บทที่ 3

วัสดุ และ วิธีทำการวิจัย

1. สารเคมี

1.1 น้ำยา ZAP-OGLOBIN(R) (Coulter Eletronics Limited ประเทศอังกฤษ) ประกอบด้วย 0.33 กรัม ของโพแทสเซียมไซยาไนด์ ใน 100 มิลลิลิตร

1.2 น้ำยา Isoton(R) II เป็นน้ำยาเจือจางของ ZAP-OGLOBIN(R)

1.3 Ethylene diamine tetra-acetic acid (Assay 98 %) บริษัท Fluka ประเทศสวิส

1.4 [^{125}I] Anti-Ferritin IRMA Tracer (Baxter ประเทศสหรัฐอเมริกา) มีปริมาณรังสี <10 ไมโครคูรี (<1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ของ mouse monoclonal antiferritin) ใน 10.2 มิลลิลิตร ของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์(phosphate buffer) ซีรัมของกระต่าย, สารสีแดง 0.02 โมลาร์โซเดียมเอไซด์ (sodium azide) และ EDTA

1.5 Ferritin IRMA Blank (Baxter ประเทศ สหรัฐ-อเมริกา) ซึ่งประกอบด้วย 5.0 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซีรัมอัลบูมิน และ 0.02 โมลาร์โซเดียมเอไซด์

1.6 Ferritin IRMA standards (Baxter ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วย 2.0 มิลลิลิตรของ เฟอร์ริตินจากตับคน ใน 5.0 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ซีรัมอัลบูมิน และ 0.02 โซเดียมเอไซด์

1.7 Ferritin IRMA Assay Buffer (Baxter ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วย 10.5 มิลลิลิตรของฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.02 โมลาร์โซเดียมเอไซด์

1.8 Ferritin IRMA Rinse Buffer (Baxter ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ประกอบด้วย 50 มิลลิลิตรของ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ และ 0.02 โมลาร์โซเดียมเอไซด์

1.9 Rabbit Anti-ferritin IRMA Coated Tubes (Baxter ประเทศ สหรัฐอเมริกา) หลอดขนาด 12 x 75 มิลลิลิตร

เคลือบด้วย แอนติบอดี (antibody) ซีรัมเฟอร์ซิติน ของกระต่ายในปริมาณ < 1 ไมโครกรัม ต่อ หลอด

2. อุปกรณ์ และ เครื่องมือ

2.1 Test tube ขนาด 5 มิลลิลิตร

2.2 Test tube rack

2.3 Precision pipette (50 ไมโครลิตร, 100 ไมโครลิตร, 200 ไมโครลิตร)

2.4 Semi-automatic pipette (ขนาด 1.0 มิลลิลิตร)

2.5 Deionized water

2.6 Plastic-backed absorbant paper (optional)

2.7 Aspirator (optianal)

2.8 Gamma counter for [^{125}I] (LKB Wallae 1982 Universal gamma counter ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.9 Centrifuge (Clay ADAMS; NEW YORK ประเทศสหรัฐอเมริกา)

2.10 Lancet

2.11 Syringe

2.12 Capillary tube

2.13 Hettich haematokrit (Bayern Geprufte Sicherhit ประเทศเยอรมัน)

2.14 Coulter haemoglobinometer (Model M 530 ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3. วิธีทำการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย : ทำในรูปแบบ Classical experimental design กล่าวคือ นำเด็กที่มีอายุอยู่ในช่วง 6-14 ปี ทั้งหมดจำนวน 420 คน จากสถานสงเคราะห์ (เด็กหญิง) บ้านราชวิถี มาทำการประเมินภาวะโภชนาการของเหล็กอย่างคร่าว ๆ โดยเจาะเลือดที่บริเวณข้อพับของแขน แล้วหาปริมาณฮีมาโตคริต โดยวิธีในข้อ 3.7 และหาปริมาณฮีโมโกลบิน โดยวิธีในข้อ 3.8 ตามลำดับ เปรียบเทียบกับค่าปกติ ที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ได้จำนวนเด็กทั้งหมด 35 คนที่มีค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินต่ำกว่าค่ามาตรฐานที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้ จึงทำการตรวจเลือด เพื่อหาค่า

ซีรัมเฟอร์ริติน ก่อนให้ยา ตามวิธีในข้อ 3.9 จากนั้นจึงแบ่งเด็กทั้ง 35 คน ออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 7 คน โดยวิธี Randomized controlled trial แล้วดำเนินการดังนี้

3.1.1 - กลุ่มที่ 1 (กลุ่มควบคุม หรือ control group) เป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับยาแต่อย่างใด
- กลุ่มที่ 2 ได้รับยาเหล็ก 1 เม็ด
- กลุ่มที่ 3 ได้รับยาเหล็ก และวิตามิน ซี อย่างละ 1 เม็ด
- กลุ่มที่ 4 ได้รับยาเหล็ก จำนวน 2 เม็ด
- กลุ่มที่ 5 ได้รับยาเหล็กจำนวน 2 เม็ด และวิตามิน ซี 1 เม็ด

เหล็กในยาที่ใช้จะอยู่ในรูป เฟอร์รัสซัลเฟต (ferrous sulfate) ขององค์การเภสัชกรรม ขนาดเม็ดละ 300 มิลลิกรัม ซึ่งเทียบเท่ากับเหล็ก 60 มิลลิกรัม ในรูปยาเม็ดเคลือบน้ำตาล สีน้ำตาลเข้ม

วิตามิน ซี (ในรูป แอล (L) แอสคอบิก) ของบริษัท CHINTA TRADING ในขนาดเม็ดละ 100 มิลลิกรัม ในรูปยาเม็ดเคลือบน้ำตาลสีเขียว

3.1.2 ทำการให้ยาตามกลุ่มที่กำหนดไว้ในข้อ 3.1.1 จนครบ 1 เดือน โดยเริ่มให้ตั้งแต่วันที่ 9 สิงหาคม 2532 จนถึงวันที่ 9 กันยายน 2532 แล้วจึงทำการประเมินผลอีกครั้งโดยการวัดค่า ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และซีรัมเฟอร์ริติน (ตามวิธี ในข้อ 3.7,3.8 และ 3.9 ตามลำดับ)

3.1.3 ทำการประเมินปริมาณเหล็กและวิตามินซี ที่เด็กจากสถานสงเคราะห์บ้านราชวิถี ได้รับจากอาหารในแต่ละวัน โดยวิธีการคำนวณจากปริมาณอาหารที่ใช้ปรุงในแต่ละวัน ตลอด 1 เดือน ที่ทำการวิจัย วิธีการนี้ เป็นการนำเอาปริมาณอาหารสดแต่ละชนิดมาเปรียบเทียบหาค่าเหล็กและวิตามินซีจากตารางแสดงคุณค่าอาหารไทย (กองโภชนาการ กรมอนามัย, 2530) จากนั้นจึงนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยสำหรับแต่ละคน โดยนักโภชนาการจากสถานสงเคราะห์บ้านราชวิถีเป็นผู้ประเมินว่าเด็กแต่ละคนได้รับในปริมาณที่พอ ๆ กัน

3.2 หลักเกณฑ์ของการเลือกผู้ถูกทดลองเข้าร่วมทำการวิจัย

3.2.1 มีอายุระหว่าง 6-14 ปี และให้ความร่วมมือกับโครงการวิจัย

3.2.2 อยู่ในกลุ่มที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นโรคโลหิตจาง โดยดูจากลักษณะทั่วไปที่ค่อนข้างชีด (สังเกตจากสีของเล็บ ริมฝีปาก เปลือกตาด้านในชีด เล็บงอคล้ายช้อนและมีระดับ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ต่ำกว่าค่าปกติที่องค์การอนามัยโลกกำหนด นั่นคือน้อยกว่า 36 % และ 12 กรัม % ตามลำดับ

3.3 หลักเกณฑ์ที่ไม่เลือกเข้าทำการวิจัย

3.3.1 ไม่สมัครใจเข้าร่วมโครงการวิจัย

3.3.2 มีระดับฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน อยู่ในระดับปกติ ที่องค์การอนามัยโลกกำหนด

3.3.3 มีโรคทางอายุรศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับโรคเลือดบางชนิด อาทิเช่น ทาลัสซีเมีย (thalassemia)

3.4 ขั้นตอนการคัดเลือก ผู้ถูกทดลอง (subject)

3.4.1 สอบถามประวัติ ด้วยการสัมภาษณ์ และตรวจสุขภาพทั่วไป

3.4.2 ชั่งน้ำหนัก และตรวจเลือดหาปริมาณฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ตามข้อ 3.7 และ 3.8 ตามลำดับ

3.4.3 นำเด็กที่มีลักษณะโดยทั่วไปค่อนข้างชีด และ / หรือ มีระดับฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ต่ำกว่า 36% และ 12 กรัม% ตามลำดับ มาทำการตรวจเลือด เพื่อหาค่า ซีรัมเฟอร์ริติน อีกครั้ง

3.4.4 อธิบายให้ผู้ถูกทดลอง ทราบถึงรายละเอียดในการวิจัย และระยะเวลาในการศึกษาเพื่อให้ผู้ถูกทดลองเข้าใจ และให้ความร่วมมือตลอดการศึกษา

3.4.5 นัดให้ผู้ถูกทดลองมาที่ห้องพยาบาลของสถานสงเคราะห์บ้านราชวิถีทุกเช้าเพื่อรับยาตามกลุ่มที่กำหนดไว้ ตลอดระยะเวลา 1 เดือน และนัดเวลาในวันถัดไปหลังจากสิ้นสุดการให้ยา เพื่อให้มาตรวจเลือด สำหรับนำไปหาปริมาณ ฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และซีรัมเฟอร์ริติน เป็นครั้งสุดท้าย ทั้งนี้มีการซักถามถึงอาการข้างเคียงจากยาทุกครั้งหลังจากที่ได้รับยา

3.5 การเตรียมเก็บเลือด และซีรัม (Serum)

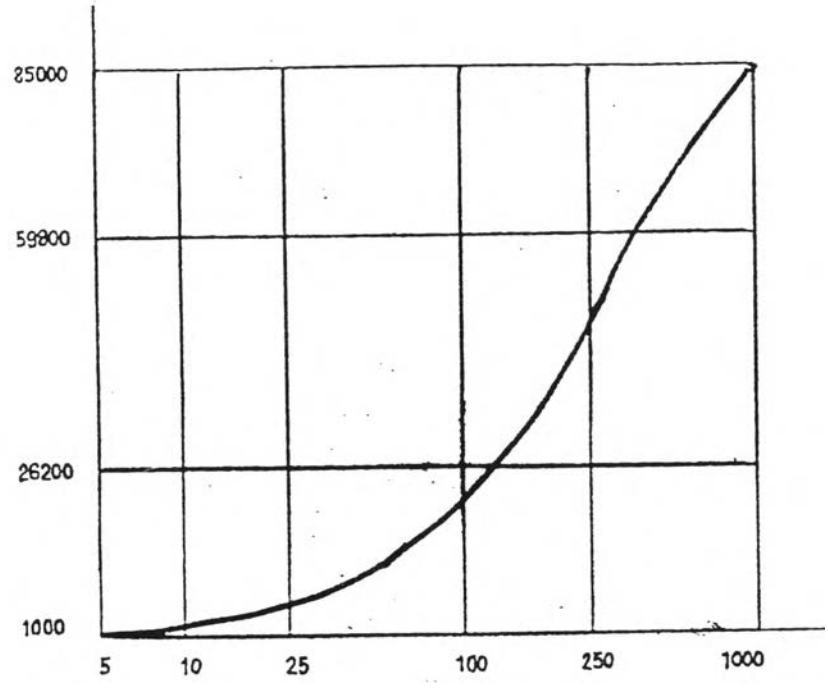
แบ่งเลือดของผู้ทดลองเป็น 2 ขวด ๆ ละ 5 มล. ขวดที่ต้องการนำมาวิเคราะห์ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน ใส่สารกันเลือดแข็ง EDTA ส่วนขวดที่ต้องการวิเคราะห์หาซีรัมเฟอร์ริติน นำมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เม็ดเลือดแดงจะจับตัวแยกออกมา เทน้ำใสใส่หลอดแก้วนำมาปั่นในเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ในอัตราเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 20 นาที เทแยกซีรัมออกจากตะกอนเก็บในหลอดแก้ว ติดสลากเขียนเลขที่ผู้ถูกทดลองและวันที่เจาะ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส จะเก็บได้นาน 7 วัน (ถ้านำไปแช่แข็งจะสามารถเก็บได้นานถึง 6 เดือน) เมื่อต้องการนำมาวิเคราะห์ ปล่อยทิ้งไว้ให้ละลายเองอย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิห้อง

3.6 การสร้างกราฟของสารละลายมาตรฐาน เพื่อหาค่าซีรัมเฟอร์ริติน (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual, 1984)

นำสารละลายมาตรฐาน Ferritin IRMA ที่ความเข้มข้น 5,10,25,100,250 และ 1,000 นาโนกรัม / มิลลิลิตร นำมาทำตามวิธี Immunoradiometric Assay ตามวิธีในข้อ 3.9 ในขั้นตอนของการหาปริมาณ นำค่าความแรงของรังสี (count per minute) ที่ได้กับค่าความเข้มข้นมาตรฐานของเฟอร์ริตินมาเขียนกราฟในกระดาษกราฟแบบกึ่งลอค (semi-logarithemic graph) โดยให้แกน Y เป็นค่า CPM และแกน X เป็นค่าความเข้มข้นของเฟอร์ริติน

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลของการสร้างกราฟของสารละลายมาตรฐานเฟอร์ริติน

Tube No.	Contents of Tubes	CPM Bound	Ferritin Concentration (ng/mL)
T1	Total Counts (Tracer)	294,889	
T2	Total Counts (Tracer)	294,319	
1	Ferritin IRMA Blank B_o 0 ng/mL	597	
2	Ferritin IRMA Blank B_o 0 ng/mL	476	00
3	Ferritin IRMA Standard 5 ng/mL	1,110	
4	Ferritin IRMA Standard 5 ng/mL	1,092	5.0
5	Ferritin IRMA Standard 10 ng/mL	2,159	
6	Ferritin IRMA Standard 10 ng/mL	2,260	10.0
7	Ferritin IRMA Standard 25 ng/mL	4,643	
8	Ferritin IRMA Standard 25 ng/mL	5,431	25.0
9	Ferritin IRMA Standard 100 ng/mL	21,388	
10	Ferritin IRMA Standard 100 ng/mL	20,432	100.0
11	Ferritin IRMA Standard 250 ng/mL	48,193	
12	Ferritin IRMA Standard 250 ng/mL	44,474	250.0
13	Ferritin IRMA Standard 1000 ng/mL	85,798	
14	Ferritin IRMA Standard 1000 ng/mL	82,673	1000.0



รูปที่ 2 กราฟมาตรฐานระหว่างความแรงของรังสี (CPM) กับความเข้มข้นของเฟอร์ริตินมาตรฐาน (โดยใช้กราฟกึ่งลอค)

เมื่อต้องการหาปริมาณของเฟอร์ริตินในซีรัมของผู้ป่วย นำซีรัมนั้นไปทำตามวิธี Immunoradiometric Assay ตามข้อ 3.9 อ่านค่าความเข้มข้นของซีรัมเฟอร์ริตินจากกราฟมาตรฐาน

3.7 วิธีการวัดปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Packed haematocrits) (เทคนิคการตรวจทางโลหิตวิทยา, 2518) ค่าฮีมาโตคริต คือ ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงคิดเป็นร้อยละต่อปริมาตรของเลือด เมื่อปั่นเลือดจนเม็ดเลือดแดงแยกจากพลาสมา เม็ดเลือดแดงอัดแน่นอยู่ก้นหลอด ความสูงของคอลัมน์ (column) เม็ดเลือดแดงจากก้นหลอดถึงระดับของพลาสมาเมื่อเทียบกับความสูงทั้งหมดคิดเป็นร้อยละคือค่าของฮีมาโตคริต ค่านี้จะบอกถึงความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงได้แม่นยำกว่าการนับจำนวนเม็ดเลือดแดงโดยตรง

วิธีทำ บรรจุเลือดเข้าหลอดแก้วเล็ก (capillary tube) ประมาณ 3 ใน 4 ของความยาวหลอด อุดปลายอีกด้านด้วยดินน้ำมัน แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นพิเศษ (Hematocrit centrifuge ของบริษัท Bayern Geprufte Sicherheit) แรงเหวี่ยงสูง 12,000-15,000 x G ปั่นโดยวางหลอดแก้วให้ปลายด้านที่อุดไว้ชิดกับขอบของเครื่องปั่น ปั่นเป็นเวลานาน 5 นาที หลังจากนั้น วัดความยาวคิดเทียบเป็นเปอร์เซนต์ของความยาวทั้งหมดของเลือด โดยอ่านค่าเทียบกับเครื่องอ่านชนิดจานกลม

3.8 วิธีการวัดปริมาณฮีโมโกลบิน (AB-Lars, automatic method 1965) โดยใช้เครื่อง Coulter Haemoglobinometer (Coulter counter M 530)

วิธีทำ นำเลือด 20 ไมโครลิตร เติมน้ำยา ISOTON(R) II 10 มิลลิลิตรและเติมน้ำยา ZAP-OGLOBIN(R) 2-3 หยด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วจึงนำไปวัดค่าปริมาณฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Coulter Haemoglobinometer (Model M530) ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร

3.9 วิธีดำเนินการวัดปริมาณซีรัมเฟอร์ริติน โดย Immunoradiometric Assay (IRMA) ดัดแปลงจากวิธี Radio Immunoassay (RIA) (Centers for Disease Control/National Institutes of Health Manual 1984)

หลักการ ของ Clinical Assays Gamma Coat [^{125}I] Ferritin Immunoradiometric Assay (IRMA) คือหลักของสารประกอบเชิงซ้อนของแอนติเจน-แอนติบอดี้ (antigen-antibody complex) โดยแอนติเจนในที่นี้คือซีรัมเฟอร์ติน เมื่อจับกับแอนติบอดี้ตัวแรกคือ rabbit anti-ferritin serum ซึ่งเคลือบอยู่ในหลอด และตัวที่ 2 คือ mouse monoclonal anti-ferritin ซึ่งเขียนบ่งไว้ด้วยไอโอดีน-125 [^{125}I] เมื่อทั้งหมดจับกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนแล้ว จึงนำสารประกอบเชิงซ้อนที่ได้ไปวัดค่ารังสีด้วยเครื่องวัด Gamma counter ซึ่งวัดเป็นค่าความแรงของรังสี (CPM) แล้วจึงนำไปหาปริมาณซีรัมเฟอร์ริตินจากกราฟมาตรฐาน

วิธีทำ : 1. เขียนฉลากที่หลอด Gammacoat ทุกหลอด เพื่อหาค่าตามรายการที่เรียงไว้ ได้แก่ total counts (T_1, T_2;

Blank [Bo]), standard ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และตัวอย่างซีรัม

2. เติม Ferritin IRMA Blank และ standard 50 ไมโครลิตร เติมซีรัม ผู้ถูกทดลอง 50 ไมโครลิตร

3. เติม Ferritin IRMA Assay Buffer 100 ไมโครลิตรทุกหลอด ยกเว้น T_1, T_2 (total counts) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ

4. วางหลอดทุกหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที

5. ดูดหลอด (ยกเว้น หลอด TC) เพื่อเทสารละลายที่เหลือทิ้งไป

6. เติม Ferritin IRMA Rinse Buffer 1 มิลลิลิตร เพื่อล้างหลอด (ยกเว้นหลอด TC) ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงดูดหลอดอีกครั้ง

7. เติมสาร anti-Ferritin IRMA Tracer หลอดละ 200 ไมโครลิตร (ยกเว้น Bo) โดยไม่ต้องเขย่า

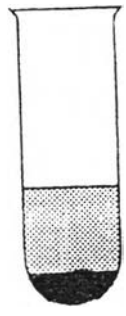
8. วางหลอดทั้งหมดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 60 นาที

9. ดูดหลอด (ยกเว้นหลอด TC) เพื่อให้ Tracer ที่เหลือทิ้งไป

10. ทำซ้ำเช่นเดียวกับข้อ 5

11. วัดค่ารังสีแกมมา (gamma ray) ด้วยเครื่อง Gamma counter ในเวลา 1 นาที โดยปรับหน้าต่างเครื่องใช้สำหรับวัดค่าไอโอดีน-125

12. นำค่าที่วัดได้ (CPM) มาหาค่าซีรัมเฟอร์ริตินจากกราฟมาตรฐาน



1 : pipet 50 µl standard, control, patient sample
: Add 100 µl assay buffer
: 60 minutes room temperature incubation

2 : Decant or Aspirate
: Rinse 2x with 1.0 ml rinse buffer
: Decant or aspirate again

3 : Add 200 µl tracer
: 60 minute room temperature incubation

4 : Decant or Aspirate
: Rinse 2x with 1.0 ml rinse buffer
: Decant or Aspirate again
: count

รูปที่ 3 แสดงภาพสรุปวิธีทำ IRMA อย่างคร่าว ๆ