วิธีการทดลอง

กลุ่มประชากรที่นำมาศึกษา

กลุ่มศึกษา คือ ผู้ป่วยประชากรไทยที่เป็นโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย จำนวน 20 คน

1. การคัดเลือกประชากรเพื่อนำมาศึกษา

   <u>เกณฑ์การเลือกผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)</u>

   Inclusion criteria :

   - ผู้หญิงหรือผู้ชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปีเชื้อชาติไทย หรือ ไทยจีน
   - ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคสะเก็ดเงินชนิด chronic plaque typeโดย แพทย์ผู้เชี่ยวชาญทาง Dermatology พร้อมทั้งได้รับการตวจชิ้นเนื้อทางห้องปฏิบัติการเพื่อยืนยันผลการวินิจฉัย

   Exclusion criteria : ผู้ป่วยที่ไม่สมัครใจยินยอมเข้าร่วมงานวิจัย

   - ผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินที่ได้รับยาทาเฉพาะที่ภายใน 2 สัปดาห์ หรือ ยารับประทานรักษาโรคสะเก็ดเงินภายใน 4 สัปดาห์ก่อนเข้าร่วมการวิจัย
   - ผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและผู้ป่วยที่ได้รับยากลุ่ม Corticosteroid รวมถึงยากดภูมิคุ้มกันอื่น ๆ ขณะทำการศึกษา
   - ผู้ป่วยที่มีภาวะ Autoimmune disease อื่นๆ
   - ผู้ป่วยที่มีประวัติเป็นโรคมะเร็ง

   <u>เกณฑ์การเลือกกลุ่มควบคุม (control)</u>

Inclusion criteria : -

- อาสาสมัครหญิงหรือชายที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 18 ปีเชื้อชาติไทย หรือไทยจีน
- อาสาสมัครที่มีสุขภาพดี

Exclusion criteria : -

- มีประวัติครอบครัวเคยเป็นโรคสะเก็ดเงิน และอาสาสมัครมีประวัติเป็น autoimmune disease อื่นๆ

2. ผู้ป่วยยินยอมเข้าร่วมการศึกษาโดยลงนามในใบยินยอม
3. บันทึกข้อมูลที่สำคัญทางคลินิกของผู้ป่วย
   - ข้อมูลพื้นฐานทั่วไป (demographic data)
   - ประเมินความรุนแรงของโรค โดยอาศัยจากอาการ, ใช้ Psoriasis Area and Severity Index (PASI) score ซึ่งเป็น clinical score มาตราฐานในการประเมินความรุนแรงของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน

การเก็บตัวอย่างเลือดและการคัดแยกเซลล์

เก็บตัวอย่างเลือด 30 มล. ใน heparin tube นำมา

- ปั่นแยก peripheral blood mononuclear cell (PBMC) โดยใช้วิธี Ficoll-Hypaque density gradient และใช้ immunomagnetic bead ที่จำเพาะในการแยก CD4+ T cell, CD8+ T cell และ B cell
- ปั่นแยก neutrophile โดยใช้วิธี polymorph-prep density gradient

การเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อ

ผู้ป่วยจะได้รับการตัดชิ้นเนื้อโดยวิธี punch biopsy ซึ่งผู้วิจัยจะนำส่งตรวจพยาธิสภาพตามปกติ โดยการย้อม H&E และทำการตัดชิ้นเนื้อจาก paraffin section และ แบ่งชิ้นเนื้อบางส่วนเก็บ ที่อุณหภูมิ -80 องศา เพื่อเตรียม frozen section จากนั้นนำมาแยกเซลล์ชั้นหนังกำพร้าออกมาศึกษาโดยทำการแยกเซลล์ด้วยวิธี Laser capture microdissection (LCM)

สำหรับชิ้นเนื้อของคนปกติ ผู้วิจัยจะขอจากผู้ป่วยที่มารับการผ่าตัดศัลยกรรมตกแต่ง โดยทำการเก็บชิ้นเนื้อภายหลังจากที่ผู้ป่วยเซ็นใบยินยอมเข้าร่วมโครงการและทำการเก็บชิ้นเนื้อและแยกเซลล์เช่นเดียวกับชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย

การศึกษา **Genome-wide DNA methylation โดยใช้ repetitive sequences**

ทำการสกัด DNA จากเซลล์ที่แยกได้โดยใช้วิธี phenol-chloroform extraction และนำมาศึกษาลักษณะการเกิด methylation ในส่วน LINE-1 ซึ่งอยู่ในยีโนม โดยใช้วิธี Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) หลักการคือ นำ DNA ที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^{m}C) และนำไปเพิ่มจำนวนโดยการใช้ primers ที่จำเพาะ ซึ่งจะทำให้ amplicons ที่ได้มี Thymidine (T) แทน cytosine (C) ทั้งหมดยกเว้น methycytosine (^{m}C) ที่ไม่เปลี่ยน ดังนั้นจึงสามารถใช้ restriction enzyme ที่เหมาะสม เช่น Taq1 ตัดเพื่อแยกความแตกต่างได้ หลังจากนั้นจึงนำมาแยกสาย DNA โดยวิธี Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) และย้อมด้วย SYBR® Green แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ผล %Methylation ด้วยเครื่อง Phosphoimager

โดยการศึกษาภาวะการเกิด genome-wide methylation จะคิดเป็นเปอร์เซนต์และเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis) เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะ gemone-wide DNA methylation กับ การเกิดโรคสะเก็ดเงิน (psoriasis)

การศึกษานี้จะทำการศึกษาโดยใช้ DNA จากเซลล์หนังกำพร้า เซลล์เม็ดเลือดขาว T cell, B cell, non-T, non-B cell, และ neutrophil จากผู้ป่วยมาเปรียบเทียบกับคนปกติ กลุ่มละ 20 ราย

การศึกษา candidate genes

ทำการศึกษายีน 2 ยีนคือ ID4 และ BCAP31 ซึ่งคัดเลือกจากผล methylation microarray ซึ่งคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาไว้แล้ว

- การศึกษายีน ID4ทำการศึกษาดังนี้

- ศึกษาภาวะ DNA methylation ของยีน ID4 บริเวณ promoter

โดยวิธี methylation specific primer (MSP) โดยศึกษาใน human cell lines และเซลล์หนังกำพร้าในผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน เปรียบเทียบกับคนปกติและโรคอื่นๆได้แก่ โรค squamous cell carcinoma of skin และศึกษาใน human cell lines ต่างๆ โดยนำเซลล์หนังกำพร้าที่แยกโดยวิธี laser capture microdissection มาสกัด DNA การนำ DNA ที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^{m}C) นำ bisulfite treated DNA มา amplifly โดยใช้ primer 2 คู่ ที่จำเพาะกับ methylated และ non-methylated DNA และคัดเลือกตัวอย่างผู้ป่วย คนปกติ และ cell line อย่างละ 1 รายมาทำการ cloneing and sequencing เพื่อประเมินผลการศึกษาโดยวิธี MSP

- ศึกษาการแสดงออกของยีน ID4 โดยวัดระดับ mRNA โดยวิธี real-time RT-PCR

โดยสกัด total RNA จาก human cell lines ชนิดต่างๆโดยใช้ silica-based column จากนั้นสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยขบวนการ reverse-transcription และวัดปริมาณ cDNA ของยีนที่สนใจโดยวิธี real-time reverse polymerase chain reaction โดยใช้ hybridization probe

- ศึกษาการแสดงออกของยีน ID4 ระดับโปรตีนโดยวิธี immunohistochemistry

โดยนำชิ้นเนื้อบริเวณรอยโรคของผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน ผู้ป่วย squamous cell carcinoma of skin ผู้ป่วยเรื้องผื่นแพ้ชนิดเรื้อรัง ผิวหนังของคนปกติ และ human cell lines มาทำการย้อม immunohistochemistry โดยใช้ anti-ID4 anibody เพื่อดูการแสดงออกของ ID4 protein ที่ชั้นต่างๆของผิวหนังกำพร้า

- การศึกษายีน BCAP31

- ศึกษาภาวะ DNA methylation ของยีน BCAP31 บริเวณ promoter

โดยเริ่มศึกษาระดับ DNA methylation ของยีน BCAP31 บริเวณ promoter ใน human cell lines ทั้งหมด 11 cell lines และ PBMC จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ กลุ่มละ 10 ราย จากนั้นนำดีเอนเอที่สกัดได้มาเติมสาร sodium bisulfite ซึ่งจะเปลี่ยน cytosine (C) ให้เป็น uracil (U) แต่จะไม่เปลี่ยน methylcytosine (^{m}C) นำ bisulfite treated DNA มาทำการ cloning and sequencing ตัวอย่างละ 10 โคลน และทำการวเคราะห์ CpG บนโปรโมเตอร์ของยีน ที่ตำแหน่ง 36,167 ถึง 37,432 ของฐานข้อมูล U52111.3 ซึ่งมีทั้งสิ้น 48 ตำแหน่ง

- ศึกษาการแสดงออกของยีน BCAP31 โดยวัดระดับ mRNA โดยวิธี real-time RT-PCR

โดยสกัด total RNA โดยใช้ silica-based column จากนั้นสร้าง complementary DNA (cDNA) โดยขบวนการ reverse-transcription และวัดปริมาณ cDNA ของยีนที่สนใจโดยวิธี real-time reverse polymerase chain reaction โดยใช้ hybridization probe ซึ่งทำการศึกษาใน human cell lines ชนิดต่างๆ และ PBMC จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงินและคนปกติ กลุ่มละ 10 ราย

การศึกษาระดับซีรั่ม IL-22 ก่อนและหลังการรักษาโดยยาเมโทรเทกเซต

โดยการเก็บ clot blood จากผู้ป่วยโรคสะเก็ดเงิน และคนปกติ จำนวน 5 cc นำนาปั่นแยกซีรั่ม เก็บไว้ที่ -20 องศา สำหรับผู้ป่วยภายหลังทำการรักษาโดยยาเมโทรเทกเซต สัปดาห์ละ15 mg นาน 12 สัปดาห์ จะทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บซีรั่มอีกครั้ง จากนั้นนำซีรั่มที่ได้มาวัดระดับ IL-22 โดยวิธี ELISA โดยใช้ enzyme-linked immunosorbent assay kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

การสรุปข้อมูลใช้ mean±SD, median, interquartile range และ proportion การทดสอบสมมติฐานของการศึกษาใช้ Wilcoxon signed rank test การทดสอบความแตกต่าง [Test of difference] ใช้ Mann-Whitney test และ Kruskal-Wallis test ทดสอบ correlation ใช้ Spearman correlation วิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS version 16 และจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น α=0.05