บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซต์ของอาสาสมัครที่เป็นบุคลากรทางรังสีในหน่วยงานรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ และประชาชนทั่วไปที่ไม่มีประวัติการทำงานเกี่ยวกับรังสี โดยมีสมมุติฐานงานวิจัย คือ รังสีเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม ซึ่งบุคลากรทางรังสีมีโอกาสได้รับรังสีจากการปฏิบัติงานจึงเป็นกลุ่มเสี่ยงของการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม จึงทำการศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซต์ของบุคลากรในหน่วยรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์เปรียบเทียบกับประชาชนทั่วไป เพื่อประเมินความเสี่ยงของบุคลากรที่ทำงานเกี่ยวกับรังสี

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

การศึกษาวิจัยนี้ ดำเนินงานที่หน่วยรังสีรักษาและมะเร็งวิทยา ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ มีดังนี้

1) เก็บตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครคนละ 4 มิลลิลิตร โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่ข้อพับแขน ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่เคลือบด้วย Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เก็บที่อุณหภูมิห้อง การเจาะเลือดมีพยาบาลวิชาชีพที่มีความชำนาญเป็นผู้ทำการเจาะเลือดโดยใช้เทคนิคปลอดเชื้อ

2) Density gradient medium ไอโซเปรบ (Isoprep™) จากบริษัท Ribbins Scientific

Density gradient medium ไอโซเปรบ (Isoprep™) คือ สารที่มีความหนาแน่นเท่ากับความหนาแน่นของลิมโฟไซต์ ใช้ในการแยกลิมโฟไซต์ออกจากเลือดร่วมกับการปั่นแยกด้วยความเร็วที่เหมาะสม

3) สารละลายไฮโปโทนิค (KCl 0.075M)

สารละลายไฮโปโทนิค คือ สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าความเข้มข้นสารละลายภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เต่ง ขยายขนาด เนื่องจากเกิดการแพร่ของน้ำ จากสารละลายภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์

4) อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด อาร์พีเอ็มไอ 1640 ชนิดที่มีซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ (RPMI 1640 serum 20%) จากบริษัท Gibco™

5) สารกระตุ้นการแบ่งเซลล์ไฟโตฮีแม็คกลูตินิน (Phytohemagglutinin M, PHA-M) จากบริษัท Gibco™

6) สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; 0.9% NaCl)

7) น้ำยาคงสภาพเซลล์ ที่มีอัตราส่วนของ เมททานอลต่อกรดอะซิติกเข้มข้น 3 ต่อ 1 (Carnoy's solution, methanal:acetic acid ; 3:1)

8) สารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)

9) สีย้อมตัวอย่างเซลล์ (Giemsa stain) จากบริษัท Fisher Chemicals

10) สารยับยั้งการแบ่งเซลล์ โคลซิมิด (Colcemid) จากบริษัท Gibco™

11) แผ่นสไลด์แก้วและแผ่นปิดสไลด์

12) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge ยี่ห้อ eppendorf รุ่น 5702, Germany) เป็นเครื่องมือสำหรับสร้างแรงเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง เพื่อนำไปใช้แยกสารหรืออนุภาค โดยอาศัยหลักความแตกต่างของความหนาแน่น ขนาดของสาร หรืออนุภาคนั้น ๆ ใช้ในกระบวนการเตรียมตัวอย่าง ใช้ปั่นแยกสารสำหรับวิเคราะห์ ใช้แยกตัวอย่างส่วนที่เป็นของแข็งออกจากตัวอย่างส่วนของเหลว หรือใช้เพื่อแยกของเหลวหลาย ๆ ชนิดที่มีความถ่วงจำเพาะต่างกันให้เกิดการแยกชั้น ดังรูป 3.1

รูป 3.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge ยี่ห้อ eppendorf รุ่น 5702, Germany)

13) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath ยี่ห้อ GFL รุ่น 1086, Germany) เป็นอ่างน้ำ ควบคุมระดับอุณหภูมิได้ โดยมีความคงที่ของอุณหภูมิอยู่ที่ $\pm$ 0.1 องศาเซลเซียส ใช้เพื่อการศึกษา ทดลอง วิจัยทางด้านเคมีและชีววิทยา ที่ต้องการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่จุดใดๆ ดังรูป 3.2

รูป 3.2 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Shaking water bath ยี่ห้อ GFL รุ่น 1086, Germany)

14) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

เครื่องผสมสารละลาย (BIOSAN รุ่น Combi-Spin) ใช้ในการผสมสารละลาย ดังรูป 3.3

รูป 3.3 เครื่องผสมสารละลาย (BIOSAN รุ่น Combi-Spin)

15) ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Laminar flow)

ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Bioair instrument รุ่น s@feflow 1.2, Italy) ใช้ในการเตรียมเซลล์หรือสารเคมีที่อยู่ภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ ดังรูป 3.4

รูป 3.4 ตู้ปฏิบัติการปลอดเชื้อ (Bioair instrument รุ่น s@feflow 1.2, Italy)

16) ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Incubator)

ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Sunyo, Japan) ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิดต่างๆ โดยสามารถปรับค่าอุณหภูมิและปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมของเซลล์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงได้ ดังรูป 3.5 ในการเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ ทำการเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์

รูป 3.5 ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ (Sunyo, Japan)

17) ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Flask)

ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Integra Biosciences, USA) ใช้สำหรับเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์ มีพื้นที่ของการเลี้ยงเซลล์ 25 ตารางเซนติเมตร ดังรูป 3.6

รูป 3.6 ขวดพลาสติกสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Integra Biosciences, USA)

18) กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CX-31, Japan) ใช้ในการศึกษาตัวอย่างขนาดเล็ก เช่น เซลล์ชนิดต่างๆ เนื้อเยื่อตัวอย่าง และโครโมโซม เป็นต้น สามารถปรับเลนส์วัตถุ (objective lens) ได้หลายค่า เช่น 10x 20x 40x และ 100x ดังรูป 3.7

รูป 3.7 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CX-31, Japan)

19) ชุดรับภาพและถ่ายภาพ (Digital camera)

ชุดรับภาพและถ่ายภาพ (DSLR Canon EOS 500D, Japan) เป็นกล้องระบบดิจิตอล (digital) ใช้ต่อกับกล้องจุลทรรศน์ เพื่อถ่ายรูปโครโมโซม ดังรูป 3.8

รูป 3.8 ชุดรับภาพและถ่ายภาพ (DSLR Canon EOS 500D, Japan)

3.2 ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

ในการศึกษาวิจัย แบ่งออกเป็นขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 ศึกษาข้อมูลของบุคลากรทางรังสีและประชาชนทั่วไป

3.2.1.1 บุคลากรทางรังสีในหน่วยรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ที่สมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย โดยมี inclusion และ exclusion criteria ดังนี้

Inclusion criteria

- เป็นบุคลากรของหน่วยรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ที่มีโอกาสได้รับรังสีในการปฏิบัติงาน

- มีข้อมูลปริมาณรังสีที่ได้รับ

- ไม่เคยได้รับการตรวจพิเศษทางรังสี เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ฟลูออโรสโคปี (fluoroscopy) หรือการรักษาด้วยรังสี

Exclusion criteria

- เป็นบุคลากรของหน่วยรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ที่ไม่มีโอกาสได้รับรังสีในการปฏิบัติงาน

- ไม่มีข้อมูลปริมาณรังสีที่ได้รับ

- เคยได้รับการตรวจพิเศษทางรังสี เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ฟลูออโรสโคปี หรือการรักษาด้วยรังสี

โดยเก็บข้อมูลของเจ้าหน้าที่จากหน่วยรังสีรักษาและเวชศาสตร์นิวเคลียร์ดังนี้

1) อายุ

2) เพศ จำแนกเป็น

- ชาย

- หญิง

3) ระยะเวลาในการปฏิบัติงาน (ปี)

4) ประวัติการรับรังสี จำแนกเป็น

- มี

- ไม่มี

5) ประวัติ การสูบบุหรี่ จำแนกเป็น

- สูบ

- ไม่สูบ

6) ประวัติการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ จำแนกเป็น

- ดื่ม

- ไม่ดื่ม

7) การใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic drugs) หรือสารเคมีที่อาจมีผลต่อ ดีเอ็นเอ จำแนกเป็น

- เคยใช้

- ไม่เคยใช้

8) ตรวจสุขภาพโดยการใช้รังสีในการเอกซเรย์ปอด จำแนกเป็น

- เคยตรวจ
- ไม่เคยตรวจ

9) ปริมาณรังสีสะสมต่อปี โดยที่มาของข้อมูลมาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข จำแนกได้เป็น

- Hp(0.07) (μSv/yr) คือ ปริมาณรังสีที่ความลึก 0.07 มิลลิเมตร จากผิว แทนปริมาณรังสีที่ผิวหนัง
- Hp(10) (μSv/yr) คือ ปริมาณรังสีที่ความลึก 10 มิลลิเมตร จากผิว แทนปริมาณรังสีที่ลำตัว (26)

3.2.1.2 ประชาชนทั่วไปที่สมัครใจเข้าร่วมเป็นอาสาสมัครในการวิจัย โดยมี inclusion และ exclusion criteria ดังนี้

Inclusion criteria

- ประชาชนทั่วไปที่ไม่เคยปฏิบัติงานเกี่ยวกับรังสี
- ไม่เคยได้รับการตรวจพิเศษทางรังสี เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ฟลูออโรสโคปี หรือการรักษาด้วยรังสี

Exclusion criteria

- ประชาชนทั่วไปที่เคยปฏิบัติงานเกี่ยวกับรังสี
- เคยได้รับการตรวจพิเศษทางรังสี เช่น เอกซเรย์คอมพิวเตอร์ ฟลูออโรสโคปี หรือการรักษาด้วยรังสี

โดยทำการเก็บข้อมูลจากกลุ่มประชาชนทั่วไป ดังนี้

1) อายุ

2) เพศ จำแนกเป็น

- ชาย
- หญิง

3) ประวัติ การสูบบุหรี่ จำแนกเป็น

- สูบ
- ไม่สูบ

4) ประวัติการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ จำแนกเป็น

- ดื่ม
- ไม่ดื่ม

5) การใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic drugs) หรือสารเคมีที่อาจมีผลต่อ ดีเอ็นเอ จำแนกเป็น

- ใช้
- ไม่ใช้

6) ตรวจสุขภาพโดยการใช้รังสีในการเอกซเรย์ปอด จำแนกเป็น

- เคยตรวจ
- ไม่เคยตรวจ

3.2.2 การเก็บตัวอย่างเลือดและการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

การศึกษารูปร่างและจำนวนโครโมโซมของมนุษย์สามารถศึกษาได้จากเซลล์ต่างๆ เช่น เซลล์ไขกระดูก เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ การศึกษาจากลิมโฟไซต์เป็นวิธีที่สะดวกที่สุด ในการศึกษาครั้งนี้ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของตัวอย่างคนละ 4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่เคลือบด้วย EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยเก็บที่อุณหภูมิห้องและนำไปแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ทันที การแยกลิมโฟไซต์ออกจากเลือดทำได้โดยอาศัยคุณสมบัติที่เซลล์ต่างชนิดมีความหนาแน่นแตกต่างกัน จึงสามารถแยกออกจากกันได้โดยการปั่นเหวี่ยงบน density gradient โดยนำเลือดที่ได้ไปเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ 3 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในหลอดสำหรับปั่นเหวี่ยงที่มีไอโซเปรบ ซึ่งมีความหนาแน่น 1.077 g/ml โดยการเติมเลือดลงไปนั้นให้ทำอย่างช้าและระมัดระวังเพื่อไม่ให้เลือดปนกับ ไอโซเปรบ โดยเลือดจะอยู่เหนือชั้นของไอโซเปรบ จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 1200g เป็นเวลา 20 นาที และปล่อยให้ rotor หยุดเองอย่างช้าๆ โดยไม่ใช้เบรค เมื่อปั่นเหวี่ยงแล้วเซลล์จะแยกชั้นกัน เม็ดเลือดแดง จะอยู่ที่ก้นหลอด ได้ไอโซเปรบอยู่เหนือส่วนของเม็ดเลือดแดง ส่วนลิมโฟไซต์จะอยู่ระหว่างไอโซเปรบกับ plasma ซึ่งจะเห็นเป็นวงสีขาวและสามารถใช้ปิเปตต์ดูดออกมาเพื่อนำไปปั่นล้างด้วย สารละลายโซเดียมคลอไรด์จำนวน 3 รอบ ก็จะได้ลิมโฟไซต์ โดยมีวิธีการดังนี้

3.2.2.1 นำลิมโฟไซต์ที่ปะปนในไอโซเปรบที่ดูดออกมาใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ต่อจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวตกตะกอนด้วยความเร็ว 500g เป็นเวลา 10 นาที

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.2.2.2 ดูดเอาสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้งให้เหลือแต่ในส่วนของลิมโฟไซต์ ทำการ resuspend ลิมโฟไซต์ให้กระจายตัว ต่อจากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ลงไป 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงเพื่อให้เซลล์เม็ดเลือดขาวตกตะกอนด้วยความเร็ว 500g เป็นเวลา 10 นาที

3.2.2.3 ทำซ้ำตามวิธีในข้อ (3.2.2.2) อีก 1 รอบ

นำลิมโฟไซต์ไปเลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 ที่มีซีรัม 20 เปอร์เซ็นต์ 7 มิลลิลิตร เติมสารไฟโตฮีแม็คกลูตินิน (PHA) 100 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นให้ลิมโฟไซต์มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส นำไปเพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์คือ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์จะแบ่งตัวและอยู่ในระยะเมทาเฟสเป็นจำนวนมาก ทำการหยดสารละลายโคลซิมิด จำนวน 210 ไมโครลิตร ก่อนครบกำหนดเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อหยุดยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ให้อยู่ในระยะเมทาเฟสเพื่อจะได้เห็นโครโมโซมชัดเจนที่สุด จากนั้นเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบ 48 ชั่วโมง จึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

3.2.3 การเก็บเกี่ยวเซลล์

การเก็บเกี่ยวเซลล์มีขั้นตอนตามลำดับต่อไปนี้

3.2.3.1 นำเซลล์ที่เลี้ยงครบ 48 ชั่วโมง ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนของเซลล์ ทำการ resuspend ให้เซลล์กระจายตัว

3.2.3.2 ค่อย ๆ เติมสารละลาย PBS ลงไปทีละน้อยจนครบ 5 มิลลิลิตร ในขณะเติมสารละลาย PBS ใช้เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) ช่วย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนของเซลล์ ทำการ resuspend ให้เซลล์กระจายตัว

3.2.3.3 ค่อย ๆ เติมสารละลายไฮโปโทนิค ความเข้มข้น 0.075M ลงไปทีละน้อยจนครบ 10 มิลลิลิตร ในขณะเติมสารละลายไฮโปโทนิคให้ใช้เครื่องผสมสารละลายช่วย โดยสารละลายไฮโปโทนิคจะทำให้เซลล์บวมและพองตัวออกจากกัน และตั้งทิ้งไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปตกตะกอนโดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนของเซลล์ ทำการ resuspend ให้เซลล์กระจายตัว

3.2.3.4 ค่อย ๆ เติมน้ำยาคงสภาพเซลล์ (Carnoy's solution) ลงไปทีละน้อยจนครบ 10 มิลลิลิตร ในขณะเติมน้ำยาคงสภาพเซลล์ให้ใช้เครื่องผสมสารละลายช่วย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 2000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้ง ให้เหลือแต่ส่วนของเซลล์ ทำการ resuspend ให้เซลล์กระจายตัว

3.2.3.5 ทำซ้ำตามวิธีในข้อ (3.2.3.4) อีก 2 รอบเพื่อทำการล้างเซลล์ ในรอบสุดท้ายดูดสารละลายที่ใสในส่วนบนทิ้ง ให้เหลือส่วนของเซลล์และสารละลายส่วนบนประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ทำการ resuspend ให้เซลล์กระจายตัว

3.2.3.6 ใช้พาสเจอร์ปิเปตชนิดแก้วดูดตะกอนเซลล์ แล้วนำไปหยดบนแผ่นสไลด์ที่มีฟิล์มบางๆของน้ำเคลือบอยู่ ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปย้อมสี เพื่อตรวจดูโครโมโซมต่อไป

3.2.4 การย้อมสีตัวอย่างเซลล์

ทำการย้อมสีตัวอย่างเซลล์ด้วยสีย้อมตัวอย่างจิมซ่าส์ โดยนำสไลด์ที่เตรียมไว้มาย้อมด้วยสีจิมซ่าส์ เป็นเวลา 7 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าเพื่อล้างสีส่วนที่เกินออก ผึ่งให้แห้งแล้วนำไปตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม

3.2.5 การตรวจนับโครโมโซมและตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม

นำสไลด์ตัวอย่างไปศึกษาโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ตรวจหาเมทาเฟสเซลล์ ตรวจนับจำนวนโครโมโซมในเมทาเฟสเซลล์ที่มีจำนวนโครโมโซมตั้งแต่ 40 โครโมโซมขึ้นไป พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนของรูปแบบที่ผิดปกติของโครโมโซมจากไดเซนทริคโครโมโซม

ทดสอบหาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมที่จะต้องศึกษาต่อตัวอย่าง โดยการตรวจสอบหาจำนวนไดเซนทริคโครโมโซมจาก 1 ตัวอย่าง จากเซลล์จำนวน 100, 200, 300, 400 และ 500 เซลล์แล้วนำมาวิเคราะห์ความถี่ของการเกิดความผิดปกติ เพื่อทำการตรวจสอบหาจำนวนโครโมโซมที่ใช้ในการวิเคราะห์ทั้งหมดต่อคน ต่อจากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยวิธีการทางสถิติ

3.2.6 การบันทึกภาพ

บันทึกภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ อุปกรณ์ถ่ายภาพระบบดิจิตอล โดยบันทึกภาพลงในคอมพิวเตอร์เพื่อง่ายต่อการนำมาตรวจนับจำนวนโครโมโซมและวิเคราะห์ความผิดปกติ

3.3 สถิติที่ใช้ในการวิจัย

นำข้อมูลทั้งหมดมารวบรวม ทำการตรวจสอบความผิดปกติของข้อมูล แล้วจึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลการเกิดไดเซนทริคโครโมโซม สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย

3.3.1 สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive Statistics) เพื่อใช้ในการอธิบายข้อมูลทั่วไป เช่น ร้อยละ ค่าเฉลี่ย มัธยฐาน พิสัย ค่าพิสัยระหว่างควอไทล์ และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.3.2 สถิติเชิงอนุมาน (Inference Statistics) เพื่อใช้สรุปอ้างอิงไปยังประชากร โดยใช้วิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจีสติก

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซต์ โดยใช้วิธีการ Dicentric assay และหาความสัมพันธ์ของความผิดปกติของโครโมโซมในลิมโฟไซต์กับประวัติการรับรังสีของบุคลากรใน ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ โดยที่ตัวแปรตามที่ต้องการศึกษาคือ การเกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิดไดเซนทริค ซึ่งได้จากการจัดกลุ่มตัวแปรเชิงปริมาณ คือ ปริมาณการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิดไดเซนทริค แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ผิดปกติ/ ไม่ผิดปกติ สำหรับการเลือก cut off ในการจัดกลุ่มจะใช้ค่า background ที่ได้จากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยต่าง ๆ ซึ่งมีค่า background เท่ากับ 1 ถึง 2 โครโมโซมต่อ 1000 เมทาเฟสเซลล์ ดังนั้น ถ้าหากพบความผิดปกติของโครโมโซมชนิดไดเซนทริคตั้งแต่ 1 โครโมโซมขึ้นไปจะถือว่าผิดปกติ ซึ่งลักษณะตัวแปรดังกล่าวจะพบได้บ่อยในการวิจัยทางด้านการแพทย์และสาธารณสุข การวิเคราะห์ด้วยการถดถอยเชิงเส้นทั่วไปจึงไม่เหมาะสม เนื่องจากตัวแปรตามมีค่า เป็นไปได้ 2 ค่า ซึ่งไม่มีการแจกแจงแบบปกติตรงตามข้อสมมติฐานทั่วไปของการถดถอยเชิงเส้นและทำให้ค่าคลาดเคลื่อนไม่มีการแจกแจงแบบปกติด้วย จึงจำเป็นต้องเลือกใช้วิธีการอื่น และวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันมากคือ การวิเคราะห์การถดถอยโลจีสติก (Logistic regression analysis)

โดยทำการวิเคราะห์การถดถอยโลจีสติกตัวแปรเดียวก่อน (Univariate logistic regression) ซึ่งเกณฑ์การพิจารณาว่าตัวแปรใดจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิดไดเซนทริค คือ ค่า P-value ≤ 0.05 จากนั้นวิเคราะห์หลายตัวแปร (Multivariate logistic regression) โดยคัดเลือกตัวแปรอิสระที่มีค่า P-value ≤ 0.20 ที่ได้จากการวิเคราะห์ถดถอยโลจีสติกตัวแปรเดียวเพื่อนำมาเข้าสู่การทดสอบในการวิเคราะห์การถดถอยโลจีสติกหลายตัวแปร ซึ่งเกณฑ์การตัดสินใจว่าตัวแปรใดจะเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิดไดเซนทริคคือ ค่า P-value ≤ 0.05 โดยการคัดเลือกตัวแปรอิสระในการวิเคราะห์การถดถอยโลจีสติก จะใช้วิธี Backward Likelihood Ratio