บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วยโรคมะเร็งโพรงหลังจมูกในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยาในช่วงปี 2537-2542

การสุ่มตัวอย่าง(sampling)

สุ่มตัวอย่างโดยประชากรตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาวิเคราะห์จะต้องมีข้อมูลทางคลินิกที่สมบูรณ์จึงถือเป็นการสุ่มตัวอย่างได้วิธีหนึ่งโดยปราศจากอคติ(bias)

กฎเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา

ผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกที่ได้รับการวินิจฉัยด้วยการตรวจชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็งในโพรงหลังจมูก ทางพยาธิวิทยาในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และมีข้อมูลทางคลินิกที่สมบูรณ์รวมทั้งชิ้นเนื้อหรือดีเอ็นเอที่สกัดไว้แล้วมีจำนวนเพียงพอในการตรวจความผิดปกติของยีน *p16*ชนิดเมททิเลชั่นในเซลล์มะเร็งด้วยวิธีMS-PCR

กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา

- การวินิจฉัยโรคทางพยาธิวิทยาไม่ชัดเจน
- มีมะเร็งชนิดอื่นร่วมด้วย (secondary malignancy)
- ชิ้นเนื้อหรือดีเอ็นเอที่สกัดไว้แล้วมีจำนวนไม่เพียงพอในการตรวจ
- ข้อมูลทางคลินิกที่ไม่สมบูรณ์ในการนำมาวิเคราะห์ตามที่ต้องการ

การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$n / group = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 \Pi (1-\Pi)}{(\Pi c - \Pi t)^2}$$

$Z\alpha$ = Z .05/2 = 1.64 (one-tailed)

$Z\beta$ = Z .20 = 1.28

Π_c = คาดว่าอัตราการรอดชีวิตที่ 36 เดือนในกลุ่มที่พบความผิดปกติของ*ยีน p16* ชนิดเมททิเลชั่นเท่ากับ 0.7

Π_t = คาดว่าอัตราการรอดชีวิตที่ 36 เดือนในกลุ่มที่ไม่พบความผิดปกติของ*ยีน p16* ชนิดเมททิเลชั่นเท่ากับ 0.3

(จากการศึกษาระยะเวลาการมีชีวิตของผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ 36 เดือนเท่ากับ 0.5)

Π = $(\Pi_c+\Pi_t)/2 = (0.7+0.3) / 2 = 0.5$

$$n / group = \frac{2(1.64+1.28)^2 (0.5) (1-0.5)}{(0.7-0.3)^2}$$

$$= 26.645$$

ขนาดตัวอย่างต้องใช้อย่างน้อย 54 ตัวอย่าง กลุ่มละประมาณ 27 ตัวอย่าง

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

นำดีเอ็นเอที่สกัดออกมาจากชิ้นเนื้อมะเร็งโพรงหลังจมูกที่ได้รับการวินิจฉัยครั้งแรกซึ่งเก็บไว้ในที่เก็บอุณหภูมิต่ำกว่า-80องศาเซลเซียสมาตรวจความผิดปกติของ*ยีน p16* ชนิดเมททิเลชั่นในเซลล์มะเร็งด้วยวิธี Methylation-Specific PCR (MS-PCR)

1. วิธีการตรวจ Methylation-Specific PCR

วิธีการตรวจ Methylation-Specific PCR เป็นการตรวจที่มีความจำเพาะมาก มีความไวมาก ทำได้รวดเร็ว และไม่แพง ในการตรวจหา methylation จากตัวอย่างดีเอ็นเอ แม้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยมาก ดีเอ็นเอจะถูกเปลี่ยนแปลงไปโดย การเติม bisulfite เพื่อเปลี่ยนแปลง cytosine ที่ไม่ถูก methylated ให้เป็น uracil ส่วน cytosine ที่ถูก methylated จะไม่เปลี่ยนแปลงไป ขั้นตอนในการตรวจมีดังนี้

ขั้นตอนการเตรียม bisulfite-modified DNA

1. ใช้สารละลาย hydroquinone ที่มีความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อ 5 ซีซีของน้ำที่จัดเตรียมไว้ นำมาเจือจางลง 1 ต่อ 10 *(hydroquinone เป็น antioxidant ที่ใช้ป้องกัน ปฏิกิริยา oxidation ระหว่างขบวนการต่อไป)*
2. เตรียมสารละลาย bisulfite ที่ความเข้มข้น 1.88 กรัมต่อ 5 ซีซีของน้ำ นำมาทำให้มีความเป็นด่างมากขึ้นโดยหยดสาร 19.5 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5 หยด*(ขบวนการนี้เป็นการสร้างดีเอ็นเอสายเดี่ยว ซึ่งจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับ bisulfite)*
3. เตรียมดีเอ็นเอ 1-2 ไมโครกรัมเจือจางในน้ำ 50 ไมโครลิตร
4. เติมสาร 2 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5.5 ไมโครลิตร(ที่เตรียมจาก fresh stock)ลงในข้อ 3.
5. ตั้งไว้(Incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
6. หลังจากนั้น เติม สารละลาย hydroquinone ที่เจือจางในข้อ 1. จำนวน 30 ไมโครลิตร และ vortex
7. แล้ว เติมสารละลาย bisulfite ในข้อ 2. จำนวน 520 ไมโครลิตร และ vortex
8. แล้วจึงเติมน้ำมัน mineral oil จำนวน 200 ไมโครลิตร*(เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ)*และตั้งไว้(Incubate) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง
9. นำส่วนที่เป็นน้ำมันออกและเติม Wizard™ resin จำนวน 1 ซีซี ลงในแต่ละหลอดทดลองและผสมให้เข้ากันอย่างดี*(Wizard™ resin จะช่วยแยกดีเอ็นเอออกจาก**sodium bisulfite** ที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี)*
10. ใส่สารในข้อ 9 ลงในหลอด หรือ syringe ที่ต่ออยู่กับ column ซึ่งยึดอยู่บน vacuum manifold ที่มีทางออกหลายทาง และ apply vacuum
11. ระหว่างที่ปล่อยน้ำออก ล้างด้วย สารละลาย 80% isopropanol จำนวน 2 ซีซี และ apply vacuum ต่อไปด้วย
12. ระหว่างที่ปล่อยน้ำออก แยกดีเอ็นเอออกจาก column โดยการล้างละลาย(elute) ด้วยน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียส จำนวน 50 ไมโครลิตร และปั่นหมุน (spin) ใน microfuge ที่ความเร็ว10000 รอบ เป็นเวลา 1 นาที *(น้ำอุ่นจะช่วยชะล้างละลายดีเอ็นเอที่ถูกเปลี่ยนแปลงแล้วออกจาก resin)*
13. หลังจากนั้นเติม สาร 3 M ของโซเดียมไฮดรอกไซด์(NaOH) 5.5 ไมโครลิตรและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที *(กระบวนการนี้กระทำเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์ในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของ cytosine ให้เป็น uracil อย่างสมบูรณ์)*
14. แล้วเติม สาร 10 M NH4OAc จำนวน 17 ไมโครลิตร และเอททานอล 95%ปริมาณ 2-3 เท่าของสารละลายรวมในข้อ 13

15. ตั้งทิ้งข้ามคืนที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อให้ตกตะกอน(precipitate)
16. นำมาหมุนเหวี่ยง นาน 25 นาที จากนั้นแยกส่วนที่เป็น supernatant ออกทิ้ง แล้วล้างด้วยเอททานอล 70 %
17. ทำให้แห้งโดยใช้ speed vacuum หลังจากนั้นละลายต่อด้วยน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอจะอยู่สภาพที่พร้อมจะเข้าสู่ขบวนการทำPCR

ขั้นตอนการเตรียม PCR mixes

1. ละลาย(thaw) PCR buffer 4dNTP mix และ primers โดยการกำหนดปริมาณแต่ละอย่างที่ใช้และเตรียม master mixes สำหรับการทำ PCR reaction ซึ่งประกอบด้วย (1)1x PCR buffer (2) 2 mM 4dNTP mix (3) sense primer กับ antisense primer 300 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ชนิดละ 1 ไมโครลิตร และ (4) *Taq* DNA polymerase(Perkin-Elmer) 1 unit
2. ใส่ PCR master mixes จากข้อ 18 ลงใน PCR tubes แต่ละหลอด
3. เติม template ของดีเอ็นเอที่อยู่ในสภาพพร้อมที่เตรียมไว้จากข้อ 17 จำนวน 7 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์จนได้ปริมาณสุดท้ายเป็น 20 ไมโครลิตร
4. เติมน้ำมัน 1-2 หยด คือ ประมาณ 25-50 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดและทิ้งไว้ในthermal cycler

ขั้นตอนการเพิ่มจำนวน PCR products

1. เริ่มต้นการทำ PCR ด้วยขบวนการ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที
2. เข้าสู่ขบวนการ PCR amplification ด้วยการกำหนด parameters ดังนี้
   35 รอบ 60 วินาที 95 องศาเซลเซียส สำหรับการ denaturation
   35 รอบ 60 วินาที อุณหภูมิ 57องศาเซลเซียส สำหรับ primer จำเพาะในการ annealing
   35 รอบ 60 วินาที 72 องศาเซลเซียส สำหรับการ elongation
   1 รอบ 4 นาที 72 องศาเซลเซียสสำหรับการ elongation เป็นขั้นตอนสุดท้าย
   เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์บน gel

ขั้นตอนการวิเคราะห์ PCR products โดย gel electrophoresis

1. เตรียม 2% Agarose gels ที่ nondenaturing ด้วย 1x TBE buffer
2. run แต่ละตัวอย่างบน gel ข้างต้น
3. stain gel ด้วย ethidium bromide และถ่ายภาพด้วย UV illumination

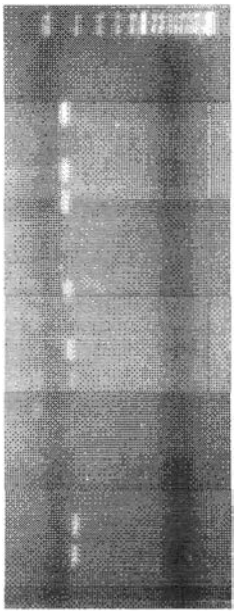
2. การอ่านผลการตรวจ Methylation-Specific PCR (MS-PCR) ของ*ยีน p16*

<u>การอ่านผลการตรวจ MS-PCR ของ*ยีน p16*</u>

ผลบวก คือ การตรวจพบแถบของ PCR products โดย gel electrophoresis ที่ stain gel ด้วย ethidium bromide

ผลลบ คือ การตรวจไม่พบแถบของ PCR products โดย gel electrophoresis stain gel ด้วย ethidium bromide

ดังแสดงในรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงผลการตรวจ MS-PCR ของ*ยีน p16*

การเก็บรวบรวมข้อมูล

เก็บรวบรวมข้อมูลดังต่อไปนี้จากเวชระเบียนแล้วบันทึกในแบบบันทึก

1. ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป : ชื่อ เพศ อายุ เชื้อชาติ
2. ปัจจัยเสี่ยงของโรคมะเร็งหลังโพรงจมูก เช่น การตรวจพบดีเอ็นเอของไวรัสอีบีวีในก้อนมะเร็ง (EBVDNA)
3. ระยะของโรค (Staging) ตามระบบ TNM
4. วิธีการรักษาที่ได้รับ
5. ระยะเวลาที่มีชีวิตอยู่ภายหลังการวินิจฉัยหรือการศึกษาวิจัยสิ้นสุด
6. ข้อมูลผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ก่อนการรักษา) เพื่อการประเมินระยะโรคที่ถูกต้อง ได้แก่
   - ผลตรวจจากชิ้นเนื้อดู EBV DNA

- ผลตรวจเลือดดูการทำงานของตับ(Liver function test) ถ้าผิดปกติทำCTหรือ ULTRASOUND ช่องท้องส่วนบน
- ผลเอ็กซเรย์ปอดและทรวงอก
- ผลการตรวจทางรังสีบริเวณโพรงหลังจมูกเช่น CT หรือ MRI เพื่อหาระยะของโรค (staging)
- ผลการตรวจ Bone scan ถ้ามีอาการ หรือผลเลือด alkaline phosphatase สูง

7. การตอบสนองต่อการรักษา (response)

การวิเคราะห์ข้อมูล

มีการวิเคราะห์ข้อมูลดังนี้

1. ข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกจากการศึกษานี้ทั้งหมด
2. ข้อมูลเปรียบเทียบของลักษณะทั่วไปผู้ป่วยมะเร็งโพรงหลังจมูกทั้งสองกลุ่มที่มีและไม่มีความผิดปกติของ*ยีน p16* ที่เกิดจากเมททิเลชั่น
3. กราฟแสดงความแตกต่างกันของลักษณะการกระจายของระยะเวลาการมีชีวิต(Kaplan-Meier curves) ของทั้งสองกลุ่มเปรียบเทียบ และ ความแตกต่างของระยะเวลาการมีชีวิตระหว่างสองกลุ่มที่มีและไม่มีความผิดปกติของ*ยีน p16* ที่เกิดจากเมททิเลชั่น โดยคำนวณจาก log rank test
4. ความแตกต่างของอัตราการตอบสนองต่อการรักษาระหว่างสองกลุ่มที่มีและไม่มีความผิดปกติของ*ยีน p16*ที่เกิดจากเมททิเลชั่น โดยคำนวณจาก Chi-square test หรือ Fisher's exact test
5. ความแตกต่างของอัตราการกลับเป็นซ้ำของโรคระหว่างสองกลุ่มที่มีและไม่มีความผิดปกติของ*ยีน p16*ที่เกิดจากเมททิเลชั่น โดยคำนวณจาก Chi-square test หรือ Fisher's exact test
6. การวิเคราะห์ปัจจัยหรือตัวแปรตัวเดียว(univariate analysis) ที่มีผลต่อสภาพการมีชีวิตรอด (status)โดย Chi-square test หรือ Fisher's exact test และระยะเวลาการมีชีวิตรอด (survival time) โดย Kaplan-Meier curves และ log rank test
7. การวิเคราะห์ปัจจัยหรือตัวแปรหลายตัว(multivariate analysis) ที่มีผลต่อสภาพการมีชีวิตรอด (status) และระยะเวลาการมีชีวิตรอด(survival time) โดยใช้ cox regression method หรือ cox proportional hazard model การสรุปข้อมูล หาระยะเวลาการมีชีวิตของผู้ป่วยในกลุ่มที่มีและไม่มีความผิดปกติของ*ยีน p16*ที่เกิดจากเมททิเลชั่น
   ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ใช้ค่า p น้อยกว่า 0.05