สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจสอบโครโมโซมเพศในอสุจิของชายที่สูบบุหรี่

นางสาว ชัญภัทร พรหมศร
นาย อภิชาติ กฤษณะประสิทธิ์

ปพ.
ว 416ก
2548
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 72597
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550
b 11769865
i.....

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Detection of Sex Chromosome in Smokers' Sperm

Thanyaphat Promson

Apichart Kidsanapasit

A Special Project Submitted in Partial of the Requirement for

the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institue of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การตรวจสอบโครโมโซมเพศในอสุจิของชายที่สูบบุหรี่
นักศึกษา	นางสาวธัญภัทร พรหมศร รหัส 46050124
	นายอภิชาติ กฤษณะประสิทธิ์ รหัส 46050152
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การตรวจสอบโครโมโซมเพศในอสุจิของชายที่สูบบุหรี่		
ผู้ดำเนินโครงงาน	นางสาวธัญภัทร	พรหมศร	46050124
	นายอภิชาติ	กฤษณะประสิทธิ์	46050152
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ		
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์		
ปีการศึกษา	2549		
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม		

บทคัดย่อ

บุหรี่มีสารเคมีหลายชนิดที่ส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้สูบบุหรี่ได้แก่โรคหัวใจและมะเร็งปอด ในสารเคมีเหล่านั้นมีสารก่อกลายพันธุ์รวมอยู่ด้วย ซึ่งสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ได้ ในการศึกษานี้ทำการศึกษาจำนวนโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย ในชายอายุ 18-30 ปี จำนวน 10 คน แบ่งเป็นกลุ่มชายที่สูบบุหรี่จำนวน 5 คน และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่เป็นกลุ่มควบคุมจำนวน 5 คน โดยศึกษาโครโมโซม X และ Y ด้วยเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH) ผลที่ได้พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของลักษณะของจำนวนโครโมโซมเพศที่ผิดปกติชนิด YY ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่เป็น 6.40±3.362 (ค่าเฉลี่ยเลขคณิต±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่เป็น 1.40±1.140 นอกจากนี้ยังพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของลักษณะความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศทั้งหมด ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และกลุ่มควบคุม (14.40±3.507 และ 6.20±1.304 ตามลำดับ) จากการศึกษาอาจกล่าวได้ว่าการสูบบุหรี่เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศในผู้ที่สูบบุหรี่ มีโอกาสเกิดภาวะมีบุตรยากและหรือมีโอกาสในการมีบุตรที่มีความผิดปกติทางโครโมโซมเพศได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Detection of sex chromosome in smokers' sperm	
Name	Miss Thanyaphat Promson	46050124
	Mr. Apichart Kidsanapasit	46050152
Program	Biotechnology	
Department	Applicd Biology	
Academic Year	2006	
Special Project advisor	Asst. Prof. Dr. Supattar Poeaim	

ABSTRACT

There are many chemical compounds in cigarette. They can cause several diseases on smokers such as heart disease and lung cancer. Mutagen is also found in cigarette which induces numerical chromosome aberration on gamete cells. In this experiment, sex chromosomes of 10 sperm's donors from 18 to 30 years old were studied (five non-smokers as the control group and five smokers as the test group). X and Y chromosome were detected with DNA probes by Fluorescence in situ hybridization (FISH). The results showed the significant difference in YY disomy between test group and control group (6.40±3.362 and 1.40±1.140, respcctively) ($P<0.05$) (mean±SD). The results also showed the significant difference in total sex chromosomes abnormality (14.40±3.507 and 6.20±1.304, respectively) ($P<0.05$). Our study indicates that smoking cigarette causes infertile and numerical of sex chromosome aberration.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษฉบับนี้ได้ทำการตรวจสอบโครโมโซมเพศในชายที่สูบบุหรี่ซึ่งการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ได้รับเสนอผลงานในงานลาดกระบังนิทรรศ พุทธศักราช 2549 โดยเป็นหนึ่งในผลงานเด่นทางด้านการแพทย์ โครงงานนี้จะสำเร็จลุล่วงด้วยดีมิได้ หากขาดความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษซึ่งกรุณาถ่ายทอดวิชาความรู้และเทคนิคต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษนี้ อีกทั้งประพฤติตนเป็นแบบอย่างที่ดี ให้ข้าพเจ้าได้เรียนรู้และนำเอาไปปฏิบัติเป็นแบบอย่าง และขอขอบคุณ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ กรรมการที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ที่ให้ความอนุเคราะห์ให้ความรู้เพิ่มเติมและช่วยตรวจทานแก้ไขรูปเล่มโครงงานพิเศษนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นายแพทย์วีรยุทธ ประพันธ์พจน์ สถาบันราชานุกูล ในการอนุเคราะห์เชื้อ *E. coli* และอบรมเทคนิคที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์คลชาติ ตันติวานิช อาจารย์ประจำภาควิชาสถิติประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่เสียสละเวลาอันมีค่าให้คำปรึกษาการวิเคราะห์ข้อมูลผลการทดลองทางสถิติ ทำให้ผลการทดลองครั้งนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวก ในการเบิกยืมและใช้อุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำโครงงานพิเศษครั้งนี้ รวมถึงเพื่อน สาขาเทคโนโลยีชีวภาพรุ่น 20 ที่คอยให้กำลังใจเสมอมา

ความสำเร็จครั้งนี้อาจไม่เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ถ้าหากขาดกำลังใจจากพ่อและแม่ ขอกราบขอบพระคุณ พ่อและแม่ ผู้คอยให้กำลังใจ ดูแลและห่วงใยอย่างใกล้ชิดเสมอมา เมื่อยามท้อแท้และเหน็ดเหนื่อยจากการทำโครงงานพิเศษหรือเรื่องต่างๆ เพียงคำพูดและความเข้าใจจากท่าน ประหนึ่งน้ำทิพย์ชโลมจิตใจให้มีแรงลุกขึ้นสู้ต่ออุปสรรคต่อไป

ธัญภัทร พรหมศร

อภิชาติ กฤษณะประสิทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ข
กิตติกรรมประกาศ.....ค
สารบัญ.....ง
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ซ
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
2.1 การสร้างอสุจิ.....3
2.2 รูปร่างและลักษณะของอสุจิ.....3
2.2.1 ส่วนหัว.....3
2.2.2 ส่วนคอและลำตัว.....3
2.2.3 ส่วนหาง.....4
2.3 ลักษณะและค่าตัวแปรของน้ำอสุจิ.....5
2.4 ลักษณะที่ผิดปกติของอสุจิ.....5
2.5 การแบ่งเซลล์สืบพันธุ์.....7
2.6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม.....9
2.6.1 ยูพลอยดี้.....9
2.6.2 อะนิวพลอยดี้.....9
2.7 อะนิวพลอยดี้ ที่เกิดในมนุษย์.....11
2.7.1 Autosomal aneuploidy.....11
2.7.1.1 Downsyndrome.....11
2.7.1.2 Patua syndrome.....12
2.7.1.3 Edwards syndrome.....12
2.7.2 Sex chromosomal aneuploidy.....13
2.7.2.1 Turner syndrome.....13
2.7.2.2 Klinefelter Syndrome.....13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.7.2.3 Triplo - X....14
2.7.2.4 Double - Y....14
2.8 Fluorescence in situ hybridization (FISH)....14
2.8.1 ขั้นตอนของเทคนิค FISH....15
2.9 สารเคมีในบุหรี่....15
2.10 สถานการณ์การสูบบุหรี่ในประเทศไทย....16
2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....19
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง....23
3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง....23
3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี....23
3.2.1 การเก็บตัวอย่างอสุจิ....23
3.2.2 การเลี้ยงเชื้อ....23
3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ....24
3.2.4 การทำอิเลคโตรโฟรีซิส....24
3.2.5 การทำ Nick Translation และการตกตะกอนตัวติดตาม....24
3.2.5.1 การทำ Nick Translation โดยใช้ชุดทำ Nick Translation สำเร็จรูปของVysis....24
3.2.5.2 การตกตะกอนตัวติดตาม....25
3.2.6 การเตรียมสไลด์....25
3.2.7 การทำเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)....26
3.2.7.1 การเตรียมสไลด์....26
3.2.7.2 การทำเทคนิค FISH....26
3.3 วิธีการทดลอง....27
3.3.1 การเก็บตัวอย่างอสุจิ....27
3.3.2 การเลี้ยงเชื้อ *E.Coli* ที่มียีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล....27
3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin....28
3.3.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ....28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.5 การทำ Nick translation และการตกตะกอนตัวติดตาม.....29
3.3.5.1 การทำ Nick translation โดยใช้ชุด Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis.....29
3.3.5.2 การทำอิเลคโตรโฟรีซิส.....29
3.3.5.3 การตกตะกอนตัวติดตาม.....30
3.3.6 การเตรียมสไลด์.....30
3.3.7 การทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH).....31
3.3.7.1 การเตรียมสไลด์.....31
3.3.7.2 การทำเทคนิค FISH.....32
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....33
4.1 ผลการทดลอง.....33
4.1.1 การศึกษากลุ่มตัวอย่าง.....33
4.1.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin.....33
4.1.3 การทำ Nick translation.....34
4.1.4 การศึกษารูปร่างของอสุจิ.....35
4.1.5 การทำเทคนิค FISH.....36
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....41
เอกสารอ้างอิง.....42
ภาคผนวก.....45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ค่าของตัวแปรน้ำอสุจิที่ปกติตามหลักขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี 1987 และ ปี 1992 6

2.2 ค่าของการเคลื่อนที่ของอสุจิปกติต่อการหลั่ง 1 ครั้งตามหลักขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี 1987 และ ปี 1992.....6

2.3 ศัพท์เฉพาะสำหรับค่าตัวแปรของน้ำอสุจิ.....7

2.4 การเรียกชื่อของอะนิวพลอยด์ แตกต่างกันไปตามจำนวนของโครโมโซมที่ขาดหรือเกิน.....10

2.5 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของผู้สูบบุหรี่เป็นประจำ พ.ศ. 2519 – 2547.....17

2.6 เปอร์เซ็นต์ของประชากรอายุ 15 ปีขึ้นไปที่สูบบุหรี่เป็นประจำ จำแนกตามอายุที่เริ่มสูบบุหรี่ อายุเฉลี่ยที่เริ่มสูบบุหรี่ เพศ และเขตการปกครอง พ.ศ. 2547.....18

2.7 เปอร์เซ็นต์ของประชากรอายุ 15 ปีขึ้นไปที่สูบบุหรี่เป็นประจำ จำแนกตามจำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวัน กลุ่มอายุและจำนวนบุหรี่ที่สูบเฉลี่ยต่อวัน พ.ศ. 2547.....19

3.1 รายละเอียดของโคลนที่ใช้ทำตัวติดตาม.....23

3.2 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่.....27

4.1 ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างชายที่สูบบุหรี่และที่ไม่สูบบุหรี่.....33

4.2 แสดงผลของโครโมโซม X, Y และความผิดปกติของโครโมโซมเพศชนิดต่างๆ ในแต่ละตัวอย่าง.....38

4.3 การเปรียบเทียบความถี่การเกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพศในอสุจิระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และที่ไม่สูบบุหรี่ 39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ขั้นตอนการสร้างอสุจิ....4
2.2 รูปร่างของอสุจิ....4
2.3 รูปร่างของตัวอสุจิที่ปกติและรูปร่างของตัวอสุจิที่ผิดปกติ....7
2.4 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในการสร้างอสุจิ....8
2.5 การเกิด non-disjunction ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะต่าง ๆ 10
2.6 การปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติ....11
2.7 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้หญิงและรูปคนไข้ชายที่เป็นโรค Down syndrome....12
2.8 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้หญิงและรูปคนไข้หญิงที่เป็นโรค Turner syndrome...13
2.9 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้ชายและรูปคนไข้ชายที่เป็นโรค Klinefelter syndrome....14
3.1 Ideogram แสดงตำแหน่งของการเข้าจับของตัวติดตามบนโครโมโซม X และ Y....24
4.1 ผลการแยกขนาดพลาสมิดด้วยเทคนิค เจลอิเลคโตรโฟรีซิส....34
4.2 ผลการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค เจลอิเลคโตรโฟรีซิสภายหลังการทำ Nick translation....35
4.3 รูปร่างของอสุจิที่ปกติและผิดปกติ....36
4.4 สัญญาณสีที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์....37
4.5 สัญญาณสีที่ปรากฏเมื่อทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์....37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

มีปัจจัยหลายอย่างที่ก่อให้เกิดความผิดปกติในเซลล์สืบพันธุ์ของเพศชาย เช่น มีความผิดปกติเกี่ยวกับอัณฑะ การติดเชื้อคางทูมในวัยเด็ก ปัญหามลภาวะ เช่น การใช้ยาฆ่าแมลง (Xai และคณะ, 2004) การเคมีบำบัด (Martin และคณะ, 1999) การใช้ยารักษาโรคบางชนิด (Baumgartner และคณะ, 2001) การดำรงชีวิต เช่น การบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ คาเฟอีน และการสูบบุหรี่ (Robbins, 1997) เป็นต้น จากสถิติปี พ.ศ. 2547 (สำนักงานสถิติแห่งชาติ) พบว่าในเพศชายเริ่มสูบบุหรี่เมื่ออายุ 15-24 ปี ซึ่งวัยนี้ถือเป็นวัยเจริญพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 85.5 และอายุ 25-39 ปี คิดเป็นร้อยละ 6.0 จากจำนวนทั้งหมด สารพิษในบุหรี่ เช่น นิโคติน และทาร์ ส่งผลเสียต่อสุขภาพในระยะยาวเป็นอย่างมาก เป็นปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคที่ร้ายแรง เช่น มะเร็งปอด มะเร็งกล่องเสียง โรคหัวใจ และโรคทางระบบประสาท เป็นต้น มูลนิธิรณรงค์เพื่อการไม่สูบบุหรี่ รายงานว่า คนไทยเสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ปีละ 52,000 คน หรือวันละ 142 คน หรือชั่วโมงละ 6 คน ขณะที่ทั่วโลกมีผู้เสียชีวิตปีละ 5 ล้านคน หรือวันละ 13,700 คน (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2549) การสูบบุหรี่ยังอาจเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนในเพศชาย รวมถึงมีปริมาณอสุจิลดน้อยลง (13-17%) (http://www.uhmc.sunysb.edu) และอาจมีผลต่อคุณภาพของอสุจิในด้านต่างๆ เช่น การเคลื่อนที่ ความผิดปกติของรูปร่าง และการมีอสุจิที่มีโครโมโซมผิดปกติ เป็นต้น ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดภาวะมีบุตรยาก (Taszarek และคณะ, 2005) และอาจทำให้เกิดโอกาสที่จะมีบุตรที่มีความผิดปกติทางโครโมโซมเพิ่มมากขึ้น เช่น Down's syndrome, Klinefelter syndrome และ Turner syndrome เป็นต้น (Sepaniak และคณะ,2004 ; Potts และคณะ, 1999)

การเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ ยูพลอยดี้ (euploidy) เป็นการเปลี่ยนที่เกี่ยวข้องกับจำนวนชุดของโครโมโซม หรือคือมีการเปลี่ยนแปลงทั้งจีโนม การเปลี่ยนแปลงอีกประเภทหนึ่งคือ อะนิวพลอยดี้ (aneuploidy) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมแท่งหนึ่งๆ ภายในชุดของโครโมโซม (เช่น อะนิวพลอยดี้ จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 2n-1, 2n+1, 2n-2 เป็นต้น) ซึ่งการเกิด อะนิวพลอยดี้ในโครโมโซมเพศของมนุษย์เกิดขึ้นได้มากกว่าในโครโมโซมร่างกาย และเมื่อเกิดความผิดปกติแบบอะนิวพลอยดี้ในโครโมโซมเพศแล้วบุตรจะมีอัตราการรอดสูงกว่า กลุ่มอาการที่เกิดขึ้นจาก อะนิวพลอยดี้ ในโครโมโซมร่างกาย ได้แก่ Triple X syndrome (47, XXX), Klinefelter syndrome (47, XXY), XYY syndrome (47, XYY), และ Turner syndrome (45, XO) เป็นต้น การตรวจสอบโครโมโซมเพศในอสุจิชายที่สูบบุหรี่ โดยศึกษาจากความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม X และ Y ในกลุ่มชายอายุ 18-30 ปี ที่สูบบุหรี่ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่ โดยใช้เทคนิค Fluorescence in situ hybridization หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิค FISH มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. ศึกษาขั้นตอนและวิธีการติดฉลากตัวติดตามด้วยเทคนิค Nick translation 2. หาความสัมพันธ์ของความผิดปกติของโครโมโซมเพศในอสุจิของชายที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการที่เกี่ยวข้อง

2.1 การสร้างอสุจิ

การสร้างอสุจิ (spermatogenesis) เป็นกระบวนการผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ที่เกิดขึ้นในท่อผลิตอสุจิซึ่งอยู่ในอัณฑะ ท่อผลิตอสุจิมีเยื่อบุผิวภายในท่อ ซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ที่สำคัญ 2 กลุ่ม คือ เซอร์โทไลเซลล์ (sertoli cell) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ สเปอมาโตโกเนีย (spermatogonia) สเปอมาโตโกเนียแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสเพื่อผลิตสเปอมาโตโกเนียสำรองไว้ หรือแบ่งเซลล์แบบเดียวกันเพื่อเข้าสู่กระบวนการในการผลิตอสุจิและได้อสุจิออกมาในที่สุด การเจริญจะผ่านหลายขั้นตอนและมีการลดโครโมโซมลงครึ่งหนึ่ง ซึ่งเกิดในช่วงของการแบ่งตัวแบบไมโอซิส เกิดเซลล์เรียกว่าสเปอมาติด (spermatid) การแบ่งตัวแบบไมโอซิสทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนสารทางพันธุกรรมของโครโมโซมแบบเดียวกัน กระบวนการจากสเปอมาโตโกเนียจนกระทั่งถึงระยะสเปอมาติด เป็นระยะแรกของการผลิตอสุจิ สเปอมาติดที่เกิดขึ้นจะเจริญผ่านอีกหลายขั้นตอนโดยไม่มีการแบ่งตัวอีก และเปลี่ยนจากเซลล์กลม ที่มีนิวเคลียสกลมมาเป็นเซลล์ตามลักษณะของอสุจิของสัตว์แต่ละชนิด ลักษณะหัวแบน มีอะโครโซมหุ้มส่วนหน้าและมีหางอยู่ทางด้านท้าย มีสารพันธุกรรมอยู่ในนิวเคลียส กลายเป็นอสุจิที่สมบูรณ์ (รูปที่ 2.1) กระบวนการในขั้นนี้เรียกว่า spermiogenesis (http://classroom.psu.ac.th/users/peerasak/ai/spermato/spermatotext.html)

2.2 รูปร่างและลักษณะของอสุจิ

ลักษณะของอสุจิในสัตว์ชั้นสูงมีลักษณะคล้ายๆกัน โดยมีขนาดเล็กและแบ่งออกเป็น 3 ส่วน (รูปที่ 2.2) คือ

2.2.1 ส่วนหัว (head)

ส่วนหัวเป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุดของอสุจิ มีลักษณะเป็นรูปไข่ ภายในบรรจุนิวเคลียสไว้เกือบเต็ม ส่วนหน้าของส่วนหัวมีอะโครโซม (acrosome) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากกอลจิคอมเพลกซ์ (golgi complex) มีหน้าที่ในการเจาะไข่ขณะเกิดการปฏิสนธิเพราะภายในอะโครโซมมีเอนไซม์กลุ่มไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งสามารถย่อยสลายเนื้อเยื่อที่อยู่ภายนอกของไข่เพื่อให้ส่วนหัวของอสุจิเข้าผสมกับนิวเคลียสของไข่ได้

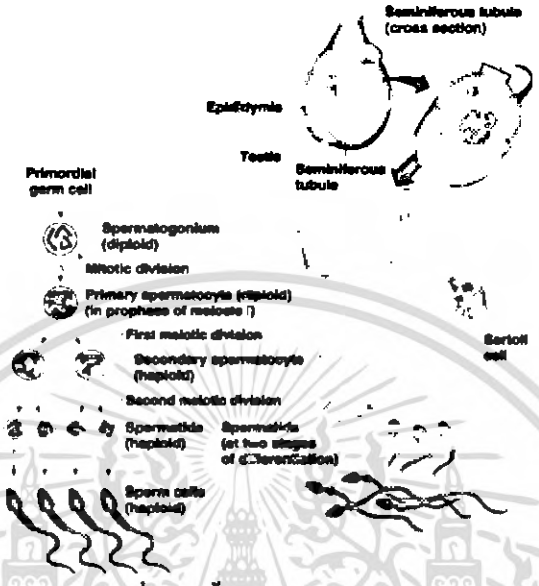
2.2.2 ส่วนคอและลำตัว (middle piece)

เป็นส่วนที่อยู่ต่อจากส่วนหัว มีลักษณะเป็นแท่ง ภายในมีแอกเซียลฟิลาเมนต์ (axial filament) มีเซนทริโอล 2 อัน ซึ่งมีไมโทคอนเดรียพันอยู่โดยรอบทำหน้าที่ให้พลังงานแก่ส่วนหัวและส่วนหางของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

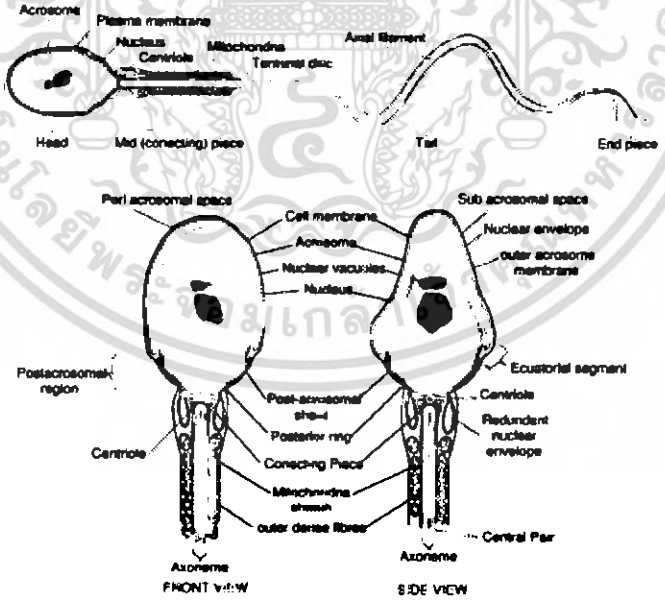
2.2.3 ส่วนหาง (tail)

เป็นส่วนของแอกเซียลฟิลาเมนต์ที่ไม่มีเยื่อหุ้ม มีลักษณะเป็นสายยาว ทำหน้าที่ในการโบกพัดให้เกิดการเคลื่อนที่ของอสุจิเพื่อเข้าผสมกับไข่ (ประสงค์ และจิตเกษม, 2545)



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการสร้างอสุจิ

ที่มา http://faculty.sunydutchess.edu/Scala/Bio102/PDF/Spermatogenesis.jpg



รูปที่ 2.2 รูปร่างของอสุจิ

ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/Sperm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ลักษณะและค่าตัวแปรของน้ำอสุจิ

ในการหาค่าของลักษณะและค่าตัวแปรต่างๆ ของน้ำอสุจิ ตัวอย่างน้ำอสุจิทั้งหมดได้มาจากการสำเร็จความใคร่ด้วยตนเอง โดยในการเก็บตัวอย่างทำการเก็บในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อและปราศจากพลาสติกเป็นส่วนประกอบ ในการเก็บน้ำอสุจิผู้ให้ต้องไม่มีการหลั่งน้ำอสุจิเป็นระยะเวลา 3 วันก่อนการเก็บตัวอย่าง หลังจากได้น้ำอสุจินำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และวิเคราะห์ใน 1 ชั่วโมงเมื่อได้ตัวอย่าง ทำการวิเคราะห์น้ำอสุจิ โดยค่าของลักษณะและค่าตัวแปรของน้ำอสุจิที่นิยมนำมาวิเคราะห์และนำมาเปรียบเทียบกับองค์การอนามัยโลก (WHO) แสดงในตารางที่ 2.1

ค่าตัวแปรของน้ำอสุจิที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก ประกอบด้วย ปริมาตรต่อการหลั่งใน 1 ครั้ง (มิลลิลิตร), พีเอช, ความเข้มข้นของอสุจิ ($x10^6$ตัว/มิลลิลิตร), ปริมาณของอสุจิทั้งหมดต่อการหลั่ง 1 ครั้ง ($x\ 10^6$ ตัว/การหลั่ง 1 ครั้ง), ลักษณะรูปร่างของอสุจิ (ร้อยละของลักษณะที่ปกติ), การมีชีวิตรอด (ร้อยละของตัวที่มีชีวิต), รวมถึงการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยแบ่งเป็น 2 แบบคือ ระดับ A คือ มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 50 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการหลั่งเป็นระยะเวลา 60 นาที ระดับ B คือ มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 25 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังจากการหลั่งเป็นระยะเวลา 60 นาที (ตารางที่ 2.2) ซึ่งศัพท์เฉพาะสำหรับค่าตัวแปรของน้ำอสุจิแสดงดังตารางที่ 2.3 (http://www.gfmer.ch/.../Semen_analysis_rumbullaku.htm)

2.4 ลักษณะที่ผิดปกติของอสุจิ

การหลั่งอสุจิทุกครั้ง มักมีอสุจิที่มีความผิดปกติของรูปร่างปนออกมาเสมอประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ซึ่ง 8-10 เปอร์เซ็นต์นี้ ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติและไม่ถือว่ามีความผิดปกติแต่อย่างใด แต่ถ้าอสุจิที่หลั่งออกมามีความปกติของรูปร่างมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จึงถือว่าปกติ (รูปที่ 2.3)

ความผิดปกติของอสุจิที่มักพบ มี 3 ประการ คือ

1 เกิดความผิดปกติที่ส่วนหัว เช่น หัวใหญ่ หัวเล็ก หัวเบี้ยว หัวแหลม มี 2 หัว เป็นต้น

2 เกิดความผิดปกติที่ส่วนหาง เช่น หางม้วน หางงอ หางขาด มี 2 หาง หางบวม มีหางส่วนกลาง 2 ท่อน เป็นต้น ซึ่งอสุจิที่มีความผิดปกติที่ส่วนหางนี้ไม่สามารถเคลื่อนที่แบบปกติได้

3 มีความผิดปกติโดยเกิดไซโตพลาสมิก ครอปเลทส์ (Cytoplasmic droplets) เป็นการเกิดวงหรือหยดน้ำ ในหางบริเวณส่วนคอ ซึ่งเกิดจากความผิดปกติของขบวนการสร้างอสุจิ (http://www.dld.go.th/biotech/... /D-2_Semen&Composition.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ค่าของตัวแปรน้ำอสุจิที่ปกติตามหลักขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี 1987 และ ปี 1992 (http://www.il-st-acad-sci.org/androl1.html)

ค่าของน้ำอสุจิ	ค่าของตัวแปรน้ำอสุจิในคนที่ปกติ	
	WHO-1987	WHO-1992
ปริมาตร (มิลลิลิตร)	≥ 2	≥ 2
พีเอช	7.2-8.0	7.2-8.0
ความเข้มข้นของอสุจิ(ล้านตัว / มิลลิลิตร)	≥ 20	≥ 20
จำนวนอสุจิทั้งหมด (ล้านตัว / การหลั่ง 1 ครั้ง)	≥ 40	≥ 40
รูปร่างของอสุจิ (ร้อยละที่ปกติ)	≥ 50	≥ 30
อสุจิที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	≥ 75	≥ 75

ตารางที่ 2.2 ค่าของการเคลื่อนที่ของอสุจิปกติต่อการหลั่ง 1 ครั้งตามหลักขององค์การอนามัยโลก (WHO) ปี 1987 และ ปี 1992 (http://www.il-st-acad-sci.org/androl1.html)

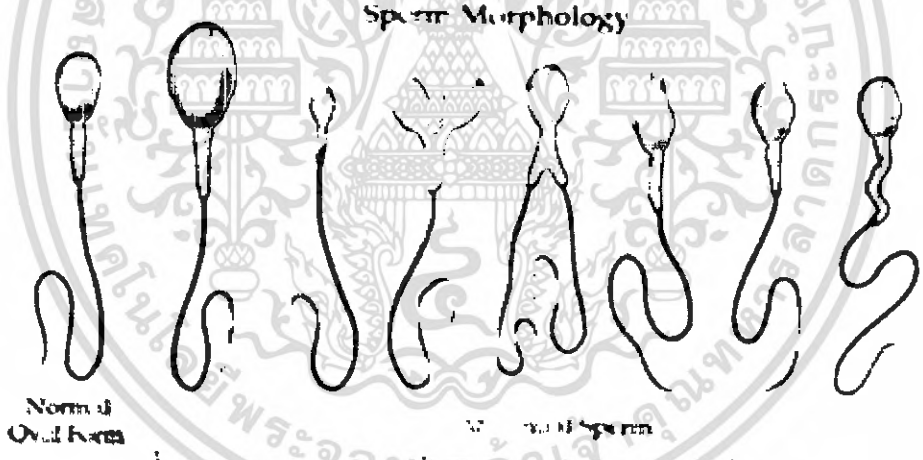
การเคลื่อนที่ของอสุจิต่อการหลั่ง 1 ครั้ง	WHO-1987	WHO-1992
ระดับ a (เปอร์เซ็นต์)	≥ 25	≥ 25
ระดับ a และ b (เปอร์เซ็นต์)	≥ 50	≥ 50
ปริมาณ สังกะสี (ไมโครโมล / การหลั่ง 1 ครั้ง)	≥ 2.4	
ปริมาณกรดซิตริก (ไมโครโมล / การหลั่ง 1 ครั้ง)	≥ 52	
ปริมาณเอนไซม์acid phosphatase (ยูนิต / การหลั่ง 1 ครั้ง)	≥ 200	
ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (ไมโครโมล / การหลั่ง 1 ครั้ง)	≥ 13	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 ศัพท์เฉพาะสำหรับค่าตัวแปรของน้ำอสุจิ (WHO, 1992)

(http://www.gfmer.ch/.../Semen_analysis_rrumbullaku.htm)

normozoospermia	มีค่าตัวแปรต่างๆ ในการแต่ละครั้งปกติ
oligozoospermia	ความเข้มข้นของอสุจิน้อยกว่า $20x10^6$ ตัว/มิลลิลิตร
asthenozoospermia	มีอสุจิน้อยกว่าร้อยละ 50 ที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า(ระดับ a และ b) หรืออสุจิน้อยกว่าร้อยละ 25 ที่มีการเคลื่อนที่
teratozoospermia	จำนวนอสุจิน้อยกว่าร้อยละ 30 มีรูปร่างปกติ
oligoasthenoteratozoospermia	มีลักษณะร่วมของทั้ง 3 ลักษณะ คือ oligozoospermia asthenozoospermia และ teratozoospermia
Azoospermia	ไม่มีอสุจิในการหลั่ง
Aspermia	ไม่มีการหลั่งอสุจิ



รูปที่ 2.3 รูปร่างของตัวอสุจิที่ปกติและรูปร่างของตัวอสุจิที่ผิดปกติ

ที่มา http://www.homefertility.com/morphology.jpg

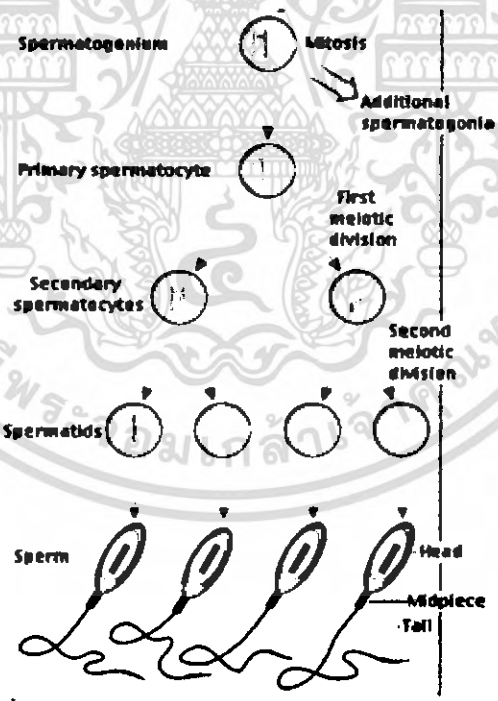
2.5 การแบ่งเซลล์สืบพันธุ์

อสุจิเป็นเซลล์สืบพันธุ์ดังนั้นย่อมมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เป็นการแบ่งเซลล์ที่ให้เซลล์ลูกมีโครโมโซมครึ่งหนึ่งเป็นของพ่อและอีกครึ่งหนึ่งเป็นของแม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไมโอซิสเป็นขบวนการแบ่งเซลล์ที่เกิดขึ้นโดยวิธีของการแบ่งนิวเคลียส 2 ครั้ง โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับชุดของโครโมโซมภายในเซลล์นั้นๆ เพียงชุดเดียว ขบวนการแบ่งไมโอซิสคล้ายคลึงกับไมโตซิสแต่มีวิธีการที่ซับซ้อนและเพิ่มคุณค่าให้กับเซลล์มากกว่า ไมโอซิสแบ่งขบวนการเป็น 2 ขั้นตอนดังนี้ ขั้นตอนที่ 1 เรียก meiotic I หรือ reduction division เป็นขั้นตอนที่มีการลดโครโมโซมลงครึ่งหนึ่งมีการแบ่งจาก 1 เซลล์ ได้เป็น 2 เซลล์ซึ่งแต่ละเซลล์มีการลดจำนวนโครโมโซม ขั้นตอนที่ 2 เรียก สืบพันธุ์ meiotic II หรือ equational divisionเป็นขั้นตอนที่ไม่มีการลดจำนวนโครโมโซม เป็นการแบ่งเซลล์ต่อจากขั้นตอนที่ 1 คือ จาก 2 เซลล์แบ่งได้เป็น 4 เซลล์ (รูปที่ 2.4)

อย่างไรก็ตามก่อนการแบ่งไมโอซิสนั้น เซลล์ต้องมีระยะการเตรียมตัวให้ดีเอ็นเอและโครโมโซมในปริมาณที่เพิ่มขึ้นอีก 1 ชุด คือต้องผ่านระยะอินเตอร์เฟสเพื่อจำลองโครโมโซมและดีเอ็นเอ เช่นเดียวกันกับไมโตซิส เซลล์เริ่มต้นที่มีไมโอซิสย่อมมีโครโมโซมที่ประกอบด้วย 2 แท่งโครมาทิด จึงตามด้วยขั้นตอนของไมโอซิส แม้มีอินเตอร์เฟสแล้วตามด้วยไมโอซิสก็ตาม แต่ไม่เรียกว่าเป็นวัฏจักรของเซลล์ (วัฏจักรของเซลล์ประกอบด้วยอินเตอร์เฟสและไมโตซิสเท่านั้น) ทั้งนี้เพราะเซลล์ลูกที่แบ่งได้กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์พร้อมไปทำหน้าที่ เซลล์ลูกที่ได้จะไม่กลับเข้าวัฏจักรเพื่อมีการแบ่งเซลล์อีก เซลล์ที่พร้อมมีไมโอซิสย่อมมีการแบ่งเซลล์เพียง 1 วัฏจักรเท่านั้น เซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นจะรอผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ของอีกเพศหนึ่งเพื่อเกิดเป็นไซโกตต่อไป



รูปที่ 2.4 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในการสร้างอสุจิ

ที่มา http://users.rcn.com/../Sexual_Reproduction.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

สิ่งมีชีวิตแต่ละสปีชีส์มีจำนวนโครโมโซมคงที่ พวกที่สืบพันธุ์โดยอาศัยเพศมีจำนวนโครโมโซม 2 แบบในเซลล์ต่างชนิดกันคือ เซลล์ร่างกายเป็นชนิดดิพลอยด์และเซลล์สืบพันธุ์เป็นชนิดแฮพลอยด์ แต่พวกสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีจำนวนโครโมโซมเพียงแบบเดียว คืออาจเป็นดิพลอยด์ หรือ แฮพลอยด์ ก็ได้ขึ้นอยู่กับตำแหน่งของวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ตัวอย่างจำนวนโครโมโซมแมลงหวี่ (*Drosiphila* spp.) มีตั้งแต่ 3, 4, 5, 6 คู่ ข้าวโพด *(Zea mays)* มี 10 คู่ และคน 23 คู่ (อมรา, 2546)

สิ่งมีชีวิตจะเจริญเติบโตอย่างปกติย่อมเกิดจากการควบคุมของยีนที่อยู่ในสภาพสมดุล ถ้าสิ่งมีชีวิตใดมีจำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไปจากเดิมย่อมก่อให้เกิดผลต่างๆ ตามมา การเปลี่ยนแปลงของจำนวนโครโมโซมอาจเกิดขึ้นได้จากธรรมชาติหรือจากการเหนี่ยวนำโดยรังสีหรือสารเคมีบางประเภท การเปลี่ยนแปลงนี้แบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ยูพลอยดี้ เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกี่ยวกับชุดของโครโมโซมหรือคือการเปลี่ยนแปลงทั้งจีโนม ตัวอย่างเช่นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 10 จะมีเซลล์ที่เป็นแฮพลอยด์ เท่ากับ 5 ถ้าจำนวนโครโมโซมเพิ่มอีก 1 ชุดกลายเป็นจำนวนเท่ากับ 15 เช่นนี้ถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงแบบยูพลอยดี้ การเปลี่ยนแปลงอีกประเภทคือ อะนิวพลอยดี้ เป็นการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมแท่งหนึ่งๆ ภายในชุดของโครโมโซม เช่น สิ่งมีชีวิตบางตัวหรือบางต้นที่อาจมีจำนวนโครโมโซม 1, 2 และ 3 แท่งที่ขาดหรือเกินจากจำนวนปกติ โดยจำนวนขาดหรือเกินต้องน้อยกว่าจำนวนโครโมโซมใน 1 ชุดของโครโมโซมเช่น อะนิวพลอยดี้มีโครโมโซมเป็น 2n-1, 2n+1, 2n-2 เป็นต้น

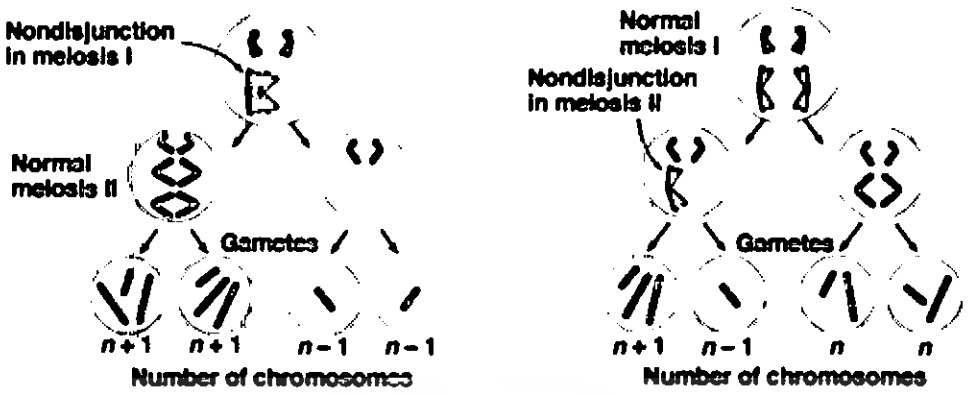
2.6.1 ยูพลอยดี้

ยูพลอยดี้ คือสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มหรือลดเป็นจำนวนเท่าของจำนวนโครโมโซมที่เป็นปกติ (X) การเกิดลูกที่มีลักษณะเป็น ยูพลอยดี้ในมนุษย์ไม่สามารถเกิดขึ้นได้ หากลูกที่ได้เป็นยูพลอยดี้จะตายตั้งแต่อยู่ภายในครรภ์

2.6.2 อะนิวพลอยดี้

การแบ่งไมโอซิสแบบปกตินั้นโครโมโซมที่เป็นคู่กันจะเข้าคู่กันและแยกออกจากกันในระยะแอนาเฟส ผลของไมโอซิสได้เซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่าๆกันโดยจำนวนโครโมโซมเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของโครโมโซมที่เริ่มแบ่ง แต่ในบางครั้งไมโอซิสอาจผิดปกติโดยที่โครโมโซมที่เคยอยู่เป็นคู่กันบางคู่อาจไม่แยกจากกันในระยะแอนาเฟส เรียกการที่โครโมโซมเป็นคู่กันไม่แยกตัวจากกันและเคลื่อนย้ายไปขั้วเดียวกันของเซลล์ในระยะแอนาเฟสเรียกว่า non-disjunction ดังรูปที่ 2.5ก และ 2.5ข กรณีเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิด อะนิวพลอยดี้ เนื่องจากมีการขาดหรือเกินของโครโมโซมเป็นจำนวนต่างๆ กันในแต่ละต้นพืชหรือสัตว์จึงมีชื่อเรียกแตกต่างกัน (อมรา, 2546) ดังตารางที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก) (ข)

รูปที่ 2.5 การเกิด non-disjunction ในการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสในระยะไมโอซิส I (ก) และในระยะไมโอซิส II (ข)

ที่มา www.anselm.edu/.../genbio/geneticsnot.html

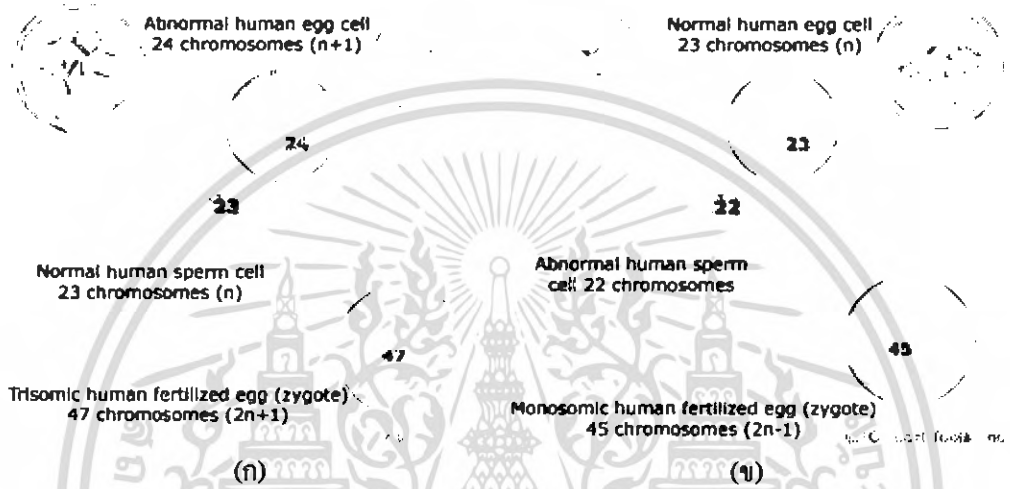
ตารางที่ 2.4 การเรียกชื่อของอะนิวพลอยดี้แตกต่างกันไปตามจำนวนของโครโมโซมที่ขาดหรือเกิน (อมรา, 2546)

ชนิดของอะนิวพลอยดี้	จำนวนโครโมโซมที่ปรากฏ	ตัวอย่างโครโมโซมคู่เหมือนจำนวน 3 คู่		
Disomic	2n	AA	BB	CC
Monosomic	2n -1	AA	BB	C_
Nullisomic	2n -2	AA	BB	__
Trisomic	2n +1	AA	BB	CC C
Double trisomic	2n +1 +1	AA	BB B	CC C
Tetrasomic	2n +2	AA	BB	CC CC
Pentasomic	2n +3	AA	BB	CC CC C

สมมติให้โครโมโซม AA, BB, CC เป็นคู่ที่ 1, 2 และ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเกิด non-disjunction ทำให้เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้มีจำนวนโครโมโซมบางแท่งขาดหรือเกินกว่าปกติ จากเซลล์สืบพันธุ์ที่ควรเป็นแฮพลอยด์คือ n อาจเป็น n + 1, n + 2, n - 1 หรือ n - 2 (กรณีที่มีโครโมโซมเกินหรือขาดเป็น 1 หรือ 2 แท่งตามลำดับ) เมื่อเซลล์สืบพันธุ์เป็น n + 1 เข้าผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (n) ไซโกตที่ได้คือ 2n + 1 หรือถ้าหากเซลล์สืบพันธุ์เป็น n - 1 เข้าผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (n) ไซโกตที่ได้คือ 2n – 1 (รูปที่ 2.6ก และ 2.6ข) (อมรา, 2546)



รูปที่ 2.6 การปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติโดยเซลล์สืบพันธุ์เป็น n + 1 เข้าผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (n) ไซโกตที่ได้คือ 2n + 1 (ก) และเซลล์สืบพันธุ์เป็น n - 1 เข้าผสมกับเซลล์สืบพันธุ์ปกติ (n) ไซโกตที่ได้คือ 2n – 1 (ข)

ที่มา http://www1.geneticsolutions.com/PageReq?id=3844:1873

2.7 อะนิวพลอยดี้ที่เกิดในมนุษย์

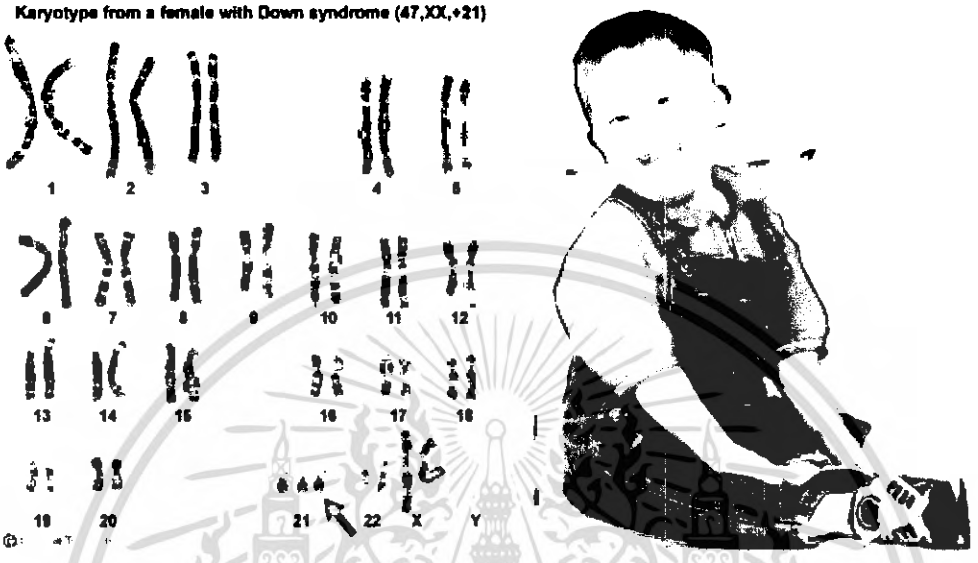
การเกิดอะนิวพลอยดี้ในมนุษย์นั้นเกิดจากความไม่สมดุลของโครโมโซมในเซลล์สืบพันธุ์ หรือที่เรียกว่าการเกิด non - disjunction ซึ่งเมื่อเซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติได้รับการผสมและเกิดเป็นคนขึ้นมา พบว่าบุคคลเหล่านี้ต้องได้รับความดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมากเพื่อความอยู่รอด ซึ่งการขาดหรือเกินของโครโมโซมในคนแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.7.1 Autosomal aneuploidy คือ การเกิดอะนิวพลอยดี้ กับโครโมโซมร่างกาย เช่น

2.7.1.1 Down's syndrome (47, XX + 21 หรือ 47, XY + 21) (รูปที่ 2.7ก) เป็นโรคที่เกิดจากโครโมโซมร่างกายแท่งที่ 21 เกินมาหนึ่งแท่ง ลักษณะอาการของโรคนี้ คือ ลักษณะรูปร่างเตี้ย ศีรษะเล็ก หน้ากลมแบนและมักมีอารมณ์ดี ปากอ้าและลิ้นโต หูเล็กและอยู่ต่ำ จมูกเล็กและแฟบ นิ้วมือป้อม สั้น มีลายมือที่ผิดปกติ อาจมีหัวใจพิการแต่กำเนิด การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติมักพบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเฉพาะในเพศชาย ไอคิวต่ำแต่อาจฝึกฝนได้จนสามารถดำรงชีวิตได้ตามปกติ อายุมักไม่ยืนยาว มักเกิดจากมารดาอายุเกิน 35 ปี หรือ บิดามีอายุเกิน 55 ปี โดยอัตราการเกิดต่อทารกแรกคลอดคือ 1/700 คน



(ก) (ข)

รูปที่ 2.7 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้หญิงที่เป็นโรค Down syndrome 47, XY+ 21 ย้อมด้วย G – band (ก) และ คนไข้ชายที่เป็นโรค Down syndrome (ข)

ที่มา http://www1.geneticsolutions.com/PageReq?id=3844:1873 (ก)

ที่มา http://www.einstein-syndrome.com/house/img/evan.jpg (ข)

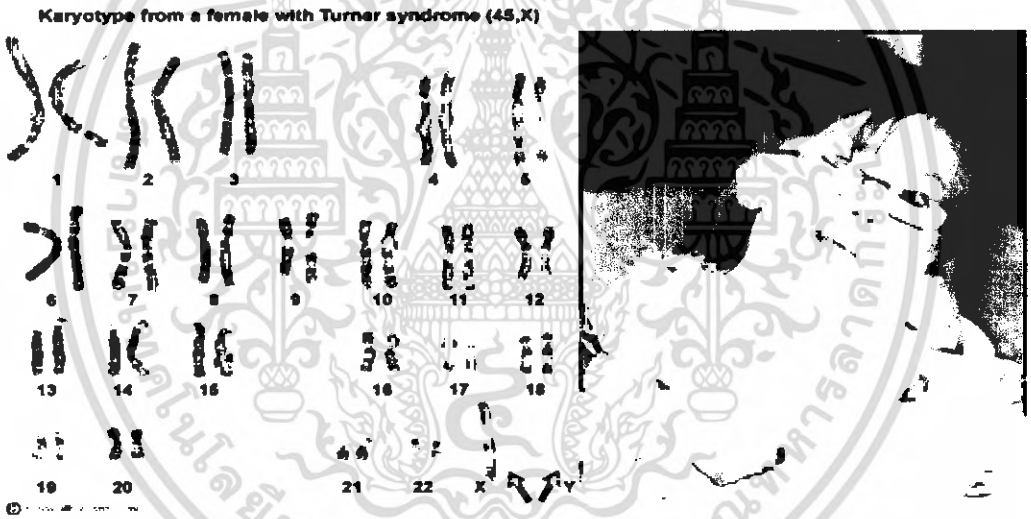
2.7.1.2 Patua syndrome (47, XX + 13 หรือ 47, XY + 13) เป็นโรคที่เกิดจากโครโมโซมร่างกายแท่งที่ 13 เกินมาหนึ่งแท่ง ซึ่งมีลักษณะปากแหว่ง เพดานโหว่ หูหนวก มักมีนิ้วเกิน อาจมีตาพิการหรือตาบอด อาการอาจเหมือน Edwards syndrome ได้แก่ ทารกมักตายตั้งแต่อายุไม่ที่เดือนหลังคลอด ตาเล็ก คางสั้น ใบหูผิดรูปร่างและอยู่ต่ำ มีความผิดปกติของไตและหัวใจ ปัญญาอ่อน มีแนวโน้มพบในแม่อายุมาก เด็กในกลุ่มนี้มีอายุมากที่สุดที่พบคือประมาณ 3 ขวบ โดยอัตราการเกิดต่อทารกแรกคลอดคือ 1/17,500 คน

2.7.1.3 Edwards syndrome (47, XX + 13 หรือ 47, XY + 13) เป็นโรคที่เกิดจากโครโมโซมร่างกายแท่งที่ 13 เกินมาหนึ่งแท่ง ซึ่งมีลักษณะข้อมือข้อเท้าบิดอย่างเห็นได้ชัด เด็กในกลุ่มนี้มีอายุมากที่สุดที่พบคือประมาณ 6 ขวบ โดยอัตราการเกิดต่อทารกแรกคลอดคือ 1/7,500 คน (พรรณี, 2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.2 Sex chromosomal aneuploidy คือ การเกิดอะนิวพลอยดี้ กับโครโมโซมเพศ ซึ่งเกิดได้มากกว่าอะนิวพลอยดี้ของโครโมโซมร่างกาย ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อเกิดกับโครโมโซมเพศแล้วจะมีอัตราการรอดที่สูงกว่า โดยเฉพาะถ้ามีการขาดหรือเกินของโครโมโซม Y มีโอกาสรอดมากกว่า เนื่องจากโครโมโซม Y มีส่วนเฮเทอโรโครมาติน (heterochromatin) มากแต่มียีนที่ทำงานน้อย และสำหรับโครโมโซม X ในเพศหญิงที่มีโครโมโซมปกติเป็น XX จะมี X 1 แท่งที่ไม่ทำงานและอะนิวพลอยดี้ของโครโมโซม X ที่เกินเข้ามาจะเป็นแท่งที่ไม่มีการทำงานด้วย อะนิวพลอยดี้ที่เกิดกับโครโมโซมเพศของคนที่พบมากคือ XXX, XXY, XYY และ monosomy ชนิด X0 (อมรา, 2546) รายละเอียดเช่น

2.7.2.1 Turner syndrome (45, X0) (รูปที่ 2.8ก) เป็นโรคที่เกิดจากโครโมโซมเพศหายไปหนึ่งแท่ง มีลักษณะภายนอกเป็นผู้หญิงที่มีการพัฒนาการทางเพศน้อย มักเป็นหมัน รูปร่างเตี้ย คอสั้น กว้างและมีแผ่นเนื้อคล้ายปีกจากต้นคอลงมาจรดที่หัวไหล่ หน้าอกกว้างสติปัญญาไม่ต่ำมาก (รูปที่ 2.8ข) โดยอัตราการเกิดต่อทารกหญิงแรกคลอดคือ 1/2,500 คน



(ก) (ข)

รูปที่ 2.8 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้หญิง ที่เป็นโรค Turner Syndrome (45, X0) ย้อมด้วย G – band (ก) และ คนไข้หญิงที่เป็นโรค Turner Syndrome(ข)

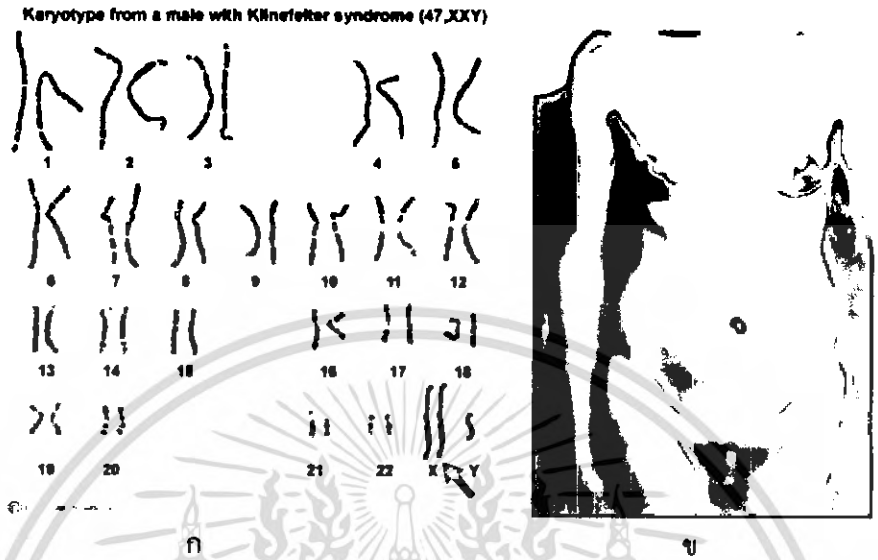
ที่มา http://www1.geneticsolutions.com/PageReq?id=3844:1873 (ก)

ที่มา http://www.antenataltesting.info (ข)

2.7.2.2 Klinefelter Syndrome (47, XXY หรือ 48, XXXY หรือ 49, XXXXY หรือ 50, XXXXXY) (รูปที่ 2.9ก) เป็นโรคที่เกิดจากโครโมโซม X เกินมา มีลักษณะภายนอกเหมือนผู้ชายแต่อัณฑะมีขนาดเล็กและสร้างอสุจิได้น้อย มักเป็นหมัน เสียงไม่ห้าว หน้าอกโตคล้ายของผู้หญิง แขน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขายาว ระดับไอคิวต่ำและต่ำมากขึ้นตามจำนวนโครโมโซม X (รูปที่ 2.9ข) และมักพบเพิ่มขึ้นในมารดาที่มีอายุมาก โดยอัตราการเกิดต่อทารกชายแรกคลอดคือ 1/1,000 คน



ก ข

รูปที่ 2.9 ลักษณะของคารีโอไทป์ของคนไข้ชายที่เป็นโรค Klinefelter Syndrome (47, XXY) ย้อมด้วย G – band (ก) และ คนไข้ชายที่เป็นโรค Klinefelter Syndrome (ข)

ที่มา http://www1.geneticsolutions.com/PageReq?id=3844:1873 (ก)

ที่มา http://cas.bellarmine.edu/.../gen03.gif (ข)

2.7.2.3 Triplo - X (47, XXX) มีลักษณะเป็นผู้หญิงที่ปกติ แต่อาจมีระดับไอคิวต่ำกว่าปกติเล็กน้อย มักเป็นหมัน โดยอัตราการเกิดต่อทารกแรกคลอดคือ 1/1,000 คน

2.7.2.4 Double - Y (47, XYY) มักเป็นเพศชายที่มีความสูงมากกว่าปกติหรือไม่ต่ำกว่า 100 เซนติเมตร มักมีระดับไอคิวไม่สูงนัก บางรายอาจมีพฤติกรรมต่อต้านสังคม มักมีบุตรได้และบุตรมักมีจำนวนโครโมโซมปกติ โดยอัตราการเกิดต่อทารกแรกคลอดคือ 1/1,000 คน (พรรณี, 2543)

2.8 Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคในการหาช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (gene mapping) เป็นงานที่ใช้เทคนิคของ in situ hybridization แต่เปลี่ยนจากตัวติดตามชนิดติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีมาเป็นตัวติดตามชนิดปลอดรังสี (nonradioactive probe) เทคนิค FISH เป็นงานอิมมูโนวิทยาร่วมกับด้าน in situ hybridization และตรวจหาสัญญาณตำแหน่งของยีนโดยใช้สารสีเรืองแสง (fluorecein หรือ fluorophore) จึงเรียกเทคนิคชื่อเต็มว่า Fluorescence in situ hybridization

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.1 ขั้นตอนของเทคนิค FISH

เทคนิคการทำ FISH ใช้ในการตรวจสอบโครโมโซม โดยใช้ตัวติดตามที่ติดสารเรืองแสงไปไฮบริไดเซชั่นกับตัวอย่าง ซึ่งจะเข้าคู่บริเวณที่จำเพาะของโครโมโซมและตัวติดตาม โดยอาศัยหลักการเข้าคู่สมของลำดับเบสที่เหมือนกัน ทำให้สามารถตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมได้ การทำเทคนิค FISH แบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนดังต่อไปนี้ คือ

1 การตกตะกอนตัวติดตาม เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินและสิ่งเจือปนและป้องกันส่วนที่เป็น repetitive DNA ของตัวติดตาม

2 การเตรียมสไลด์ เพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินและสิ่งสกปรกออกจากสไลด์ และทำให้ตัวติดตาม สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้อย่างสมบูรณ์

3 ไฮบริไดเซชั่น (Hybridization) คือขั้นตอนการเข้าจับของตัวติดตามกับโครโมโซมในตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจง

4 Post Hybridization คือการล้างสไลด์เพื่อกำจัดตัวติดตามส่วนเกินและสิ่งสกปรกออกไป ทำให้ตรวจสอบสัญญาณสีได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ

สารเรืองแสงซึ่งให้เป็นตัวติดฉลากมีหลายชนิดให้สีปรากฏต่างๆกันเช่น สีแดงส้ม เขียว ชมพู มีการทำตัวติดตามต่างตำแหน่งกันบนแท่งโครโมโซมเดียวกัน หรือต่างแท่งโครโมโซมกัน โดยให้แต่ละชนิดของตัวติดตามติดฉลากด้วยสารสีเรืองแสงต่างสี (อมรา, 2546)

2.9 สารเคมีในบุหรี่

สารเคมีในบุหรี่ไส้บุหรี่นั้น ทำจากใบยาสูบตากแห้ง นำไปผ่านกระบวนการทางเคมี และมีการเพิ่มสารอื่น ๆ ควันบุหรี่ประกอบด้วยสารเคมีมากกว่า 4,000 ชนิด ซึ่งในจำนวนนั้นมีสารเคมีจำนวนมากที่เป็นสารพิษ สารที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (mutagen) สารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogen) สารเคมีที่เป็นองค์ประกอบ ได้แก่

1. นิโคติน เป็นสารที่ทำให้คนติดบุหรี่ ออกฤทธิ์โดยตรงต่อสมองทั้งเป็นตัวกระตุ้นและกดประสาทส่วนกลาง ถ้าได้รับสารนี้ขนาดน้อย ๆ เช่น การสูบบุหรี่ 1-2 มวนแรก อาจกระตุ้นทำให้รู้สึกกระปรี้กระเปร่า แต่ถ้าสูบมาก ๆ หลาย ๆ มวน จะกดประสาทส่วนกลางทำให้ความรู้สึกต่าง ๆ ช้าลงร้อยละ 95 ของนิโคตินจะไปจับอยู่ที่ปอด บางส่วนจับอยู่ที่เยื่อบุช่องปาก และบางส่วนถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดมีผลโดยตรงต่อต่อมหมวกไต ก่อให้เกิดการหลั่งสารอิพิเนฟริน (epinephrine) ทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น หัวใจเต้นเร็วกว่าปกติ และไม่เป็นจังหวะ หลอดเลือดที่แขนและขาหดตัว เพิ่มไขมันในเส้นเลือด ควันของบุหรี่ 1 มวน จะมีนิโคติน 0.8 - 1.8 มิลลิกรัม (ค่ามาตรฐานสากลกำหนดไว้ 1 มิลลิกรัม) และสำหรับการสูบบุหรี่ก้นกรองนั้นก็ไม่ได้ทำให้ปริมาณนิโคตินลดลงได้

2. ทาร์ หรือน้ำมันดิน ประกอบด้วยสารหลายชนิด เกาะกันเป็นสีน้ำตาลเป็นสารก่อให้เกิดมะเร็งได้ เช่น มะเร็งปอด กล่องเสียง หลอดลม หลอดอาหาร ไต กระเพาะปัสสาวะ และอื่น ๆ ซึ่งร้อยละ 50 ของทาร์จะไปจับที่ปอด ทำให้เกิดการระคายเคืองอันเป็นสาเหตุของการไอเรื้อรังมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เสมหะในคนที่สูบบุหรี่วันละซอง ปอดจะรับทาร์เข้าไปประมาณ 30 มิลลิกรัม/มวน หรือ 110 กรัม/ปี บุหรี่ไทย มีทาร์อยู่ระหว่าง 12-24 มิลลิกรัม/มวน

3. คาร์บอนมอนอกไซด์ เป็นก๊าซที่ทำลายคุณสมบัติในการเป็นพาหนะนำออกซิเจนของเม็ดเลือดแดงไม่สามารถจับออกซิเจนได้เท่ากับปกติ เกิดการขาดออกซิเจน ทำให้มึนงง ตัดสินใจช้า เหนื่อยง่าย ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของโรคหัวใจ

4. ไฮโดรเจนไซยาไนด์ เป็นก๊าซพิษที่ทำลายเยื่อบุผิวหลอดลมส่วนต้นทำให้มีอาการไอเรื้อรัง มีเสมหะเป็นประจำ โดยเฉพาะในตอนเช้าจะมีมากขึ้น

5. ไนโตรเจนไดออกไซด์ เป็นก๊าซพิษที่ทำลายเยื่อบุหลอดลมส่วนปลาย และถุงลมทำให้ผนังถุงลมบางโป่งพอง ถุงลมเล็ก ๆ หลายอันแตกรวมกันเป็นถุงลมใหญ่ ทำให้มีถุงลมจำนวนน้อยลง การยืดหยุ่นในการหายใจเข้าออกน้อยลงทำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพอง

6. แอมโมเนีย มีฤทธิ์ระคายเคืองเนื้อเยื่อ ทำให้แสบตา แสบจมูก หลอดลมอักเสบ ไอ และมีเสมหะมาก

7. สารกัมมันตรังสี ควันบุหรี่มีสารโพโลเนียม 210 ที่มีรังสีแอลฟาอยู่เป็นสาเหตุการเกิดโรคมะเร็งปอด และในควันบุหรี่มีสารกัมมันตรังสี ทำให้ผู้ที่ไม่สูบบุหรี่หายใจเอาอากาศที่มีสารพิษนี้เข้าไปด้วย (http://www.thaiantitobacco.com)

2.10 สถานการณ์การสูบบุหรี่ในประเทศไทย

มูลนิธิรณรงค์เพื่อการไม่สูบบุหรี่ รายงานว่า คนไทยเสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ปีละ 52,000 คน หรือวันละ 142 คน หรือชั่วโมงละ 6 คน ขณะที่ทั่วโลกมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคอันเนื่องมาจากบุหรี่ปีละ 5 ล้านคน หรือวันละ 13,700 คน

จากข้อมูลองค์การอนามัยโลก รายงานถึงจำนวนผู้เสียชีวิตจากการสูบบุหรี่ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี โดยคำนวณว่าในอีกประมาณ 25 ปีข้างหน้า ทั่วโลกจะมีผู้เสียชีวิตด้วยโรคอันเนื่องมาจากการสูบบุหรี่สูงขึ้นเป็นปีละ 10 ล้านคน หรือวันละ 27,000 คน หรือนาทีละ 20 คน ซึ่งหมายถึงบุหรี่เป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลกมากกว่าการเสียชีวิตจากโรคเอดส์ วัณโรค อุบัติเหตุ การฆ่าตัวตาย และการเสียชีวิตระหว่างคลอดรวมกันทั้งหมด และจากการวิจัยทางการแพทย์พบว่า อัตราเสี่ยงต่อการป่วยและเสียชีวิตจากการสูบบุหรี่นั้น สูงกว่าที่เคยคาดไว้ โดยพบว่า 1 ใน 2 หรือครึ่งหนึ่งของผู้สูบบุหรี่ที่เริ่มสูบตั้งแต่วัยรุ่นและสูบต่อไปเป็นประจำจะเสียชีวิตในวัยกลางคน หรือหมายถึงคนเหล่านี้จะมีอายุสั้นกว่าคนทั่วไปถึง 22 ปี (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.5 จำนวนและเปอร์เซ็นต์ของผู้สูบบุหรี่เป็นประจำทั้งประเทศ พ.ศ. 2519 – 2547

ปีสำรวจ	จำนวนผู้สูบบุหรี่เป็นประจำ (พันคน)	เปอร์เซ็นต์ของผู้สูบบุหรี่เป็นประจำ เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มของประชากรทั้งประเทศ		
		รวม	ชาย	หญิง
2519 [1]	8,629.5	30.1	54.7	6.1
2524 [1]	9,759.2	27.8	51.2	4.4
2529 [1]	10,377.0	26.4	48.8	4.1
2531 [2]	10,109.9	25.0	46.6	3.5
2534 [2]	11,402.1	26.3	48.9	3.8
2536 [2]	10,406.2	22.8	43.2	2.5
2539 [2]	11,254.3	23.5	44.6	2.5
2542 [2]	10,230.6	20.5	38.9	2.4
2544 [2]	10,551.2	20.6	39.3	2.2
2547 [2]	9,631.9	17.9	34.1	1.9

1 ผู้สูบบุหรี่เป็นประจำที่มีอายุ 10 ปีขึ้นไป

2 ผู้สูบบุหรี่เป็นประจำที่มีอายุ 11 ปีขึ้นไป

ที่มา 1 การสำรวจเกี่ยวกับอนามัยและสวัสดิการ พ.ศ. 2519 2524 2529 2534 2539 และ 2544

2 การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ของประชากร พ.ศ. 2531 2536 และ 2542

3 การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547

สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร

(http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-8-47E.xls)

72597

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.6 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งประเทศที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปที่สูบบุหรี่เป็นประจำ จำแนกตามอายุที่เริ่มสูบบุหรี่ อายุเฉลี่ยที่เริ่มสูบบุหรี่ เพศ และเขตการปกครอง พ.ศ. 2547

เพศ เขตการปกครอง	จำนวนประชากรที่สำรวจ (พันคน)	อายุที่เริ่มสูบบุหรี่ (เปอร์เซ็นต์)					
		ต่ำกว่า 10 ปี	10 – 14 ปี	15 – 24 ปี	25 – 39 ปี	40 ปีขึ้นไป	อายุเฉลี่ย (ปี)
ทั่วราชอาณาจักร	9,627.6	0.3	7.8	84.0	7.2	0.7	18.4
ชาย	9,102.9	0.3	7.8	85.5	6.0	0.4	18.2
หญิง	525.6	0.6	8.7	58.6	27.6	4.5	21.7
เขตการปกครอง							
ในเขตเทศบาล	2,484.3	0.5	6.0	85.4	7.5	0.6	18.5
นอกเขตเทศบาล	7,143.3	0.2	8.5	83.6	7.1	0.6	18.3

ที่มา การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547
สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร
(http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-4-47.xls)

ข้อมูลจาก สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร พบว่าจำนวนและอัตราร้อยละของผู้สูบบุหรี่เป็นประจำ พ.ศ. 2519 – 2547 มีจำนวนลดลง แต่เปอร์เซ็นต์ของชายที่สูบบุหรี่เป็นประจำ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มของประชากรชายทั้งประเทศ พบว่ายังอยู่ในช่วงที่ค่อนข้างสูงคือประมาณ 35- 50 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2.5) นอกจากนี้ พบว่าผู้สูบบุหรี่ในประเทศไทยมักเริ่มสูบบุหรี่ในช่วงอายุ 15-24 ปี โดยอายุเฉลี่ยที่เริ่มสูบบุหรี่อยู่ที่ 18.4 ปี ซึ่งเป็นช่วงอายุที่เหมาะต่อการนำมาเป็นกลุ่มที่ใช้ในการทดลองนำมาตรวจสอบความผิดปกติในอสุจิชายที่สูบบุหรี่ (ตารางที่ 2.6) มีจำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวันโดยเฉลี่ยอยู่ที่ 10.4 มวน (ตารางที่ 2.7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั้งประเทศที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไปที่สูบบุหรี่เป็นประจำ จำแนกตามจำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวัน กลุ่มอายุและจำนวนบุหรี่ที่สูบเฉลี่ยต่อวัน พ.ศ. 2547

กลุ่มอายุ (ปี)	จำนวนประชากรที่สำรวจ (พันคน)	จำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวัน (เปอร์เซ็นต์)				
		1 – 10 มวน	11 – 20 มวน	21 – 40 มวน	41 มวนขึ้นไป	จำนวนบุหรี่ที่สูบเฉลี่ยต่อวัน (มวน)
15 - 19	301.1	88.1	11.8	0.1	-	7.2
20 - 24	963.6	82.8	15.8	1.4	-	9.0
25 - 29	1,267.6	76.0	23.1	0.9	-	9.9
30 - 34	1,267.9	73.5	25.0	1.5	-	10.5
35 - 39	1,165.1	70.5	27.0	2.4	0.1	10.9
40 ปีขึ้นไป	4,662.2	69.4	27.3	3.1	0.2	10.8
รวม	9,627.6	72.9	24.8	2.2	0.1	10.4

ที่มา การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547 สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร (http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-5-47.xls)

2.11 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Taszarek และคณะ (2005) ได้ทำการตรวจสอบลักษณะภายนอกและด้านชีวเคมีของอสุจิในชายที่มีภาวะมีบุตรยากและมีประวัติการสูบบุหรี่ โดยแบ่งเป็นชายที่สูบบุหรี่และมีภาวะมีบุตรยาก 27 คน ชายที่ไม่สูบบุหรี่และมีภาวะมีบุตรยาก 79 คน และผู้บริจาคที่สุขภาพดีและไม่สูบบุหรี่ 82 คน พบว่าในชายที่สูบบุหรี่มีการเคลื่อนที่ของอสุจิไปข้างหน้าอย่างช้าๆ และมีการลดลงของการทดสอบด้วย Hypoosmotic swelling test ซึ่งต่ำกว่าในกลุ่มของชายที่มีภาวะมีบุตรยากและไม่สูบบุหรี่ และพบความเข้มข้นของเซลล์เม็ดเลือดขาวในน้ำอสุจิในคนที่สูบบุหรี่มากกว่าในคนที่ไม่สูบบุหรี่ และไม่พบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นของอสุจิ การเคลื่อนที่ อสุจิที่รูปร่างปกติ และอสุจิที่มีความบกพร่อง

Rubes และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาว่าการสูบบุหรี่และการบริโภคเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ในวัยรุ่นชายมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่เป็น disomy และการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำอสุจิหรือไม่ โดยศึกษาในวัยรุ่นชายอายุ 18 ปีที่สูบบุหรี่ (20 มวน/วัน เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 2 ปี) และดื่มแอลกอฮอล์ ที่สุขภาพแข็งแรง จำนวน 10 คน และวัยรุ่นชาย 15 คนที่ไม่สูบบุหรี่ ด้วยวิธี Multi-color FISH ในโครโมโซมแท่งที่ 8, X และ Y โดยได้ข้อสรุปว่าการสูบบุหรี่ในวัยรุ่นมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่เป็น disomy และการเสื่อมของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะเฉพาะของคุณภาพน้ำอสุจิและข้อบกพร่องเหล่านี้อาจส่งผลต่อการสืบพันธุ์ของเพศชาย และอาจเพิ่มโอกาสการมีบุตรที่มีกลุ่มอาการของอะนิวพลอยดี้ ได้ในอนาคต

Robbins และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาความเสี่ยงจากการดำรงชีวิตทั่วๆไป (การสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มคาเฟอีน และการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์) ต่อการเกิดอะนิวพลอยดี้ในอสุจิจากอาสาสมัคร 45 คน อายุ 19-35 ปี โดยใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบความถี่ของ อะนิวพลอยดี้ และ ดิพลอยดี้ ในโครโมโซม X, Y และ 18 ซึ่งมีความแตกต่างกันในระดับของความเสี่ยงจากการสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มคาเฟอีน และการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ พบว่า คาเฟอีนมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่เป็น อะนิวพลอยดี้ XX18 และ XY18, ดิพลอยดี้ XY18-18 และการเกิดจำนวนซ้ำของลักษณะ YY18-18 เมื่อควบคุมการดื่มแอลกอฮอล์ การสูบบุหรี่ และอายุของผู้บริจาค ส่วนแอลกอฮอล์นั้นมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่เป็น อะนิวพลอยดี้ XX18, ดิพลอยดี้ XY18-18 และการเกิดจำนวนซ้ำของลักษณะ XX18-18 เมื่อควบคุมการดื่มคาเฟอีน การสูบบุหรี่ และอายุของผู้บริจาค แต่ไม่เป็นที่แน่ชัดสำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการสูบบุหรี่กับ XX18 แม้ว่าจะทำการตัดช่วงอายุทิ้งไป แต่ยังสามารถยืนยันได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ XX18 อะนิวพลอยดี้ มีสาเหตุเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของอายุผู้บริจาค และกล่าวว่าการใช้เทคนิค FISH ในอสุจิได้รับการพิสูจน์ว่าเป็นสิ่งที่มีประโยชน์ในการค้นหาและเปรียบเทียบจำนวนความผิดปกติของพันธุศาสตร์ของเซลล์ในเซลล์อสุจิของมนุษย์ผ่านระดับที่แตกต่างกันของความเสี่ยงจากการสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มคาเฟอีน และการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

Shi และคณะ (2001) ได้ตรวจสอบความเกี่ยวข้องระหว่างการสูบบุหรี่และอสุจิที่เป็น อะนิวพลอยดี้ โดยการศึกษาในชายเชื้อชาติจีนที่มีการดำรงชีวิตคล้ายคลึงกันและไม่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่มีการสูบบุหรี่ที่แตกต่างกัน โดยใช้ Two multi-color FISH ในการตรวจสอบโครโมโซมแท่งที่ 13 และ 21 และใช้ Three-color FISH ในการตรวจสอบโครโมโซมเพศ โดยใช้โครโมโซมแท่งที่ 1 เป็นตัวควบคุมภายในของโครโมโซมร่างกาย เพื่ออ้างอิงการเกิดดิพลอยดี้ และการไฮบริไดเซชั่น ที่ไม่สมบูรณ์ พบว่าความถี่ของการเกิด disomy13 ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่มีมากกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ ในขณะที่ความถี่การเกิด disomy 21, X หรือY ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ และได้สรุปว่าการสูบบุหรี่อาจเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดอะนิวพลอยดี้ ในโครโมโซมดังกล่าวซึ่งชายแต่ละคนอาจมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นการเกิด อะนิวพลอยดี้ ในเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งถูกชักนำโดยการสูบบุหรี่แตกต่างกันไป

Potts และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงผลกระทบของการสูบบุหรี่ในเพศชายที่มีผลต่อดีเอ็นเอของอสุจิ โดยใช้วิธี Sperm chromatin structure assay (SCSA) ซึ่งเป็นการวัดการตอบสนองของดีเอ็นเอในอสุจิต่อการชักนำของกรดที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพ และวิธี Terminal deoxynucleotidyl transferase assay (TdTA) ซึ่งเป็นการวัดสายของดีเอ็นเอที่แตกหักโดยเติม biotinylated nucleotide dUTP ที่ปลาย 3'-OH ของสายดีเอ็นเอที่มีการแตกหัก โดยใช้ terminal deoxynucleotidyl transferase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อสุจิของชายที่สูบบุหรี่จะมีการตอบสนองต่อการชักนำของกรดที่ก่อให้เกิดการเสียภาพมากกว่าในชายที่ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.02$) และมีระดับของการแตกหักของสายดีเอ็นเอสูงกว่า ($P<0.05$) และได้สันนิษฐานว่า การสูบบุหรี่จะทำลายโครงสร้างของโครมาตินและทำให้เกิดการแตกหักภายในสายดีเอ็นเอในอสุจิของมนุษย์ การเปลี่ยนแปลงนี้อาจปรากฏผลในการกลายพันธุ์ของดีเอ็นเอในอสุจิ ซึ่งมีแนวโน้มให้เกิดการผิดรูปร่าง การเกิดมะเร็ง และโรคทางพันธุกรรมในลูกหลานได้

Baumgartner และคณะ (1999) ทำการศึกษาความผิดปกติจองจำนวนและรูปร่างโครโมโซมในอสุจิของผู้ป่วยที่รับการรักษาด้วยยา Diazepam (Valium®) โดยเปรียบเทียบกับหนูทดลองโดยใช้ multicolor FISH ศึกษาโครโมโซม 1, 16, 21, X และ Y ในผู้ป่วยที่ได้รับยาปริมาณ 0.7-7.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เพื่อศึกษาผลกระทบของยาที่มีต่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับยาในปริมาณ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม พบว่า ความถี่ของการเกิด ดิพลอยดี้ในอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่มของหนูทดลอง (0.018% กับ 0.002%) และผู้ที่รับยา Diazepam เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (2.9% กับ 1.8%)

Martin และคณะ (1998) ทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในอสุจิของผู้ป่วยมะเร็งอัณฑะในช่วงก่อน ระหว่าง และหลังการรักษาด้วยเคมีบำบัด โดยใช้เทคนิค Multicolor FISH เพื่อตรวจสอบอะนิวพลอยดี้ของโครโมโซม 1, 12, X และ Y และ ดิพลอยดี้ จากการศึกษาพบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของอสุจิที่มีโครโมโซม 24, XY ในกลุ่มระหว่าง (0.33%) และหลังการรักษาด้วยเคมีบำบัด (0.34%) เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนรับการรักษา (0.14%) ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาในหนูทดลองก่อนหน้านี้

Xia และคณะ (2004) ได้ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ที่ทำงานในโรงงานผลิตยาฆ่าแมลงที่ได้รับสาร Fenvalerate 12 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 30 คน โดยใช้เทคนิค multicolor FISH ศึกษาโครโมโซม X, Y และ 18 พบว่าความถี่ของ sex chromosome disomy, chromosome 18 disomy และ nullisomies ของโครโมโซมเพศและโครโมโซม 18 เพิ่มสูงขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษานี้เสนอว่าสาร Fenvalerate หรือกระบวนการเมตาบอลิสมของสารนี้ชักนำให้เกิดความผิดปกติของอสุจิในคนงานที่ได้รับสารนี้โดยก่อให้เกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในช่วงการสร้างตัวอสุจิ

Naccarati และคณะ (2003) ได้ทำการตรวจสอบความถี่ของอะนิวพลอยดี้และดิพลอยดี้ในผู้ที่ทำงานที่ต้องสัมผัสกับสไตรีน (styrene) และผู้ที่มีสุขภาพดีที่ไม่ได้สัมผัสกับสารนี้โดยใช้เทคนิค FISH ตรวจสอบโครโมโซมเพศและโครโมโซมแท่งที่ 2 พบว่า ไม่พบความแตกต่างของการเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะนิวพลอยดี้และดิพลอยดี้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างผู้ที่สัมผัสสารสไตรีนและกลุ่มควบคุม แต่พบว่าในการศึกษานี้ อายุมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด XX disomy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างอสุจิจากชายที่สูบบุหรี่จำนวน 5 คน และชายที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 5 คนในช่วงอายุ 18-30 ปี โดยเก็บตัวอย่างด้วยวิธี Masturbation

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 การเก็บตัวอย่างอสุจิ

- หลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.2.2 การเลี้ยงเชื้อ

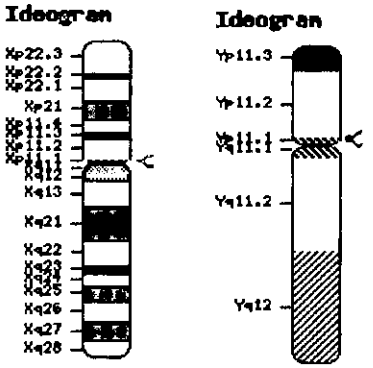
- จานเพาะเลี้ยง
- หลอดทดลอง
- ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth
- อาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar
- ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล
- เชื้อ *E.coli*

เชื้อ *E.coli* ที่ใช้ในการทำตัวติดตามได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันราชานุกูล เชื้อ *E.coli* ที่ใช้มี 2 ชนิด (ตารางที่ 3.1 และรูปที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดของโคลนที่ใช้ทำตัวติดตาม (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

รหัส	ตำแหน่งบนโครโมโซม	FISH	ขนาดพลาสมิด	Gene Bank
RP13-971O21	Xp11.1	Interphase	58 Mb	AL 591645.35
RP11-1126J10	Yp11.1	Interphase	39 Mb	AC 069323.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ก ข

รูปที่ 3.1 Ideogram แสดงตำแหน่งของการเข้าจับของตัวติดตามบนโครโมโซม X ที่ตำแหน่ง Xp11.1 (ก) และ บนโครโมโซมY ที่ตำแหน่ง Yp11.1 (ข)

ที่มา http://www.ncbi.nlm.nih.gov

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ (ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin)

- หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- สารละลาย A1
- บัฟเฟอร์ A2
- สารละลาย A3
- สารละลาย AW
- สารละลาย A4
- สารละลาย AE
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
- Water bath 50 องศาเซลเซียส
- Nucleospin plasmid column

3.2.4 การทำอิเลคโตรโฟรีซิส

- เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส
- อะกาโรสเจล
- สีย้อม
- เอธิเดียมโบรไมด์
- 1 X TBE buffer

3.2.5 การทำ Nick Translation และการตกตะกอนตัวติดตาม

3.2.5.1 การทำ Nick Translation โดยใช้ชุดทำ Nick Translation สำเร็จรูปของ Vysis

- หลอดทดลองขนาด 0.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดีเอ็นเอเป้าหมาย
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- Water bath 70 องศาเซลเซียส
- Vortex
- 0.1 mM dATP dCTP และ dGTP
- 0.1 mM dTTP
- spectrum-dUTP
- 10 X nick translation buffer
- nick translation enzyme

3.2.5.2 การตกตะกอนตัวติดตาม

- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส
- ดีเอ็นเอตัวติดตาม 300 – 500 นาโนกรัม
- แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์
- Salmon sperm
- 3 M Sodium acetate
- Deionized formamide
- Human Cot – 1 DNA
- Water bath 75 องศาเซลเซียส

3.2.6 การเตรียมสไลด์

- สไลด์
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- พาราฟิล์ม
- พาสเจอร์ปิเปต
- หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร
- 0.01 M Tris – 0.9 % NaCl
- Fixative (Methanol : Acetic acid; 3:1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.7 การทำเทคนิค Fluorescence in situ hybridization (FISH)

การทดลองหาวิธีที่เหมาะสม ในการทำ FISH เพื่อที่หาวิธีที่สามารถตรวจสอบสัญญาณได้อย่างชัดเจนโดย เทคนิค FISH ชนิด direct label

3.2.7.1 การเตรียมสไลด์

- จาร์แก้ว 11 ใบ
- แอลกอฮอล์ 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
- 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร RNase
- 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร Pepsin
- 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde
- 0.1 M DTT และ 0.01 M DTT
- 2 X SSC พีเอช 7.0
- 1 N HCl
- 1X PBS พีเอช 7.5
- 1 M $MgCl_2$
- Water bath 37 และ 73 องศาเซลเซียส

3.2.7.2 การทำเทคนิค FISH ชนิด direct label

1 Hybridization

- ตู้บ่ม 37 องสาเซลเซียส
- ตัวติดตามที่ติดสัญญาณด้วยสารเรืองแสง
- สไลด์ตัวอย่าง
- 70 เปอร์เซ็นต์ formamide/2X SSC
- แอลกอฮอล์ 70, 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- เครื่องอุ่นสไลด์อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
- ถาดสำหรับ Hybridize
- Cover slip
- Rubber glue
- Moisture chamber
- Water bath 73 องศาเซลเซียส

2 Post Hybridization

- จาร์แก้ว 2 ใบ
- Water bath 68 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 0.4 X SSC

- 2 X SSC

- DAPI II

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างอสุจิ

1 ทำการเก็บตัวอย่างอสุจิจากชายที่สูบบุหรี่และชายที่ไม่สูบบุหรี่ในช่วงอายุ 18-30 ปีด้วยวิธีการ Masturbation หลังจากทำการงดเว้นการหลั่งเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน โดยให้กลุ่มตัวอย่างกรอกข้อมูลส่วนตัวเกี่ยวกับอายุ จำนวนปีที่สูบบุหรี่ จำนวนบุหรี่ที่สูบต่อวัน และทำการเก็บตัวอย่างในหลอดทดลอง ขนาด 50 มิลลิลิตร (ตารางที่3.2)

2 เก็บตัวอย่างไว้ที่ -70 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

ตารางที่ 3.2 ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างชายที่สูบบุหรี่และไม่สูบบุหรี่

ตัวอย่างที่	อายุ (ปี)	จำนวนการสูบบุหรี่ (มวน/วัน)	ระยะเวลาที่สูบ (ปี)
C2	22	4	5
C5	18	20	2
C6	24	4	9
C7	18	20	2
C8	19	2	3
D3	19	-	-
D4	20	-	-
D5	21	-	-
D6	20	-	-
D8	22	-	-

3.3.2 การเลี้ยงเชื้อ *E.Coli* ที่มียีนด้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล

1 เตรียมอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร

2 นำ *E.coli* มาทำการ cross streak ลงบนเพลท

3 นำเพลทที่ทำ cross streak เป็น 1 ° cultureนำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน

4 เขี่ยโคโลนีที่ขึ้นเดี่ยวๆ จาก 1 ° culture มาทำ cross streak ลงบนเพลทที่ 2 เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 ° culture นำไปบ่มที่ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

5 เตรียมอาหาร LB borth ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ใส่หลอดทดลอง 3 มิลลิลิตร

6 เขี่ยโคโลนีที่ขึ้นเดี่ยวๆ จาก 2 ° culture เขี่ยมาลงในอาหารเหลว นำในหลอดทดลองที่มีเชื้อไปเลี้ยงแบบเขย่าที่ 250 - 280 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 37 ° องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 วัน

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

1 แบ่งอาหารเหลวใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เชื้อหนึ่งตัวใช้ หลอดทดลอง 2 หลอด) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที

2 เทส่วนใสด้านบนทิ้ง เติมสารละลายA1 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่ 1 ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต

3 ดูดสารละลาย A1 ในหลอดทดลองที่ 1 มาใส่ในหลอดทดลองที่ 2 ของเชื้อตัวเดียวกัน และผสมด้วยปิเปต

4 เติมสารละลาย Buffer A2 250 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยการเอียงหลอดทดลองไปมา 6-8 ครั้ง ห้าม vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที

5 เติมสารละลาย A3 300 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน 6-8 ครั้ง ห้าม vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 10 นาที

6 ดูดสารละลายใสที่ได้ใส่ใน plasmid column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 1 นาที

7 เทสารละลายด้านล่างใน plasmid column ทิ้ง เติมสารละลาย AW ซึ่งบ่มไว้ที่ 50 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร ลงไปใน plasmid column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 1 นาที

8 เทสารละลายด้านล่างใน plasmid column ทิ้ง เติมสารละลาย A4 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 1 นาที จากนั้นเทสารละลายด้านล่างใน plasmid column ทิ้ง

9 นำ plasmid column ไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นนำ plasmid column ไปใส่ในหลอดทดลอง ใหม่ขนาด 1.5 ไมโครลิตร

10 เติมสารละลาย AE 50 ไมโครลิตรบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 11,000 รอบ/นาที 1 นาที ส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือ ดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสงเพื่อหาความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

นำสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้มีความเข้มข้น 1/500 เท่า แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรเพื่อคำนวณหาความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอที่สกัดได้ และหาความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่หาได้จากการคำนวณ คือ ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 1 มีปริมาณดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ หาได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 ต่อ 280

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาโนเมตร ค่าที่ได้หากอยู่ในช่วง 1.65 - 2.00 คือ ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ถ้าค่าที่ได้มากกว่า 2.00 แสดงว่าปนเปื้อน ฟีนอล – คลอโรฟอร์ม หรือ อาร์เอ็นเอ แต่ถ้าค่าที่ได้น้อยกว่า 1.65 แสดงว่าปนเปื้อนโปรตีน

3.3.5 การทำ Nick translation และการตกตะกอนตัวติดตาม

3.3.5.1 การทำ Nick translation โดยใช้ชุด Nick translation สำเร็จรูปของ Vysis

การทำ Nick Translation คือ การนำดีเอ็นเอเป้าหมายที่สกัดได้มาติดสารเรืองแสงด้วยการทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดแบบสุ่มเพื่อได้ตัวติดตามที่มีขนาดที่เหมาะสมสำหรับการทำไฮบริไดเซชั่น โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1 ผสมสารที่ใช้ในการทำ Nick translation ในหลอดทดลอง ขนาด 0.2 มิลลิลิตรที่ห่อด้วยฟอยล์เพื่อป้องกันแสง โดยใส่สารที่เป็นเอนไซม์ลงไปเป็นตัวสุดท้าย สารที่ใช้ในชุดสกัดสำเร็จรูปมีดังต่อไปนี้

Nuclease-free water	(17.5 – X) ไมโครลิตร
ดีเอ็นเอเป้าหมาย ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	X ไมโครลิตร
0.2 mM spectrum-dUTP	2.5 ไมโครลิตร
0.1 mM dTTP	5.0 ไมโครลิตร
0.1 mM dATP dCTP และ dGTP	10.0 ไมโครลิตร
10 X Nick translation buffer	5.0 ไมโครลิตร
Nick translation enzyme	10.0 ไมโครลิตร
ปริมาตรรวมทั้งหมด	50 ไมโครลิตร

2 ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้สารผสมกัน ก่อนนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที

3 นำตัวติดตามที่ได้มาทำอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อดูขนาดของตัวติดตามว่าได้ขนาดตามที่ต้องการแล้วหรือไม่ เมื่อได้ขนาดของตัวติดตามที่ต้องการแล้ว ทำการหยุดปฏิกิริยาโดยการแช่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4 เก็บตัวติดตามที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.5.2 การทำอิเลคโตรโฟรีซีส

เป็นการหาขนาดตัวติดตามที่ได้จากการทำ Nick translation ว่าเป็นขนาดที่เหมาะสมในการทำไฮบริไดเซชั่นหรือไม่ ซึ่งขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 300-500 bp โดยทำการเทียบกับแถบดีเอ็นเอ Marker 100 bp โดยมีขั้นตอนต่อไปนี้

1 เตรียมอะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์

2 ใช้ความต่างศักย์ 50 โวลต์ นาน 1-2 ชั่วโมง หรือ ใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 30-45 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3 นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ 5 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 15-20 นาที

4 นำเจลที่ได้ไปตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต และถ่ายภาพ

3.3.5.3 การตกตะกอนตัวติดตาม

ในการตกตะกอนตัวติดตาม ทุกขั้นตอนต้องทำในที่มืดเนื่องจากตัวติดตาม ถูกติดฉลากด้วยสารเรืองแสง หากตัวติดตามสัมผัสกับแสงจะมีผลทำให้ประสิทธิภาพของตัวติดตามลดลง

1 นำตัวติดตามที่ผ่านการทำ Nick translation มา 300 – 500 นาโนกรัมหรือประมาณ 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2 เติม salmon sperm DNA 0.6 ไมโครลิตร

3 เติม 1 ไมโครกรัม human cot – 1 DNA (หรือประมาณ 2 ไมโครลิตร)

4 เติม DNA – free water 7.4 ไมโครลิตร

5 เติม 2 ไมโครลิตรของ 3 M sodium acetate และ 50 ไมโครลิตร 100 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล ผสมให้เข้ากัน ไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืน

6 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7 เทส่วนใสทิ้งจะเห็นตะกอนที่ก้นหลอด จากนั้นเติม 50 ไมโครลิตร 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบ/นาที 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

8 เทส่วนใสทิ้งแล้วปล่อยทิ้งไว้ให้เอทานอลระเหยออกให้หมด

9 ละลายตะกอนด้วย Hybridization solution 20 ไมโครลิตร vortex เบาๆ นำไปแช่ใน water bath 37 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

10 เก็บตัวติดตามไว้ที่ ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การเตรียมสไลด์

ขั้นตอนนี้เป็นการนำตัวอย่างอสุจิที่ได้มาล้างให้สะอาดและเตรียมลงบนสไลด์

1 นำอสุจิที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นนำอสุจิ 0.5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.01 M Tris-0.9% NaCl 3.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง 15 มิลลิลิตร เพื่อทำการล้างอสุจิ

2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

3 ทำการล้างอสุจิ 0.5 มิลลิลิตร ด้วย 0.01 M Tris-0.9% NaCl 3.5 มิลลิลิตร ซ้ำอีก 3 รอบ

4 เติม Fixative 2 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 รอบ/นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

5 ทำการล้างอสุจิด้วย Fixative ซ้ำอีก 2 รอบ

6 เติม Fixative 2 มิลลิลิตร ทำการกระจายเซลล์โดยการใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดพ่น (ห้าม vortex)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7 หยดสารละลายอสุจิที่ได้บนสไลด์ 1-2 หยด จากนั้นหยด Fixative ที่เย็นทับ 1-2 หยด และทิ้งสไลด์ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องประมาณ 5 นาที

8 ส่องดูด้วยกล้อง phase contrast เพื่อดูการกระจายตัวและรูปร่างของอสุจิ และใช้ดินสอขีดข้างสไลด์บริเวณที่มีการกระจายตัวของอสุจิเหมาะสมและเหมาะแก่การนำไปไฮบริไดเซชั่นต่อไป

3.3.7 การทำ Fluorescence in situ hybridization (FISH)

3.3.7.1 การเตรียมสไลด์

เป็นขั้นตอนเพื่อกำจัดโปรตีนส่วนเกินและสิ่งสกปรกต่างๆ ออกจากสไลด์ และทำให้ตัวติดตามเข้าจับกับโครโมโซมของตัวอย่างได้อย่างง่ายขึ้น โดยขั้นตอนการเตรียมสไลด์มีวิธีการดังนี้

1 วางสไลด์บนจาร์แก้วใน water bath 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2 หยด 0.1 M DTT ใน 0.1 M Tris 100 ไมโครลิตร บนสไลด์ ปิดพาราฟิล์ม นาน 10 นาที โดยวางสไลด์บนจาร์แก้วใน water bath 37 องศาเซลเซียส

3 หยด 0.01 M DTT ใน 0.1 M Tris 100 ไมโครลิตร บนสไลด์ ปิดพาราฟิล์ม นาน 10 นาทีโดยวางสไลด์บน จาร์แก้ว ใน water bath 37 องศาเซลเซียส

4 ล้างสไลด์ใน 2X SSC พีเอช 7.0 ที่ 73 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที

5 เตรียม RNase ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1 ไมโครลิตร กับ 2X SSC 200 ไมโครลิตร ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

6 หยด RNase ที่เตรียมไว้บนสไลด์ ปิดพาราฟิล์ม นาน 10 นาที โดยวางสไลด์บนจาร์แก้วใน water bath 37 องศาเซลเซียส

7 นำสไลด์ล้างใน 2X SSC ที่ 37 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เขย่าสไลด์ทุก 2 นาที

8 เตรียม 10 เปอร์เซ็นต์ Pepsin ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 1 N HCl 500 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 49.5 มิลลิลิตร ในจาร์แก้วที่ water bath 37 องศาเซลเซียส แช่สไลด์ 10 นาที โดยเขย่าทุกๆ 2 นาที

9 ล้างสไลด์ใน 1 X PBS ที่ อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที

10 เตรียม 1X PBS 47.5 ml กับ 37 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde 1.3 มิลลิลิตร และ $MgCl_2$ 2.5 มิลลิลิตร ในจาร์ เก็บที่มืด แช่สไลด์นาน 12 นาที

11 แช่สไลด์ใน 1X PBS ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เขย่าสไลด์ทุกๆ 2 นาที

12 แช่สไลด์ในแอลกอฮอล์ 70 85 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้องตามลำดับ

13 ตากสไลด์ให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.7.2 การทำเทคนิค FISH ชนิด Direct label

I Hybridization

เป็นขั้นตอนที่ตัวติดตามเข้าจับกับโครโมโซมที่ตำแหน่งที่มีลำดับเบสที่เป็นคู่สมกัน โดยในการทดลองนี้ใช้ตัวติดตาม 2 ชนิดทำให้สามารถตรวจสอบหาความผิดปกติของโครโมโซมได้ ในการทำขั้นตอนที่เกี่ยวกับตัวติดตามที่ติดสารเรืองแสง อย่าให้ตัวติดตามโดนแสงมากเพราะทำให้สารเรืองแสงเสียคุณสมบัติ

1.1 นำตัวติดตามที่ได้จากการตกตะกอนตัวติดตามชนิดละ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ deionized formamide ในอัตราส่วน 1:1 บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

1.2 นำสไลด์ไปทำให้เสียสภาพ โดยหยด 70 เปอร์เซ็นต์ formaldehyde/ 2 X SSC 1 มิลลิลิตร ใน water bath 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที

1.3 ทำสไลด์ให้แห้งโดยการนำสไลด์มาแช่ใน เอทานอลที่เย็น 70 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ครั้งละ 1 นาที ตากสไลด์ให้แห้งบน เครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เกิน 2 นาที

1.4 ทำตัวติดตามให้เสียสภาพโดยนำหลอดทดลองที่มีตัวติดตามไปลอยใน water bath 75 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที

1.5 หยดตัวติดตามที่เตรียมไว้จากข้อที่ 1.4 ลงบนสไลด์ และปิดด้วย cover slip แล้วปิดขอบด้วย rubber glue

1.6 นำสไลด์ใส่ใน moisture chamber แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2 Post hybridization

2.1 นำสไลด์ออกจากตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ดึงเอา rubber glue และ cover slip ออก

2.2 แช่ใน 0.4 X SSC อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เขย่าเบาๆ

2.3 นำมาแช่ใน 2 X SSC อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที เขย่าเบาๆ

2.4 นำมาเอียงให้น้ำส่วนเกินออกไป ตากสไลด์ให้แห้ง ในที่มืด

2.5 หยด DAPI II 4 ไมโครลิตรลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip รอประมาณ 1 - 2 ชั่วโมง ก่อนนำไปตรวจสอบสัญญาณสีด้วยกล้องฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 การศึกษากลุ่มตัวอย่าง

ในการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมเพศในชายที่สูบบุหรี่ โดยเทคนิค Fluorescence In Situ Hybridization ได้ทำการสำรวจตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ซึ่งกลุ่มที่ 1 เป็นชายที่สูบบุหรี่จำนวน 5 คน และกลุ่มที่ 2 เป็นชายที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 5 คน โดยทั้ง 2 กลุ่มเป็นชายที่อยู่ในช่วงวัยเจริญพันธุ์มีอายุ 18 - 25 ปี ผลที่ได้ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการศึกษากลุ่มตัวอย่างชายที่สูบบุหรี่และที่ไม่สูบบุหรี่

ข้อมูลของกลุ่มตัวอย่าง	กลุ่มชายที่สูบบุหรี่ (mean ± S.D.) (n=5)	กลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่ (mean ± S.D.) (n=5)
อายุ (ปี)	20.20 ± 2.683	20.40 ± 1.140
จำนวนบุหรี่ที่สูบ (มวน/วัน)	10.0 ± 9.165	-
ระยะเวลาที่สูบ (ปี)	4.20 ± 2.950*	-

(ค่าเฉลี่ยเลขคณิต ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

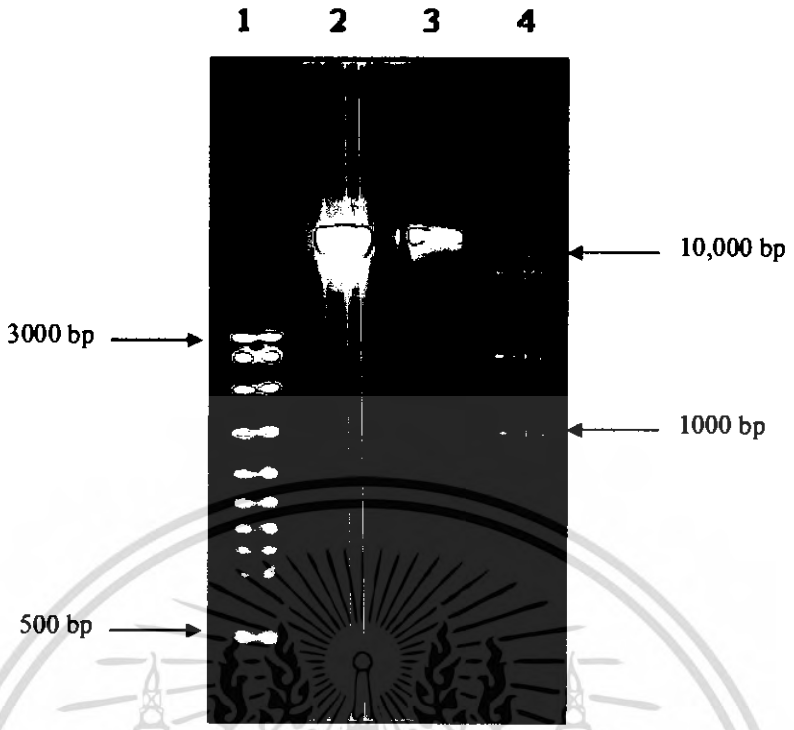
* $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่

อายุเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดการแปรผลที่ผิดพลาดได้ในกลุ่มการทดลองเนื่องจากอายุมีความสัมพันธ์กับการเกิดอะนิวพลอยดี้ในอสุจิ (Naccarati และคณะ, 2003; Robbins และคณะ, 1997b) สำหรับในการทดลองนี้พบว่า อายุของกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่

4.1.2 การสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

จากการเลี้ยงเชื้อ *E. coli* ที่มีพลาสมิดขนาด 58 Mb และ 39 Mb ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซม Xp11.1 และ Yp11.1 ตามลำดับ เมื่อนำมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิดสำเร็จรูป nucleospin และทำการแยกขนาดพลาสมิดด้วยเทคนิค เจลอิเลคโตรโฟรีซิส (รูปที่ 4.1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลการแยกขนาดพลาสมิดด้วยเทคนิค เจลอิเลคโตร โฟรีซิส

แถบที่ 1 คือ Marker ขนาด 100 bp

แถบที่ 2 คือ พลาสมิดของโคลน RP13 - 971O21 มีตำแหน่งบนโครโมโซม Xp11.1

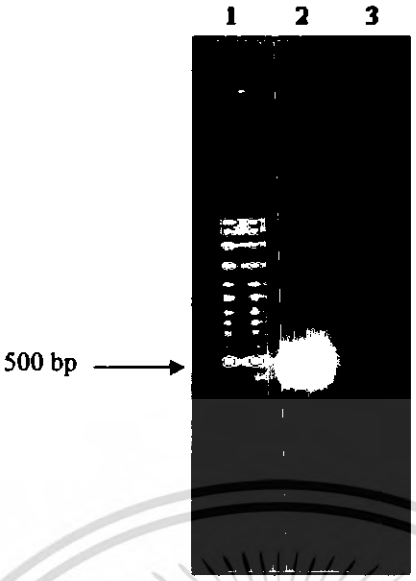
แถบที่ 3 คือ พลาสมิดของโคลน RP11 - 1126J10 มีตำแหน่งบนโครโมโซม Yp11.1

แถบที่ 4 คือ Marker ขนาด 1 Kb

4.1.3 การทำ Nick translation

ขนาดของดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการทำตัวติดตามคือ 300 - 500 bp ในการศึกษานี้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาโดยการตัดแบบสุ่มของเอนไซม์ คือ 1 ชั่วโมง 30 นาที ผลที่ได้ตามรูปที่ 4.2 ขนาดของดีเอ็นเอที่ได้เพื่อนำมาทำตัวติดตามซึ่งได้จากโคลน RP13-971O21 ที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ Xp11.1 มีขนาด 500 - 1,200 bp และ ตัวติดตามซึ่งได้จากโคลน RP11-1126J10 ที่มีตำแหน่งบนโคร โมโซมที่ Yp11.1 มีขนาด 100 - 1,200 bp ซึ่งขนาดของตัวติดตามทั้ง 2 ถือว่าเป็นขนาดที่เหมาะสมในการทำตัวติดตามที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค FISH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 ผลการแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิค เจลอิเลคโตรโฟรีซิส ภายหลังการทำ Nick translation

แถบที่ 1 คือ Marker ขนาด 100 bp

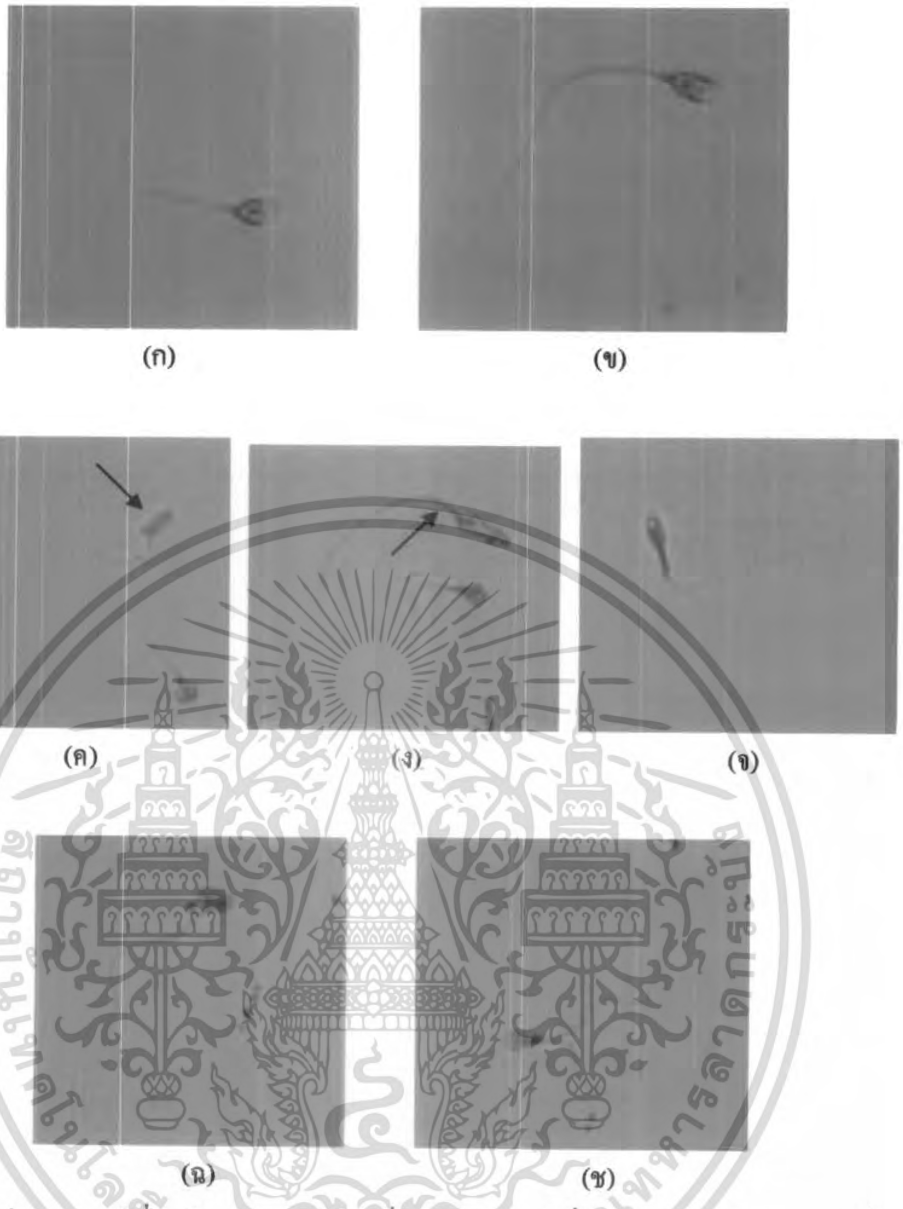
แถบที่ 2 คือ ตัวติดตามที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ Xp11.1

แถบที่ 3 คือ ตัวติดตามที่มีตำแหน่งบนโครโมโซมที่ Yp11.1

4.1.4 การศึกษารูปร่างของอสุจิ

ในการศึกษาลักษณะของอสุจิในระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่ พบว่าทั้ง 2 กลุ่มการทดลองพบรูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติ (รูปที่ 4.3) แต่โอกาสในการพบรูปร่างที่ของอสุจิที่ผิดปกติ จากการสังเกตในกลุ่มของชายไม่ที่สูบบุหรี่มีโอกาสพบรูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติได้น้อยกว่ากลุ่มชายที่สูบบุหรี่ โดยลักษณะของอสุจิที่ผิดปกติได้แก่ ลักษณะของรูปร่างหัวของอสุจิที่ผิดปกติ หัวโต หัวเล็ก อสุจิที่มีลักษณะ 2 หัว ลักษณะของรูปร่างหางของอสุจิที่ผิดปกติ หางสั้น อสุจิที่มีลักษณะ 2 หาง เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



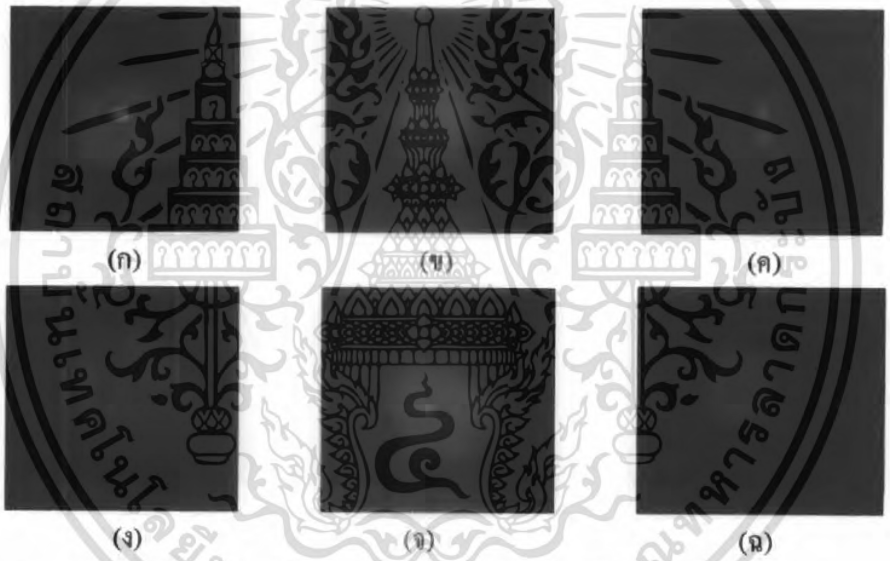
รูปที่ 4.3 รูปร่างของอสุจิที่ปกติและผิดปกติ โดยที่รูปร่างของอสุจิที่ปกติ (ก และ ข) ส่วน อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ ได้แก่ อสุจิที่มีลักษณะหัวและคอผิดปกติ (ถูกศรชี้) (ค และ ง) อสุจิที่มีลักษณะคอผิดปกติ (จ) อสุจิที่มี 2 หัว (ฉ) และ อสุจิที่มี 2 หาง (ช)

4.1.5 การทำเทคนิค FISH

ในการตรวจนับโครโมโซมเพศในอสุจิโดยใช้ตัวติดตามที่ทำขึ้นเอง กำหนดให้ตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีแดงคือโครโมโซม X และตัวติดตามที่ติดสัญญาณสีเขียวคือโครโมโซม Y (รูปที่ 4.4) ทำการสุ่มนับอสุจิทั้งหมด 2,613 จากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง โดยทำการนับอย่างน้อย 200 ตัวในแต่ละตัวอย่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ดังสรุปในตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 4.4 สัญญาณสีที่ปรากฏภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ที่กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 4.5 สัญญาณสีที่ปรากฏเมื่อทำการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า กำหนดให้สีแดงคือ โครโมโซม X และสีเขียวคือ โครโมโซม Y โดยตรวจสอบพบอสุจิที่มีโครโมโซมเพศปกติ X หรือ Y (ก และ ข ตามลำดับ) และ อสุจิที่มีโครโมโซมเพศผิดปกติ คือ อสุจิที่มีโครโมโซมเพศเป็นXX (ค), YY (ง), XY (จ) และไม่มีสัญญาณสี (ฉ)

ผลจากการนับสัญญาณสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ พบว่าในแต่ละตัวอย่างมีโอกาสพบโครโมโซม X หรือ Y ได้ใกล้เคียงกัน และพบความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศในอสุจิหลายชนิด ได้แก่ XX, YY, XY, XXY, XYY และไม่มีสัญญาณสี ดังรูปที่ 4.5 ซึ่งเปอร์เซ็นต์ที่พบความผิดปกติเหล่านี้แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของโครโมโซม X, Y และความผิดปกติของโครโมโซมเพศชนิดต่างๆ ในแต่ละตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ชนิดของโครโมโซมที่ตรวจพบ (เปอร์เซ็นต์)							
	X	Y	XX	XY	YY	XXY	XYY	ไม่มีสัญญาณสี
C2	51.47	43.63	0	1.47	0.98	0.49	0	1.96
C5	44.18	48.59	1.61	1.61	2.41	0	0.40	1.20
C6	44.15	49.02	0.98	0	2.54	0	0	5.39
C7	38.97	56.25	0.37	0.74	2.94	0	0	0.74
C8	47.49	48.67	0	0.59	3.24	0	0	0
D3	50.93	46.47	0.37	0.74	1.12	0	0	0.37
D4	44.04	53.80	0.36	0.12	0.36	0	0	0.72
D5	45.71	52.24	0	1.22	0	0	0	0.82
D6	48.60	48.20	0.80	0.40	0.80	0	0	1.19
D8	37.30	61.05	0	0.66	0.33	0	0	0.66

การศึกษาไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของโครโมโซมเพศของอสุจิที่ปกติ คือ มีโครโมโซม X หรือ Y ทั้งในกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และชายที่ไม่สูบบุหรี่ และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของลักษณะโครโมโซมที่ผิดปกติทั้งแบบ XX, XY, XXY, XYY และ ไม่มีสัญญาณสี แต่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของโครโมโซมเพศที่ผิดปกติที่มีโครโมโซมเป็น YY เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่ ($P < 0.05$) และพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อรวมลักษณะที่ผิดปกติทั้งหมดของโครโมโซมเพศในอสุจิ ($P < 0.05$) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 4.3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบความถี่การเกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพศในอสุจิระหว่างกลุ่มชายที่สูบบุหรี่ และที่ไม่สูบบุหรี่

ผลการทำ FISH		กลุ่มชายที่สูบบุหรี่ (mean ± S.D.) (n = 5)	กลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่ (mean ± S.D.) (n = 5)
จำนวนอสุจิที่นับ (เซลล์)		1,268	1,345
ลักษณะโครโมโซมที่ปกติ	X	113.60 ± 28.077	121.20 ± 10.035
	Y	125.60 ± 32.860	141.60 ± 26.567
	รวม	239.20 ± 56.716	262.80 ± 23.552
ลักษณะโครโมโซมที่ผิดปกติ	XX	1.40 ± 1.673	0.80 ± 0.837
	XY	2.20 ± 1.483	2.00 ± 0.707
	YY	6.40 ± 3.362*	1.40 ±1.140
	XXY	0.20 ± 0.447	0.00
	XYY	0.20 ± 0.447	0.00
	ไม่พบสัญญาณสี	4.00 ± 4.183	2.00 ± 0.707
	รวม	14.40 ± 3.507*	6.20 ±1.304

* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่

จากข้อมูลองค์การอนามัยโลก รายงานถึงจำนวนผู้เสียชีวิตจากการสูบบุหรี่ พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปีและเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตของคนทั่วโลกมากกว่าการเสียชีวิตจากโรคเอดส์ วัณโรค อุบัติเหตุ การฆ่าตัวตาย และการเสียชีวิตระหว่างคลอดรวมกันทั้งหมด และจากการวิจัยทางการแพทย์พบว่า อัตราเสี่ยงต่อการป่วยและเสียชีวิตจากการสูบบุหรี่นั้น สูงกว่าที่เคยคาดไว้ (สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, 2549) นอกจากจะส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บุหรี่เองแล้ว ผลกระทบที่เกิดขึ้นยังส่งผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์สืบพันธุ์ (Shi และคณะ, 2001) ซึ่งสามารถส่งต่อความผิดปกตินั้นไปยังลูกหลานได้

อายุเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดอะนิวพลอยดี้บนโครโมโซม โดยเฉพาะอย่างยิ่งบนโครโมโซมเพศ (Naccarati และคณะ, 2003; Robbins และคณะ, 1997) แต่บางการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุและการเกิดอะนิวพอยดี้ (Harkonen และคณะ, 1999; Shi และคณะ, 2001) ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าค่าเฉลี่ยอายุของกลุ่มชายที่สูบบุหรี่และกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่ไม่แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันอย่างมีนัยสำคัญ (20.20 ± 2.683 และ 20.40 ± 1.140 ตามลำดับ) (P<0.05) จึงสามารถตัดปัจจัยด้านอายุที่ก่อให้เกิดอะนิวพลอยดี้เพิ่มขึ้นในแต่ละบุคคลออกไป

จากผลการทดลองพบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนอสุจิที่มีความผิดปกติของโครโมโซมเพศชนิด YY ในกลุ่มชายที่สูบบุหรี่ (6.40 ± 3.362) (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (1.40 ±1.140) (P<0.05) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับการศึกษาของ Rubes และคณะ (1998) เกี่ยวกับผลกระทบของการสูบบุหรี่ในวัยรุ่นชายอายุ 18 ปี ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของอสุจิที่มีโครโมโซมเพศชนิด YY และการเสื่อมของลักษณะเฉพาะของคุณภาพน้ำอสุจิ

สำหรับในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนอสุจิที่มีโครโมโซมเพศปกติ และจำนวนอสุจิที่มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศชนิด XX, XY, XYY และ XXY Shi และคณะ (2001) พบว่าความถี่ของการเกิด disomy13 ในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่มีมากกว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ ในขณะที่ความถี่การเกิด disomy 21, X หรือY ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างที่สูบบุหรี่และกลุ่มตัวอย่างที่ไม่สูบบุหรี่ และกล่าวว่าชายแต่ละคนอาจมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นการเกิดอะนิวพลอยดี้ในเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งถูกชักนำโดยการสูบบุหรี่แตกต่างกันไป จากการที่พบจำนวนอสุจิที่มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศแตกต่างกันไปนั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยภายนอกที่ไม่สามารถควบคุมได้ในแต่ละตัวอย่าง เพราะนอกจากการสูบบุหรี่แล้วยังมีปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อความผิดปกติของสารพันธุกรรมในเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละตัวอย่างแตกต่างกันไป ดังเช่น Robbins และคณะ (1998) ที่ได้ทำการศึกษาความเสี่ยงจากการ การสูบบุหรี่ การดื่มเครื่องดื่มคาเฟอีน และการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่อการเกิดอะนิวพลอยดี้ ในอสุจิจากกลุ่มตัวอย่างอายุ 19-35 ปี โดยใช้เทคนิค FISH ในการตรวจสอบความถี่ของอะนิวพลอยดี้และดิพลอยดี้ ในโครโมโซม X, Y และ 18 ซึ่งพบว่าในแต่ละกลุ่มการทดลองพบชนิดความผิดปกติของโครโมโซมแตกต่างกันออกไป โดยพบความสัมพันธ์ของการเกิดอะนิวพลอยดี้ในกลุ่มที่ดื่มเครื่องดื่มคาเฟอีน และกลุ่มที่ดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของการเกิดอะนิวพลอยดี้ในกลุ่มชายที่สูบบุหรี่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาจำนวนโครโมโซมเพศในอสุจิของชายที่สูบบุหรี่โดยมีกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งอายุเฉลี่ยของทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองพบว่า กลุ่มชายที่สูบบุหรี่มีความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมเพศชนิด YY แตกต่างจากกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่อย่างมีนัยสำคัญ (6.40 ± 3.362 และ 1.40 ±1.140 ตามลำดับ) ($P<0.05$) และเมื่อเปรียบชนิดของความผิดปกติทั้งหมดของจำนวนโครโมโซมเพศในกลุ่มชายที่สูบบุหรี่เปรียบเทียบกับกลุ่มชายที่ไม่สูบบุหรี่พบว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยในกลุ่มของชายที่สูบบุหรี่จะพบอสุจิที่มีจำนวนโครโมโซมเพศผิดปกติมากกว่ากลุ่มที่ไม่สูบบุหรี่ (14.40 ± 3.507 และ 6.20 ±1.304 ตามลำดับ) ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนอสุจิที่มีโครโมโซมเพศปกติ (X หรือ Y) และเมื่อเปรียบเทียบความผิดปกติของโครโมโซมแต่ละชนิดในกลุ่มตัวอย่างทั้งสองกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนอสุจิที่มีโครโมโซมเพศผิดปกติชนิด XX, XY, XYY, XXY และไม่พบสัญญาณสี

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาตัวอย่างให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อทำให้การวิเคราะห์ข้อมูลมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น

2. ควรเพิ่มตัวติดตามในโครโมโซมร่างกายเป็นการยืนยันประสิทธิภาพการเข้าจับของตัวติดตามกับตัวอย่าง เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ที่ได้มีความถูกต้องและหลากหลายมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ประสงค์ หลำสะอาด และ จิตเกษม หลำสะอาด. 2545. คู่มือเอนทรานซ์ระบบใหม่ ชีววิทยา ม.4-6. กรุงเทพฯ : พ.ศ. พัฒนา.

พรรณี ฐิดาภิชิต. 2543. หลักพันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. พันธุศาสตร์ของเซลล์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547. [Online]. Available http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-4-47.xls

สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547. [Online]. Available : http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-5-47.xls

สำนักงานสถิติแห่งชาติ กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร. การสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ และการดื่มสุราของประชากร พ.ศ. 2547. [Online]. Available : http://service.nso.go.th/nso/data/data23/stat_23/toc_4/4.4-8-47E.xls

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2549. สถิติการตายจากการสูบบุหรี่. [Online]. Available : http://www.thaihealth.or.th/news.php?id=933

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. 2549. บุหรี่ มหันตภัยร้าย ก่อเกิดสารพัดโรค. [Online]. Available : http://www.thaihealth.or.th/news.php?id=100

Baumagartner, A., Schid, T.E., Schuetz, C.G. and Adler, I.D. 2001. Detection of aneuploidy in rodent and human sperm by multicolor FISH after chronic exposure to diazepam. *Mutat. Res. -Gen. Tox. En.* 490(1). 11-19.

Martin, R.H., Ernst, S., Rademaker. A., Barclay, L., Ko, E. and Summers, N. 1999. Analysis of sperm chromosome complements before, during, and after chemotherapy. *Cancer Genet. Cytogen.* 108(2). 133-136

Naccarati, A., Zanello, A., Landi, S., Consigli, R., and Migliore, L., 2003. Sperm-FISH analysis and human monitoring: a study on workers occupationally exposed to styrene. *Mutat. Res.* 537. 131–140.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Potts, R.J., Newbury, C.J., Smith, G., Notarianni, L.J. and Jefferies, T.M. 1999. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res.* 423(1-2). 103-11

Robbins, W.A., Vine, M.F., Truong, K.Y. and Everson, R.B. 1997b. Use of fluorescence in situ hybridization (FISH) to assess effects of smoking, caffeine, and alcohol on aneuploidy load in sperm of healthy men. *Environ. Mol. Mutagen.* 30, 175–183.

Rubes, J., Lowe, X., Moore II, D., Perreault, S., Slott, V., Evenson, D., Selevan, S.G., and Wyrobek, A.J. 1998. Smoking cigarette is associated with increased sperm disomy in teenage man. *Fertility and Sterility.* 70. 715-23.

Sepaniak, S., Forges, T., Fontaine, B., Gerard, H., Foliguet, B., Guillet-May, F., Zaccabri, A., and Monnier-Barbarino, P. 2004. Negative impact of cigarette smoking on male fertility: from spermatozoa to the offspring. *J Gyneco.l Obste.t Biol. Reprod. (Paris).* 33(5). 384-90.

Shi, Q., Ko, E., Barcley, L., Hoang, T., Rademarker, A and Martin, R. 2001. Cigarette smoking and aneuploidy in human sperm. *Mol. Reprod. Dev.* 59(4): 417- 21

Taszarek, H.G., Depa-Martynow, M., Derwich, K., Pawelczyk, L. and Jedrzejczak, P. 2005. The Influence of cigarette smoking on sperm quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Przegl. Lek.,* 62(10), 978-81.

Xia, Y., Bian, Q., Xu, L., Cheng, S., Song, L., Liu, J., Wu, W., Wang, S. and Wang, X. Genotoxic effects on human spermatozoa among pesticide factory workers exposed to fenvalerate. *Toxicology.* 203, 49–60

Environmental and Occupational Hazards and Male infertility. 2006. [Online]. Available : http://www.uhmc.sunysb.edu

http://uuhsc.utah.edu/healthinfo/adult/men/infertil.htm

http://th.wikipedia.org/wiki

http://www.thaiantitobacco.com

http://academic.pgcc.edu/~aimholtz/

http://www.il-st-acad-sci.org/androl1.html

http://www.homefertility.com/morphology.jpg

http://users.rcn.com/../Sexual_Reproduction.html

http://www.anselm.edu/.../genbio/geneticsnot.html

http://www1.geneticsolutions.com/PageReq?id=3844:1873

http://members.aol.com/chrominfo/intfish.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

http://members.aol.com/chrominfo/metafish.htm

http://www.accessexcellence.org/RC/VL/GG/sky.html

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

http://en.wikipedia.org/wiki/Sperm

http://www.einstein-syndrome.com/house/img/evan.jpg

http://cas.bellarmine.edu/.../gen03.gif

http://www.antenataltesting.info

http://www.thefetus.net

http://classroom.psu.ac.th/users/peerasak/ai/spermato/spermatotext.html

http://www.dld.go.th/biotech/... /D-2_Semen&Composition.htm

http://www.gfmer.ch/.../Semen_analysis_rrumbullaku.htm

http://faculty.sunydutchess.edu/Scala/Bio102/PDF/Spermatogenesis.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. 20X SSC 500 มิลลิลิตร พีเอช 7.0

   NaCl 88.66 กรัม

   Tri sodium citrate 44.12 กรัม

   ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

2. 10X PBS 500 มิลลิลิตร พีเอช 7.5

   NaCl 40 กรัม

   Na_2HPO_4 (anhydrous) 14.5 กรัม

   KCl 1 กรัม

   KH_2PO_4 1 กรัม

   ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.5 นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

3. 1 M Tris 100 มิลลิลิตร พีเอช 4.5

   Tris 12.114 กรัม

   เติมน้ำให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร และปรับพีเอชให้เท่ากับ 4.5 นำไปผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

4. 0.01 Tris-0.9% NaCl 50 มิลลิลิตร

   1 M Tris พีเอช 4.5 0.5 มิลลิลิตร

   0.9 เปอร์เซ็นต์ NaCl 49.5 มิลลิลิตร

5. Deionized formamide 10 มิลลิลิตร

   Rasin 0.5 กรัม

   Formamide 10 มิลลิลิตร

   คนสาร 30 นาที และกรองเอาเรซินออก เก็บที่ – 20 องศาเซลเซียส

6. Hybridization buffer 5 มิลลิลิตร

   Dextran sulphate 1 กรัม

   2X SSC 5 มิลลิลิตร

7. 70 % Formamide / 2X SSC 10 มิลลิลิตร

   Formamide 7 มิลลิลิตร

   2X SSC 3 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. 1 M DTT 10 มิลลิลิตร

DTT 1.545 กรัม

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อด้วยการกรอง ห้ามนำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

9. 0.1 M DTT 5 มิลลิลิตร

1M DTT ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร

0.1M Tris พีเอช 4.5 4.5 มิลลิลิตร

10. 0.01 M DTT 5 มิลลิลิตร

0.1M DTT 0.5 มิลลิลิตร

0.1 M Tris พีเอช 4.5 4.5 มิลลิลิตร

11. เตรียม 1 mM spectrum-dUTP จากชุดสำเร็จรูป โดยเติม Nuclease free water 50 ไมโครลิตร

12. 0.2 mM spectrum-dUTP 20 ไมโครลิตร

1mM spectrum-dUTP 4 ไมโครลิตร

Nuclease free water 16 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ห่อฟอยล์ เก็บให้พ้นแสง

13. 0.1mM dNTP (dATP, dCTP, dGTP) 30 ไมโครลิตร

0.3 mM dATP 10 ไมโครลิตร

0.3 mM dCTP 10 ไมโครลิตร

0.3 mM dGTP 10 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

14. 0.1mM dTTP 30 ไมโครลิตร

0.3 mM dTTTP 10 ไมโครลิตร

Nuclease free water 20 ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

15. 1 N $MgCl_2$ 50 ไมโครลิตร

$MgCl_2$. 6H2O 10.165 กรัม

ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

16. 100 mg /ml Pepsin เตรียม 5 มิลลิลิตร

Pepsin 500 มิลลิกรัม

น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 5 มิลลิลิตร

แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. 20 mg /ml RNase เตรียม 1 มิลลิลิตร

RNase	20 มิลลิกรัม
น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หรือ TE buffer	1 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้