บทที่ 4

วิธีดำเนินการวิจัย

การทำวิจัยเป็นการศึกษาเชิงทดลองเปรียบเทียบผลทางเภสัชพลศาสตร์และเภสัชจลนศาสตร์หลังการฉีด Fraxiparine เข้าทางหลอดเลือดดำระหว่างคนปกติและผู้ป่วย chronic hemodialysis และการหาขนาดยาในผู้ป่วยกลุ่มนี้

ประชากรตัวอย่าง (sampled) ของการทำวิจัยมี 2 กลุ่มคือกลุ่มคนปกติและกลุ่มผู้ป่วย chronic hemodialysis ตัวอย่างของประชากรแต่ละกลุ่มจะได้มาจากการสุ่มตัวอย่างอย่างง่าย (simple random) จากผู้ที่จะเข้าร่วมการวิจัยซึ่งจะได้รับทราบรายละเอียดเกี่ยวกับการทำวิจัยรวมทั้งผลดีผลเสียที่อาจจะเกิดขึ้นได้เป็นอย่างดี ผู้วิจัยเลือกประชากรตัวอย่างสองกลุ่มนี้เพราะว่ามีการใช้ยา Fraxiparine มากขึ้นในคนปกติที่เกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหัวใจหรือในสมอง เนื่องจากข้อดีดังกล่าว ส่วนผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่รักษาด้วยการฟอกเลือดผ่านไตเทียม มีการสัมผัสกับ heparin เป็นระยะเวลานานจึงมีโอกาสเกิดภาวะแทรกซ้อนจากยาได้มาก ประกอบกับผลดีของยา Fraxiparine ดังกล่าวจึงเริ่มมีการใช้ยานี้มากขึ้นในผู้ป่วยกลุ่มนี้ ดังนั้นจึงควรที่จะรู้การตอบสนองต่อยานี้เป็นอย่างดีจึงจะทำให้แพทย์สามารถใช้ยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คนปกติ หมายถึงผู้ที่มีคุณสมบัติดังนี้

Inclusion criteria มีอายุระหว่าง 20-60 ปี มีสุขภาพสมบูรณ์ มีหน้าที่การทำงานของไตปกติ ซึ่งวัดจากระดับพลาสมาครีเอทินีนและไม่มีการเจ็บป่วยในช่วงทำวิจัย

Exclusion criteria มีโรคตับแข็ง, โรคแผลในกระเพาะอาหาร,และความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้

ผู้ป่วย chronic hemodialysis หมายถึงผู้ที่มีคุณสมบัติดังนี้

Inclusion criteria มีอายุระหว่าง 20-60 ปี เป็นผู้ป่วยไตวายเรื้อรังที่รักษาด้วยการฟอกเลือดผ่านไตเทียมในรพ.จุฬาลงกรณ์และไม่มีการเจ็บป่วยในช่วงทำวิจัย

Exclusion criteria มีโรคตับแข็ง, โรคแผลในกระเพาะอาหาร,และความดันโลหิตสูงที่ยังควบคุมไม่ได้

จากการคำนวณตามสถิติในการหาจำนวนตัวอย่างดังภาคผนวกพบว่าต้องใช้ประชากรตัวอย่างแต่ละกลุ่มเป็นจำนวน 6 คน

เครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย ได้แก่ ยา Fraxiparine หลอดเก็บตัวอย่างเลือดซึ่งเป็นหลอดพลาสติกที่บรรจุโซเดียมซิเตรทปริมาตร 0.3 มล. น้ำยาตรวจตัวอย่างเลือดวัดค่า anti-Xa activity

ตู้เก็บตัวอย่างเลือดที่มีความเย็น -20 เซลเซียส และเครื่องวัดค่า optical density

วิธีการศึกษา (Intervention) ดำเนินตามขั้นตอนดังนี้

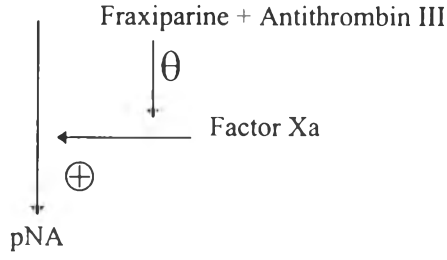
1. ฉีด Fraxiparine ขนาด 40 IU/กก.เข้าทางหลอดเลือดดำของประชากรตัวอย่างคนปกติ
2. เก็บตัวอย่างเลือดปริมาณ 2.7 มล.ใส่ในหลอดเก็บสารตัวอย่างเลือดที่บรรจุโซเดียมซิเตรท 0.3 มล.เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บในภาชนะที่มีน้ำแข็งปิดฝาสนิท จะเก็บตัวอย่างเลือดก่อนฉีดยาและที่ 5, 15, 30, 60, 120, 180, และ 240 นาทีหลังฉีดยา
3. ปั่นตัวอย่างเลือดดังกล่าวด้วยความเร็ว 3000 g เป็นเวลา 15 นาทีแล้วเก็บเฉพาะส่วนพลาสมามาตรวจ ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจได้ทันที จะเก็บตัวอย่างเลือดในตู้เก็บตัวอย่างที่มีความเย็น -20 เซลเซียส
4. ตรวจวัดระดับ anti-Xa activity ของพลาสมาตัวอย่าง แล้วจึงนำมาคิดหาระดับสูงสุดและค่าครึ่งชีวิต
5. ดำเนินการด้วยวิธีเดียวกันนี้ในผู้ป่วย chronic hemodialysis ในวันเว้นฟอกเลือดและวันฟอกเลือด
6. ปรับขนาดยา Fraxiparine ในวันฟอกเลือดครั้งต่อไปมากขึ้นร้อยละ 25 ถ้ามีลิ่มเลือดเกิดขึ้นในระบบ โดยในครั้งต่อไปของการฟอกเลือดจะเก็บตัวอย่างเลือดขณะเสร็จการฟอกเลือดเพื่อตรวจระดับ anti-Xa activity
7. วัดปริมาตรไตเทียมหลังการฟอกเลือดทุกครั้งเพื่อเปรียบเทียบกับก่อนการฟอกเลือด

วิธีการตรวจระดับพลาสมา anti-Xa activity

มีวิธีการตรวจติดตามระดับของ anti-Xa activity หลายวิธีซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการวิจัย ผู้วิจัยเลือกใช้วิธี amidolytic assays (Christian 1992) เพราะว่าเป็นวิธีมาตรฐานและนิยมใช้ในการทำวิจัย สามารถซื้อได้ง่ายและเป็นวิธีที่สะดวกซึ่งมีเครื่องมือในการตรวจวัดโดยวิธีนี้แล้ว

หลักการของการตรวจคือเป็นการวัดปริมาณการทำงานของ Fraxiparine ในที่นี้คือanti-Xa activity ที่เหลืออยู่หลังจาก incubate plasmaซึ่งมี Fraxiparine กับ factor Xa ในเวลาที่กำหนด แน่นอน ตัววัดคือปริมาณของสารที่ตรวจสอบได้ที่เกิดขึ้นจากการทำงานของ Fraxiparine ในที่นี้คือ pNA ดังนั้นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นดังนี้

4- Methyl(2R)-2-amino(methoxy{ethoxycarbamate})pentanoic acid-Gly-Arg-pNA



จะเห็นได้ว่าในกรณีไม่มี Fraxiparine จะเกิดการสลายได้ pNA ปริมาณมาก แต่เมื่อมี Fraxiparine และ antithrombin III มากจะทำให้ปฏิกิริยาเกิดน้อยลง จะได้ pNA น้อยลง การวัด pNA จะวัดเป็นหน่วย optical density จึงต้องเปลี่ยนเป็นหน่วย IU/ มล. โดยอาศัยกราฟมาตรฐานซึ่งจะต้องทำทุกครั้งที่มีการตรวจวัดค่า anti-Xa activity ของตัวอย่างเลือด

การทำจะเป็นตามขั้นตอนดังนี้

1. ใส่พลาสมาที่ต้องการทดสอบมา 50 ไมโครลิตรใส่ในหลอดพลาสติค
2. เติมสารทดสอบที่ 1 ซึ่งเป็นสารที่ใช้วัดค่าปริมาณ 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate เป็นเวลา 1 นาที
3. เติมสารทดสอบที่ 2 ซึ่งเป็น factor Xa ปริมาณ 200 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันแล้วนำไป incubate เป็นเวลา 1 นาที
4. เติม citric acid 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่า optical density (OD) ที่ 405 นาโนเมตร
5. ทำหลอดเปรียบเทียบค่า OD ของแต่ละตัวอย่างนั้น(blank test tube) โดยการเติมสารต่างๆตามลำดับดังนี้ citric acid 200 ไมโครลิตร สารทดสอบที่ 1 200 ไมโครลิตร พลาสมาที่ต้องการทดสอบ และสารทดสอบที่ 2 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน
6. การวัดแต่ละครั้งจะมีการทำกราฟมาตรฐาน (standard curve) เพื่อแปลงค่า OD ของพลาสมาตัวอย่างเป็นค่า IU/ มล.

การวัดปริมาตรไตเทียม

การวัดปริมาตรไตเทียมมี 2 วิธีคือการใช้คนวัด (manual method) และการใช้เครื่องวัด ในปัจจุบันสามารถใช้ได้ทั้งสองวิธีซึ่งได้ผลเท่าเทียมกัน สำหรับในประเทศไทยเริ่มมีการใช้เครื่องวัดมากขึ้นเนื่องจากมีความสะดวกต่อผู้วัด แต่อย่างไรก็ตามยังมีปัญหาพอสมควรเนื่องจากระบบการทำงานของเครื่องวัดยังมีปัญหาเกี่ยวกับเทคนิคของเครื่องทำให้การล้างและการวัดปริมาตรไตเทียมทำ

ไม่ได้ทุกครั้ง (failed procedure) และทำให้ต้องเปลี่ยนเป็นวัดด้วยคนแทนซึ่งจะทำให้เสียเวลามากยิ่งขึ้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือกใช้การวัดปริมาตรไตเทียมด้วยคนคือผู้วิจัยเอง

ขั้นตอนการวัดมีดังนี้

1. เมื่อทำฟอกเลือดเสร็จ ผู้วิจัยจะเก็บระบบการฟอกเลือดตรวจปริมาณลิ่มเลือดและนำไตเทียมแยกออกมาเพื่อล้าง
2. ผู้วิจัยใช้น้ำของระบบไตเทียมล้างไตเทียมจนน้ำที่ได้ใสดีซึ่งกินเวลาประมาณ 5 นาที
3. ประเมินการมีอากาศในไตเทียมด้วยการหงายไตเทียมขึ้นให้น้ำล้างไตเทียมไล่อากาศออกให้หมด และใช้การเคาะไตเทียมเพื่อช่วยไล่อากาศส่วนที่อาจหลงเหลืออยู่
4. ปิดน้ำล้างไตเทียมและจึงวัดด้วยการใช้หลอดฉีดยาดันลมจากปลายด้านหนึ่งของไตเทียมไล่น้ำออกจนหมด โดยมีการรองรับปริมาตรน้ำด้วยหลอดแก้ววัดปริมาตรทางห้องทดลอง
5. ทำการล้างและวัดไตเทียมแต่ละตัวจำนวน 3 ครั้งแล้วหาค่าเฉลี่ยและบันทึกผล

การเก็บรวบรวมข้อมูล

จะดำเนินการโดยผู้ทำวิจัย จะเริ่มตั้งแต่การซักประวัติและตรวจร่างกาย การวัดปริมาตรไตเทียมและการตรวจลิ่มเลือดในระบบไตเทียมและการรวบรวมผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การวิเคราะห์ข้อมูล

จะใช้ descriptive statistic ในการหาค่าเฉลี่ยของข้อมูลพื้นฐานของประชากรตัวอย่างทั้งสองกลุ่มและระดับสูงสุดและค่าครึ่งชีวิตของ anti-Xa activity จะใช้ unpaired t-test และ paired t-test ในการทดสอบความแตกต่างของประชากรตัวอย่างในกรณีที่เป็นการทดสอบในตัวอย่างกลุ่มเดียวและสองกลุ่มตามลำดับ จะใช้ linear correlation ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงเพื่อหาค่าครึ่งชีวิตของ anti-Xa activity ในกรณีที่มีการทดสอบความแตกต่างจะถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อระดับค่าความเชื่อมั่นที่ $p<0.05$