เอกสารอ้างอิง

สุภา ณ นคร. ใน โลหิตวิทยา, ครั้งที่ 1, หน้า 746 - 775, สำราญนิยกร สโมสรนักศึกษาแพทย์ศิริราช, 2511

Arnett, F.C., Bias, W.B. and Shulman, L.E. "HL - A Antigens in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)" Arthritis and Rheumatism 15(1972) : 428 - 429.

Arnett, F.C. and Shulman, L.E. "Studies in Familial Systemic Lupus Erythematosus" Medicine 55(1976) : 313 - 322.

Amos, D.B. and Ward, F.E. in HLA and Disease (Dausset, J. and Svejgaand, A. eds.) pp. 269 - 279. Williams & Silkins Co., Baltimore, 1977.

Batchelor, J.K., Welsh, K.I., Tinoco, R.M., Dollery, C.T., Hughes, G.R., Bernstein, R., Pyan, P., Naish, P.F., Aber, G.M., Bing, R.F. and Russell, G.I. "Hydralazine - induced Systemic Lupus Erythematosus : influence of HLA - DR and sex in susceptibility" Lancet, 1(1980) : 1107 - 9.

Black, C.M., Welsh, K.I., Fielder, A., Hughes, G.R.V. and Batchelor, J.R. "HLA antigens and Bf allotypes in HLE : evidence for the association being with specific haplotypes" Tissue Antigens 19(1982) : 115 - 120.

Bell, D.A., Rigby, R., Stiller, C.R., Clark, W.F., Harth, M. and Ebers, G. "HLA antigens in systemic lupus erythematosus : relationship to disease severity, age at onset, and sex" The Journal of Rheumatology 11(1984) : 475 - 479.

Bodmer, J. and Bodmer, W. "Histocompatibility 1984" Immunology today 5(1984) : 251 - 254.

Celada, A., Barras, C., Benzonana, G. and Jeannet, M. "Increased frequency of HLA - DRw in systemic lupus erythematosus" The New England Journal of Medicine 301(1979) : 1398.

Celada, A., Barras, C., Benzonana, G. and Jeannet, M. "Increased frequency of HLA - DR3 in systemic lupus erythematosus" Tissue Antigens 15(1980) : 283 - 288.

Charoenwongse, P. Kangwanshiratada, O. and Noppornpunth V. "HLA Antigens in Thais" in Proceedings of The third Asia and Oceania Histocompatibility Workshop Conference (Aizawa. ed.) in press.

Dostal, C., Ivanyi, D., Macurova, H., Hana, I. and Strejcek, J. "HLA antigens in systemic lupus erythematosus" Journals of the Rheumatic Disease 36(1977) : 83 - 85.

De Wolf, W.C., Dupont, B. and Yunis, E.J. "HLA and disease : current concepts" Human Pathology 11(1980) : 332 - 336.

Grumet, F.C., Coukell, A., Bodmer, J.G. Bodmer, W.F. and McDevitt, H.O. Histocompatibility (HL - A) antigens associated with systemic lupus erythematosus" The New England Journal of Medicine 285(1971) : 193 - 196.

Goldberg, M.A. Arnett, F.C., Bias, W.B. and Shulman, L.E. "Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus" Arthritis and Rheumatism 19(1976) : 129 - 132.

Gladman, D.D., Terasaki, P.I., Park, M.S., Iwaki, Y., Louie, S., Quismorio, F.P., Barnett, E.V. and Liebling, M.R. "Increased frequency of HLA - DRw2 in SLE" Lancet 301(1979): 902.

Griffing, W.L., Moore, S.B., Lathra, H.S, McKenna, C.H. and Fathwan, C.G. "Associations of antibodies to native DNA with HLA - DRw3: A possible Major Histocompatibility Complex linked human immune response gene" J. Exp. Med. 152(1980) : 319s - 325s.

Gardner, E.J. and Snustad, D.P. in Principle of Genetics, 7th ed., pp. G - 6, John Wiley & Sons, Inc., U.S.A., 1984.

Ivanyi, D., Dostal, C. and Mrklas, L. "HLA - B8 in Systemic Lupus Erythematosus" Tissue Antigens 8(1976) : 91 - 93.

Kampf, D., Malchus, R., Alexander, M. and Hoppe, I. "HLA - Antigens in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)" Archives of Dermatological Research 350(1979) : 345 - 349.

Kameda, S., Naito, S., Tanaka, K., Kajiyama, K., Nishigouri, S., Jimi, S. and Yanase, T. "HLA antigens of patients with systemic lupus erythematosus in Japan" Tessue Antigens 20(1982) : 221 - 222.

McDevitt, H.O. and Bodmer, W.F. "Histocompatibility Antigens, Immune Responsiveness and Susceptibility to Disease" The American Journal of Medicine 52(1972) : 1 - 8.

McDevitt, H.O. "Current concepts in immunology : Reguration of the immune response by the major histocompatibility system" The New England Journal of Medicine 303(1980) : 1514 - 1517.

Madsen, M. "HLA - DR Antigens : Aspects in Relation to serology, Genetics and Clicnical Renal Transplantation" Ph.D. Dissertation. Aarhus University, 1983.

Nies, K.M., Brown, J.C., Dobois, E.L., Quismorio, F.P., Friou, G.J. and Terasaki, P.I. "Histocompatibility (HL - A) Antigens and Lymphocytotoxic Antibodies in Systemic Lupus Erythematosus (SLE)" Anthritis and Rheumatism 17(1974) : 397 - 402.

Rigby, R.J., Dawkins, R.L., Wetherall, J.D. and Hawkins, B.R. "HLA in Systemic Lupus Erythematosus : Influence on Severity" Tissue Antigens 12(1978) : 25 - 31.

Ryder, L.P., Svejgaard, A. and Dausset, J. "Genetics of HLA disease association" Ann. Rev. Genet. 15(1981) : 169 - 187.

Svejgaard, A. and Ryder, L.P. in HLA and disease (Dausset, J. and Svejgaard, A. eds.) pp. 46 - 71. William & Wilkins Co., Baltimore, 1977.

Stern, R., Fu, S.M., Fotino, M., Agnello, V. and Kunkel, H.G. "Hereditary C2 deficiency association with skin lesions resembling the discoid lesion of systemic lupus erythematosus" Arthritis and Rheumatism 19(1976) : 517 - 522.

Scherak, O., Smolen, J.S. and Mayr, W.R. "HLA - DRw3 and systemic lupus erythematosus" Arthritis and Rheumatism 23(1980) : 954 - 957.

Sasazuki, T., Kaneoka, H., Nishimaru, Y., Kaneoda, R., Hayama, M. and Ohkuni, H. "An HLA - linked immune suppression gene in man" J. Exp. Med. 152(1980) : 297s - 313s.

Sontheimer, R.D., Maddison, P.J., Reichlin, M., Jordon, R.E., Staslny, P. and Gilliam, J.N. "Serologic and HLA Associations in Subacute Cutaneous Lupus Erythematosus, a Clinical Subset of Lupus Erythematosus" Annals of Internal Medicine 97(1982) : 664 - 671.

Schur, P.H., Meyer, I., Garovoy, M. and Carpenter, C.B. "Associations between Systemic Lupus Erythematosus and the Major Histocompatibility Complex : Clinical and Immunological Considerations" Medical Immunology and Immunopathology 24(1982) : 263 - 275.

Thompson, J.S. and Thompson, M.W. in Genetics in Medicine, 3rd. ed., pp. 81 - 99, W.B. Saunders Co., U.S.A., 1980.

The Rheumatism Review Subcommittee of the American Rheumatism Association." Twenty - fifth Rheumatism Review : Review of the American and English Literature for the Years 1979 and 1980" Arthritis and Rheumatism 26(1983) : 301 - 310.

Tan, E.M., Cohen, A.S., Fries, J.F., Masi, A.T., McShane, D.J., Rothfield. N.F., Schaller, J.G., Talal, N. and Winchester, R.J. "The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus" Arthritis and Rheumatism 25(1982) : 1271 - 1275.

Van Den Tweel, V.G., Dugas, D.J. and Loon, J. "The Biology of the HL - A System and the Association with Malignant Lymphomas" American Journal of Clinical Pathology 72(1979) : 732 - 735.

Whittingham, S., Mathews, J.D., Schanfield, M.S., Tait, B.D. and Mackay, I.R. "Effect of Gene Interaction on Susceptibility to Disease" Tissue Antigens 17(1981) : 252 - 254.

Welsh. K. "HLA genes, immunoalobulin genes and human disease" Nature 292(1981) : 673 - 674.

Whittingham, S., Mathaws, J.P., Schanfield, M.S., Tait, B.D. and Mackay, I.R. "HLA and Gm genes in systemic lupus erythematosus" Tissue Antigens 21(1983) : 50 - 57.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

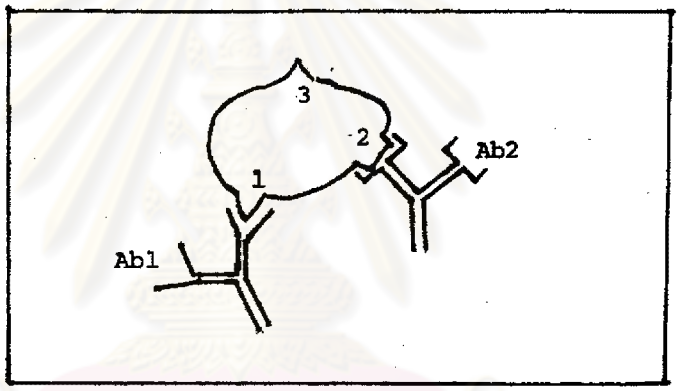
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ความหมายของศัพท์เทคนิค

1. complement เป็นกลุ่มของโปรตีนหลายตัวในน้ำเหลืองสด ซึ่งช่วยให้แบคทีเรียหรือเซลล์ที่มีแอนติบอดีจับอยู่ถูก phagocyte จับกินได้ง่ายขึ้นหรือถูกทำให้แตกสลายได้ และยังช่วยเสริมและควบคุมการอักเสบบางอย่างของร่างกายด้วย

2. antigenic determinant เป็นตำแหน่งบนพื้นผิวของแอนติเจนที่สามารถจับยึดกับแอนติบอดีหรือลิมโฟซัยต์ชนิดเซลล์ T ที่ถูกกระตุ้นแล้ว (sensitized T cell)



รูปที่ 4 antigenic determinant 1, 2 ทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติบอดี (Ab) 1, 2 ตามลำดับ

3. mixed lymphocyte reaction (MLR) เป็นปฏิกริยาที่เกิดขึ้นเมื่อนำลิมโฟซัยต์ของคน 2 คนมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในหลอดทดลอง ถ้าลิมโฟซัยต์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีระบบ HLA แตกต่างกันจะทำให้เกิดการกระตุ้นซึ่งกันและกัน และจะทำให้เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อ่อนเกิดขึ้น (blast formation) ถ้าลิมโฟซัยต์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีระบบ HLA เหมือนกันจะไม่เกิดการแบ่งตัวของเซลล์อ่อน

4. haplotype คือ set ของยีนในแต่ละ series ของ HLA ที่อยู่บนโครโมโซมแท่งเดียวกัน ตัวอย่างเช่น HLA - A1, HLA - B5, HLA - Cw1, HLA - Dw1 และ HLA - DRw1 ประกอบกันเรียกว่า haplotype haplotype นี้จะถ่ายทอดไปยังลูกทั้งหมดไม่แยกจากกัน นอกจากมี crossing over ดังนั้นลูกจะได้รับ haplotype มาจากพ่อและแม่ข้างละ 1 haplotype

ภาคผนวก ข.

การจัดเตรียม typing tray

การตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA-A และ HLA-B ใช้วิธี serologically defined โดยอาศัยแอนติบอดีในการตรวจ

คุณภาพของแอนติบอดีที่จะใช้ในการจัดเตรียม typing tray เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการตรวจทาง serologically defined แอนติบอดีที่ได้รับการคัดเลือกมาใช้ใน typing tray เรียกว่า typing sera หลักเกณฑ์ที่ใช้พิจารณาคัดเลือก typing sera มี 3 ประการได้แก่

1) typing sera ควรเป็นแอนติบอดีได้มาจากซีรั่มชาติเดียวกัน เพื่อความถูกต้องแน่นอนในการแปลผลแอนติเจน

2) typing sera ที่ดีควรเป็น monospecific sera คือ ทำปฏิกริยาจำเพาะกับแอนติเจน 1 ชนิด และมีความแรงพอที่จะทำให้เกิดผลบวกได้ 100 % เพื่อป้องกันการเกิดผลลบปลอม (false negative) ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแปลผลได้

3) เนื่องจากแอนติเจนของระบบ HLA มีมากมายหลายชนิด การที่จะตรวจหาแอนติเจนของแต่ละโลคัสให้ครบถ้วนและเกิด "blank" (unknown antigen) น้อยที่สุดนั้นจำเป็นต้องการแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ มาเก็บรวบรวมไว้ให้มากที่สุด

แหล่งของแอนติบอดีของระบบ HLA

แหล่งของแอนติบอดีของระบบ HLA มีหลายแหล่ง เช่นจากผู้ป่วยที่เคยได้เลือดหลายครั้ง ผู้ป่วยที่มีประวัติการสลัดอวัยวะที่ปลูกถ่ายไว้เป็นต้น แต่วิธีการที่เหมาะสมที่สุดและได้แอนติเจนบอดีที่มีคุณภาพดี คือ การตรวจหาแอนติบอดีในสตรีที่ตั้งครรภ์ แอนติบอดีของระบบ HLA มีอยู่ในน้ำเหลือง (serum) โดยทำการเจาะเลือดเพื่อเก็บน้ำเหลืองจากสตรีไทยจำนวน 2,000 คนที่มาฝากครรภ์ที่ภาควิชาสูติศาสตร์ - นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ปริมาณคนละ 50 มล.

lymphocyte ที่ใช้ในการตรวจหาแอนติบอดีระบบ HLA

โดยการใช้ panel cell และ extra cell

panel cell คือ lymphocyte ที่ใช้เป็นเซลล์หลักในการตรวจหาแอนติบอดี ซึ่งแอนติเจนระบบ HLA ของ panel cell เหล่านี้ได้ผ่านการทำ HLA typing จาก 2 แห่งคือ ศูนย์ Scandiatransplant มหาวิทยาลัย Århus ประเทศเดนมาร์ค และห้องปฏิบัติการ Tissue typing ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ดังนั้นจึงรู้ phenotype ของ panel cell แต่ละคน

extra cell เป็น lymphocyte ซึ่งส่วนใหญ่ได้มาจากผู้ประสงค์จะบริจาคไตให้ญาติพี่น้องที่มีความจำเป็นต้องทำการเปลี่ยนไต และรู้ phenotype ของแอนติเจน HLA แล้วเพราะได้ผ่านการทำ HLA typing จาก 2 แห่งเช่นเดียวกับ panel cell extra cell เหล่านี้จะถูกนำมาช่วยเสริมการ identification เนื่องจากแอนติเจนในระบบ HLA มีเป็นจำนวนมาก บางชนิดเป็นแอนติเจนที่หายากหรือค่อนข้างยาก และยังมีแอนติเจนหลายตัวที่เป็น "strong cross - reacting antigens" ดังนั้นการ identify แอนติบอดีในกลุ่มนี้จำเป็นต้องอาศัย lymphocyte ของคนเป็นจำนวนมากจึงจะสามารถบอกลักษณะและคุณสมบัติที่ถูกต้องแน่นอนของแอนติบอดีได้

ขั้นตอนการ sereening หาแอนติบอดีของระบบ HLA

1) การเตรียม screening tray

- ใส่ mineral oil ลงในหลุมของ microtest plate หลุมละประมาณ 4 µl เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำเหลือง

- หยดน้ำเหลืองที่ต้องการจะ screen หาแอนติบอดีลงในหลุม ๆ ละ 1 µl ใส่ negative และ positive control

2) การเตรียม lymphocyte (ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 2 และ 3 หน้า 17)

3) การทำ HLA typing โดยวิธี microlymphocytotoxicity tist (วิธีทำอยู่ในข้อ 4 หน้า 19) และการอ่านผลการทดลอง (ใช้วิธีเดียวกับข้อ 5 หน้า 21)

ถ้าเซลล์ตายมากกว่า 20 % หรือมีระดับความแรงของปฏิกริยาเท่ากับ 8 ขึ้นไป ถือว่าเป็นปฏิกริยาบวก

4) การวิเคราะห์แอนติบอดีของระบบ HLA

การวิเคราะห์แอนติบอดีเพื่อหาแอนติบอดีที่เป็น monospecific sera หรือมีความจำเพาะต่อแอนติเจน โดยอาศัยการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนี้คือ

4.1) การใช้ X^2 - test โดยใช้ two and two table ของ Fisher's exact test และ X^2 - test ใช้สูตรที่มี Yates' correction

4.2) หาค่า correlation coefficient (R value)

ค่า X^2 ยิ่งมากจะแสดงถึงความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนชนิดนั้น และถ้าค่า R value มีค่าใกล้ +1 มากเท่าไรก็ยิ่งแสดงถึงคุณภาพดีเยี่ยมของแอนติบอดีนั้น ดังนั้นจึงสามารถคัดเลือกแอนติบอดีมาใช้เป็น typing sera ได้

การเตรียม typing tray

1) ใส่ mineraloil ลงในหลุมของ microtest plate หลุมละประมาณ 4 µl เพื่อป้องกันการระเหยของ sera เมื่อนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง

2) หยด sera ซึ่งเป็น known antibody ลงไปในหลุม ๆ ละ 1 µl โดยใช้ Terasaki dispenser (สามารถจะหยด sera ได้ครั้งละ 6 หลุม) 1 หลุมต่อ 1 sera โดยใน microtest plate ชุด A เป็น sera สำหรับทำ HLA-A typing และ plate ชุด B สำหรับทำ HLA-B typing (แผนภาพแสดง typing sera ของ HLA-A และ HLA-B อยู่ในรูปที่ 5 และ 6 ในนามของ tray-3A และ tray-3B ตามลำดับ)

3) นำ typing tray ที่เตรียมเสร็จไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ-40°C เพื่อเตรียมไว้ตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA-A และ HLA-B ต่อไป

ขั้นตอนทั้งหมดในการตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA ของเลือด 1 ตัวอย่าง

1) เก็บตัวอย่างเลือดและทำ defibrination (ในงานวิจัยนี้ศึกษาในคนปกติจำนวน 118 คนและผู้ป่วยโรค SLE จำนวน 60 คน)

↓ ประมาณ 15 นาที

2) แยกเม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte จากเลือดที่ปราศจากไฟบริน โดยวิธีการของ Boyum คือ gradient centrifugation ตลอดจนการกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ปนมาในส่วนตะกอนและการล้างเซลล์ lymphocyte ที่ได้

↓ ประมาณ 2 ชั่วโมง

3) การปรับความเข้มข้นของเซลล์และการตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์ lymphocyte

↓ ประมาณ 25 นาที

4) การตรวจหาชนิดของแอนติเจน HLA-A และ HLA-B โดยใช้วิธี microlymphocyto-toxicity test

↓ ประมาณ 2 ชั่วโมง

5) การอ่านผลการทดลอง

↓ ประมาณ 30 - 60 นาที

6) การแปลผลการทดลอง

↓ ประมาณ 15 - 30 นาที

7) บันทึกและรวบรวมข้อมูลเพื่อนำไปคำนวณหา phenotype frequency, genotype frequency, relative risk และการวิเคราะห์ทางสถิติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การพิจารณาขนาดตัวอย่าง (sample size determination)

การพิจารณาขนาดตัวอย่างที่จะศึกษานั้นจะต้องพิจารณาถึงลักษณะข้อมูลและองค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง ตลอดจนวัตถุประสงค์ของการศึกษา สำหรับงานวิจัยนี้เป็นการคำนวณขนาดตัวอย่างในการศึกษาไปข้างหน้า (cohort study) ซึ่งก่อนที่จะคำนวณขนาดของตัวอย่างในการศึกษานี้จำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับอุบัติการของโรค ขนาดตัวอย่างที่จะใช้ในการศึกษานี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับอุบัติการของโรคและ relative risk ของโรคนั้นเป็นสำคัญ

ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นต้องทราบก่อนที่จะคำนวณหาขนาดตัวอย่างคือ

1) โอกาสที่จะเกิดโรคในกลุ่มที่ไม่ได้รับองค์ประกอบ (non-exposed) โดยกำหนดให้ $= p_1$

2) ตั้งสมมุติฐานและกำหนดให้การเสี่ยงต่อโรคนั้น (relative risk) = R

3) ตั้งระดับความเชื่อมั่น $= \alpha$(two-sided)

4) กำหนดความคลาดเคลื่อนชนิดที่ II (type II error) = β(one-seded)

ให้ n = ขนาดของตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม

สูตรที่ 1

$$n = \frac{\left\{ z_\alpha \sqrt{2\bar{p}\bar{q}} + z_\beta \sqrt{p_1 \left[1 + R = p_1 \ (1 + R^2) \right]} \right\}^2}{\left[p_1 \ (1 - R) \right]^2}$$

โดย $\bar{p} = \frac{1}{2} p_1 \ (1 + R)$

$\bar{q} = 1 - \bar{p}$

z_α และ z_β เป็นค่าความคลาดเคลื่อนชนิดที่ I และ II (α error และ β error) ซึ่งดูได้จากตารางแล้วแทนค่า z_α และ z_β

สูตรที่ 1 นี้จะเน้นความสำคัญให้เห็นว่าขนาดตัวอย่างขึ้นอยู่กับ p_1 และ R ถ้าอุบัติการยิ่งพบน้อย ขนาดตัวอย่างยิ่งต้องใช้มากขึ้น

หรือใช้สูตรที่ 2

$$n = \frac{\left\{ z_{\alpha}\sqrt{2\bar{p}\bar{q}} + z_{\beta}\sqrt{p_1\ (1 - p_1) + p_2\ (1 - p_2)} \right\}^2}{(p_1 - p_2)^2}$$

(two sided)

โดยค่า $\bar{p} = \frac{1}{2}\ (p_1 - p_2)$

$\bar{q} = 1 - \bar{p}$

แทนค่า p_2 จากสูตร $p_2 = p_1 R$ ซึ่งขนาดของตัวอย่างจะมากหรือน้อยจะขึ้นอยู่กับค่า p_1 และ R

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงค่าความคลาดเคลื่อนชนิดที่ I และ II

(Z_α & Z_β)

α(/β)	one-sided test $Z_\alpha(/Z_\beta)$	two-sidee test Z_α
0.001	3.09	3.29
0.005	2.58	2.81
0.01	2.33	2.58
0.025	1.96	2.24
0.05	1.64	1.96
0.10	1.28	1.64
0.20	0.84	1.28
0.30	0.52	1.04

งานวิจัยครั้งนี้กำหนดขนาดของตัวอย่างที่ศึกษาคือ ผู้ป่วยโรค SLE มีจำนวน 50 คน ขึ้นไป และจำนวนของคนปกติที่ใช้เป็น normal control มีขนาดเป็น 2 เท่าของจำนวนผู้ป่วยที่ศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

การเตรียมสาร

1. 1% trypan blue (Stock solution)

น้ำยา 1. trypan blue

2. น้ำกลั่น

3. normal saline (NSS)

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 30 ml.)

ละลาย trypan blue 0.3 กรัมด้วยน้ำกลั่น 30 ml. ใน Erlenmayer flask คนละลายหมดดีแล้วจึงกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 เก็บไว้ที่ 4 ^{o}C

วิธีเตรียม working solution (0.4% trypan blue)

1. ผสม 1% trypan blue 4 ml. กับ terile normal saline 6 ml.

2. แบ่งใส่ Eppendorf tube แล้ว centrifuge ด้วย microfuge 2 นาทีก่อนใช้

3. เก็บไว้ที่ 4 ^{o}C

รายละเอียดของน้ำยา

trypan blue - Mdrck Cat. No. Art 11732

($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$) - M. 96080 g/mol.

2. 5% eosin Y

น้ำยา 1. eosin Gelblich (yellowish)

2. sterile NSS

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 ml.)

1. ละลาย eosin 5 กรัม ด้วย sterile NSS ใน Erlenmayer flask จนละลายหมดดีแล้วจึงเทใส่ volummetric flask ขนาด 100 ml.

2. เติม sterile NSS จนครบปริมาตร 100 ml. กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 แบ่งใส่ขวดเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่เกิน 30 ml.)

รายละเอียดของน้ำยา

1. eosin Gelblich - Merck cat. No. Ant 1345 (C_{20} H_6 Br_4 Na_2 O_5)

- M. 691.90 g/mol.

2. sterile NSS (0.9% NaCl)

- กองวิทยาศาสตร์ สภากาชาดไทย
- on pyrogenic, USP

3. 40% neutral formalin (pH 7.2 - 7.4)

น้ำยา 1. 37% formaldehyde

2. $CaCO_3$

3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 ml.)

1. ผสม 37% formaldehyde solution 40 ml. กับน้ำกลั่น 60 ml. ใน Erlenmayer flask จุกเกลียว

2. ใส่ $CaCO_3$ จำนวนมากเกินพอเพื่อไป saturate 40% formalin

3. แบ่งใส่ tube นำไปปั่นเพื่อแยกตะกอน $CaCO_3$ (ปั่น 2,000 npm 15 นาที ด้วยเครื่องปั่น DPR - 600)

4. ดูดเฉพาะส่วนใสกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1

5. นำไปปรับ pH ให้ได้ pH 7.2 - 7.4 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่เกิน 30 ^{o}C)

รายละเอียดของน้ำยา

1. 37% formaldehyde (HCHO)
   - Merck Cat. No. Ant 4003
   - M. 30.03 g/mol. 1 ℓ = 1.08 kg.
2. $CaCO_3$
   - Merck Cat. No. Ant 2066
   - M. 100.09 g/mol.

4. Tris-NH_4Cl

สูตร tris buffer : NH_4Cl = 1 : 9

น้ำยา 1. NH_4Cl
2. tris buffer solution
3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 ml.)

1. เตรียมสารละลาย NH_4Cl โดยชั่ง NH_4Cl 0.83 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นใน Erlenmayer flask จนละลายหมดดีแล้วจึงเทใส่ volummetric flask ขนาด 100 ml. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml. เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ไม่เกิน 30 ^{o}C)

2. เตรียม tris-NH_4Cl โดยผสม10 ml. ของ tris buffer กับ 90 ml. ของ NH_4Cl solution ปรับ pH ให้ได้ 7.2 - 7.4

หมายเหตุ ควรเตรียม tris buffer และ 0.83% NH_4Cl แยกเก็บไว้ เมื่อต้องการใช้ tris-NH_4Cl จึงนำมาผสมกันตามสูตร ปรับ pH แล้วใช้ทันที ไม่ควรเตรียมเก็บไว้ใช้

รายละเอียดของน้ำยา

NH_4Cl - Merck Cat. No. Art 1145
- M. 53.49 g/mol.

5. tris buffer (pH 7.2 - 7.4)

น้ำยา 1. Trizma base Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane

2. 5N.HCl

3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 ml.)

1. ละลาย Trizma base 2.06 g. ด้วยน้ำกลั่นประมาณ 80 ml. ใน Erlenmayer flask จน Trizma base ละลายหมดดีก่อนแล้วจึงเทใส่ volummetric flask ขนาด 100 ml.

2. เติม 5N.HCl เพื่อปรับ pH เป็น 7.2 - 7.4

3. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml. กรองผ่านกระดาษกรองยอง Whatman No.1

4. แบ่งใส่ขวดเก็บไว้ที่ 2^0 - 8 ^oC

รายละเอียดของน้ำยา

Trizma base - Sigma Chemical Co., Cat. No. T-1503

- MW. 121.1 g

6. 1 M. Hepes solution (pH 7.0 - 7.2)

น้ำยา 1. Hepes powder

2. 5N. NaOH

3. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 ml.)

1. ชั่ง Hepes powder 23.83 g ละลายด้วยน้ำกลั่น 50 ml. ใน Erlenmayer flask จน Hepes ละลายหมดดีก่อน แล้วจึงเทใส่ volummetric flask ขนาด 100 ml.

2. เติม 5N. NaOH เพื่อปรับ pH เป็น 7.0 - 7.2

3. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 100 ml. กรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1

4. sterile โดยใช้ membrane fitration 0.2 µm. เก็บไว้ที่ 2°- 8 $^{\circ}C$

รายละเอียดของน้ำยา

Hepes (N - 2 - Hydroryethyl piperazine - N - 2 - Ethansulfonic acid) ($C_8 H_{18} N_2 O_4 S$) Cat. No. H - 3375, Sigma Chemical Co., MW. 238.3 g.

7. Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) (pH 7.2 - 7.4)

น้ำยา

1. HBSS powder
2. $NaHCO_3$ powder
3. 1 M. Hepes solution
4. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 1,000 ml.)

1. เท HBSS powder 1 ซอง (9.8 g.) ใส่ใน Erlenmayer flask 500 ml. เทน้ำกลั่นล้างผง HBSS ในซองแล้วเทลงใน Erlenmayer flask หลาย ๆ ครั้งจนมั่นใจว่าไม่มีผง HBSS ติดอยู่ที่ซองอีก เติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรประมาณ 200 ml. เขย่าจนผง HBSS ละลายหมดดีแล้วจึงกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงใน volummetric flask 1,000 ml.

2. ชั่ง Na HCO_3 0.35 g. ละลายในน้ำกลั่นจนละลายหมดดีแล้วจึงเทใส่ volummetric flask ผสมกับ HBSS เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 950 ml.

3. ปรับ pH โดยใช้ 5N. NaOH และ 5N. HCl จนได้ pH 7.0 - 7.2

4. เติม 1 M. Hepes solution 12 ml.

5. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 ml.

6. Sterile โดยใช้ membrane filtration 0.2 µm. วัด pH หลัง strile

7. แบ่งใส่ขวด ๆ ละประมาณ 500 ml. (Aseptic technique) เก็บที่ 2°- 8 $^{\circ}C$

รายละเอียดของน้ำยา

1. HBSS powder - Gibco Laboratory
   - Cat. No. 450 - 1200
   - Net. Wt. 9.8 g.
   - without $NaHCO_3$
   - เก็บไว้ในที่แห้งและอุณหภูมิไม่เกิน $30^{\circ}C$
2. $NaHCO_3$ powder - Merck
   - Cat. No. Art 6329
   - M. 84.01 g/mol.

8. Modified McCoy's 5a medium (pH 7.2 - 7.4)

น้ำยา
1. McCoy's 5a powder
2. $NaHCO_3$
3. 1 M. Hepes solution
4. antibiotic - penicillin - Streptomycin 10,000 Unit/ml.
5. น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 1,000 ml.)

1. เท McCoy's 5a powder 1 ซอง (12 g.) ใส่ใน Erlenmayer flask 500 ml. เทน้ำกลั่นล้างผง McCoy's 5a ในซองแล้วเทลงใน Erlenmayer flask หลาย ๆ ครั้งจนมั่นใจว่าไม่มีผง McCoy's 5a ติดอยู่ที่ซองอีก เติมน้ำกลั่นลงไปจนได้ปริมาตรประมาณ 200 ml. เขย่าจนผง McCoy's 5a ละลายหมดดีแล้วจึงกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.1 ลงใน volummetric flask 1,000 ml.

2. ชั่ง $NaHCO_2$ 2.2 g. ละลายในน้ำกลั่น จนละลายหมดดีแล้ว จึงเทใส่ volummetric flask ผสมกับ McCoy's 5a เขย่าให้เข้ากันดี แต่อย่าเขย่ามากเกินไป เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรประมาณ 950 ml.

3. ปรับ pH โดยใช้ 5N. NaOH และ 5N.HCl จนได้ pH 7.0 - 7.2

4. เติม antibiotic คือ Penicillin-Streptomycin (10,000 unit/ml.) 2 ml.

5. เติม 1 M. Hepes solution 25 ml.

6. เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1,000 ml.

7. sterile โดยใช้ membrane filtration 0.2 µm. วัด pH หลัง sterile

8. แบ่งใส่ขวด ๆ ละ 500 ml. (aseptic technique) เก็บที่ 2° - $8\ ^{\circ}C$

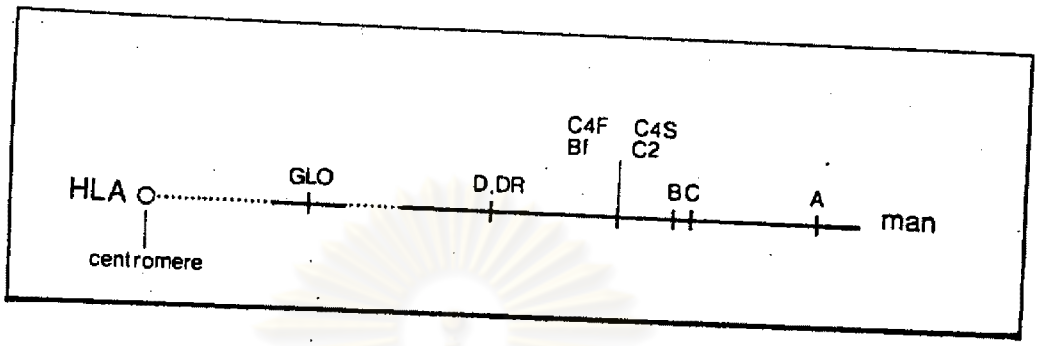
<u>รายละเอียดของน้ำยา</u>

McCoy's 5a powder - Gibco Laboratory
- Cat. No.430 - 1500
- Net. wt. 12 g.
- without $NaHCO_3$
- with L-Glutamine
- เก็บไว้ในที่แห้งและมืด อุณหภูมิ 2°- $8\ ^{\circ}C$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 กฎเกณฑ์ของ ARA (1982) ที่ใช้ในการจำแนกผู้ป่วยโรค SLE (Tan และคณะ, 1982)

เกณฑ์	คำจำกัดความ
1. ผื่นบนแก้ม (malar rash)	ผิวหนังเป็นผื่นแดง อาจเรียบหรือนูน อยู่บนแก้ม มักจะไม่เป็นที่คลุก
2. ผื่นบนผิวหนังที่มีลักษณะกลม (discoid rash)	รอยนูนแดงเป็นดวงที่ผิว มีรายตกละเอียด เกิดขึ้นในบริเวณแผลเก่า
3. ไวต่อแสง (photosensitive)	ผื่นบนผิวหนังซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกริยาที่ผิดปกติต่อแสงแดด
4. แผลเปื่อยที่ปาก (oral ulcer)	แผลเปื่อยที่ปากหรือในบริเวณคลุกและคอหอยส่วนบน ปกติจะเป็นแผลที่ไม่เจ็บ
5. ข้ออักเสบ (arthritis)	มีการอับเสบของ 2 ข้อต่อหรือมากกว่านี้ โดยอาศัยความแข็ง, การบวม หรือการมีน้ำซึมผ่าน
6. เยื่อเลื่อมอักเสบ (serositis)	ก. เยื่อหุ้มปอดอักเสบ หรือ ข. ถุงหุ้มหัวใจอักเสบ
7. ความผิดปกติของไต (renal disorder)	ก. ปัสสาวะมีโปรตีนมากกว่า 0.5 กรัมต่อวัน หรือมากกว่า 3+ หรือ ข. cellular casts โปรตีนที่ปรากฏในปัสสาวะ ซึ่งอาจเป็นเม็ดเลือดแดง หรือเป็นฮีโมโกลบิน (hemoglobin) หรือประกอบเป็นเม็ด หรือเป็นท่อน หรือแบบผสม
8. ความผิดปกติของระบบประสาท (neurologic disorder)	ก. การกลับของโรค หรือ ข. โรคจิต
9. ความผิดปกติของโลหิต (hematologic disorder)	ก. โลหิตจางเนื่องจากเม็ดโลหิตถูกทำลาย, มี reticulocyte มากเกินไปในโลหิต หรือ ข. เม็ดโลหิตขาวน้อยกว่าปกติ หรือ ค. ลิมโฟซัยต์ ในโลหิตลดลง หรือ ง. ภาวะเกล็ดเลือดน้อย
10. ความผิดปกติทางอิมมูนวิทยา (immunologic disorder)	ก. ผลการเตรียมเซลล์ LE ให้ผลบวกหรือ ข. anti-DNA ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อ DNA ในไตเตอร์ (titer) ที่ผิดปกติ หรือ ค. anti-Sm ซึ่งเป็นการมีแอนติบอดีต่อแอนติเจน Sm nuclear หรือ ง. ผลจากการทดลองทางน้ำเหลืองที่ให้ผลบวกปลอม
11. แอนติบอดีต่อนิวเคลียส์ (antinuclear antibody)	มีความผิดปกติของไตเตอร์ของแอนติบอดี anti-nuclear



รูปที่ 1 แผนที่ยีนของระบบ MHC ของมนุษย์

C2 หมายถึงโลคัสสำหรับองค์ประกอบที่ 2 ของคอมพลีเมนท์

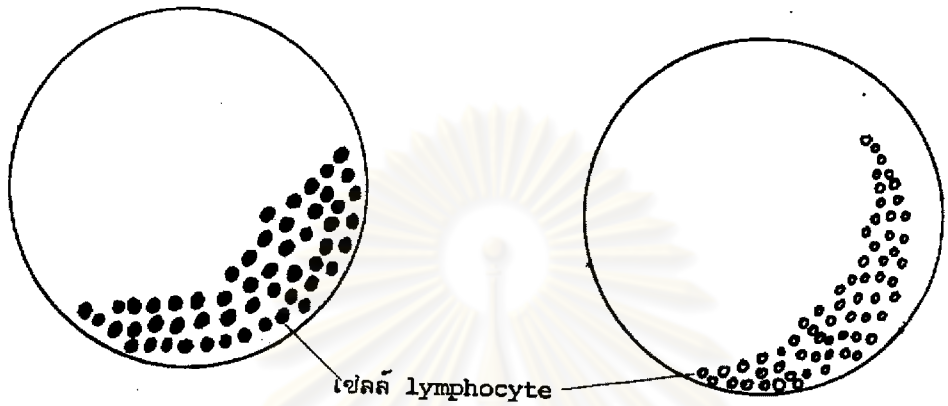
Bf หมายถึงโลคัสสำหรับ properdin factor

C4F, C4S หมายถึงโลคัสสำหรับองค์ประกอบที่ 4 ของคอมพลีเมนท์ 2 โลคัส

GLO หมายถึงโลคัสสำหรับ enzyme glyoxylase

ระยะทางระหว่างโลคัส HLA-A และ HLA-D/DR ประมาณ 1.8 centimorgan, 1 centimorgan คือ 1% recombination frequency

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ผลบวก

1. เป็นเซลล์ตาย
2. ลักษณะบวมโตกว่าเดิม 2 - 3 เท่า
3. ภายในเซลล์ติดสีทึบ

ผลลบ

1. เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต
2. ลักษณะเป็น lymphocyte ขนาดเล็ก
3. ภายในเซลล์แจ่มใส สะท้อนแสง มองเห็น cytoplasm ชัดเจน

รูปที่ 3 ผลของการทดลองที่ให้ผลบวกและผลลบจาก microlymphocyte toxicity test

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN HOSPITAL

DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY

TISSUE TYPING LABORATORY

TISSUE TYPING TRAY (1985)

HLA ANTIGEN

NAME _____ WARD _____

BLOOD GROUP _____ AGE _____

DATE _____ VIAB _____ % ☐ FRESH

_____ ☐ OVERNIGHT

A _____ A _____

B _____ B _____

C _____ C _____

DR _____ DR _____

A	B	C	D	E	F	
A1 20107	A1 1-01 (อัมพา)	A1 1-02 (ทองสุข)	A1 S.935 (ดารัตน์)	A1 MADSEN	A2 S.631 (แสงจันทร์)	1
A2 1200 (พเยาว์)	A2 S.1221 (ต่าย)	A2 S.1589 (ประยูร)	A2+28 8103	A2+28 28104	A2+28 2-08 (วาสนา)	2
A2+28 S.605 (จันทร์เป็ง)	A2+28 S.841 (เรณู)	A2+28 S.842 (วันดี)	A3 20306	A3 KISSMEYER	A3+11 27701	3
A9 0902	A9 0903	A9 02904	A9 S.30 (อารี)	A9 S.447 (พูน)	A9 S.940 (เลื่อน)	4
A9 S.1679 (บุปผา)	A25 (10) 22503	A25+26 (10) 21004	A25+26 (10) 21005	A10 10-01 (ทองเจือ)	A1+26 9301	5
A11 พันธ์ทิพย์	A11 S.586 (จำลอง)	A11 S.682 (ศิริพร)	A11 N.43 (สำราญ)	A1+11 27401	N.C.	6
						7
A	B	C	D	E	F	

รูปที่ 5 แผนภาพแสดง typing sera ของ HLA-A TRAY-3A

NAME _____ TISSUE TYPING TRAY (1985)

A	B	C	D	E	F	
B5 0503	B5 5-06(ยุพิน)	B5 S.213(ป้อม)	B5 S.514 (สมิท)	B5 S.845(เติม)	B5+35 8203	1
B5+35 28204	B5+35 5-03(ปราณี)	B5+35 5-05(ประหยัด)	B5+35 S.916(อังอร)	B5+35 S.1739(ระแวง)	B7 S.938(ข่อทิพย์)	2
B7 S.1124 (ศรีนวล)	B7 S.1261(สายันต์)	B7 S.1481(คำผัด)	B8 02805	B8 20020	B8 0804	3
B8 S.1416(สุนีย์)	B44(12) 24403	B44(12) 24404	B12 20012	B12 1203	B12 12-01(เพทาย)	4
B13 21306	B13 1305	B13 PEDERSEN	B13 S.268(สุกใจ)	B13 S.471(ประยงค์)	B15 21504	5
B15 21503	B15 1502	B15 S.730(บุญมี)	B15 S.400 (สาหร่าย)	B15+w46 S.1244(สะอิ้ง)	B15+w46 S.1277(ทองดาว)	6
B17 21705	B17 17-01(มาลัย)	B17 17-02(สมพร)	B17 S.838 (สำราญ)	B17 S.1120(สุมาลี)	N.C.	7
B18 RAMA R18	Bw22 22-01(พวง)	Bw22 22-03(ม่วย)	Bw22+7 7-04(คำเปล)	B7+w22 7-02(ยืนยง)	B7+w22 S.864 (ส้มเกลี้ยง)	8
B7+(w22) S.609(สมจิตร)	B27 22708	B27 27-05 (สายสุนีย์)	B27 S.236(ศิรมย์)	B27 S.1009(ชิม)	Bw60(40) 40-04(พรทิพย์)	9
B40 S.604(มาลี)	B40 S.1284 (ทิมเขียง)	B13+40 13-01(No.18)	Bw46 Abs.(M)	Bw46 Abs.(N)	P.C. (S.331+H5+H8)	10
A	B	C	D	E	F	

รูปที่ 6 แผนภาพแสดง typing sera ของ HLA-B

Tray-3B

ประวัติผู้เขียน

นางสาวบุษบา วงษาสันต์ เกิดวันที่ 22 กรกฎาคม พ.ศ. 2504 จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตโปรแกรมพันธุศาสตร์ จาก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2525

ศึกษาต่อหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาพันธุศาสตร์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2526 ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินทุนสมเด็จพระมหาธิเบศร อดุลยเดชวิกรมพระบรมราชชนก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย