บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

รูปแบบในการศึกษาวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยแบบ cohort study

กลุ่มตัวอย่าง

อาสาสมัครผู้ป่วยโรคเบาหวานที่รับการรักษาในเขตรับผิดชอบโรงพยาบาลส่งเสริมสุขภาพชุมชนบ้านศาลเจ้าไก่ต่อ อำเภอลาดยาว จังหวัดนครสวรรค์ ทุกเพศ อายุระหว่าง 40–75 ปี มีประวัติการเป็นโรคเบาหวาน และได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องที่โรงพยาบาลมามากกว่า 5 ปี เกณฑ์การคัดเลือกอาสาสมัครผู้ป่วยโรคเบาหวานคือ ต้องไม่มีภาวะแทรกซ้อนโรคใดๆ ที่มีการแสดงออกทางคลินิกแล้ว ได้แก่ โรคไต (ระดับ serum creatinine > 2 mg/dl) โรคหัวใจทุกชนิด (myocardial infarction และ heart failure) หรือมีประวัติการเป็นหัวใจ โรคเส้นเลือดสมองตีบ (stroke) โรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคตับ และไม่เป็นผู้ที่กำลังใช้ยา warfarin อยู่ (เนื่องจากผู้ป่วยกลุ่มนี้มีภาวะเลือดออกง่ายจากได้รับยา warfarin ซึ่งเป็นยาต้านการแข็งตัวของเลือด การได้รับอบเชยซึ่งมีสาร coumarin เป็นส่วนประกอบซึ่งเป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด ทำให้ผู้ป่วยได้รับสารต้านการแข็งตัวของเลือด มากเกินขนาด อาจทำให้ผู้ป่วยมีภาวะเลือดออกได้) มีสุขภาพโดยทั่วไปแข็งแรง อาสาสมัครคนใดมีการใช้วิตามิน อาหารเสริม สมุนไพร หรือยาแผนโบราณต้องหยุดก่อนเข้าร่วมโครงการเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ แบ่งอาสาสมัครผู้ป่วยเบาหวานที่เข้าร่วมโครงการ ออกเป็น 3 กลุ่ม เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยแต่ละกลุ่ม คือ เพศ อายุ ระยะเวลาในการเป็นโรค ระยะเวลาในการศึกษา 60 วัน โดย

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่จะได้รับวิตามินซี เสริมจากยารักษาเบาหวานที่ได้รับอยู่แล้วเป็นปกติ ขนาดวันละ 1,000 mg โดยให้ได้รับ 2 ครั้งๆ ละ 500 mg จำนวน 2 เวลา หลังอาหารเช้า และเย็น เป็นระยะเวลา 60 วัน กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ได้จะรับได้รับอบเชยสายพันธุ์จีน บดเป็นผงอัดใส่แคปซูล เสริมจากยารักษาเบาหวานที่ได้รับอยู่แล้วเป็นปกติ ขนาดวันละ 1,500 mg โดยให้ได้รับ 3 ครั้งๆ ละ 500 mg จำนวน 3 เวลา หลังอาหารเช้า กลางวันและเย็น เป็นระยะเวลา 60 วัน และกลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มผู้ป่วยเบาหวานที่รับการรักษาเป็นปกติและไม่ได้รับวิตามินเสริมใดๆ

นัดอาสาสมัครโดยให้อดอาหารมาเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนถึงเวลานัด ตรวจสุขภาพโดยทั่วไป วัดความดัน ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง วัดเส้นรอบเอว ของอาสาสมัครทุกคนแล้วบันทึก จากนั้นจึงทำการเจาะเลือด แล้วนำไปตรวจวัดสารชีวเคมีประกอบด้วย glucose, BUN, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-C, LDL-C และ HbA1c แยกเก็บ serum จำนวน 3 ml ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอตรวจ total antioxidant, malondialdehyde, hsCRP และ insulin ที่คณะสหเวชศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อไว้เป็น baseline ก่อนได้รับวิตามินเสริม สำหรับการกินยาเบาหวาน และระยะเวลาการนัดพบแพทย์ของผู้ป่วยทุกกลุ่มนั้นเหมือนเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง

การสั่งจ่ายผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ทั้งวิตามินซีและอบเชย อยู่ภายใต้การสั่งโดยแพทย์ โดยเภสัชกรเป็นผู้จ่าย และอธิบายวิธีการกินยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารตามกลุ่ม หลังจากจ่ายวิตามินไปแล้ว 1 วันจะมีการโทรศัพท์ถามอาสาสมัครทุกราย ถึงอาการข้างเคียง และ วันที่ 30 และ 45 หลังจากกินไปแล้ว จะติดตามความสม่ำเสมอของการกินยา และอาการข้างเคียงของการกินวิตามิน โดยการไปเยี่ยมบ้านเพื่อสอบถาม เมื่อกินครบ 60 วันแล้ว ในวันที่ 61 นัดอาสาสมัครโดยให้อดอาหารมาเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนถึงเวลานัด มาตรวจร่างกายโดยแพทย์ วัดความดัน ชั่งน้ำหนัก วัดส่วนสูง วัดเส้นรอบเอว และเจาะเลือดทุกราย เลือดที่เจาะแล้วทั้งหมด นำไปตรวจวัดสารชีวเคมีเหมือนตอนเริ่มโครงการ การศึกษานี้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ของมหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก เลขที่ 55 03 01 0020 และอาสาสมัครทุกคนสมัครที่เข้าร่วมโครงการได้รับทราบข้อมูลรายละเอียดและเซ็นยินยอม

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดทางเส้นเลือดดำด้วยวิธีสุญญากาศ ด้วยการใช้ vacuum tube EDTA ปริมาตร 2 ml, NaF ปริมาตร 2.5 ml และ clotted blood ปริมาตร 6 ml หลอด EDTA blood สำหรับทำ hemolysate เพื่อตรวจ HbA1c ปั่นแยก NaF plasma และ serum เพื่อตรวจวิเคราะห์ แยกเก็บ serum จำนวน 3 ml ลงใน tube ขนาด 12x75 mm ปิดจุก พันพาราฟิล์ม เก็บที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์

ทำการวิเคราะห์หาค่าของสารต่างๆ ในตัวอย่าง โดย

1. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ glucose จากตัวอย่าง NaF plasma โดยใช้เครื่อง Kone prime 60i automatic analyzer ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Thermo Fisher Scientific ประเทศฟินแลนด์

2. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ glucose, BUN, creatinine, total cholesterol, triglyceride, HDL-C และ LDL-C จากตัวอย่าง serum โดยใช้เครื่อง Kone prime 60i automatic analyzer

3. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ HbA1c ด้วยตัวอย่าง hemolysate ที่ได้จากการเตรียมน้ำยา hemolyzing 1,000 µLและ EDTA blood 10 µL ผสมแล้วเขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง 5 นาที โดยใช้เครื่อง Kone prime 60i automatic analyzer

4. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ insulin จากตัวอย่าง serum โดยเครื่อง Axsym immunoassay analyzer ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Abbott Laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา

5. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ hsCRP จากตัวอย่าง serum โดยใช้เครื่อง Roche Hitachi 912 chemistry analyser ผลิตภัณฑ์ของบริษัท Roche ประเทศสหรัฐอเมริกา

6. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ MDA จากตัวอย่าง serum ด้วยวิธี colorimetric method โดยมีวิธีทำตามขั้นตอนดังนี้ นำ serum 50 µl ใส่หลอดทดลอง เติม phosphoric acid 750 µl เขย่า แล้วเติม thaiobarbituric acid 250 µl เขย่า แล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 1 ชั่วโมง ปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปแช่น้ำแข็ง 5 นาที แล้วเติม thaiobarbituric acid 50 µl เขย่าแล้วนำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที เติมน้ำกลั่น 400 µl เขย่าแล้วนำไปปั่น 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูด supernatant 1 ml วัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 532 nm โดยใช้เครื่อง spectrophotometer (spectro 22)

7. ทำการตรวจวิเคราะห์หาระดับ total antioxidant จากตัวอย่าง serum ด้วยวิธี colorimetric method โดยมีวิธีทำตามขั้นตอนดังนี้ เตรียม ABTS stock solution โดยละลาย ABTS (Sigma-Aldrish USA) ด้วย phosphate buffer saline ให้ได้ 300 mM เตรียม stock myoglobin solution โดยละลาย myoglobin 10 mg ด้วย phosphate buffer saline จำนวน 2.85 ml วิธีเตรียม ABTS substrate working solution โดยเติม 5% hydrogenperoxide 25 µl ใน stock ABTS 10 ml วิธีเตรียม myogobin working solution โดยการ dilute stock myoglobin solution 100 เท่าด้วย PBS ใส่ serum 10 µl ลงใน 96-wells plate เติม myoglbin working solution 50 µl เติม ABTS working solution 150 µl จากนั้น incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดสีที่เกิดขึ้นที่ความยาวคลื่น 405 nm โดยใช้เครื่องอ่าน plate reader

8. ทำการคำนวนหาระดับ eGFR จากค่า serum creatinine โดยใช้สูตร Cockcroft-Gault คือ

$$\text{eGFR} = \frac{(140 - \text{Age}) \times \text{Mass(in kilogram)} \times 0.85(\text{if female})}{72 \times \text{Serum creatinine(in mg/dL)}}$$

9. ทำการคำนวณหาระดับ insulin resistance, beta cell และ ค่า QUICKI จากค่า fasting blood glucose และ fasting insulin โดยใช้ HOMA (homeostatic model assessment) โดยแทนค่าจากสูตร

$$\text{HOMA} - \text{IR} = \frac{\text{Glucose} \times \text{Insulin}}{405}$$

$$\%\,\text{HOMA} - \text{B} = \frac{360 \times \text{Insulin}}{\text{Glucose} - 63}$$

10. คำนวณค่า QUICKI จากสูตร

$$\text{QUICKI} = \frac{1}{\log \text{I}_0 + \log \text{G}_0}$$

โดยแทนค่า I_0 คือ fasting Insulin และ G_0 คือ fasting glucose

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษานี้จะทำการแปลผลทางสถิติ และมีการแสดงผลการศึกษาออกมาโดยค่า median และ interquartile Q1-Q3 ใช้ Wilcoxon Signed Ranks Test ในการหาความสัมพันธ์ของข้อมูล ระดับความสัมพันธ์ทางสถิติ $P < 0.05$