

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

เป็นการศึกษาเชิงพรรณนา ณ จุดเวลาใดเวลาหนึ่ง

ระเบียบวิธีวิจัย

ประชากรเป้าหมาย

กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยเบาหวาน

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่เริ่มมีอาการก่อนอายุ 30 ปี

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม

คนปกติที่ไม่มีประวัติโรคเบาหวานในครอบครัว

ประชากรตัวอย่าง

กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยเบาหวาน

ผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่เริ่มมีอาการก่อนอายุ 30 ปี ที่เคยมารับการตรวจรักษาที่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และโรงพยาบาลพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรี ซึ่งมีชื่ออยู่ในเวชระเบียนผู้ป่วยนอก ผู้ป่วยจะได้รับการติดต่อทางจดหมายหรือโทรศัพท์เพื่อขอความร่วมมือในการเป็นอาสาสมัครสำหรับการวิจัยนี้

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมได้จากอาสาสมัครซึ่งเป็นลูกจ้างทำงานบ้าน, คนงานในโรงงาน, พนักงานรักษาความปลอดภัย และเสมียนในสำนักงานที่มีสุขภาพดี และไม่มีประวัติโรคเบาหวานในครอบครัว

เกณฑ์การเลือกตัวอย่าง

กลุ่มที่ 1 ผู้ป่วยเบาหวาน

เกณฑ์การคัดตัวอย่างเข้า

- ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวานตามเกณฑ์ของ National Diabetes Data Group²⁹
- เริ่มมีอาการของโรคเบาหวานก่อนอายุ 30 ปี
- ระยะเวลาที่เป็นโรคเบาหวานไม่เกิน 10 ปี
- ได้รับการรักษาโรคเบาหวานด้วยการควบคุมอาหารอย่างเดียวหรือร่วมกับยาเม็ดลดระดับน้ำตาลได้ผลโดยไม่ต้องใช้ยาฉีดอินซูลินตั้งแต่เริ่มแรก

เกณฑ์การตัดตัวอย่างออก

- เป็นเบาหวานประเภท IDDM ซึ่งวินิจฉัยโดยประวัติว่าเคยเกิด diabetic ketoacidosis อย่างน้อย 1 ครั้งเมื่อขาดอินซูลิน
- เป็นเบาหวานประเภทที่อยู่ใน clinical class ที่ 4 ตามการแบ่งประเภทขององค์การอนามัยโลก¹ คือ เบาหวานชนิดอื่นที่เกี่ยวข้องกับสภาวะหรือกลุ่มอาการบางอย่าง ได้แก่
 - โรคของตับอ่อน
 - โรคที่มีสาเหตุจากฮอร์โมน
 - โรคเบาหวานที่เกิดจากยาหรือสารเคมี
 - ความผิดปกติของอินซูลินหรือ insulin receptor
 - โรคทางพันธุกรรมบางอย่าง
- มีภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรงของโรคเบาหวาน เช่น proliferative diabetic retinopathy, renal failure, neuropathy, diabetic foot ulcer เป็นต้น

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม

เกณฑ์การคัดตัวอย่างเข้า

- อายุใกล้เคียงกับอายุของผู้ป่วยเบาหวานขณะได้รับการทำแคลมป์ คือประมาณ 17-30 ปี
- มีสุขภาพทั่วไปแข็งแรง
- ได้รับการตรวจ fasting plasma glucose แล้วไม่เป็นเบาหวาน

เกณฑ์การตัดตัวอย่างออก

- มีคนในตระกูลเป็นโรคเบาหวานแม้เพียงคนเดียว โดยการถามประวัติถึง 3 ชั่วอายุคน คือ ในรุ่นปู่ย่าตายาย, รุ่นบิดามารดา และรุ่นเยาว์กับกับผู้เป็นอาสาสมัคร
- ได้รับยาใดๆที่อาจมีผลต่อการวิจัยนี้

ขนาดตัวอย่าง

เนื่องจากยังไม่เคยมีการทำวิจัยเรื่องพยาธิสรีรวิทยาของผู้ป่วยเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินที่เริ่มมีอาการก่อนอายุ 30 ปีโดยใช้เทคนิคกลูโคสเคลมพ์มาก่อน จึงไม่มีข้อมูลที่จะนำมาคำนวณขนาดตัวอย่างได้ แต่ในการทำวิจัยเรื่องอื่นที่ใช้เทคนิคกลูโคสเคลมพ์ที่ทำในต่างประเทศนั้น ขนาดตัวอย่างประมาณ 10 รายก็ให้คำตอบได้ ดังนั้น ในการวิจัยนี้จึงใช้ขนาดตัวอย่างผู้ป่วยเบาหวาน 10 ราย และคนปรกติ 10 ราย

โครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแล้ว

การเตรียมผู้ป่วยก่อนทำ GLUCOSE SLAMP TECHNIQUE

- อธิบายเหตุผลและวิธีการแก่ผู้ป่วย
- ผู้ป่วยลงชื่อในใบยินยอมเป็นอาสาสมัครสำหรับการวิจัยนี้
- หยุดยาเม็ดลดระดับน้ำตาลในเลือด 3 วันก่อนการทำแคลมพ์
- รับผู้ป่วยไว้ในโรงพยาบาล 1 วันก่อนการทำแคลมพ์ เพื่อปรับระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ดี โดยใช้อินซูลินชนิดออกฤทธิ์สั้น
- บันทึกข้อมูลทั่วไปของผู้ป่วย เช่น อายุ อาชีพ เศรษฐฐานะ ภูมิลำเนา ประวัติโภชนาการ ประวัติการบริโภคมันสำปะหลัง ประวัติการใช้ยา การดื่มสุรา และประวัติครอบครัว
- ตรวจร่างกาย และส่งผู้ป่วยทำเอ็กซเรย์ plain abdomen

ขั้นตอนการทำ GLUCOSE CLAMP TECHNIQUE

- ให้ผู้ป่วยงดอาหารช่วงกลางคืนเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบกลูโคสแคลมป์เทคนิคในเช้าวันรุ่งขึ้นเวลา 8.00 น.
- ให้ผู้ป่วยถ่ายปัสสาวะทิ้งไปก่อนเริ่มทำ hyperglycemic clamp
- แขนงและคา Teflon catheter เบอร์ 20-gauge เข้าไปใน antecubital vein สำหรับให้สารละลายกลูโคส 1 ขวด และอินซูลินอีก 1 ขวดโดยผ่าน T-way
- ที่แขนอีกข้างหนึ่ง แขนงและคา Teflon catheter เบอร์ 20-gauge เข้าไปใน wrist vein สำหรับการดูดเลือดออกมาตรวจตลอดเวลาของการทำแคลมป์โดยการให้สารละลาย normal saline ในอัตรา keep vein open (KVO) และต่อ T-way เชื่อมกับสาย extension tube ที่ตัดปลายข้างหนึ่งไว้ แล้วใช้ arterial clamp หีบปลายเอาไว้ เมื่อถึงเวลาจะตรวจเลือดก็ปล่อย arterial clamp ให้เลือดหยุดทิ้งจนคิดว่าไม่มีน้ำเกลืออยู่ในสายแล้ว จึงหยุดเลือดใส่เครื่องตรวจระดับน้ำตาลขนาดเล็ก และเมื่อจะตรวจเลือดดูระดับอินซูลินก็ใช้ syringe ดูเลือดจาก T-way ใส่ test tube ที่ไม่มี anticoagulant ไว้ส่งห้องปฏิบัติการ
- ตรวจเลือดดูระดับน้ำตาลและดูดเลือดไว้สำหรับ fasting plasma insulin concentration
- ทำ hyperglycemic clamp ก่อน โดยการทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะแรกด้วยการให้สารละลายกลูโคสความเข้มข้นสูง (20%-50%) เข้าทางหลอดเลือดดำ ให้ได้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง 200-250 มก/ดล โดยการปรับอัตราการให้สารละลายตามผลการตรวจระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้เครื่องตรวจขนาดเล็ก ในระยะ priming นี้ตรวจทุก 2-3 นาที ต่อไปเป็นระยะรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้คงที่อยู่ที่ 200-250 มก/ดล เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในระยะ maintenance นี้ตรวจระดับน้ำตาลในเลือดทุก 5 นาที
- เมื่อจบ hyperglycemic clamp แล้ว ให้ผู้ป่วยถ่ายปัสสาวะเพื่อนำไปตรวจระดับน้ำตาลในปัสสาวะ
- ต่อไปทำ euglycemic clamp ด้วยการให้สารละลายอินซูลินชนิดออกฤทธิ์สั้นเข้าทางเส้นเลือดดำ รักษากระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในช่วง euglycemia (80-120 มก/ดล) ด้วยการให้สารละลายกลูโคสควบคู่ไปด้วยเป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำระหว่างการทำแคลมป์เพื่อนำไปตรวจระดับอินซูลิน
- นำค่าต่างๆที่ได้ไปคำนวณตามสูตร

การตรวจวัดระดับสารเคมีในเลือดและปัสสาวะ

- การตรวจ plasma glucose concentration ทำโดยวิธี glucose oxidase ใช้เครื่องตรวจระดับน้ำตาลขนาดเล็ก Glucometer Elite (Miles Canada Inc. Diagnostics Division , Etobicoke , ON , Canada) ซึ่งมีความแม่นยำในการตรวจสูงมากเมื่อเทียบกับการตรวจโดยวิธีมาตรฐานในห้องปฏิบัติการ⁷¹ มีค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ 0.983-0.985
- การตรวจ urine glucose concentration ทำโดยวิธี glucose oxidase ใช้เครื่อง Cobas Mira S Automate Analyzer (Hoffmann la Roche Ltd. Company Diagnostica , Basel , Switzerland)
- การตรวจ plasma insulin concentration ทำโดยวิธี RIA : immunoassay ด้วย COAT-A-COUNT (Diagnostic Products Corporation , Los Angeles , CA , USA)

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

- ข้อมูลเชิงปริมาณ สรุปเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±SD)
- การทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของข้อมูล 2 กลุ่ม ชนิด small independent groups ใช้ Mann-Whitney U test^{72,73} ทำโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS for Windows โดยถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อค่า $p < 0.05$
- การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร 2 ตัว ใช้ค่าสัมประสิทธิ์ของสหสัมพันธ์ (Pearson correlation coefficient , r) บอกระดับของความสัมพันธ์⁷⁴ ดังนี้

<u>r</u>	<u>ระดับของความสัมพันธ์</u>
0.8 ถึง 1.0	มีความสัมพันธ์มาก
0.5 ถึง 0.8	มีความสัมพันธ์ปานกลาง
0.2 ถึง 0.5	มีความสัมพันธ์น้อย
0.0 ถึง 0.2	ไม่ควรสนใจกับความสัมพันธ์นี้เลย

- ทำกราฟแสดงความสัมพันธ์ (scatter diagram) และคำนวณค่า r โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Microsoft Excel 97