หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

ประชากรเป้าหมาย(target population) คือ ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตชาวไทยที่ได้รับยา mycophenolate mofetil

ประชากรตัวอย่าง(sample population) คือ ผู้ป่วยปลูกถ่ายไตชาวไทยที่ได้รับยา mycophenolate mofetil ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ตัวอย่าง(sample) คือผู้ป่วยปลูกถ่ายไตชาวไทยไตที่ได้รับยา mycophenolate mofetil ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ที่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือก

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วย(Inclusion criteria)

1. ผู้ป่วยหลังการปลูกถ่ายไตแล้วอย่างน้อย 1 เดือน
2. มีอายุระหว่าง15 ถึง 65 ปี

เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยออก(Exclusion criteria)

1. ผู้ป่วยที่กำลังได้รับยาต่อไปนี้ cholestyramine, NSAIDs, salicylate, antacids with magnesium and aluminum hydroxides และ furosemide
2. ค่า serum creatinine มากกว่า 3 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร

ขนาดตัวอย่าง(sample size)

เนื่องจากเป็นการวิจัยที่ไม่เคยทำมาก่อน ฉะนั้นขนาดตัวอย่างคือประชากรตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์และยินยอมให้ทำการศึกษาอย่างน้อย 15 ราย

วิธีการศึกษา(Experimental maneuver)

ผู้ป่วยทุกรายในการวิจัยได้รับคำแนะนำให้ทานยา mycophenolate mofetil (Cellcept ® Roche pharmaceutical) ในขนาด 250 มิลิกรัม รับประทานครั้งละ 2 เม็ด หลังอาหารเช้าและเย็น ห่างกัน 12 ชม.เวลาแน่นอนเป็นเวลา 1 สัปดาห์และอดน้ำและอาหารคืนก่อนวันนัดเจาะเลือด

เจาะเลือดตรวจทางห้องปฏิบัติการณ์พื้นฐาน CBC, LFT, Alb, glob, BUN, creatinine, ปัสสาวะ 24 ชม. creatinine clearance

เจาะเลือดตรวจที่ก่อนทานยา MMF หลังทาน 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 ชม. โดยนำไปปั่นแยกน้ำเหลืองและนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นลบ 80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดทางกับของ MPA โดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ต่อไป

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

วิธีการตรวจวัดระดับ MPA ในพลาสมา

ตัวอย่าง เลือด 3 มิลลิลิตรบรรจุใน vacutainer tube ที่มีสาร lithium heparin sulfate เพื่อปั่นแยก

วิธีการทำ

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างที่บรรจุใน vacutainer tubes ที่มีสาร heparin มาปั่นแยกพลาสมาที่ ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 5 นาทีและนำเฉพาะพลาสมาเก็บในหลอดพลาสติกแล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ – 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์

2. การสกัด MPA(MPA extraction)

นำพลาสมามาละลายที่อุณหภูมิห้องจากนั้นเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นดูดพลาสมามา 0.5 มิลลิลิตร

+ น้ำ 1.5 มิลลิลิตร

+ intranal standard(IS) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร

+ 0.1 N HCl 0.75 มิลลิลิตร

จากนั้นเขย่าให้เข้ากันนาน 10 วินาที เติมใส่ใน C_{18} solid phase extraction column ซึ่งปรับสภาพด้วย methanol 2 มิลลิลิตร

และ น้ำ 2 มิลลิลิตรมาก่อนหน้านี้โดยการผ่าน column อาศัยแรงโน้มถ่วงของโลก และใช้น้ำ 1 มิลลิลิตรล้างหลอดที่ใช้เตรียมอีกครั้ง เติมใส่ column จนหมด

นำ column มาวางบน aliquot ขนาดบรรจุ 2 มิลลิลิตรแล้ว elute ด้วย methanol 0.1 M acetate buffer(80:20, V/V), pH 4 ขนาด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ MPA ด้วย HPLC ต่อไป

3. Chromatography and assays

3.1 เครื่องมือ Shimadzu high performance liquid chromatograph รุ่น LC-3A with LDC4100- UV detector

3.2 4.0mm x 250 mm 5-μm particle size(Lichrocart C_{18}, Merck) reverse phase column

3.3 mobile phase ประกอบด้วย HPLC-grade acetonitrile 0.05 % aqueous phosphoric acid(45:55, V/V)

นำสารที่สกัดจากขั้นตอนที่แล้วผสมให้เข้ากัน ฉีดเข้าในระบบ chromatography ปริมาณ 100 ไมโครลิตร โดยใช้ pump speed 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที วัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก็จะได้กราฟความสูงของ MPA และ internal standard ออกมาดังรูปที่ 25

4. การคำนวณ

ใช้ standard MPA ในขนาดความเข้มข้น 0.5, 1, 2, 3, 5, 10, 100 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร

+ พลาสมาอาสาสมัครปกติ 0.4 มิลลิลิตร

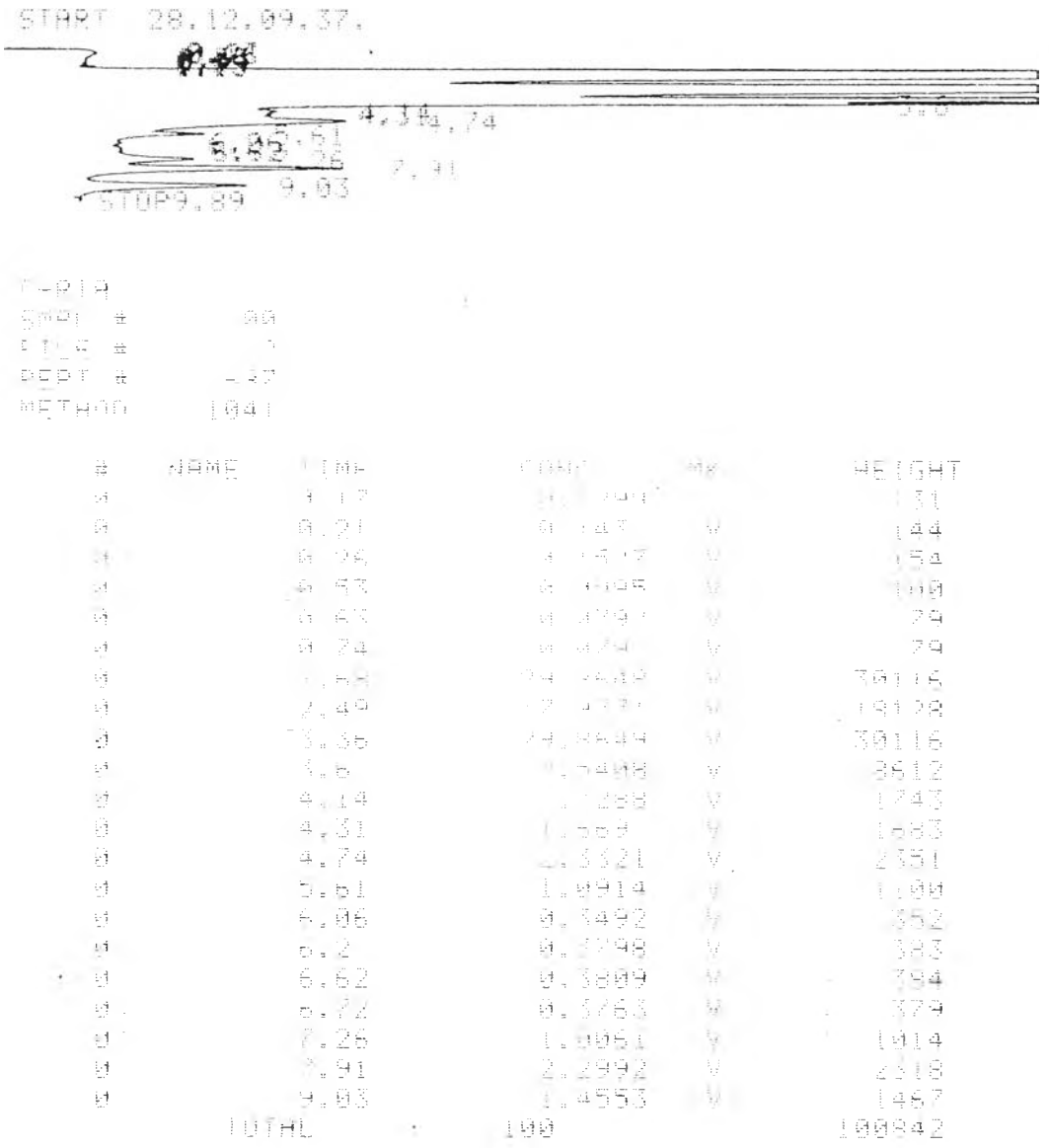
+ น้ำ 1.5 มิลลิลิตร

+ internal standard( ) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.1 มิลลิลิตร

+ 0.1 N HCl 0.75 มิลลิลิตร

ผ่านขั้นตอน extraction และ HPLC เช่นเดียวกันเพื่อหา linear least squares regression จาก peak-height ratio(คิดจาก peak height of MPA / peak height of IS) เพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน(calibration curve)

MPA = a + b(peak-height ratio)



รูปที่ 25 แสดงตัวอย่างกราฟแสดงความสูงของ MPA และ internal standard ที่ได้จากการทำ high performance liquid chromatography (HPLC)

a. = peak height ที่ 7.91 นาที แสดงค่าของ internal standard ในสารตังอย่างที่ extract ได้

b. = peak height ที่ 9.03 นาที แสดงค่าของ MPA ในสารตังอย่างที่ extract ได้

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลผู้ป่วยเช่น อายุ เพศ น้ำหนัก ส่วนสูง ระยะเวลาหลังเปลี่ยนไต การตรวจร่างกายทั่วไป ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ CBC, LFT, BUN, creatinine, 24 hr. urine for creatinine clearance
2. ค่า plasma mycophenolic acid(MPA) ในเลือดที่ 0, 1, 2, 4, 6, 8 และ 12 ชม.
3. ค่า maximal plasma concentration(Cmax) ของ MPA และ ค่า time of maximum plasma concentration(t_{max}) ของ MPA สามารถดูได้จาก concentration-time data โดยตรง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ตารางที่ 12 แสดงวิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์	วิธีการทางสถิติ
1. ค่า maximal plasma concentration(Cmax) ของ MPA	Mean $\pm$ SD
2. ค่า time of maximum plasma concentration(t_{max}) ของ MPA	
3. ค่า predose concentration($C_{predose}$) ของ MPA	
4. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย AUC_{0-12}	Unpaired t-test
5. ความสัมพันธ์ของข้อมูลพื้นฐานกับค่าเฉลี่ย AUC_{0-12} ของ MPA	Correlation สำหรับ continuous data Unpaired t-test สำหรับ category data
6. ความสัมพันธ์ของ MPA ณ เวลาต่างๆกับค่า AUC_{0-12}	Linear regression analysis
7. ความสัมพันธ์ของ MPA มากกว่า 1 ค่าเพื่อทำนายค่า AUC_{0-12}	Stepwise linear regression analysis