

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

วิธีการวิจัย

การศึกษานี้ทำในกลุ่มตัวอย่าง 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มตัวอย่างที่เป็นผู้ป่วยโรคเริมช่องปาก และกลุ่มตัวอย่างที่เป็นอาสาสมัครที่เยื่อเมือกช่องปากมีลักษณะปกติ เก็บเนื้อเยื่อจากแต่ละกลุ่มและวัดระดับการแสดงออกของ ADAM9 และ PCNA ในระดับโปรตีนด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี เปรียบเทียบผลระหว่างโรคเริมช่องปากและเนื้อเยื่อปกติ ตรวจสอบความสัมพันธ์กับ ความรุนแรงทางคลินิกของโรคเริมช่องปาก และตรวจสอบการแสดงออกของ ADAM9 ในระดับโปรตีนด้วยวิธีเวสเทิร์นบลอตติงในเคอราติโนไซต์ช่องปาก (human oral keratinocyte; HOKs) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีระดับแคลเซียมแตกต่างกัน (ภาพที่ 3.1)



ภาพที่ 3.1 แผนผังวิธีการวิจัย ก.อิมมูโนฮิสโตเคมีข.เวสเทิร์นบลอตติง

3.1 การขอคำรับรองจากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย

ทำการขอคำรับรองการศึกษาวิจัยในมนุษย์จากคณะกรรมการพิทักษ์สิทธิสวัสดิภาพและป้องกันอันตรายของผู้ถูกวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ตามเอกสารรับรองเลขที่ 16/2557

3.2 คัดเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา

3.2.1 กลุ่มผู้ป่วยโรคเอนไซม์ช่องปาก

ผู้ป่วยรายใหม่ที่ได้เข้ารับการรักษานในคลินิกเวชศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ได้รับการวินิจฉัยโดยอาศัยลักษณะทางคลินิกและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาแล้วว่าเป็นโรคเอนไซม์ช่องปาก จำนวน 25 คน โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมงานวิจัย ดังนี้

1) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัย

1.1 ผู้ป่วยที่มีรอยโรคในช่องปาก ซึ่งต่อมาได้รับการวินิจฉัยโรคทางคลินิกและทางจุลพยาธิวิทยาว่าเป็นโรคเอนไซม์ช่องปาก

1.2) ผู้ป่วยไม่มีโรคทางระบบใด ๆ

1.3) ผู้ป่วยไม่ได้ใช้ยาที่มีรายงานว่าทำให้เกิดรอยโรคเอนไซม์ช่องปาก^(16, 26)

1.4) ผู้ป่วยไม่มีรอยโรคหรือความผิดปกติอื่น ๆ ของเยื่อเมือกช่องปาก

1.5) ผู้ป่วยไม่มีวัสดุบูรณะฟันที่อาจทำให้เกิดรอยโรคเอนไซม์ช่องปากจากการสัมผัส

1.6) ผู้ป่วยอายุ 18 ปีขึ้นไป

2) เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัย

2.1) ผู้ป่วยปฏิเสธการรักษา

2.2) ผู้ป่วยมีโรคทางระบบ หรือได้รับยารักษาโรคทางระบบใด ๆ

2.3) ผู้ป่วยตั้งครรภ์หรือกำลังอยู่ในช่วงให้นมบุตร

2.4) ผู้ป่วยมีรอยโรค หรือมีความผิดปกติอื่น ๆ ของเยื่อเมือกช่องปาก

2.5) ผู้ป่วยมีประวัติการใช้สเตียรอยด์ในการรักษาโรคเอนไซม์ช่องปาก

3.2.2 กลุ่มควบคุม

อาสาสมัครที่มีสุขภาพช่องปากดี ที่เข้ารับการรักษานในคลินิกทันตศาสตร์ช่องปาก และแม็กซ์ซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เพื่อรับการผ่าตัดฟันฝังชนิดอยู่ในกระดูกทั้งหมด โดยคัดเลือกอาสาสมัครที่ไม่ปรากฏลักษณะของการอักเสบของเนื้อเยื่อในบริเวณที่ตัดขึ้นเนื้อ ทั้งอาการแสดงทางคลินิกและลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา จำนวน 13 คน โดยมีเกณฑ์การคัดเลือกผู้เข้าร่วมงานวิจัย ดังนี้

1) เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัย

1.1) ผู้ป่วยมีสุขภาพร่างกายแข็งแรง ไม่มีโรคทางระบบ และไม่ได้รับยารักษาโรคทางระบบใด ๆ

1.2) ผู้ป่วยไม่มีรอยโรคหรือความผิดปกติอื่น ๆ ของเยื่อเมือกช่องปาก

1.3) ผู้ป่วยอายุ 18 ปีขึ้นไป

2) เกณฑ์การไม่รับอาสาสมัครเข้าร่วมงานวิจัย

2.1) ผู้ป่วยปฏิเสธเข้าร่วมงานวิจัย

2.2) ผู้ป่วยมีโรคทางระบบหรือกินยารักษาโรคทางระบบใด ๆ

2.3) ผู้ป่วยมีรอยโรคหรือความผิดปกติอื่น ๆ ของเยื่อเมือกช่องปาก

3.3 การเก็บข้อมูลความรุนแรงทางคลินิกของไคเคนแพลนต์ช่องปาก

ประเมินลักษณะความรุนแรงทางคลินิกซึ่งประกอบด้วย

3.3.1 การประเมินความรุนแรงของรอยโรคทางคลินิก

โดยประเมินลักษณะและขนาดของรอยโรค ด้วยเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก (clinical criteria score)⁽⁶⁵⁾ ดังต่อไปนี้

คะแนน 5 - ร้างเหสีขาวร่วมกับแผลถลอกขนาดมากกว่า 1 ตารางเซนติเมตร

คะแนน 4 - ร้างเหสีขาวร่วมกับแผลถลอกขนาดน้อยกว่า 1 ตารางเซนติเมตร

คะแนน 3 - ร้างเหสีขาวร่วมกับการฟกช้ำขนาดมากกว่า 1 ตารางเซนติเมตร

คะแนน 2 - ร้างเหสีขาวร่วมกับการฟกช้ำขนาดน้อยกว่า 1 ตารางเซนติเมตร

คะแนน 1 - ร้างเหสีขาวเล็กน้อยที่ไม่มีรอยแดง

คะแนน 0 - ไม่มีรอยโรค เยื่อเมือกช่องปากปกติ

ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 3.1 รายละเอียดของเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิกและภาพตัวอย่าง

คะแนน	ลักษณะทางคลินิก	ภาพตัวอย่าง
คะแนน 5	ร่องเหงือกพร้อมกับแผลถลอกขนาดมากกว่า 1 ตารางเซนติเมตร	
คะแนน 4	ร่องเหงือกพร้อมกับแผลถลอกขนาดน้อยกว่า 1 ตารางเซนติเมตร	
คะแนน 3	ร่องเหงือกพร้อมกับการฟกช้ำขนาดมากกว่า 1 ตารางเซนติเมตร	
คะแนน 2	ร่องเหงือกพร้อมกับการฟกช้ำขนาดน้อยกว่า 1 ตารางเซนติเมตร	
คะแนน 1	ร่องเหงือกเล็กน้อยที่ไม่มีรอยแดง	
คะแนน 0	ไม่มีรอยโรค เยื่อเมือกช่องปากปกติ	

ทำการประเมินรอยโรคไลเคนแพลนัสช่องปากทั้งหมดโดยผู้เชี่ยวชาญในสาขาเวชศาสตร์ช่องปากคนเดียว และกรณีตรวจพบรอยโรคหลายตำแหน่งพิจารณาบันทึกระดับของรอยโรคในตำแหน่งที่ตื้นขึ้น

3.3.2 ประเมินระดับความเจ็บปวด

ใช้เส้นแสดงระดับความเจ็บปวด (Visual analog scale; VAS) ระดับ 0 - 10 แบบบันทึกผล มีเส้นยาว 10 เซนติเมตรโดยระดับ 0 แทนไม่เจ็บ และ 10 แทนความเจ็บปวดที่มากที่สุดที่สามารถจินตนาการได้ ให้ผู้ป่วยทำเครื่องหมายบนแถบเส้น จากนั้นวัดระยะประเมินค่าความเจ็บปวดแปลผลเป็นคะแนนความเจ็บปวด (Visual analog scale score)⁽⁶⁶⁾



ภาพที่ 3.2 เส้นแสดงระดับความเจ็บปวด

3.4 การเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่าง

หลังจากผู้ป่วยทำการลงนามในใบคำยินยอมให้ทำวิจัยแล้วจะเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่าง ภายใต้การใช้ยาชาเฉพาะที่ โดยเก็บเนื้อเยื่อตัวอย่างขนาด 3x10x5 มิลลิเมตร โดยประมาณ หลังจากนั้นเนื้อเยื่อตัวอย่างจะถูกเก็บในสารละลายร้อยละ 10 บัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (10% buffer formalin) แล้วฝังเนื้อเยื่อตัวอย่างลงในบล็อกขี้ผึ้งพาราฟิน (paraffin block) เพื่อเตรียมทำการย้อมด้วยเทคนิคฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin; H&E) เพื่อยืนยันผลทางพยาธิวิทยาทำโดยผู้เชี่ยวชาญในสาขาพยาธิวิทยาช่องปากคนเดียวว่าเป็นโรคไลเคนแพลนัสช่องปากจริง จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อตัวอย่างไปย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อไป

3.5 การย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี⁽⁶⁷⁾

เพื่อตรวจสอบการแสดงออกในระดับโปรตีนของ ADAM9 และ PCNA ในชิ้นเนื้อจากผู้ป่วย
โรคเนื้องอกช่องปากและอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีโดยมีขั้นตอนดังนี้

- 3.5.1 ตัดชิ้นเนื้อตัวอย่างขนาด 5 ไมครอนจากบล็อกริ่ฟี่งพาราฟินลงในสไลด์แก้วเคลือบ
- 3.5.2 ละลายพาราฟินในไซลีน (xylene) แล้วล้างด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างกัน (ร้อยละ 100 เป็นเวลา 3 นาที และร้อยละ 70 เป็นเวลา 3 นาที) และล้างครั้งสุดท้ายด้วยน้ำ 3 นาที
- 3.5.3 ใส่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 (3% hydrogenperoxide) เป็นเวลา 10 นาที
- 3.5.4 ล้างสไลด์แก้วเคลือบที่มีเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยน้ำเปล่า 5 นาที
- 3.5.5 ใส่ในสารละลายรีทรีฟ (retrieval solution) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นปล่อยให้เย็นลงในอุณหภูมิห้อง 20 นาที
- 3.5.6 ล้างในสารละลายทริสบัฟเฟอร์ (Tris-buffered saline;TBS) 5 นาที
- 3.5.7 บ่มชิ้นเนื้อตัวอย่างในนอมอลเซอร์รั่ม (Normal Horse Serum) ที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที

3.5.8 บ่มชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยแอนติบอดีต่อ ADAM9 ความเข้มข้น 1:50 หรือ PCNA ความเข้มข้น 1:100 (ADAM9 goat polyclonal antibody, Santa cruz Biotech, USA/PCNA mouse monoclonal antibody, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) ซ้ำมึน โดยใช้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.9 ล้างใน TBS 5 นาที

3.5.10 บ่มชิ้นเนื้อด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง (2°antibody, Santa cruz Biotech ABC kit/R.T.U. Vectastain elite ABC kit, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) 30 นาทีด้วยอุณหภูมิห้อง

3.5.11 ให้ TBS ไหลผ่านชิ้นเนื้อและล้างด้วย TBS 5 นาที

3.5.12 กระตุ้นปฏิกิริยาอิมมูโนเพอรอกซิเดสโดยการใส่สารแดป (DAB substrate) 4 นาทีและล้างด้วยน้ำเป็นเวลา 5 นาที

3.5.13 แคลสไลด์แก้วพร้อมชิ้นเนื้อตัวอย่างในฮีมาทอกซิลิน 20 วินาที

3.5.14 ล้างด้วยน้ำ 5 นาทีจากนั้นปิดด้วยแผ่นแก้วและเคลือบด้วยกลีเซอริน (glycerine)

3.6 การแปลผลอิมมูโนฮิสโตเคมี

ทำการแปลผลโดยผู้ทำวิจัยซึ่งได้รับการฝึกหัดจากผู้เชี่ยวชาญ และทำการทดสอบความเที่ยงตรงในการแปลผลในตัวผู้ทำการวิจัย (intra-calibration) แล้ว ชิ้นเนื้อตัวอย่างถูกตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยเลนส์กำลังขยาย 10 เท่าก่อน เพื่อแยกชั้นเยื่อหุ้มออกจากชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จากนั้นถ่ายภาพชิ้นเนื้อด้วยกล้องดิจิทัล (D70, Olympus, Tokyo, Japan) ที่ยึดติดอยู่กับกล้องจุลทรรศน์ (BX41, Olympus) เพื่อใช้ในการนับเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีของ ADAM9 ด้วยเลนส์กำลังขยาย 20 เท่าโดยเลือกบริเวณที่จะนับเซลล์ที่ชั้นเยื่อหุ้มโดยแบ่งเฉลี่ยชิ้นเนื้อเป็น 5 ตำแหน่งที่เท่ากัน จากซ้ายไปขวาของสไลด์แก้วจากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกซึ่งติดสีน้ำตาลในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) จากทั้ง 5 ตำแหน่งด้วยโปรแกรมอิมเมจ เจ (Image J program, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) นำจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากแต่ละบริเวณมาหาผลรวมคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ให้ผลบวกต่อเซลล์ทั้งหมด จากนั้นนำค่าร้อยละมาหาคะแนนตามควอร์ไทล์(quartile) โดยเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้

คะแนน 0 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 1

คะแนน 1 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 2

คะแนน 2 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 3

คะแนน 3 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 4

และประเมินให้คะแนนความเข้มของการติดสี(intensity score)ของเซลล์ที่ให้ผลบวกให้คะแนน ตั้งแต่ 0-2 จากการติดสีอ่อนไปเข้ม (0 = ไม่ติดสี, 1 = ติดสีอ่อน, 2 = ติดเข้ม) จากนั้นนำคะแนนทั้ง 2 ส่วนมาบวกกันคิดเป็นคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemical staining score) ของ ADAM9 ตั้งแต่ 0 - 5 สำหรับ PCNA ใช้การให้คะแนนเฉพาะส่วนที่เป็นจำนวนของเซลล์ที่ให้ผลบวก และไม่คิดคะแนนความเข้มของการติดสี โดยนับเซลล์ที่ให้ผลบวกด้วยโปรแกรมอิมเมจ เจ เช่นเดียวกับ ADAM9 โดยการติดสีน้ำตาลที่นิวเคลียส (nucleus) ของเซลล์เคอราติโนไซต์ถือว่าเป็นผลบวกนับเซลล์จากชั้นเนื้อ 5 ตำแหน่งและนำจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกจากแต่ละบริเวณมาหาผลรวมคิดเป็นค่าเฉลี่ยร้อยละของเซลล์ให้ผลบวกต่อเซลล์ทั้งหมด จากนั้นนำค่าร้อยละมาคิดคะแนนตามควอร์ไทล์ โดยเกณฑ์การให้คะแนนการมีผลบวกต่อPCNA (PCNA-positive cell score) ดังนี้

คะแนน 0 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 1

คะแนน 1 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 2

คะแนน 2 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 3

คะแนน 3 - มีเซลล์ที่ให้ผลบวกอยู่ในช่วงควอร์ไทล์ที่ 4

3.7 การเพาะเลี้ยงเซลล์เคอราติโนไซต์ช่องปาก

นำเซลล์เคอราติโนไซต์ช่องปาก (Human oral keratinocytes; HOKs) จากเนื้อเยื่อเหงือกที่ไม่มี การอักเสบที่ปกคลุมบริเวณที่เป็นฟันผุที่ฝังอยู่ในกระดูกทั้งหมด⁽⁶⁸⁾ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยง- เซลล์ (keratinocyte growth medium) บั๊จจยเสริม 5 ชนิดคือ bovine pituitary extract, epidermal growth factor, insulin, hydrocortisone, gentamycin sulfate, amphotericin-B (Clonetics®, Walkersville, MD, USA) ที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้เลี้ยงภายใต้ความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เมื่อ HOKs มีความหนาแน่นร้อยละ 80 โดยประมาณ ทำการแบ่ง HOKs และเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยง- เซลล์ที่ความเข้มข้นของแคลเซียมต่างกัน 3 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.03, 0.15 และ 1.2 มิลลิโมลาร์ (mM) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.8 วิธีการสกัดแยกโปรตีนจากเคอราติโนไซต์ช่องปาก⁽⁶⁹⁾

เมื่อครบแล้วทำการสกัดแยกโปรตีนด้วยการสลายเซลล์ให้ได้สารละลายโปรตีน (cell lysate) โดยใช้ RIPA (radio-immunoprecipitation assay; RIPA) นำสารละลายโปรตีนที่ได้มาวัดปริมาณ โปรตีนด้วย BCA Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) และอ่านค่า Optical density ที่ 540 นาโนเมตร ได้ค่าเป็นความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายเป็นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (μg/ml) เพื่อนำมาคำนวณปริมาณสารละลายที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนในหน่วยไมโครกรัมที่เท่ากัน

3.9 การตรวจการแสดงผลของโปรตีนในเคอราตินไนซ์ช่องปาก

เพื่อตรวจสอบการแสดงผลของโปรตีน ADAM9 โดยใช้หลักการของเจลอิเล็กโตรฟอเรซิส (gel electrophoresis) ทำการตรวจสอบโปรตีนที่ต้องการด้วยแอนติบอดีโดยมีขั้นตอนดังนี้⁽⁶⁸⁾

3.9.1 แบ่งสารสกัดที่มีปริมาณโปรตีนสุทธิ 30 ไมโครกรัมให้ความร้อน 100°C เป็นเวลา 5 นาที

3.9.2 แยกโปรตีนตามน้ำหนักโดยนำสารสกัดที่มีปริมาณโปรตีน 30 ไมโครกรัมมาละลายบนร้อยละ 10 โพลีอะครีลาไมด์เจล (10% polyacrylamide gel) แยกโปรตีนด้วยวิธีอิเล็กโตรฟอเรซิส (electrophoresis) ในรันนิ่งบัฟเฟอร์ (running buffer) ที่มีความเข้มข้นเป็น 1 เท่า (1x running buffer) ด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วถ่ายโอน (transfer) โปรตีนทั้งหมดไปที่เยื่อไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membranes, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 100 มิลลิแอมแปร์เป็นเวลา 12 ชั่วโมงในบลอตติงบัฟเฟอร์ที่เย็น (cold blotting buffer) โดยใช้เครื่อง Transblot apparatus (Bio-Rad, CA, USA)

3.9.3 หลังจากโอนย้ายโปรตีนมาสู่เยื่อไนโตรเซลลูโลสแล้ว นำเยื่อไนโตรเซลลูโลสที่ได้ไปแช่ในน้ำนมไร้ไขมันที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 ใน TBS (5% non-fat dry milk in TBS) ที่มี ทวิน-20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (0.05% Tween-20) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.9.4 จากนั้นบ่มเยื่อไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดีต่อ ADAM-9 ชนิดเดียวกับที่ใช้ในขั้นตอนอิมมูโนฮิสโตเคมีหรือแอนติบอดีต่อบีตา แอคติน (β -Actin, Santa Cruz Biotechnology) ความเข้มข้น 1:1,000 ในอุณหภูมิ 4°C ข้ามคืน

3.9.5 เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วจะนำเยื่อไนโตรเซลลูโลสมาล้างในทวิน-20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ใน TBS เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ แล้วจึงบ่มด้วยแอนติบอดีลำดับที่สอง (anti-goat or anti-mouse secondary antibody, Santa Cruz Biotechnology) อัตราส่วน 1: 2,000 ใน ทวิน-TBS (Tween-TBS) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

3.9.6 ล้างอีกครั้งด้วยทวิน-20 ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ใน TBS เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 3 รอบ จากนั้นนำไปกระตุ้นการเปล่งแสงที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี (chemiluminescence) ด้วย LumiGLO Reserve chemiluminescence reagent (KPL, Gaithersburg, MD, USA) และถ่ายภาพด้วย ChemiDoc XRS gel documentation system (Bio-Rad Laboratories)

3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้โปรแกรม SPSS (The Statistical Package for the Social Sciences software version 17.0 for Windows, IBM, Chicago, IL, USA) ในการคำนวณสถิติอนุมานพารามетริกโดย

3.10.1 เปรียบเทียบการแสดงออกของ ADAM9 และ PCNA ระหว่างกลุ่มไลเคนแพลนัสกับกลุ่มควบคุมด้วยสถิติ Mann-Whitney *U* test

3.10.2 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ADAM9 ซึ่งวัดเป็นคะแนนอิมมูโนฮิสโตเคมีของ ADAM9 กับลักษณะความรุนแรงทางคลินิกซึ่งมีตัวแทนเป็นเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก หรือคะแนนความเจ็บปวด ด้วยสถิติ Spearman correlation coefficient

3.10.3 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ PCNA ซึ่งวัดเป็น คะแนนเซลล์ที่มีผลบวกต่อ PCNA กับลักษณะความรุนแรงทางคลินิกซึ่งมีตัวแทนเป็นเกณฑ์ลำดับคะแนนทางคลินิก หรือคะแนนความเจ็บปวด ด้วยสถิติ Spearman correlation coefficient

3.10.4 ตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ ADAM9 กับการแสดงออกของ PCNA ด้วยสถิติ Spearman correlation coefficient