

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์

- 1.1 เครื่อง TDX Analyzer
- 1.2 carousel ภาชนะใช้สำหรับบรรจุ cuvette และ sample cartridge
- 1.3 sample cartridge ภาชนะพลาสติกใช้สำหรับบรรจุสิ่งส่งตรวจ
- 1.4 cuvette

2. สารเคมี

2.1 gentamicin calibrators ใช้สร้างกราฟมาตรฐาน ประกอบด้วย gentamicin ที่ความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0-10  $\mu\text{g/ml}$

ขวด	ความเข้มข้นของgentamicin( $\mu\text{g/ml}$ )
A	0.0
B	0.5
C	1.5
D	3.0
E	6.0
F	10.0

2.2 gentamicin control เป็นตัวควบคุมใช้ตรวจสอบความถูกต้องของกราฟมาตรฐาน ประกอบด้วย gentamicin ใน serum คนปกติจำนวน 3 ขวด ดังนี้

ขวด	ความเข้มข้นของ gentamicin ( $\mu\text{g/ml}$ )
L	3
M	4
H	8

2.3 gentamicin reagent pack ที่ใช้ในการหาระดับความเข้มข้นของ gentamicin ใน serum

ขวด	ประกอบด้วย
P	buffer ที่ผสม protein stabilizer จำนวน 3 ml
S	gentamicin antiserum ใน buffer ที่ผสม protein stabilizer จำนวน 3 ml
T	gentamicin ที่ติดสลาด้วย fluorescein isothiocyanate (gentamicin fluorescein tracer) ผสมใน buffer ที่มี surfactant และ protein stabilizer จำนวน 3 ml

4. Buffer คือ bovine gamma globulin ใน phosphate buffer

## ขั้นตอนการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ Gentamicin

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 1. การคัดเลือกกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุม

คัดเลือกผู้ป่วยเพศหญิงจากแผนกอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่มีอายุเท่ากับหรือมากกว่า 15 ปีขึ้นไป โดยให้ค่าชี้แจงถึงเหตุผล และวิธีในการศึกษาวิจัยแก่ผู้ป่วย และผู้ป่วยให้ความยินยอมเป็นลายลักษณ์อักษร แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1 กลุ่มศึกษาจำนวน 8 คน ประกอบด้วยผู้ป่วยโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ และมีการติดเชื้อในร่างกายน่าจำเป็นต้องได้รับการรักษาด้วย gentamicin ชนิดของโรคตับทำการวินิจฉัยโดยแพทย์ผู้ทำการรักษา เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยโรคตับเข้าสู่วิจัยใช้วิธีของ Moore et al. (1986) โดยกำหนด ให้มีลักษณะตามเกณฑ์อย่างน้อยที่สุด 3 ข้อใน 6 ข้อ ต่อไปนี้

1.1.1 ระดับ aspartate aminotransferase ได้แก่ SGOT, SGPT มีค่ามากกว่าปกติ 2 เท่า (ค่าปกติ 0-35 iu/l)

1.1.2 ระดับ total bilirubin มีค่ามากกว่า 2.5 mg/dl (ค่าปกติ 0.1-1.0 mg/dl)

1.1.3 ระดับ albumin ใน serum น้อยกว่าหรือเท่ากับ 3.0 g/dl (ค่าปกติ 3.2-4.5 g/dl)

1.1.4 ระดับ alkaline phosphatase มากกว่าปกติ (ค่าปกติ 0-90 iu/l)

1.1.5 ค่า prothrombin time มากกว่า 15 วินาที (ค่าปกติ 11.5 วินาที)

1.1.6 มีภาวะท้องมาน (ascites)

1.2 กลุ่มควบคุม จำนวน 10 คน ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคตับมีภาวะการทำงานของไตปกติ และมีการติดเชื้อในร่างกายน่าต้องได้รับการรักษาด้วย gentamicin ทำการวินิจฉัยโรคโดยแพทย์ผู้ทำการรักษา

ลักษณะตามเกณฑ์ของผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม มีดังนี้

1. มีภาวะการทำงานของไตก่อนได้รับ gentamicin และวันที่ 3 ภายหลังเริ่มใช้ยาปกติโดยมีค่า serum creatinine (Scr) ปกติอยู่ระหว่าง 0.5-1.5 mg/dl

2. มีการติดเชื้อในร่างกาย และแพทย์ผู้ทำการรักษาพิจารณาให้การรักษาด้วย gentamicin โดยอาจใช้เป็นยาตัวเดียวหรือใช้ร่วมกับยาปฏิชีวนะตัวอื่น ๆ ได้แก่ penicillin G sodium , cloxacillin, ampicillin

ลักษณะตามเกณฑ์ของการติดเชื้อตามวิธีของ Moore et al. (1986) กำหนดให้มีลักษณะตามเกณฑ์ ดังนี้

- 2.1 อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 38 องศาเซลเซียส
- 2.2 ค่า white blood cell count มากกว่า 10,000 cell/mm<sup>3</sup> หรือ polymorphonuclear cell มากกว่า 85 %
- 2.3 พบอาการอักเสบเฉพาะที่
- 2.4 ผล culture พบ pathogenic bacteria ในกระแสเลือด หรือบริเวณที่ติดเชื้อ

3. ไม่มีอาการหรือโรคต่อไปนี้ที่อาจมีผลต่อการขับถ่ายยาออกทางไต เช่น ภาวะช็อค (shock), ไตวายเฉียบพลัน (acute renal failure), โรคไตระยะสุดท้ายที่ต้องทำการล้างไต, hepatorenal syndrome

4. ไม่ได้รับยาที่มีผลต่อระดับของ gentamicin ในเลือดและมีพิษต่อไต ดังเช่น furosemide, cyclosporin

2. การกำหนดขนาดยาและยาปฏิชีวนะชนิดอื่นที่ใช้ร่วมกัน

ขนาดของ gentamicin ที่ให้คือ 3 - 6 mg/kg ตามการพิจารณาของแพทย์ที่ทำการรักษา โดยให้วันละครั้ง ไม่น้อยกว่า 3 วัน ยาปฏิชีวนะอื่นที่ใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มผลประสิทธิภาพในการรักษา คือ penicillin G sodium, cloxacillin หรือ ampicillin

3. การบริหารยา

คำนวณขนาดยา 3 - 6 mg/kg/d ตามการรักษาของแพทย์และนำมาเจือจางด้วย intravenous solution 100 ml ให้ยาโดยวิธี infusion ด้วยอัตราคงที่เป็นเวลา 30 นาที

4. การเก็บตัวอย่าง serum เพื่อหาระดับยา gentamicin ใน serum โดยทำการเก็บตัวอย่างหลังจากเริ่มให้ยาไปแล้วอย่างน้อยที่สุด 2 วัน เพื่อให้ระดับยาสถิต steady state ในวันที่ 3 ของการรักษาทำการเจาะเลือด 8 ครั้งๆ ละ

3 ml โดยเจาะจากแขนด้านตรงข้ามกับที่ให้ infusion ภายหลังจากสิ้นสุดการ infusion ที่เวลา 15, 30, 45 นาที, 1, 4, 8, 12, 23.5 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาปั่นด้วย centrifuge (3000 rpm เป็นเวลา 10-15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง) นำ serum ที่ได้ไปหาปริมาณยาด้วยเครื่อง TDX Analyzer ในกรณีที่ไม่สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ทันทีนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ภายใน 7 วัน

5. วิธีวิเคราะห์หาปริมาณ gentamicin โดยเครื่อง TDX Analyzer ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

5.1 ขั้นตอนการสร้างกราฟมาตรฐาน

5.1.1 เตรียม carousel ดังนี้

5.1.1.1 วาง cuvette ลงใน carousel ที่ตำแหน่ง 1 ถึง 9

5.1.1.2 วาง sample cartridge ลงใน carousel ที่ตำแหน่ง 1 ถึง 9

5.1.1.3 Pipet gentamicin calibrator ซึ่งใช้สร้างกราฟมาตรฐาน อย่างน้อย 50  $\mu$ l ใส่ลงใน sample cartridge ดังนี้

Gentamicin calibrators ตำแหน่งที่ใส่ใน Sample cartridge (ความเข้มข้น  $\mu$ g/ml)

A (0.0)	1
B (0.5)	2
C (1.5)	3
D (3.0)	4
E (6.0)	5
F (10.0)	6

5.1.1.4 Pipet gentamicin control อย่างน้อย 50  $\mu$ l ใส่ลงใน sample cartridge สำหรับตรวจสอบความถูกต้องของกราฟมาตรฐานดังนี้

Gentamicin controls (ความเข้มข้น $\mu\text{g/ml}$ )	ตำแหน่งที่ใส่ใน Sample cartridge
L (1)	7
M (4)	8
H (8)	9

5.1.2 วาง carousel ในเครื่อง TDx Analyzer

5.1.3 วาง gentamicin reagent pack ในเครื่อง

TDx Analyzer ปิดประตูเครื่อง กด run

5.1.4 เครื่องมือเริ่มทำงานรอจนเครื่องทำงานเสร็จ

สมบูรณ์

5.1.5 ดูผลการวิเคราะห์จาก print out เครื่อง TDx Analyzer จะทำการบันทึกกราฟมาตรฐานดังกล่าวไว้ในหน่วยความจำ

5.2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของ gentamicin ใน serum

5.2.1 เตรียม carousel ดังนี้

5.2.1.1 วาง cuvette และ sample cartridge ลงใน carousel ที่ตำแหน่งต่างๆ จำนวน cuvette และ sample cartridge ที่ใช้ขึ้นอยู่กับจำนวน serum ที่นำมาหาระดับความเข้มข้นของ gentamicin

5.2.1.2 Pipet serum ที่ได้จากข้อ 4 จำนวน อย่างน้อย 50  $\mu\text{l}$  ใส่ลงใน sample cartridge ที่ตำแหน่งต่าง ๆ

5.2.2 วาง gentamicin reagent pack ในเครื่อง TDx Analyzer ปิดประตูเครื่อง กด run

5.2.3 เครื่องมือเริ่มทำงานคอยจนเครื่องทำงานเสร็จ  
สมบูรณ์

5.2.4 ดูผลการวิเคราะห์จาก print out

6. เกณฑ์ในการตัดผู้ป่วยออกจากขั้นตอนการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ gentamicin ได้แก่ ผู้ป่วยที่ตรวจระดับ serum creatinine ในวันที่ 3 แล้วมีค่ามากกว่า 1.5  $\text{mg/dl}$

## ขั้นตอนการศึกษาผลการใช้ Gentamicin ต่ออัตราการกรองไต

1. คัดเลือกผู้ป่วยจากแผนกอายุรศาสตร์ แบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้
  - 1.1 กลุ่มศึกษาจำนวน 9 คนประกอบด้วยผู้ป่วยโรคไตที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ และ มีการติดเชื้อในร่างกายนี้อาจต้องได้รับการรักษาด้วย gentamicin เกณฑ์ในการคัดเลือกผู้ป่วยโรคไตเข้าสู่การศึกษาใช้ลักษณะตามเกณฑ์เหมือนขั้นตอนการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ gentamicin
  - 1.2 กลุ่มควบคุมจำนวน 10 คน ประกอบด้วยผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคไต มีภาวะการทำงานของไตปกติและมีการติดเชื้อในร่างกายนี้อาจต้องได้รับการรักษาด้วย gentamicin วินิจฉัยโรคโดยแพทย์ผู้ทำการรักษา
2. ทั้งกลุ่มศึกษาและกลุ่มควบคุมต้องได้รับการรักษาด้วย gentamicin อย่างน้อยที่สุด 5 วัน
3. เจาะ serum creatinine เพื่อประเมินภาวะการทำงานของไต ที่วันและเวลาต่าง ๆ ดังนี้
  - 3.1 ภายใน 24 ชั่วโมงก่อนเริ่มการรักษาด้วย gentamicin เพื่อประเมินภาวะการทำงานของไตก่อนคัดเลือกเข้าสู่การศึกษา
  - 3.2 ในวันที่ 3 หลังจากเริ่มให้ยาเพื่อประเมินภาวะการทำงานของไตในวันที่ ทำการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์
  - 3.3 ในวันที่ 5 และวันที่ 7 หลังจากเริ่มให้ยาเพื่อประเมินภาวะการทำงานของไตหลังจากได้รับการรักษาด้วย gentamicin 5-7 วัน ติดต่อกัน
4. เกณฑ์ในการคัดผู้ป่วยออกจาก ขั้นตอนการศึกษาผลการใช้ gentamicin ที่มีต่อระดับ serun creatinine ได้แก่ผู้ป่วยที่ใช้ gentamicin ติดต่อกันไม่ถึง 5 วัน และในระหว่างนั้นระดับ serum creatinine ภายหลังการใช้ยาไม่เพิ่มขึ้นจากก่อนการใช้ยาเกิน 0.5 mg/dl

## การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

### 1. ขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลผลการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของ Gentamicin ดังนี้

1.1 ขั้นตอนการนำระดับยาใน serum มาหาค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ MK model ดังต่อไปนี้

1.1.1  $K_{e\alpha}$  (Elimination rate constant of drug in distribution phase) คือ ค่าคงที่ของอัตราการกำจัดยาในระลอกกระจายยา มีหน่วยเป็น  $hr^{-1}$

1.1.2  $K_{e\beta}$  (Elimination rate constant of drug in elimination phase) คือ ค่าคงที่ของอัตราการกำจัดยาในระลอกกำจัดยา มีหน่วยเป็น  $hr^{-1}$

1.1.3  $T_{1/2\alpha}$  (Half life of drug in distribution phase) คือ ค่าครึ่งชีวิตของยาในระลอกกระจายยา มีหน่วยเป็น  $hr^{-1}$

1.1.4  $T_{1/2\beta}$  (Half life of drug in elimination phase) คือ ค่าครึ่งชีวิตของยาในระลอกกำจัดยามีหน่วยเป็น  $hr^{-1}$

1.1.5  $V_c$  (Volume of distribution in central compartment) หรือ  $V_i$  (Volume of distribution in initial compartment) คือ ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยาใน central compartment มีหน่วยเป็น  $l/kg$

1.1.6  $V_p$  (Volume of distribution in peripheral compartment) หรือ  $V_t$  (Volume of tissue compartment) คือ ค่าปริมาตร การกระจายตัวของยาใน peripheral compartment มีหน่วยเป็น  $l/kg$

1.1.7  $V_d \text{ area}$  หรือ  $V_d \beta$  (Volume of distribution in elimination phase) คือ ค่าปริมาตรการกระจายตัวของยาในกำจัดยา มีหน่วยเป็น  $l/kg$



1.1.8 Cl (Clearance) ค่าเคลียร์แรนซ์ คือ ปริมาตรของเลือดที่มียากระจายอยู่และถูกทำให้ปราศจากยาในหนึ่งหน่วยเวลา มีหน่วยเป็น l/hr

1.1.9 AUC (The area under the serum concentration time curve) คือค่าพื้นที่ใต้โค้งของกราฟเป็นค่าซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของยาในเลือดกับเวลา บอกถึงปริมาณยาในรูปออกฤทธิ์ที่อยู่ในระบบไหลเวียนเลือด มีหน่วยเป็น  $\text{mg/l.hr}$

1.2 เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของ gentamicin ระหว่างผู้ป่วยโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติกับผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ

1.3 หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $T_{1/2\beta}$  กับสารชีวเคมีในเลือดที่ใช้ประเมินการทำงานของตับ ได้แก่ SGOT, SGPT, total bilirubin, albumin, alkaline phosphatase และค่า prothrombin time

## 2. ขั้นตอนการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการศึกษาผลการใช้ยา Gentamicin ที่มีผลต่ออัตราการกรองที่ไต

2.1 รวบรวมค่า serum creatinine (Scr) ที่เจาะภายใน 24 ชั่วโมง ก่อนให้ gentamicin และในวันที่ 5 และ 7 หลังจากเริ่มให้ยา เกณฑ์ที่ใช้ตัดสินว่าเกิดอาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ gentamicin ดูจากผลระดับ Scr คือ Scr หลังจากได้รับการรักษาด้วย gentamicin เป็นเวลา 5-7 วันติดต่อกัน เพิ่มขึ้นจากค่า Scr ก่อนให้ยามากกว่าหรือเท่ากับ  $0.5 \text{ mg/dl}$

2.2 เปรียบเทียบร้อยละของการเกิดอาการอันไม่พึงประสงค์จากการใช้ gentamicin ที่มีผลต่อระดับ Scr ในผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม

## การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

### การวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์

#### 1. ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ MK model

### สถิติที่ใช้วิเคราะห์

1. ค่า mean และ standard deviation สำหรับหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์
2. Unpaired t-test สำหรับหาความแตกต่างระหว่างลักษณะทั่วไป, ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ, และค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ในผู้ป่วยโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ
3. Mann whitney U-test สำหรับหาความแตกต่างระหว่างลักษณะทั่วไป, ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการ, และ ค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ ในผู้ป่วยโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ เปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่เป็นโรคตับที่มีภาวะการทำงานของไตปกติ ใช้ในกรณีที่เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างผู้ป่วยทั้ง 2 กลุ่ม ด้วย unpaired t-test แล้วไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
4. Correlation coefficient สำหรับหาความสัมพันธ์ระหว่าง T1/2 $\beta$  กับสารชีวเคมีในเลือดที่เป็นพารามิเตอร์ใช้ประเมินการทำงานของตับ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางแสดงการเจาะเลือดหาระดับยา Gentamicin และ Serum creatinine

วันที่	Infusion gentamicin 30 นาที	การเจาะเลือดเพื่อหาระดับ gentamicin ที่ เวลาต่าง ๆ ดังนี้ ภายหลังจากสิ้นสุดการ Infusion 15, 30, 45, นาที, 1, 4, 8, 12, 23.5 ชั่วโมง	การเจาะเลือดเพื่อหาระดับ Serum creatinine
0	-	-	/
1	/	-	-
2	/	-	-
3	/	/	/
4	/	-	-
5	/	-	/
6	/	-	-
7	/	-	/

- = ไม่ได้ปฏิบัติ

/ = ปฏิบัติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย