บทที่ 2

วัตถุประสงค์ วัสดุ วิธีการและขั้นตอนการดำเนินการ

วัตถุประสงค์

1. วัตถุประสงค์หลัก

1.1 เพื่อศึกษาลักษณะเส้นผมในผู้ป่วย SLE ที่มี generalized, non-scarring alopecia โดยใช้ Light & Electron Microscope.

2. วัตถุประสงค์รอง

2.1 เพื่อศึกษา Pathology ของหนังศีรษะในผู้ป่วยเหล่านี้

2.2 เพื่อศึกษาจำนวน Subpopulations of T-lymphocytes (Helper และ suppressor T-cells) ของหนังศีรษะในผู้ป่วยเหล่านี้

2.3 เพื่อศึกษาลักษณะและจำนวนของ Langerhans cells ทั้งใน epidermis dermis และ hair follicle ของหนังศีรษะในผู้ป่วยเหล่านี้

2.4 เพื่อศึกษาลักษณะการติด Immunoreactant ของหนังศีรษะในผู้ป่วยเหล่านี้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เพิ่มพูนความรู้ ความก้าวหน้าทางวิชาการเกี่ยวกับลักษณะเส้นผมในผู้ป่วย SLE ที่มี generalized, non-scarring alopecia

2. อาจใช้เป็นพื้นฐานในการค้นคว้าต่อไป เพื่อเปรียบเทียบลักษณะเส้นผมในผู้ป่วย SLE เหล่านี้กับผู้ป่วยโรคอื่นๆ

3. เพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษา Pathogenesis และ Cause ของ generalized, non-scarring alopecia ใน ผู้ป่วย SLE

หอสมุดกลาง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วัสดุ</u>

1. กลุ่มประชากร

เป็นผู้ป่วย SLE ที่มารับการรักษาที่รพ.จุฬาลงกรณ์ จำนวน 10 ราย ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

1.1 ครบ criteria ตาม revised criteria of ARA(1982)

1.2 มารพ.จุฬาลงกรณ์ในช่วง ส.ค. 2532-ม.ค.2533

1.3 ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็น SLE ครั้งแรก

1.4 มีอาการผมร่วงเป็นแบบ generalized, non-scarring alopecia

1.5 ไม่เคยได้รับการรักษา SLE มาก่อน เช่น chloroquin, corticosteroid, N-SAID หรือ immunosuppressive drugs

1.6 ไม่เคยได้รับยาที่สามารถ induce ให้เกิด SLE เช่น hydralazine, melthyldopa, procainamide, quinidine, diphenylhydantoin, isoniazid, chlorpromazine.

1.7 ไม่เคยได้รับยาที่สามารถ induce ให้เกิด non-cicatricial alopecia เช่น heparin, caumarin, thiouracil, carbimazole, triparanol, vitamin A, levodopa, propanolol.

1.8 ไม่ป่วยเป็น Telogen effluvium จากสาเหตุต่างๆ เช่น หลังคลอด หลังมีไข้สูง หลังหยุดกินยาคุมกำเนิด หลังหยุดกิน corticosteroid

1.9 ไม่มีภาวะ Nutritional deficiency โดยกำหนดว่า น้ำหนักตัวต้อง > 90% ของน้ำหนักมาตรฐาน ใน percentile ที่ 50 ในความสูงเดียวกัน (Burana Chavalittamrong and Puangtong Tantiwongse, 1987)

1.10 ไม่ป่วยเป็น Hypothyroidism, Hyperthyrodism หรือ Hypopituitarism.

1.11 ไม่ป่วยเป็น syphilis

1.12 ไม่มีภาวะ Iron deficiency

1.13 ไม่ป่วยเป็น Diffuse alopecia areata

2. 4-Dimethylaminocinnamaldehyde (DACA) (Cytosol Lab, Boston,MA02136) ละลายใน 0.5 N Hydrochloric acid ในความเข้มข้น 1%

3. กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Olympus รุ่น CHK)

4. กล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน (Scanning electron microscope ของบริษัท JEOL รุ่น JSM T-20)

5. เครื่องเคลือบทองสูญญากาศ (บริษัท JEOL รุ่น JFC 1100)

6. Monoclonal antibodies (DAKO APAAP KIT Tm and DAKO-T6)

7. FITC-conjugated rabbit immunoglobulin to human IgG, IgA, IgM, C3 and Fibrin (DAKOPATTS)

8. Fluorescence microscope (Olympus รุ่น Vanox, Super high pressure mercury lamp)

<u>วิธีการ</u>

1. ซักประวัติทั่วๆไปเกี่ยวกับคนไข้ คือ เพศ,อายุ,อาชีพ,สถานภาพสมรส และที่อยู่

2. ถาม onset of alopecia และ progression

3. ถ่ายรูป pattern of alopecia

4. ทำ hair plucking บริเวณ frontal และ vertex area เพื่อดูอัตราส่วนของ anagen ต่อ telogen hair โดยใช้ needle-holder ที่มี cellulose tape พันรอบ jaws (เพื่อกัน slipping of hair shaft เวลาดึง) จับเส้นผมในตำแหน่ง 1-2 นิ้ว เหนือหนังศีรษะจำนวนประมาณ 50 เส้น แล้วดึงเส้นผมออกมาในทิศทางเดียวกับที่เส้นผมโผล่ออกจากหนังศีรษะ นำมาดูด้วย Light microscope (Van Scott, Reinertson and Steinmuller,1957) จากนั้น stain ด้วย DACA โดยถ้าเป็น anagen hair จะติดสีแดงที่ inner root sheath (Baden, Kubilus and Baden, 1979)

5. ดู Morphology ของ hair ทั้ง anagen และ telogen hair โดย 5.1 วัดความยาวของ hair

5.2 ดูด้วยตาเปล่า

5.3 ดูด้วย Light microscope

5.4 ดูด้วย Scanning electron microscope โดยนำเส้นผมมาล้างด้วยน้ำผสม แชมพูอ่อนๆ เพื่อขจัดฝุ่นและสิ่งสกปรกอื่นๆออก จากนั้นทิ้งให้แห้งในอุณภูมิห้อง นำมา coat ด้วย gold ในเครื่องสูญญากาศ แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อีเล็คตรอน (Dawber and Comaish, 1970) โดย

5.4.1 ดูขนาดของเส้นผมทั้งเส้น

5.4.2 วัดขนาดเฉลี่ยของเส้นผม โดยวัดที่โคนผมเหนือหนังศีรษะไม่เกิน 1 mm. และวัดที่ส่วนปลายสุดของเส้นผม โดยคำนวณจากมาตราส่วนที่กำหนดไว้ในรูป

5.4.3 ดูลักษณะของ cuticle และการเรียงตัวของ cuticle ตลอดความยาวของเส้นผมโดย excluded artefactual appearance เหล่านี้ออกไป (Wyatt, Bottoms and Comaish, 1972) คือ

5.4.3.1 ลักษณะความผิดปกติของ cuticle ซึ่งเกิดจากการ focus ที่กำลังขยายสูงๆ

5.4.3.2 Cracking ซึ่งเกิดจากความแห้ง หลังจากcoat ด้วย glod ที่ไม่เหมาะสม

5.4.3.3 Epidermal corneocytes หรือสิ่งสกปรกภายนอกอย่างอื่นที่ติดอยู่บน cuticle

5.4.4 ดูลักษณะของ cuticle เฉพาะบริเวณโคนเส้นผมประมาณ 1 mm. เหนือหนังศีรษะ แล้วแบ่งระดับการเปลี่ยนแปลงของ cuticle ตามความรุนแรงดังนี้คือ

การเปลี่ยนแปลงระดับ 0 = Normal pattern : cuticle จะเรียงตัวซ้อนกันอย่างเป็นระเบียบ โดยขอบของ cuticle จะเรียบไม่มีรอยขรุขระหรือแตกหัก และชี้ไปทางส่วนปลายของเส้นผม (รูปที่ 1)

การเปลี่ยนแปลงระดับ 1 = Jagged edge : ขอบของ cuticle จะมีการเว้าแหว่งเล็กๆ (รูปที่ 2)

การเปลี่ยนแปลงระดับ 2 = Cracking and Separation : ขอบของ cuticleจะมีการหักแตกเป็นชิ้นใหญ่ๆ บางส่วนอาจหลุดขาดจากกัน (รูปที่ 3)

การเปลี่ยนแปลงระดับ 3 = Partial dystrophy : มีบางส่วนของ cuticleที่ไม่เรียงตัวซ้อนกันเป็นชั้นๆ (รูปที่ 4)

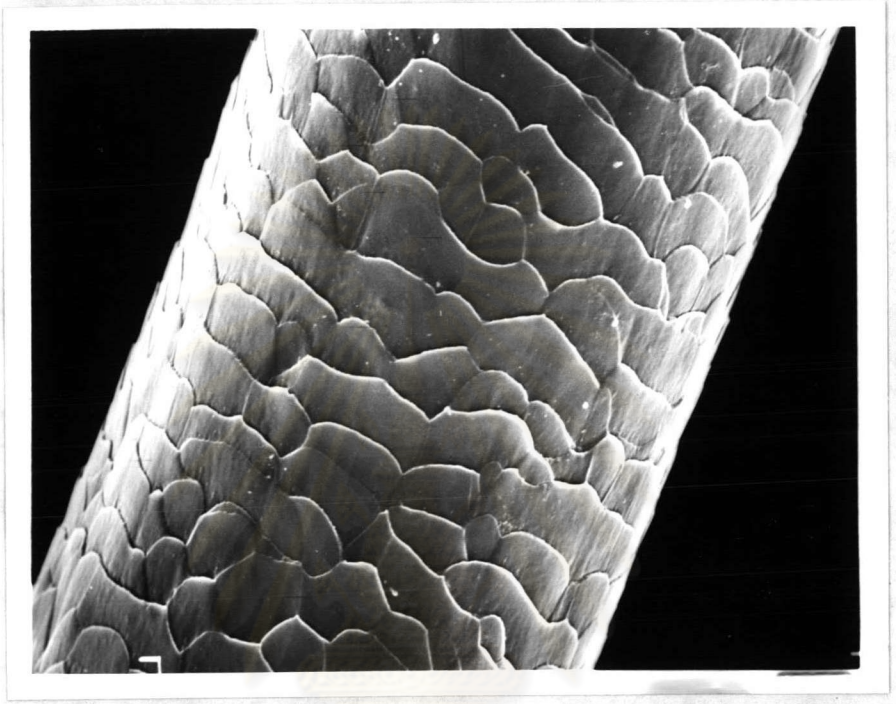
การเปลี่ยนแปลงระดับ 4 = Total dystrophy : ไม่เห็นลักษณะการเรียงตัวซ้อนกันของ cuticle เลย (รูปที่ 5)

5.4.5 ดูลักษณะ hair bulb, hair sheath, hair shaft และ tip of hair

6. Skin biopsy ที่ frontal area ใกล้บริเวณที่ทำ hair plucking โดยใช้ Punch biopsy ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 mm. preserve ชิ้นเนื้อด้วย OCT-Compound แล้วแช่ใน liquid nitrogen รักษาอุณหภูมิไว้ในระดับ -80°C จากนั้นนำชิ้นเนื้อไปตัดให้มีความหนา 4-6 Um. ด้วย Freezing microtome แล้วย้อมด้วย Hematoxylin and eosin (H&E) และ Monoclonal antibodies โดย primary antibodies ที่ใช้ได้แก่ DAKO-T11, DAKO-T4, DAKO-T8 และ DAKO-T6 จากนั้นนำชิ้นเนื้ออีกส่วนหนึ่งไปย้อม Direct immunofluorescence โดย antibodies ที่ใช้ คือ anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-C3 และ anti-fibrin

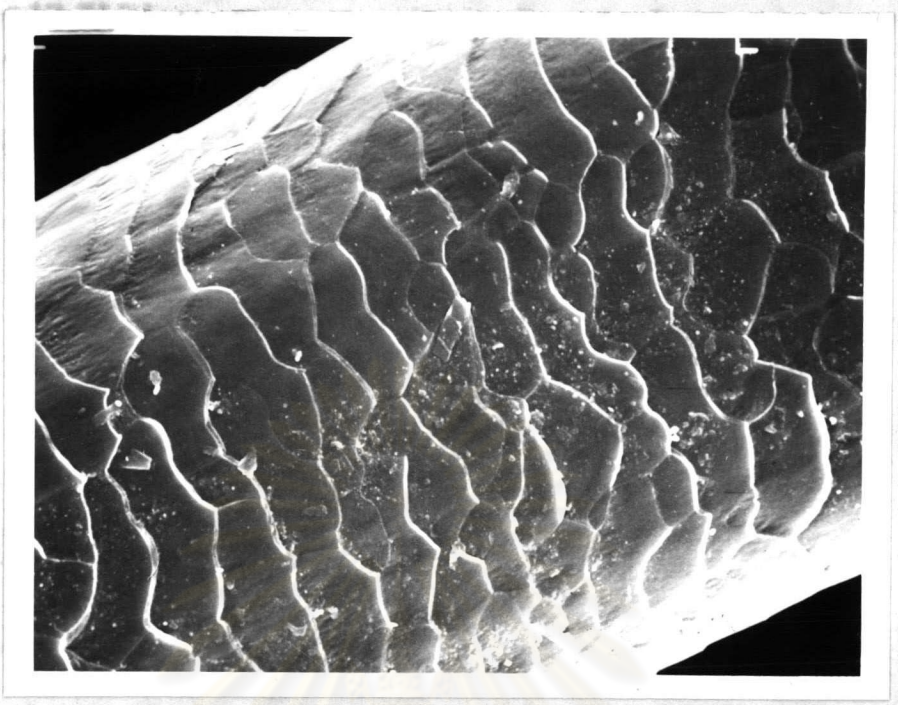
7. ชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย H & E นำมาดู

7.1 Histology ทั่วๆไป

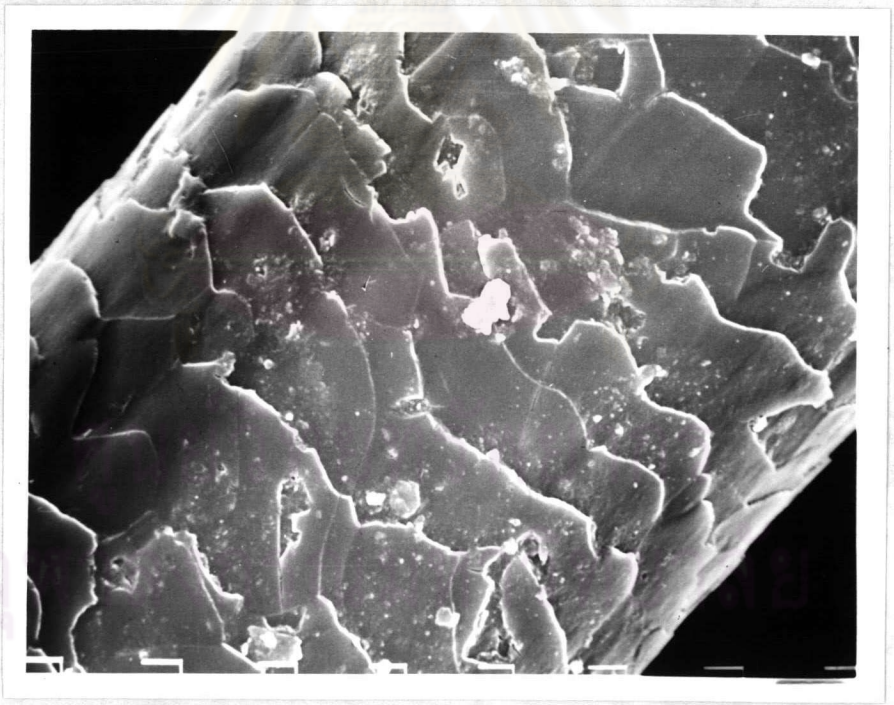


รูปที่ 1 Normal cuticular pattern (x1000)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

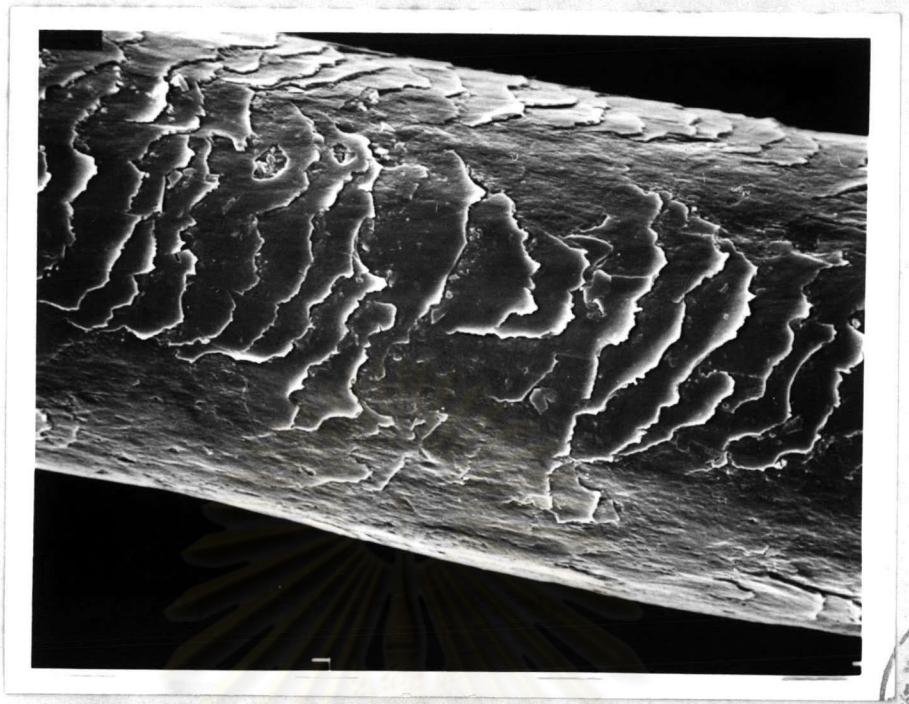


รูปที่ 2 Cuticular pattern มี jagged edge (x1000)



รูปที่ 3 Cuticular pattern มี cracking and separation (x1500)

016285



รูปที่ 4 Partial dystrophy of cuticle (x750)

รูปที่ 5 Total dystrophy of cuticle (x2000)

7.2 ลักษณะของ hair follicles

7.3 ลักษณะของ cell infiltrations และนับจำนวน cell infiltrations และ lymphocytes ทั้งหมด (ถ่ายรูปไว้)

8. ชิ้นเนื้อที่ย้อมด้วย Monoclonal antibedies

8.1 นำมานับจำนวน T-lymphocytes (DAKO-T11+) เทียบกับจำนวน cell infiltrations ทั้งหมดที่นับได้จาก H & E

8.2 นับจำนวน Helper T-cell (DAKO-T4+) ทั้งหมด

8.3 นับจำนวน Suppressor T-cell (DAKO-T8+) ทั้งหมด

8.4 นับจำนวน และดูลักษณะของ Langerhans cell (DAKO-T6+) ทั้งใน epidermis ใน dermis และใน hair follicle ทั้งหมด แล้วนำมาเทียบกับ normal control

9. ชิ้นเนื้อที่ทำ Direct immunofluorescence นำมาดูด้วย Fluorescence microscope โดยดู type, location, morphology และ intensity ของ Immunocreactant ที่ติด

10. Normal control เป็นอาสาสมัคร 4 ราย ทำ hair plucking แล้วนำเส้นผมไปดูด้วย scanning electron microscope และทำ skin biopsy ดู histology ย้อม Monoclonal antibodies และ Direct immunofluorescence ด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับในผู้ป่วย

11. รวบรวมข้อมูลและผลการทดลอง มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ และเขียนรายงาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ใช้ Mann-Whitney U test (Nonparametric statistics) โดยกำหนดให้ p-value <0.05 จึงจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ