บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

1. ตัวอย่างเลือดจากคนไทยปกติจำนวน 118 คน และผู้ป่วยโรค SLE จำนวน 60 คน ปริมาตรคนละ 20 ม.ล. (ml.)

2. อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างเลือด

2.1 เข็มเจาะเลือดเบอร์ 21

2.2 syringe ขนาด 20 ม.ล.

2.3 ล่ายยางรัดต้นแขน

2.4 flask ขนาด 125 ม.ล. ภายในบรรจุลูกแก้วเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ม.ม. ประมาณ 30 - 40 ลูก

2.5 ล้าสี

2.6 ethyl alcohol 70%

2.7 ปากกาสำหรับเขียนชื่อตัวอย่างเลือด

3. เครื่องมือ

3.1 เครื่องชั่งแบบละเอียด

3.2 เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

3.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงแยกเลือด (centrifuge) ยี่ห้อ IEC รุ่น Centra - 7 R

3.4 อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (water bath) ที่ 37 องศาเซลเซียส

3.5 เครื่องผสมชนิดกดปั่น (mixer)

3.6 ตู้เย็น

3.7 กล้องจุลทรรศน์ชนิด phase-contrast

3.8 microtest plates และ planing slide

3.9 hemacytometer

3.10 Hamilton syringe ขนาด 50 µl และ 250 µl

3.11 jet pipette

3.12 เครื่องนับเซลล์ (handy count)

3.13 light box

3.14 ตะเกียงแอลกอฮอล์

4. เครื่องแก้ว

4.1 pipette ขนาด 1 ม.ล., 5 ม.ล. และ 10 ม.ล.

4.2 beaker ขนาด 50 ม.ล., 100 ม.ล.

4.3 volummetric flask ขนาด 125 ม.ล.

4.4 สไลด์

4.5 plastic centrifuge tube ขนาด 10 ม.ล.

5. สารเคมีและวัสดุวิทยาศาสตร์ *

5.1 antisera HLA

5.2 modified McCoy' 5A medium

5.3 Hanks' balanced salt solution

5.4 Ficoll-Paque

5.5 fetal bovine serum

5.6 rabbit complement

5.7 trypan blue 0.4%

5.8 normal saline solution

5.9 Hepes

5.10 HCl

5.11 $NaHCO_3$

* รายละเอียดจากภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.12 NaOH

5.13 eosin Y 5%

5.14 neutral formalin 40%

5.15 tris-NH_4Cl

5.16 น้ำกลั่น

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดคนละ 20 ม.ล. จากคนไทยปกติจำนวน 118 คน ซึ่งเป็นบุคคลากรที่ทำงานในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์และนิสิตคณะแพทย์ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์-มหาวิทยาลัย และผู้ป่วยโรค SLE จำนวน 60 คน ที่เข้ามารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาล-จุฬาลงกรณ์

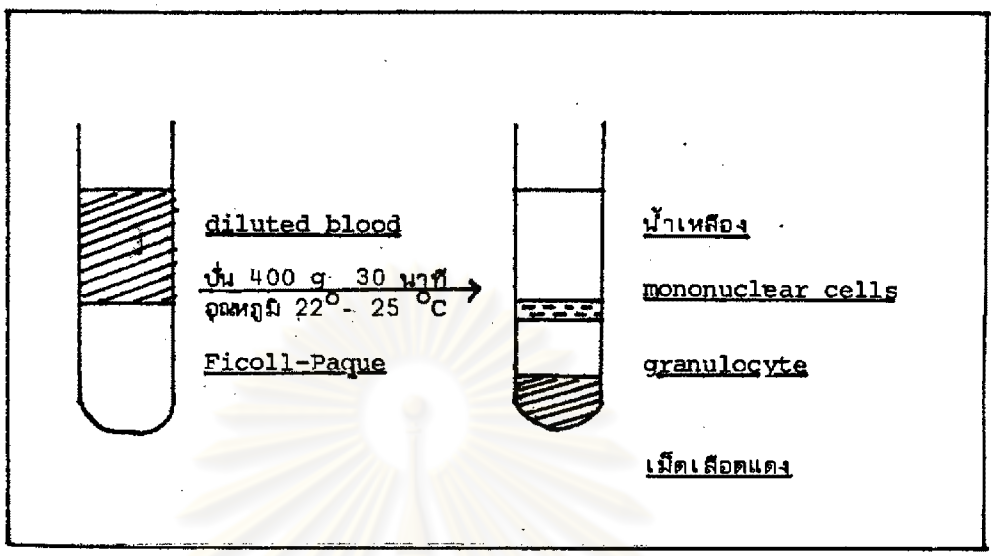
นำเลือดของแต่ละคนมาบรรจุใน flask ขนาด 125 ม.ล. ซึ่งภายใน flask นั้นมีลูกแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 30 ม.ม. จำนวน 30 - 40 ลูก เพื่อขจัดไฟบริน (fibrin) โดยการเขย่าเลือดและลูกแก้วด้วยความเร็วประมาณ 15 - 20 รอบ/นาที และในช่วงเวลาประมาณ 5 - 10 นาที จะได้เลือดที่ปราศจากไฟบริน (defibrinated blood) ประมาณ 10 - 15 ม.ล. โดยเฉลี่ย

2. การแยกเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ทำตามวิธีการของ Boyum's method โดยวิธี gradient centrifugation

2.1 นำเลือดที่ปราศจากไฟบรินมาเจือจางด้วย Hanks' balanced salt solution (HBSS) อัตราส่วน 1 ต่อ 1

2.2 ใช้ Pasteur pipette ดูดเลือดจากข้อ 2.1 ปริมาตร 4 ม.ล. ไหลช้า ๆ ลงไปวางบนน้ำยา Ficoll-Paque ปริมาตร 3 ม.ล. ซึ่งบรรจุในหลอดสำหรับปั่นขนาด 10 ม.ล. ระวังอย่าให้สิ่นละเทือน นำไปปั่นด้วยความเร็ว 400 g นาน 30 นาที Ficoll-Paque เป็นสารที่มีความหนาแน่น 1.077 $\pm$ 0.001 กรัม/ม.ล. ฉะนั้นหลังจากปั่นเสร็จจะพบเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งหนักที่สุดจะตกลงอยู่ก้นหลอด ส่วน lymphocyte และ mononuclear cell ซึ่งเบากว่า Ficoll-Paque จะลอยอยู่เห็นเป็นวงแหวนสีขาวเหนือชั้นของ Ficoll-Paque (รูปที่ 2)

013332



รูปที่ 2 การแยกเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ด้วยวิธีการของ Böyum (1968)

2.3 ดูดชั้นของเซลล์ในชั้นวงแหวนสีขาวมาใส่ในหลอดสำหรับปั่นขนาด 10 ม.ล. แล้วเติม HBSS จนครบ 10 ม.ล. นำไปปั่นล้างด้วยความเร็ว 160 g นาน 10 นาที

2.4 ถ้ามีเซลล์เม็ดเลือดแดงปนมาในส่วนของตะกอน ต้องทำลายโดยใช้ tris-NH_4Cl 10 ม.ล. นำไปอุ่นในอ่างน้ำปรับอุณหภูมิ 10 นาที 37 องศา เซลเซียส ปั่นล้างทันทีด้วยความเร็ว 160 g นาน 10 นาที (ถ้าไม่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงปนมาในส่วนของตะกอน ข้ามขั้นตอนนี้ไปทำขั้นตอนที่ 2.5 ต่อไป)

2.5 เติม HBSS 10 ม.ล. ลงไปในส่วนของตะกอน ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นล้างอีก 2 ครั้ง

2.6 เติม 5% fetal bovine serum-McCoy'5A ประมาณ 1 - 2 ม.ล. ลงไปในส่วนตะกอน ผสมให้เข้ากันดี

3. การปรับความเข้มข้นและการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์

3.1 ตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง hemacytometer โดยทำการนับจำนวนเซลล์ในช่องที่ 1 และ 3 ของช่องสำหรับตรวจนับเม็ดเลือดขาว แล้วหาค่าเฉลี่ยของเซลล์ใน 1 ช่อง (0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

3.2 คำนวณหาจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยใช้สูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด} = \frac{X}{100} \times VCS$$

X = ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ใน 1 ช่อง (0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

VCS (volume cell suspension) = ปริมาตรของ cell suspension ทั้งหมดก่อนที่จะทำการนับเซลล์

3.3 ปรับปริมาตรของ cell suspension เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 2.5 ล้านเซลล์/ม.ล. โดยใช้ 15 % fetal bovine serum-McCoy'5A เพราะถ้าจำนวนเซลล์มากหรือน้อยกว่า 2.5 ล้านเซลล์/ม.ก. นี้ จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการอ่านผล สูตรที่ใช้คำนวณมีดังนี้

$$\text{ปริมาตรที่ถูกต้อง} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}{2.5} \quad \text{ม.ล.}$$

3.4 ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยใช้ 0.4% trypan blue 50 µl ผสมกับ cell suspension (2.5 ล้านเซลล์/ม.ล.) 50 µl ทำการตรวจนับเซลล์ที่ตายและเซลล์ที่มีชีวิต (ในช่องที่ 1 และ 3 ของช่องสำหรับตรวจหาเม็ดเลือดขาว) ภายในเวลา 10 นาที คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความมีชีวิต} = \frac{X}{Y} \times 100$$

X = จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในช่องที่ 1 และ 3

Y = จำนวนเซลล์ทั้งหมดในช่องที่ 1 และ 3

ในการตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA จะใช้เซลล์ที่มีชีวิตมากกว่า 90 % เพื่อกำจัดความผิดพลาดในการอ่านและแปลผล

4. การตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA โดยการทำ microlymphocytotoxicity test (NIH technique หรือ two-stage technique)

หลักการทดลอง

ถ้าแอนติเจน HLA ตัวใดตัวหนึ่งบนผิวของเซลล์ lymphocyte มีความจำเพาะต่อแอนติบอดี แอนติบอดีก็จะทำปฏิกริยากับแอนติเจนและมีการตรึงคอมพลีเมนท์เข้าร่วมในปฏิกริยา เป็นผลให้ผนังเซลล์ lymphocyte ถูกทำลายสีจึงสามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ ทำให้เห็นเซลล์ที่ตายติดสีและขนาดบวมโตกว่าเซลล์ปกติ 2 - 3 เท่า แต่ถ้าไม่เกิดปฏิกริยาจะเห็นเซลล์ที่มีชีวิตมีลักษณะแวววาวสะท้อนแสงไม่ติดสี (รูปที่ 3)

ขั้นตอนการทดสอบ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 two stage microlymphocytotoxicity test (NIH technique)

Stage I		
	antiserum	1 µl
	lymphocyte (2.5×10^6 cells/ml.)	1 µl
	incubation, 22° - 25°C	30 min.
Stage II		
	rabbit complement	5 µl
	incubation, 22° - 25°C	60 min.
	staining	
	5% Eosin Y	3 µl
	incubation with dye, 22° - 25°C	5 min.
	40% Formalin, pH 7.2	8 µl

4.1 นำ microtest plate ที่มี antisera บรรจุอยู่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง 25 $^\circ$C (antisera แต่ละชนิดทำการตรวจสอบแล้วได้ผลการคำนวณทางสถิติ 2 x 2 table ได้ค่า X^2 ที่ $P < .001$ และค่า coefficient $= \sqrt{\frac{X^2}{N}}$ มากกว่า 0.7 ขึ้นไป และ Strength index เกิน 80 เปอร์เซ็นต์) เลือก 1 ตัวอย่างจะทำการทดสอบใน typing tray 2 tray คือ

tray ที่ 1 บรรจุ antisera HLA-A ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ HLA - A1, HLA - A2, HLA - A2 + 28, HLA - A3, HLA - A3 + 11, HLA - A9, HLA - A25 (10), HLA - A25 + 26 (10), HLA - A10, HLA - A1 + 26, HLA - A11, HLA - A1 + 11 และ negative control

tray ที่ 2 บรรจุ antisera HLA - B ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ HLA - B5, HLA - B5 + 35, HLA - B7, HLA - B8, HLA - B44 (12), HLA - B12, HLA - B13, HLA - B15, HLA - B15 + w46, HLA - B17, HLA - B18, HLA - B22, HLA - B22 + 7, HLA - B7 + 22, HLA - B7 + (w22), HLA - B27, HLA - Bw60 (40), HLA - B40, HLA - B13 + 40, HLA - Bw46, positive control และ negative control

1 microtest plate มี 60 หลุม ปริมาตรของ antisera HLA มีจำนวน 1 µl. ในแต่ละหลุม

รายละเอียดการจัดเตรียม typing tray อยู่ในภาคผนวก

4.2 ใส่ lymphocyte ปริมาณ 1 µl. ลงในแต่ละหลุมของ microtest plate แล้วนำไปอบ ที่อุณหภูมิห้อง คือ อุณหภูมิ 20 - 22°C

4.3 เติม rabbit complement 5 µl. ลงในแต่ละหลุม นำไปอบที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที

4.4 เติม eosin Y 3 µl. นำไปอบที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

4.5 หยุดปฏิกริยาโดยเติม neutral formalin 8 µl. หลังจากนี้ 15 นาที ปิด planing slide แล้วนำมาอ่านผลการทดลองด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด phase contrast กำลังขยาย 100 เท่า

5. การอ่านผลการทดลองและวิธีให้คะแนนผลของการทดสอบ

ตรวจดูเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ตายซึ่งสังเกตจากการมีลักษณะบวมโตกว่าเดิม 2 - 3 เท่า ภายในติดสีเข้มทึบไปหมด ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่มีลักษณะเป็น lymphocyte ขนาดเล็กและแวววาวล้อมแสง มองเห็นภายใน cytophasm ชัดเจน

วิธีการให้คะแนนของผลการทดสอบมีดังนี้

เปอร์เซ็นต์เซลล์ตาย	คะแนน
0 - 10	1
11 - 20	2
21 - 40	4
41 - 80	6
81 - 100	8
ไม่ได้ทดสอบ	0

ถ้าได้คะแนน 6 - 8 แสดงว่าการทดสอบได้ผลบวก

6. <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

6.1 การหา phenotype frequency (P.F.) ของแอนติเจนแต่ละชนิด P.F. หมายถึงสัดส่วนของลักษณะที่แสดงออกมาเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะรวมทั้งหมด คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$P.F. = \frac{\text{จำนวนคนที่มีแอนติเจนที่กำหนด}}{\text{จำนวนคนทั้งหมด}}$$

6.2 การหา genotype frequency (G.F.) ของแอนติเจนแต่ละชนิด G.F. หมายถึงสัดส่วนของยีน 1 allele เมื่อเปรียบเทียบกับทุก allele ใน 1 โลคัสของกลุ่มประชากร (Gardner และ Snustad, 1984) คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

$$G.F. = 1 - \sqrt{1 - P.F.}$$

6.3 การเปรียบเทียบการกระจายตัวของแอนติเจนแต่ละชนิดระหว่างผู้ป่วยและคนปกติ 2 ประการ คือ

6.3.1 การคาดคะเนความเสี่ยงต่อการเป็นโรค โดยอาศัยค่า relative incidence ratio คือ relative risk (R.R.) โดย Woolf (1955)

ค่า R.R. แสดงถึงโอกาสที่คนที่มีแอนติเจนชนิดนั้น จะเป็นโรคชนิดนั้นมากกว่าคนปกติกี่เท่า (ตามตัวเลขที่คำนวณได้)

ค่า R.R. คำนวณได้จากสูตร

$$R.R. = \frac{ad}{bc}$$

a = จำนวนผู้ป่วยที่มีแอนติเจนที่กำหนด

b = จำนวนผู้ป่วยที่ไม่มีแอนติเจนที่กำหนด

c = จำนวนคนปกติที่มีแอนติเจนที่กำหนด

d = จำนวนคนปกติที่ไม่มีแอนติเจนที่กำหนด

6.3.2 การทดสอบนัยสำคัญ

6.3.2.1 ถ้าค่าความคาดหวัง (expected value) ของข้อมูลมีค่ามากกว่า 5 ใช้การทดสอบไคสแควร์ (classical chi-square test) ที่มีการแก้ไขของ Yates (Yates' correction) สูตรการคำนวณมีดังนี้

$$X^2 \text{ (Yates')} = \frac{(|ad - bc| - \frac{N}{2})^2 \times N}{n_1 n_2 n_3 n_4}$$

ค่า a, b, c, d, n_1, n_2, n_3, n_4 และ N

a = จำนวนผู้ป่วยที่มีแอนติเจนที่กำหนด

b = จำนวนผู้ป่วยที่ไม่มีแอนติเจนที่กำหนด

c = จำนวนคนปกติที่มีแอนติเจนที่กำหนด

d = จำนวนคนปกติที่ไม่มีแอนติเจนที่กำหนด

n_1 = จำนวนผู้ที่มีแอนติเจนที่กำหนด

n_2 = จำนวนผู้ที่ไม่มีแอนติเจนที่กำหนด

n_3 = จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (ในที่นี้คือ 60 คน)

n_4 = จำนวนคนปกติทั้งหมด (ในที่นี้คือ 118 คน)

N = จำนวนสุทธิคนทั้งหมดในการทดลอง (ในที่นี้คือ 178 คน)

	แอนติเจนที่ทดสอบ		รวม
	ให้ผล +	ให้ผล -	
จำนวนผู้ป่วย	a	b	n_3
จำนวนคนปกติ	c	d	n_4
รวม	n_1	n_2	N

6.3.2.2 ถ้าค่าความคาดหวังของข้อมูลมีค่าน้อยกว่า 5 ใช้วิธีการทดสอบของ Fisher (Fisher's exact probability test) สูตรการคำนวณมีดังนี้คือ

$$P = \frac{n_1 ! \, n_2 ! \, n_3 ! \, n_4 !}{N ! \, a ! \, b ! \, c ! \, d !}$$

ความหมายของค่า n_1, n_2, n_3, n_4, N, a, b, c และ d มีอยู่ในข้อ 6.3.2.1

ค่าความน่าจะเป็น (P) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้จะใช้ค่าที่มีการแก้ไข คือค่า P_c (corrected P-value) เพื่อลดความคลาดเคลื่อนในการตัดสินใจ (Svejaard และ Syder, 1974; McDevitt และ Bodmer, 1972) P_c คำนวณได้จากสูตรต่อไปนี้

P_C = P x จำนวนของ specificities ที่ใช้ทดสอบ

จำนวนของ antisera ที่ใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 18 specificities

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย