บทที่ 3

วิธีการดำเนินการ

รูปแบบการวิจัย (Research Design)

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methadology)

เป็นการทดสอบเครื่องมือ (Diagnostic Test)

ประชากรเป้าหมาย (Population) ประชากรไทยที่เป็นโรคมะเร็งตับที่สามารถที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธี TOCE

ประชากรตัวอย่าง (Sample) ประชากรไทยที่เป็นโรคมะเร็งตับที่สามารถที่เข้ารับการรักษาด้วยวิธี TOCE ที่รับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

เกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา (Inclusion Criteria)

1.ผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC ที่เข้ารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ซึ่งได้รับการวินิจฉัยด้วย

1.1 การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1.2 อาการและอาการแสดงอัลตาซาวด์หรือเอ็กซ์เรย์พบก้อนที่ตับร่วมกับระดับของอัลฟ่าฟีโตโปรตีนมากกว่า 400 IU/ml [72, 73, 74, 75]

2.ไม่สามารถรักษาด้วยการผ่าตัด

เกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา (Exclusion Criteria)

1.มีก้อนเลือดในหลอดเลือดดำ main portal

2.มีการกระจายไปนอกตับ

3.มีข้อห้ามต่อการทำหัตถการ เช่น เกร็ดเลือดน้อยกว่า 50,000, Prothrombin time ยาวกว่า 2 เท่าของค่าควบคุม

4. โรคตับซึ่งไม่สามารถควบคุมได้ (uncontrolled liver disease decompensation) เช่น เลือดออกในทางเดินอาหาร, มีอาการตับวาย,มีการติดเชื้อแบคทีเรีย

5. มีไตวาย ค่าครีเอตินีนในเลือด มากกว่า 2 mg/dl

การเลือกตัวอย่าง ผู้ป่วยทุกรายที่เข้าเกณฑ์

การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample Size Justification)

จากคำถามหลักคาดหวังว่าจะได้ Diagnostic Test ที่มีความไว (sensitivity) ร้อยละ 90 โดยมีความคลาดเคลื่อน (error) ไม่เกินร้อยละ 15

$$N = \frac{Z\alpha^2 pq}{d^2}$$

$Z\alpha$ = ระดับความเชื่อมั่น 95 % $(Z\alpha = 1.96)$

p = ความไวต่อการบอกการตอบสนองต่อการรักษาด้วย TOCE ร้อยละ 90

q = 1 - q (q = 1 - 0.9 = 0.1)

d = ค่าความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้ (d = 0.15)

$$N = \frac{(1.96)^2(0.9)(0.1)}{(0.15)^2} = 15.3$$

จะได้ n = 15 (จำนวนตัวอย่างในกลุ่มมะเร็งตับที่ p53 ให้ผลบวก)

อุบัติการณ์ของการพบโปรตีน p53 ในน้ำเลือดในผู้ป่วยมะเร็งตับ HCC เท่ากับร้อยละ 40 ฉะนั้นตัวอย่างทั้งหมดประมาณ 38 ตัวอย่าง

การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ผู้ป่วยที่ได้รับคัดเลือกเข้ามาศึกษาจะได้รับการ

1.ซักประวัติและตรวจร่างกาย

2.เจาะเลือดเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ

3.ทำการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี

4.ติดตามผลการรักษาและวัดการตอบสนองหลังทำการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี

วิธีเจาะเลือดเพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการ

เจาะเลือด จำนวน 5 ml ใส่หลอดที่ไม่มีสารกันเลือดแข็งตัว หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้แข็งตัวประมาณ 1 ชั่วโมงแล้วทำการปั่นเพื่อแยกเอาน้ำเลือดออกมาแล้วแยกเป็นสองส่วน ส่วนที่หนึ่งส่งห้องปฏิบัติการกลางเพื่อตรวจหาระดับ alfa-fetoprotein ส่วนที่เหลือจำนวนอย่างน้อย 1 ซีซี ทำการเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -70 C จนกว่าจะทำการตรวจหาระดับโปรตีน p53

วิธีการตรวจหาโปรตีน p53 จากน้ำเลือด โดยวิธี ELISA นำมาตรวจโดยใช้น้ำเลือด อย่างน้อย 1 ซีซี แช่แข็งที่ -70 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจ ด้วยขั้นตอนเดียวทางวิธี immunoassay โดยใช้ p53 pan ELISA โดยซึ่งเป็นการตรวจหาโปรตีนหรือแอนติเจนของ p53 ซึ่งโปรตีนที่พบจะเป็นชนิด mutant โดยใช้เทคนิคแบบ “sandwich ELISA” ซึ่งผ่านการควบคุมมาตรฐานของการทดสอบแล้ว และเทคนิคนี้มีความน่าเชื่อถือสามารถทำได้โดยไม่ยาก นอกจากนี้เทคนิคนี้ส่วนหนึ่งจะมีการเพิ่ม biotin เข้าไปใน monoclonal antibody ตัวที่หนึ่งเพื่อทำให้เพิ่มประสิทธิภาพของการจับการแอนติเจนที่ทำการตรวจหาได้มากขึ้น ส่วนวิธีการตรวจหาโปรตีน p53 จากน้ำเลือดมีดังต่อไปนี้คือ

1). เจือจางน้ำเลือด 50 ไมโครลิตร ด้วย sample dilute 200 ไมโครลิตร

2). เตรียมน้ำยาใช้งาน (working solutions) ที่อุณหภูมิห้อง (18-25 องศาเซลเซียส)

3). ขั้นตอนการทำตามคู่มือปฏิบัติงาน (manual protocol) แล้วรายงานผลเป็นตัวเลขหน่วยเป็น พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร (ดูภาคผนวก)

การรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี

เนื่องจากการทำทีโอซีอีอาจเป็นอันตรายได้ผู้ที่เข้ารับการศึกษาจะต้องไม่มีข้อห้ามดังต่อไปนี้

1.มีก้อนเลือดในหลอดเลือดดำ portal เพราะจะทำให้เกิดตับวายได้เนื่องจากขาดเส้นเลือดที่จะไปเลี้ยงตับส่วนดี

2.มีการกระจายออกไปนอกตับเพราะการศึกษาอาจไม่ช่วยผู้ป่วยและผู้ป่วยอาจมีระยะเวลาการรอดชีวิตที่สั้นไม่สามารถจะมีชีวิตอยู่เพื่อบอกการตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอีได้

3.มีข้อห้ามต่อการทำผ่าตัดเนื่องจากจะทำให้ไม่สามารถควบคุมการแข็งตัวของเลือดได้

4.โรคตับที่ไม่สามารถควบคุมได้เนื่องจากการทำงานของตับจะยิ่งแย่ลงหลังการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี

5.มีภาวะไตวาย ซึ่งเสียต่อการมีหน้าที่การทำงานของไตที่แย่ลงไปอีกจากภาวะแทรกซ้อนต่อไตที่อาจจะเกิดขึ้นจากการทำหัตถการหรือจากยาเคมีบำบัดที่ต้องใช้ในการทำทีโอซีอี

การทำทีโอซีอี ทำโดยแพทย์ที่แผนก Radiology Intervention ภาควิชารังสีวิทยาโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยผู้ป่วยจะได้รับการใส่สายเข้าไปในเส้นเลือดแดง hepatic แล้วใช้สารน้ำมันที่ประกอบด้วย mitomicin C 20 mg, 5-fluorouracil 500 mg, lipiodal ไม่เกิน 10 cc และ gelatin-sponge (Gelfoam) ทำการอุดเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงก้อนมะเร็ง

การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

1.ข้อมูลพื้นฐาน : ชื่อ เพศ อายุ performance status

2.การวินิจฉัยโรค ระยะของโรค (staging)

3.ปัจจัยเสี่ยงของโรคมะเร็งตับ

4.วิธีการรักษาที่ได้รับ

5.การตรวจทางห้องปฏิบัติการ (ก่อนการรักษาด้วย chemoembolization)

- ตรวจเลือดดูการทำงานของตับ (Liver function test)
- การตรวจหาโปรตีน p53 ในน้ำเลือดด้วยวิธี ELISA
- การตรวจทางรังสีบริเวณตับและช่องท้องส่วนบนด้วย เอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) หรือ เอ็กเรย์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) เพื่อวัดขนาดของก้อนมะเร็งและหาระยะของโรค (staging)

6.การวัดการตอบสนอง วัดผลของ chemoembolization ต่อก้อนมะเร็งด้วยเอ็กซเรย์คอมพิวเตอร์ (CT) หรือ เอ็กเรย์คลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (MRI) ที่ 2 เดือนหลังการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี

การให้คำนิยามเชิงปฏิบัติที่จะใช้ในการวิจัย (Operational Definitions)

1. การวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมะเร็งตับชนิด HCC สามารถวินิจฉัยได้สองวิธีคือ

1.1 การตรวจชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา

1.2 อาการและอาการแสดง อัลตาซาวด์หรือเอ็กเรย์พบก้อนที่ตับร่วมกับระดับของเอลฟ่าฟีโตโปรตีนมากกว่า 400 IU/ml [72, 73, 74, 75]

2.การแบ่งระยะของโรคมะเร็งตับชนิด HCC

อาศัยการแบ่งตามระบบของ The Union Internationale Control Cancer (UICC) หรือระบบ TNM ซึ่งมีรายละเอียดดังตารางที่ 4 และการจัดระยะระบบ Okuda

ตารางที่ 4 แสดงการแบ่งระยะของของโรคมะเร็งตับชนิด HCC อาศัยการแบ่งตามระบบของ TNM.

Primary tumor	
TX	Primary tumor ไม่สามารถวัดได้
T0	ไม่พบ primary tumor
T1	ขนาดก้อนไม่เกิน 2 ซม. และไม่มีการลุกลามหลอดเลือด
T2	ขนาดก้อนไม่เกิน 2 ซม. แต่มีการลุกลามหลอดเลือด ขนาดก้อนเกิน 2 ซม. และไม่มีการลุกลามหลอดเลือด มีหลายก้อนแต่ก้อนใหญ่ที่สุดมีขนาดไม่เกิน 2 ซม., เป็นที่ตับกลีบเดียวและไม่มีการลุกลามหลอดเลือด
T3	ขนาดก้อนเกิน 2 ซม. และมีการลุกลามหลอดเลือด มีหลายก้อนแต่ก้อนใหญ่ที่สุดมีขนาดไม่เกิน 2 ซม., เป็นที่ตับกลีบเดียวแต่มีการลุกลามหลอดเลือด มีหลายก้อนแต่ก้อนใหญ่ที่สุดมีขนาดเกิน 2 ซม., เป็นที่ตับกลีบเดียว, อาจมีหรือไม่มีการลุกลามหลอดเลือด
T4	มีหลายก้อนและมากกว่า 1 กลีบ ลุกลามแขนงใหญ่ของหลอดเลือดดำ portal หรือ hepatic

Regional lymph node		Distant metastasis	
NX	ไม่ทราบลักษณะของต่อมน้ำเหลืองข้างเคียงได้	MX	ไม่ทราบการแพร่กระจาย
N0	ไม่มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง	M0	ไม่มีการแพร่กระจาย
N1	มีการกระจายไปต่อมน้ำเหลืองข้างเคียง	M1	มีการแพร่กระจาย

Stage grouping

I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
IIIA	T3	N0	M0
IIIB	T1-3	N1	M0
IVA	T4	Any N	M0
IVB	Any T	Any N	M1

ตารางที่ 5 การแบ่งระยะตาม Okuda

Stage	Tumor size		Ascites		Albumin		Bilirubin	
	>50%	<50%	+	-	< 3 g/dL	>3 g/dL	>3 mg/dL	< 3 mg/dL
I	(-)		(-)		(-)		(-)	
II	1 หรือ 2 (+)							
III	3 หรือ 4 (+)							

*(+) : sign of advanced disease

3. <u>การวัดการตอบสนองต่อการรักษาทีโอซีอี</u>

3.1 ได้ผล หมายถึง ขนาดของก้อนที่ใหญ่ที่สุดลดลงมากกว่า ร้อยละ 50 หรือ มีสาร lipiodal ค้างอยู่ในก้อนมากกว่าร้อยละ 50 ของก้อนมะเร็ง [76]

3.2 ไม่ได้ผล หมายถึง ขนาดของก้อนที่ใหญ่ที่สุดลดลงน้อยกว่าร้อยละ 50 หรือมีสาร lipiodal ค้างอยู่ในก้อนน้อยกว่าร้อยละ 50 ของก้อนมะเร็ง หรือไม่เข้าข้อบ่งชี้ตามข้อ 3.1

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการแบ่งผู้ป่วยเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่มีการตรวจพบและไม่พบโปรตีน p53 ในน้ำเลือด แล้ววัดดูการตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีทีโอซีอี และใช้วิธีการทางสถิติคำนวณหาความสัมพันธ์ดังกล่าว พร้อมทั้งวัดความไว (sensitivity) ความจำเพาะ (specificity) ค่าทำนายผลบวก (positive predictive value) และค่าทำนายผลลบ (negative predictive value) ของเครื่องมือคือการตรวจหาโปรตีน p53 ในน้ำเลือดด้วยวิธี ELISA

การนำเสนอข้อมูล

นำเสนอในรูปตาราง และแผนภูมิ

ตารางการปฏิบัติงาน (Time Schedule)

ดูภาคผนวก

ปัญหาทางจริยธรรม (Ethical Considerations)

ไม่มีปัญหาทางจริยธรรม เพราะเป็นการศึกษาถึงเครื่องมือในการวัดการตอบสนองของการรักษาโรค และไม่เสี่ยงต่ออันตราย

งบประมาณ (Budget)

ค่าน้ำยาและวัสดุสิ้นเปลืองในการตรวจหาโปรตีน p53 จำนวน 40 ชุด ๆ ละ 200 บาทเป็นเงิน 8,000 บาท ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ