หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การดำเนินการวิจัย แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน คือ การตรวจหาเซกส์โครมาติน การวิเคราะห์โครโมโซมและทำคาริโอไทพ์ และการศึกษาประวัติคนไข้ที่มีเซกส์โครมาตินผิดปกติ

ตอนที่ 1 การตรวจหาเซกส์โครมาติน

กลุ่มตัวอย่าง

ก. กลุ่มคนไข้ เป็นคนไข้ในโรงพยาบาลปัญญาอ่อน ดินแดง กรุงเทพมหานคร ปี 2520 จำนวน 204 คน เป็นชาย 102 คน อายุ 8-25 ปี หญิง 102 คน อายุ 6-33 ปี แยกเป็นกลุ่มย่อยตามระดับ I Q เป็น 6 ระดับคือ

กลุ่มที่ 1 Dull Normal I Q 90-83
กลุ่มที่ 2 Borderline I.Q 82-68
กลุ่มที่ 3 Mild Retardation I Q 67-52
กลุ่มที่ 4 Moderate Retardation I Q 51-36
กลุ่มที่ 5 Severe Retardation I Q. 35-20
กลุ่มที่ 6 Profound Retardation I Q น้อยกว่า 20

ข. กลุ่มควบคุม (control group) เลือกโดยการสุ่มแบบง่ายจากนิสิตคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย จำนวน 10 คน เป็นชาย 5 คน อายุ 18-24 ปี หญิง 5 คน อายุ 20-25 ปี ระดับ I Q. มากกว่า 90 ขึ้นไป

วิธีการตรวจหาเซกส์โครมาติน

เนื้อเยื่อที่นำมาตรวจใช้เยื่อบุกระพุ้งแก้ม โดยทำ buccal smear มีขั้นตอนดังนี้

1. การขูดเนื้อเยื่อ ให้คนไข้บ้วนปากจนสะอาดด้วยน้ำยาบ้วนปาก 3 ครั้ง แล้วใช้ที่ขูด (เป็นสไลด์แก้วตัดครึ่งตามยาว ขอบเรียบไม่มีรอยบิ่น) ขูดแรง ๆ บริเวณกระพุ้งแก้ม ซ้ำในที่เดียวกันและในทิศทางเดียวกัน ขูดด้านกับน้ำที่กดอยู่ที่แก้มด้านนอก เซลที่ขูดได้เช็ดทิ้งไป 2 ครั้ง ใช้เซลที่ขูดหนสุดท้าย ในการขูดต้องให้คนไข้อ้าปากให้กว้างและเงยหน้าเล็กน้อย ในกรณีที่คนไข้ไม่ยอมอ้าปาก ใช้ขูดบริเวณริมฝีปากล่างด้านใน

นำเซลที่ขูดได้มาหาบาง ๆ บนสไลด์แก้วที่แห้งและสะอาด เว้นปลายข้างหนึ่งไว้ติดชื่อ วางแตะปลายที่ขูดซึ่งมีเซลติดอยู่ ลงบนปลายข้างหนึ่งของสไลด์ให้เอียงเป็นมุมประมาณ 45 องศา แล้วลากไปยังปลายอีกข้างหนึ่งของสไลด์ ถ้ามีเซลเหลืออยู่มากก็ลากกลับแต่ไม่ซ้ำรอยเดิม คนไข้ 1 คนทำสไลด์ 2 แผ่น และทำเพิ่มในกรณีสไลด์ย้อมติดสีจาง หรือเซลไม่ดีอ่านผลได้ไม่ชัด

2. การตรึงเซล (fixation) น้ำยาตรึงเซลประกอบด้วย absolute ethanol และ ether ในอัตราส่วน 1 : 1 บรรจุใน coplin jar เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 10°ซ. จุ่มสไลด์ในน้ำยาตรึงทันทีที่ทาเซลลงบนสไลด์แล้วเสร็จ ขณะที่เซลยังเปียกอยู่ เป็นเวลา 30 นาที

3. ทำให้เซลสงบ โดยแช่ใน methanol 90 %, 70 %,50 % และน้ำกลั่น ตามลำดับ ครั้งละ 2 นาที

4. hydrolyse ด้วย 1N.HCl อุณหภูมิ 56°ซ. เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่น 2 นาที

5. ย้อมสี โดยแช่สไลด์ใน crystal violet 1 % เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้างสีที่เกินออกด้วยการจุ่มเร็ว ๆ ใน methanol 90 % และ absolute ethanol ตามลำดับ

6. เมื่อย้อมสีสไลด์แล้ว วางสไลด์ไว้ให้แห้งในอากาศ ในอากาศ แล้วปิดด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์ โดยใช้น้ำยาปิดสไลด์ ทำให้แห้งโดยเข้าตู้อบ

อุณหภูมิ 56° ซ. 1 คืน

7. ตรวจหาเซกส์โครมาตินในเซลจากสไลด์ด้วยกล้องจุลทัศน์ที่มีกำลังขยาย 400 เท่า หรือ 1000 เท่า เลือกดูเซลที่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ไม่หยักหรือพับ ไม่ติดสีซีดหรือเข้มจนเกินไป นับ 200 เซลต่อคนไข้ 1 คน หาจำนวนเซลโครมาตินบวกจากร้อยเซล(เป็นร้อยละ) คนไข้ที่มีเซลโครมาตินบวกตั้งแต่ร้อยละ 10 ขึ้นไปจัดเป็นโครมาตินบวก และถ้ามีจำนวนเซลโครมาตินบวกน้อยกว่าร้อยละ 10 จัดเป็นโครมาตินลบ

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

1. จากการตรวจหาเซกส์โครมาตินในเซลเพื่อสำรวจหาคนไข้ที่มีเซกส์โครมาตินผิดปกติ นำจำนวนเซลโครมาตินบวกใน 100 เซลที่ได้มาแจกแจงหาจำนวนคนในแต่ละค่า แล้วคำนวนหาร้อยละของจำนวนคนนั้น

2. หาค่าเฉลี่ย(mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตราฐาน(standard deviation) ของจำนวนเซลโครมาตินบวกใน 100 เซลนั้น แล้วคำนวนหาค่าเฉลี่ยของประชากรโดยประมาณ(μ) โดยอาศัยค่าจากการกระจาย ที่ (t-distribution)

3. เปรียบเทียบหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มคนไข้กับกลุ่มควบคุมด้วยการทดสอบ-ที(t-test)

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์โครโมโซมและการิโอไทพ์

เมื่อสำรวจเซกส์โครมาตินแล้วนำคนไข้ที่มีเซกส์โครมาตินผิดปกติและกรณีสงสัยทั้งหญิงและชายมาศึกษาโครโมโซมประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวโดยถือเกณฑ์

1. คนไข้ชายโครมาตินบวก(มีจำนวนเซลโครมาตินบวกเกินร้อยละ 10)
2. คนไข้หญิงโครมาตินลบ(มีจำนวนเซลโครมาตินบวกต่ำกว่าร้อยละ 10)
3. คนไข้ชายในกลุ่มที่มีจำนวนเซลโครมาตินบวกต่ำกว่า $\bar{X}$ + 2SD เลือกโดยการสุ่มแบบง่ายมาจำนวน 3/4 ของคนในกลุ่มนี้
4. คนไข้หญิงในกลุ่มที่มีจำนวนเซลโครมาตินบวกต่ำกว่า $\bar{X}$ - 2SD เลือกโดยการสุ่มแบบง่ายมาจำนวน 3/4 ของคนในกลุ่มนี้
5. คนปกติจากกลุ่มกนปกติ ชาย 1 คน หญิง 1 คน ..เลือกโดยการสุ่มแบบง่าย

วิธีการวิเคราะห์โครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมโดยเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวด้วยวิธีmacrotechnique เพื่อนับโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ปรับปรุงวิธีของ Moorhead และคณะ(1960)ดังนี้

1. เจาะเลือด ใช้กระบอกเข็มฉีดยาขนาด 10 ลบ.ซม. เจาะเลือดคนไข้จากเส้นเลือดดำบริเวณข้อพับข้อศอกด้านใน คนละ 5 ลบ.ซม. ผสมกับheparin 0.2 ลบ.ซม. ปิดปลอกเข็มเข้าที่ให้เรียบร้อย ตั้งกระบอกเข็มฉีดยาไว้ในแนวดิ่ง เก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 10° ซ. จนกระทั่งปลาสมา(plasma) แยกตัวเป็นชั้นเหนือเม็ดเลือดแดงได้ปริมาณ 1 ลบ.ซม. ใช้เวลา 30 นาที

2. เตรียมอาหาร บรรจุTC.199 medium 5 ลบ.ซม., phytohemagglutinin 0.5 ลบ.ซม. และfetal calf serum 1 ลบ.ซม. ในขวดเลี้ยงเซล แล้วเติมปลาสมาของคนไข้ลงไป 1 ลบ.ซม.(ถ้าเป็นเด็กอายุต่ำกว่า 10 ขวบใช้ปลาสมา 0.5 ลบ.ซม.) ปิดจุกขวดให้สนิท หุ้มด้วยกระดาษตะกั่ว(aluminum foil) อีกชั้นหนึ่ง นำไปเก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 68 ชม. เขย่าทุกวัน และสังเกตสีของอาหารในขวด ถ้าอีกเหลืองเผยอฝาขวดเล็กน้อยแล้วปิดใหม่ให้สนิท การปฏิบัติข้างต้นทำในสภาพปลอดเชื้อ

3. การเก็บผลและการตรึงเซล(Harvesting and Fixation) เมื่อครบ 68 ชม. เติมcolcimid solution 1 ลบ.ซม. เขย่า ทิ้งไว้ 2 ชม. แล้วเปลี่ยนอาหารจากขวดใส่ลงในgraduate centrifuge tube เพื่อนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่น(centrifuge) ที่ 800 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสๆส่วนบนทิ้ง เหลือกลุ่มเซลสีคล้ำบริเวณก้นหลอด เขย่าให้เซลกระจาย ใช้ Pasteur pipette ค่อยๆหยดKCl 0.075 M. ลงไปในหลอดจนครบ 5 ลบ.ซม. เก็บในตู้อบอุณหภูมิ 37° ซ. 10 นาที แล้วนำมาปั่น 5 นาที ที่ 800 รอบ/นาที เทน้ำใสๆส่วนบนทิ้ง เหลือกลุ่มเซลก้นหลอด เขย่าให้เซลกระจายดีแล้วเติมน้ำยาตรึงด้วย Pasteur pipette ลงไปทีละหยดพร้อมกับเขย่าให้เข้ากัน จนได้ 5 ลบ.ซม. เก็บไว้ในตู้เย็น 30 นาที น้ำยาตรึงประกอบด้วย absolute

methaol และ gracial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° ซ. ให้เย็นจัดอยู่ตลอดเวลา

4. ล้างเซล หลังจากการตรึงเซล 30 นาที นำมาปั่น 5 นาที 800 รอบ/นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้ง เขย่าแล้วเติมน้ำยาตรึงอีก 5 ลบ.ซม. นำไปปั่น 5 นาที 800 รอบ/นาที ทำเช่นนี้ 4 ครั้ง จนได้เซลขาวสะอาด จึงนำมาเตรียมสไลด์

5. การเตรียมสไลด์ ด้วย flaming technique หลังจากล้างเซลครั้งสุดท้าย แล้วเทน้ำยาตรึงทิ้ง เขย่าให้เซลกระจาย เติมน้ำยาตรึงลงไปประมาณ 1 ลบ.ซม. กะให้พอเหมาะกับจำนวนเซล นำมาหยดบนสไลด์โดยใช้ Pasteur pipette

สไลด์ที่ใช้เป็นสไลด์ที่สะอาด แช่ในน้ำเย็นจัดเก็บในตู้เย็น เมื่อยกสไลด์ขึ้นจากน้ำจะสามารถอุ้มน้ำไว้ได้เต็มสไลด์ เมื่อหยดเซลลงบนสไลด์ 3 หยด (เว้นปลายข้างหนึ่งไว้ติดชื่อ) แล้วนำไปลนไฟเหนือตะเกียงแอลกอฮอล์ จนเห็นเปลวไฟสีน้ำเงินลุกบนสไลด์ วางสไลด์ให้แห้งในอากาศ แล้วนำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์ กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูว่ามีเซลในระยะเมตาเฟส และโครโมโซมกระจายดีหรือไม่

6. การย้อมสี นำสไลด์ที่ดีจากข้อ 5 มาย้อมสี giemsa 10 นาที โดยวางสไลด์ในแนวนอนบนถาดรอง หยดสีลงจนเต็มสไลด์ เว้นปลายที่ติดชื่อ เมื่อครบ 10 นาที ล้างสีที่เกินออกด้วยน้ำกลั่น วางสไลด์ให้แห้งในอากาศ

7. ปิดสไลด์ ล้างสไลด์ด้วย xylene 1 นาที แล้วปิดแผ่นแก้วปิดสไลด์ด้วยน้ำยาปิดสไลด์ ทำให้แห้งโดยเข้าตู้อุณหภูมิ 37° ซ. 1 คืน

8. นำสไลด์มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทัศน์กำลังขยาย 1000 เท่า นับโครโมโซมจากเมตาเฟส 20 เซล ต่อคนไข้ 1 คน และนับ 50 เซล ในกรณีที่สงสัย สังเกตโครโมโซมตัวที่หายไปหรือเกินมาในแต่ละเซล เลือกเซลที่โครโมโซมกระจายดีถ่ายรูปไว้คนละ 3 รูปและ 5 รูปในกรณีที่สงสัยด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า แล้วอัดขยายรูปขนาด 5 x 7 นิ้ว นำมาตัดโครโมโซมแยกเป็นแท่ง ๆ

จัดเรียงทำคาริโอไทพ์ตาม Denver System of Nomenclature ซึ่งมีการปรับปรุงตาม London Conference และ Chicago Conference (1966)

การทำคาริโอไทพ์

จากรูปถ่ายบนสไลด์ เลือกเซลที่มีโครโมโซมกระจายดี เห็น centromere ชัดเจน นำมาตัดโครโมโซมแยกเป็นแท่ง แล้วจัดเรียงตามขนาด เป็น 23 คู่ ดังนี้

กลุ่ม A (คู่1-3) เป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ มี median centromere คู่ที่ 2 ค่อนข้างเป็น submedian ทั้ง 3 คู่แตกต่างกันชัดเจน และแยกจากคู่อื่นๆ ได้ง่าย เพราะมีขนาดใหญ่และตำแหน่งของ centromere ดังกล่าว

กลุ่ม B (คู่ 4-5) เป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ (รองจากกลุ่ม A) มี submedian centromere ทั้งสองคู่คล้ายกันมาก จึงลำบากในการแยก แต่คู่ที่ 4 ยาวกว่าคู่ที่ 5 เล็กน้อย

กลุ่ม C (คู่ 6-12) เป็นโครโมโซมขนาดกลาง มี submedian centromere คู่ที่ 6 มีขนาดใหญ่ที่สุด และเล็กลงตามลำดับจนถึงคู่ที่ 12 เอกซ์โครโมโซมมีขนาดเท่ากับโครโมโซมขนาดใหญ่ของกลุ่มนี้ ความยาวใกล้เคียงกับคู่ที่ 6 และคู่ที่ 7

กลุ่ม D (คู่ 13-15) เป็นโครโมโซมขนาดกลาง มี centromere อยู่เกือบปลายด้านหนึ่ง(acrocentric centromere) คู่ที่ 13 มักจะมี satellite บนแขนข้างสั้น(short arms) คู่ที่ 14 มี satellite เล็กๆบนแขนข้างสั้นเช่นเดียวกัน ส่วนคู่ 15 ไม่เคยพบ satellite เลย

กลุ่ม E (คู่ 16-18) เป็นโครโมโซมค่อนข้างเล็ก มี median centromere ในคู่ 16 และ submedian ในคู่ 17และคู่ 18

กลุ่ม F (คู่ 19-20) เป็นโครโมโซมขนาดเล็ก มี median centromere

กลุ่ม G (คู่ 21-22) เป็นโครโมโซมขนาดเล็กมาก มี acrocentric centromere คู่ 21 มี satellite บนแขนข้างสั้น ส่วนวายโครโมโซมคล้าย

กับโครโมโซมในกลุ่มนี้ แต่มีขนาดใหญ่กว่าเล็กน้อย

ตอนที่ 3 การศึกษาประวัติคนไข้ที่มีเซกส์โครมาตินผิดปกติ

จากคนไข้ที่มีเซกส์โครมาตินผิดปกติ มีการทำคาริโอไทพ์ประกอบ และสอบถามประวัติทางครอบครัว อายุบิดามารดาขณะคลอด ประวัติการศึกษา ตรวจสอบ I Q และศึกษารูปร่างลักษณะด้วย