บทที่ 3

ผลการวิจัย

จากการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมในตัวอสุจิจากอาสาสมัครจำนวน 11 ราย อายุระหว่าง 22-39 ปี มีจำนวนตัวอสุจิอยู่ระหว่าง 46-210 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ด้วยการใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบสำหรับโครโมโซม 13, 18, 21, X และ Y โดยวิธี Fluorescence in situ hybridization (FISH) การใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบแต่ละชนิดจะใช้กับตัวอย่างอสุจิจากอาสาสมัคร 5 ราย ในระยะแรกของการทดลองประสบปัญหาต่างๆ เช่น ตัวอสุจิมีการขยายตัวมากเกินไป เพราะความชื้นใน moist chamber มากเกินไป หรือบางครั้งตัวอสุจิมีขนาดเล็กเกินไป เพราะความชื้นใน moist chamber น้อย การ smear ไม่ดีทำให้ตัวอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่มแน่น ทำให้แยกขอบเขตของอสุจิแต่ละตัวลำบาก ไม่สามารถจะนับสัญญาณ (signal) ได้ถูกต้อง ส่วนที่บางทำให้ตัวอสุจิห่างมากไปทำให้นับได้ตัวอสุจิได้น้อย มีการหลุดของตัวอสุจิมากเกินไปเนื่องจากความแรงในขั้นตอนการล้าง หรืออุณหภูมิสูงมากเกินไป

การทดลองบางครั้งไม่ได้ผลคือไม่เห็นสัญญาณ หรือเปอร์เซนต์ของสัญญาณมีน้อยและสัญญาณไม่ชัดเจนเนื่องจาก denature solution หรือสารละลาย dithiotreitol (DTT) หรือ lithium diodosalicylate (LIS) เสื่อมคุณภาพ ดังนั้นต่อมาจึงเตรียมใหม่ทุกครั้ง ต่อมาได้นำ Proteinase K มาย่อยผนังเซลล์ของตัวอสุจิร่วมด้วยพบว่าสัญญาณที่ได้ชัดยิ่งขึ้น แต่การใช้ Proteinase K ต้องระวังเวลาในการ incubate พบว่าถ้าเกิน 20 นาที จะมีการหลุดของตัวอสุจิ ในบางครั้งการล้างหลังการไฮบริไดซ์ถ้าอุณหภูมิของสารละลายสูงเกินไปทำให้สัญญาณหลุดออกจากนิวเคลียสของตัวอสุจิในการทดลองพบว่าดีเอ็นเอตรวจตามแบบ CEP (CEP 18, X และ Y) ใช้อุณหภูมิในขั้นตอนการล้างด้วย 0.4 X SSC ใน 0.3% NP-40 ใช้อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส แต่ดีเอ็นเอตรวจตามแบบ LSI (LSI 13 และ 21) ถ้าใช้อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส สัญญาณจะหลุดออกนอกนิวเคลียสของตัวอสุจิ เมื่อลดอุณหภูมิมาที่ 70 องศาเซลเซียส พบว่าสัญญาณไม่หลุดจากนิวเคลียส สำหรับดีเอ็นเอตรวจตามโครโมโซม X และโครโมโซม Y ในอาสาสมัครรายที่หนึ่งและรายที่สองนั้น ไม่ได้อยู่ในขวดเดียวกัน ต้องนำมาผสมกันในขั้นตอนการเตรียมดีเอ็นเอตรวจตาม โดยเป็นชนิด CEP X (spectrum organe) และ CEP Y (spectrum green) ผลการทดลองให้ผลบวก (positive signal) 94.33% ตัวอย่างสัญญาณบวกของโครโมโซม X และ Y แสดงไว้ในรูปที่ 20-23 และสำหรับดีเอ็นเอตรวจตามของโครโมโซม X และ Y ในอาสาสมัครรายที่สาม รายที่สี่และรายที่ห้าเป็นแบบ

Aneuscreen ผสมกันของโครโมโซม X โครโมโซม Y และ โครโมโซม 18 CEP X (spectrum green) CEP Y (spectrum orange) CEP 18 (spectrum aqua) ให้ผลบวก 93.01%

ดีเอ็นเอตรวจตามของโครโมโซม 13 และ 21 เป็นแบบ Aneuscreen LSI 13 (spectrum green) LSI 21 (spectrum orange) ให้ positive signals 93.83% และ92.97% ดังตัวอย่างในรูปที่ 14-18 สำหรับโครโมโซม 18 ซึ่งให้ aneuscreen CEP 18, X, Y ให้ผลบวก (positive signal) 98.31% ดังตัวอย่างในรูปที่ 19 จำนวนอสุจิที่ได้ตรวจวิเคราะห์สำหรับดีเอ็นเอตรวจสอบแต่ละชนิดมีดังนี้ โครโมโซม 13 จำนวน 30,077 ตัว โครโมโซม 18 จำนวน 32,935 ตัว โครโมโซม 21 จำนวน 30,077 ตัว และโครโมโซม XY จำนวน 31,486 ตัว สัญญาณของโครโมโซม 18 จะชัดเจนมากที่สุด ในการนับสัญญาณเป็นสองตำแหน่งนั้น จะถือเอาระยะห่างระหว่างตำแหน่งสัญญาณทั้งสองนั้นต้องห่างกันประมาณครึ่งหนึ่งหรือมากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของสัญญาณที่อยู่ชิดกัน ในการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความถี่ของความผิดปกติของโครโมโซม 13, 18, 21, X และ Y และเปรียบเทียบความถี่ของความผิดปกติของโครโมโซมเหล่านี้ และศึกษาสัดส่วนระหว่างอสุจิที่นำโครโมโซม X และอสุจิที่นำโครโมโซม Y ในกลุ่มอสุจิ Control, Swim up และ Neat semen โดยใช้ Student's T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% หรือ $P < .05$ และพิจารณาให้มีความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซม 13, 18, 21 (จากตารางที่ 2-4) ชนิด disomy, diploidy และความผิดปกติทั้งหมด (total) ระหว่างกลุ่มอสุจิ Control : Swim up Control : Neat และ Swim up : Neat ไม่มีความแตกต่าง

สำหรับความผิดปกติของโครโมโซมเพศ (จากตารางที่ 5) ชนิด XY, XX, YY ระหว่างกลุ่มอสุจิ Control : Swim up Control : Neat และ Swim up : Neat ก็ไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน สำหรับอาสาสมัครรายที่ 3, 4 และ 5 ใช้ดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP 18 / CEP X / CEP Y พบ disomy XY, XX และ YY เท่ากับ 0.07%, 0.01% และ 0.00% ตามลำดับ diploidy ที่มีโครโมโซม XY, XX และ YY เท่ากับ 0.04%, 0.00% และ 0.01% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของอสุจิที่นำโครโมโซม X และอสุจิที่นำโครโมโซม Y (จากตารางที่ 6) ของกลุ่มอสุจิ control และ swim up ไม่พบความแตกต่าง แต่ในกลุ่ม neat พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < .02$

ตารางที่ 2 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซม 13 ของอสุจิ กลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

รายที่	control			swim up			neat		
	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total
3	0.049	0.049	0.098	0.066	0.000	0.066	0.097	0.048	0.145
8	0.099	0.099	0.198	0.000	0.097	0.097	0.000	0.000	0.000
9	0.148	0.099	0.247	0.147	0.000	0.147	0.000	0.098	0.098
10	0.049	0.146	0.195	0.266	0.177	0.443	0.048	0.191	0.239
11	0.000	0.280	0.280	0.044	0.265	0.309	0.096	0.144	0.240
total	0.345	0.673	1.018	0.523	0.539	1.062	0.241	0.481	0.722
เฉลี่ย	0.069	0.135	0.204	0.105	0.108	0.212	0.048	0.096	0.144

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซม 18 ของอสุจิกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

รายที่	control			swim up			neat		
	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total	disomy	diploidy	total
3	0.098	0.049	0.147	0.000	0.048	0.048	0.098	0.000	0.098
4	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.000	0.144	0.144	0.000	0.098	0.098	0.042	0.000	0.042
6	0.083	0.083	0.166	0.316	0.045	0.361	0.081	0.163	0.244
7	0.000	0.128	0.128	0.000	0.219	0.219	0.047	0.047	0.094
total	0.181	0.404	0.585	0.316	0.410	0.726	0.268	0.210	0.478
เฉลี่ย	0.036	0.081	0.117	0.063	0.082	0.145	0.054	0.042	0.096

ตารางที่4 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซม 21 ของกลุ่มอสุจิ control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

รายที่	control				swim up				neat			
	disomy	diploidy	other	total	disomy	diploidy	other	total	disomy	diploidy	other	total
3	0.049	0.049	0.000	0.098	0.099	0.000	0.000	0.099	0.049	0.049	0.000	0.098
8	0.148	0.099	0.000	0.247	0.049	0.097	0.000	0.146	0.144	0.000	0.000	0.144
9	0.000	0.099	0.000	0.099	0.098	0.000	0.000	0.098	0.049	0.098	0.000	0.147
10	0.000	0.146	0.000	0.146	0.089	0.177	0.000	0.266	0.095	0.191	0.048*	0.334
11	0.093	0.281	0.000	0.374	0.044	0.265	0.044*	0.353	0.144	0.144	0.000	0.288
total	0.290	0.674	0.000	0.964	0.379	0.539	0.044	0.962	0.481	0.482	0.048	1.011
เฉลี่ย	0.058	0.135	0.000	0.193	0.076	0.108	0.009	0.192	0.096	0.096	0.010	0.202

* พบความผิดปกติของ trisomy 21

ตารางที่ 5 แสดงเปอร์เซนต์ความผิดปกติของโครโมโซมเพศของกลุ่ม control, swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

รายที่	control				swim up				neat			
	XY	XX	YY	total	XY	XX	YY	total	XY	XX	YY	total
1	0.047	0.000	0.000	0.047	0.046	0.000	0.000	0.046	0.147	0.000	0.098	0.245
2	0.331	0.095	0.095	0.621	0.288	0.000	0.048	0.336	0.098	0.049	0.000	0.147
3	0.196	0.000	0.000	0.196	0.144	0.000	0.048	0.192	0.098	0.049	0.000	0.147
4	0.047	0.000	0.000	0.047	0.049	0.000	0.000	0.049	0.000	0.000	0.000	0.000
5	0.249	0.000	0.000	0.249	0.197	0.000	0.000	0.197	0.042	0.000	0.000	0.042
total	0.870	0.095	0.095	1.060	0.724	0.000	0.096	0.820	0.385	0.098	0.098	0.581
เฉลี่ย	0.174	0.019	0.019	0.212	0.145	0.000	0.019	0.164	0.077	0.020	0.020	0.116

ตารางที่ 6 แสดงเปอร์เซนต์ของตัวอสุจินำโครโมโซม X และโครโมโซม Y ของอสุจิกลุ่ม control swim up และ neat จากอาสาสมัคร 5 ราย

รายที่	control		swim up		neat	
	X	Y	X	Y	X	Y
1	490251	46.629	45.932	49.744	47.957	44.756
2	463549	45.788	46.801	44.829	50.172	40.020
3	48.822	46.860	49.087	45.962	46.362	46.165
4	49.348	48.183	48.031	47.496	51.227	44.492
5	43.105	44.643	42.181	45.732	46.417	43.128
เฉลี่ย	47.415	46.422	46.406	46.753	48.427	43.712

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

ตารางที่ 7 แสดงความผิดปกติโดยเฉลี่ยของโครโมโซม 13, 18 และ 21 ทั้ง disomy, diploidy และ total ในอาสาสมัครแต่ละราย

โครโมโซม	อาสาสมัครรายที่	disomy	diploidy	total
13	3	0.071	0.032	0.103
	8	0.033	0.065	0.098
	9	0.098	0.066	0.164
	10	0.121	0.171	0.292
	11	0.047	0.230	0.276
18	3	0.065	0.032	0.098
	4	0.000	0.000	0.000
	5	0.014	0.081	0.095
	6	0.160	0.097	0.257
	7	0.016	0.131	0.147
21	3	0.066	0.033	0.098
	8	0.114	0.065	0.179
	9	0.049	0.066	0.115
	10	0.061	0.171	0.249
	11	0.094	0.230	0.338

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

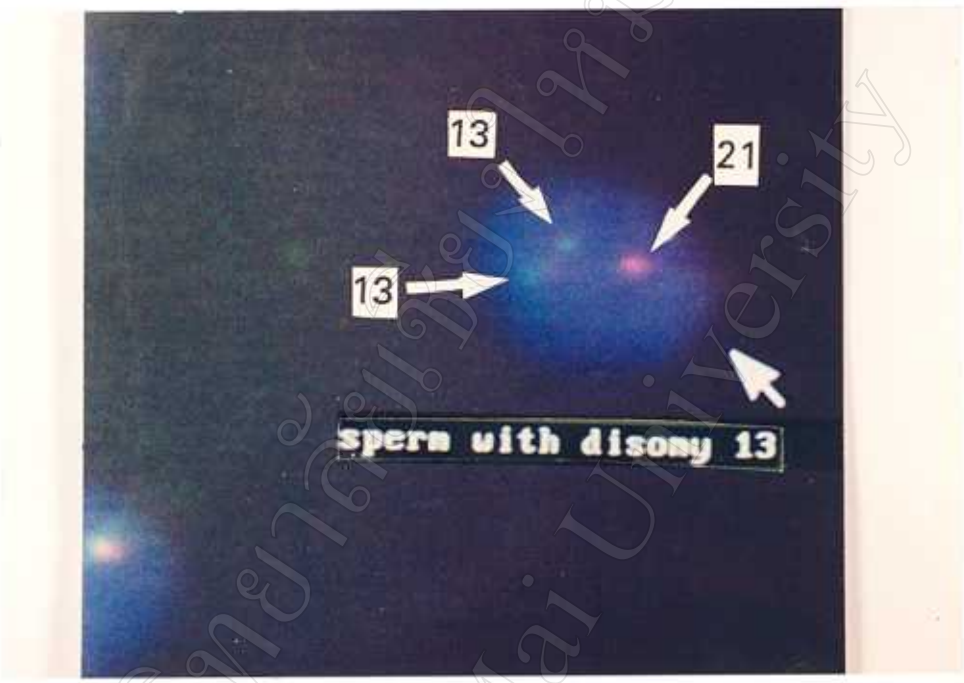
ตารางที่ 8 แสดงความผิดปกติทั้งหมดโดยเฉลี่ยของโครโมโซมเพศในอาสาสมัครแต่ละราย

อาสาสมัครรายที่	XY	XX	YY	total
1	0.080	0.000	0.033	0.113
2	0.239	0.048	0.048	0.335
3	0.146	0.016	0.016	0.178
4	0.032	0.000	0.000	0.032
5	0.163	0.000	0.000	0.163

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ Chiang Mai University

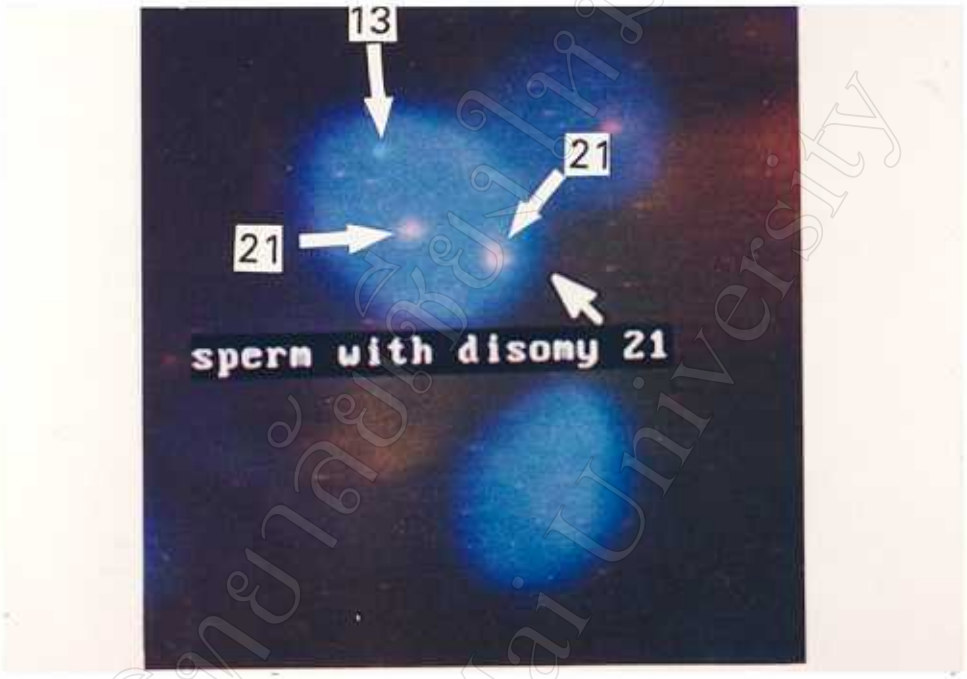
รูปที่ 14 แสดงนิวเคลียสของอสุจิที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP13 (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEP21 (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้ให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม 13 และ 21 ชนิดละ 1 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



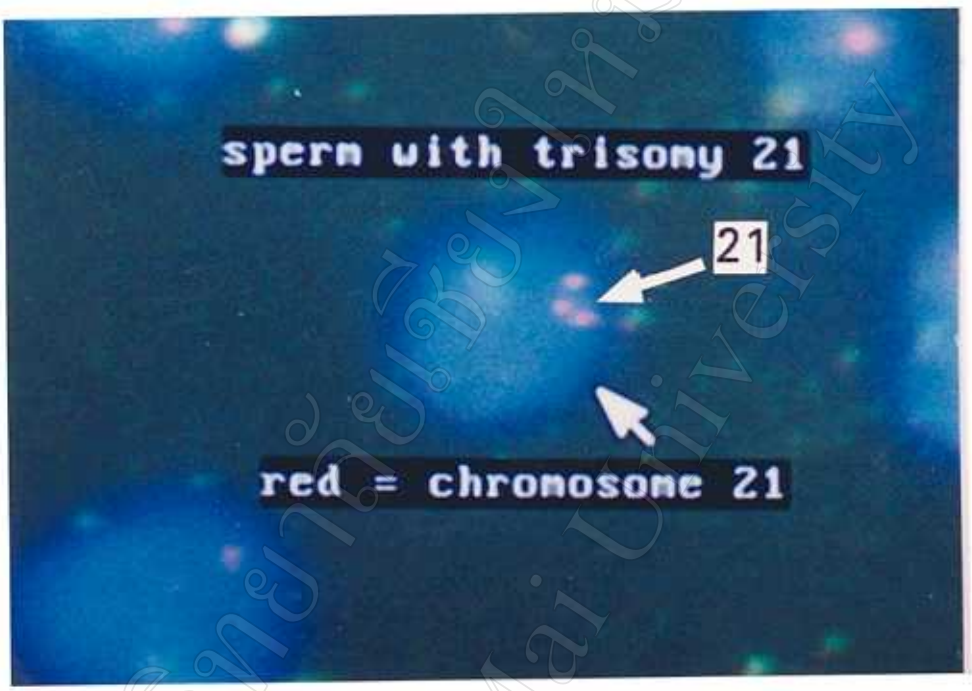
รูปที่ 15 แสดงนิวเคลียสของอสุจิที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP13 (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEP21 (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้ให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม 13 2 จุด และสำหรับโครโมโซม 21 1 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



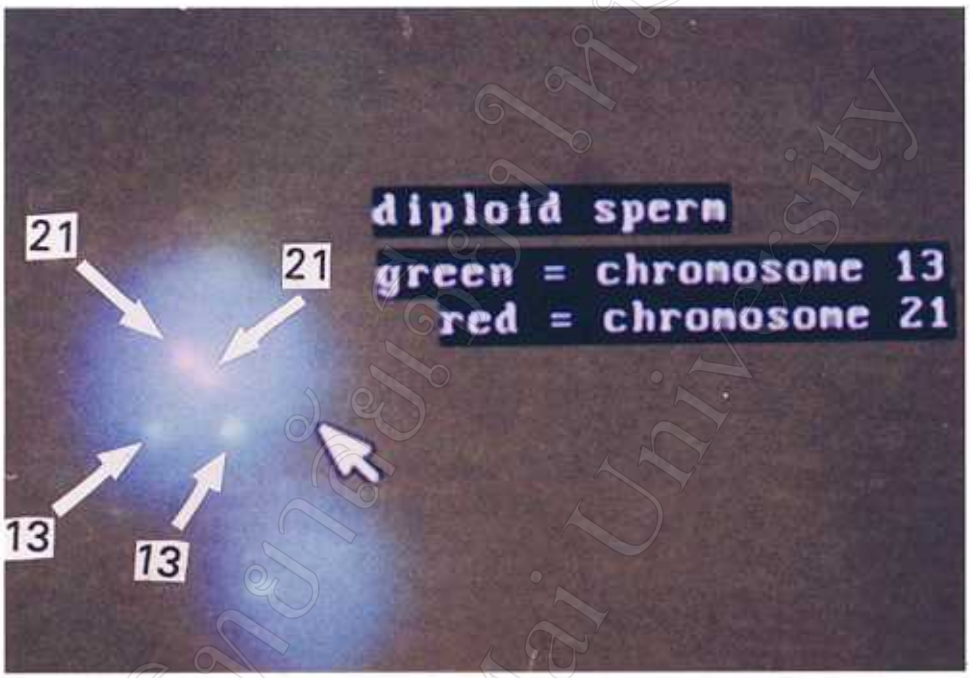
รูปที่ 16 แสดงนิวเคลียสของอสุจิไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP13 (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEP21 (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้ให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม 21 2 จุด และสำหรับโครโมโซม 13 1 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



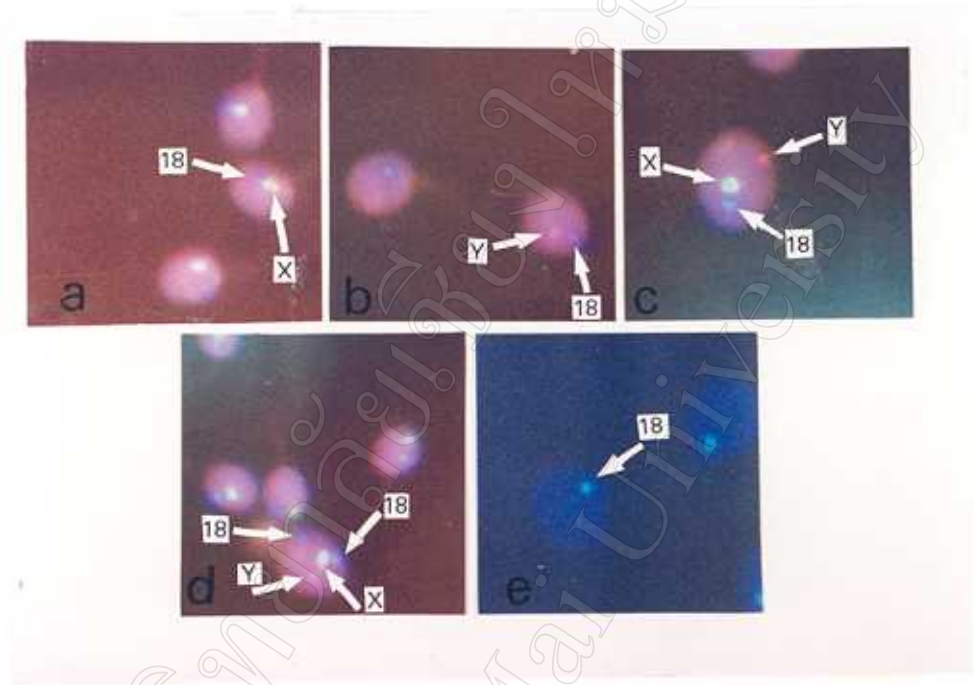
รูปที่ 17 แสดงนิวเคลียสของอสุจิไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP13 (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEP21 (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้ให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม 21 3 จุด และสำหรับโครโมโซม 13 1 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 18 แสดงนิวเคลียสของอสุจิไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP13 (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEP21 (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้ให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม 13 2 จุด และสำหรับโครโมโซม 21 2 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 19 แสดงนิวเคลียสของอสุจิไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEP18 (ฟลูออเรสเซนซ์สีน้ำเงิน) และ CEPX (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) และ CEPY (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง)

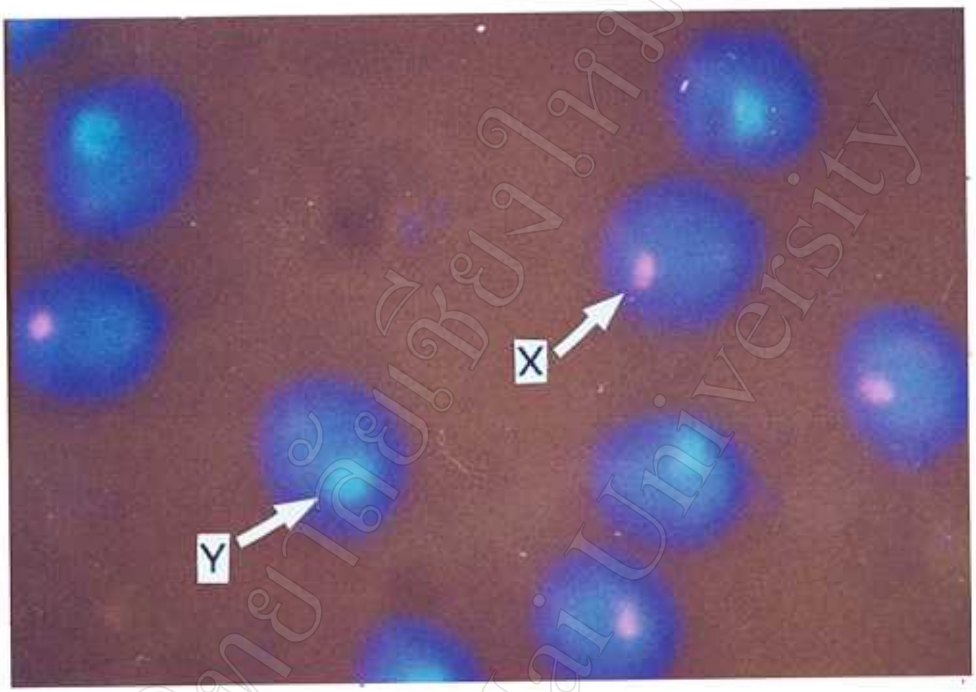
a) อสุจิที่นำโครโมโซม X และโครโมโซม 18 1 ตัว

b) อสุจิที่นำโครโมโซม Y และโครโมโซม 18 1 ตัว

c) อสุจิที่นำทั้งโครโมโซม X และ Y (ลูกศรชี้)

d) อสุจิที่เป็น diploidy นิวเคลียสให้สัญญาณสำหรับโครโมโซม X, Y และโครโมโซม 18 2 จุด (ลูกศรชี้)

e) อสุจินำโครโมโซม 18 (ฟลูออเรสเซนซ์สีฟ้า)

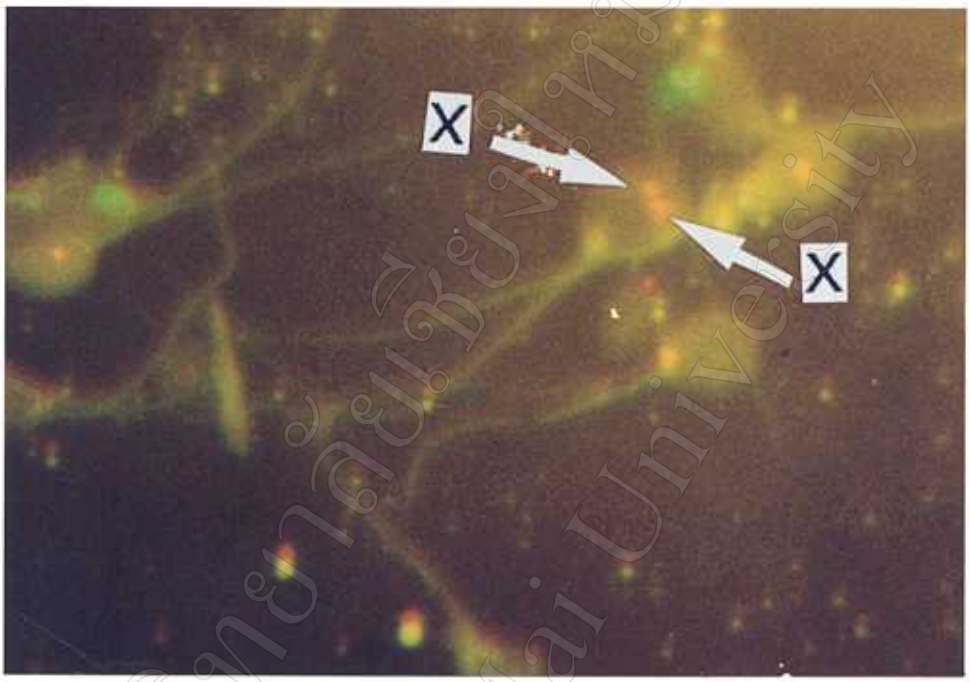


รูปที่ 20 แสดงนิวเคลียสของอสุจิที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEPX (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) และ CEPY (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) อสุจิที่นำโครโมโซม X จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีแดง อสุจิที่นำโครโมโซม Y จะให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University

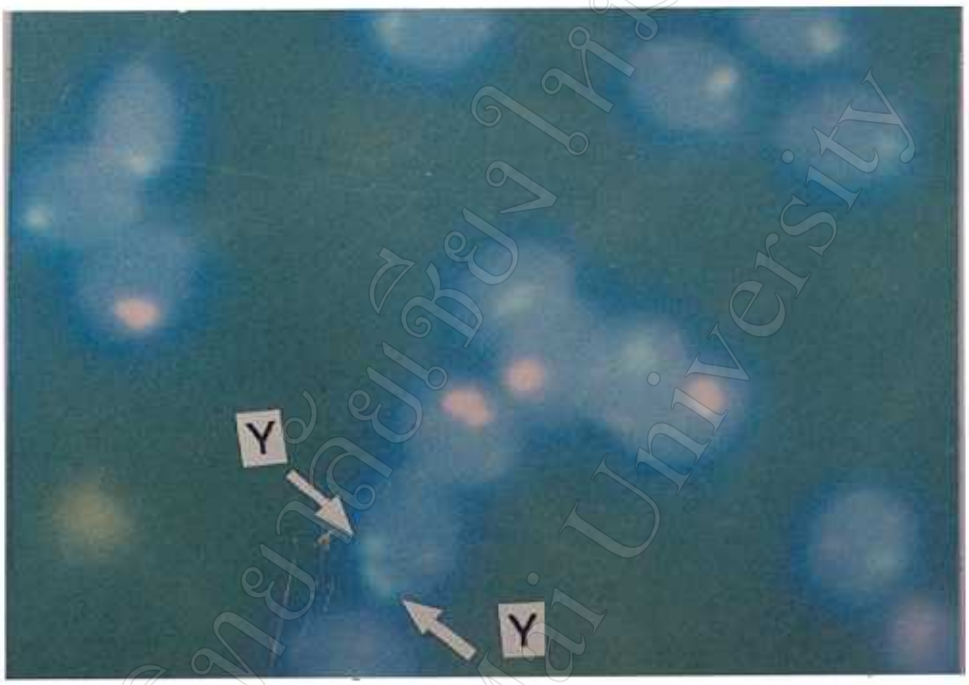
รูปที่ 21 แสดงนิวเคลียสของอสุจิที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEPX (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) และ CEPY (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) นิวเคลียสที่ลูกศรชี้แสดงอสุจิที่นำโครโมโซม X และ Y

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 22 แสดงนิวเคลียสของอสุจิ (ลูกศรชี้) ที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEPX (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) และ CEPY (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีแดง 2 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University



รูปที่ 23 แสดงนิวเคลียสของอสุจิที่ไฮบริไดซ์ด้วยดีเอ็นเอตรวจสอบ CEPX (ฟลูออเรสเซนซ์สีแดง) และ CEPY (ฟลูออเรสเซนซ์สีเขียว) ตรงลูกศรชี้แสดงอสุจิที่ให้สัญญาณฟลูออเรสเซนซ์สีเขียวสำหรับโครโมโซม Y 2 จุด

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Chiang Mai University