บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิเคราะห์โครโมโซมและคาริโอไทพ์

ทำการวิจัยกับผู้ป่วยโรคมะเร็งปากมดลูกจำนวน 10 คน ที่มารับการรักษา ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการรักษาด้วยการฉายรังสีแกมม่าจากธาตุโคบอลท์ 60 รวม 20 ครั้ง (อาทิตย์ละ 5 ครั้ง) และได้รับรังสีทั้งหมด 4,000 rads. โดยผิวหนังของผู้ป่วยทุกคนอยู่ห่างจากแหล่งกำเนิดรังสี (skin source distance) 80 เซนติเมตร

ผู้ป่วยรายแรก เป็นหญิงไทยอายุ 36 ปี มีบุตรมาแล้ว 4 คน ต่อมาได้แท้งบุตรคนที่ 5

ผู้ป่วยรายที่สอง เป็นหญิงไทยอายุ 38 ปี มีบุตรทั้งหมด 6 คน

ผู้ป่วยรายที่สาม เป็นหญิงไทยอายุ 25 ปี มีบุตร 1 คน

ผู้ป่วยรายที่สี่ เป็นหญิงไทยอายุ 30 ปี มีบุตรทั้งหมด 4 คน

ผู้ป่วยรายที่ห้า เป็นหญิงไทยอายุ 34 ปี มีบุตรทั้งหมด 3 คน

ผู้ป่วยรายที่หก เป็นหญิงไทยอายุ 32 ปี มีบุตรทั้งหมด 3 คน

ผู้ป่วยรายที่เจ็ด เป็นหญิงไทยอายุ 40 ปี มีบุตรทั้งหมด 6 คน

ผู้ป่วยรายที่แปด เป็นหญิงไทยอายุ 37 ปี มีบุตรทั้งหมด 5 คน

ผู้ป่วยรายที่เก้า เป็นหญิงไทยอายุ 42 ปี

ผู้ป่วยรายที่สิบ เป็นหญิงไทยอายุ 31 ปี มีบุตรทั้งหมด 3 คน

วิธีการวิเคราะห์โครโมโซม

ศึกษาโครโมโซมโดยเพาะเลี้ยงเม็ดเลือดขาวด้วยวิธี microtechnique นับโครโมโซมในระยะเมตตาเฟส โดยวิธีของ Moorhead และคณะ (1960) ดังนี้

1. ใช้ whole blood 0.2 ลบ.ซม. ใส่ในน้ำยาเพาะเลี้ยงโครโมโซม (chromosome medium 1A, lyophilized) ปริมาณ 5 ลบ.ซม. นำไปอบในตู้อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 68-72 ชั่วโมง

2. การเก็บผลและตรึงเซลล์ (harvesting and fixation) เมื่อครบ 68-72 ชม. เติม colcemid solution ความเข้มข้น 0.01 % ลงไป 1-2 หยด เก็บไว้ที่ตู้อบอุณหภูมิ 37° ซ ต่ออีก 1-2 ชม. จากนั้นนำมาปั่นด้วยเครื่องปั่น (centifuge) ที่ 700 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสๆ ส่วนบนทิ้งเหลือตะกอนเก็บไว้ เติมสารละลาย KCl 0.076 M ประมาณ 7-8 ลบ.ซม. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที ใส่น้ำยาตรึง (fixative) ที่ประกอบด้วย absolute methanol และ gracial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 ลงไป 0.5 ลบ.ซม. เสร็จแล้วนำมาปั่นที่ 700 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสๆ ส่วนบนทิ้ง เหลือตะกอนเก็บไว้ แล้วเติมน้ำยาตรึงเซลล์ลงไปอีก 6 ลบ.ซม. เขย่าให้เข้ากัน นำมาปั่นที่ 700 รอบ/นาที นาน 10 นาที เทน้ำใสส่วนบนทิ้งและทำซ้ำอีกจนครบ 3 ครั้ง จึงนำมาเตรียมสไลด์

3. การเตรียมสไลด์ หลังจากล้างเซลล์ครั้งสุดท้าย แล้วเทน้ำยาตรึงทิ้ง เขย่าให้เซลล์กระจาย เติมน้ำยาตรึงลงไปประมาณ 0.2-0.5 ลบ.ซม. นำมาหยดลงบนสไลด์ที่สะอาด แล้วนำมาเฟาไฟทิ้งสไลด์ไว้ให้แห้ง

4. การย้อมสี นำสไลด์ที่ได้จากข้อ 3 มาย้อม giemsa 2-4 % นาน 10 นาที วางสไลด์ให้แห้งในอากาศ แล้วปิดสไลด์ด้วยแผ่นแก้วปิดสไลด์

5. นำสไลด์มาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ศึกษาการหักของโครโมโซมและโครโมโซมที่มีลักษณะผิดปกติ โดยศึกษาจาก 100 เมตตาเฟสต่อคนไข้ 1 คน ในปริมาณรังสีขนาดต่างๆ และถ่ายรูปเมตตาเฟสไว้ด้วยกำลังขยาย 1,000 เท่า นำมาจัดเรียงทำคาริโอไทพ์ตาม Denver System of Nomenclature(1960)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. ศึกษาโครโมโซมในระยะเมตาเฟส 100 เซลล์ต่อคนไข้ 1 คน ในปริมาณรังสีขนาดต่างๆ ตรวจหาจำนวนโครโมโซมที่หัก และจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะผิดปกติ

2. เปรียบเทียบหาความแตกต่างของจำนวนโครโมโซมที่หัก และจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะผิดปกติจากผู้ป่วยที่ได้รับการรักษาโรคด้วยรังสีในปริมาณต่างๆ ระหว่างปริมาณรังสีที่คนไข้ได้รับในการรักษาด้วยการทดสอบ -เอฟ (F-test)

3. หาสหสัมพันธ์ (correlation) ระหว่างปริมาณรังสีแต่ละขนาดที่คนไข้ได้รับกับ จำนวนโครโมโซมที่หัก และจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะผิดปกติ และหาสมการรีเกรชชั่น (regression)