

บทที่ 3 วิธีการวิจัย

1. ประชากร และ ตัวอย่าง

1.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือกประชากร และ ตัวอย่าง

ประชากรเป้าหมาย (population) คือ ผู้ป่วยคนไทยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตทั้งแบบ cadaveric หรือ living related และ ได้รับยา tacrolimus

ประชากรตัวอย่าง (sample population) คือ ผู้ป่วยคนไทยที่ได้รับการปลูกถ่ายไตทั้งแบบ cadaveric หรือ living related และ ได้รับยา tacrolimus ที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

ตัวอย่าง (sample) คือ ประชากรตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือก

1.1.1 กฎเกณฑ์ในการคัดเลือกเข้ามศึกษา

1. ผู้ป่วยอายุมากกว่า 15 ปี
2. ผู้ป่วยได้รับยา tacrolimus สำหรับ primary prophylactic หรือ rescue therapy เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือน
3. ผู้ป่วยไม่ได้รับยาอื่นที่รบกวน metabolism ของยา tacrolimus โดยผ่านทางกรกระตุ้นหรือ ยับยั้ง cytochrome P450 (CYP) 3A4 isoenzymes ยกเว้นยา prednisolone ซึ่งผู้ป่วยสามารถได้รับในขนาดที่ไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์
4. ผู้ป่วยได้รับยา tacrolimus ในขนาดที่ไม่เปลี่ยนแปลงเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์
5. ผู้ป่วยมีการทำงานของตับปกติ โดยมีผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังต่อไปนี้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ได้แก่ total protein, globulin, albumin, total bilirubin, direct bilirubin, SGOT, SGPT, alkaline phosphatase

1.1.2 กฎเกณฑ์ในการตัดออกจากการศึกษา

1. ผู้ป่วยที่มีอาการเจ็บป่วยในขณะที่ทำการศึกษา
2. ผู้ป่วยหญิงมีครรภ์

1.2 เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง

เลือกโดยการสุ่มคร่าวๆเข้าโครงการวิจัยด้วยความสมัครใจ

1.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากเป็นการวิจัยที่ไม่เคยทำมาก่อนในประเทศไทย ดังนั้นขนาดตัวอย่างคือประชากรตัวอย่างที่เข้าเกณฑ์ในการคัดเลือก และ ยินยอมให้ทำการศึกษา โดยผู้ทำการวิจัยวางแผนจะใช้ขนาดตัวอย่างประมาณ 15 คน

2. วิธีการศึกษา

ผู้ป่วยทุกรายจะรับประทานยา tacrolimus ในขณะที่ท้องว่าง คือ ก่อนอาหาร 1 ชั่วโมง หรือ หลังอาหาร 2 ชั่วโมง เพื่อหลีกเลี่ยงปัจจัยที่อาจรบกวนการดูดซึมของยา วันละ 2 เวลาห่างกัน 12 ชั่วโมง ในขนาดที่ทำให้ morning trough level อยู่ในช่วง 5-15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร⁶¹ และ ขนาดยาจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์ก่อนการศึกษา

ทำการวัด whole-blood tacrolimus level ของผู้ป่วยแต่ละราย ณ เวลาต่างๆโดยเริ่มจากการวัดระดับยาก่อนรับประทานยาเมื่อเช้า (C_0) และ ณ เวลา 1 (C_1), 2 (C_2), 4 (C_4), 6 (C_6), 8 (C_8) และ 12 (C_{12}) ชั่วโมงหลังรับประทานยาเมื่อเช้าตามลำดับ การเจาะเลือดผู้ป่วยในแต่ละเวลาใช้เลือดปริมาณ 6 มิลลิลิตร แบ่งใส่ในหลอดทดลองที่มี EDTA 2 หลอด หลอดละ 3 มิลลิลิตร หลังเจาะเลือดครบทุกเวลาแล้วจึงนำหลอดทดลองทุกหลอดไปวัดระดับยาพร้อมกันโดยวิธี

microparticle enzyme immunoassay using monoclonal antibody (IMx Tacrolimus II assay; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) หลังจากนั้นจึงนำผลของระดับยาในแต่ละเวลาซึ่งมี 2 ค่า มาหาค่าเฉลี่ย เนื่องจากระดับยา C_1 และ C_2 ในผู้ป่วยบางรายอาจมีค่าสูงเกิน upper limit ของ IMx Tacrolimus II assay คือ 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ดังนั้นก่อนนำเลือดของทั้ง 2 เวลาดังกล่าวไปวัดระดับยา จะนำเลือดจากหลอดทดลอง 1 หลอดของทั้ง 2 เวลา มา dilute 1:1 กับ dilution reagent (IMx Tacrolimus II MODE 1 Calibrator) หลังจากวัดระดับยาแล้ว ถ้าระดับยาในหลอดทดลองที่ไม่ได้ dilute มีค่าไม่เกิน upper limit ก็ให้นำผลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยกับผลของหลอดทดลองที่ได้ dilute (ซึ่งคูณด้วย dilution factor คือ 2 แล้ว) แต่ถ้าระดับยาในหลอดทดลองที่ไม่ได้ dilute มีค่าเกิน upper limit ก็จะใช้เฉพาะผลของหลอดทดลองที่ได้ dilute

หา completed AUC โดยการนำระดับยา tacrolimus ของผู้ป่วยแต่ละราย ณ เวลาต่างๆมาคำนวณโดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. ลากเส้นตรงเชื่อมต่อระดับยาแต่ละจุดเพื่อสร้างเส้นแสดงระดับยา
2. แบ่งพื้นที่ใต้เส้นแสดงระดับยาให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูหลายๆรูป
3. คำนวณหาพื้นที่ของสี่เหลี่ยมคางหมูแต่ละรูป
4. นำพื้นที่ทั้งหมดมารวมกัน (สมการที่ 1-3 และ รูปที่ 5)

$$\text{Completed AUC} = \text{AUC}_{0-1} + \text{AUC}_{1-2} + \text{AUC}_{2-4} + \text{AUC}_{4-6} + \text{AUC}_{6-8} + \text{AUC}_{8-12} \quad (1)$$

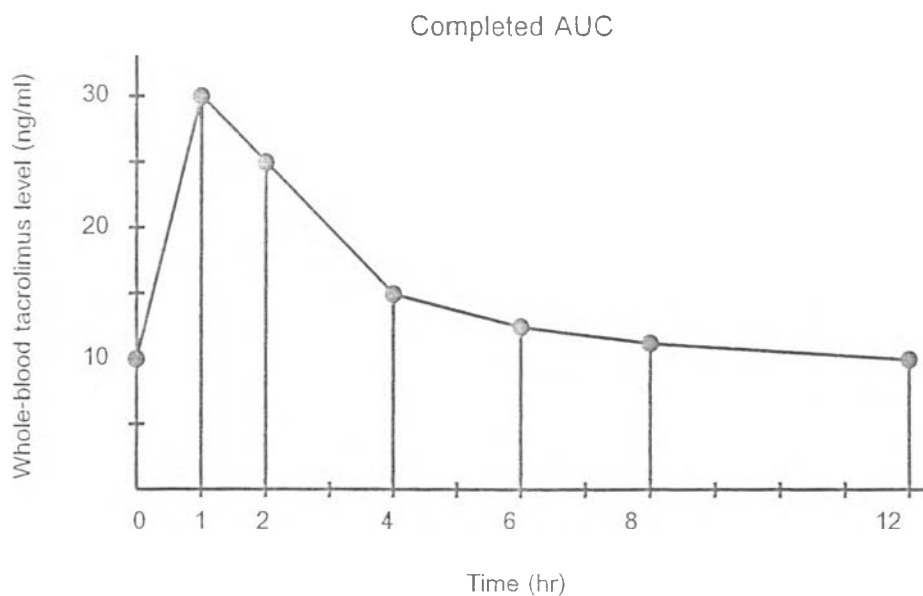
$$= (t_1 - t_0) \times (C_0 + C_1)/2 + (t_2 - t_1) \times (C_1 + C_2)/2 + (t_4 - t_2) \times (C_2 + C_4)/2$$

$$+ (t_6 - t_4) \times (C_4 + C_6)/2 + (t_8 - t_6) \times (C_6 + C_8)/2 + (t_{12} - t_8) \times (C_8 + C_{12})/2 \quad (2)$$

หมายเหตุ: AUC มีหน่วยเป็นชั่วโมง • นาโนกรัม/มิลลิลิตร (hr • ng/ml) t คือเวลาที่วัดระดับยา มีหน่วยเป็นชั่วโมง (hr) C_t คือระดับยา ณ เวลา t มีหน่วยเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร (ng/ml)

เมื่อแทนค่า t ลงไปในสมการที่ 2

$$\text{Completed AUC} = 0.5C_0 + C_1 + 1.5C_2 + 2C_4 + 2C_6 + 3C_8 + 2C_{12} \quad (3)$$



รูปที่ 5 การหา completed AUC โดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู

หาความสัมพันธ์ของระดับยา tacrolimus ณ เวลาต่างๆ กับ completed AUC โดยการหาค่า r (correlation coefficient) และ r^2 (coefficient of determination)

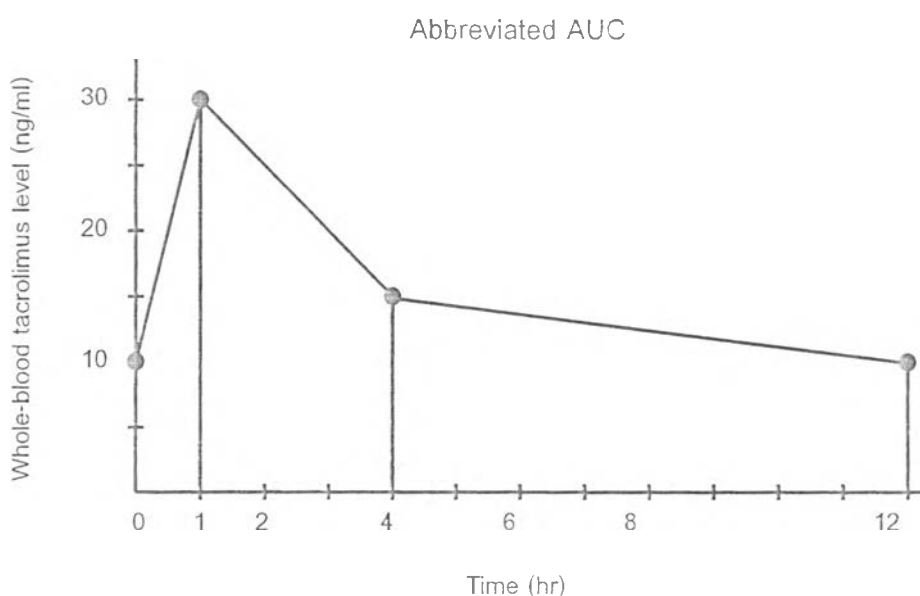
หา abbreviated AUC โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

1. วิธีวิเคราะห์สมการถดถอย (stepwise multiple linear regression analysis) ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์โดยกำหนดให้ completed AUC เป็นตัวแปรที่ไม่อิสระ (dependent variable) และ กำหนดให้ระดับยา tacrolimus ณ เวลาต่างๆ เป็นตัวแปรอิสระ (independent variable) หาสมการซึ่งใช้ระดับยาน้อยจุดที่สุด ที่สามารถทำนายค่า completed AUC ได้อย่างแม่นยำ ผลที่ได้จะอยู่ในรูปสมการดังต่อไปนี้

$$\text{Abbreviated AUC} = a + bC_x + cC_y + dC_z + \dots \quad (4)$$

หมายเหตุ: a คือค่าคงที่ b, c, d คือค่าสัมประสิทธิ์ของระดับยา ณ เวลา X, Y, Z ตามลำดับ

2. วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู (linear trapezoidal rule) หาสมการซึ่งใช้ระดับยาน้อยจุดที่สุดที่สามารถนำมาสร้างเส้นแสดงระดับยาซึ่งมีพื้นที่ใต้เส้นแสดงระดับยาจากการคำนวณโดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมูใกล้เคียงกับ completed AUC ตัวอย่างเช่น ใช้ระดับยา C_0, C_1, C_4 และ C_{12} ในรูปที่ 1 มาสร้างเส้นแสดงระดับยา (รูปที่ 6) ซึ่งจะมีพื้นที่ใต้เส้นแสดงระดับยาใกล้เคียงกับ completed AUC ในรูปที่ 1



รูปที่ 6 การหา abbreviated AUC โดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู

สมการที่ 5-7 แสดงถึงการหา abbreviated AUC จากระดับยา C_0 , C_1 , C_4 และ C_{12} โดยใช้วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมู

$$\text{Abbreviated AUC} = \text{AUC}_{0-1} + \text{AUC}_{1-4} + \text{AUC}_{4-12} \quad (5)$$

$$= (t_1 - t_0) \times (C_0 + C_1)/2 + (t_4 - t_1) \times (C_1 + C_4)/2 + (t_{12} - t_4) \times (C_4 + C_{12})/2 \quad (6)$$

เมื่อแทนค่า t ลงไปในสมการที่ 6

$$\text{Abbreviated AUC} = 0.5C_0 + 2C_1 + 5.5C_4 + 4C_{12} \quad (7)$$

ในทางทฤษฎี ณ สภาวะคงที่ (steady state) ระดับยา C_0 จะมีค่าไม่แตกต่างกับ C_{12} ดังนั้นจึงอาจใช้ระดับยา C_0 แทน C_{12} ในสมการที่ 7 ได้ดังนี้

$$\text{Abbreviated AUC} = 4.5C_0 + 2C_1 + 5.5C_4 \quad (8)$$

นำ abbreviated AUC ที่หาโดยใช้วิธีวิเคราะห์สมการถดถอย และ วิธีกฎสี่เหลี่ยมคางหมูมาวิเคราะห์ความสามารถในการทำนายค่า completed AUC โดยหาความสัมพันธ์ (r และ r^2) กับ completed AUC และ คำนวณค่า percentage of absolute prediction error (APE%) ดังนี้ $\text{APE\%} = |(\text{abbreviated AUC} - \text{completed AUC})| / \text{completed AUC} \times 100\%$ เกณฑ์ที่ใช้ในการตัดสินใจว่า abbreviated AUC มีความแม่นยำเพียงพอที่จะนำมาใช้ในทางคลินิกคือ $r \geq 0.95$, $r^2 \geq 0.9$ และ range ของ $\text{APE\%} \leq 15\%$ ⁸²

ข้อมูลของการศึกษาจะแสดงผลเป็นค่า mean \pm SE หรือ percentage กำหนดให้มีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $p\text{-value} < 0.05$ การวิเคราะห์ทางสถิติใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS 10.0 for Windows