

บทที่ 4

อภิปรายผลการค้นคว้า

งานค้นคว้าแบบอิสระนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบโอกาสการตรวจพบหลักฐานการกระทำชำเรา ระหว่างการตรวจหาดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่ง DYS390 กับ การตรวจหาตัวสุจิจากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย ผู้ค้นคว้าได้เลือกใช้วิธีการตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ก่อนนำไปแยกเส้นดีเอ็นเอด้วย Acrylamide gel electrophoresis แล้วย้อมเจดด้วยเทคนิค Silver staining เพื่อให้ปรากฏแถบดีเอ็นเอ ดังแสดงไว้ในภาพ 7 และ 8

ในภาพ 7 แสดงถึงการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน (ช่องที่ 1) กับแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอของผู้ชายที่ทราบชนิดของอัลลีลในตำแหน่ง DYS390 มาเป็นดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สาเหตุที่ต้องเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของตัวอย่างดังกล่าวกับแถบดีเอ็นเอมาตรฐานก็เพราะต้องการตรวจสอบว่าแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นมานั้นอยู่ในช่วงขนาดที่เราต้องการหรือไม่ และผลจากการทดลองแยกแถบดีเอ็นเอดังกล่าว พบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วงระหว่าง 200-250 bp เนื่องจากการตรวจสอบขนาดของแถบดีเอ็นเอในครั้งนี้ ผู้ค้นคว้าได้ใช้ตัวอย่างเลือดจากผู้ชาย 3 คน ที่ทราบชนิดของอัลลีลแน่นอน คือ อัลลีล 24, อัลลีล 25 และอัลลีล 26 (ช่องที่ 2, 3 และ 4 ตามลำดับ) มาเป็นตัวอย่างในการตรวจสอบ ดังนั้น ช่วงขนาดของดีเอ็นเอที่ได้จึงอยู่ในช่วงที่มากกว่า 200 bp ซึ่งก็มีขนาดที่ใกล้เคียงกับข้อมูลจากงานวิจัยอื่นๆที่ได้ค้นคว้ามา คือ ดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์บนโครโมโซมเพศชายในตำแหน่ง DYS390 จะมีลักษณะการจัดเรียงของเบสเป็นชุดๆ ที่ซ้ำกันประมาณ 21-27 ซ้ำ โดยลำดับเบสที่ซ้ำกันจะมีอยู่ 2 ชนิด คือ TCTA และ TCTG ซึ่งทั้งหมดจะมีช่วงขนาดประมาณ 190 - 220 bp ถ้าใช้ primer F: 5'-TATATTTTACACATTTTGGGCC-3' และ R: 5'-TGACAGTAAAATGAACACATTGC-3' ดังแสดงในภาพ 6 และหลังจากที่ได้ทำการตรวจสอบช่วงขนาดดีเอ็นเอของตัวอย่างเลือดจากผู้ชายดังกล่าวแล้ว และผลก็แสดงให้เห็นว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ในช่วงขนาดที่ต้องการ จึงได้ใช้เลือดของผู้ชายทั้ง 3 คนนี้มาสร้างแถบอัลลีลมาตรฐาน ดังแสดงไว้ในภาพ 7 ช่องที่ 5 ซึ่งเป็นการเรียงตัวของแถบดีเอ็นเอ อัลลีล 24, อัลลีล 25 และอัลลีล 26 ตามลำดับ (เรียงจากแถบล่างขึ้นบน)

หลังจากได้อัลลีลมาตรฐานแล้ว ผู้ค้นคว้าจึงใช้อัลลีลมาตรฐานนี้เป็นตัวเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่ตรวจได้จากตัวอย่างน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย และประเมินชนิดของอัลลีล พบว่าค่าความถี่ของอัลลีลที่เจอใกล้เคียงกับที่พบในกลุ่มประชากรชายชาวเอเชียตะวันออก (Chun et al., 2005, Hara et al., 2007) จึงน่าจะเชื่อได้ว่าแถบดีเอ็นเอดังกล่าวเป็นอัลลีลของผู้ชายที่ปนเปื้อนมาจริง

การทดลองนี้ผู้ค้นคว้าใช้เลือดของผู้หญิง และน้ำซับช่องคลอดที่ปราศจากการร่วมเพศ (ตรวจพบเซลล์เยื่อบุช่องคลอด แต่ตรวจไม่พบ AP และตัวอสุจิ) เป็นตัวควบคุมการทดลอง (Negative control) เพื่อแสดงถึงความจำเพาะ (Specific) ของ primer ที่ใช้อยู่ ว่าจะมีความจำเพาะต่อดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศชาย (Y-chromosome) หรือไม่ ถ้า primer ที่ใช้มีความจำเพาะต่อโครโมโซมเพศชายจริง ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดและเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของผู้หญิงจะต้องไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอให้เห็น (ภาพ 8) และเนื่องจากน้ำซับช่องคลอดที่ใช้เป็นตัวควบคุมมีสภาพสิ่งแวดล้อมทุกอย่างเหมือนกับในตัวอย่างที่นำมาศึกษา ต่างเพียงไม่มีอสุจิ ดังนั้น จึงเป็นตัวควบคุมที่เหมาะสมที่สุด

จากผลการตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 อาจารย์ระบุจำนวนอัลลีลโดยประมาณของผู้กระทำชำเรา (ภาพ 8 และ ตาราง 2) จากผลการแยกแถบดีเอ็นเอจะเห็นว่าในช่องที่ 16, 17 และ 23 อาจบอกได้ว่าเป็นอัลลีลที่ 25, 25 และ 24 ตามลำดับ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นตรงกับแถบอัลลีลมาตรฐานที่ใช้เปรียบเทียบพอดี ส่วนในช่องที่ 6, 9 และ 24 แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นอยู่ต่ำกว่าแถบของอัลลีลมาตรฐานเล็กน้อย ซึ่งประมาณได้ว่าเป็นอัลลีลที่ 23 ส่วนในช่องที่ 21 จะเห็นว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งลักษณะเช่นนี้อาจช่วยบอกได้ว่าผู้เสียหายรายนี้ถูกกระทำชำเราจากผู้ชาย 2 คน

ในตาราง 3 แสดงข้อมูลเปรียบเทียบผลการตรวจพบตัวอสุจิตับลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 จากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย โดยแสดงผลเป็นคู่ๆ ตามที่ตรวจพบ ซึ่งลักษณะของผลการทดลองทั้ง 60 คู่ สรุปไว้ในตาราง 4 ดังนี้ ตรวจไม่พบทั้งตัวอสุจิและ DYS390 18 ตัวอย่าง ตรวจไม่พบตัวอสุจิแต่พบ DYS390 12 ตัวอย่าง ตรวจพบตัวอสุจิแต่ไม่พบ DYS390 7 ตัวอย่าง และตรวจพบทั้งตัวอสุจิตับ DYS390 23 ตัวอย่าง เมื่อทดสอบสมมติฐานที่ว่า “โอกาสของการตรวจพบดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 แตกต่างจากโอกาสของการตรวจพบตัวอสุจิ จากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหาย” โดยเลือกใช้ McNemar chi-square test เพราะเป็นการทดสอบความแตกต่างระหว่างข้อมูลในการวัด 2 ครั้ง จากกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน (หรือกลุ่มตัวอย่างเดิม) ซึ่งพบว่า โอกาสของการตรวจพบดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 ไม่มีความแตกต่างจากการตรวจพบตัวอสุจิ จากน้ำซับช่องคลอดของผู้เสียหายอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.359$)

แตเมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์แยกเป็นกลุ่มย่อยๆตามปริมาณของตัวอสุจิที่ตรวจพบ จะพบว่า ในตัวอย่างที่ตรวจไม่พบตัวอสุจิทั้ง 30 ตัวอย่าง แต่สามารถตรวจพบลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 ได้ถึง 12 ตัวอย่าง (40%) สาเหตุอาจเกิดจากข้อบกพร่องของวิธีการตรวจหาตัวอสุจิแบบ Oppitz test เพราะเป็นการตรวจที่ใช้ปริมาณตัวอย่างจากน้ำซั้บช่องคลอดเพียงเล็กน้อย (ประมาณ 3 ไมโครลิตร) หยดบนแผ่นสไลด์ ก่อนนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างที่นำมาตรวจจะไม่มีตัวอสุจิตัดมาด้วย จึงทำให้ตรวจไม่พบ หรืออีกกรณีหนึ่งอาจเกิดจากความผิดพลาดของผู้ตรวจ เนื่องจากความเพื่อยของสายตาที่ต้องใช้กล้องเป็นเวลานานๆ ทำให้ตรวจไม่พบตัวอสุจิได้เช่นกัน แต่ในตัวอย่างน้ำซั้บช่องคลอดของผู้เสียหายอาจจะมีตัวอสุจิปนอยู่ ดังนั้นเมื่อนำมาตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอบนโครโมโซมเพศชายจึงสามารถตรวจพบได้ เพราะการสกัดดีเอ็นเอที่ใช้ในการค้นคว้าครั้งนี้ใช้วิธีสกัดแบบไม่แยกชนิดเซลล์ จากน้ำซั้บช่องคลอดทั้งหมดที่สกัดจากไม้สวอบ

การสกัดดีเอ็นเอแบบไม่แยกชนิดเซลล์ อาจทำให้ได้ดีเอ็นเอจากเซลล์อื่นของผู้ชายที่ไม่ใช่ตัวอสุจิปนมาด้วย เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว ที่พบได้มากในชายที่มีการอักเสบของระบบสืบพันธุ์และทางเดินปัสสาวะ ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวอาจปนมากับการล้างอสุจิขณะที่มีเพศสัมพันธ์ได้ หรืออาจพบเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) ซึ่งเกิดจากการเสียดสีของอวัยวะเพศขณะกระทำการชำเรา ทำให้เซลล์เยื่อบุผิวหลุดลอกแล้วปนอยู่กับเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของผู้เสียหาย ซึ่งในกรณีเช่นนี้ จะเห็นว่าเป็นประโยชน์มากต่อคดีที่มีผู้ต้องสงสัยเป็นหมันหรือเป็นคนที่มีความอสุจิน้อย (azoospermic semen) ซึ่งโอกาสในการตรวจพบตัวอสุจินี้น้อยมาก หรืออาจตรวจไม่พบเลย และในรายที่ผู้กระทำการชำเราใช้ส่วนอื่นของร่างกาย เช่น นิ้วมือ กระทำต่ออวัยวะเพศของผู้เสียหาย วิธีการตรวจการหาลักษณะดีเอ็นเอ อาจเป็นวิธีที่ทำให้พบหลักฐานการกระทำการชำเราได้เช่นกัน เนื่องจากมีโอกาสที่เซลล์ผิวหนังจากนิ้วมือจะหลุดติดมากับผู้เสียหาย

ประโยชน์ของการตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอ คือช่วยเพิ่มโอกาสในการตรวจพบหลักฐานการกระทำการชำเราได้มากกว่าการตรวจหาตัวอสุจิเพียงอย่างเดียว และนอกจากนั้นยังพบว่า โอกาสในการตรวจพบลักษณะดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์ ตำแหน่ง DYS390 จะแปรตามปริมาณของอสุจิในตัวอย่าง คือ ในตัวอย่างที่พบตัวอสุจิปริมาณ 1+ สามารถตรวจเจอ DYS390 43% ตัวอย่างที่พบตัวอสุจิปริมาณ 2+ สามารถตรวจเจอ DYS390 83% และตัวอย่างที่พบตัวอสุจิปริมาณ 3+ สามารถตรวจเจอ DYS390 ได้ทั้งหมด (100%) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Kondo และคณะ ในปี ค.ศ. 1997 ที่พบว่าในคราบตัวอย่างส่งตรวจที่มีจำนวนตัวอสุจิน้อยๆ ไม่สามารถตรวจพบลักษณะหรือรูปแบบ DNA ของผู้ต้องสงสัยได้เลย ส่วนคราบตัวอย่างส่งตรวจที่พบตัวอสุจิจำนวนมากๆ สามารถตรวจพบรูปแบบของ DNA ได้ทั้งหมด

จากการค้นคว้าในครั้งนี้ ยังสังเกตพบว่า นอกจากตัวอย่างที่ตรวจไม่พบตัวอสุจิแล้ว ยังมีตัวอย่างที่ตรวจพบตัวอสุจิประมาณ 1+ และ 2+ บางส่วนที่ตรวจไม่พบลักษณะดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 สาเหตุอาจเป็นเพราะความผิดพลาดในบางขั้นตอนของวิธีการสกัดดีเอ็นเอ เช่น ในขั้นตอนการล้างตะกอนด้วยน้ำกลั่น อาจมีตะกอนบางส่วนหลุดติดไปกับน้ำที่ดูดทิ้ง ซึ่งตะกอนส่วนนั้นอาจมีตัวอสุจิติดไปด้วยจึงทำให้ในน้ำสกัด มีปริมาณดีเอ็นเอจากตัวอสุจิน้อย หรืออาจเกิดจากขั้นตอนของการใช้สารละลาย Proteinase K เพื่อทำลายโปรตีนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสารละลาย Proteinase K ที่ใช้อาจมีความเข้มข้นน้อยเกินไป จึงทำลายโปรตีนที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ไม่สมบูรณ์ ดีเอ็นเอจึงไม่สามารถหลุดออกจากเซลล์ได้ทั้งหมด ทำให้ไม่มี DNA template สำหรับใช้เป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ หรือแม้กระทั่งในขั้นตอนของการต้มน้ำสกัดดีเอ็นเอในน้ำเดือด เพื่อทำลายการทำงานของ Proteinase K ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารละลาย Proteinase K ถูกทำลายไม่หมด เมื่อนำตัวอย่างน้ำสกัดดีเอ็นเอไปใช้ในกระบวนการ PCR สารละลาย Proteinase K ที่เหลืออยู่จึงไปทำลาย DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญในการช่วยสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ แต่เมื่อเอนไซม์ตัวนี้มีปริมาณลดลงการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ก็จะลดลงตามไปด้วย จึงเป็นเหตุให้ตรวจไม่พบลักษณะดีเอ็นเอในตัวอย่างที่ตรวจพบตัวอสุจิได้ เช่นกัน หรือสาเหตุอาจเกิดจากวิธีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอแบบไม่แยกชนิดเซลล์ ทำให้ในน้ำสกัดดีเอ็นเอมีปริมาณดีเอ็นเอของผู้เสียหาย (หรือเพศหญิง) ปนอยู่มาก จนกลายเป็นตัวกีดขวางการจับกันระหว่าง primer กับ ดีเอ็นเอเป้าหมาย (Target DNA) ถ้าเป็นปัญหานี้อาจแก้ไขโดยเปลี่ยนไปใช้วิธีสกัดแบบการย่อยสลายแยกส่วน (Differential extraction) แทน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Dekairelle และ Hoste ในปี ค.ศ. 2001 และ Nascimento ในปี ค.ศ. 2009 ที่แนะนำให้ใช้วิธีนี้ ร่วมกับการตรวจหา STRs เพราะวิธีนี้จะมีขั้นตอนการย่อยสลายแยกส่วนเอาเซลล์เยื่อช่องคลอดออกมาก่อน ให้เหลือไว้แต่เฉพาะเซลล์อสุจิแล้วทำการย่อยตัวอสุจิอีกครั้งหนึ่ง แต่ก็มีข้อควรระวัง คือ ในขณะที่ย่อยเซลล์เยื่อช่องคลอดด้วย Proteinase K ไม่ควรใช้เวลานานเกิน 2 ชั่วโมง เพราะเซลล์อสุจิอาจถูกย่อยสลายไปด้วย

อีกสาเหตุหนึ่งที่น่าจะเป็นปัจจัยทำให้การตรวจพบดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลท์ ตำแหน่ง DYS390 ได้น้อย คือ ขนาดของ PCR product มีขนาดใหญ่ ทำให้ยากต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ในขบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ซึ่งแนวทางแก้ไขปัญหาคือ การออกแบบ primer คู่ใหม่ ที่ทำให้ขนาดของ PCR product สั้นลง แต่ปัญหาของดีเอ็นเอในตำแหน่ง DYS390 คือ มีชุดเบสซ้ำจำนวนมาก ตั้งแต่ 21-27 ซ้ำ ซึ่งยากต่อการทำให้ PCR product สั้นลงได้ เพราะถึงแม้จะออกแบบ primer ให้ชิดกับ Tandem ขนาดของ PCR product ที่ได้ยังคงสูงกว่า 100 bp ดังนั้น อาจต้องใช้ดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลท์ บนโครโมโซมเพศชาย ตำแหน่งอื่นที่มีขนาดของ PCR product สั้นกว่าตำแหน่ง DYS390 เพราะเชื่อว่าน่าจะมีความไวต่อการตรวจหาลักษณะดีเอ็นเอได้มากกว่า