

บทที่ 3 วิธีดำเนินการ

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

Cross-sectional Analytic Study

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

ประชากร (Population) และตัวอย่าง (Sample)

ประชากรเป้าหมาย ได้แก่ ผู้ป่วยโรค Systemic Lupus Erythematosus เพศหญิงที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

กลุ่มตัวอย่างหรือกลุ่ม SLE ได้แก่ ผู้ป่วย Systemic Lupus Erythematosus เพศหญิงที่ได้รับการวินิจฉัยตาม American Rheumatism Association Revised Criteria 1982⁵⁵ ที่อยู่ในความดูแลของหน่วยโรคข้อและรูมาติสซั่ม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ตั้งแต่ 2540-2541 โดยลำดับที่พบ ไม่ว่าจะพบขณะช่วงแรกวินิจฉัย(first diagnosis) หรือระหว่างติดตามการรักษา(follow up) ทั้งผู้ป่วยนอก(out-patients)และผู้ป่วยใน(in-patients)

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่เข้าข่ายในการวิจัย (Inclusion criteria)

1. เพศหญิงที่มีประจำเดือน
2. ผู้ป่วยที่มีระยะเวลาประจำเดือนปกติ (ไม่น้อยกว่า 24 วัน หรือไม่มากกว่า 35 วัน)⁵⁰ อย่างน้อย 2 เดือนติดต่อกัน
3. ผู้ป่วยยินยอมให้ศึกษา โดยลงนามในใบยินยอมให้ทำวิจัย

คุณสมบัติของผู้ป่วยที่ไม่เข้าข่ายในการวิจัย (Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
2. ผู้ป่วยที่ใช้ยาที่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ Prolactin ได้แก่ antipsychotic drugs, metoclopramine, cimetidine, opiates, methylidopa และยาคุมกำเนิด
3. ผู้ป่วยที่สงสัยว่ามีโรคที่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ Prolactin ได้แก่ โรคของ pituitary และ hypothalamus โดยใช้การซักประวัติและตรวจร่างกายโดยละเอียด

กลุ่มควบคุม ได้แก่ สตรีปกติที่สามารถจับคู่กันได้(Matched)กับกลุ่มตัวอย่าง ในด้านเพศ อายุ รอบประจำเดือน และช่วงประจำเดือน

คุณสมบัติของกลุ่มควบคุมที่เข้าข่ายในการวิจัย (Inclusion criteria)

1. เพศหญิงที่มีประจำเดือน
2. สตรีที่มีระยะรอบประจำเดือนปกติ (ไม่น้อยกว่า 24 วัน หรือไม่มากกว่า 35 วัน)⁵⁰ มาอย่างน้อย 2 เดือนติดต่อกัน
3. สตรีที่มีอายุใกล้เคียงกับกลุ่มตัวอย่าง (± 5 ปี)
4. สตรีที่สามารถมาเจาะเลือดในวันที่เดียวกันของรอบเดือนกับกลุ่มตัวอย่างได้
5. ยินยอมให้ศึกษา โดยลงนามในใบยินยอมให้ทำวิจัย

คุณสมบัติของกลุ่มควบคุมที่ไม่เข้าข่ายในการวิจัย (Exclusion criteria)

1. สตรีที่มีประวัติอาการทางคลินิกบางอย่างที่อาจเป็นลักษณะของโรค SLE ในช่วง 1 ปี ก่อนการศึกษาจนถึงขณะศึกษา ดังนี้คือ malar rash, discoid rash, photosensitivity, oral ulcer, polyarthritis, alopecia, psychosis และ seizure
2. สตรีที่ตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
3. สตรีที่ใช้ยาที่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ Prolactin ได้แก่ antipsychotic drugs, metoclopramine, cimetidine, opiates, methyl dopa และยาคุมกำเนิด
4. สตรีที่สงสัยว่ามีโรคที่สามารถเปลี่ยนแปลงระดับของ Prolactin ได้แก่ โรคของ pituitary และ hypothalamus โดยใช้การซักประวัติและตรวจร่างกายโดยละเอียด

การคัดเลือกตัวอย่าง

เมื่อผู้วิจัยตรวจรักษาผู้ป่วย SLE ทั้งผู้ป่วยนอกและผู้ป่วยในจะคัดเลือกกลุ่มตัวอย่างไปด้วยตามคุณสมบัติข้างต้น และนัดผู้ป่วยมาตรวจเพื่อเก็บตัวแปรและเก็บตัวอย่างเลือดต่อไป

ส่วนกลุ่มควบคุมจะคัดเลือกจากบุคลากรทางการแพทย์ ตามคุณสมบัติข้างต้นเช่นเดียวกัน และนัดมาตรวจเพื่อเก็บตัวแปรและเก็บตัวอย่างเลือดต่อไป

การคำนวณขนาดตัวอย่าง⁵⁶

$$n / \text{group} = (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 \frac{\bar{p}(1 - \bar{p})}{D^2}$$

n = ขนาดตัวอย่าง

$Z_{\alpha} = 1.645$ (one tails)

$Z_{\beta} = 0.84$ (20%)

p_1 = สัดส่วนการพบระดับ prolactin สูงใน SLE (expected event rate in disease group)

p_2 = สัดส่วนการพบระดับ prolactin สูงในคนทั่วไป (expected event rate in control group)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสัดส่วนการพบระดับ prolactin สูงใน SLE อยู่ระหว่าง 0.159-0.35^{27,28} เฉลี่ยคือ 0.255 ส่วนสัดส่วนการพบระดับ prolactin สูงในคนทั่วไป เท่ากับ 0.033³⁷

$$\bar{p} = (p_1 + p_2)/2$$

$$D = p_1 - p_2$$

$$\bar{p} = (0.033 + 0.255)/2 = 0.144$$

$$D = 0.255 - 0.033 = 0.222$$

$$n / \text{group} = (1.645 + 0.84)^2 \times 0.144(1 - 0.144) / (0.222)^2$$

$$= (6.18 \times 2 \times 0.144 \times 0.856) / (0.049)$$

$$= 31$$

เพิ่มอีก 10% เพื่อป้องกันข้อมูลสูญหาย เป็น 35 คน

∴ ต้องใช้ตัวอย่างกลุ่มละ 35 คน

การสังเกต (Observation) และการวัด (Measurement)

ตัวแปร

1. ข้อมูลพื้นฐานของกลุ่มตัวอย่างและกลุ่มควบคุม

ได้แก่ เพศ อายุ น้ำหนัก ส่วนสูง ข้อมูลด้านสูติ-นรีเวช

2. ลักษณะทางคลินิก

ได้แก่ ระยะเวลาที่เป็นโรค โรคที่พบร่วม การใช้ยา prednisolone และยาอื่นๆ การประเมินการกำเริบของโรคโดยแพทย์และผู้ป่วย (Physician global assessment score and Patients

global assessment score) และมีการประเมินลักษณะทางคลินิกที่สนใจอีก 4 อย่างโดยการประเมินทั้งหมดจะกระทำโดยผู้วิจัยเอง

ลักษณะทางคลินิกที่สนใจ ได้แก่

1. กลุ่มอาการทางเยื่อและผิวหนัง(muco-cutaneous)^{2,3}

มีอาการต่อไปนี้ได้อย่างใดอย่างหนึ่งช่วงเวลา 3 เดือนก่อนการศึกษานถึงขณะศึกษา ถือว่ามีอาการทางเยื่อและผิวหนัง

ก.malar rash

ข.subacute cutaneous lupus erythematosus(SCLE)

ค.discoid lupus erythematosus(DLE)

ง.oral ulceration

2. กลุ่มอาการข้ออักเสบ(arthritis)^{2,3}

มี nondeforming symmetrical polyarthritis ในช่วงเวลา 3 เดือนก่อนการศึกษานถึงขณะศึกษา ถือว่ามีอาการทางข้ออักเสบ

3. กลุ่มอาการไตอักเสบรูปลูกษ(lupus nephritis)^{2,3}

มีอาการต่อไปนี้ได้อย่างใดอย่างหนึ่งในช่วงเวลา 1 ปีก่อนการศึกษานถึงขณะศึกษา ถือว่ามีอาการไตอักเสบรูปลูกษ

ก.มีลักษณะ 2 ประการนี้

1.ปัสสาวะมี hematuria (red blood cell มากกว่า 5 ตัว/high power field)

หรือมี cellular casts

2.มี proteinuria มากกว่า 0.5 กรัมต่อวัน หรือ มากกว่า 3+

ข.nephrotic syndrome

มี proteinuria มากกว่า 3.5 กรัมต่อวัน

ค.พยาธิสภาพของไต(kidney pathology) เข้าได้กับไตอักเสบรูปลูกษ(lupus nephritis) ตามข้อกำหนดขององค์การอนามัยโลก(WHO classification of lupus nephritis)

4. กลุ่มอาการรูปลูกษของระบบประสาท(neuropsychiatric lupus)^{2,3}

มีอาการต่อไปนี้ได้อย่างใดอย่างหนึ่งในช่วงเวลา 1 ปีก่อนการศึกษานถึงขณะศึกษา ถือว่ามีอาการรูปลูกษของระบบประสาท

ก.ลมชัก(seizure)

ข.psychosis

3. The Systemic Lupus Activity Measure (SLAM)⁵³

วัดและประเมินตัวแปรต่อไปนี้เฉพาะในกลุ่มผู้ป่วย SLE ได้แก่

weight loss, fatigue, fever, oral ulcers, alopecia, rash, vasculitis, cytooid bodies, hemorrhage, papillitis or pseudotumor cerebri, lymphadenopathy, hepatomegaly or splenomegaly, pleural effusion/pleurisy, pneumonitis, Raynaud's phenomenon, hypertension, carditis, abdominal pain, stroke syndrome, seizure, cortical dysfunction, headache, myalgia/myositis, joint pain, hematocrit, white blood cells count, lymphocyte count, platelet count, Erythrocyte sedimentation rate, serum creatinine, urine sediment

มีการประเมินและให้คะแนนตามแบบฟอร์มตัวอย่างในภาคผนวก โดยผู้วิจัยเอง การประเมินจะทำในช่วงที่เจาะเลือดหาระดับ prolactin

4. ระดับฮอร์โมน prolactin ในกระแสเลือด

มีหน่วยเป็น mIU/L (โดยหน่วย ng/mL = $0.031 \times$ mIU/L)

เครื่องมือที่ใช้ในการวัดตัวแปร

1. งานทางห้องปฏิบัติการพื้นฐาน ได้แก่ Complete Blood Count (CBC), Urinalysis (UA), Erythrocyte Sedimentation Rate (ESR) และ Serum Creatinine โดยห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

2. การตรวจระดับ Prolactin โดยวิธี Fluoroimmunoassay (FIA) technique โดยห้องปฏิบัติการของภาควิชาสูติศาสตร์-นรีเวชวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

กลุ่มตัวอย่าง

1. เก็บข้อมูลทางคลินิก ได้แก่ อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ระยะเวลาที่เป็นโรค อาการและอาการแสดงของโรค ยาที่ได้รับอยู่รวมทั้งขนาด โรคที่พบร่วม รวมถึงมีอาการทางเยื่อและผิวหนัง (muco-cutaneous) ข้ออักเสบ (arthritis) ไตอักเสบ (lupus nephritis) และรูปของระบบประสาท (neuropsychiatric lupus) หรือไม่ ถ้าต้องการผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการประกอบจะใช้จากผลที่ใช้ในการประเมิน SLAM score

2. ชั่งประวัติเกี่ยวกับประจำเดือน ได้แก่ ระยะเวลาของรอบเดือน ความสม่ำเสมอรอบเดือน

3. นัดกลุ่มผู้ป่วย ในวันหลังการมีรอบเดือนช่วงครึ่งแรก(follicular phase) ในการศึกษานี้จะ นัดให้ผู้ป่วยมาพบเมื่อเริ่มมีประจำเดือนวันแรก โดยให้เลื่อนไปได้ไม่เกิน 3 วันจะได้อยู่ใน follicular phase

4. นัดช่วงระหว่างเวลา 8.00-12.00 น. โดยให้ผู้ป่วยที่จะถูกเจาะเลือดมาเจาะเลือดในตอนเช้าหลังจากอดอาหารนาน 6 ชั่วโมง ให้ผู้ป่วยได้พักก่อนเจาะเลือด ถ้าเป็นผู้ป่วยในหอผู้ป่วยก็จะมาเจาะเลือดที่หอผู้ป่วย

5. ประเมินระดับการกำเริบของโรคโดยใช้ SLAM index score

6. นำเลือดที่แข็งตัวแล้ว (clotted blood) ไปปั่นที่ 3500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที

7. แยกเก็บเฉพาะ serum นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียสไว้เพื่อวัดระดับฮอร์โมน
กลุ่มควบคุม

1. เลือกกลุ่มควบคุมตามข้อกำหนด

2. นัดคนที่อยู่ในกลุ่มควบคุม มาพบในวันที่เดียวกันของรอบประจำเดือน โดยให้เลื่อนไปจากวันที่ต้องการได้ไม่เกิน 3 วัน แต่ต้องเป็นวันที่มีประจำเดือนมาแล้ว

3. นัดช่วงระหว่างเวลา 8.00-12.00 น. โดยให้ผู้ป่วยที่จะถูกเจาะเลือดมาเจาะเลือดในตอนเช้าหลังจากอดอาหารนาน 6 ชั่วโมง ให้ได้พักก่อนเจาะเลือด

4. นำเลือดที่แข็งตัวแล้ว (clotted blood) ไปปั่นที่ 3500 รอบต่อนาทีนาน 10 นาที

5. แยกเก็บเฉพาะ serum นำไปแช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียสไว้เพื่อวัดระดับฮอร์โมน

วิธีตรวจหาระดับ prolactin

หลักการตรวจโดยวิธี Fluoroimmunoassay อาศัยพื้นฐานของวิธี direct sandwich technique และตรวจนับ europium(Eu) ดังที่แสดงในแผนภาพที่ 1

ใช้ DELFIA® Prolactin (Time-resolved fluoroimmunoassay) โดยวิธี Two-incubation procedure ดังนี้

1. สารละลายที่ใช้มีดังนี้ Wash concentrate, Assay Buffer, Tracer stock solution และ Enhancement solution ซึ่งเป็นสารละลายที่เตรียมมาสำเร็จรูป
2. นำ serum ที่แช่แข็งไว้มาทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง
3. เตรียมสารละลาย Wash solution โดยการนำเทสารละลาย Wash concentrate 40 mL ลงในภาชนะสะอาดแล้วเจือจาง 25 เท่า โดยผสมน้ำอีก 960 mL ลงไปจะได้ buffered wash solution(pH 7.8)

4. ล้างภาชนะแบบ prewash 1 ครั้งด้วยโปรแกรม 18
5. ใส่ Prolactin Standard และ Serum ที่ต้องการตรวจ หลุมละ 25 μ L
6. ใส่ Assay Buffer ปริมาณ 200 μ L ลงไปในแต่ละหลุม
7. incubate นาน 2 นาทีด้วยวิธีเขย่าแบบเร็ว แล้วต่อด้วย incubate นาน 90 นาทีด้วยวิธีเขย่าแบบช้า ที่อุณหภูมิห้อง
8. เตรียมสารละลาย Anti-Prolactin-Eu-labelled tracer solution โดยผสม Tracer stock solution 320 μ L เข้ากับ Assay buffer 24 mL
9. ล้างภาชนะแบบ prewash 2 ครั้งด้วยโปรแกรม 18
10. ใส่ Anti-Prolactin-Eu tracer dilution ปริมาณ 200 μ L
11. incubate โดยไม่เขย่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 90 นาที
12. ล้างภาชนะแบบ prewash 6 ครั้งด้วยโปรแกรม 18
13. ใส่ Enhancement solution ปริมาณ 200 μ L
14. เขย่าแบบช้าอีก 5 นาที
15. อ่านค่า prolactin ด้วยเครื่องวัด time-resolved fluorometer โดยเลือกใช้โปรแกรม KIT

18

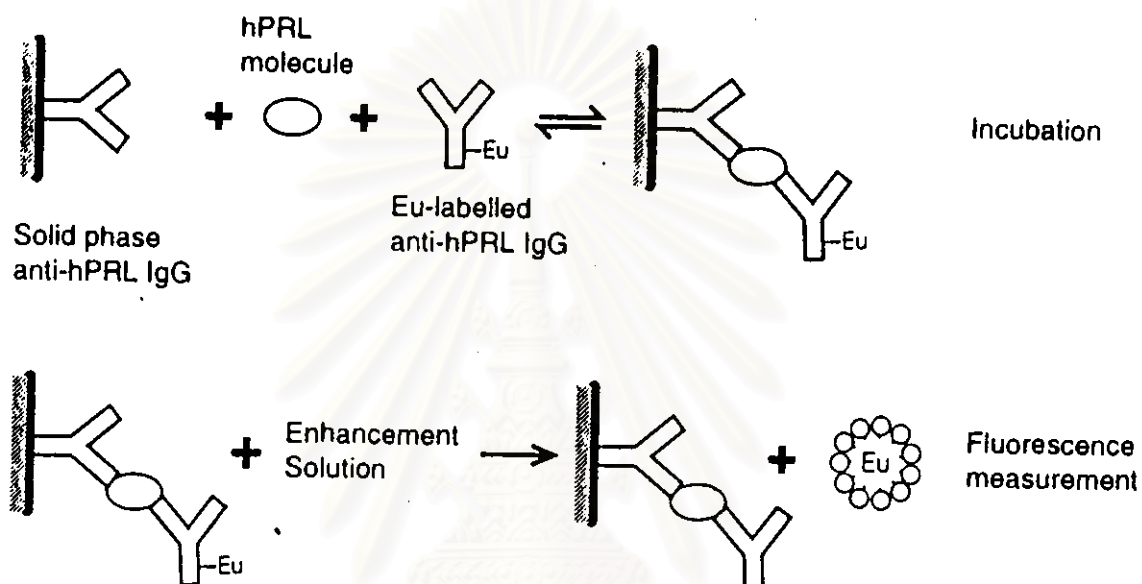
สิ่งที่แสดงในแผนภาพที่ 2

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา ใช้การตรวจระดับ prolactin ด้วยวิธีนี้มีค่ามาตรฐานของห้องปฏิบัติการดังนี้

- %CV Intra-assay = 1.41 (ที่ระดับ prolactin 90 mIU/L) และ 2.92 (ที่ระดับ prolactin 900 mIU/L)
- %CV Inter-assay = 2.68 (ที่ระดับ prolactin 90 mIU/L) และ 4.38 (ที่ระดับ prolactin 900 mIU/L)

ส่วนระดับ prolactin ที่ได้จากการตรวจในสตรีปรกติ โดยห้องปฏิบัติการของภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา ในช่วง follicular phase = 492.3 ± 18.7 mIU/L, ช่วง mid-cycle period = 830.0 ± 175.2 mIU/L และช่วง luteal phase = 506.2 ± 19.7 mIU/L

แผนภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการตรวจระดับฮอร์โมนด้วยวิธี FIA




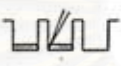

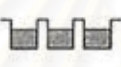


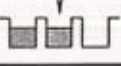


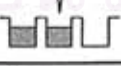

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการตรวจระดับฮอร์โมน Prolactin

13901149-8

DELFLIA® Prolactin kit

Summary Protocol Sheet, Two-incubation Procedure

Wash		Program 18 (x 1)		
Add standards and unknowns		25 µL		
Add buffer		200 µL		
Incubate		2 min. fast shaking + 90 min. slow shaking at RT		
Dilute tracer (see table)		Strips		
		Tracer stock solution (µL)		
		Buffer (mL)		
		1	40	3
		2	80	6
		3	120	9
		4	160	12
		5	200	15
		6	240	18
7	280	21		
8	320	24		
Wash		Program 18 (x 2)		
Add tracer dilution		200 µL		
Incubate		90 min. without shaking at RT		
Wash		Program 18 (x 6)		
Enhance		200 µL, 5 min. slow shaking		
Count		KIT 18		

DELFLIA is a registered trademark of Wallac Oy.

การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

1 การสรุปข้อมูล(Summarization of Data)

- 1.ค่าเฉลี่ย(mean)ของระดับ prolactin ในแต่ละกลุ่มการทดลอง
- 2.จำนวนและสัดส่วนของผู้ป่วยที่มีระดับ prolactin สูงกว่า 20 ng/ml
- 3.ระดับ prolactin กับ SLAM index score
- 4.ระดับ prolactin ในกลุ่มอาการทางคลินิกต่างๆ
- 5.สัดส่วนของกลุ่มอาการทางคลินิกต่างๆในกลุ่มที่มีระดับ prolactin สูงกว่า 645.2 mIU/L (20 ng/mL) หรือระดับ prolactin ต่ำกว่า 645.2 mIU/L

2 การนำเสนอข้อมูล(Data Presentation)

เสนอในรูปแบบตาราง และแผนภูมิตามความเหมาะสม

3 การทดสอบสมมติฐาน(Hypothesis testing)

- 1.ใช้ paired t-test ทดสอบว่าผู้ป่วย SLE มีระดับฮอร์โมน prolactin แตกต่างจาก กลุ่มควบคุมหรือไม่
- 2.ใช้ linear correlation และ linear regression หาความสัมพันธ์ของระดับฮอร์โมน prolactin กับระดับการกำเริบของโรค(SLAM score) หรือลักษณะทางคลินิกต่างๆ
- 3.ใช้ unpaired t-test หรือ Mann-Whitney U test หรือ chi-square test ทดสอบว่าระดับฮอร์โมนในผู้ป่วยที่มีกับไม่มีอาการและอาการแสดงแต่ละกลุ่ม(ได้แก่ อาการทางคลินิกทั่วไป กลุ่มอาการทางเขื้อนและผิวหนัง ข้ออักเสบ ไตอักเสบ และลุ่สของระบบประสาท) ต่างกันหรือไม่

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

เนื่องจากการศึกษานี้ไม่มี intervention แต่มีการเก็บตัวอย่างเลือดเพิ่มเติมจากปรกติ จึงมี ปัญหาทางจริยธรรมน้อย แต่ได้ส่งให้คณะกรรมการจริยธรรมพิจารณาแล้ว

การบริหารงานวิจัยและตารางการปฏิบัติงาน (Administration and Time Schedule)

- | | |
|-----------------------------|--------------|
| 1.หาข้อมูลและทบทวนวรรณกรรม | กรกฎาคม 2540 |
| 2.เตรียมและวางแผนการวิจัย | สิงหาคม 2540 |
| 3.เสนอโครงการเพื่อขออนุมัติ | ตุลาคม 2540 |

4.เริ่มเก็บรวบรวมข้อมูล	ตุลาคม 2540 ถึง มีนาคม 2541
5.วิเคราะห์ข้อมูล	ตุลาคม 2540 ถึง มีนาคม 2541
6.สรุปและรายงานผล	เมษายน 2541

งบประมาณ (Budget)

แจกแจงได้ดังนี้

1.ค่าตรวจระดับฮอร์โมน Prolactin (250 บาทต่อราย ทั้งหมด 81 ราย)	รวม 20,250 บาท
2.ค่าการตรวจประเมิน SLAM score (120 บาทต่อผู้ป่วย 1 คน ทั้งหมด 42 คน)	รวม 5,040 บาท
3.ค่าอาสาสมัคร (คนละ 100 บาท ทั้งหมด 42 คน)	รวม 4,200 บาท
4.ค่าวัสดุ (เอกสารต่างๆ)	รวม 510 บาท

จากรายละเอียดดังกล่าวรวมเป็นเงินทั้งหมด 30,000 บาท ซึ่งผู้วิจัยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยจำนวน 20,000 บาท

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย