บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 **ประชากร** (Population)

3.1.1 ประชากรเป้าหมาย

ผู้ป่วยเด็กโรคตับเรื้อรังที่มารับการรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

3.1.2 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามาศึกษา :

1. ผู้ป่วยเด็กอายุตั้งแต่แรกเกิดถึง 12 ปี
2. ป่วยเป็นโรคตับเรื้อรังที่มีการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของตับจากการตรวจทางห้องปฏิบัติการนานตั้งแต่ 8 สัปดาห์ขึ้นไป (การตรวจทางห้องปฏิบัติการที่มีการเปลี่ยนแปลงนั้นได้แก่ total bilirubin > 1 mg/dl, direct bilirubin > 0.1 mg/dl, SGOT > 35 IU, SGPT > 35 IU , prolonged prothrombin time) หรือมีอาการทางคลินิกของภาวะตับแข็ง

3.1.3 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา :

- ผู้ป่วยโรคเลือดที่มีการแตกของเม็ดเลือดแดงง่าย
- ผู้ป่วย Cystic fibrosis, Abetalipoproteinemia

3.1.4 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

$$N = \left[\frac{Z\alpha + Z\beta}{C(r)}\right]^2 + 3$$

α = type I error = 0.05

β = type II error = 0.10

r = correlation coefficient ระหว่าง H_2O_2 Hemolysis กับ Vitamin E/Total lipids ratio ในกลุ่มทารกคลอดก่อนกำหนดที่มีน้ำหนักตัวน้อย[28] = 0.59

$Z\alpha = Z_{0.05/2} = 1.96$

$Z\beta = Z_{0.10} = 1.28$

$$C(r) = \frac{\log_e (1 + r)/(1-r)}{2} = \frac{\log_e 3.878}{2} = 0.677$$

$$N = \left[\frac{1.96 + 1.28}{0.677}\right]^2 + 3 = 25.89$$

จะต้องใช้ขนาดตัวอย่างอย่างน้อย 30 คน

3.2 **<u>การสังเกตและการวัด</u>** (Observation and Measurement)

ผู้ป่วยและผู้ปกครองจะได้รับคำชี้แจงถึงการขาดวิตามิน E ในผู้ป่วยเด็กโรคตับเรื้อรัง และความสำคัญของการตรวจประเมินภาวะของวิตามิน E เพื่อประโยชน์ในการติดตามรักษาและผู้ปกครองยินยอมให้ผู้ป่วยเข้าร่วมในการศึกษานี้โดยเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลพื้นฐาน : ชื่อ, เพศ. อายุ, หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย
2. การวินิจฉัยโรค, การผ่าตัด และอายุขณะที่ทำผ่าตัด, ระยะเวลาที่เป็นโรค, ขนาดวิตามิน E ที่ได้รับ
3. ผู้ป่วยจะได้รับการเจาะเลือด 10 มล. เพื่อตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้

   3.1 Liver function test : TB, DB, Albumin, Globulin, SGOT, SGPT, Alk.phosphatase, Prothrombin time

   3.2 CBC, peripheral blood smear, reticulocyte count

   3.3 การวัดเปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดงที่สัมผัสไฮโดรเจน-เพอร์ออกไซด์ (H_2O_2 Hemolysis Test) โดยใช้ Modified Horwitt et al. technique[26] ใช้เลือด 1 มล. (ทำภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากเจาะเลือด)

   1. ผสม citrated blood 0.3 มล. กับ phosphate buffer saline (PBS) 4.5 มล. นำไปปั่น 1,500 รอบ/นาที นาน 15 นาทีเท plasma ออก และทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
   2. เติม PBS 2 มล. เตรียมเป็น 5% RBC suspension
   3. ใส่ 5% RBC suspension 0.3 มล. ลงในหลอดทดลอง 5 หลอด
   4. หลอดที่ 1-2 เติม PBS 0.3 มล.
      หลอดที่ 3-5 เติม 4% H_2O_2 0.3 มล.
   5. นำหลอดทดลองทั้งหมด incubate ที่ 37°C นาน 3 ชั่วโมง
   6. หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น 4.5 มล. (100% hemolysis)
      หลอดที่ 2 เติม PBS 4.5 มล. (blank)
      หลอด 3-5 เติม PBS 4.5 มล. (test)
   7. นำหลอดทดลองทั้งหมดไปปั่นและวัดค่า absorbance ของ supranatant fluid ที่ 575 นาโนเมตร
   8. คำนวณเปอร์เซนต์การแตกของเม็ดเลือดแดงที่สัมผัสไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ดังนี้

$$\% \text{ Hemolysis} = \frac{\text{OD test - OD blank}}{\text{OD 100\% hemolysis - OD blank}} \times 100$$

3.4 การวัดระดับวิตามิน E ในซีรั่ม (serum vitamin E)

โดยใช้ Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC)[32] ใช้ซีรั่ม 2 มล.

1. ซีรั่ม 500 ไมโครลิตรนำมาสกัดด้วย ethanol 2 มล. และ hexane โดยเติม ethanol 1 มล. และผสมด้วย vortex mixture นาน 30 วินาที หลังจากนั้นเติม hexane 2 มล. และผสมด้วย vortex mixture นาน 60 วินาที นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที
2. แยกส่วนบนปริมาตร 1.6 มล. และทำให้ระเหยแห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน
3. ละลายส่วนที่แห้งด้วย methanol 250 ไมโครลิตร และฉีดเข้าเครื่อง HPLC ใช้ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยมี condition ของ HPLC ดังนี้

   Mobile phase : 100% Methanol

   Flow rate : 1 ml/min

   Fluorodetector excitation wavelength 295 mm.

   emssion wavelength 340 mm.

3.5 การวัดระดับไขมันในเลือด (Total Lipids)

โดยใช้ Colorimetric Method[33] ใช้เลือด 1 มล.

1. ใส่ water (blank), standard และ sample ลงในแต่ละหลอดทดลองหลอดละ 0.2 มล.
2. เติม concentrated sulfuric acid 0.2 มล. ลงในแต่ละหลอดและต้มในน้ำเดือด 10 นาที
3. ทำให้เย็นในน้ำ 10 นาที, เติม phosphovanillin reagent 10 มล.แล้วนำไป incubate ที่ 37°C นาน 15 นาที
4. ทำให้เย็นและอ่านค่า absorbance ของ standard และ sample เทียบกับ blank ที่ 540 นาโนเมตร
5. คำนวณระดับไขมันในเลือด (total lipids) ดังนี้

$$\text{total lipids (mg/dl)} = \frac{\text{absorbance of sample}}{\text{absorbance of standard}} \times \text{conc. of standard}$$

- โดยการตรวจทางห้องปฏิบัติการ 3.1 และ 3.2 ส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาล
- การตรวจทางห้องปฏิบัติการ 3.3 และ 3.5 ทำโดยผู้วิจัย

- การตรวจทางห้องปฏิบัติการ 3.4 เก็บตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยไว้ที่ -20°C และตรวจพร้อมกันเมื่อได้ตัวอย่างครบที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 <u>การรวบรวมข้อมูล</u> (Data Collection)

ข้อมูลของผู้ป่วยจะได้รับการบันทึกในแบบฟอร์มก่อน (ภาคผนวก) ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลดังต่อไปนี้

1. ข้อมูลพื้นฐาน : ชื่อ, เพศ, อายุ, หมายเลขบัตรประจำตัวผู้ป่วย
2. การวินิจฉัยโรค, การผ่าตัด และอายุขณะที่ทำผ่าตัด (ถ้ามี), ระยะเวลาที่เป็นโรค, ขนาดวิตามิน E ที่ได้รับ
3. liver function test, prothrombin time
4. CBC, peripheral blood smear, reticulocyte count
5. % H_2O_2 Hemolysis
6. serum vitamin E, total lipids, vitamin E/total lipids ratio

และทำการเก็บข้อมูลทั้งหมดลงในคอมพิวเตอร์โดยมีการตรวจสอบข้อมูลอีกครั้งหนึ่งเพื่อความถูกต้องและแม่นยำ

3.4 <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u> (Data Analysis)

1 หาความสัมพันธ์ระหว่าง H_2O_2 Hemolysis Test กับ vitamin E/total lipids โดยใช้ Correlation Analysis นำเสนอด้วย scattergram และคำนวณค่า coefficient of correlation

2 แสดงค่าความชุกของการขาดวิตามิน E ในผู้ป่วยเด็กโรคตับเรื้อรังในโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์