

การตรวจความผิดปกติของโครโมโซม X ในด้านจำนวน

ด้วยวิธี Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

Determination of numerical X chromosome abnormality by

Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย ปณิดดา โรจน์พิบูลสถิตย์ และ ศศิรัช กังสดาลอำไพ

สาขาชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12121

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาความผิดปกติด้านจำนวนโครโมโซม X ในอสุจิของชายไทยที่มีสุขภาพดี โดยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ซึ่งสังเกตผลจากสัญญาณเรืองแสงที่จำเพาะต่อโครโมโซม X หลังจากมีการเข้าสู่เบสของดีเอ็นเอติดตามซึ่งติดสารเรืองแสง (ในที่นี้คือ CEP X DNA probe) กับดีเอ็นเอของอสุจิ โดยอสุจิปกติชนิดที่มีโครโมโซม X (อสุจิ X) จะปรากฏสัญญาณเรืองแสงเพียงจุดเดียว แต่หากอสุจิ X มีความผิดปกติชนิดที่มีจำนวนโครโมโซม X มากกว่าหนึ่งแท่งก็จะปรากฏสัญญาณเรืองแสงหลายจุด งานวิจัยนี้ได้ทำการตรวจความผิดปกติในอสุจิของชายไทย 6 ราย อายุเฉลี่ย 36.5 ± 3.6 ปี โดยน้ำอสุจิที่ได้มีคุณสมบัติทางกายภาพอยู่ในเกณฑ์ปกติคือ ปริมาตรน้ำอสุจิเฉลี่ย 3.65 ± 0.9 มล. pH เฉลี่ย 8.2 ± 0.2 และจำนวนอสุจิเฉลี่ย 86.4 ± 26.6 ล้านตัว/มล. ผลการตรวจอสุจิจำนวน 8,153 เซลล์พบว่า เป็นอสุจิ X เฉลี่ย 45.48 ± 0.06 % รวมทั้งมีอสุจิ X ที่มีจำนวนโครโมโซม X ผิดปกติเฉลี่ย 0.28 ± 0.23 % ความผิดปกติส่วนใหญ่ที่สามารถตรวจพบได้ชัดเจนคือความผิดปกติที่เป็นชนิด XX

Abstract

Numerical X-chromosome abnormality was investigated in sperm cells of healthy Thai men using Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) technique. Specific-X-fluor signal was able to be detected after hybridization of fluorescent DNA probe (CEP X) to sperm X DNA. Binding of the probe to the normal X-bearing spermatozoa (which contains only one X-chromosome) produced one fluorescent signal whereas multiple signals would be observed in the abnormal cell containing extra X-chromosome. Six male donors with the age of 36.5 ± 3.6 years were participated in this project. The physical qualities of their semen samples were within normal limits : semen volume was 3.65 ± 0.9 ml with pH of 8.2 ± 0.2 and sperm count was 86.4 ± 26.6 million cells/ml. Among the 8,153 spermatozoa analyzed, half of them were X-bearing sperms (45.48 ± 0.06 %). Moreover, a small number of those with additional X-chromosome (0.28 ± 0.23 %) were also detected and most of them were XX.

1. บทนำ

โครโมโซมของคนมีจำนวน 46 โครโมโซม ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกายหรือออโตโซม (autosome) 22 คู่ และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) 1 คู่ ผู้หญิงจะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 46,XX และผู้ชายมีจำนวนโครโมโซมเป็น 46,XY หากมีความผิดปกติของโครโมโซมเกิดขึ้น (พบได้ไม่ต่ำกว่า 0.5% ของทารกแรกคลอด) มักก่อให้เกิดโรค ความผิดปกติของโครโมโซมแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ ประเภทแรกเป็นความผิดปกติด้านโครงสร้าง (structural abnormality) เช่น โรค Prader Willi Syndrome มีลักษณะโครโมโซมเป็น 46,XX or XY,del(15)q11-q13 คือมีการขาดหายไปบางส่วนของโครโมโซมแท่งที่ 15 เด็กที่เป็นโรคนี้จะมีลักษณะอ้วนเตี้ย ปัญญาอ่อน ประเภทที่สองเป็นความผิดปกติของโครโมโซมด้านจำนวน (numerical abnormality) เช่น โรค Down Syndrome มีลักษณะโครโมโซมเป็น 47,XX or XY,+21 คือมีโครโมโซมแท่งที่ 21 เกินมาหนึ่งแท่ง เด็กจะปัญญาอ่อน เติบโตช้า มีความผิดปกติของกระดูก กล้ามเนื้อและอวัยวะภายใน โรค Turner Syndrome ลักษณะโครโมโซมเป็น 45,X คือมีโครโมโซม X ขาดหายไป 1 แท่ง เด็กหญิงที่เกิดมาจะรูปร่างเตี้ย หน้าอกไม่เจริญเท่าปกติ ไม่มีประจำเดือน มีปัญหาของระบบหัวใจและไต โรค Klinefelter syndrome ลักษณะโครโมโซมเป็น XXY เด็กชายกลุ่มนี้ไม่มีโครโมโซม X เกินมา 1 แท่ง มีอวัยวะเพศชายที่เล็กผิดปกติ อสุจิน้อยหรือไม่มี และมักเป็นหมัน ความผิดปกติของโครโมโซมมีหลายแบบและก่อให้เกิดโรคที่เป็นปัญหาทั้งต่อตนเองและสังคม ดังนั้นจึงมีการคิดค้นหาวิธีการต่างๆ ในการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมตั้งแต่ก่อนคลอดโดยอาศัยเซลล์จากน้ำคร่ำ วิธีที่ใช้กันส่วนใหญ่ในปัจจุบันคือการทำ Karyotype และย้อมด้วยวิธี Q-หรือ G-banding ซึ่งเป็นการเรียงดูความผิดปกติของโครโมโซมที่ย้อมสีด้วยเทคนิคพิเศษ ทำให้เกิดแถบสีที่มีลักษณะจำเพาะบนโครโมโซมทุกคู่ ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องอาศัยความละเอียดอ่อนตลอดจนความชำนาญของผู้เชี่ยวชาญที่ต้องฝึกฝนการอ่านผลโดยเฉพาะ และใช้เวลาค่อนข้างมากประมาณ 7-14 วันจึงทราบผล เนื่องจากต้อง

เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากการเจาะน้ำคร่ำของหญิงตั้งครรภ์ อีกวิธีหนึ่งซึ่งเริ่มถูกนำมาใช้วิเคราะห์โครโมโซมคือ เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) โดยการนำ DNA probe มาติดฉลากด้วยสารเรืองแสง ซึ่ง DNA probe นั้นจะจับกับโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง ความผิดปกติของโครโมโซมจะถูกตรวจพบจากการเรืองแสงของ DNA probe ภายใต้การมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ วิธีนี้สามารถรายงานผลได้เร็วภายใน 24-48 ชั่วโมงเพราะไม่จำเป็นต้องมีการเลี้ยงเพิ่มจำนวนเซลล์และให้ความถูกต้องแม่นยำสูง [1] เทคนิคนี้เริ่มได้รับความนิยมในการวินิจฉัยก่อนคลอด (Prenatal Diagnosis) จากเซลล์ในน้ำคร่ำ ทั้งยังเหมาะกับการวินิจฉัยเซลล์ตัวอ่อน (Preimplantation Genetic Diagnosis) เนื่องจากสามารถตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ตัวอ่อน (blastomere) ในเวลาอันสั้น ทำให้สามารถนำเซลล์ตัวอ่อนที่คาดว่าจะมีความสมบูรณ์ที่สุดไปฝังในมดลูกได้ทันที นอกจากนั้นยังสามารถใช้เทคนิคนี้ในการตรวจวิเคราะห์ห่อสุจิว่าเป็นชนิด X หรือ Y (haploid X-chromosome bearing sperm or haploid Y-chromosome bearing sperm) ก่อนนำไปใช้ในการสร้างเด็กหลอดแก้วได้อีกด้วย [2].

คณะผู้วิจัยได้ประยุกต์ใช้เทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) ตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมด้านจำนวนในอสุจิตัวอย่างที่ได้จากชายไทยที่มีสุขภาพดี ผู้วิจัยเลือกศึกษาเพียงโครโมโซมเดียวคือโครโมโซม X เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมด้วยวิธี FISH ผลที่ได้รับจากการวิจัยนั้นนอกจากจะสามารถนำไปประยุกต์กับการตรวจโครโมโซมแท่งอื่นๆ แล้วยังเป็นข้อมูลพื้นฐานของสาเหตุระดับอนุโมเลกุลในกลุ่มชายไทยที่มีบุตรยาก รวมทั้งเป็นการรองรับโครงการผลิตเด็กหลอดแก้วซึ่งเปิดบริการที่โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาเสริมในการเรียนการสอนวิชาเวชพันธุศาสตร์ได้เป็นอย่างดี

2. อุปกรณ์และวิธีการ

นำน้ำอสุจิเก็บใหม่จากอาสาสมัครชายที่มีสุขภาพดีและให้การยินยอมในการทำวิจัยครั้งนี้ มาวัดปริมาตรและ pH และหาจำนวนอสุจิด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (hemacytometer) เพื่อปรับตัวอย่างให้มีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 100,000-300,000 เซลล์/มล. แล้วจึงนำไปหยดลงบนแผ่นสไลด์ 200 μ l จากนั้นตรึงอสุจิบนแผ่นสไลด์ด้วยการแช่สไลด์ในสารละลาย cold fixative (75% methanol : 25% acetic acid) ประมาณ 15 นาที ล้างสไลด์ด้วย 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0) ผึ่งให้แห้งสนิทแล้วจึงหยดสารละลาย 50 mM dithiothreitol ใน 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 200 μ l ลงบนแผ่นสไลด์ที่ตรึงอสุจิไว้ ปิดแผ่นสไลด์ด้วย coverslip ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เพื่อให้มีการคลายเกลียวของดีเอ็นเอที่อัดแน่นในหัวอสุจิ เมื่อครบเวลาแล้วจึงล้างสไลด์ด้วย 2X SSC และผึ่งให้แห้ง จากนั้นหยดสารละลาย CEP X DNA probe (Vysis, U.S.A.) ในน้ำยา hybridization buffer ลงบนสไลด์ (ตามสูตรสำหรับน้ำยา DNA probe 1 ชนิด) ปิดแผ่นสไลด์ด้วย coverslip และเก็บใส่กล่องสไลด์ที่มิด นำไปอบที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 5 นาทีเพื่อให้ดีเอ็นเอของ probe และ DNA ของอสุจิแยกเป็นสายเดี่ยว เมื่อครบเวลาจึงเก็บสไลด์ในกล่องที่ชื้น (humidified box) ที่อุณหภูมิ 42 °C เพื่อให้เกิดการเข้าคู่ของดีเอ็นเอ (hybridization) เป็นเวลา 45 นาที แล้วจึงล้างสไลด์ด้วย 0.4X SSC แล้วผึ่งให้แห้ง จากนั้นจึงย้อมด้วยสารเรืองแสง DAPI 20 μ l เพื่อย้อมนิวเคลียสให้ติดสีฟ้าม่วง ตรวจสอบการติดสีของสารเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ฟิลเตอร์ที่เป็น single-band pass ของสีเขียว ทำให้เซลล์อสุจิที่มีโครโมโซม X เรืองแสงสีเขียวที่บริเวณเซนโตรเมียร์

อนึ่งได้ทำการศึกษาโครโมโซม Y ด้วย CEP Y DNA probe (Vysis, U.S.A.) ที่ติดสารเรืองแสง rhodamine สีแดง โดยใช้วิธีการทำนองเดียวกัน แต่แทนที่ CEP X DNA probe ด้วย CEP Y DNA probe ตรวจสอบการติดสีของสารเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ฟิลเตอร์ที่เป็น

single-band pass ของสีส้ม rhodamine ทำให้เซลล์อสุจิที่มีโครโมโซม Y เรืองแสงสีแดง นอกจากนั้นยังได้ทำการศึกษาแบบ Dual-color FISH assay โดยใช้ CEP X DNA probe และ CEP Y DNA probe ทั้งคู่พร้อมกัน ซึ่งวิธีนี้เป็นการศึกษาประหยัดเวลาและน้ำยาด้วย โดยเปลี่ยนแปลงสัดส่วนน้ำยาของ DNA probe ตามสูตรสำหรับน้ำยา DNA probe 2 ชนิด

สัดส่วนสำหรับ 1 สไลด์ในการเตรียมน้ำยา DNA probe 1 ชนิด

CEP X DNA probe หรือ CEP Y DNA probe	1	μ l
Hybridization buffer	12	μ l
Steriled highly purified water	2	μ l

สัดส่วนสำหรับ 1 สไลด์ในการเตรียมน้ำยา DNA probe 2 ชนิด

สำหรับ Dual-color FISH assay

CEP X DNA probe	1	μ l
CEP Y DNA probe	1	μ l
Hybridization buffer	12	μ l
Steriled highly purified water	1	μ l

สังเกตผลโดยการเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ โดยใช้ฟิลเตอร์ที่เป็น triple-band pass สำหรับ DAPI/fluorescein/rhodamine จะเห็นโครโมโซม X เรืองแสง fluorescein สีเขียว โครโมโซม Y เรืองแสง rhodamine สีแดง และนิวเคลียสเรืองแสง DAPI สีฟ้าม่วง

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

การศึกษาวีเคราะหจำนวนโครโมโซม X ในอสุจิของอาสาสมัครชายไทยที่มีสุขภาพดี 6 คน ซึ่งมีอายุระหว่าง 36.5 $\pm$ 3.6 ปี เมื่อนำน้ำอสุจิมาวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพโดยวัดปริมาตรน้ำอสุจิและจำนวนอสุจิตลอดจนค่า pH พบว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ คือมีปริมาณน้ำอสุจิเฉลี่ย 3.65 $\pm$ 0.93 มล. (ค่ามาตรฐานของ WHO > 2 มล.) ปริมาณอสุจิเฉลี่ย 86.4 $\pm$ 26.6 ล้านเซลล์/มล.น้ำอสุจิ (ค่ามาตรฐานของ WHO > 20 ล้านเซลล์/มล.) และค่า pH เฉลี่ย 8.2 $\pm$ 0.25

(ค่ามาตรฐานของ WHO > 7.2) ดังแสดงในตารางที่ 1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมด้วยวิธี single-color FISH assay โดยอาศัย CEP X หรือ CEP Y DNA probe และการตรวจวิเคราะห์จำนวนโครโมโซมด้วยวิธี dual-color FISH assay โดยอาศัยทั้ง CEP X DNA probe และ CEP Y DNA probe ได้แสดงในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนโครโมโซม X ด้วยวิธี Fluorescence *In Situ* Hybridization โดยอาศัย CEP X DNA probe พบว่าค่าเฉลี่ยของอสุจิ X เท่ากับ $45.76 \pm 0.06\%$ (ตารางที่ 2) ซึ่งใกล้เคียงกับค่าที่มีการรายงานมาก่อน [3,4,5] โดยค่าเหล่านี้ต่างใกล้เคียง 50% สำหรับการวิเคราะห์หาความผิดปกติในด้านจำนวนของโครโมโซม X นั้น ในการวิจัยนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีจำนวนโครโมโซม X ผิดปกติเฉลี่ย $0.28 \pm 0.23\%$ เมื่อพิจารณาเฉพาะอสุจิ X พบว่ามีจำนวนโครโมโซม X ผิดปกติอยู่ $0.60 \pm 0.56\%$ ซึ่งความผิดปกติด้านจำนวนของโครโมโซม X ที่ศึกษาในค่อนข้างจะมีความแตกต่างกันในแต่ละบุคคล โดยบางคนพบความผิดปกติค่อนข้างมาก บางคนพบปานกลาง บางคนไม่พบความผิดปกติเลย ความผิดปกติที่สามารถตรวจสอบได้ส่วนใหญ่ในการศึกษาอสุจิทั้งหมด 8,153 เซลล์ คือ การเรืองแสงของโครโมโซม X เป็น 2 จุด กล่าวคือ เป็นความผิดปกติชนิด XX นอกจากนั้นยังพบอสุจิ 1 เซลล์ที่มีการเรืองแสงเป็น 3 จุด (XXX)

อย่างไรก็ตามเนื่องจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาความผิดปกติในด้านจำนวนของโครโมโซม X เพียงแห่งเดียว ดังนั้นความผิดปกติที่ตรวจวิเคราะห์ได้คือ เซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม X เกิน (ดังเช่น XX, หรือ XXX) แต่ไม่สามารถประเมินความผิดปกติของเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซม X หายไป หรือที่เรียกว่า nullisomy รวมทั้งไม่สามารถแยกความผิดปกติที่เป็น aneuploidy (เช่น disomy XX ที่มีโครโมโซม X เกินมา 1 แห่ง) ออกจากความผิดปกติที่เป็นแบบ polyploidy (เช่น diploid XX มีโครโมโซมเกินมา 1 ชุด คือ โครโมโซมแห่งที่ 1-23 เพิ่มขึ้นทุกแห่ง) เนื่องจากความผิดปกติทั้งสองประเภทให้สัญญาณเรืองแสง 2 จุดเช่นกัน จิราพรณ์และเอนก [5] รายงานการใช้วิธีแยกโดยอาศัยขนาดของหัวอสุจิเป็นสำคัญ นั่นคือถ้า

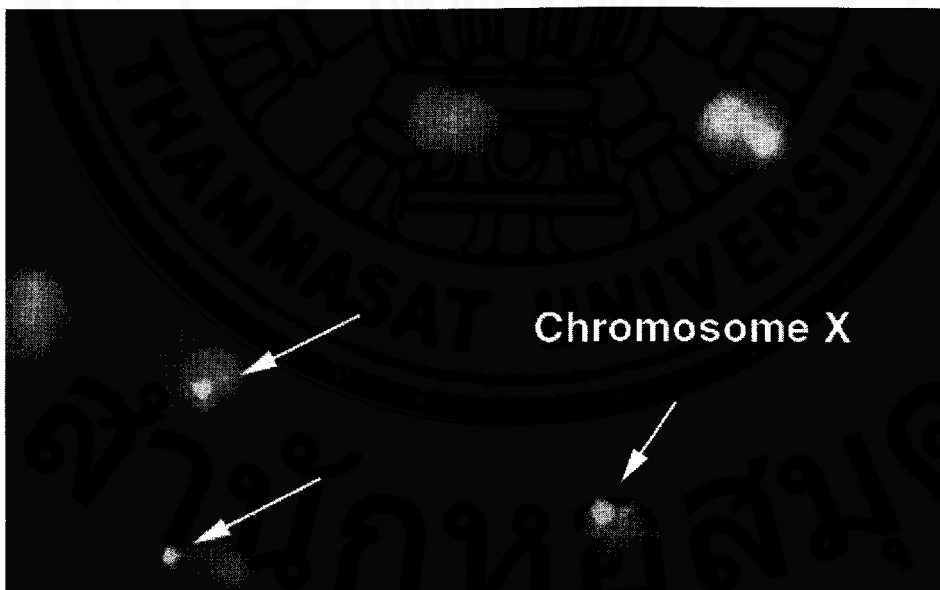
พบสัญญาณเรืองแสง 2 จุดอยู่ในหัวนิวเคลียสที่ขนาดปกติ ความผิดปกติเป็น disomy แต่หากสัญญาณเรืองแสง 2 จุดนี้อยู่ในหัวนิวเคลียสที่ขนาดใหญ่กว่าปกติ 2-4 เท่าจะจัดเป็น diploid อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่าหัวอสุจิที่มีโครโมโซม X จะมีขนาดใหญ่กว่าหัวอสุจิที่มีโครโมโซม Y เนื่องจากมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่าประมาณ 2.8 % [6] ดังนั้นการแยกอสุจิที่เป็น disomy และอสุจิที่เป็น diploid โดยใช้ขนาดของหัวอสุจิต้องอาศัยประสบการณ์และความชำนาญ ปัจจุบันได้มีการศึกษาโครโมโซมร่างกายร่วมด้วย เช่น โครโมโซมแห่งที่ 18 เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ทำให้สามารถแยกกลุ่ม disomy และ diploid ได้ชัดเจนมากขึ้น เพราะการที่หัวอสุจิปรากฏสัญญาณเรืองแสงของโครโมโซม X เป็น 2 จุด แต่มีสัญญาณเรืองแสงของโครโมโซม 18 เป็น 1 จุด แสดงว่าอสุจินั้นมีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม X เป็นแบบ disomy แต่หากหัวอสุจิปรากฏสัญญาณเรืองแสงของโครโมโซม X เป็น 2 จุด และสัญญาณเรืองแสงของโครโมโซม 18 เป็น 2 จุดเช่นกัน ย่อมแสดงว่าอสุจินั้นมีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม X เป็นแบบ diploid นอกจากนี้การใช้โครโมโซมแห่งที่ 18 เป็นตัวควบคุมภายใน ยังเพิ่มความน่าเชื่อถือในการ hybridization เนื่องจากการใช้โครโมโซม X เพียงแห่งเดียวนั้นไม่สามารถบอกได้ว่าอสุจิที่ไม่มีสัญญาณแสงเป็นเพราะมีโครโมโซมเพศเป็นโครโมโซม Y หรือมีความผิดพลาดในขั้นตอนการ hybridization การใช้โครโมโซมแห่งที่ 18 ควบคู่ไปด้วยจึงสามารถบ่งชี้ประสิทธิภาพของขั้นตอนการ hybridization ได้ชัดเจนมากขึ้น

สำหรับผลการตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของจำนวนของโครโมโซม X เท่ากับ 0.28 % นี้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับที่มีรายงานมาก่อน [4,5,7,8] และเพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการติดสัญญาณ DNA probe โดยเฉพาะในกลุ่มที่ไม่มีการติดสีของสารเรืองแสง จึงได้ทำการวิเคราะห์เพิ่มเติมโดยใช้ CEP Y DNA probe เข้าร่วมในการวิจัยเพื่อยืนยันการติดสีของสารเรืองแสง ซึ่งผลการวิเคราะห์นำอสุจิของชายไทยที่มีสุขภาพดี 2 ราย พบว่าการติดสีของสารเรืองแสงทั้งโครโมโซม X และโครโมโซม Y พร้อมกัน (Dual color FISH assay) ได้ผลยืนยันว่าประสิทธิภาพการติดสีของสารเรืองแสงด้วยเทคนิค FISH นั้นมีความจำเพาะเจาะจงและความถูกต้องแม่นยำสูง โดยพบว่ามี การติดสีของสารเรืองแสงของโครโมโซมเพศในแทบทุก

เซลล์ ค่าเฉลี่ยของเซลล์อสุจิที่มีโครโมโซม X คิดเป็น $51.66 \pm 0.07\%$ ค่าเฉลี่ยของเซลล์อสุจิที่มีโครโมโซม Y คิดเป็น $41.85 \pm 0.02\%$ (ตารางที่ 3) ค่าดังกล่าวแตกต่างเล็กน้อยจากการศึกษาโดยใช้ CEP X DNA probe เพียงอย่างเดียวอาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาโดยใช้ DNA probe 2 ชนิดก็เป็นได้ การวิเคราะห์โดยใช้ DNA probe 2 ชนิดในงานวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์สำคัญเพียงเพื่อเป็นการยืนยันและเพิ่มความเชื่อมั่นในการใช้ DNA probe ชนิดเดียวว่าการติดสีของสารเรืองแสงนั้นเชื่อถือได้จริง อย่างไรก็ตาม การใช้ DNA probe 2 ชนิดพร้อมกันนั้นยังมีประโยชน์อื่นอีกมากซึ่งต้องทำการวิจัยในระดับลึกเพิ่มเติม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาถึงประสิทธิภาพการ hybridization ในเทคนิค FISH ซึ่งมีรายงานถึงความแตกต่างกันเล็กน้อยระหว่างห้องปฏิบัติการแต่ละแห่ง [2,6,9,10,11]

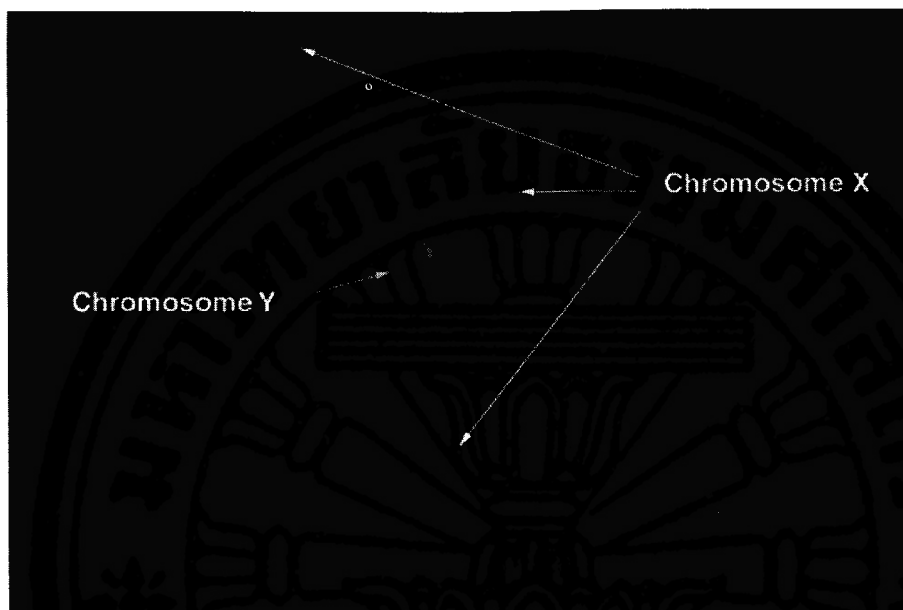
การตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซมโดยใช้เทคนิค FISH นี้ต้องมีความละเอียดและได้รับการควบคุมทุกชั้น

ตอน ปริมาณของอสุจิที่กระจายบนแผ่นสไลด์ที่ทดสอบไม่มากหรือน้อยเกินไป ต้องมีการกระจายของอสุจิบนแผ่นสไลด์มากที่สุดเพื่อไม่ให้เกิดการทับซ้อนกันของเซลล์ หากอสุจิมักไปอาจทำให้เกิดการซ้อนทับของเซลล์ได้ง่าย ทำให้สัญญาณเลือนออกมาไม่ชัดเจน หากอสุจิมักน้อยเกินไปทำให้เป็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นตัวติดตามซึ่งมีราคาแพง (ราคาขณะนี้ประมาณ 27,000 บาทต่อการใช้ DNA probe 1 ชนิด ต่อ 20 สไลด์) นอกจากนั้นเวลาที่ใช้ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอหรือเวลาที่ใช้ในการเข้าสู่ของดีเอ็นเอ ตลอดจนการล้างเอา DNA probe ที่ค้างอยู่ทิ้งไป ต่างมีผลต่อประสิทธิภาพการติดสารเรืองแสงบนโครโมโซมที่ต้องการทั้งสิ้น โดยอาจทำให้เกิดการไม่ติดสารเรืองแสงในที่ควรจะมี (ผลลบลง) หรือมีเจนนี้อาจทำให้มีการติดสารเรืองแสงขึ้นในที่ซึ่งไม่ควรจะมี (ผลบวกลง) นอกจากนั้นสไลด์ที่ผ่านการมวี้แล้ว ต้องได้รับการเก็บรักษาที่ดีในกล่องเก็บสไลด์ที่มีดและเก็บที่อุณหภูมิต่ำที่ช่องเยือกแข็ง หากนำมาใช้อ่านสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงนานๆ จะทำให้เสื่อมสภาพได้และไม่สามารถนำมาอ่านผลได้อีก



รูปที่ 1 ภาพแสดงการติดสารเรืองแสง fluorescein ของ CEP X DNA probe บน โครโมโซม X ของอสุจิ

โดยใช้ฟิลเตอร์ชนิด single band pass (fluorescein monochrome)



รูปที่ 2 ภาพแสดงการติดสารเรืองแสง fluorescein ของ CEP X DNA probe บน โครโมโซม X และการติดสารเรืองแสง rhodamine ของ CEP Y DNA probe บน โครโมโซม Y และการติดสารเรืองแสง DAPI ของนิวเคลียสของอสุจิ โดยใช้ฟิลเตอร์ชนิด triple-band pass (fluorescein/rhodamine/DAPI)

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางกายภาพของน้ำอสุจิจากอาสาสมัครชายที่มีสุขภาพดี

อาสาสมัครชายคนที่	อายุ (ปี)	pH	ปริมาณน้ำอสุจิ (มิลลิลิตร)	ปริมาณอสุจิ (ล้านเซลล์/มิลลิลิตร)
1	40.0	8.0	3.7	119.7
2	38.0	8.0	3.0	52.3
3	39.0	8.0	2.7	71.2
4	38.0	8.0	5.0	66.7
5	31.0	8.5	4.5	104.9
6	33.0	8.5	3.0	103.6
ค่าเฉลี่ย (mean)	36.5	8.2	3.6	86.4
S.D.	3.6	0.2	0.9	26.6

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซม X ในด้านจำนวน

อาสาสมัครชาย คนที่	จำนวนอสุจิที่ ตรวจวัด	จำนวนอสุจิ X	จำนวนอสุจิ X ที่ผิดปกติ	% จำนวนอสุจิ X ที่ ผิดปกติ/จำนวน อสุจิทั้งหมด	% จำนวนอสุจิ X ที่ ผิดปกติ/จำนวนอสุจิ X
1	1041	489	0	0	0
2	1180	671	6	0.51	0.89
3	1003	417	6	0.60	1.44
4	2122	933	1	0.05	0.11
5	1763	711	2	0.11	0.28
6	1044	468	4	0.38	0.85
รวม	8153	3689	19		
Mean				0.28	0.60
S.D.				0.25	0.56

ตารางที่ 3 ผลการตรวจวิเคราะห์จำนวนโครโมโซม X และ Y ด้วย Dual-Color FISH Assay

ตัวอย่างอสุจิ ลำดับที่	จำนวนอสุจิ X	จำนวนอสุจิ Y	จำนวนอสุจิที่ ตรวจวัด	% จำนวนอสุจิ X	% จำนวนอสุจิ Y
1	489	417	1041	46.97	40.06
2	671	515	1180	56.36	43.64
Mean				51.66	41.85
S.D.				0.07	0.02

4. สรุป

สำหรับงานวิจัยบุกเบิกในการตรวจวิเคราะห์โครโมโซมในด้านจำนวนด้วยวิธี FISH ในห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ นับว่าให้ผลสำเร็จอย่างยิ่ง ผลการวิจัยครั้งนี้จัดเป็นงานวิจัยพื้นฐานที่ทำให้ทราบระดับความผิดปกติของโครโมโซมในด้านจำนวนที่เกิดขึ้นในคนที่มีสุขภาพดี โดยค่าที่ได้สามารถใช้เป็นค่าขั้นต่ำของระดับความผิดปกติในด้านจำนวนของโครโมโซม X ที่เกิดได้ (cut off value: 0.28%) โดยอาจใช้เป็นค่าเปรียบเทียบเพื่อดูความเสี่ยงต่อการเกิดปัญหาทางพันธุกรรมในบุคคลที่มีความเสี่ยงสูง เช่น มีประวัติบุคคลในครอบครัวมีปัญหาทางพันธุกรรมหรือบุคคลที่ทำงานเสี่ยงในโรงงานอุตสาหกรรมที่ต้องสัมผัสหรือใกล้ชิดกับสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้งานวิจัยชิ้นนี้ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการศึกษาความผิดปกติในด้านจำนวนของโครโมโซมอื่นๆ ต่อไป โดยเฉพาะกับโครโมโซมที่ก่อให้เกิดปัญหาของโรคพันธุกรรมต่างๆ เช่น โครโมโซม 13, 18, และ 21 เป็นต้น การศึกษาวิจัยต่อไปอาจช่วยให้รู้ถึงสาเหตุของปัญหาโรคทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นเพื่อใช้เป็นพื้นฐานการป้องกันหรือการบำบัดรักษาโรคต่อไป นอกจากนี้ยังเป็นงานวิจัยพื้นฐานสำหรับรองรับงานบริการและงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับ FISH เช่น การตรวจวิเคราะห์หาความผิดปกติของโครโมโซมของบลาสโตเมอร์ก่อนที่จะเข้าสู่อการคลอดเด็กหลอดแก้ว การตรวจวิเคราะห์เพื่อป้องกันปัญหาทางพันธุกรรมของ X-linked diseases และ Down Syndrome การตรวจวินิจฉัยผู้ป่วยที่มี Philadelphia chromosome ในโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิดที่เป็น chronic myelogenous leukemia (CML) [12] เป็นต้น

5. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณอุบล ช่วงสูงเนิน อาจารย์นายแพทย์เจริญไชย เจียมจรรยา และอาจารย์นายแพทย์สวัสดิ์ไตรตรึงษ์ศานา หน่วยผู้มีบุตรยาก โรงพยาบาลธรรมศาสตร์เฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี และ สาขาวิชาสูติ-นรีเวชศาสตร์ สถานวิทยาศาสตร์ปริคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัย

ธรรมศาสตร์ ในการให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างสูง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะกรรมการส่งเสริมการวิจัยเสริมหลักสูตร มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปีงบประมาณ 2542

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] Lichter, P. and Cremer, T., Chapter 6 : Chromosome Analysis by Non-isotropic *in situ* Hybridization, In Rooney, D.E. and Czepulkowski, B.H. eds., Human Cytogenetics, A Practical Approach, Vol. I., Second Edition, Oxford University Press, New York, 1992.
- [2] Liu, J., Zheng, X.Z., Baramki, T.A., Yazigi, R.A., Compton, G., and Katz, E., Ultrarapid Detection of Sex Chromosomes with the Use of Fluorescence *in situ* Hybridization with Direct Label DNA Probes in Single Human Blastomeres, Spermatozoa, Aminocytes, and Lymphocytes, *Fertil. Steril.* 70 (5) : 927-932, 1998.
- [3] Han, T.L., Ford, J.H., Webb, G.C., Flaherty, S.P., Correll, A., and Matthews, C.D., Simultaneous Detection of X-and Y-bearing Human Sperm by Double Fluorescence *in situ* hybridization, *Mol. Reprod. Dev.* 34 (3) : 308-313, 1993.
- [4] Wyrobek, A.J., Robbins, W.A., Mehraein, Y., Pinkel, D., and Weier, H.U., 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.* 53 (1): 1-7, 1994.
- [5] จิราพรณ์ เหมี่ยมวิจาวณ์ และ อนนก อารีพรพร, บทที่ 16: Sex Chromosome Analysis of Human Spermatozoa. น. 271-280. ใน นรเศรษฐเจริญ, อภิวัฒน์ มุทิรากร และ ยง

- สุวรรณธรณ. (ผู้รวบรวม) อนุชีวิวิทยาทางการแพทย์, บริษัท เท็กซ์แอนด์เจอร์นัลพับลิเคชั่น จำกัด, กรุงเทพฯ, 624 น., 2541.
- [6] Fugger, E.F., Black, S.H., Keyvanfar, K., and Schulman, J.D., Births of Normal Daughters after Micro Sort Sperm Separation and Intrauterine Insemination, *in vitro* Fertilization, or Intracytoplasmic Sperm Injection, Hum. Reprod. 13 (9) : 2387-2395, 1998.
- [7] Shi, Q., and Martin, R.H., Aneuploidy in Human Sperm: A Review of the Frequency and Distribution of Aneuploidy, Effects of Donor Age and Lifestyle Factors, Cytogenet. Cell Genet. 90 (3-4) : 219-226, 2000.
- [8] Lu, P.Y., Hammitt, D.G., Zinsmeister, A.R., and Dewald, G.W., 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. 62 (2) : 394-399, 1994.
- [9] Martinez-Pasarell, O., Marquez, C., Coll, M., Egozcue, J., and Templado, C., Analysis of Human Sperm-derived Pronuclei by Three-colour Fluorescent *in situ* Hybridization, Hum. Reprod. 12 (4) : 641-645, 1997.
- [10] Vidal F., Fugger, E., Blanco, J., Keyvanfar, K., Catala, V., Norton, M., Hazelrigg, W., Black, S., Levinson, G., Egozcue, J., and Schulman, J., Efficiency of Microsort Flow Cytometry for Producing Sperm Populations Enriched in X- or Y- Chromosome Haplotypes : A Blind Trial Assessed by Double and Triple Colour Fluorescent *in situ* Hybridization, Hum. Reprod. 13 (2) : 308-312, 1998.
- [11] Shi, Q., and Martin, R.H., Spontaneous Frequencies of Aneuploid and Diploid Sperm in 10 Normal Chinese Men :Assessed by Multicolor Fluorescence *in situ* Hybridization, Cytogenet. Cell Genet. 90 (1-2) : 79-83, 2000.
- [12] Hess, G., Reifenrath, C., Friedrich-Frekka, A., Beyer, V., Naumann, S., Schuch, B., Huber, C., Fischer, T., and Decker, H., Autologous Transplantation of *in vivo* Purged PBSC in CML : Comparison of FISH, Cytogenetics, and PCR Detection of Philadelphia Chromosome in Leukapheresis Products, Cancer Genet. Cytogenet. 117 (1) : 1-8, 2000.