บทที่ 2

วิธีดำเนินการ

รูปแบบการวิจัย

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาเชิงปฏิบัติการในห้องทดลอง (Laboratory Experimental study)

ระเบียบวิธีการวิจัย

1. ประชากรและตัวอย่าง

1.1 ประชากรเป้าหมาย คือ ประชากรที่มิได้เป็นโรคเรื้อรัง โรคเลือด โรคขาดสารอาหาร โรคขาดสมดุลย์ของเกลือแร่

1.2 ประชากรตัวอย่าง คือ ผู้บริจาคเลือดให้สภากาชาดไทย

1.3 ตัวอย่าง คือ ผู้บริจาคเลือดให้สภากาชาดไทยและยินดีบริจาคเลือดให้ทำการศึกษาวิจัย

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง

การหาขนาดตัวอย่างของงานวิจัย 2 กลุ่มที่เกี่ยวข้องกัน (two dependent groups)

จำนวณคู่ = $[(Z\alpha+Z\beta) Sd / \Delta]2$

เนื่องจากเป็นการวัดค่าก่อนและหลังการทดลอง จึงใช้ตัวอย่างเพียงกลุ่มเดียว

กำหนด Type 1 error = 5% ค่า $Z\alpha$ = 1.96

กำหนด Type 2 error = 10% ค่า $Z\beta$ = 1.28

Sd = ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของการวัดค่า hematocrit จากการศึกษานำร่อง = 0.408

Δ = ความแตกต่างของการวัดค่า hematocrit = 0.5

จำนวนตัวอย่าง = [(1.96 + 1.28) 0.408 / 0.5]

= 6.989 = 7 ราย

3. การสังเกตุและการวัดผล

วัดค่า hematocrit เป็นเปอร์เซ็นต์

วัดค่า sodium และ potassium ภายในเม็ดเลือดแดง เป็น mEq/L

ดูลักษณะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของเม็ดเลือดแดงโดยอาศัยภาพถ่ายที่ได้จาก scanning electron microscope

<u>รายละเอียดวิธีการศึกษา</u>

พิษงูแมวเซา เป็นพิษที่ผลิตโดยสถานเสาวภา สภากาชาดไทยนำมาละลายใน NSS แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นต่างๆดังต่อไปนี้ คือ 0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 , 0.9 , 1.0 , 5.0 , 10.0 , 20.0 , 40.0 , 60.0 , 80.0 , 100.0 , 120.0 μg / 5 μm

เลือดที่นำมาศึกษา ใช้ heparin และ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว ขึ้นกับชนิดของการทดลอง

การ incubated จะใช้ที่อุณภูมิ 37° โดยใช้ incubator หรือ hot warm bath

Antivenom ต่อพิษงูแมวเซา ผลิตจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย โดยมีคุณสมบัติคือ ปริมาณAntivenom = 1 ml ใช้แก้พิษงูได้เท่ากับ 0.64 mg ของพิษงูแมวเซา ได้นำมาเจือจางโดยใช้ NSS เพื่อให้ได้ขนาดพอดีกับขนาดพิษงูแมวเซาที่นำมาศึกษา

Phospholipase A_2 ซึ่งได้จากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย ถูกนำมาเจือจางด้วย NSS จนมีขนาดที่เท่ากับปริมาณที่มันมีอยู่ในพิษงูแมวเซาขนาดที่นำมาศึกษา (พิษงูแมวเซาที่นำมาศึกษาเปรียบเทียบในขั้นตอนนี้มีขนาดเท่ากับ 800 ng ซึ่งจะมี phospholipase A_2 อยู่ประมาณ 44% by weight หรือเท่ากับ 350 ng ของ phospholipase A_2)

การศึกษาด้วย Scanning electron microscope ได้ทำการศึกษาที่แผนกพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การวัดค่า sodium และ potassium ภายในเม็ดเลือดแดงอาศัยห้องปฏิบัติการของหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนวิธีการศึกษา

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า hematocrit

นำเลือดที่ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว นำมาแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 ml. นำพิษงูแมวเซามาเติมโดยใช้พิษงูขนาดตั้งแต่ 0.05 , 0.1 , 0.2 , 0.3 , 0.4 , 0.5 , 0.6 , 0.7 , 0.8 , 0.9 , 1.0 , 5.0 , 10.0 , 20.0 , 40.0 , 60.0 , 80.0 , 100.0 , 120.0 μg ตามลำดับโดยมีหลอดควบคุม คือ ไม่ใส่พิษงูแมวเซาเลยอีกหนึ่งหลอด หลังจากนั้นนำไป incubated ที่อุณหภูมิ 37° c ทิ้งไว้นาน 30 นาที แล้วนำมาหาค่า hematocrit โดยวิธีปั่น microhematocrit tube นำค่าที่วัดได้มาจดบันทึกไว้

2. การศึกษาด้วย Scanning electron microscope

2.1 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วใช้พิษงูขนาด 800 ng เติม แล้ว incubated ที่อุณหภูมิ 37°c แล้วนำมาศึกษาที่เวลาต่างๆ คือ 1 , 5 , 10 , 15 , 20 , 30 นาทีตามลำดับ และมีเลือดที่ใช้เป็นตัวเปรียบเทียบโดยไม่ได้ใส่พิษงูแมวเซา

2.2 ใช้ EDTA เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วใช้พิษงูแมวเซาขนาด 800 ng เติมแล้ว incubated นาน 30 นาที และมีเลือดที่ไม่ได้ใส่พิษงูแมวเซาเปรียบเทียบ

2.3 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วเติม Phospholipase A_2 ขนาด 350 ng incubated ที่อุณหภูมิ 37°c แล้วนำมาศึกษาที่เวลา 15 และ 30 นาที ตามลำดับ

2.4 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว incubated กับ Verapamil Hcl ขนาด 500 ng ที่อุณหภูมิ 37°c นาน 15 นาที หลังจากนั้นเติมพิษงูแมวเซาขนาด 800 ng แล้ว incubated ต่อ หลังจากนั้นนำมาศึกษาที่เวลา 10 และ 30 นาที

2.5 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว โดยเม็ดเลือดแดงที่จะทำการศึกษาอยู่ในสภาวะ Hypertonic และ Hypotonic โดยอาศัยการปรับความเข้มข้นของ buffer ที่ใช้ในขั้นตอนการเตรียม specimen สำหรับ Scanning electron microscope

2.6 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วล้าง Plasma ออกแล้วเติมด้วย NSS หลังจากนั้นเติมพิษงูแมวเซาขนาด 800 ng incubated นาน 30 นาที แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเลือดที่ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา

2.7 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วล้าง plasma ออกหลังจากนั้นเติม Acetar solution(Acetar ประกอบด้วย sodium 130 mEq/L , potassium 4 mEQ / L , calcium 3 mEq /L , Chloride 109 mEq/Lและ Acetate 28 mEq/L) หลังจากนั้นเติมพิษงูแมวเซาขนาด 800 ng incubated นาน 30 นาที แล้วนำมาศึกษาเปรียบเทียบกับเลือดที่ไม่ได้เติมพิษงูแมวเซา

2.8 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วเติม Antivenom 1.25 µl (เป็นขนาดที่ใช้กับพิษงูแมวเซาขนาด 800 ng) incubated ที่อุณหภูมิ 37° นาน 30 นาที แล้วนำมาศึกษา

2.9 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วเติมพิษงูแมวเซาขนาด 800 ng incubated นาน 15 นาที แล้วเติม Antivenom ขนาด 1.25 µl แล้ว incubated อีก 15 นาที แล้วนำไปศึกษา

2.10 ใช้ heparin เป็นสารกันเลือดแข็งตัว แล้วเติมส่วนผสมของพิษงูแมวเซากับ Antivenom แล้วนำมา incubated นาน 30 นาที แล้วนำไปศึกษา

Scanning electron microscope มีวิธีการดังนี้

A. smear เลือดลงบน cover slide

B. หยด 0.1 mol Phosphate buffer ลงบนแผ่นที่ smear แล้วทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเทออก

C. หยด 3% glutaraldehyde ลงบนแผ่น smear แล้วทิ้งไว้ 20-30 นาที แล้วเทน้ำยาทิ้งออก

D. washing ด้วย 0.1 mol Phosphate buffer 3 ครั้งๆละ 10 นาที

E. Post-fixative ในน้ำยา 2% OsO_4 1 ชม.

F. Dehydrate ใน 70% ethyl alcohol 15 นาที 1 ครั้ง

G. Dehydrate ใน 80% ethyl alcohol 15 นาที 1 ครั้ง

H. Dehydrate ใน 90% ethyl alcohol 15 นาที 1 ครั้ง

I. Dehydrate ใน 95% ethyl alcohol 15 นาที 1 ครั้ง

J. Dehydrate ใน 100% ethyl alcohol 15 นาที 3 ครั้ง

K. Drying โดยใช้เครื่อง critical point dry

L. เลือกบริเวณที่ต้องการ แล้วนำไปติดบน specimen stub

M. นำไป coat ด้วย Au ด้วยเครื่อง Fine coat JFC-1100 E นาน 8 นาที

N. Specimen พร้อมที่จะนำไปดูด้วยกล้อง scanning electron microscope

3. การศึกษาค่า sodium และ potassium ภายในเม็ดเลือดแดงมนุษย์

3.1 นำเลือดที่ต้องการตรวจมาปั่น ที่ 2000 rpm นาน 3 นาที แล้วแยกเอา plasma ออก

3.2 เติมน้ำยา $MgCl_2$ ในสัดส่วน 1 : 1 mixed กับเม็ดเลือดแดงจนเข้ากัน แล้วนำไปปั่นแยกเม็ดเลือดออก

3.3 ทำซ้ำ ข้อ 3.2 จนครบ 3 ครั้ง

3.4 เติมน้ำยา 1% acetic acid เพื่อ lysis เม็ดเลือดแดง โดยใช้สัดส่วน 1 : 1

3.5 นำไปวัดค่า sodium หรือ potassium โดยวิธี Atomic absorption

การรวบรวมและการนำเสนอข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูลและนำเสนอข้อมูลในรูปแบบตาราง แผนภูมิ กราฟ และรูปภาพ ขึ้นกับลักษณะของข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณ นำเสนอในรูปแบบของ ตาราง แผนภูมิ และกราฟ

ข้อมูลเชิงคุณภาพ นำเสนอลักษณะของรูปภาพ

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณ สรุปเป็น mean±SD , ร้อยละ และการทดสอบสมมติฐานใช้ paired t-test

ข้อมูลเชิงคุณภาพ ใช้การบรรยายลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่พบ

ระยะเวลาการปฏิบัติงาน

ทำการทดลองและเก็บข้อมูล กรกฎาคม 2537 - มีนาคม 2538

วิเคราะห์ข้อมูล กุมภาพันธ์ - มีนาคม 2538

เขียนรายงานการวิจัย มีนาคม - เมษายน 2538

เสนอผลงานวิจัย เมษายน 2538

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งบประมาณ

ได้รับการสนับสนุนเงินทุนนการวิจัยจาก เงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช
งบประมาณประกอบด้วย

หมวดค่าจ้างชั่วคราว

จ้างผู้ช่วยวิจัยระดับปริญญาตรี 1 คน เพื่อช่วยงานด้าน scanning electron microscope จำนวน 1 คน ระยะเวลาปฏิบัติงาน 4 เดือน ค่าจ้างรายเดือน เท่ากับ 5,000.- รวมทั้งหมดเท่ากับ 20,000.-

หมวดค่าวัสดุ

- ค่าใช้จ่ายของ scanning electron microscope จำนวน 50 ตัวอย่างๆละ 2,000.-	รวม	100,000.-
- ค่าพิษงูแห้งจากสถานเสาวภา สภากาชาดไทย จำนวน 1 กรัม	รวม	3,000.-
- ค่าน้ำยา Heparin จำนวน 20 ขวด (ขวดละ 50.-)	รวม	1,000.-
- ค่าใช้จ่ายในการวัด intracellular sodium และ potassium จำนวน 40 ตัวอย่าง	รวม	4,000.-
- ค่า microhematocrit tube จำนวน 300 อัน	รวม	150.-
- ค่า pipet tip (ขนาด 100 µl จำนวน 300 อัน	รวม	300.-
- ค่า pipet tip (ขนาด 1000 µl จำนวน 100 อัน	รวม	300.-
- ค่าหลอดทดลอง (ขนาด 10 ml) จำนวน 100 หลอด	รวม	700.-
- ค่า diskett computer เพื่อใช้ในการเก็บข้อมูล จำนวน 1 กล่อง	รวม	500.-
- ค่าอุปกรณ์เครื่องเขียน	รวม	500.-
รวมหมวดค่าวัสดุ		110,450.-

หมวดค่าใช้สอย

- ค่าถ่ายเอกสาร	รวม	500.-
- ค่าใช้จ่ายเบ็ดเตล็ด	รวม	500.-
รวมหมวดค่าใช้สอย		1,000.-
รวมงบประมาณทั้งหมด		131,450.-

(หนึ่งแสนสามหมื่นหนึ่งพันสี่ร้อยห้าสิบบาทถ้วน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย