บทที่3
วิธีดำเนินการ

คำถามการวิจัย (Research Question)

คำถามหลัก (Primary question)

ในคนไทย HLA-DRB1*0405 มีความสัมพันธ์กับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

เพื่อต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของ HLA-DR4 subtype ชนิดต่าง ๆกับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ในคนไทย

สมมติฐาน (Hypothesis)

ในคนไทยสัดส่วนของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ที่มี HLA-DRB1*0405 มากกว่าคนปกติ

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

Cross-Sectional Descriptive Study

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมายได้แก่ ผู้ป่วยไทยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

กลุ่มตัวอย่างได้แก่ ผู้ป่วยไทยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ที่มารับการรักษาที่หน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

คุณสมบัติของกลุ่มตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์ในการวิจัย (Inclusion criteria)

1. ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ตาม classification criteria of rheumatoid arthritis ARA 1987 (ภาคผนวก2)
2. ตรวจพบว่ามี HLA-DR4
3. มีเชื้อชาติไทย

คุณสมบัติของกลุ่มตัวอย่างที่ไม่เข้าเกณฑ์ในการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ตาม classification criteria of rheumatoid arthritis ARA 1987 (ภาคผนวก2) แต่ตรวจไม่พบ HLA-DR4
2. มีเชื้อชาติอื่นที่ไม่ใช่เชื้อชาติไทย

กลุ่มควบคุม ได้แก่ คนไทยปกติที่มี HLA-DR4

การคัดเลือกตัวอย่าง ผู้วิจัยจะคัดเลือกตัวอย่างจากกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุมตามเกณฑ์ที่กำหนดเท่ากับจำนวนขนาดตัวอย่างที่คำนวณได้

การคำนวณขนาดตัวอย่าง [35]

$N = 2pq(Z_\alpha + Z_\beta)^2 / (P_1 - P_0)^2$

$P_1 = P_0R/[1+P_0(R-1)]$

$p = (P_1+P_0)/2$

N = จำนวนขนาดตัวอย่าง, $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.1$

$Z_\alpha = 1.96$ (two tail), $Z_\beta = 1.28$ (one tail)

P_0 = สัดส่วนของคนปกติ(HLA-DR4) ที่มี HLA-DRB1*0405 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในคนเกาหลี [9] พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.378 (เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาเรื่องนี้ในคนไทย และพบว่าในคนเอเชียผิวเหลือง เช่น เกาหลี[9] HLA-DRB1*0405 มีความสัมพันธ์กับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ จึงใช้ข้อมูลที่มีเชื้อชาติใกล้เคียงกัน)

R = โอกาสเสี่ยง (Relative risk) ของการเป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ ในคนที่มี HLA-DRB1*0405 จากการศึกษาก่อนหน้านี้ในคนเกาหลี [9] พบว่ามีค่าเท่ากับ 4.6

$P_1 = (0.378\times4.6)/[1+0.378\times(4.6-1)]$

$= 0.736$

$p = (0.378+0.736)/2$

$= 0.557$

$q = 1-0.557 = 0.443$

$N = 2\times0.557\times0.443\times(1.96+1.28)^2/(0.736-0.378)^2$

$= 40$ คน

$\therefore$ จะต้องใช้ตัวอย่างกลุ่มละ 40 คน

การสังเกต (Observation) และการวัด (Measurement)

ตัวแปรในการวิจัย

HLA-DR4 subtype ชนิดต่างๆ(HLA-DRB1*0401-0410) ของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

เครื่องมือที่ใช้ในการวัดตัวแปร

การตรวจ subtype ชนิดต่างๆของ HLA-DR4 โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide probe (PCR-SSOP)[32] โดยห้องปฏิบัติการ Tissue typing ของหน่วยวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาจุลชีววิทยา และห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุลของหน่วยโลหิตวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

กลุ่มผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

1.เก็บข้อมูล อายุ เพศ

2.เก็บข้อมูลลักษณะทางคลีนิคของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ได้แก่

- ระยะเวลาที่เป็นโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์
- ระยะเวลาของการเป็นโรคข้ออักเสบรูมาดอยด์
- Extra-articular manifestation
- ผล X-ray ข้อว่ามีการสึกกร่อนของข้อหรือไม่
- ผลการตรวจ rheumatoid factor
- Functional class (ภาคผนวก 3) ตั้งแต่เริ่มวินิจฉัย และขณะปัจจุบัน
- ภาวะข้อผิดรูป (joint deformity)
- ยาที่ได้รับ

3.นัดผู้ป่วยที่มี HLA-DR4 มาเจาะเลือดและแยกเก็บ DNA เอาไว้นำไปวิเคราะห์ตรวจ HLA-DR4 subtypes (0401-0410)

กลุ่มควบคุม

1.เก็บข้อมูล อายุ เพศ

2.นัดกลุ่มควบคุมที่มี HLA-DR4 มาเจาะเลือดและแยกเก็บ DNA เอาไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ตรวจหา HLA-DR4 subtypes (0401-0410)

วิธีการวิเคราะห์ HLA-DR4 subtypes โดยวิธี polymerase chain reaction-sequence specific nucleotide probe (PCR-SSOP)[36] ประกอบไปด้วย

1. วิธีการสกัดและแยกเก็บ DNA (DNA extraction)

น้ำยาที่ใช้

- 5% ethylene diamine tetraacetate (EDTA)
- red cell lysis buffer (RCLB.)
- white cell lysis buffer (WCLB.)
- 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)
- proteinase K
- chloroform+Isoamyl alcohol (24:1)
- 5M. NaCl
- phenol + chloroform-isoamylalcohol 3:1
- absolute ethanol
- 70% ethanol
- TE buffer

1. เจาะเลือด 10 ml. ใส่หลอดทดลอง(ขนาด 15 ml. ที่มี 5% EDTA 2 ml.) ผสมให้เข้ากันแล้ว นำมาปั่นที่ 4°C ที่ 2,500 รอบ/วินาที เป็นเวลานาน 15 นาที

2. เก็บ buffy coat ใส่ใน falcon tube (ขนาด 15 ml.) เติม RCLB. 10 ml. ผสมให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ 4°C ที่ 1,500 รอบ/วินาที นาน 10 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

3. นำตะกอนที่ได้ในข้อ 2 มาเติม WCLB. เขย่าทำให้ตะกอนแตกตัวดีแล้วแบ่งใส่ eppendorf tube หลอดละ 0.6 ml.

4. เติม 10% SDS 12 µl ผสมให้เข้ากันและเติม proteinase K 12 µl ผสมให้เข้ากันนำไปอุ่นที่ 50 °C นาน 18 ชั่วโมง หรือทิ้งไว้ค้างคืน

5. เติมสารละลาย phenol + chloroform-isoamyl alcohol (3:1) 0.5 ml. ผสมให้เข้ากัน แล้วปั่นด้วยเครื่อง high speed นาน 5 นาที เก็บส่วนใสด้านบนและทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

6. นำส่วนใสที่ได้มาเติม chloroform+isoamylalcohol (24:1) ปริมาณเท่าตัว ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นด้วยเครื่อง high speed นาน 5 นาที

7. นำเอาส่วนใสที่ได้เติม 5 M.NaCl (เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.1 M.) ผสมให้เข้ากัน

8. เติม absolute ethanol (ที่แช่เย็นเตรียมไว้) กะปริมาณ 2 เท่าของส่วนใสที่ได้ ใช้นิ้วมือค่อย ๆปั่นก้นหลอดทดลองจะแลเห็นสายของ DNA

9. นำไปปั่นด้วยเครื่อง high speed นาน 5 นาทีเทส่วนใสทิ้ง

10. เติม 70% ethanol 1 ml. เขย่าจนตะกอนหลุดออกจากก้นหลอดทดลอง นำไปปั่นด้วยเครื่อง high speed นาน 5 นาที เทส่วนใสทิ้งทำซ้ำอีก 1 ครั้ง

11. นำเอาตะกอนที่ได้มาทำให้แห้งที่ 60-80 °C นาน 30 นาที

12. เติม TE buffer 50 µl เมื่อ DNA ละลายดีจึงนำไปวัดค่า OD เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของ DNA ต่อไป

การวัดค่า OD เพื่อหาความเข้มข้นของ DNA

- นำ DNA ที่ได้มาละลายให้มีความเข้มข้น 1:50 โดยใช้ TE buffer และนำไปวัดค่า OD ที่ 260 nm, 280 nm และ 330 nm ตามลำดับ

- คำนวณความเข้มข้นของ DNA ที่ได้ตามสูตรต่อไปนี้

ความเข้มข้นของ DNA (µg/ml) = $\left[\{OD(260nm) - OD(330nm)\} \times 50\right] \times 50$

ความเข้มข้นของ DNA ที่พอเหมาะคือ 100-120 µg/ml จึงนำไปทำ polymerase chain reaction ต่อไป

ถ้าความเข้มข้นของ DNA มากกว่า 120 µg/ml ให้เจือจางด้วย TE buffer ให้มีความเข้มข้น 100 µg/ml

2. วิธีการทำ polymerase chain reaction

น้ำยาที่ใช้

- primer B (codon 87: 5' G CCG CTG CAC TGT GAA GCT CTC 3')
- primer C (codon 6: 5' GT TTC TTG GAG CAG GTT AAA C 3')
- Taq polymerase
- dNTP
- PCR buffer
- DNA sample

1. นำ primer , PCR buffer, dNTP อุ่นที่ 37°C นาน 30 นาที

2. ผสม - 10 µl PCR buffer
  10 µl dNTP
  2.5 µl primer B
  2.5 µl primer C
  64.5 µl dH_2O
  10 µl DNA sample
  0.5 µl Taq polymerase

รวมปริมาตรทั้งหมด 100 µl ต่อ 1 sample

3. นำเข้าเครื่อง DNA thermal cycler (Perkin-Elmer model 480 Thermo-Cycler) ตาม protocol ของ Quick-Type[37]

ตั้ง setting ไว้ที่ 1 cycle : 95°C นาน 30 วินาที

32 cycles : 95°C นาน 1 นาที, 60°C นาน 1 นาที, 72°C นาน 1 นาที

1 cycle : 72°C นาน 10 นาที

4. นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบโดยใช้วิธี gel electrophoresis

วิธีตรวจสอบ PCR product โดยใช้ gel electrophoresis

1. ใช้ 1.5% gel ใน 1xTAE + ethidium bromide (10 mg/ml) 1.5 µl เตรียม 30 ml.

วิธีทำ

- ชั่ง agarose gel 0.45 gm. เติม 1xTAE 30 ml. นำไปต้มให้ละลาย วางไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 60°C และเติม ethidium bromide 1.5 µl ผสมให้เข้ากันและเทลงใน gel tray ที่เตรียมไว้ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น

2. นำ PCR product 4 µl ผสมกับ bromphenol blue 2 µl และหยอดลงใน gel ที่เตรียมไว้ โดย standard markerที่ใช้คือ ϕx 174 DNA/Hae III นำไปผ่านกระแสไฟ 85 V. ประมาณ 45 นาทีจากนั้นนำ gel ไปดูโดยผ่านรังสี ultraviolet โดยแถบที่ต้องการจะอยู่ที่ตำแหน่ง 290 kb. ของ standard marker ดังแสดงในแผนภาพที่5

3. นำ PCR product (ที่ผ่านการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis แล้วให้ผลบวก)มาเติม chloroform 50 µl ผสมให้เข้ากันนำไปปั่นด้วยเครื่อง high speed นาน 5 นาที ดูดเอาส่วนใสด้านบนเก็บไว้ที่ 4°C (ขั้นตอนนี้เป็นการทำเพื่อแยกเอาน้ำมันออกจาก PCR product) เพื่อนำไปทำขั้นที่ 3 ต่อไป

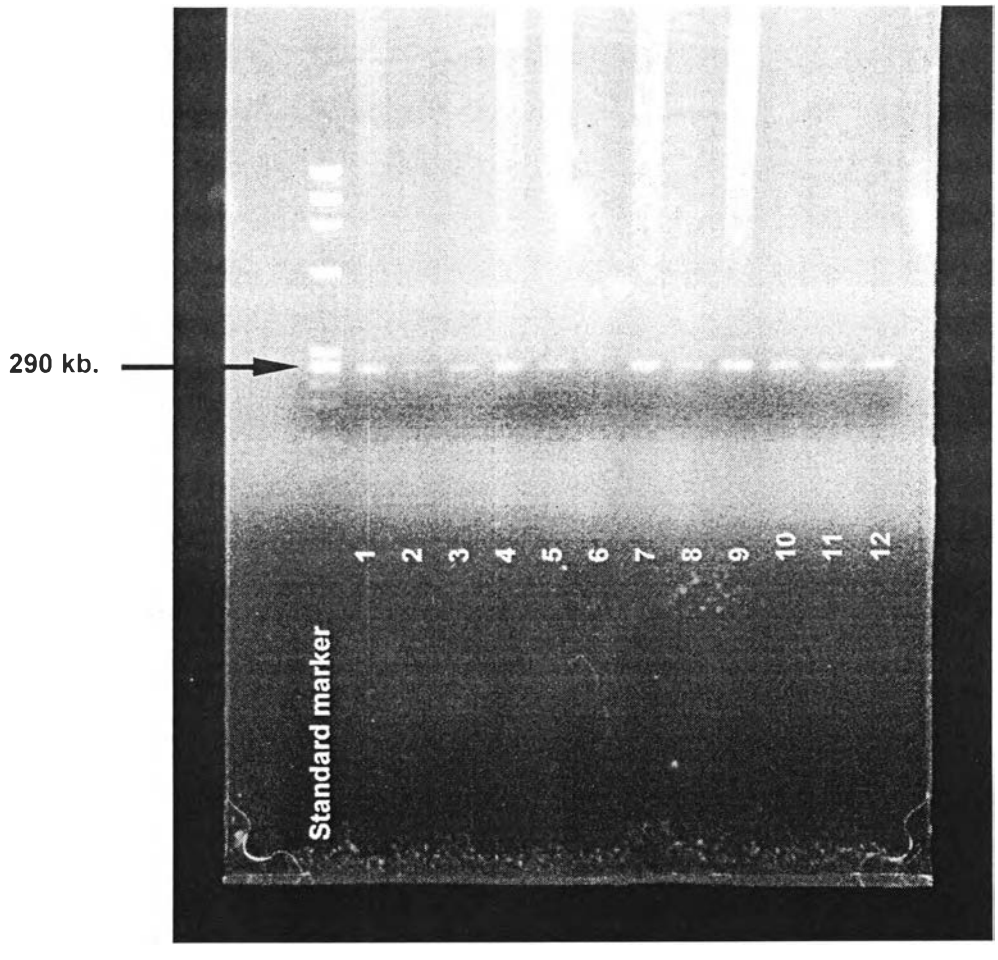
3. วิธีการทำ Dot blot-Hybridization (Quick-Type ™)[37]

3.1. การเตรียม dot blot บน membrane

น้ำยาและอุปกรณ์ที่ใช้

- nylon membrane (Lifecodes # 957025; Amersham Hybond N+)
- PCR products
- 2xSSC
- denaturation solution
- membrane rinsing solution

แผนภาพที่5 แสดงผลตัวอย่างการตรวจสอบ PCR product โดยวิธี Gel electrophoresis



ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

ต้นฉบับ หน้าขาดหาย

4. นำ membrane ใส่ในถุงที่ตัดไว้แล้วเติมน้ำยา probe-hybridization solution จากข้อ 2. ปิดถุงนำไปวางใน water bath shaker 45°C นาน 30 นาที *

5. นำ membrane ออกจากถุงและใส่ในถุงที่มี 2xSSC 20 ml ปิดถุงเขย่านาน 2-3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง *

6. นำ membrane มาใส่ในถุงที่มี TMAC solution 30ml. (60°C) ปิดถุงนำไปเขย่าใน water bath shaker 60°C นาน 20 นาที *

7. นำ membrane มาใส่ในถุงที่มี 2xSSC ปิดถุงตั้งทิ้งไว้นาน 2-3 นาทีที่อุณหภูมิห้อง *

8. นำ membrane แต่ละแผ่นแช่ใน 1×QUICK-LIGHT Buffer 40 ml. เขย่านาน 1 นาที เท 1×QUICK-LIGHT Buffer ทิ้ง และทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง

9. นำ membrane มาวางบน folder รีดน้ำออกให้หมด นำไปพ่นด้วย Lumiphos® sprayใน ห้องมืด รีดฟองอากาศออกให้หมดและ ปิดผนึก folder โดยรอบโดยใช้ heat seal

10. นำแผ่น membrane ไปใส่ใน X-ray film casette โดยให้ด้านที่มี DNA หันเข้าหาฟิล์ม ทิ้งไว้นาน 5-30 นาที ที่ตู้อบ 37°C จึงนำฟิล์มไปล้าง จะได้ membrane ดังตัวอย่างแผนภาพที่7 และอ่านผล hybridization ของแต่ละคน (ตามแผนภาพที่8) ออกมาเป็น HLA-DR4 subtype ชนิดต่างๆ โดยนำไปเทียบกับแผนภาพที่9 ซึ่งแสดง HLA-DR4 subtype ที่ให้ผลบวกกับ probe ชนิดต่างๆ

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1 การสรุปข้อมูล(Summarization of Data)

1. ข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับ อายุ เพศ ของคนปกติและของผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์
2. HLA-DR4 subtype ชนิดต่างๆในผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ และของคนปกติ
3. หาความสัมพันธ์ระหว่าง HLA-DR4 subtype กับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

2 การนำเสนอข้อมูล(Data Presentation)

เสนอในรูปแบบตาราง และแผนภาพตามความเหมาะสม

3 การทดสอบสมมติฐาน(Hypothesis testing)

ใช้ Chi-square test ทดสอบว่า HLA-DR4 subtype ชนิดต่างๆมีความสัมพันธ์กับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์หรือไม่

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

เนื่องจากการศึกษานี้มีแต่การเก็บตัวอย่างจากเลือดเท่านั้นจึงไม่มีปัญหาทางด้านจริยธรรม

ข้อจำกัดในการวิจัย (Limitation)

อาจมี HLA-DR subtype ตัวอื่นนอกเหนือจาก HLA-DRB1*0401-0410 ที่มีความสัมพันธ์กับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ แต่ไม่สามารถนำมาศึกษาได้เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับเรื่องงบประมาณ

ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefits and Application)

1.ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายความถี่ของ HLA-DR4 subtype ต่างๆทั้ง 10 ชนิดของคนไทยปกติ

2.ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายความถี่ของ HLA-DR4 subtype ต่างๆทั้ง 10 ชนิดของผู้ป่วยไทยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

3.ศึกษาความสัมพันธ์ของโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ กับ HLA-DR4 subtype แต่ละชนิด (HLA-DRB1*0401-0410)

อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to solve the problems)

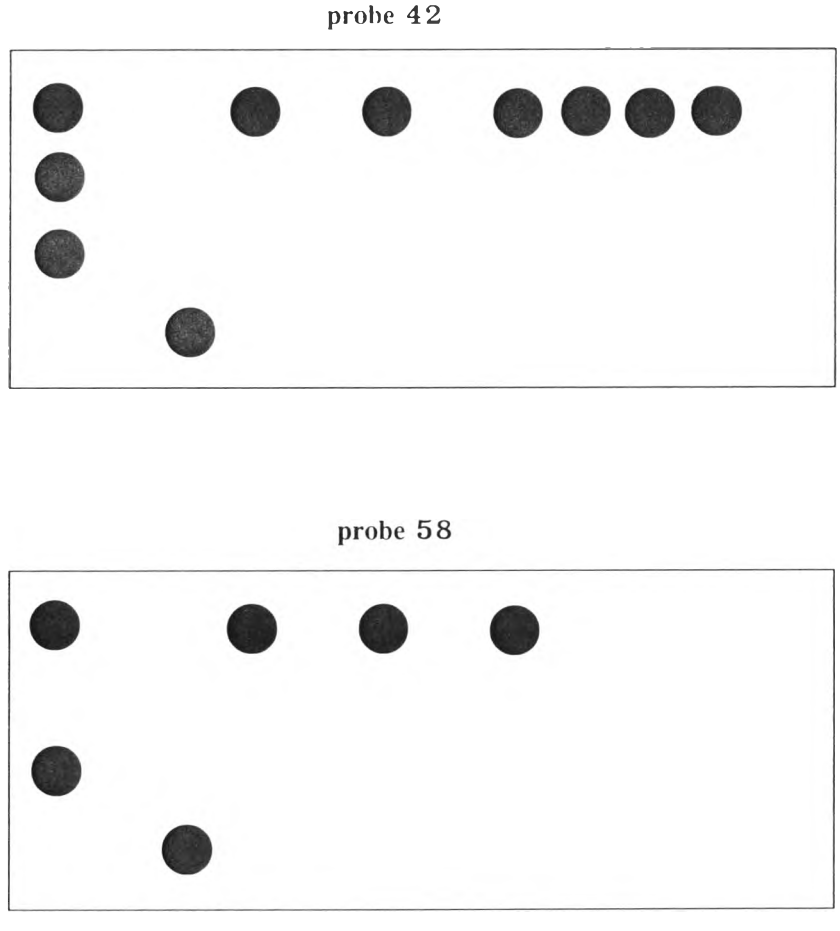
เนื่องจาก ผู้ป่วยที่เคยตรวจพบ HLA-DR4 จากการวิจัยเรื่อง"การศึกษาแอนติเจนของระบบ HLA ในผู้ป่วยไทยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์"ประมาณ 7-8 ปีที่ผ่านมา โดย รศ.พญ. ปรียาจิต เจริญวงศ์ และคณะ [13] บางรายอาจขาดการติดตามการรักษาผลทำให้ได้ผู้ป่วยไม่ครบ 40 ราย

การแก้ไขคือ เขียนจดหมายตามหรือติดต่อกับผู้ป่วยทางโทรศัพท์ในรายที่ขาดการติดต่อเป็นระยะเวลานาน

การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

1.หาข้อมูลและทบทวนวรรณกรรม	พฤษภาคม ถึง มิถุนายน 2541
2.เตรียมและวางแผนการวิจัย	มิถุนายน ถึง กรกฎาคม 2541
3.เสนอโครงการเพื่อขออนุมัติ	กรกฎาคม 2541
4.เริ่มเก็บรวบรวมข้อมูลและทำการวิจัย	สิงหาคม 2541 ถึง มกราคม 2542
5.วิเคราะห์ข้อมูลจากผลการทดลอง	กุมภาพันธ์ ถึง มีนาคม 2542
6.สรุปและรายงานผล	เมษายน 2542

แผนภาพที่7 ภาพวาดแสดงตัวอย่างแผ่น membrane ที่ให้ผลบวกหลัง hybridization ด้วย probe 42 และ Probe 58



แผนภาพที่8 แสดงผล Hybridization

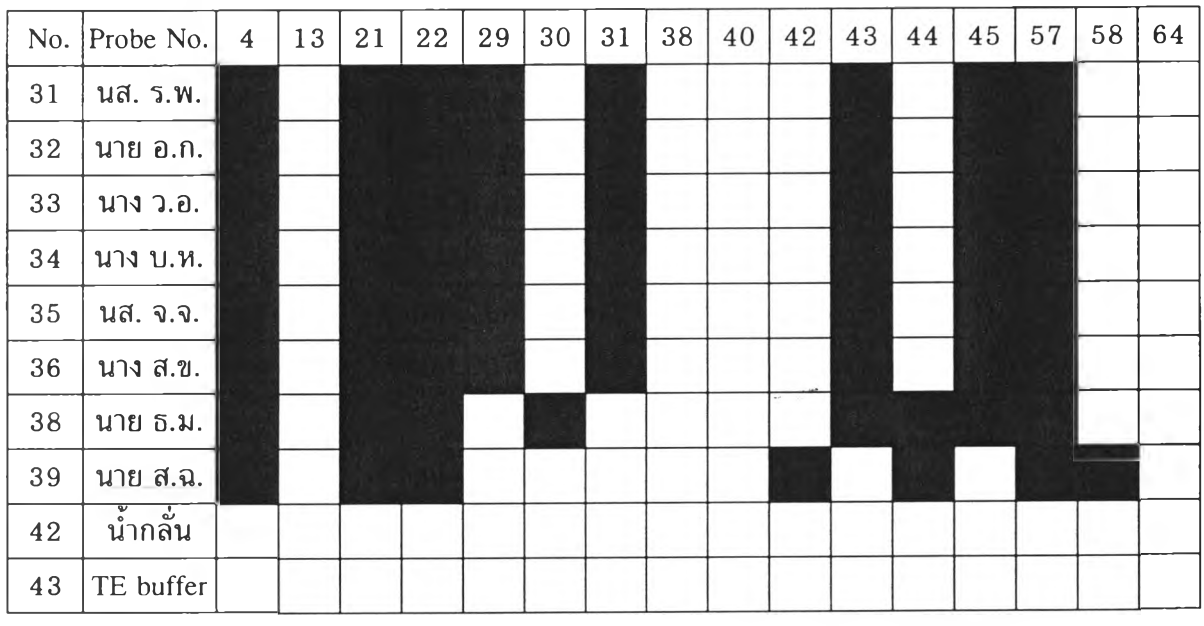
No.	Probe No.	4	13	21	22	29	30	31	38	40	42	43	44	45	57	58	64
1	นาย บ.พ.	■		■	■		■				■		■		■	■	
2	นส. พ.น.	■		■	■		■				■		■	■	■		
3	นาย ธ.ศ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
4	นาง ศ.จ.	■		■	■		■				■		■		■	■	
5	นาง ส.จ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
6	นาง อ.จ.	■		■	■		■				■		■		■	■	
7	นาย ค.จ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
8	นาง ส.ส.	■		■	■		■				■		■		■	■	
9	นส. อ.ก.	■		■	■		■				■		■	■	■		
10	นาย ม.ส.	■		■	■		■				■		■	■	■		
11	นาง ภ.ส.	■		■	■		■				■		■	■	■		
12	นาย ธ.อ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
13	นาง ก.ข.	■		■	■		■				■		■	■	■		
14	นาย ท.ท.	■		■	■	■		■				■		■	■		
15	นาง ส.ส.	■			■			■	■				■	■	■		
17	นาย ช.ม.	■		■	■	■		■				■		■	■		
18	นาง ก.อ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
19	นาย ป.ป.	■		■	■	■		■				■		■	■		
20	นาง อ.ก.	■		■	■	■		■				■		■	■		
21	นาง จ.อ.	■		■	■	■		■				■		■	■		
22	นาง ฉ.ส.	■		■	■	■		■				■		■	■		
23	นาง ร.ห.	■		■	■	■		■				■		■	■		
24	นาง บ.ส.	■		■	■		■					■	■	■	■		
25	นาง ส.ก.	■		■	■		■				■		■		■	■	
26	นาง น.ว.	■		■	■	■		■				■		■	■		
27	นาง ว.ก.	■		■	■	■		■				■		■	■		
28	นาง ป.ป.	■		■	■	■		■				■		■	■		
30	นาง ส.ช.	■		■	■	■		■				■		■	■		

รายชื่อที่ขีดเส้นใต้หมายถึง คนปกติ

รายชื่อที่ไม่ได้ขีดเส้นใต้หมายถึง ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

I 19336330

แผนภาพที่8 แสดงผล Hybridization

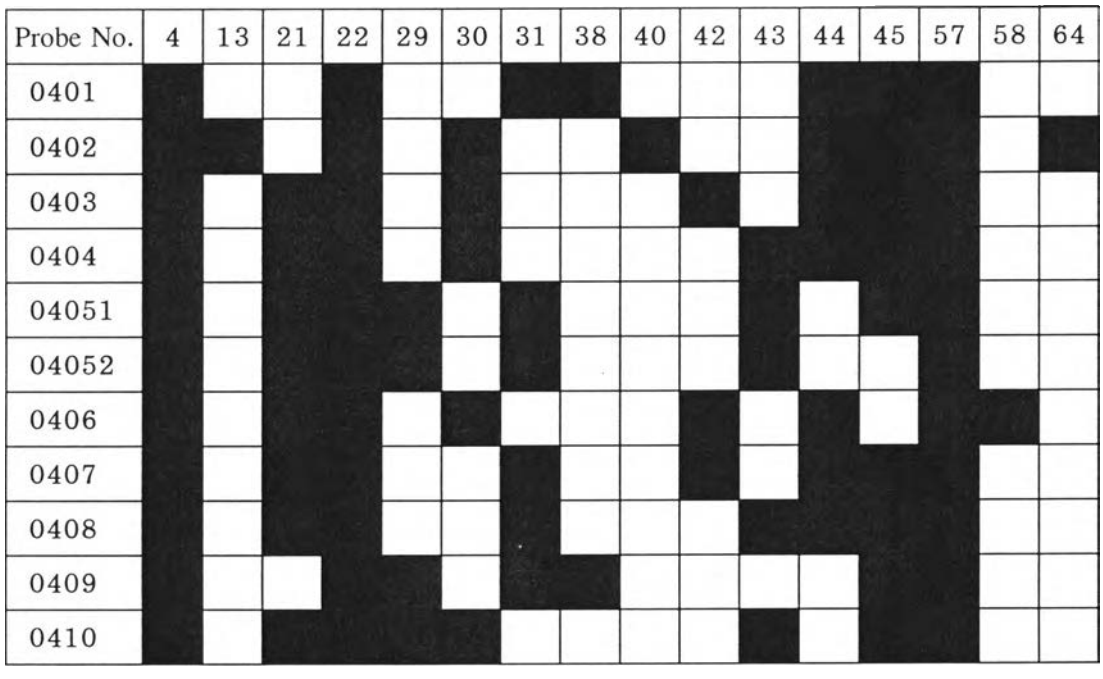


No.	Probe No.	4	13	21	22	29	30	31	38	40	42	43	44	45	57	58	64
31	นส. ร.พ.																
32	นาย อ.ก.																
33	นาง ว.อ.																
34	นาง บ.ห.																
35	นส. จ.จ.																
36	นาง ส.ข.																
38	นาย ธ.ม.																
39	นาย ส.ฉ.																
42	น้ำกลั่น																
43	TE buffer																

รายชื่อที่ขีดเส้นใต้หมายถึง คนปกติ

รายชื่อที่ไม่ได้ขีดเส้นใต้หมายถึง ผู้ป่วยโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์

แผนภาพที่9 แสดง HLA-DR4 subtype ที่ให้ผลบวกกับ Probe ชนิดต่าง ๆ



Probe No.	4	13	21	22	29	30	31	38	40	42	43	44	45	57	58	64
0401	■			■			■	■				■	■	■		
0402	■	■		■		■			■			■	■	■		■
0403	■		■	■		■				■		■	■	■		
0404	■		■	■		■					■	■	■	■		
04051	■		■	■	■		■				■		■	■		
04052	■		■	■	■		■				■			■		
0406	■		■	■		■				■		■		■	■	
0407	■		■	■			■			■		■	■	■		
0408	■		■	■			■				■	■	■	■		
0409	■			■	■		■	■					■	■		
0410	■		■	■	■	■					■		■	■		