

บทที่ 4

ระเบียบวิธีวิจัย และการรวบรวมข้อมูล

คำถามการวิจัย

1. epidermal LC ในผื่น PPE ของผู้ป่วย HIV มีการเปลี่ยนแปลงไปจากผิวหนังปกติ ในด้านจำนวน และ โครงสร้างของเซลล์หรือไม่
2. epidermal LC เป็นเป้าหมายของการติดเชื้อ HIV ในผื่นชนิดนี้หรือไม่

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของ LC ในผิวหนังชั้นหนังกำพร้าของผื่น pruritic papular eruption ที่พบร่วมกับการติดเชื้อ HIV
2. เพื่อศึกษาหาหลักฐานของเชื้อไวรัส HIV ใน LC ในผื่น PPE และบริเวณใกล้เคียง
3. เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาถึงพยาธิกำเนิดของผื่น PPE ต่อไปในอนาคต

สมมุติฐาน

พยาธิกำเนิดของผื่น PPE เกี่ยวข้องกับการที่ LC ในผิวหนังของผู้ป่วยเกิดการติดเชื้อ HIV ขึ้น ทำให้จำนวนเซลล์ลดลงและทำให้มีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้างของเซลล์และบทบาททางภูมิคุ้มกัน

วิธีการดำเนินงานวิจัยและวิธีวิเคราะห์ข้อมูล

ก. วัตถุประสงค์และวิธีการ

วัตถุประสงค์

- ประชากรและตัวอย่าง
- หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

การวินิจฉัยว่าเป็น HIV-associated pruritic papular eruption มีหลักเกณฑ์ดังนี้

1. ตรวจเลือดหาเชื้อ HIV โดยวิธี ELISA และยืนยันผลการตรวจสอบด้วย Particle Agglutination test
2. ต้องไม่เคยมีประวัติแพ้ยุง (insect bite reaction) หรือมีประวัติครอบครัวยุงมาก่อน
3. ตุ่มผื่นที่เกิดขึ้นต้องไม่มีความเกี่ยวข้องกับตำแหน่งที่ถูกยุงกัด
4. ลักษณะเป็นตุ่มนูนแดงขนาด 2-5 มม. อาจเป็นตุ่มหนองได้ เป็น 2 ข้างเหมือนกัน พบกระจายตามแขนและขาเป็นส่วนใหญ่ อาจกระจายไปที่อื่น เช่น ศีรษะ คอ ลำตัวส่วนบน ผื่นอาจพบอยู่ตามรูขุมขนได้ ไม่พบผื่นบริเวณฝ่ามือ ฝ่าเท้า ผื่นมีหลายระยะเป็นได้ทั้ง macule , papule , nodule , vesicle หรือ bullae
5. มีอาการคันค่อนข้างมากและมีอาการเรื้อรัง ผื่นไม่เจ็บ อาการคันมักเริ่มพร้อม ๆ กันกับผื่น แต่อาจมีอาการคันก่อนผื่นได้
6. ผลการตรวจทางพยาธิต้องเข้าได้กับโรค PPE โดยพบเซลล์ lymphocyte และเซลล์ plasma อยู่รอบเส้นเลือด และอาจพบเซลล์ eosinophil , หรือพบลักษณะ granuloma ได้ บางครั้งจะพบ spongiosis ของ hair follicle ร่วมไปกับการมีเซลล์อักเสบที่ perifollicular ในชั้นหนังแท้ อาจมีการทำลายของ hair follicle ทำให้มีฝี eosinophillic หรือเกิดที่ sebaceous gland ได้
7. การตรวจทางห้องปฏิบัติการพื้นฐานต่าง ๆ ได้แก่ 10%KOH, scabies scrapings, Gram stain, hematoxylin and eosin stain, Giemsa stain, acid-fast stain ไม่พบ organism ที่เป็นสาเหตุอื่นที่ทำให้เกิดผื่น

ประชากรตัวอย่าง

ผู้ป่วย HIV-associated pruritic papular eruption ที่มารับการตรวจรักษาในโรงพยาบาล จุฬาลงกรณ์ จำนวน 20 ราย

กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา

1. ตรวจเลือดหาหลักฐานของการติดเชื้อ HIV ได้ผลบวก
2. มีลักษณะผื่นที่เข้าได้ดังกล่าว
3. ผลทางพยาธิเข้าได้
4. สามารถให้ความร่วมมือในการศึกษาและติดตามผลได้
5. ในผู้ป่วยที่ได้รับยารักษาผื่นมาก่อน ต้องหยุดยามาแล้วอย่างน้อย 1 เดือน
6. ในผู้ป่วยที่ไม่เคยได้รับยารักษาโรคเอดส์มาก่อนหรือเคยได้รับมาก่อนแต่ขาดการรักษามาแล้วอย่างน้อย 2 สัปดาห์

กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา

1. มีประวัติ insect bite reaction ,มีประวัติ ผื่นแพุ้งในครอบครัว
2. ตรวจสอบด้วยวิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการพบเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุ

วิธีการ

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง ใช้การสังเกต และการทดสอบโดยใช้ห้องปฏิบัติการ ศึกษาในผู้ป่วย 20 ราย

ข. วิธีดำเนินการวิจัย

● ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. ผู้วิจัยชี้แจงวัตถุประสงค์ วิธีการ ประโยชน์ที่ได้รับ อันตรายที่อาจเกิดขึ้นแก่ผู้ป่วย
2. ผู้ป่วยลงนามยินยอมเข้ารับการรักษา และสามารถถอนตัวจากการวิจัย เมื่อใดก็ได้
3. ชักประวัติ
 - ◆ บันทึก อายุ, เพศ,เชื้อชาติ, ประวัติแพ้สัมผัส, แพศของอุ้งนอน, ระยะเวลาที่เป็นผื่น, โรคแทรกซ้อนต่าง ๆ, อาการที่เป็นเริ่มแรก, อาการคัน, การใช้ยา , ตรวจร่างกายทั่วไป
 - ◆ บันทึกลักษณะผื่น macule, nodule, papule, vesicle, bullae, scale, follicular, crusted, ulcer, excoriation
 - ลักษณะสี
 - จำนวน
 - การกระจาย แขน ขา คีรษะ คอ ลำตัว mucous membrane
 - ตำแหน่ง flexor, extensor
 - ◆ บันทึกความรุนแรงของผื่นแบ่งเป็น 3 ระดับดังนี้
 1. ระดับน้อย : ผื่นจำกัดอยู่เฉพาะบริเวณ แขนขานอกร่มผ้าเท่านั้น หรือจำนวนตุ่มไม่เกิน 10 ตุ่ม
 2. ระดับปานกลาง : ผื่นมีที่บริเวณร่มผ้าที่แขนขาเป็นจำนวนมาก แต่ไม่เป็นที่ลำตัว
 3. ระดับรุนแรง : ผื่นพบได้ทั้งในและนอกร่มผ้า หรือเป็นทั้งตัว

- ◆ บันทึกความคิดปกติอื่น ๆ การติดเชื้อแทรกซ้อนต่าง ๆ , ความผิดปกติของต่อมน้ำเหลือง
- ◆ บันทึกระยะของโรคเอดส์ (HIV-staging) โดยบันทึกเป็น 2 แบบ
 1. แบ่งระยะของการเจ็บป่วยด้วยโรคเอดส์ โดยเรียกตามอาการและความรุนแรงของโรคทางคลินิก
 2. แบ่งตามหลักเกณฑ์ของ CDC (Centers for Disease Control) ในปี พ.ศ. 2536

4. การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

- ◆ anti-HIV (ELISA and confirm with Particle Agglutination test)
- ◆ CBC , total lymphocyte count
- ◆ CD4 บันทึกผลวันแรกที่พบว่า มีผื่น PPE และขณะที่ทำการศึกษา
- ◆ ตรวจหาโรคช่อง oral thrush โดยต้องมีผลบวก KOH ที่ลิ้น
- ◆ ตรวจด้วยวิธีพื้นฐานทางห้องปฏิบัติการเพื่อหาเชื้ออื่นที่เป็นสาเหตุโดยทำ 10%KOH, scabies scrapings, Gram stain, hematoxylin and eosin stain, Giemsa stain, acid-fast stain

5. Electronmicroscopic and Immunohistochemical studies

ตัดชิ้นเนื้อบริเวณผื่นเป็นจำนวน 2 ชิ้น โดยเลือกรอยโรคที่เกิดขึ้นใหม่ erythematous papule กับรอยโรคเก่า ร่วมกับชิ้นเนื้อปกติจากผู้ป่วยอีก 1 ชิ้นเป็น control โดยชิ้นเนื้อทุกชิ้นจะตัดในบริเวณใกล้เคียงกัน ตัดโดยใช้ punch biopsy no 6 เข็มแผล แล้วทำการแบ่งชิ้นเนื้อแต่ละชิ้นออกเป็น 3 ส่วน

ส่วนแรกนำชิ้นเนื้อแช่ในน้ำยา 10% formalin in aqueous solution เพื่อนำไปศึกษาทางพยาธิวิทยา

ส่วนที่สองนำชิ้นเนื้อแช่ในน้ำยา gluteraldehyde โดยแช่ไว้ข้ามคืน แล้วจึงนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ส่วนที่สามหลังตัดชิ้นเนื้อจะเก็บชิ้นเนื้อในแผ่นฟรอยด์ เก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ -80°C จนกว่าจะนำไปศึกษาทางอิมมูโนวิทยาต่อไป

โดยมีรายละเอียดวิธีการศึกษาดังนี้

1. Histopathologic studies

นำชิ้นเนื้อไปย้อมด้วย hematoxylin and eosin stain และตรวจดูพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope)

2. electron microscopic studies

ตัดชิ้นเนื้อขนาดความหนาไม่เกิน 1 มม. แช่ในน้ำยา 3% gluteraldehyde ค้างคืน ล้างด้วย phosphate buffer หลังจากนั้นแช่ชิ้นเนื้อตัวอย่างลงใน 2% OsO₄ 1 ชั่วโมง นำไป dehydrate ใน alcohol แล้วนำไป infiltrate และ embed ใน Epon 812, polymerization ที่อุณหภูมิ 60°C 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำ plastic block ที่ได้ไปตัดให้เป็น thick section ขนาดความหนา 0.5 ไมโครเมตร เลือกบริเวณที่สามารถพบ Langerhans cell นำไปตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้เป็น thin section ขนาดความหนา 60-100 นาโนเมตร วางชิ้นเนื้อที่ได้ลงบนกริดทองแดง (copper grid) แล้วนำไปย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate แล้วนำไปตรวจดูลักษณะและรูปร่างของ Langerhans' cell และตรวจหาเชื้อ HIV ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (transmission electron microscope) ทั้งภายในและรอบ LC

3. Immunohistochemical studies ใช้ avidin-biotin-peroxidase complex method

ตัดชิ้นเนื้อขนาดความหนา 4-6 micrometer thick ด้วยเครื่อง cryostat วางบนแผ่นสไลด์และทิ้งไว้ให้แห้ง 15 นาที แช่ใน cold acetone 10 นาที แล้วนำไป phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.2, 0.15 N หลังจากนั้นนำเอาสไลด์ไปใส่ใน moist chamber ใส่ anti-CD1, anti-HIV core protein p24 antigen ลงบน slide แต่ละแผ่นทิ้งไว้ 30 นาที นำ slide ไปล้างใน PBS 10 นาที แล้วนำ slide ไปใส่ใน moist chamber ใส่ biotinylated antimouse serum ลงไปทิ้งไว้ 30 นาที ล้าง slide ด้วย PBS 10 นาที นำไปใส่ moist chamber ย้อม slide ด้วย streptavidin-HRP ทิ้งไว้ 30 นาที ล้างด้วย PBS 10 นาที ทำการ mount สไลด์ โดยใช้ buffered glycerine แล้วนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ในชั้น epidermis ตรวจหา CD1 Ag เพื่อนับจำนวนของ LC โดย epidermal LC นั้นจะถูกนับว่าเป็น 1 เซลล์เมื่อประกอบด้วยนิวเคลียส และส่วนของ dendrites ตั้งแต่ 2 อันขึ้นไปและตรวจ HIV core protein p24 antigen เพื่อหาหลักฐานของเชื้อไวรัสภายในและรอบเซลล์ชนิดนี้

โดยการตรวจชิ้นเนื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และ immunohistochemical study นั้นได้ใช้วิธีการศึกษาแบบ "blind analysis" ผู้ศึกษาจะไม่ทราบว่าเป็นเนื้อที่กำลังศึกษาอยู่นั้นเป็น PPE ชนิดผื่นใหม่, ผื่นเก่า หรือผิวหนังปกติเพื่อป้องกันการเกิดความลำเอียงในการแปลผลการศึกษา

- ขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากการวิจัยนี้เป็นการวิจัยแรกที่ศึกษาทางอิมมูโนพยาธิวิทยาและอิมโมตรอนไมโครสโคปในฝิ่นของโรคนี้ เพื่อสร้างสมมติฐาน และ วัสดุมีราคาแพงมาก จึงกำหนดศึกษาในผู้ป่วย 20 ราย ซึ่งเป็นจำนวนมากพอสมควรโดยยังไม่มีการศึกษาใดนำมาก่อน

- วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics) คำนวณข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย, ใช้สถิติที่ไม่ใช้พารามิเตอร์ แบบ Wilcoxon matched pairs signed - rank test คำนวณความแตกต่างของความหนาแน่นของ epidermal LC ในฝิ่น PPE ชนิดฝิ่นเก่าและฝิ่นใหม่เปรียบเทียบกับผิวหนังปกติบริเวณใกล้เคียงกัน และ Mc Nemar chi-square คำนวณความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์อิมโมตรอนของ epidermal LC ที่ตรวจพบกับการเกิดฝิ่น PPE ทั้งสองระยะ

ค. ปัญหาทางจริยธรรม

โดยปกติในการวินิจฉัยโรคนี้จะใช้ลักษณะทางคลินิกเป็นเกณฑ์ หรืออาจใช้ผลทางพยาธิวิทยาที่เข้าได้ ซึ่งจะใช้เพียงชิ้นเนื้อเดียว ไม่มีความจำเป็นที่จะต้องตัดชิ้นเนื้อถึง 3 แห่ง แต่เนื่องจากมีความจำเป็นในการศึกษา และการตัดชิ้นเนื้อไม่ทำให้เกิดอันตรายแทรกซ้อนอื่น โดยต้องอธิบายให้ผู้ป่วยเข้าใจ รวมทั้งให้ผู้ป่วยเขียนใบยินยอมรับรู้อก่อนเข้าในการศึกษาวิจัยด้วย

ง. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

การวิจัยนี้จะช่วยให้เข้าใจถึงพยาธิกำเนิดของโรค และอาจนำไปสู่แนวทางการรักษาใหม่

จ. อุปสรรค

เนื่องจากโรคนี้เป็นโรคที่เรื้อรัง ยังไม่มียากลุ่มใดที่ใช้ได้ผลดีเท่าที่ควร และการวิจัยไม่มีประโยชน์ต่อผู้ป่วยโดยตรง อาจทำให้ผู้ป่วยขาดความร่วมมือในการศึกษาวิจัยได้ แต่จะแก้ไขได้โดยการอธิบายผลดีผลเสียที่เกิดจากการวิจัย และให้การดูแลรักษาฝิ่นรวมทั้งโรคแทรกซ้อนอื่น ๆ ไปพร้อมกัน ตลอดจนการศึกษานี้เป็นการวิจัย ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง ทำให้ผู้ป่วยสะดวกในการเข้าร่วมโครงการ นอกจากนี้ยังมีปัญหาเรื่องวัสดุอุปกรณ์มีราคาแพง จึงต้องพยายามหาแหล่งเงินทุนสนับสนุนการวิจัยต่อไป