สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization

นาย ชยพล สมบูรณ์ยศเดช
นาย ณัฐพล วชิรโรจน์
นางสาว วลัยพัชร วงศ์ชัยศรี

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67291
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2549
b 11616421
i.....

โครงงานพิเศษเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Detection of Genetic Abnormality in Urinary Bladder Cancer Tissue by Fluorescence *in situ* Hybridization Technique

Chayapol Somboonyosdech

Nuttapon Vachiraroj

Waraipat Vongchaisri

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization

นักศึกษา นาย ชยพล สมบูรณ์ยศเดช รหัสประจำตัว 45050185

นาย ณัฐพล วชิรโรจน์ รหัสประจำตัว 45050198

นางสาว วลัยพัชร วงศ์ชัยศรี รหัสประจำตัว 45050235

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

.....

(รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization

นักศึกษา นาย ชยพล สมบูรณ์ยศเดช
นาย ณัฐพล วชิรโรจน์
นางสาว วลัยพัชร วงศ์ชัยศรี

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

บทคัดย่อ

ในประเทศไทย โรคมะเร็งนั้นเป็นสาเหตุการตายเป็นอันดับ 3 รองลงมาจากโรคหัวใจและอุบัติเหตุ ซึ่งโรคมะเร็งที่พบได้บ่อยเป็นอันดับ 5 ในเพศชาย คือ มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ การศึกษาเกี่ยวกับความผิดปกติทางโครโมโซมในระดับพันธุศาสตร์โมเลกุลของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในครั้งนี้ ได้ทำการตรวจสอบความผิดปกติโดยใช้เทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization ในผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ใช้ตัวติดตามบนตำแหน่งของโครโมโซม X และ Y ซึ่งจากการตรวจสอบพบความผิดปกติของโครโมโซมได้หลายรูปแบบ โดยพบว่ามีการขาดหายไปของโครโมโซม Y เป็นเปอร์เซ็นต์ที่พบมากที่สุด เฉลี่ยร้อยละ 48.84 ซึ่งเป็นอัตราที่สูงกว่าคนปกติ (ซึ่งมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 3.1) ดังนั้นสามารถนำเทคนิคนี้มาประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบโอกาสการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะกับผู้ป่วยเพศชายในอนาคตได้ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาถึงตำแหน่งต่าง ๆ ให้มากขึ้นเพื่อความแม่นยำในการวินิจฉัยในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Detection of Genetic Abnormality in Urinary Bladder Cancer Tissue by Fluorescence *in situ* Hybridization Technique
Name	Chayapol Somboonyosdech
	Nuttapon Vachiraroj
	Waraipat Vongchaisri
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Dr. Supattar Poeaim
Special Project Co-Advisor	Dr. Anurug Poeaim

ABSTRACT

In Thailand, cancer is the cause of death of many people at the third. First and second in heart disease and accident. Almost cancer that had been found in male at fifth is bladder cancer. Studying about abnormality of chromosome at the cause of bladder cancer observe by Fluorescence *in situ* Hybridization technique with chromosome X and Y probe in four patient. By experiment found various abnormality chromosome. The most that found was deletion of chromosome Y at 48.84% in high level about 3.1% of normal people. Thus, this technique in experiment can apply to detection the risk of bladder cancer in male in the future. However, should study the positions on several chromosomes for precise diagnosis in the future.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ถูกจัดทำขึ้นเพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และโครงงานพิเศษนี้จะสำเร็จลงไม่ได้หากขาดซึ่งความกรุณาจาก ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ และ ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ให้ความรู้และคำแนะนำที่มีประโยชน์ตลอดทั้งความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาของอาจารย์เป็นอย่างสูง จึงขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ประธานกรรมการคุมสอบโครงงานพิเศษ ที่ได้สละเวลาอันมีค่าเพื่อคุมสอบโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้ง คำแนะนำต่างๆที่มีประโยชน์แก่ข้าพเจ้า เป็นผลให้โครงงานพิเศษฉบับนี้มีความสมบูรณ์แบบมากขึ้น

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน เจ้าหน้าที่ห้องธุรการ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีส่วนเกี่ยวข้องในโครงงานพิเศษนี้ ตลอดทั้งเพื่อนๆนักศึกษาปริญญาตรีทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆเป็นอย่างดีเสมอมา ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างราบรื่นและมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายนี้ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัว ที่ให้คำแนะนำในการทำงานที่มีคุณค่าและมีประโยชน์อย่างมาก ตลอดทั้งกำลังใจที่มอบให้ด้วยดีตลอดมา

ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์ที่พึงจะได้รับจากโครงงานพิเศษฉบับนี้แก่ผู้มีพระคุณทุกท่าน

นาย ชยพล สมบูรณ์ยศเดช
นาย ณัฐพล วชิรโรจน์
นางสาว วลัยพัชร วงศ์ชัยศรี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I
บดคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II
กิตติกรรมประกาศ.....III
สารบัญ.....IV
สารบัญตาราง.....V
สารบัญรูป.....VI
บทที่ I บทนำ.....1
I.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ.....2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ.....2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ.....3
2.1 มะเร็ง.....3
2.2 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....5
2.3 วิธีการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....8
2.4 Fluorescence *in situ* Hybridization.....9
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....13
3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี.....13
3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ.....17
3.3 วิธีการทดลอง.....17
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล.....28
4.1 การเตรียมสไลด์.....28
4.2 การเตรียมตัวติดตาม.....29
4.3 การตรวจสอบด้วยเทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization.....31
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ.....36
เอกสารอ้างอิง.....37

ภาคผนวก.....40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 แสดงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปเตรียมตัวติดตาม.....18

2 แสดงสารเคมีที่ใช้ทำ Nick translation ด้วย Conventional method.....21

3 แสดงสารเคมีที่ใช้ทำ Nick translation ด้วยชุดสำเร็จรูปของ Vysis.....22

4 แสดงผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

1 โครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะ.....6

2 เยื่อบุภายในกระเพาะปัสสาวะ.....7

3 เทคนิค Comparative Genomic Hybidization (CGH).....9

4 เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH).....11

5 ใช้ตัวติดตามตรวจสอบโครโมโซมคู่ที่ 9 (ติดสีแดง) และ 17 (ติดสีเขียว).....12

6 เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากกล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast (10 เท่า).....29

7 แสดงขนาดของแถบตัวติดตามที่ทำด้วยวิธี Conventional.....30

8 แสดงรูปของเซลล์ที่ทำการย้อมด้วย DAPI.....31

9 แสดงเซลล์กระพุ้งแก้มของคนปกติเพศชายที่ทำการไฮบริไดซ์.....32

10 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ
ของโครโมโซม X ที่เกินมา.....33

11 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ
ของการขาดหายไปของโครโมโซม Y.....33

12 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ
ของการขาดหายไปของโครโมโซม X.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันในประเทศไทยโรคมะเร็งจัดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตมากเป็นอันดับ 3 รองจากโรคหัวใจ และอุบัติเหตุ โดยโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะพบได้มากเป็นอันดับ 5 ในเพศชายโดยมีโอกาสเกิดขึ้น 5.2 ต่อประชากรหนึ่งแสนคน โดยมีอุบัติการณ์ต่ำกว่าประเทศทางตะวันตก (สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2536) ซึ่งเชื่อว่าเป็นผลมาจากปัจจัยทั้งด้านสิ่งแวดล้อม (การสูบบุหรี่ สารเคมี และการติดเชื้อ) และพันธุกรรม

การเกิดมะเร็งเป็นขบวนการที่เกิดจากความผิดปกติระดับพันธุกรรม ที่มีการเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอนโดยยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคมะเร็งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ oncogene คือ ยีนที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง และ tumor suppressor gene คือ ยีนที่ป้องกันการเกิดโรคมะเร็ง ถ้ายีนกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งหรือทั้ง 2 กลุ่ม เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจะส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ซึ่งโดยความผิดปกติที่พบโดยส่วนใหญ่ oncogene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการเพิ่มจำนวนชุดของลำดับดีเอ็นเอ (amplification) และยีนในกลุ่ม tumor suppressor gene จะมีความผิดปกติชนิดที่มีการขาดหายไปของลำดับดีเอ็นเอ (deletion) มีผลทำให้เกิดความไม่สมดุลในจีโนม เป็นสาเหตุหนึ่งในการเกิดโรคมะเร็งได้

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในมะเร็งสามารถศึกษาได้หลายเทคนิค เช่น Polymerase Chain Reaction (PCR), G-Banding และ Karyotype, Comparative Genomic Hybridization (CGH) และ Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH) เป็นต้น โดยเทคนิค FISH เป็นเทคนิคในการหาช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (genetic mapping) เป็นงานด้านอิมมูโนวิทยาร่วมกับด้าน *in situ* hybridization และตรวจหาสัญญาณตำแหน่งยีนโดยใช้สารสีเรืองแสง (fluorecein หรือ fluorophore) การตรวจด้วยวิธี FISH เป็นการตรวจวิเคราะห์ที่สามารถทำได้รวดเร็วและมีความแม่นยำสูง มีประโยชน์ในการวินิจฉัยทางคลินิคหลายด้าน เนื่องจากการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธี FISH สามารถตรวจหาความผิดปกติของโครโมโซมที่มีขนาดเล็ก ที่ไม่สามารถตรวจพบด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้ ปัจจุบันจึงใช้ประโยชน์ในการตรวจยืนยัน microdeletion syndrome ต่างๆ การตรวจด้วยวิธี FISH สามารถทำได้ทั้งในระยะอินเตอร์เฟส (interphase) และ เมทาเฟส (metaphase) (อมรา, 2540)

เทคนิค FISH ถูกนำมาศึกษาในตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งหลายชนิด รวมทั้งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ เช่น Stamouli และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมเนื้อเยื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 32 ตัวอย่าง พบว่า ในกลุ่มของผู้ป่วยที่เป็นเพศชาย จะมีการขาดหายไปของโครโมโซม Y และโครโมโซม X เพิ่มมากขึ้นกว่าปกติ แต่ในรายที่ผู้ป่วยเป็นเพศหญิง กลับพบว่าโครโมโซม X มีจำนวนโครโมโซมปกติ นอกจากมีความผิดปกติของโครโมโซมเพศแล้วยังพบความผิดปกติของโครโมโซมอื่นๆ ดังเช่น Slovak และคณะ (2001) ได้ศึกษาโดยใช้เทคนิค S-FISH (Spectral Fluorescence *in situ* Hybridization) โดยตรวจสอบกับผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ พบความผิดปกติของโครโมโซมที่ 7, 8, 9, 10, X และ Y และ Zenon และคณะ (1997) ได้ศึกษาผู้ป่วยในอเมริกาเหนือ และยุโรป โดยประมาณ 50 ตัวอย่าง โดยใช้เทคนิค CGH พบว่า มีการเพิ่มปริมาณของสารพันธุกรรมอย่างมาก (Amplification) ที่ตำแหน่ง 1p, 1q, 3p, 8q, 10p, 12p, 13q, 17q, 18p และ 22q

สำหรับประเทศไทย สุพัตรา และคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติทางพันธุกรรมของเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยเทคนิค CGH พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอบนโครโมโซมตำแหน่งที่ 1q, 8p, 9q และ 22q และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมแท่งที่ 9 และ Y โดยความผิดปกติของโครโมโซม Y ในมะเร็งชนิดที่ไม่ลุกลามพบความผิดปกติ 25% และในมะเร็งที่ลุกลามพบความผิดปกติ 36.36%

ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมของโครโมโซม Y ซึ่งพบการขาดหายไปได้บ่อย ด้วยเทคนิคอื่นๆ โดยเฉพาะเทคนิค FISH ในกลุ่มผู้ป่วยคนไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อตรวจสอบความผิดปกติทางพันธุกรรมของโครโมโซม X และ Y ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
2. เพื่อพัฒนาตัวติดตามที่เตรียมขึ้นเอง ที่ใช้กับเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization
3. เพื่อเรียนรู้และพัฒนาทักษะกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ ตลอดจนพัฒนาเจตคติที่ดีของการเป็นนักวิทยาศาสตร์

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาจากตัวติดตามที่มีตำแหน่งของโครโมโซม X และ Y โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization ในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของคนไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 มะเร็ง (cancer)

มะเร็งเป็นกลุ่มของโรคที่ประกอบด้วยเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วผิดปกติหลุดออกไปจากการควบคุมของร่างกายเซลล์ที่ผิดปกตินี้จะไม่ตาย แต่เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วจนเป็นก้อนหรือแตกเป็นแผล และมีความสามารถในการเบียดตัวหรือแทรกแซงไปยังอวัยวะข้างเคียงที่ปกติหรือสามารถกระจายไปตามส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น กระจายไปตามกระแสเลือดหรือทางเดินน้ำเหลือง พร้อมกับมีความสามารถฝังตัวและเจริญเติบโตที่อวัยวะใดของร่างกายได้ หากอวัยวะนั้นเป็นอวัยวะที่สำคัญ เช่น ปอด ตับ สมอง หัวใจ ผู้ป่วยก็จะมีชีวิตอยู่รอดไม่นาน ปัจจุบันได้มีการศึกษาเรื่องราวต่าง ๆ ของโรคมะเร็งละเอียดมากขึ้นจนถึงระดับของสารพันธุกรรม ทำให้ทราบถึงความผิดปกติพื้นฐานที่สำคัญคือ การทำงานของยีนหรือสารพันธุกรรมมีความผิดปกติ โดยเฉพาะส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัว การเจริญเติบโตของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และพฤติกรรมต่าง ๆ ของเซลล์มะเร็ง เช่น ความสามารถในการกระจายและฝังตัว เป็นต้น มะเร็งเป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีหลายขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 เรียกว่าขั้นตอนเริ่มต้น (Initiation) โดยที่สารพันธุกรรมได้รับสารก่อมะเร็งหรือขบวนการอื่น ๆ ที่ทำลายหน้าที่ปกติของสารพันธุกรรม ขบวนการดังกล่าวนี้เกิดอยู่ตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 2 เรียกว่าขั้นตอนส่งเสริม (Promotion) โดยจะส่งเสริมให้สารพันธุกรรมมีความผิดปกติมากขึ้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 3 เรียกว่าขั้นตอนเปลี่ยนแปลงเป็นโรคมะเร็ง (Conversion) หากไม่ได้รับการตรวจค้นหามะเร็งระยะแรกเริ่ม และไม่ได้รับการรักษา ขบวนการเกิดโรคมะเร็งจะดำเนินต่อไปตลอดเวลา

ขั้นตอนที่ 4 เรียกว่าขั้นตอนแพร่กระจาย หรือลุกลามของโรคมะเร็ง (Progression) เซลล์มะเร็งจากต้นกำเนิดกระจายไปที่เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะข้างเคียง หรือกระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยผ่านทางทางเดินน้ำเหลืองหรือกระแสเลือด และฝังตัวในอวัยวะต่าง ๆ พร้อมกับทำให้การทำงานของอวัยวะที่สำคัญของร่างกายล้มเหลว อันเป็นผลให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งถึงแก่ชีวิตในที่สุด ซึ่งผู้ป่วยโรคมะเร็ง ส่วนมากในประเทศไทย หรือประเทศที่ด้อยพัฒนา จะมาพบแพทย์เพื่อขอรับการรักษาเมื่อเป็นมะเร็งในระยะสุดท้าย (http://www.chulacancer.net/p0000027_3.htm)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งในประเทศไทย

ในปี พ.ศ. 2536 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยมะเร็งในเพศชาย 10 อันดับแรก คือ มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งเม็ดเลือดขาว, มะเร็งต่อมน้ำเหลือง, มะเร็งหลังโพรงจมูก, มะเร็งหลอดอาหาร

ในเพศหญิง 10 อันดับแรก มะเร็งปากมดลูก, มะเร็งเต้านม, มะเร็งตับ, มะเร็งปอด, มะเร็งลำไส้ใหญ่, มะเร็งรังไข่, มะเร็งช่องปาก, มะเร็งต่อมทัยรอยด์, มะเร็งกระเพาะอาหาร, มะเร็งปากมดลูก (http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm)

2.1.2 สาเหตุของโรคมะเร็ง

สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง แบ่งออกเป็น 2 ประเภทที่สำคัญ คือ

1. เกิดจากสิ่งแวดล้อมหรือภายนอกร่างกาย ซึ่งปัจจุบันนี้เชื่อกันว่ามะเร็ง ส่วน ใหญ่ เกิดจากสาเหตุได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม เช่น สารพิษจาก เชื้อรา ที่มีชื่อ อัลฟาทอกซิน (alfatoxin) สารก่อมะเร็งที่เกิดจากการปิ้ง ย่าง พวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) สารเคมีที่ใช้ในขบวนการถนอม อาหาร ชื่อไนโตรซามิน (nitosamine) สีผสมอาหารที่มาจากสีย้อมผ้า รังสีเอ็กซเรย์ อุลตราไวโอเลตจากแสงแดด เชื้อไวรัส ไวรัสตับอักเสบบี ไวรัสฮิวแมนแพบพิลโลมา การติดเชื้อพยาธิใบไม้ในตับ จากพฤติกรรมบางอย่าง เช่น การสูบบุหรี่และดื่มสุรา เป็นต้น

2. เกิดจากความผิดปกติภายในร่างกาย ซึ่งมีเป็นส่วนน้อย เช่น เด็กที่มีความพิการมาแต่กำเนิดมีโอกาสเป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น การมีภูมิคุ้มกันที่บกพร่อง ภาวะทุพโภชนาการ เช่น การขาดวิตามินบางชนิด เช่น วิตามินเอ และ วิตามินซี เป็นต้น และความผิดปกติทางพันธุกรรม (http://www.thailabonline.com/sec7castat.htm)

2.1.3 ยีนที่ก่อให้เกิดโรคมะเร็ง

1) ยีนก่อมะเร็ง (proto-oncogene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้จะแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนหยุดแสดงออกเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว ดังนั้นหากเกิดการกลายพันธุ์จนยีนแสดงออกมาตลอดเวลา เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด oncogene เป็นยีนกลุ่มแรก ๆที่พบว่าเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็ง ยีนนี้พบครั้งแรกในไวรัสก่อมะเร็ง ตัวอย่างของไวรัสพวกนี้คือ rous sarcoma virus (RSV) เมื่อเข้าไปในเซลล์แล้วจะใช้เอนไซม์ reverse transcriptase สร้างดีเอ็นเอขึ้นจากอาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอนี้เรียกว่า provirus สามารถแทรกตัวเข้ากับดีเอ็นเอของเซลล์เจ้าบ้านแล้วทำให้เซลล์เปลี่ยนเป็นเซลล์มะเร็งได้ ในธรรมชาติพบ RSV สองกลุ่มคือกลุ่มที่ไม่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า non acute virus กับกลุ่มที่ทำให้เซลล์เป็นมะเร็งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียกว่า acute transforming virus จีโนมของไวรัสพวก acute transforming virus มียีนที่แตกต่างจากพวก non acute virus มี 1 ยีนที่ทำให้เซลล์ปกติเป็นเซลล์มะเร็งได้ เรียกว่า viral oncogene หรือ v-oncogene เมื่อศึกษาลึกลงไปพบว่า v-oncogene มีลักษณะคล้ายกับ proto-oncogene มาก มีเพียงบางส่วนที่แตกต่างกันออกไป เชื่อกันว่า v-oncogene นี้มาจาก proto oncogene ซึ่งกลายพันธุ์แล้ว ไวรัสนำออกจากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง proto-oncogene ที่กลายพันธุ์อยู่ในเซลล์แล้วทำให้เซลล์เป็นมะเร็งเรียกว่า cellular oncogene กลไกการเปลี่ยนจาก proto-oncogene เป็น oncogene นั้นเกิดขึ้นได้หลายแบบ เช่น การแสดงออกของยีนที่มากเกินไป สืบเนื่องจากการแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิดโปรโมเตอร์ใหม่ การแทรกเข้ามาของไวรัสทำให้เกิด enhancer รวมทั้งการเพิ่มจำนวนมาก ๆ ของ proto-oncogene เป็นต้น

2) ยีนต้านมะเร็ง (tumor suppressor gene) เป็นยีนที่ทำงานโดยการยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยีนกลุ่มนี้มีลักษณะการทำงานที่สำคัญคือ ยีนจะหยุดการแสดงออกเพื่อให้มีการแบ่งเซลล์ และเมื่อใดก็ตามที่ยีนทำงานเซลล์จะหยุดการแบ่งตัว เมื่อใดก็ตามที่ยีนกลุ่มนี้สูญเสียหน้าที่ ไม่สามารถแสดงออกได้ เซลล์จะแบ่งตัวโดยไม่มีที่สิ้นสุด ตัวอย่างของยีนในกลุ่มนี้คือ ยีน *p53* โดย ยีน *p53* เป็น tumor suppressor gene ยีนหนึ่งซึ่งสร้าง transcription factor จะแสดงออกเมื่อเซลล์ถูกแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งอาจทำให้ดีเอนเอเกิดความเสียหายได้ ยีน *p53* จะทำงานโดยหยุดเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหาย ก่อนที่จะปล่อยให้เซลล์เข้าสู่ระยะ S ซึ่งมีการสังเคราะห์ดีเอนเอใหม่ ในภาวะที่เซลล์ขาด *p53* เซลล์ไม่สามารถหยุดการแบ่งเซลล์ไว้ที่ระยะ G1 เพื่อซ่อมแซมดีเอนเอที่เสียหายก่อนที่จะเข้าสู่ระยะ S ซึ่งใช้ดีเอ็นเอที่แตกหักเสียหายนั้นเป็นต้นแบบในการสร้างดีเอนเอใหม่ ส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์มากขึ้น ในกรณีที่ดีเอ็นเอแตกหักเสียหายจนไม่อาจซ่อมแซมให้กลับดังเดิมได้ p53 จะกำหนดให้เซลล์ตาย (apoptosis) (Vogelstein และ Kinzler, 1992) (http://dpc6.ddc.moph.go.th/knowledge/cancer.pdf)

2.2 มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

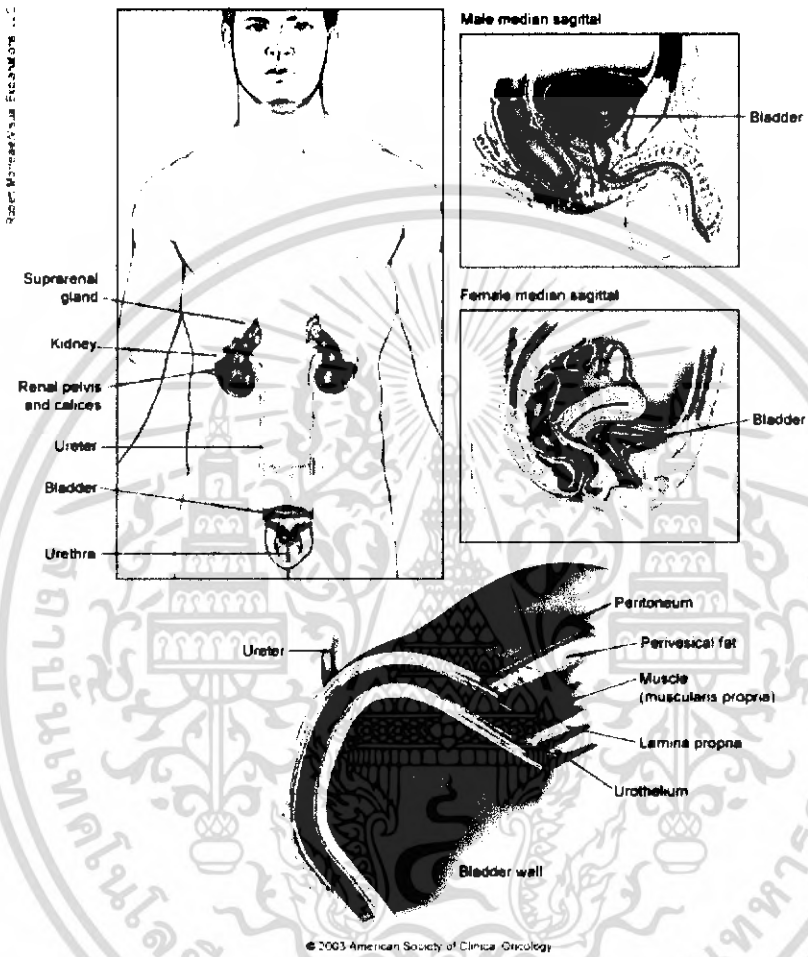
เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในระบบอวัยวะขับถ่ายและอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศชาย โดยโครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะดังรูปที่ 1 จะมีลักษณะเป็นถุงสำหรับเก็บน้ำปัสสาวะมีตำแหน่ง อยู่ที่ในช่องท้องระดับ หัวเหน่า กระเพาะปัสสาวะจะมีหน้าที่รับน้ำปัสสาวะที่ไตกรองออกมาจากกระแสเลือดแล้วส่งผ่านลงมาทางท่อไตลงมาเก็บในกระเพาะปัสสาวะ เมื่อมีปริมาณน้ำปัสสาวะมากพอสมควรกระเพาะปัสสาวะจะขับน้ำปัสสาวะออกทิ้งทางท่อปัสสาวะต่อไป

มะเร็งของกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่เกิดขึ้นมาจากเยื่อบุภายในกระเพาะปัสสาวะดังรูปที่ 2 มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติจนกลายเป็นก้อนเนื้องอกขึ้นมา ก้อนเนื้อที่งอกขึ้นมานี้จะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญเติบโตขึ้นมาเรื่อย ๆ จนอาจโตเต็มกระเพาะปัสสาวะ และแผ่ขยายลุกลามออกไปยังอวัยวะข้างเคียงและต่อมน้ำเหลืองที่อยู่ใกล้ชิดได้ถ้าหากไม่ได้รับการรักษาให้ถูกต้อง

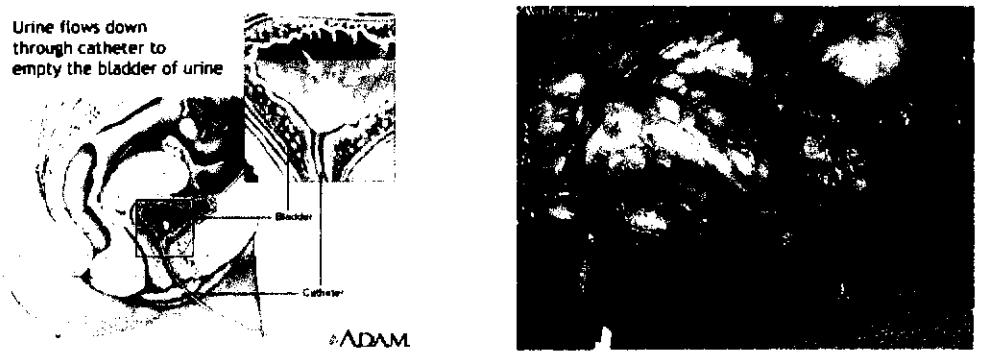
(http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor)



รูปที่ 1 โครงสร้างของกระเพาะปัสสาวะ

ที่มา: http://www.plwc.org/plwc/MainConstructor

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 เยื่อบุภายในกระเพาะปัสสาวะ

ที่มา: http://www.webpathology.com/image.cfm?n=22&Case=56

2.2.1 อุบัติการณ์ของการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ในปี 1990 และ 1995 จะพบผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในประเทศไทยอายุโดยเฉลี่ยของผู้ป่วยจะอยู่ระหว่าง 50-70 ปี (www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html)

2.2.2 สาเหตุของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

พบในคนที่สูบบุหรี่ และผู้ที่ทำงานเกี่ยวกับสารเคมีบางชนิด เช่น สีอะนีลีน (aniline) หรือสารพวกไฮโดรคาร์บอนประเภท ß–naphthylamines, ผู้บริโภคขัณฑสกร, การติดเชื้อ *Schistosomiasis*, ผู้ป่วยที่มี metabolic defect ใน tryptophan metabolism, ยาเคมีบำบัด เช่น cyclophosphamide นอกจากนี้ มีการระคายเคืองและการอักเสบเนื่องจากก้อนนิ่วในกระเพาะปัสสาวะ ก็เป็นสาเหตุชักนำให้เกิดโรคนี้ได้ (http://dpc6.ddc.moph.go.th/knowledge/cancer.pdf)

2.2.3 อาการของโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ผู้ป่วยจะมีอาการปัสสาวะเป็นเลือด โดยไม่มีอาการเจ็บปวด ผู้ป่วยบางราย อาจมีเพียง เลือดหยดออกมาเมื่อปัสสาวะสุด บางครั้งจะมีอาการคล้ายกระเพาะปัสสาวะอักเสบ คือ ถ่ายปัสสาวะบ่อย แสบ หรือ ขัดเนื่องจากเลือดที่ออกจับตัวเป็นลิ่ม ในระยะลุกลาม จะมีอาการปวดได้มาก และบางรายมีการอุดตันของท่อไตทำให้มีอาการปวดหลังได้ด้วย

(www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html)

2.2.4 กระบวนการวินิจฉัยโรค

2.2.4.1 การวินิจฉัยที่แน่ชัดต้องอาศัย cystoscopy และ transurethral biopsy ของก้อนที่เห็นจากการส่องกล้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4.2 Urine cytology อาจจะช่วยในการวินิจฉัย แต่ไม่สามารถบอกตำแหน่งของก้อนได้อย่างชัดเจน (www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html)

2.2.5 ลักษณะทางพยาธิวิทยา

โดยส่วนใหญ่มะเร็งกระเพาะปัสสาวะมีลักษณะเป็น Transitional cell carcinoma โดยคิดเป็น 90-95% แต่สามารถพบเป็นชนิด Adenocarcinoma ได้ 3% และชนิด Squamous cell carcinoma พบได้ 3-7% (www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html)

2.2.6 การรักษาโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

แนวทางในการรักษามะเร็งกระเพาะปัสสาวะแบ่งได้ดังนี้

1) Surgery คือ การผ่าตัดเอาเนื้อร้ายออก เพื่อป้องกันการลุกลามไปยังอวัยวะอื่นๆได้

2) Radiation therapy คือ ใช้รังสีในการรักษาร่วมกับการผ่าตัด โดยอาจให้รังสีก่อนหรือหลังการผ่าตัด

3) Chemotherapy คือการใช้สารเคมีในการฆ่าเซลล์มะเร็ง (www.elibonline.com/doctors/caneer_skin.html)

2.3 วิธีการศึกษาในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

2.3.1 วิธีการศึกษาทั่วไป

เป็นการศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของเนื้อเยื่อ โดยแพทย์พยาธิวิทยาว่าผู้ป่วยมีลักษณะของเนื้อเยื่ออยู่ในระยะใด เช่น การตรวจด้วยรังสีเอ็กซ์ การใช้กล้องส่องตรวจภายในกระเพาะปัสสาวะ การนำชิ้นเนื้อไปตรวจ เป็นต้น

2.3.2วิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล

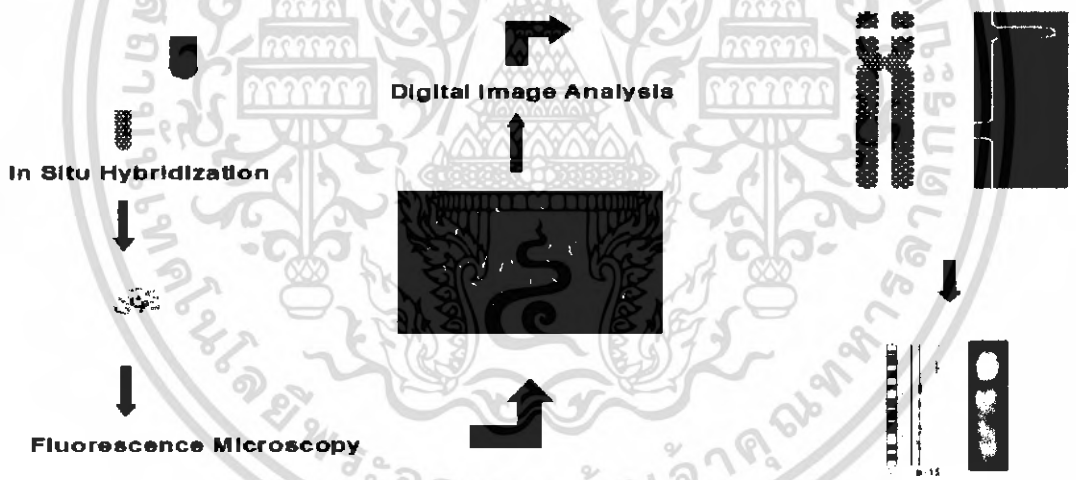
การศึกษาวิธีทางพันธุศาสตร์ระดับโมเลกุล มีหลายวิธีด้วยกัน เช่น

เทคนิค G-banding และ karyotype ในประเทศทางยุโรป Antronelli และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาตัวอย่างของผู้ป่วย 11 ตัวอย่าง พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมคู่ที่ 1, 3, 8, 18 และพบการขาดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 9, 21 และ Y

เทคนิค Polymerase chain reaction ในประเทศฟินแลนด์ Hiroaki และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วย 31 ตัวอย่าง พบความผิดปกติของยีน C-myc และ Cyelin D1 นอกจากนี้ Lisa และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยในประเทศทางตะวันตก 56 ตัวอย่างพบความผิดปกติของตำแหน่ง L-myc, D85255, RB1, D10S197, D17S197, D17S261และ D13S513

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาโดยเทคนิคทั้งสองดังที่กล่าวมาแล้วยังสามารถตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization (CGH) ดังรูปที่ 3 ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถช่วยตรวจภาพโดยรวมของความผิดปกติของยีนที่คลอบคลุมทั้งจีโนม หลักการของเทคนิค CGH คือตรวจหาตำแหน่งการเพิ่มหรือขาดหายไปของโครโมโซมใดๆ ในจีโนมของเซลล์มะเร็ง โดยใช้ความปกติของจีโนมในเซลล์ปกติเป็นหลัก โดยใช้จีโนมิกตัวติดตาม 2 ชนิด คือ control probe (เตรียมจากเซลล์ปกติ) และ tumor probe (ตัวติดตามเตรียมจากเซลล์มะเร็ง) ตัวติดตามทั้งสองติดฉลากด้วยสารปลอดรังสีที่ให้สีต่างกัน เช่น control probe ติดฉลากด้วย digoxigenin ใช้สี TRITC (tetraethyl rhodamine isothiocyanate) ซึ่งให้สีแดง และ tumor probe ติดฉลากด้วย biotin ใช้สี FITC ให้สีเขียว นำเทคนิคไฮบริไดเซชันระหว่างตัวติดตามกับดีเอ็นเอเป้าหมายบนแท่งโครโมโซมเมทาเฟสของเซลล์ปกติ โดยโครโมโซมเมทาเฟสถูกย้อมสีฟ้าไว้แล้วด้วยสี DAPI (4,6-diamidio-2-phenylindole) ตรวจดูสัญญาณสีที่เกิดจากไฮบริไดเซชันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ สีที่ปรากฏบนแท่งเมทาเฟสสามารถบอกความผิดปกติของเซลล์มะเร็งได้ถ้าปรากฏสีฟ้าแสดงว่าบริเวณที่ปรากฏจะมีปริมาณดีเอ็นเอปกติ แต่ถ้าปรากฏสีเขียวจะแสดงว่าเป็นบริเวณที่มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์มะเร็ง



รูปที่ 3 เทคนิค Comparative Genomic Hybidization (CGH)

ที่มา: http://www.tumorprofiling.org

ได้มีการศึกษาความผิดปกติทางโครโมโซมด้วยเทคนิค CGH โดย Kallionimie และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาในประเทศทางตะวันตก พบว่ามีการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 1p22, 1q31,3q24-q26, 8q21 และ 13q21-q34 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 11p, 11q, 8p, 9, 17p, 3p และ 12q ในประเทศไทย สุพัตรา และคณะ (2003) พบว่ามีการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซมที่ 1q, 8q, 9q, 22q และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

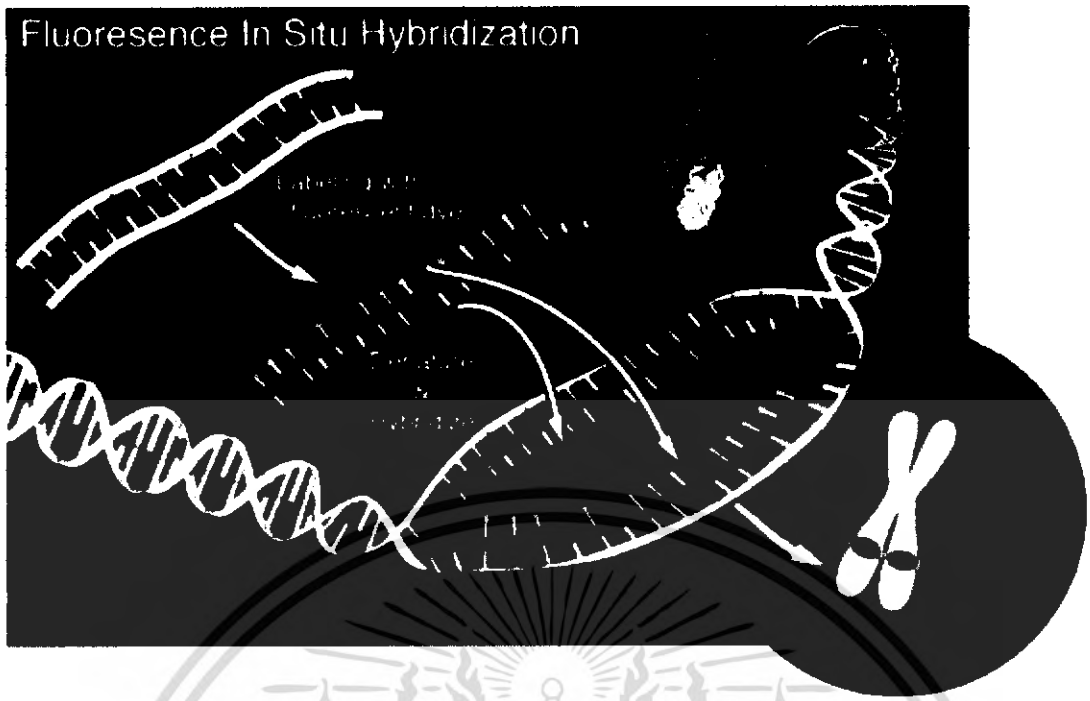
บริเวณ 5p, 19p และมีการขาดหายไปของโครโมโซมคู่ที่ 9 และโครโมโซม Y ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยในโรคมะเร็งระยะไม่ลุกลาม

2.4 Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

เทคนิค FISH เป็นเทคนิคในการหาช่วงลำดับเบสที่สนใจหรือยีนบนแท่งโครโมโซม (gene mapping) เป็นงานที่เทคนิคของ *in situ* Hybridization แต่เปลี่ยนจากตัวติดตามชนิดติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสีมาเป็นตัวติดตามชนิดปลอดรังสี (nonradioactive probe) เทคนิค FISH เป็นงานด้านอิมมูโนวิทยาร่วมกับด้าน *in situ* Hybridization และตรวจหาสัญญาณตำแหน่งของยีนโดยใช้สารสีเรืองแสง (fluorecein หรือ fluorophore) จึงเรียกเทคนิคชื่อเต็มว่า Fluorescence *in situ* Hybridization

ขั้นตอนการทำเทคนิค FISH ดังรูปที่ 4 คือ (1) การเตรียมตัวติดตามชนิด nonradioactive probe เมื่อได้ ตัวติดตามซึ่งมีช่วงลำดับเบสของดีเอ็นเอตามต้องการ (อาจเป็นตัวติดตามที่ได้จากการโคลนยีนหรือดีเอ็นเอบางส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายหรือตัวติดตามชนิดสังเคราะห์ขึ้นเองเมื่อทราบลำดับเบสที่ต้องการ) ติดฉลากตัวติดตามด้วยสารปลอดรังสี ซึ่งนิยมใช้ได้แก่ biotin และ digoxiginin ด้วยอย่างเช่นใช้ biotin นั้นต้องให้โมเลกุลของ biotin จับกับเบสซึ่งอาจเป็นชนิด purine หรือ pyrimidine ของนิวคลีโอไทด์ของตัวติดตาม เทคนิคการให้โมเลกุลของ biotin กับตัวติดตามนั้นนิยมใช้ nick tanslation labelling เรียก ตัวติดตามที่ติดมากับฉลากด้วย biotin นี้ว่า biotinylated probe (biotinylated dATP หรือ biotinylated dUTP แล้วแต่ชนิดของเบส A หรือ U ของตัวติดตามที่ biotin เข้าไปติด) จากนั้น (2) ทำเทคนิค *in situ* Hybridization ระหว่าง biotinylated probe กับดีเอ็นเอเป้าหมายของแท่งโครโมโซมเมทาเฟสซึ่งอยู่บนแผ่นสไลด์ (3) การตรวจหาสัญญาณเพื่อหาตำแหน่งดัวติดตามบนแท่งโครโมโซม ทำเทคนิคการเพิ่มสัญญาณเรืองแสงโดยใช้โมเลกุล antibiotin antibody ที่เชื่อมอยู่กับสารเรืองแสง (เช่น การติดฉลากด้วย biotin จะใช้ antibody คือ avidinfluorophore (เป็น labeled avidin) หรือใช้ avidin ที่เชื่อมกับเอนไซม์ เช่น alkaline phosphatase (เป็น labeled avidin) ให้ labeled avidin ที่เตรียมนี้จับเข้ากับ biotinylated probe ต่อจากนั้นตรวจหาสัญญาณการติดฉลากของตัวติดตามบนดีเอ็นเอเป้าหมายโดยใช้การตรวจหาจุดสีของสารเรืองแสงภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดฟลูออเรสเซนต์ (ซึ่งสารดังกล่าวจะให้สีที่มีความจำเพาะของคลื่นแสง) ในกรณีที่ติดตามด้วย avidinfluorophore สำหรับการติดตามสัญญาณสีของ avidin-alkaline phosphatase จะตรวจภายหลังการใส่สารตั้งต้นกับเอนไซม์จะมีผลทำให้เกิดเป็นจุดสีที่ตำแหน่งของของตัวติดตามจับกับดีเอ็นเอเป้าหมายซึ่งสามารถตรวจดูสัญญาณได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

ที่มา: http://www.mtsinai.on.ca/ pdmg/images/FISH.jpg

Hussein และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 50 ปี ในประเทศอียิปต์ โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะและตัวติดตามซึ่งติดฉลากด้วย biotin พบการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 4 และ 7 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9, 10, 11, 17, 19 และ โครโมโซม Y

Aurelia และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 63 ปี ในประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ พบการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 7 และ 8 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9, 10, 11, และ โครโมโซม Y

Jaime และคณะ (1995) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน อายุตั้งแต่ 20 - 80 ปี ในประเทศสหรัฐสอเมริกา โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเซลล์จากน้ำปัสสาวะ และตัวติดตาม X และ Y ตำแหน่ง centromere ผลจากการศึกษาเซลล์ทั้งหมด 3,264 เซลล์ พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y 102 เซลล์ ซึ่งคิดเฉลี่ยเป็นร้อยละ 3.1 โดยอัตราดังกล่าวไม่เกี่ยวข้องกับอายุของผู้ป่วย ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในเพศชาย

Ishiwata และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 44 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 69.2 ปี ในประเทศญี่ปุ่น โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์จากน้ำปัสสาวะ และตัวติดตามโครโมโซมคู่ 9 และ 17 จากชุด Vysis, Downers Grove, Ill พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9 ร้อยละ 75 และโครโมโซมคู่ที่ 17 ร้อยละ 51

Guido และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 68 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 69.4 ปี ในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ โดยใช้ตัวติดตามโครโมโซมคู่ 7, 9, 17, X และ Y พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y ในผู้ป่วย 23 คน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 34

Michael และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 105 คน อายุเฉลี่ยประมาณ 67 ปี ในประเทศสวิสเซอร์แลนด์ อายุเฉลี่ยประมาณ 67 ปี โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ โดยใช้ตัวติดตามโครโมโซมคู่ 1, 17 และ Y พบการเพิ่มขึ้นมาของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 1 ร้อยละ 46 และ 17 ร้อยละ 40 และการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซม Y ร้อยละ 20

Stefan และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในผู้ป่วยชาย 1 คน และหญิง 1 คน ในประเทศเยอรมัน โดยเทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะของทั้งคู่ โดยใช้ตัวติดตามจากชุด CEP 9 และ 17 ของ Vysis โดยโครโมโซมคู่ 9 จะติดสีแดง และ 17 จะติดสีเขียว พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9 ดังรูปที่ 5 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน CDKI2 และ FACC และโครโมโซมคู่ที่ 17 ซึ่งเป็นที่อยู่ของยีน p53

รูปที่ 5 ใช้ตัวติดตามตรวจสอบโครโมโซมคู่ที่ 9 (ติดสีแดง) และ 17 (ติดสีเขียว) พบการขาดหายไปของดีเอ็นเอบนโครโมโซมคู่ที่ 9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli*

- จานเพาะเชื้อ
- หลอดทดลอง
- ตู้บ่มเชื้อ 37 องศาเซลเซียส
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Lurai-Bertani medium (LB)
- ยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล

3.1.2 การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ

- เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ
- ใบมีดผ่าตัดที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- สไลด์
- Pasteur pipet
- Hot plate
- Phosphase buffer saline (PBS)
- Fixative solution (Methanol : Acetic acid = 3:1)

3.1.3 การ Pretreatment สไลด์

- Jar
- ไมโครปิเปต
- หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- 2X SSC
- เอนไซม์ RNase
- เอนไซม์ Pepsin
- 1N HCl
- Phosphate buffer saline (PBS)
- 37% Formaldehyde
- 1M Magnesium Chloride
- Alcohol series (ethanol 70%, 85%, 100%)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.4 การสกัดดีเอ็นเอ

โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin

3.1.5 การติดฉลากตัวติดตามด้วยวิธี Nick Translation

การติดฉลากแบบ Indirect method

- DNA เป้าหมายที่ต้องการติดฉลาก
- Biotin-16-dUTP
- dNTPs (0.5 mM dATP, dCTP, dGTP และ 0.1mM dTTP)
- 10X NT reaction buffer
- 0.1M β-mercaptoethanol
- DNase (stock solution 5U/ไมโครลิตร)
- DNA Polymerase (stock solution 11.8 U/ไมโครลิตร)

การติดฉลากแบบ Direct method โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Vysis

- DNA เป้าหมายที่ต้องการติดฉลาก
- 0.2 mM Spectrumgreen
- 0.1mM dTTP
- dNTPs MIX
- 10X Nick translation buffer
- Nick Translation enzyme

3.1.6 การตรวจสอบขนาด DNA

การทำเจลอิเลคโตรโฟรีซิส

- สารละลาย 1X TBE
- สีย้อม
- Ethidium bromide
- Agarose gel

3.1.7 เทคนิค Fluorescence *in situ* hybridization

3.1.7.1 Indirect method

การตกตะกอนตัวติดตาม

- DNA ตัวติดตามที่ทำการติดฉลากมาแล้ว (300-500 นาโนกรัม)
- Salmon sperm
- Human Cot 1 DNA
- 85% Ethanol
- 100% Ethanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3M Potassium acetate
- Deionized Formamide
- Hybridization buffer
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

Hybridization

- ถาดสำหรับการ Denature สไลด์
- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- 70% Formamide/2X SSC
- ตัวติดตามที่ทำการติดฉลากแล้ว
- สไลด์ตัวอย่าง
- Cover slip
- กาวยาง
- Moister chamber
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Washing

- Cover slip
- Jar
- 0.4X SSC/0.3% tween20
- 2X SSC/0.1% tween20
- 4X SSC/0.2% tween20
- Water bath 70 องศาเซลเซียส
- Water bath 45 องศาเซลเซียส
- Blocking นาโนกรัม solution
- Detection solution
- Mouse anti-Biotin
- TRITC
- DAPI (1mg/มิลลิลิตร)
- Phosphate buffer saline (PBS)
- Antifade

3.1.7.2 Direct method

การตกตะกอนตัวติดตาม

- DNA ตัวติดตามที่ทำการติดฉลากมาแล้ว (300-500 นาโนกรัม)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Salmon sperm
- Human CotI DNA
- 85% Ethanol
- 100% Ethanol
- 3M Potassium acetate
- Deionize Formamide
- Hybridization buffer
- น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

Hybridization

- ถาดสำหรับการ Denature สไลด์
- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- Water bath 75 องศาเซลเซียส
- ตัวติดตามที่ทำการติดฉลากแล้ว
- สไลด์ตัวอย่าง
- Cover slip
- กาวยาง
- Moister chamber
- ตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Washing

- Cover slip
- Jar
- 0.4X SSC
- 2X SSC
- Water bath 68 องศาเซลเซียส
- DAPI II (1mg/มิลลิลิตร)

3.1.7.3 การทำ FISH โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Vysis

Hybridization

- ถาดสำหรับการ Denature สไลด์
- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- ตัวติดตามที่ติดฉลาก
- สไลด์ตัวอย่าง
- Cover slip

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กาวยาง
- Moister chamber
- ตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส

Washing

- Water bath 73 องศาเซลเซียส
- Jar
- 0.4X SSC/0.3% NP-40
- 2X SSC/0.1% NP-40
- Alcohol series (เอทธานอล 70%, 85%, 100%)
- DAPI II
- Cover slip

Detection

- กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์
- Immersion oil

3.2 ตัวอย่างเนื้อเยื่อ

ตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ จำนวน 4 รายเป็นเพศชายทั้งหมดโดย ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลราชวิถี และตัวอย่างเซลล์กระพุ้งแก้มในเพศชายปกติจำนวน 1 รายเพื่อใช้เป็นตัวควบคุม

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อนั้น ได้ใช้เชื้อ *E.coli* ในการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนพลาสมิด ที่มีอยู่ในเชื้อ *E.coli* ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถคัดเลือกเชื้อ *E.coli* นี้ได้โดยการเลี้ยงในอาหาร LB agar ที่มียาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เนื่องจากพลาสมิดเหล่านี้มียีนต้านยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลอยู่

ซึ่งเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงนั้นเพื่อจะนำพลาสมิดมาทำตัวติดตามนั้น มีอยู่ 3 ชนิดด้วยกัน ดังตารางที่ I

67291

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไปเตรียมตัวติดตาม

รหัส	ตำแหน่งบนโครโมโซม	FISH	ขนาดพลาสมิด	โคลน	Gene Bank
RP 13-971021	Xp 11.1	Interphase	58 Mb	BAC	AL 591645.35
RP 11-75f5	Yq11.1	Interphase	12 Mb	BAC	AL011293.5
RP11-1126s10	Yp11.1	Interphase	11 Mb	BAC	AL069323.5

วิธีการเพาะเลี้ยงและคัดเลือกเชื้อมีดังต่อไปนี้

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร
2. นำเชื้อ *E.Coli* ที่ต้องการมาทำการ cross streak ลงบนเพลทเพื่อให้ได้เป็น single colony ให้มากที่สุด
3. นำเพลทที่ streak เชื้อแล้วไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 1 วัน
4. เขี่ยเชื้อ *E.coli* ที่เป็น single colony จากเพลทแรกมาทำการ cross streak ลงบนเพลทที่สอง
5. นำเพลทที่ streak เชื้อรุ่นที่ 2 ไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส 1 วัน
6. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB broth ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล 0.1 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละประมาณ 3 มิลลิลิตร ทำการเขี่ยเชื้อรุ่นที่ 2 ลงในอาหารเหลวที่เตรียมไว้
7. นำหลอดอาหารที่เขี่ยเชื้อแล้วไปบ่มในตู้บ่ม 37 องศาเซลเซียส ในสภาพเขย่า 200 รอบต่อนาที ตลอดเวลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเซลล์เพื่อนำมาสกัดพลาสมิดในขั้นต่อไป

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปของ Nucleospin มีขั้นตอนดังนี้

1. แบ่งอาหารเหลวใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร (เชื้อหนึ่งตัวใช้ หลอดทดลอง 2 หลอด)
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายใส (Supernatant) ส่วนบนทิ้ง
3. เติมสารละลาย A1 250 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง 1 ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ดูดสารละลาย A1 ในหลอดทดลอง 1 มาใส่ในหลอดทดลอง 2 ของเชื้อตัวเดียวกัน แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปต
5. เติมสารละลาย Buffer A2 250 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน 6-8 ครั้ง ด้วยวิธี Gentle mix ห้าม Vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
6. เติมสารละลาย A3 300 ไมโครลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน 6-8 ครั้งด้วยวิธี Gentle mix ห้าม Vortex
7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5-10 นาที ดูดสารละลายส่วนใสที่ได้ ใส่ลงไปใน Nucleospin plasmid column
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างในหลอดทิ้งไป
9. เติมสารละลาย AW ที่บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 500 ไมโครลิตร ลงไปใน Plasmid column
10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา1 นาที เทสารละลายด้านล่างในหลอดทิ้งไป
11. เติมสารละลาย A4 600 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายด้านล่างในหลอดทิ้งไป
12. นำ Plasmid column ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที
13. นำ Plasmid column ไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลาย AE 50 ไมโครลิตร เพื่อชะเอาดีเอ็นเอที่ติดกับ column ออกมา ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 นาที
14. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
15. ทำการเก็บส่วนใสที่ได้ ซึ่งส่วนใสที่อยู่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร คือดีเอ็นเอที่สกัดได้

3.3.3 การหาปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้โดยการวัดค่าความดูดกลืนแสง

การวัดค่าความดูดกลืนแสงนั้นเพื่อที่จะหาปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้และดูความบริสุทธิ์ ซึ่งในการวัดค่าความดูดกลืนแสงนั้น จะใช้ช่วงความยาวคลื่นแสงที่ 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตรในการวัด โดยช่วงความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร นั้นจะใช้ในการวัดปริมาณดีเอ็นเอและช่วงความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร จะใช้ในการวัดการปนเปื้อนของโปรตีน ค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอหาได้จาก

ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (นาโนกรัม /ไมโครลิตร) = A x 50 (ไมโครลิตร /มิลลิลิตร) x B

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดย A = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร

B = ค่าการเจือจาง (เท่า)

ความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ ดูได้จากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 นาโนเมตร / ค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ค่าที่ได้ควรอยู่ระหว่าง 1.80-2.00 ในกรณีที่มีค่ามากกว่า 2.00 แสดงว่ามีการปนเปื้อน อาร์เอ็นเอ และถ้าค่าที่ได้มีค่าน้อยกว่า 1.80 แสดงว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีน

3.3.4 การเตรียมสไลด์

ได้ทำการเตรียม 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 การทำให้เป็นเซลล์เดี่ยวในสารละลาย Fixative (Single cell in fixative solution)

1. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อออกมาจากหลอดเก็บโดยใช้ใบมีดฆ่าเชื้อตัดชิ้นเนื้อเยื่อนั้น
2. ล้างสไลด์ให้สะอาดโดยใช้สารละลาย Fixative (Methanol : Acetic acid = 3:1)
3. นำเนื้อเยื่อใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PBS อยู่ เพื่อล้างคราบไขมันและสิ่งที่ติดอยู่กับเซลล์ 2 ครั้ง
4. นำเนื้อเยื่อมาวางบนสไลด์หลุมหยด Fixative solution สับให้ละเอียดที่สุด จนเนื้อเยื่อเป็นเนื้อเดียวกันกับสารละลาย
5. ดูดสารละลายเซลล์นำไปหยดลงบนสไลด์ซึ่งวางอยู่บน Hot plate รอให้สไลด์แห้ง
6. นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase contrast เพื่อดูปริมาณและการกระจายเซลล์

วิธีที่ 2 การติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ (Touch print)

1. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อออกมาจากหลอดเก็บโดยใช้ใบมีดฆ่าเชื้อตัดชิ้นเนื้อเยื่อนั้น
2. ล้างสไลด์ให้สะอาดโดยใช้สารละลาย Fixative
3. นำเนื้อเยื่อใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี PBS อยู่ เพื่อล้างคราบไขมันและสิ่งที่ติดอยู่กับเซลล์ 2 ครั้ง
4. นำเนื้อเยื่อมาทาบลงบนสไลด์ เพื่อให้เซลล์ติดสไลด์ รอให้สไลด์แห้ง
5. นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase contrast เพื่อดูปริมาณและการกระจายเซลล์

การทำ Pretreatment Slide

1. ล้างสไลด์ตัวอย่างด้วย 2X SSC ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที
2. หยดเอนไซม์ RNase (RNase 1 ไมโครลิตร + 2X SSC 200 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
3. ล้างสไลด์ด้วย 2X SSC จำนวน3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. กำจัดโปรตีนที่ไม่ต้องการออกโดยใช้เอนไซม์ Pepsin (น้ำกลั่น 49.5 มิลลิลิตร, Pepsin 50 ไมโครลิตร, 1N HCl 500 ไมโครลิตร) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
5. ล้างสไลด์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
6. ทำการตรึงเซลล์โดยใช้ 37% formaldehyde 1.3 มิลลิลิตร/1M $MgCl_2$ 2.5 มิลลิลิตรในสารละลาย PBS 47.5 มิลลิลิตร นาน 12 นาที
7. ล้างสารละลายที่ใช้ตรึงเซลล์ออกโดยแช่ในสารละลาย PBS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที
8. ทำให้แห้งด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 70, 85% และ 100% นานครั้งละ 3 นาที ตามลำดับและปล่อยให้แห้ง

3.3.5 การทำ Nick translation

การทำ Nick translation ได้แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การทำด้วยวิธี Conventional Method ดังตารางที่ 2 และ การใช้ชุด nick translation สำเร็จของ Vysis ดังตารางที่ 3 ซึ่งแต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

3.3.5.1 การเตรียมสารเคมีในการทำ Nick translation

ตารางที่ 2 สารเคมีที่ใช้ทำ Nick translation ด้วย Conventional method ในปริมาณ 30 ไมโครลิตร

สาร	ปริมาณ
NT-buffer	5 ไมโครลิตร
Beta-mercaptone (ß-me)	5 ไมโครลิตร
dNTPs 10X	5 ไมโครลิตร
Biotin-16-dUTP หรือ Digoxigenin-11-dUTP	1.5 ไมโครลิตร
DNA Template (2 µl/ml)	X ไมโครลิตร
DNA polymerase	1 ไมโครลิตร
DNase (1:4000)	1 ไมโครลิตร
Sterile water	11.5-X ไมโครลิตร
Total	30 ไมโครลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 สารเคมีที่ใช้ทำ Nick translation ด้วยชุดสำเร็จรูปของ Vysis ในปริมาณ 25 ไมโครลิตร

สาร	ปริมาณ
0.2 mM SpectrumGreen or SpectrumOrange	1.25 ไมโครลิตร
0.1 mM dTTP	2.5 ไมโครลิตร
dNTPs	5 ไมโครลิตร
10X Nick translation buffer	2.5 ไมโครลิตร
Nick translation enzyme	5 ไมโครลิตร
DNA Template (1 μg)	X ไมโครลิตร
Sterile water	8.75 – X ไมโครลิตร
Total	25 ไมโครลิตร

3.3.5.2 การทำ Nick translation

1. นำสารต่างๆผสมกัน โดยใส่เอนไซม์หลังสุด ทำการ Vortex และ Spin down เพื่อให้สารผสมกัน
2. นำไปเข้าเครื่อง PCR โดยใช้อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง โดยทำการหาเวลาที่เหมาสมที่สุดที่จะได้ตัวติดตามในขนาดที่ต้องการ (300-500 Basepair)
3. หยุดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
4. เก็บตัวติดตามที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.6 การทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีส

นำตัวติดตามที่ได้มาทำเจลอิเลคโตรโฟรีซีสเพื่อหาขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมในการนำไปไฮบริไดซ์ ขนาดของตัวติดตามที่เหมาะสมในการนำไปไฮบริไดซ์ควรมีขนาดประมาณ 300 – 500 คู่เบส ซึ่งสามารถเทียบขนาดได้จาก DNA Marker โดยนำตัวติดตามที่ได้มาแยกขนาดโดยใช้กระแสไฟฟ้า แยกขนาดบนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1-2 % ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์แล้ว นำไปส่องดูด้วยแสงอัตราไวโอเลต มีขั้นตอนดังนี้

1. ทำการเตรียมเจลจากผงอะกาโรส โยเตรียมความเข้มข้นเจล 1-2% และละลายใน TBE Buffer
2. ปิดฝา นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟ จนเจลละลายหมด ทิ้งไว้ให้เย็นประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส
3. เทลงในถาดเจลที่เตรียมไว้ เสียบหวีลงไป รอจนกระทั่งเจลแข็งตัว ประมาณ 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำหวีออกแล้วนำเจลที่ได้ไปใส่ในอ่างที่ใช้สำหรับทำอิเลคโตรโฟเรซีส
5. เทสารละลาย TBE Buffer ลงไปให้ท่วมเจล
6. ทำการหยอดดีเอ็นเอที่ผสมน้ำกลั่นและสีย้อมเรียบร้อยแล้ว
7. ต่อสายขั้วบวกและลบ แล้วเปิดเครื่องโดยใช้ความต่างศักย์ 100 โวลต์ นาน 60 นาที โดยให้สีวิ่งไปประมาณร้อยละ 80 ของความยาวของเจล
8. นำเจลที่ได้ไปย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ นานประมาณ 10 นาที
9. หลังจากนั้นนำเจลไปล้างด้วยน้ำกลั่น นานประมาณ 10 นาที
10. นำเจลที่ได้ไปส่องดูด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเพื่อดูขนาดของตัวติดตาม โดยทำการเปรียบเทียบขนาดของตัวติดตามกับขนาดของ DNA Marker

3.3.7 การทำ Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH)

ในการทำ FISH นั้น มีวิธีหลักๆ ดังต่อไปนี้

ในการทดลอง ได้ทำ 3 วิธีด้วยกัน คือ Indirect method, Direct method และ การทำ FISH โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Vysis ซึ่งแต่ละวิธีมีขั้นตอนการปฏิบัติดังต่อไปนี้

3.3.7.1 การทำ FISH ด้วยวิธี Indirect method ได้ทำตัวติดตาม Y ซึ่งติดฉลากด้วย Biotin-16-dUTPและติดฉลากด้วย TRITC ที่ให้สัญญาณสีแดง

การตกตะกอนตัวติดตาม

1. นำตัวติดตามที่ผ่านการติดฉลากแล้ว ปริมาณ 300-500 นาโนกรัม และ Salmon sperm DNA 1 ไมโครลิตร และใส่น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไปเพื่อปรับปริมาตรให้มีปริมาตรทั้งหมดเท่ากับ 25 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน
2. ทำการตกตะกอน DNA โดยการเติม 100% Ethanol 2.5 เท่าของปริมาตรทั้งหมดและ 3M potassium acetate 1/10 ของปริมาตรทั้งหมดลงไปในหลอด นำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส 45 นาที
3. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วดูดส่วนใสด้านบนออกเติม 85 % Ethanol 500 ไมโครลิตร (ระวังอย่าให้ตะกอน DNA หลุด) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 rpm ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดส่วนใสด้านบนออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง ตากตะกอนให้แห้ง
4. เติม Deionize formamide 5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. เติม Human Cot-1 DNA 2 ไมโครลิตร และ Hybridization buffer 5 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ทำตัวติดตามให้เสียสภาพโดยการใช้ความร้อนที่ใน Water bath ที่ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำตัวติดตามที่ไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และนำตัวติดตามที่ได้ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

Hybridization

1. นำสไลด์ไป ทำให้เสียสภาพ โดยหยด 70% Formamide/2X SSC 1 มิลลิลิตร ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 4 นาที
2. แช่สไลด์ใน 70%, 85% และ 100% เอธิลแอลกอฮอล์ ตามลำดับ ครั้งละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตากสไลด์ให้แห้ง
3. หยดตัวติดตามที่ผ่านการทำให้เสียสภาพแล้วลงบนสไลด์ 10 ไมโครลิตร ปิดด้วย Cover slip แล้วปิดขอบด้วยRubber glue นำสไลด์ใส่ใน Moister chamber แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

Washing

1. นำสไลด์ออกจาก Moister chamber แล้วดึง Rubber glue ออกจากสไลด์ ระวังอย่าให้Cover slip เคลื่อน
2. ล้างสไลด์ใน 0.4X SSC/0.3% tween20 ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที ขณะทำการล้างสไลด์ ให้แกว่งสไลด์จน Cover slip หลุดออกไป
3. ล้างสไลด์ใน 2X SSC/0.1% tween20 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 นาทีหยด Blocking solution 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ นำสไลด์ไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที
4. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2% tween20 นาน 2 นาที ผสม Sheep anti-DIG /Mouse anti-BIOTIN 1 ไมโครลิตร กับ Detection solution 40 ไมโครลิตร หยดสารลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย Cover slip นำไปบ่มใน Moist chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
5. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2% tween20 ที่ 45 องศาเซลเซียส 3 ครั้งครั้งละ 5 นาที
6. ผสม FITC/TRITC 1 ไมโครลิตร กับ Detection solution 40 ไมโครลิตร หยดสารลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย Cover slip
7. นำไปบ่มใน Moist chamber ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
8. ล้างสไลด์ใน 4X SSC/0.2% tween20 ที่ 45 องศาเซลเซียส 3 Jar ครั้งละ 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ผสม DAPI I ไมโครลิตร กับ PBS 5 มิลลิลิตร หยดสารละลาย DAPI 1 มิลลิลิตร ลงบนสไลด์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที (ทำในที่มืด) จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำและตากสไลด์ให้แห้ง
10. หยด antifade solution 5 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover slip แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นต์ เพื่อตรวจสอบสัญญาณ

3.3.7.2 การทำเทคนิค FISH ด้วยวิธี Direct

การตกตะกอนตัวติดตาม

1. ปิเปตตัวติดตาม 5 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นประมาณ 100 นาโนกรัม) ใส่ลงในหลอด Microcentrifuge
2. เติม Human Cot-1 DNA ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมมา 1 ไมโครลิตร เติม Human placental DNA ความเข้มข้น 2 ไมโครกรัมมา 2 ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 4 ไมโครลิตร เติม Sodium acetate ความเข้มข้น 3M 1.2 ไมโครลิตร เติม 100% Ethanol 30 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็งนาน 15 นาที
3. หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm / 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ เทสารละลายส่วนบนทิ้ง (Supernatant) แล้วปล่อยดีเอ็นเอทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10-15 นาที
4. ละลายดีเอ็นเอในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3 ไมโครลิตร และ Hybridization buffer 7 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำตัวติดตามที่ได้ไปทำให้สูญเสียสภาพโดยความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที

Hybridization

1. นำตัวติดตามจำนวน 2 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด Microcentrifuge นำตัวติดตามไป Denature ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำตัวติดตามที่ได้ไป Vortex แล้ว Spin down
2. หยดตัวติดตามที่ได้ลงบนสไลด์ ปิดด้วย Cover slip แล้วปิดขอบด้วย Rubber glue
3. นำสไลด์ไปทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที นำสไลด์ที่ได้ใส่ไน Moister chamber แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Washing

1. นำสไลด์ออกจาก Moister chamber แล้วดึง Rubber glue ออกจากสไลด์ ระวังอย่าให้ Cover slip เคลื่อน
2. ล้างสไลด์ใน 0.4X SSC ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ขณะทำการล้างสไลด์ ให้แกว่งสไลด์จน Cover slip หลุดออกไป
3. ล้างสไลด์ใน 2X SSC ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 นาที ตากสไลด์ให้แห้งหยด DAPI II 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ ปิดด้วย Cover slip แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดใส
4. นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นต์ เพื่อตรวจสอบสัญญาณ

3.3.7.3 การทำเทคนิค FISH โดยใช้ชุดสำเร็จรูปของ Vysis

การใช้ชุดทำ FISH สำเร็จรูป สามารถนำตัวติดตามที่ได้มาจากชุดสำเร็จรูปมาใช้ได้ทันที โดยไม่ต้องนำตัวติดตามไปตกตะกอน

Hybridization

1. นำตัวติดตามจากชุด FISH (CEP X, CEP Y) DNA Probe Kit (CEP X, CEPY) X จะติด Spectrum orange ซึ่งให้สัญญาณสีแดง Y จะติด Spectrum green ซึ่งให้ สัญญาณสีเขียว สำเร็จรูปมา 3 ไมโครลิตร หยดตัวติดตามลงบนสไลด์ ปิดด้วย Cover slip แล้วปิดขอบด้วย Rubber glue
2. นำสไลด์ไปทำให้เสียสภาพด้วยความร้อนใน Water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 8 นาที นำสไลด์ที่ได้ใส่ไน Moister chamber แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 16-24 ชั่วโมง

Washing

1. นำสไลด์ออกมาจาก Moister chamber แล้วดึง Rubber glue ออกจากสไลด์ ระวังอย่าให้ Cover slip เคลื่อนล้างสไลด์ใน 0.4X SSC/0.3% NP-40 ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 73 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขณะทำการล้างสไลด์ ให้แกว่งสไลด์จน Cover slip หลุดออกไปล้างสไลด์ใน 2X SSC/0.1% NP-40 ที่อุณหภูมิห้อง นาน 5 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. แช่สไลด์ที่ Ethanol 70%, 85 % และ 100 % ครั้งละ 3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ตามลำดับ ตากสไลด์ให้แห้ง ระวังอย่าให้สไลด์โดนแสง หยด DAPI II 4 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์
3. ปิดด้วย Cover slip แล้วปิดขอบด้วยน้ำยาทาเล็บ นำสไลด์ไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซ็นต์ เพื่อตรวจสอบสัญญาณ

3.3.8 การตรวจสอบสัญญาณ

ทำการตรวจสอบสัญญาณโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า ตรวจสอบผลที่ได้ และทำการถ่ายรูปเก็บไว้ โดยเมื่อทำ FISH เสร็จสิ้นแล้ว ควรระวังให้มีการโดนแสงให้น้อยที่สุด เพื่อป้องกันการลดลงของสัญญาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การเตรียมสไลด์

ได้ทำการศึกษาหาวิธีที่เหมาะสมในการเตรียมสไลด์ในการตรวจสอบในเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้เทคนิค Fluorescense *in situ* Hybidization ด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ วิธีการติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ (Touch print) และวิธีการทำให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวในสารละลาย Fixative (Single cell in fixative solution)

4.1.1 วิธีการติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ (Touch print)

จากการนำเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมาล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้งและนำมาแตะลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทำให้แห้งบน hot plate แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีการกระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆจำนวนมาก มีเซลล์ที่เกาะกลุ่มกันบางเพียงเล็กน้อย ลักษณะรูปร่างของเซลล์ยังเป็นปกติ

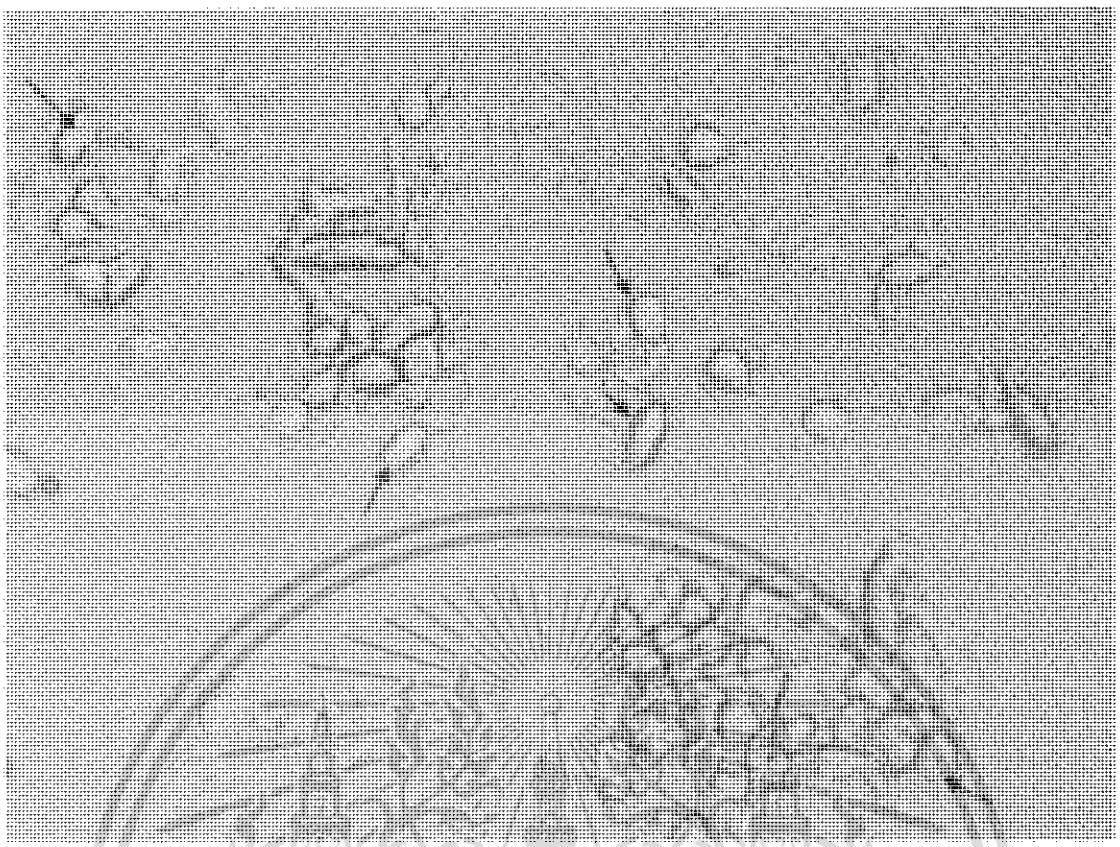
4.1.2 วิธีการทำให้ได้เป็นเซลล์เดี่ยวในสารละลาย Fixative (Single cell in fixative solution)

จากการนำเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะมาวางบนสไลด์หลุม หยดสารละลาย Fixative จำนวน 2-3 หยด แล้วใช้มีดสับเนื้อเยื่อให้ละเอียด จนกระทั่งได้สารละลายที่มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปหยดลงบนสไลด์แล้วนำไปวางบน hot plate จนสไลด์แห้ง แล้วนำสไลด์มาล้างด้วย PBS อีกครั้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการกระจายตัวของเซลล์เดี่ยวๆ จำนวนน้อยมาก เซลล์ส่วนใหญ่ยังเกาะตัวเป็นกลุ่มก้อนมีชิ้นขนาดใหญ่ ไม่เป็นเซลล์เดี่ยว

ดังนั้นวิธีการเตรียมสไลด์ให้ได้ผลดีในการตรวจสอบด้วยเทคนิค Fluorescense *in situ* Hybidization และมีความสะดวกรวดเร็ว เราจึงเลือกใช้วิธีการติดเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ การเตรียมด้วยวิธีนี้ยังสามารถเก็บสไลด์ไว้ได้นาน โดยการนำสไลด์ไปแช่ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ก่อนนำสไลด์มาใช้งานนำมาวางที่อุณหภูมิห้องให้สไลด์หายเป็นไอแล้วนำไปใช้งานต่อไปได้

หลังจากทำการเตรียมสไลด์ ต้องนำสไลด์มาตรวจดูการกระจายตัวและปริมาณของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Phase contrast ดังรูปที่ 6 เพื่อที่จะได้เลือกสไลด์ที่มีปริมาณเซลล์และการกระจายตัวที่ดีที่สุดมาใช้ในการไฮบริไดซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



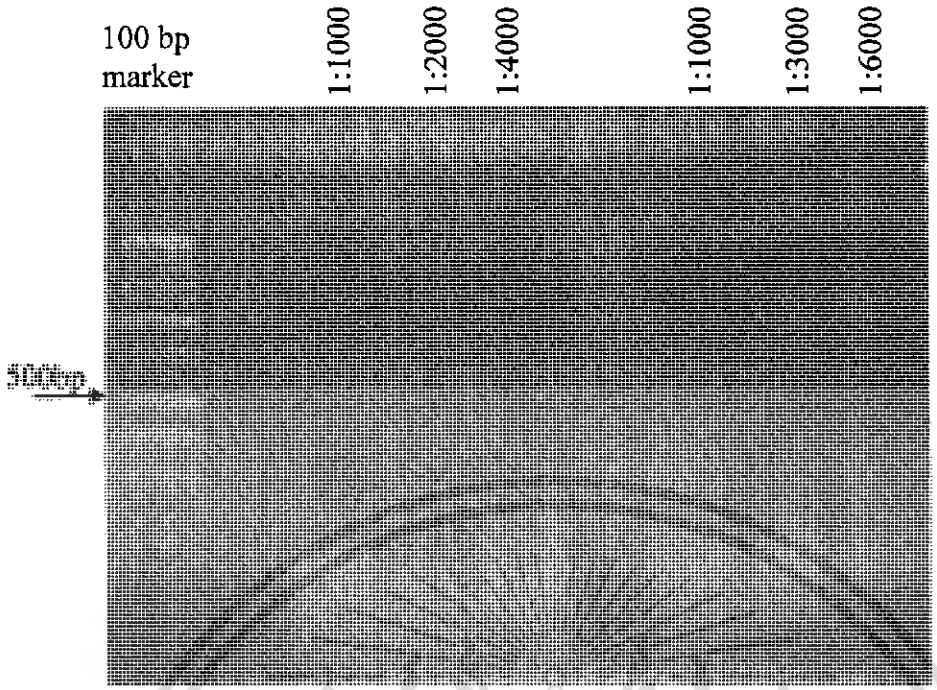
รูปที่ 6 เซลล์มะเร็งกระเพาะปัสสาวะจากกล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast (10 เท่า)

4.2 การเตรียมตัวติดตาม

4.2.1 วิธี Conventional

ในการเตรียมตัวติดตามนั้น การติดฉลากตัวติดตามได้ใช้วิธี nick translation ซึ่งในการทำ nick translation นั้นจะมีเอนไซม์ DNase เพื่อทำการตัดชิ้นส่วนพลาสมิดให้มีรอยขาด (nick) แล้วจึงใช้เอนไซม์ DNA Polymerase ทำการต่อชิ้นส่วนให้มีขนาดที่ต้องการ โดยสภาวะที่เหมาะสมในการทำ nick translation นั้น จะอยู่ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเพื่อให้ได้ขนาดที่ต้องการ (*300-500 basepair*) จึงได้ทำการทดลองสภาวะที่เหมาะสมโดยทดลองความเข้มข้นของเอนไซม์ DNase ที่ความเข้มข้น ต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7 แสดงขนาดของแถบตัวติดตามที่ทำด้วยวิธี conventional โดยเลนที่ 1 คือ DNA Marker 100 bp, เลนที่ 2 - negative control, เลนที่ 3 - DNase 1:1000, เลนที่ 4 - DNase 1:2000, เลนที่ 5 - DNase 1:4000, เลนที่ 6 - negative control, เลนที่ 7 - DNase 1:1000, เลนที่ 8 - DNase 1:3000 และ เลนที่ 9 - DNase 1:6000

จากรูปที่ 7 พบว่า ขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของ ความเข้มข้นเอนไซม์ DNase ในแต่ละความเข้มข้นนั้น มีขนาดที่ค่อนข้างใกล้เคียงกัน คือ มีขนาดประมาณ 100 basepair ดังนั้นในการทดลองจึงเลือกใช้ความเข้มข้น DNase ที่ความเข้มข้น 1:4000 เนื่องจากเป็นความเข้มข้นเฉลี่ยและจากผลปริมาณชิ้นดีเอ็นเอมีปริมาณค่อนข้างมากกว่าความเข้มข้นอื่นๆ

4.2.2 การทำ nick translation ด้วยชุดสำเร็จรูป Vysis

จากการทำ nick translation ด้วยวิธี conventional นั้นให้ขนาดของตัวติดตามที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอขนาดสั้นซึ่งไม่ตรงกับขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ ดังนั้นจึงได้ใช้วิธีการติดฉลากด้วยชุดสำเร็จรูปของ vysis เพื่อให้ได้ขนาดตามที่ต้องการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

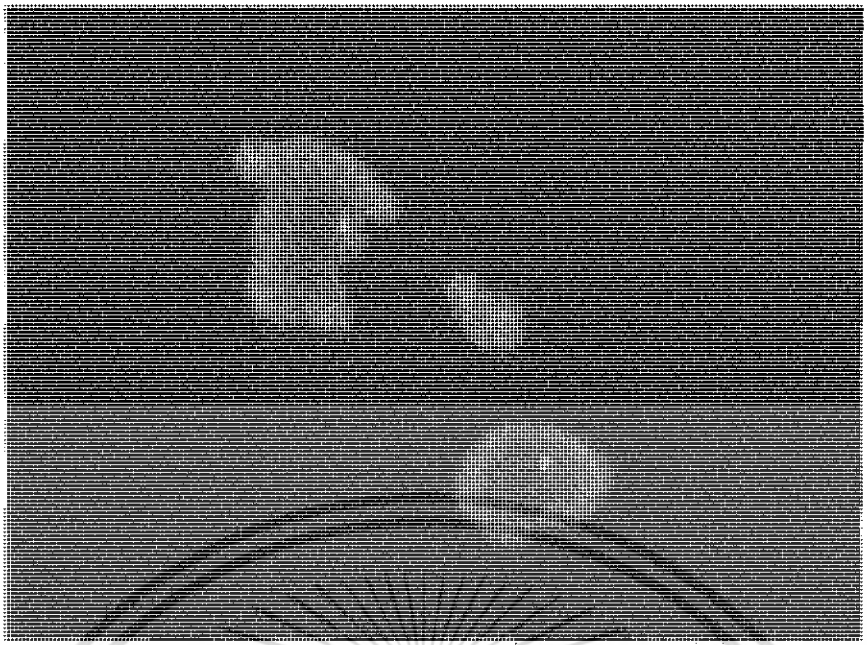
4.3 การตรวจสอบด้วยเทคนิค Fluorescense *in situ* hybridization

ผลของการตรวจสอบเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้ตัวติดตาม X ซึ่งให้สัญญาณสีแดง (ติดสี Spectrumorange) และ ตัวติดตาม Y ซึ่งให้สัญญาณสีเขียว (ติดสี Spectrumgreen) ไฮบริไดซ์ร่วมกัน การย้อมเซลล์ด้วย DAPI โดย DAPI นั้นจะย้อมติดเฉพาะสารพันธุกรรม เมื่อปรับฟิลเตอร์ที่เหมาะสมแล้วจะทำให้สามารถเห็นเซลล์ซึ่งมีสีฟ้าได้ ดังรูปที่ 8

รูปที่ 8 แสดงรูปของเซลล์ที่ทำการย้อมด้วย DAPI ทำให้เห็นเซลล์ที่ติดสีฟ้าของ DAPI

ในคนเพศชายปกตินั้น มีโครโมโซมเพศเป็น X และ Y ดังนั้น ถ้ามีการตรวจสัญญาณจะต้องให้สัญญาณออกมาเป็น 2 สัญญาณทั้งเขียวและแดง ซึ่งในการทดลองได้ใช้เซลล์กระพุ้งแก้มของคนปกติที่ไม่ได้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชาย และทำการตรวจหาสัญญาณ และตรวจพบสัญญาณ ทั้งสอง ดังรูปที่ 9

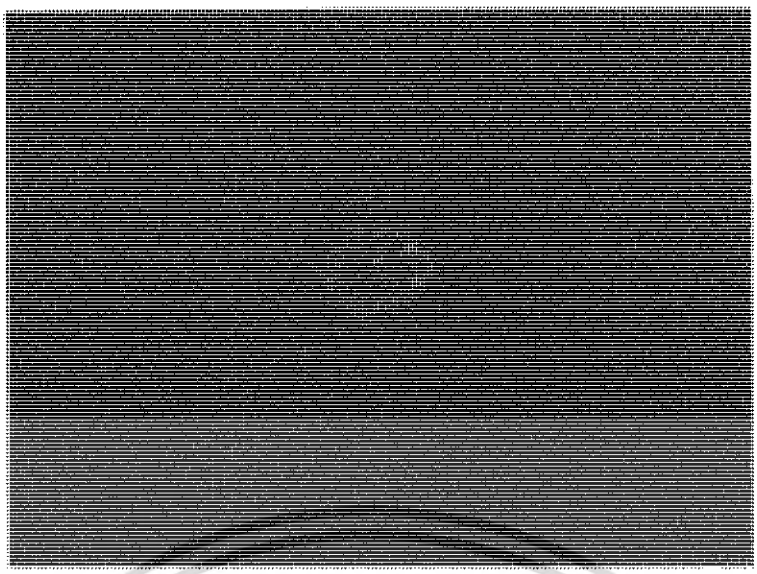
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 แสดงเซลล์กระพุ้งแก้มของคนปกติเพศชายที่ทำการไฮบริไดซ์ด้วยตัวติดตาม ทำให้เห็นสัญญานของตัวติดตาม X (สีแดง) และตัวติดตาม Y (สีเขียว)

และในการตรวจสอบผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้ง 4 ราย จะพบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซมหลายรูปแบบดังต่อไปนี้ เมื่อทำการตรวจสอบด้วยเทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization แล้วจะพบการเพิ่มขึ้นมาของสัญญาณสีแดง ซึ่งแสดงถึงโครโมโซม X ที่เกินมา ดังรูปที่ 10 มีการขาดหายไปของสัญญาณสีเขียว ซึ่งแสดงถึงการขาดหายไปของโครโมโซม Y ดังรูปที่ 11 และมีการขาดหายไปของสัญญาณที่แดง ซึ่งแสดงถึงการขาดหายไปของโครโมโซม X ดังรูปที่ 12 อีกด้วย ในบรรดาความผิดปกติต่างๆ เหล่านี้ ความผิดปกติที่พบมากและบ่อยที่สุด คือ การขาดหายไปของโครโมโซม Y เฉลี่ยเป็นร้อยละ 61.05 (จากจำนวนผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะจำนวน 4 ตัวอย่าง) รองลงมาคือการขาดหายไปของโครโมโซม X เฉลี่ยเป็นร้อยละ 4.54 และการเกินของโครโมโซม X เฉลี่ยเป็นร้อยละ 4.35 ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างที่ 3 นั้น ไม่สามารถตรวจพบสัญญาณของตัวติดตาม X และ Y มากถึงร้อยละ 22.58 ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีการขาดหายไปของโครโมโซม X และ Y หรือเซลล์ไม่สามารถไฮบริไดซ์ร่วมกับตัวติดตามได้ ซึ่งได้แสดงรายละเอียดไว้ในตารางที่ 4

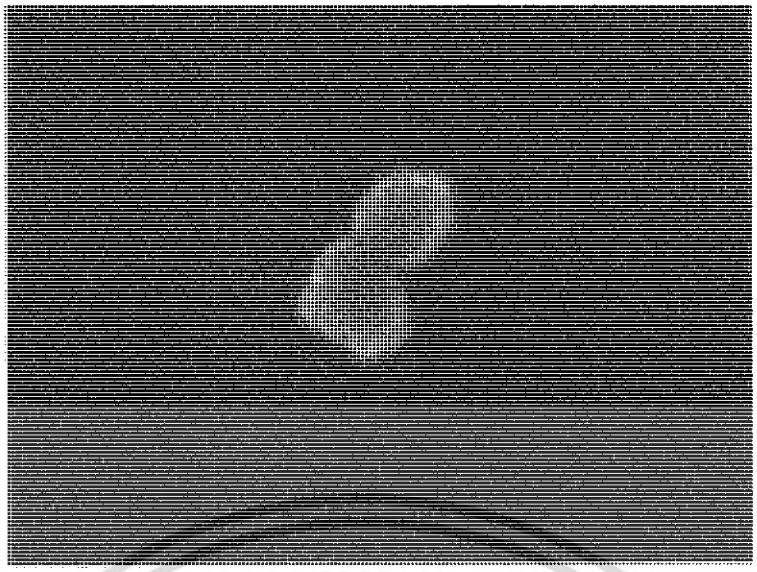
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ โดยมีสัญญาณสีแดง 2 ตำแหน่งใน 1 เซลล์ ซึ่งแสดงถึงโครโมโซม X เกินมา

รูปที่ 11 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ โดยไม่พบสัญญาณสีเขียวในเซลล์ ซึ่งแสดงถึงการขาดหายไปของโครโมโซม Y

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 แสดงเซลล์เนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งผลแสดงความผิดปกติ โดยไม่พบสัญญาณสีแดงในเซลล์ แสดงถึงการขาดหายไปของโครโมโซม X

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดลองที่ได้จากเทคนิค **Fluorescense *in situ* Hybridization** ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ

ตัวอย่าง	เพศ	จำนวนเซลล์	เซลล์ปกติ	โครโมโซม X		โครโมโซม Y		ไม่มีสัญญาณ
				ขาด	เกิน	ขาด	เกิน	
Control	ชาย	214	192	6 (2.80%)	0	4 (1.87%)	0	12 (5.61%)
1	ชาย	30	5	1 (3.33%)	2 (6.67%)	20 (66.67%)	0	2 (6.67%)
2	ชาย	800	66	6 (0.75%)	0	662 (82.75%)	0	56 (7%)
3	ชาย	62	18	7 (11.29%)	0	24 (38.71%)	0	14 (22.58%)
4	ชาย	205	49	15 (7.32%)	22 (10.73%)	115 (56.09%)	0	4 (1.95%)
เฉลี่ย				4.54%	4.35%	61.05%	0%	8.76%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชาย จำนวน 4 ราย จากการทดลองจะเห็นได้ว่า มีการขาดหายไปของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเป็นเปอร์เซ็นต์ที่มากกว่าความผิดปกติอย่างอื่น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Guido และคณะ (1995) ที่ได้ทำการทดลองในผู้ป่วยที่อยู่ในประเทศทางตะวันตกด้วยเทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization ซึ่งพบการขาดหายไปของโครโมโซม Y ร้อยละ 34 และในปีเดียวกัน Aurelia และคณะ ได้พบความผิดปกติของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชาย จำนวน 25 ราย พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y เช่นกัน

ต่อมาในปี 1998 Michael และคณะ ได้พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชาย 105 ราย โดยพบความผิดปกติเฉลี่ยร้อยละ 20 และในปี 2004 Hussein และคณะ ได้ทำการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ 25 คน ในประเทศอียิปต์ โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อภายในกระเพาะปัสสาวะ พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y ด้วย

ในประเทศไทย ตามรายงานของ สุพัตรา และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาความผิดปกติทางโครโมโซมของผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในประเทศทางตะวันออก ด้วยเทคนิค Comparative Genomic Hybridization พบการขาดหายไปของโครโมโซม Y เช่นกัน จึงได้นำมาศึกษารายละเอียดเฉพาะขึ้นโดยใช้เทคนิค Fluorescense *in situ* Hybridization ผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่นั้นจะเป็นเพศชาย มีอายุประมาณ 50 – 70 ปี ในการทดลองของ Jaime และคณะ (1996) ได้ทำการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม Y ในคนปกติที่ไม่ได้เป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งพบความผิดปกติในเปอร์เซนต์ที่ต่ำ เฉลี่ยร้อยละ 3.1 อย่างไม่เป็นนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผมของการขาดหายไปของโครโมโซม Y ในเซลล์กระพุ้งแก้มของตัวอย่างควบคุม ที่มีการขาดหายไปขงโครโมโซม Y ร้อยละ 1.87 และพบว่า ถ้ามีการขาดหายไปของโครโมโซม Y มากกว่าร้อยละ 10 ก็จะมีโอกาสที่จะเป็นมะเร็งกระเพาะปัสสาวะได้ ซึ่งตรงกับผลของตัวอย่างเนื้อเยื่อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะทั้ง 4 ราย ดังในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ชิ้นเนื้อมะเร็งกระเพาะปัสสาวะของผู้ป่วย โดยใช้เทคนิค Fluorescence *in situ* Hybridization โดยใช้ตัวติดตาม (Probe) ของโครโมโซม X และ Y กับผู้ป่วยมะเร็งกระเพาะปัสสาวะเพศชายจำนวน 4 คน ผลปรากฏว่า มีการขาดหายของโครโมโซม Y ในผู้ป่วยทั้ง 4 คน ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะ ซึ่งมะเร็งกระเพาะปัสสาวะส่วนใหญ่จะพบในเพศชาย ทำให้ในการตรวจสอบการขาดหายไปของโครโมโซม Y นั้นค่อนข้างมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าในโครโมโซม Y นั้นอาจมี tumor suppressor gene ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนของเซลล์ ดังนั้นเมื่อ tumor suppressor gene เกิดการขาดหายไป จึงทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวที่ผิดปกติทำให้เกิดโรคมะเร็งได้ อาจกล่าวได้ว่าการตรวจสอบความผิดปกติที่ตำแหน่งนี้จึงสามารถนำมาพยากรณ์โอกาสที่จะเกิดโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะในอนาคตได้ เพื่อที่จะได้รักษาได้ทันท่วงที แต่อย่างไรก็ตาม ควรศึกษาในตำแหน่งที่มีความผิดปกติ อื่นๆด้วย

ข้อเสนอแนะ

5.1 ตัวอย่างควรมากกว่านี้ ในการวิเคราะห์เพื่อความน่าเชื่อถือของข้อมูล

5.2 ในการตรวจสอบผลควรให้จำนวนเซลล์เป็นมาตรฐานและมีปริมาณที่คงที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ทวีศักดิ์ ตีระวัฒนพงษ์. 2541. อณูชีววิทยาทางการแพทย์. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. 2536. สถิติโรคมะเร็งที่พบในประเทศไทยประจำปี พ.ศ. 2536. กรุงเทพฯ.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม, วรพจน์ ชุณหคล้าย, บุษบา ฤกษ์อำนวยโชค และ อมรา คัมภิรานนท์. 2546. การศึกษาความไม่สมดุลของดีเอ็นเอบนโครโมโซมในโรคมะเร็งกระเพาะปัสสาวะโดยใช้เทคนิคคอมพาราทีฟจีโนมิคไฮบริไดเซชัน วารสารยูโร ปีที่ 24 ฉบับที่1; 8-16

อมรา คัมภิรานนท์. 2540. พันธุศาสตร์ของเซลล์ ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร

Antronelli A., Portesi E., Cozzoli A., Zanotelli T., Tardanico R., Batzarini P., Grigolato P.G and Cosciani C.S. 2003. The Collecting Duct Carcinoma of the Kidney A Cytogenetical study. European Urology, 43, 680-685.

Aurelia M.M., Andrea M.P., Kristine L.K. and Avery A.S. 1995. FISH Studies of Urinary Cells of Patients with Bladder Cancer. *Urol Oncol,* 1, 234-239.

Fadl-Elmula I., Kytola S., Pan Y., Lui W.O., Derienzo G., Forsberg L., Mandahl N., Gorunova L., Bergerheim U.S., Heim S. and Larsson C. 2001. Characterization chromosomal abnormalities in uroepithelial carcinomas by G-banding, spectral karyotyping and FISH analysis. *Int. J. Cancer*, 92, 824-831.

Gibas Z. and Gibas L. 1997. Cytogenetics of Bladder Cancer. *Cancer Genet Cytogenet* , 95, 108-115.

Giollant M., Perissel B., Wang M.R., Tchirkov A., Dos Santos E., Hemery B. and Malet P. Characterization of chromosomal changes in a bladder cancer cell line by classical cytogenetics, FISH and CGH. 1995. *Cancer Genetics and Cytogenetics,* 84, 152.

Guido S., Holger M., Urs W., Hedvika N., Thomas C.G., Gianfranco M., Michael J.M. and Frederic M.W. 1995. *Cancer Genet Cytogenet,* 82, 163-169.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Halling K.C., King W., Sokolova I.A. 2000. A comparison of cytology and fluorescence *in situ* hybridization for the detection of urothelial carcinoma. *Journal of Urology,* 164, 1768-1775.

Hiroaki S., Mikio I., Kazushi S., Masaharu T., Masao D., Masaki Y. and Leopoldo R., Christophere J. K. and Rajvir D. 2002. β-Catenin Mutations Correlate with Over Expression of C-myc and Cyclin D1 Genes in Bladder Cancer. *The Journal of Urology,* 168, 2220-2226.

Hussein M.K., Magdy S.A. and Nadia M. 2004. Chromosomal aberrations in Cis and Ta bilharzial bladder cancer: a theory of pathogenesis. *Urologic Oncology,* 22, 443–447.

Ishiwata S., Takahashi S., Homma Y., Tanaka Y., Kameyama Y., Hosaka Y. and Kitamura T. 2001. Noninvasive Detection and Prediction of Bladder Cancer by Fluorescence in situ Hybridization Analyysis of Exfoliated Urothelial Cell in Voided Urine. *Urology,* 57, 811–815.

Jaime B., Aurelia M.M., and Avery A.S. 1996. FISH Studies on the Y Chromosome Urinary Cells in Male. *Cancer Genet Cytogenet,* 88, 155-157.

Kallioniemi A., Kallioniemi O.P. and Citro G. 1995. Identification of gains and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer,* 12, 213-219.

Lisa S., Mariann C., Hans M., Thomas H., Niels M., Claus K. and Torben O. 2000. Loss of heterozygosity at 1p, 8p, 10p, 13q, and 17p in advanced urothelial cancer and lack of relation to chemotherapy response and outcome. *Cancer Genetics and Cytogenetics,* 123, 109-113.

Michael N., Urs W., Ulrico S., Daniel A., Tobias Z., Robert M., Goran A., Hartmut K., Marcus R. and Holger M. 1999. Polysomies but not Y chromosome losses have Prognostic significance in pTa/pT1 urinary bladder cancer. *Human Pathology,* 30, 81-86.

Sandberg A.A. and Berger C.S. 1994. Review of chromosome studies in urological tumors:: II. Cytogenetics and molecular geneties of bladder cancer. *The Journal of Urology,* 151, 545-560.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Slovak M.L., Tcheurekdjian L., Zhang F.F. and Murata-collins J.L. 2001. Simultaneous Detection of Multiple Genetic Aberrations in Single Cells by Spectral Fluorescence *in Situ* Hybridization. *Cancer Research,* 61, 831-836.

Stamoulia M.I., Panania A.D., Fertib A.D, Petrakia C., Oliver R.T.D., Raptisa S.A. and Young B.D. 2004. Detection of genetic alterations in primary bladder carcinoma with dual-color and multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics,* 149, 107-113.

Stefan D.,Kristin M., Ruth K., Peter J.W., Maximilian B., Arndt H. and Robert S. 2006. Improved clonality analysis of multifocal bladder tumors by combination of histopathologic organ mapping, loss of heterozygosity, fluorescence in situ hybridization, and p53 analyses. *Human Pathology,* 37, 143– 151.

Strefford J.C., Lillington D.M., Steggall M., Lane T.M., Nouri A.M.E., Young B.D. and Oliver R.T.D. 2002. Novel chromosome findings in bladder cancer cell lines detected with multiplex fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 135, 139-146.

Vogelstein B. and Kinzler K.W. 1992. Carcinogens leave fingerprints. *Nature,* 355, 209-210.

http://www.dpc6.ddc.moph.go.th/knowledge/cancer.pdf

http://www.elibonline.com/doctors/cancer_skin.html

http://www.chulacancer.net/p0000027_3.htm

http://www.mtsinai.on.ca/ pdmg/images/FISH.jpg

http://www.plwc.org/plwc/MainConstructor

http://www.si.mahidol.ac.th/sidoctor

http://www.thailabonline.com/scc7castat.htm

http://www.tumorprofiling.org

http://www.webpathology.com/image.cfm?n=22&Case=56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

- **LB agar** ในการเตรียม 1 ลิตร

Casein triptic peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Agar	15	กรัม
H_2O	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- **LB broth** ในการเตรียม 1 ลิตร

Casein triptic peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
H_2O	1000	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- **20 X SSC (pH 7)** ในการเตรียม 500 มิลลิลิตร

NaCl	87.66	กรัม
Tri-Na-citrate	44.12	กรัม

นำไปปรับ pH 7.0 (HCl)

Auto clave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

- **Blocking solution** ในการเตรียม 30 มิลลิลิตร

BSA	0.9	กรัม
4 X SSC/0.2%tween 20	30	มิลลิลิตร

ใส่หลอดขนาด 50 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- **Detection solution** ในการเตรียม 10 มิลลิลิตร

BSA	0.1	กรัม
4 X SSC/0.2%tween 20	10	มิลลิลิตร

ใส่หลอดขนาด 15 มิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

- **Deionized formamide** ในการเตรียม 10 มิลลิลิตร

Resin	0.5	กรัม
Formamide	10	มิลลิลิตร

กวนสารเป็นเวลา 30 นาที และ กรองเอา resin ออก แบ่งใส่หลอดทดลอง เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- **Hybridization buffer** ในการเตรียม 5 มิลลิลิตร

2 X SSC	5	มิลลิลิตร
Dextran sulfate	1	กรัม

แบ่งใส่หลอดทดลองเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

- **70% formamide/2X SSC** ในการเตรียม 10 มิลลิลิตร

Formamide	7	มิลลิลิตร
2 X SSC	3	มิลลิลิตร

- **PBS** ในการเตรียม 500 มิลลิลิตร

$MgCl_2$	2.5	มิลลิลิตร
Potassium dihydrogen phosphate	625	ไมโครลิตร
H_2O	500	มิลลิลิตร

ปรับ pH 7.2

Autoclave 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้