บทที่ 4

วัสดุและวิธีการ

ประชากรและประชากรตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย (target population)

ผู้ชายไทยที่เป็นเกลื้อนและไม่เป็นเกลื้อน อายุ 16-19 ปี

ประชากรตัวอย่าง (population sampled)

นักเรียนชายโรงเรียนเตรียมทหาร อายุ 16-19 ปี ที่เป็นเกลื้อนและไม่เป็นเกลื้อน

<u>กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion criteria)</u>

นักเรียนโรงเรียนเตรียมทหาร อายุ 16-19 ปี

<u>กลุ่มศึกษา</u> คือ คนที่เป็นเกลื้อนที่หลังและ/หรือหน้าอก โดยไม่ได้รับการรักษาก่อนทำการวิจัยอย่างน้อย 1 เดือน

โรคเกลื้อน วินิจฉัยโดย

1. ลักษณะทางคลินิค เป็นผื่นราบสีขาว, สีน้ำตาลหรือสีชมพู มีสะเก็ดบางๆ เมื่อใช้เล็บขูดเบาๆจะเห็นเป็นขุยขาวๆ
2. ตรวจยืนยัน โดยวิธี scotch tape technique[16] โดยใช้เทปใสแปะที่บริเวณผื่น แล้วแปะลงบน slide ที่หยด methylene blue นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์ยีสต์และสายราขาดเป็นท่อนๆ (fragmented hyphae)

<u>กลุ่มควบคุม</u> คือ คนที่ไม่เป็นเกลื้อนจากการตรวจร่างกายและไม่เคยมีประวัติเป็นเกลื้อนมาก่อน

<u>กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกออกจากการศึกษา (Exclusion criteria)</u>

1. มีโรคประจำตัวหรือภาวะที่ทำให้เป็นโรคเกลื้อนง่าย เช่น Cushing's syndrome,ภาวะ immunosuppression,ภาวะขาดอาหาร

2. กำลังรักษาหรือเคยรับการรักษาโรคเกลื้อนและหยุดรักษาแล้วน้อยกว่า 1 เดือน ก่อนทำการวิจัย
3. กินหรือเคยกินยาที่ทำให้อัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันเปลี่ยนแปลง และหยุดยาไม่ถึง 1 ปี ได้แก่ 13-cis retinoic acid,estrogen, antiandrogen, corticosteroid, spironolactone

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากเป็นการวิจัย 2 กลุ่มที่ไม่เกี่ยวกัน เป็นอิสระต่อกัน และสรุปข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย จึงเลือกใช้สูตร

$$n/group = 2\,[(z_{\alpha} + z_{\beta})\sigma\,]^2 / (Mc-Mt)^2$$

จากการศึกษาแบบนำร่อง (pilot study) ในคนที่เป็นเกลื้อน 10 ราย และคนปกติ 9 ราย อายุ 15-25 ปี ได้ผลดังนี้

- ค่าเฉลี่ยของอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันในคนที่เป็นเกลื้อน (Mc) = 1.36 ug/cm^2/min.
  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.47
- ค่าเฉลี่ยของอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันในคนปกติ (Mt) = 0.92 ug/cm^2/min.
  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน = 0.40
- ค่าความแปรปรวน (pooled variance) = 0.19

จากการแทนค่าในสูตร โดยกำหนด

Type I error = 5% (Z_{α} = 1.65) (one-tailed test)

Type II error = 10% (Z_{β} = 1.28) (one-tailed test)

ขนาดตัวอย่างต่อกลุ่ม

$$= \frac{2(1.65 + 1.28)^2\,(0.19)}{(1.36 - 0.92)^2} = 16.85 \text{ คน}$$

การสุ่มตัวอย่าง

สำรวจนักเรียนเตรียมทหารชั้นปีที่ 1 และชั้นปีที่ 2 จำนวน 1473 คน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่เป็นเกลื้อน และกลุ่มที่ไม่เป็นเกลื้อนแล้วใช้วิธี simple random sampling โดยใช้ตารางเลขสุ่ม (random number table) เพื่อให้ได้กลุ่มที่เป็นเกลื้อน 20 คน และกลุ่มควบคุม 20 คน เข้าโครงการวิจัย

การสังเกตและการวัด

<u>การเก็บข้อมูล</u>

ตัวอย่างที่รับเข้าการศึกษาจะได้รับทราบถึงวัตถุประสงค์ วิธีการประโยชน์ของการวิจัยและจะได้รับการซักประวัติ ตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

<u>การซักประวัติ</u>

1. ประวัติส่วนตัว เช่นอายุ ภูมิลำเนา ส่วนสูง น้ำหนัก สุขอนามัยส่วนตัว
2. ประวัติของโรค เช่น อายุที่เริ่มเป็น ตำแหน่งที่เป็น ปัจจัยที่ทำให้โรค(ผื่น)เป็นมากขึ้น ประวัติของการรักษา
3. ประวัติครอบครัว มีสมาชิกในครอบครัวเป็นอย่างผู้ป่วยหรือไม่
4. ประวัติการเจ็บป่วยในอดีต ประวัติโรคประจำตัวและประวัติยาที่ใช้เป็นประจำ

<u>การตรวจร่างกาย</u>

ตรวจร่างกายทั่วไปและตรวจร่างกายระบบผิวหนังโดยแพทย์ผู้ทำการวิจัย ดูและบันทึก ลักษณะ การกระจายและตำแหน่งของผื่น

<u>การตรวจทางห้องปฏิบัติการ</u>

1. กลุ่มตัวอย่างที่เป็นเกลื้อนจะได้รับการตรวจยืนยันทางห้องปฏิบัติการโดยใช้เทปใสแปะที่บริเวณผื่น แล้วแปะลงบนสไลด์ที่หยด methylene blue นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบเซลล์ยีสต์และสายราขาดเป็นท่อน ๆ(16)

2. กลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมจะได้รับการเก็บตัวอย่างสารไขมัน โดยใช้ Sebu-test strip เพื่อนำไปหาค่า อัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมัน (sebum excretion rate,SER) (หน่วยเป็น ug/cm^2/min) และเปอร์เซนต์ของส่วนประกอบต่าง ๆ

เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. Sebu-test strip (Cuderm Corp Dallas, Texas) ซึ่งเป็นแผ่นเทปขนาด 1.8 x 2 ตารางเซนติเมตร เคลือบด้วยสารที่มีความสามารถในการดูดซึมไขมันได้ดี
2. หลอดแก้วที่มีฝาแก้วปิดสนิท (quick-fit tube) ที่ล้างด้วย hexane แล้ว
3. Forceps
4. หลอดทดลอง (test tube) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. ยาว 10 ซม. ที่ล้างด้วย hexane แล้ว
5. เครื่อง Sonicator
6. อุปกรณ์ในการทำ Thin-layer chromatography ได้แก่
   6.1 ไมโครปิเปตต์ขนาด 10 และ 500 ไมโครลิตร
   6.2 Silica gel-TLC plate ขนาด 10x20 ตารางเซนติเมตร หนา 200 ไมโครเมตร
   6.3 แทงค์โครมาโตกราฟฟี่ 3 แทงค์
   6.4 ตู้อบ (Oven)
   6.5 เครื่อง Photodensitometer รุ่น LKB 2400 Gelscan XL^{tm} software package

ขั้นตอนและวิธีในการวิจัย

1. <u>การเตรียมตัวอย่างก่อนเก็บสารไขมัน</u>

   แจกแบบสอบถามแก่กลุ่มตัวอย่างให้ไปตอบที่บ้าน แล้วนำมาคืนในวันรุ่งขึ้น กลุ่มตัวอย่าง ได้รับคำแนะนำให้งดใช้เครื่องสำอางหรือครีมที่หน้าและลำตัว เป็นเวลา24 ชั่วโมงก่อนทำการศึกษา

2. การเก็บตัวอย่างสารไขมัน

ผู้วิจัยต้องสวมถุงมือเพื่อกันการปนเปื้อนของไขมันจากมือ และใช้ forceps ที่เช็ดทำความสะอาดด้วย hexane ในการหยิบจับอุปกรณ์ต่างๆ การเก็บตัวอย่างสารไขมันใช้เวลาเก็บ 3 ชั่วโมง ตั้งแต่เวลา 9.00-12.00 น. โดยมีขั้นตอนดังนี้

2.1 เช็ดบริเวณที่จะเก็บสารไขมัน คือ บริเวณกลางหน้าผาก กลางหน้าอก (sternum) และกลางหลัง (interscapular area) ด้วย hexane ที่อิ่มตัว เพื่อขจัดสารไขมันที่บริเวณผิวหนัง

2.2 เมื่อผิวแห้งใช้ forceps คีบ Sebu-test strip ติดบนกลางหน้าผาก หน้าอก และหลังของกลุ่มตัวอย่าง

2.3 ให้กลุ่มตัวอย่างนั่งเรียนในห้องเรียนตามปกติ ตั้งแต่เวลา 9.00-12.00 น. ซึ่งเป็นช่วงที่มีอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันสูงสุด (Burton และคณะ 1970)[48]

2.4 เมื่อครบ 3 ชั่วโมง แกะ Sebu-test strip ออกใส่ลงในหลอดแก้วที่มีฝาแก้วปิดสนิท (quick-fit tube) เก็บไว้เพื่อนำไปสกัดสารไขมันในห้องปฏิบัติการต่อไป

3. การสกัดสารไขมัน

3.1 เท hexane 2 มล. ลงในหลอดทดลองที่มี Sebu-test strip ใส่อยู่ก่อนแล้ว เขย่าด้วยเครื่อง Sonicator 3 นาที เทสารละลายเก็บไว้อีกหลอดทดลองหนึ่ง ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้ง โดยเก็บสารละลายไว้ในหลอดทดลองเดียวกันกับครั้งแรก

3.2 นำสารละลายที่ได้มาทำให้ระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จะได้สารไขมันที่สกัดได้เหลืออยู่ที่ก้นหลอด

3.3 เก็บสารไขมันที่ได้ใน freezer (-20 องศาเซลเซียส) รอทำ Thin-layer chromatography

4. การทำ Thin-layer chromatography

4.1 ละลายไขมันตัวอย่างด้วย hexane 0.5 มล.

4.2 ใช้ปิเปตต์ดวงสารที่ละลายแล้ว 10 ไมโครลิตร หยดลงบน silica gel TLC plate ซึ่งมีขนาด 10 x 20 เซนติเมตร หนา 200 ไมโครเมตร ที่ถูกกระตุ้นด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง

4.3 สารละลายมาตรฐานใช้ cholesterol, cholesterol oleate, oleic acid, methyl oleate, triolein, oleyl palmitate, squalene (Sigma co. St. Louis, Missouri) ปริมาณแต่ละชนิดเท่ากับ 2 ไมโครกรัมต่อ 5 ไมโครลิตร ของ hexane แล้วหยดสารละลายมาตรฐาน จำนวน 5 ไมโครลิตร บน plate(1 plate สกัดแยกสารได้ 9 ตำแหน่ง)

4.4 วาง plate ลงในแทงค์ 3 แทงค์ตามลำดับดังนี้ (Downing) (1969)[33]

แทงค์ที่ 1 ใช้ hexane 200 มล. รอจนตัวทำละลายเคลื่อนไป 18 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที แล้วเอา plate ออกวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วใส่ในแทงค์ที่ 2

แทงค์ที่ 2 ใช้ benzene 200 มล. รอจนตัวทำละลายเคลื่อนไป 18 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที แล้วเอา plate ออกวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วใส่ในแทงค์ที่ 3

แทงค์ที่ 3 ใช้ hexane : ether : acetic acid (สัดส่วนโดยปริมาตรเท่ากับ 70 : 30 : 1) รวม 202 มล. รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ไป 18 เซนติเมตร ซึ่งใช้เวลาประมาณ 45 นาที แล้วเอา plate ออกวางให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที

4.5 ย้อมสีด้วยสารละลาย 7% phosphomolibdic acid และทำให้ร้อนในตู้อบอุณหภูมิ 130 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที เพื่อให้เห็นแถบของส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารไขมัน

5. <u>การคำนวณหาค่าอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมันและส่วนประกอบของสารไขมันบนผิวหนัง</u>

5.1 ใช้เครื่อง photodensitometer วัดความเข้มของแถบไขมัน นำค่าที่ได้จากไขมันตัวอย่างเทียบกับไขมันมาตรฐานซึ่งทราบค่าอยู่แล้ว เพื่อให้ทราบถึงปริมาณของสารที่แยกได้

5.2 คำนวณหาค่าอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมัน (sebum excretion rate, SER) โดยนำปริมาณ cholesterol, free fatty acids, triglycerides, wax esters, cholesterol esters, และ squalene มารวมกัน แล้วหารด้วยพื้นที่ของ Sebu-test strip (2 x 1.8 ตารางเซนติเมตร) และเวลาที่ใช้ (180 นาที) ค่าที่ได้มีหน่วยเป็น ug/cm ^{2}/min.

5.3 คำนวณหาสัดส่วนของส่วนประกอบแต่ละตัว โดยนำปริมาณของส่วนประกอบแต่ละตัวหารด้วยปริมาณรวมของส่วนประกอบทุกตัว คำนวณเป็นเปอร์เซนต์

6. <u>การหาค่า recovery ของวิธีการทางห้องปฏิบัติการที่ใช้</u>

6.1 นำสารละลายมาตรฐาน (cholesterol, cholesterol oleate, oleic acid, methyl oleate, triolein, oleyl palmitate, squalene) หยดลงบน Sebu-test strip 10 แผ่น ให้ปริมาณของสารแต่ละชนิดใน 1 แผ่น เท่ากับ 40 ไมโครกรัม

6.2 นำไปสกัดโดยวิธีเดียวกับการสกัดสารไขมันตัวอย่าง (ดูข้อ 3)

6.3 นำสารไขมันที่สกัดได้ไปทำ Thin-layer chromatography เพื่อหาส่วนประกอบของสารละลายมาตรฐาน โดยใช้วิธีเดียวกับสารไขมันตัวอย่าง (ดูข้อ 4) และวัดค่าโดยใช้เครื่อง photodensitometer

6.4 คำนวณหาปริมาณของสารแต่ละชนิดที่ได้จากการทำ Thin-layer chromatography แล้วนำมาเทียบกับปริมาณของสารที่ใส่ไปก่อนสกัดสารไขมัน

การรวบรวมข้อมูล

1. รวบรวมข้อมูลจากประวัติและการตรวจร่างกาย
2. ประเมินผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การศึกษานี้ได้ผลเป็น

2.1 Sebum excretion rate (SER) มีหน่วยเป็น $ug/cm^2/min$

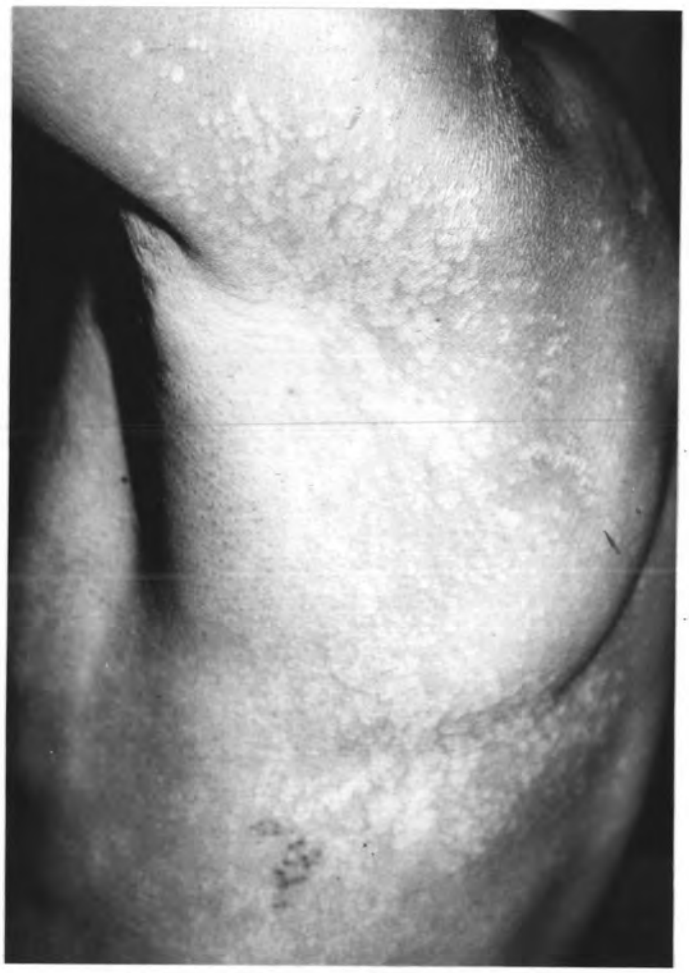
2.2 เปอร์เซนต์ของส่วนประกอบต่างๆ (cholesterol, free fatty acids, triglycerides, cholesterol esters & wax esters และ squalene)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ลักษณะข้อมูลเป็นข้อมูลเชิงปริมาณ, ลักษณะเป็นค่าต่อเนื่อง
สรุปเป็นค่าเฉลี่ย, ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<u>การทดสอบสมมติฐาน</u>

1. เปรียบเทียบอัตราการขับถ่ายสารจากต่อมไขมัน และส่วนประกอบของสารไขมันบนผิวหนัง ระหว่างกลุ่มคนที่เป็นเกลื้อนและกลุ่มควบคุมโดยใช้ unpaired t-test
2. เปรียบเทียบส่วนประกอบของสารไขมันบนผิวหนังจากตำแหน่งต่าง ๆ (หน้าผาก, หน้าอก และกลางหลัง) โดยใช้ F- test (Analysis of variance)



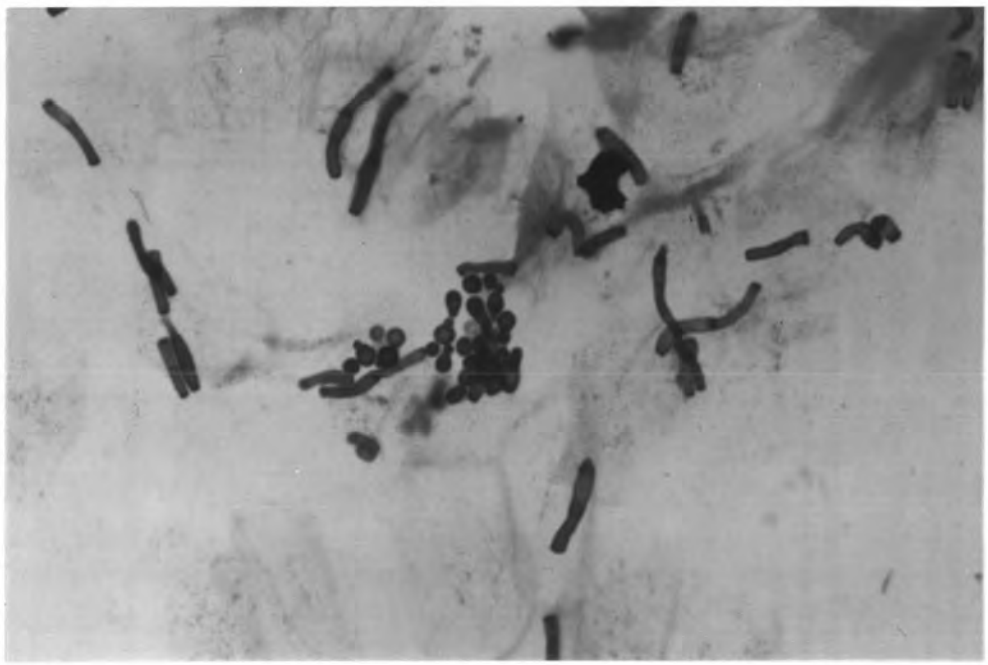
ภาพที่ 1 ลักษณะทางคลีนิคของโรคเกลื้อน เป็นผื่นสีขาว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

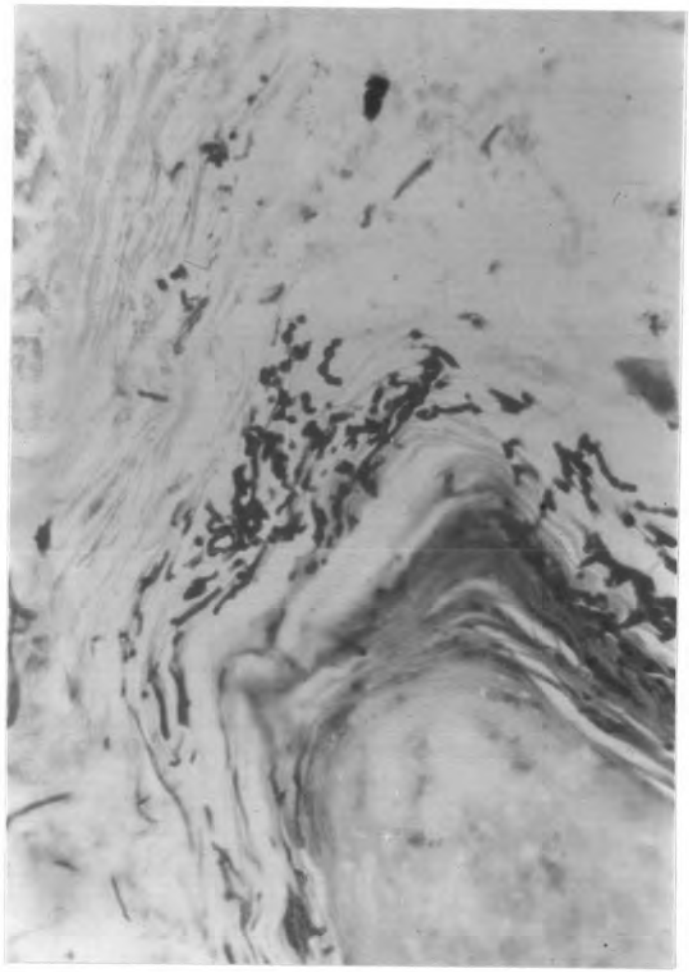
ภาพที่ 2 ลักษณะทางคลินิคของโรคเกลื้อน เป็นผื่นสีชมพู

ภาพที่ 3 ลักษณะทางคลีนิคของโรคเกลื้อน เป็นผื่นสีน้ำตาล

ภาพที่ 4 ลักษณะทางคลินิคของโรคเกลื้อน เป็นผื่นสีน้ำตาล



ภาพที่ 5 ลักษณะทางกล้องจุลทรรศน์เมื่อขูดขุยของเกลื้อนมาตรวจดูจะพบลักษณะเซลล์ยีสต์ รูปร่างกลมอยู่ปนกับสายราท่อนสั้นๆ ("Spaghetti and meatballs")



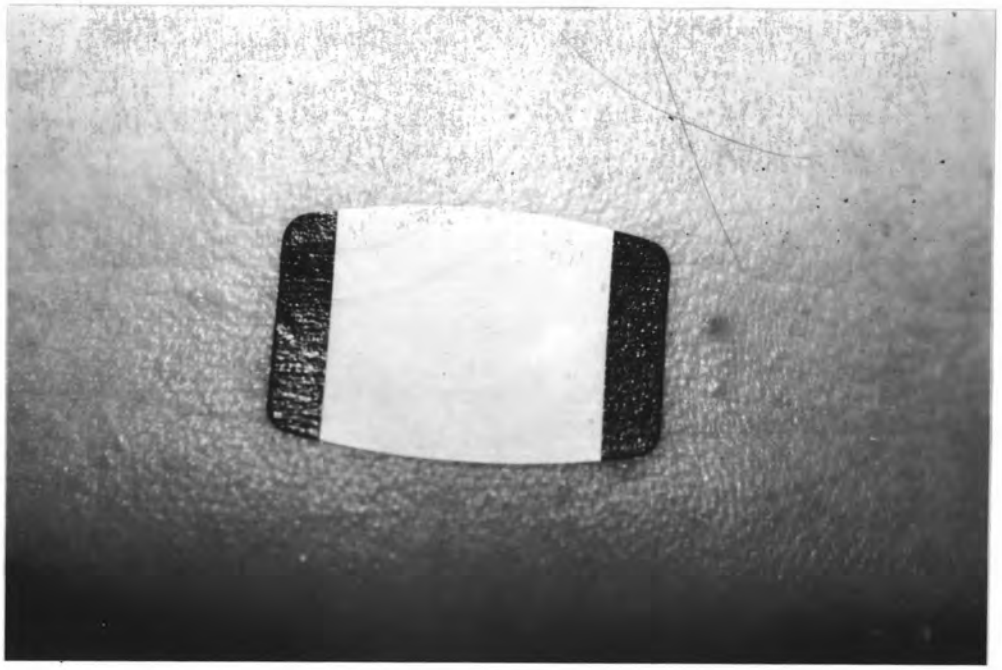
<u>ภาพที่ 6</u> ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของโรคเกลื้อน

ภาพที่ 7 Sebu-test strip

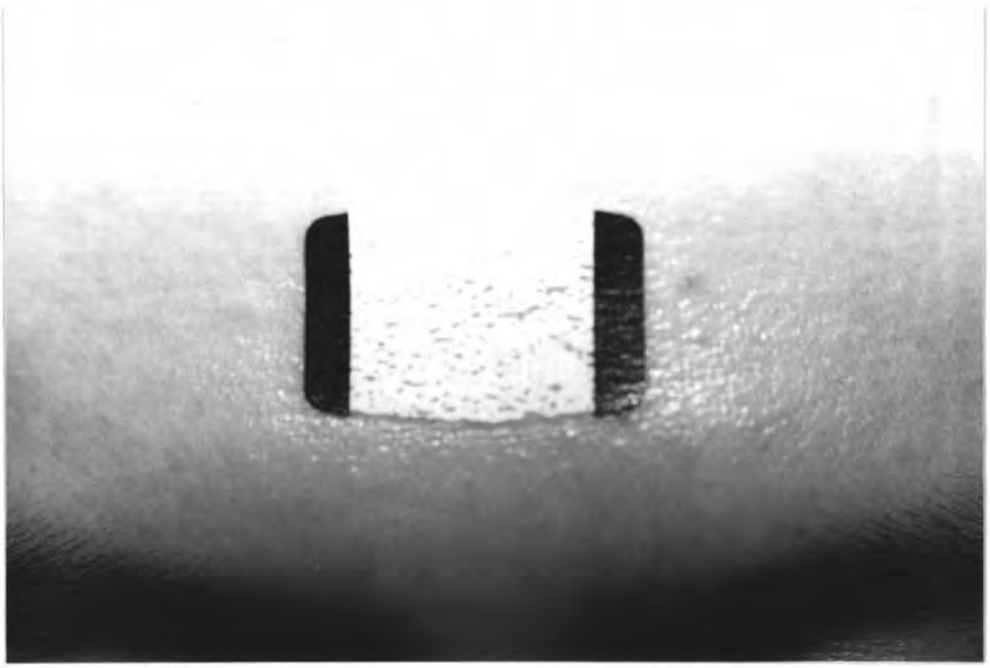
ภาพที่ 8 กลุ่มตัวอย่างก่อนการเก็บสารไขมัน

ภาพที่ 9 ตัวอย่าง เมื่อใช้ Sebu-test strip ติดที่หน้าผากและหน้าอก

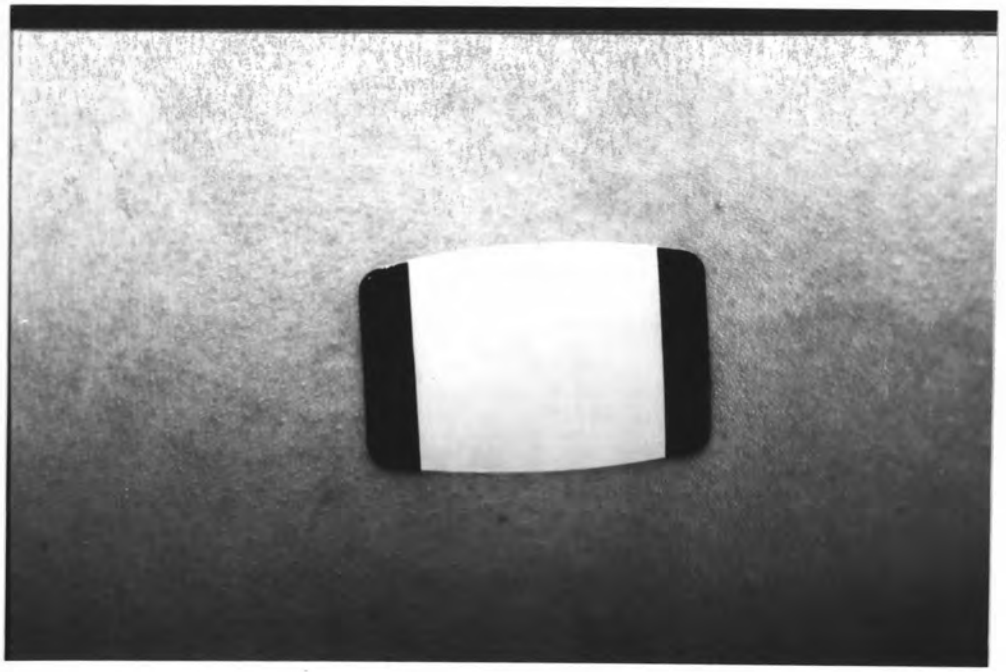
ภาพที่ 10 ตัวอย่าง เมื่อใช้ Sebu-test strip ติดที่กลางหลัง



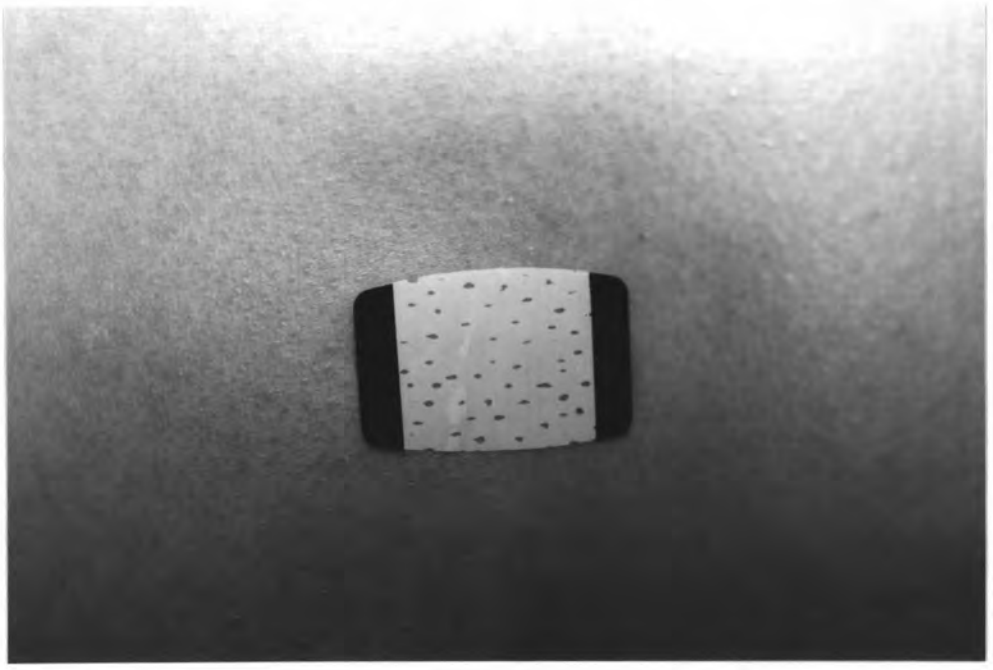
ภาพที่ 11 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด เมื่อเริ่มติด Sebu-test strip ที่หน้าผาก



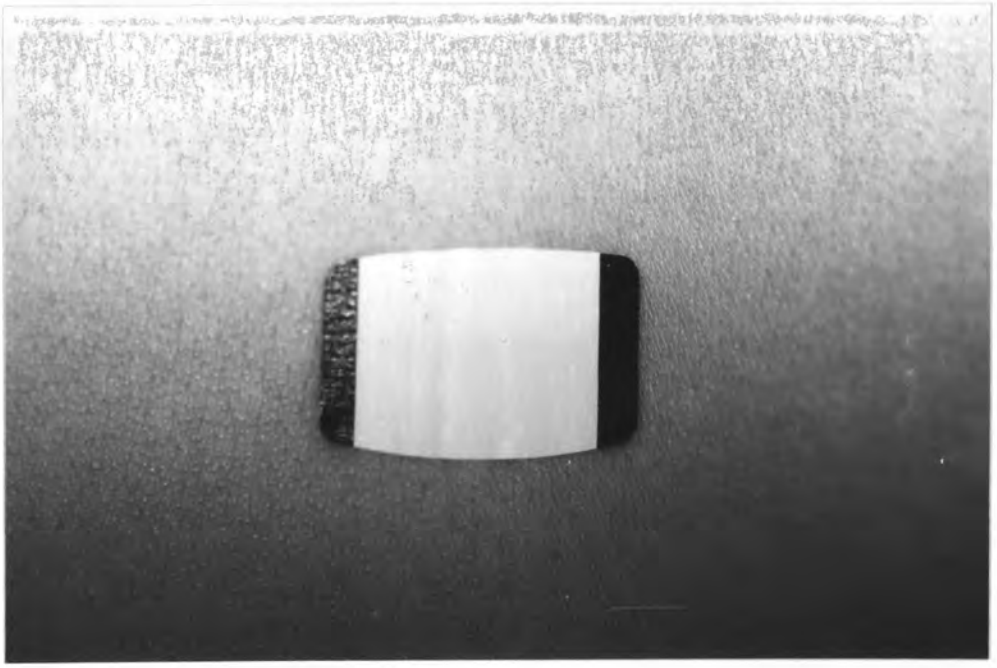
ภาพที่ 12 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด หลังติด Sebu-test strip ที่หน้าผากเป็นเวลา 3 ชั่วโมง



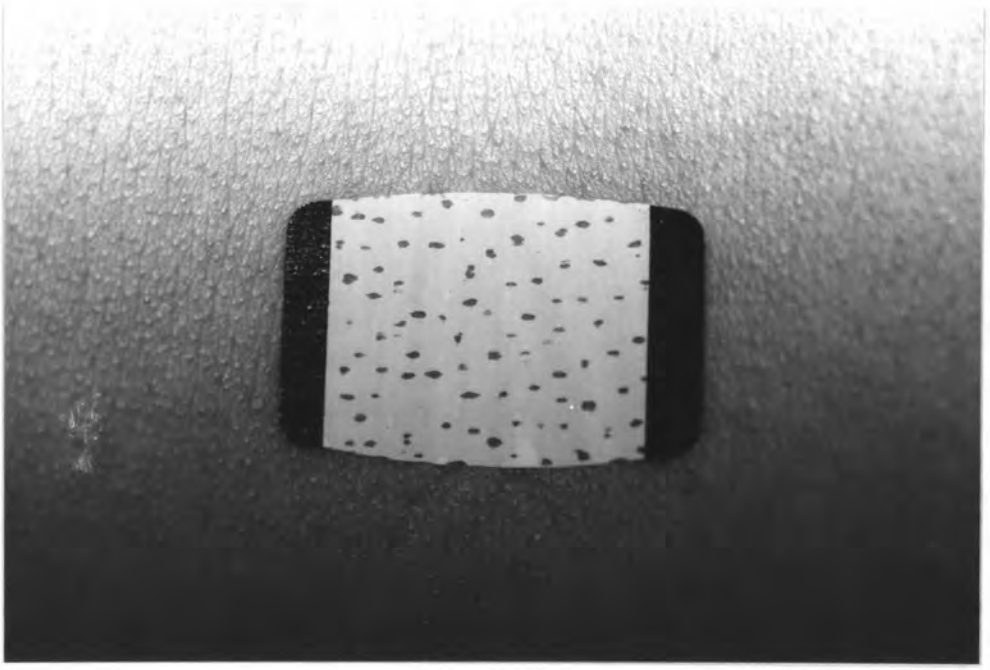
ภาพที่ 13 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด เมื่อเริ่มติด Sebu-test strip ที่หน้าอก



ภาพที่ 14 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด หลังติด Sebu-test strip ที่หน้าอกเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

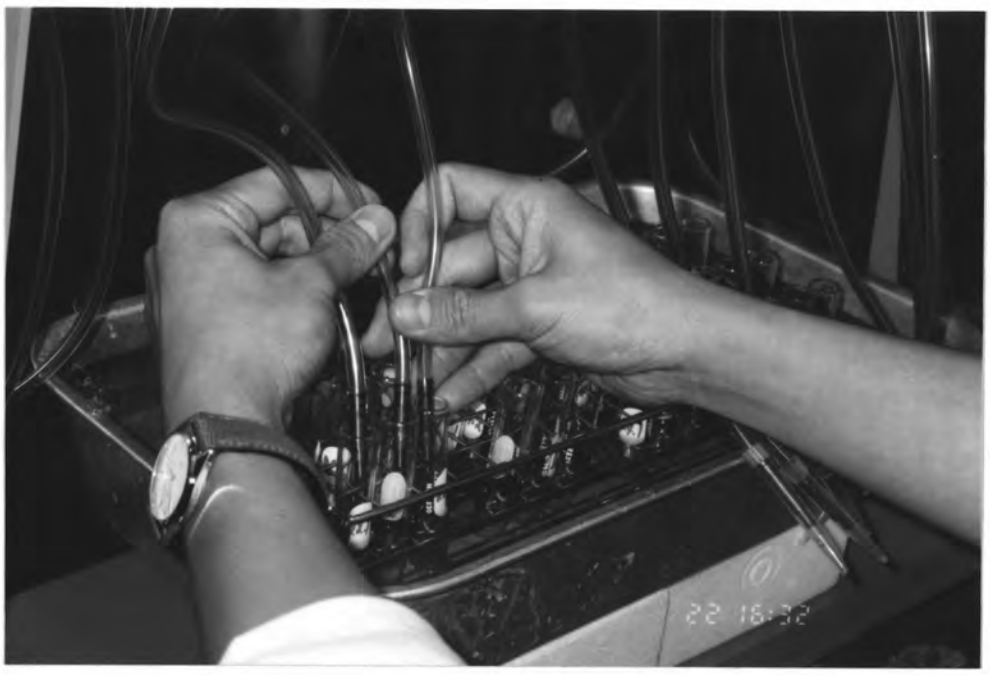


ภาพที่ 15 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด เมื่อเริ่มติด Sebu-test strip ที่กลางหลัง

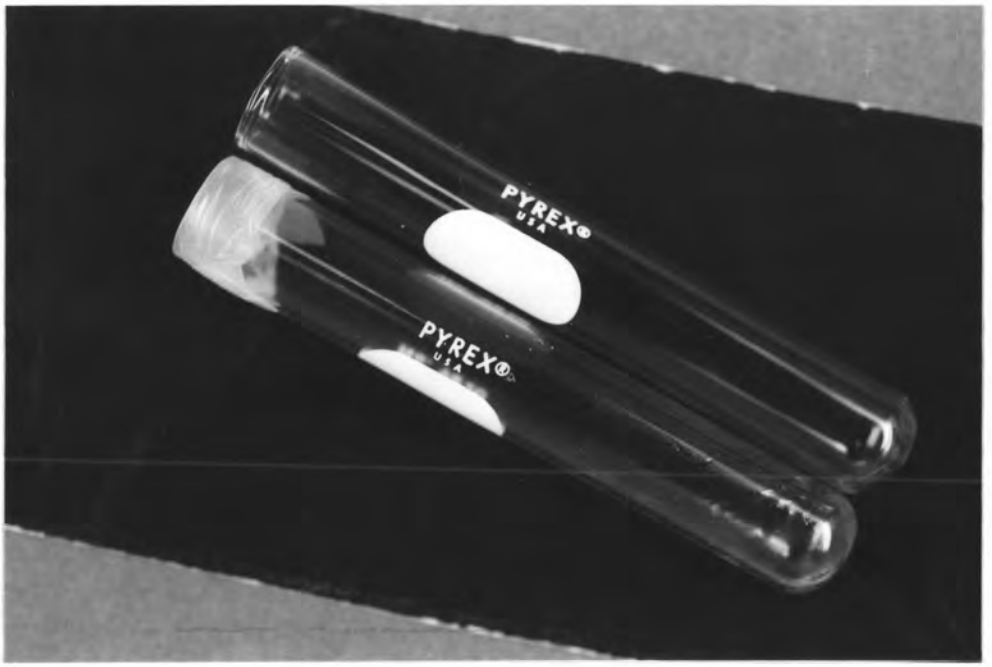


ภาพที่ 16 รูปถ่ายระยะใกล้ชิด หลังติด Sebu-test strip ที่กลางหลังเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ภาพที่ 17 การสกัดสารไขมันจาก Sebu-test strip ด้วย Hexane



ภาพที่ 18 การทำให้สารไขมันที่สกัดได้ระเหยด้วยก๊าซไนโตรเจน



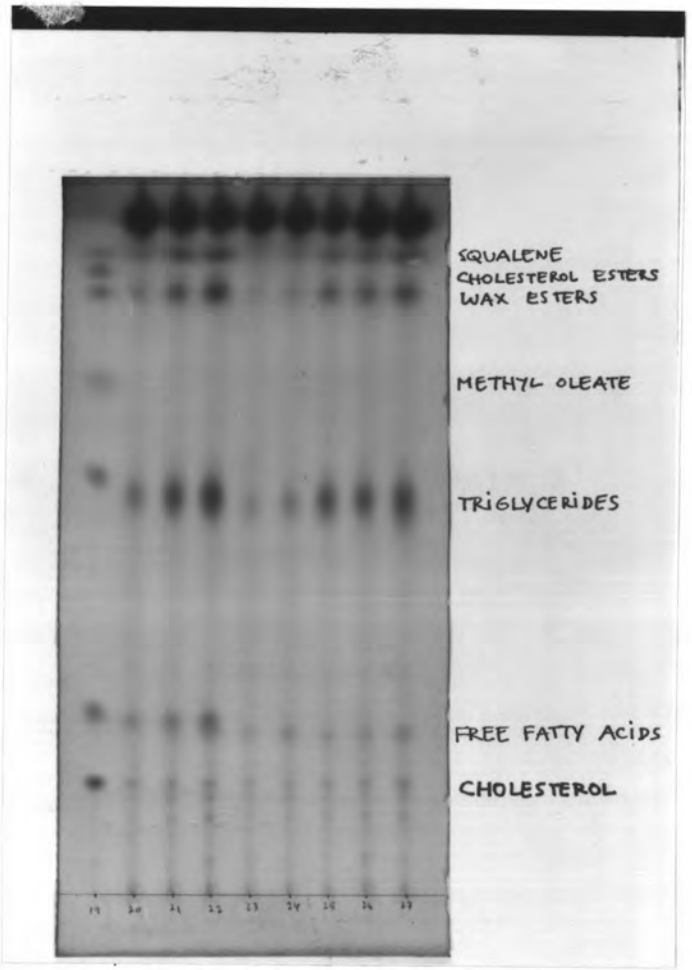
ภาพที่ 19 สารไขมันที่สกัดได้ (หลอดล่าง) เปรียบเทียบกับหลอดทดลองเปล่า (หลอดบน)

ภาพที่ 20 การหยดสารละลายไขมันลงบน Silica gel TLC plate

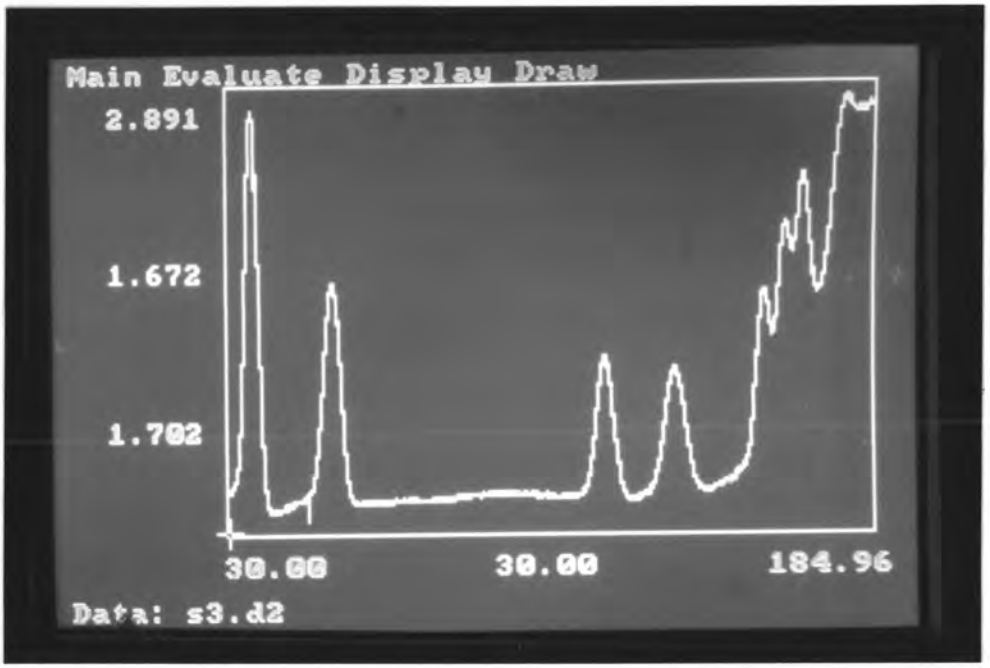
ภาพที่ 21 การวาง TLC plate ลงในแทงค์ 3 แทงค์ ตามลำดับ
ในรูป TLC plate อยู่ในแทงค์ที่ 1 (ขวามือสุด)

ภาพที่ 22 การย้อม TLC plate ด้วยสารละลาย phosphomolibdic acid

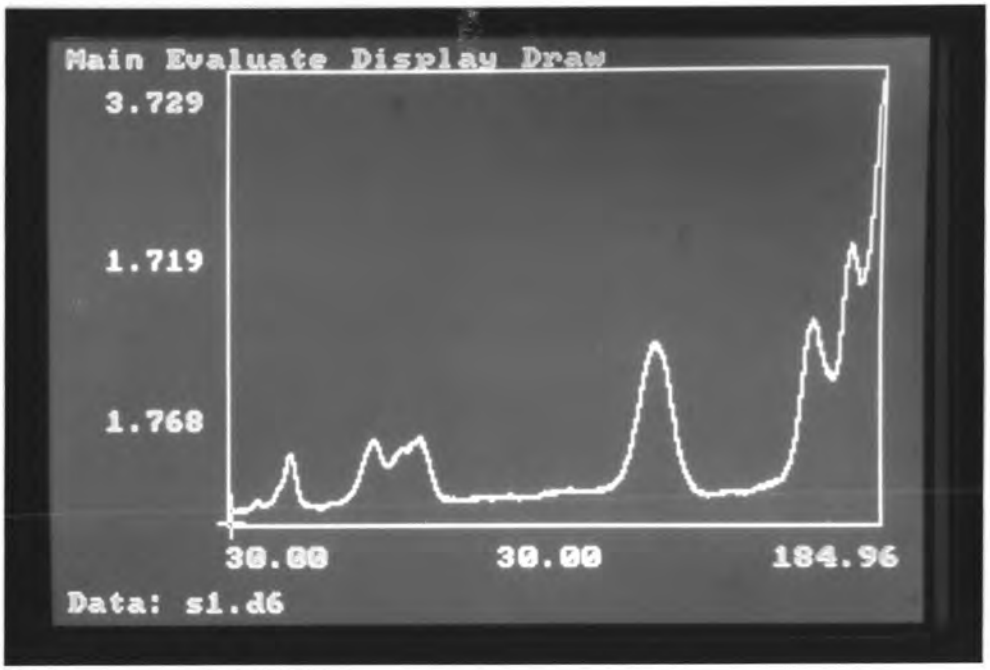
I16453811



ภาพที่ 23 สารไขมันจากตัวอย่างและ standard lipid บน TLC plate ที่ได้จากการทำ Thin-layer chromatography



ภาพที่ 24 กราฟของ standard lipid ที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง photodensitometer สารมาตรฐานเรียงลำดับตามยอดกราฟจากซ้ายไปขวา คือ cholesterol, oleic acid, triolein, methyl oleate, oleyl palmitate, cholesterol oleate, squalene



ภาพที่ 25 กราฟของส่วนประกอบของสารไขมันบนผิวหนังของตัวอย่างที่ได้จากการวัดด้วยเครื่อง photodensitometer
สารไขมันเรียงลำดับยอดกราฟจากซ้ายไปขวา คือ CHOL,FFA,TG,WE&CE,SQU