บทที่ 6
วัสดุและวิธีการ

1) ประชากรและตัวอย่าง (population and sample)

ประชากรเป้าหมาย : ผู้ป่วยโรคจมูกอักเสบภูมิแพ้จากไรฝุ่น

ประชากรตัวอย่าง : ผู้ป่วยโรคจมูกอักเสบภูมิแพ้จากไรฝุ่นที่มาตรวจรักษา ที่คลินิกโรคภูมิแพ้ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

<u>กฎเกณฑ์การคัดเลือกเข้ามาศึกษา</u> (Inclusion Criteria)

- อายุ 16-65 ปี
- มีอาการของโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้เรื้อรังมาอย่างน้อย 1 ปี
- มีผลการทดสอบผิวหนัง (skin-prick test) เป็นบวกต่อสารสกัดจากไรฝุ่น ขนาดของตุ่มนูน (wheal) เส้นผ่านศูนย์กลางอย่างน้อย 5 ม.ม. และขนาดเท่ากับหรือมากกว่าขนาดของตุ่มนูนที่เกิดขึ้นจากการทดสอบผิวหนังด้วยฮิสตามีน (histamine) 10 มก./มล. และมีประวัติเข้าได้กับการแพ้ไรฝุ่น

<u>กฎเกณฑ์ในการคัดออกจากการศึกษา</u> (Exclusion Criteria)

- มีอาการติดเชื้อของระบบทางเดินหายใจภายใน 2 สัปดาห์ ก่อนการวิจัย
- มีความผิดปกติทางกายวิภาคของจมูก (Anatomical defects) หรือติ่งเนื้อในจมูก (Nasal Polyposis)
- เคยได้รับการรักษาด้วยวิธีอิมมูนบำบัด (Immunotherapy) มาก่อน
- เคยได้รับ Astemizole มาก่อนในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ก่อนการวิจัย หรือได้ยาต้านฮิสตามีนตัวอื่น (ทั้งชนิดกินหรือพ่นจมูก), cromolyn, หรือ ketotifen มาก่อนในช่วงเวลา 7 วัน ก่อนการวิจัย
- เคยได้รับยาสเตอรอยด์ (ทั้งชนิดกินหรือพ่นจมูก) มาก่อนในช่วงเวลา 6 สัปดาห์ ก่อนการวิจัย
- ผู้หญิงที่กำลังตั้งครรภ์หรือให้นมบุตร
- สูบบุหรี่

2) การคำนวณขนาดตัวอย่าง

โดยใช้ตัวเลขความแปรปรวน (S^2p=1.3236) จากการศึกษาของ Ciprandi G และคณะ[9] ซึ่งศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบของ terfenadine ซึ่งเป็นยาในกลุ่มเดียวกันในโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ชนิดตามฤดูกาล, เนื่องจาก terfenadine สามารถลด ICAM-1 score ลงได้ 2 แต้ม (ค่า ICAM-1 score ลดลงหลังจากให้ยาจาก 2 เหลือ 0) ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงใช้ ICAM-1 score ที่

ลดลงจากก่อนการรักษา 1.5 แต้ม บอกถึงความสามารถในการลดการอักเสบได้ของยา เพื่อเป็นการเพิ่ม power ทางสถิติในการวิจัยให้เหมาะสม เนื่องจากประสิทธิภาพของยาในการลดการอักเสบของยาต้านฮีสตามีนในโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ชนิดตลอดปีอาจจะน้อยกว่าประสิทธิภาพของยาในโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ชนิดตามฤดูกาลได้บ้าง

α = 0.05 (two-tailed)

β = 0.10 (two-tailed)

$$N = \frac{(Z\alpha+Z\beta)^2 2S^2 p}{D^2} = \frac{(1.96+1.28)^2 x2x1.3236}{(1.5)^2}$$

= 12.35 คน ในแต่ละกลุ่ม

อาจมีผู้ป่วยขาดการติดต่อ 20%

จากการคำนวณ พบว่าต้องใช้ผู้ป่วย 30 คน (กลุ่มละ 15 คน) ในการวิจัย

3) การสังเกตและการวัด (Observation and Measurement)

ผู้ป่วยจะได้รับการแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดยการสุ่มเลือกซองบรรจุยาที่เตรียมไว้แล้วล่วงหน้า โดยที่ทั้งแพทย์และผู้ป่วยไม่ทราบว่าเป็นยาจริง (fexofenadine) หรือยาหลอก (placebo)

หลังจากผู้ป่วยได้ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม จากการสุ่มซองยาแล้ว จะได้รับการ

- เก็บข้อมูลพื้นฐาน: ชื่อ, เพศ, อายุ, หมายเลขประจำตัว
  การวินิจฉัยโรคและผลการตรวจสอบทางผิวหนังต่อสารสกัดจากไรฝุ่น (Der p allergen extract)
- ผู้ป่วยจะได้รับบัตรบันทึกอาการของโรคจมูกอักเสบจากภูมิแพ้ เพื่อบันทึกความรุนแรงของอาการ ตั้งแต่วันที่ 0 จนถึงวันที่ 7 ของการวิจัย
- หลังจากนั้นผู้ป่วยจะต้องรับประทานยาเป็นเวลา 7 วัน ในเวลา 07.00 น. และ เวลา 19.00 น. โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับ fexofenadine (60 mg) 1 tablet bid , กลุ่มที่ 2 ได้รับ placebo 1 table bid
- ในวันที่ 0 และวันที่ 7 ผู้ป่วยจะได้รับการนัดมาทำ nasal specific allergen (Der p allergen extract) challenge test โดยทำการล้างจมูก (nasal lavage) และตรวจเยื่อบุจมูกโดยใช้เครื่องมือ rhinoprobes เขี่ยชั้นผิวของเยื่อบุภายในจมูกในเวลาก่อนที่จะทำ nasal challenge test และ 30 นาทีภายหลังทำ nasal challenge test เรียบร้อยแล้ว
- นำเยื่อบุจมูกที่ได้จากการเขี่ยชั้นผิวของเยื่อบุภายในจมูกด้วย rhinoprobes มาตรวจสอบหา ICAM-1 expression จากเซลล์เยื่อบุผิวจมูก และตรวจหาปริมาณของเซลล์อักเสบในเยื่อบุภายในจมูกดังกล่าว
- นำน้ำที่ได้จากการล้างจมูก (nasal lavage fluid) มาเก็บไว้ที่ -70^0 เซลเซียส เพื่อรอการวิเคราะห์ ต่อไป

4) วิธีการ

การทำ Nasal Specific Allergen Challenge Test[89]

ให้ผู้ป่วยนั่งรอเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้จมูกชินกับสภาพอากาศ หลังจากนั้น control solution (phosphate-buffered saline (PBS) ผสมกับ human serum albumin 0.03% และ benzalkonium chloride 0.05%) จะถูกพ่น (spray) เข้าไปในรูจมูกแต่ละข้าง (ปริมาณ 0.125 มล./ข้าง) หลังจากนั้นผู้ป่วยจะถูก challenge ด้วยสารสกัดจากไรฝุ่น (Dermatophagoides Pteronyssinus allergen extract) ของบริษัท Greer Laboratories, Inc. USA. Lot: GB70-46B-8UR6 ในขนาดที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้น (25, 100, 250, และ 500 AU/ml) โดยแต่ละ dose จะถูกพ่นเข้าไปในรูจมูก แต่ละข้าง (ปริมาณ 0.125 มล./ข้าง) ห่างกันทุก 15 นาที จนกระทั่งมีการตอบสนองทางจมูก (positive nasal challenge) กล่าวคือ total symptom score มากกว่า 7 หรือ challenge จนถึงขนาดสูงสุด (500AU/ml).

การล้างจมูก (Nasal Lavage) [50]

ให้ผู้ป่วยเงยหน้าขึ้นข้างบนโดยแหงนคอไปทางด้านหลังพร้อมทั้งกลั้นหายใจแล้วเติม lactated Ringer's solution อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงไปในรูจมูกข้างละ 5 มล.ทิ้งไว้ 10 วินาที จึงจะสั่งเอาน้ำล้างจมูกออก (จะได้ปริมาตรประมาณ 2.5 – 3.5 มล.) ลงมาในภาชนะพลาสติกและถ่ายไปยัง polypropylene tube ขนาด 10 มล.

การวัด ICAM-1 Expression จากเซลล์เยื่อบุผิวในจมูก

ใช้วิธี Immunocytochemistry: โดยวิธี sensitive immunoenzymatic alkaline phosphatase-monoclonal anti-alkaline phosphatase (APAAP) complex procedure ปรับปรุงจากวิธีของ Cordell et al. [68] โดย specimens จะถูกจุ่มใน 1:50 dilution ของ purified ICAM-1 Mono Ab (1 มก./มล. , 84 H10 , IgG1-Immunotech , Marseille) หลังจากล้างใน Phosphate Buftered Saline (PBS) PH7.6, ตัวอย่างจะถูก incubated กับ rabbit anti-mouse-Ig ตามด้วย APAAP complex หลังจากนั้น specimen จะถูก incubated ใน substrate solution ที่มี basic new fusin, napthol (as biphosphate) และ levamizole (เป็น inhibitor ของ endogenous alkaline phosphates) (Sigma , St. MA, USA) ในตัวอย่างควบคุมจะไม่เติม MoAb หรือ antimouse Ig ใน negative isotype-control สำหรับ staining บน epithelial cells จะใช้ Anti-T-Lymphocyte (CD3) MoAb OKT3, IgG1 (DAKO, Milan, Italy) ขนาด1:20 dilution ของ stock solution เป็นตัว stained ทุก preparation จะถูก counterstained ด้วย Harris' haematoxylin และถูกตรวจสอบโดยพยาธิแพทย์ที่ไม่ทราบที่มาของตัวอย่าง เซลล์เยื่อบุผิวจะได้รับการตรวจนับโดยดูจากรูปร่างลักษณะ โดย ICAM-1/CD54 expression บนเซลล์เยื่อบุผิวจะถูกประเมินเป็นจำนวนร้อยละของจำนวนเซลล์เยื่อบุผิวที่ย้อมติด ICAM-1 ต่อจำนวนเซลล์ทั้งหมดจำนวนไม่น้อยกว่า 200 เซลล์

<u>การตรวจนับปริมาณเซลล์อักเสบ</u> **(Inflammatory Cells)**

การเขี่ยชั้นผิวของเยื่อบุภายในจมูก (nasal scraping) ใช้วิธีการที่ปรับปรุงมาจาก Ciprandi และคณะ[8] กล่าวคือเยื่อบุภายในจมูกจะถูกเขี่ยด้วย RhinoScrape (Allertec Co., Ltd., Samutprakarn, Thailand) จากชั้นผิวของเยื่อบุจมูกบริเวณตรงกลางของ inferior turbinates ในจมูกทั้ง 2 ข้างภายหลังจากทำการล้างจมูกเรียบร้อยแล้ว RhinoScrape ที่เขี่ยชั้นผิวของเยื่อบุภายในจมูกแล้วจะถูกนำมาจุ่มในน้ำยา PBS จำนวน 2 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์กระจายทั่วแล้วนำไปเตรียม cytospin slides โดยใช้ standard techniques (200 microliter of fluid, 800xG เป็นเวลา 5 นาที) Slides ดังกล่าวจะถูกเก็บไว้ที่ -20° เซลเซียสจนกว่าจะทำการย้อม (ภายใน 24 ชั่วโมง)

เซลล์ eosinophils, neutrophils, epithelial cells จะถูกแยกนับโดยการย้อมสี May-Grunwald / Giemsa. ร้อยละของเซลล์ที่มี histamine (histamine-containing cells : mast cells และ basophits) จะถูกนับโดยใช้สี Blue-toluidine (pH2.5) for metachromatic cells slides จะถูกนำมาอ่านโดยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus BH2, Objective 40, Eyepiece 10X, Field No. 26) จำนวนของเซลล์อักเสบ (neutrophils, eosinophils และ metachromatic cells) แต่ละชนิดจะถูกนับในแต่ละ microscope field โดยข้อมูลจะแสดงเป็นค่า mean of 10 fields Slides จะถูกตรวจนับโดยพยาธิแพทย์ซึ่งไม่ทราบที่มาของตัวอย่าง

5) การรวบรวมข้อมูล

ข้อมูลของผู้ป่วยจะได้รับการบันทึกและเก็บลงในคอมพิวเตอร์ เพื่อนำมาตรวจสอบและวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

6) การวิเคราะห์ข้อมูล

เนื่องจากข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์มีจำนวนน้อยและมีการแจกแจงข้อมูลไม่เป็น normal distribution จึงใช้การวิเคราะห์แบบ nonparametric tests

การวิเคราะห์ผลของ fexofenadine เปรียบเทียบกับหรือยาหลอก (placebo) ต่อระดับของ ICAM-1 expression จากเซลล์เยื่อบุผิวในจมูกและปริมาณเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) ใช้การวิเคราะห์ด้วย Mann-Whitney Test

การวิเคราะห์ผลของ fexofenadine และยาหลอก (placebo) ต่อระดับของ ICAM-1 expression จากเซลล์เยื่อบุผิวในจมูกและปริมาณเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) โดยเปรียบเทียบระดับก่อนและหลังการรักษาในประชากรกลุ่มเดียวกัน ใช้การวิเคราะห์ด้วย Wilcoxon Signed Ranks Test

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ICAM-1 กับอาการของผู้ป่วยและปริมาณเซลล์อักเสบ (inflammatory cells) ใช้การวิเคราะห์ด้วย Spearman's correlation