

บทที่ 2 ระเบียบวิธีวิจัย

รูปแบบการวิจัย: Randomized, double-blind, placebo, controlled study

สถานที่ทำการวิจัย: โรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และโรงพยาบาลขอนแก่น
จุดยุติของการศึกษา (Study endpoints)

จุดยุติหลัก (Primary endpoints): เพื่อประเมินอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดและคุณภาพชีวิตในเรื่อง

1. การกดไขกระดูก (bone marrow suppression) ซึ่งในที่นี้รวมถึง ภาวะเกล็ดเลือดต่ำ (thrombocytopenia: เกล็ดเลือดน้อยกว่า $100,000 \text{ cells/mm}^3$) ภาวะเม็ดเลือดขาวต่ำ (neutropenia: เม็ดเลือดขาวน้อยกว่า $3,000 \text{ cells/mm}^3$) และ ภาวะเม็ดเลือดแดงต่ำ (anemia: hemoglobin น้อยกว่า 10 g/dL) โดยจะประเมินทุกครั้งก่อนผู้ป่วยรับเคมีบำบัด
2. ภาวะผอมแห้ง (cachexia) หมายถึง น้ำหนักตัวลดลงมากกว่า 10% ของน้ำหนักตัวก่อนเริ่มรับการรักษา ภายในช่วงเวลา 3 เดือนของการรับเคมีบำบัด โดยจะประเมินทุกครั้งก่อนผู้ป่วยรับเคมีบำบัด
3. พิษต่อระบบประสาทรับความรู้สึก (neurotoxicity) หมายถึง สูญเสียระบบรับความรู้สึกหรือมีอาการชา โดยมีอาการชาในระดับปานกลาง นั่นคือ มากกว่าหรือเท่ากับเกรด 2 ตามเกณฑ์ของ CTCAE version 3 (อาการชาบริเวณการใช้แขน มือ หรือนิ้ว แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน)
4. พิษต่อไต (nephrotoxicity) หมายถึง ระดับ serum creatinine เพิ่มขึ้นมากกว่า 0.5 mg/dL ของระดับก่อนเริ่มรับการรักษาโดยจะประเมินทุกครั้งก่อนผู้ป่วยรับเคมีบำบัด
5. พิษต่อหัวใจ (cardiotoxicity) หมายถึง มีอาการเมื่อทำงานหนัก นั่นคือ New York Heart Association Functional (NYHA) Classification ระดับ 2
6. ค่าคะแนนคุณภาพชีวิตรวมของผู้ป่วยมะเร็ง (FACT-G) เพิ่มขึ้นมากกว่า 10 คะแนน โดยจะประเมิน 4 ครั้ง คือ ก่อนรับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และระหว่างรับการรักษาด้วยเคมีบำบัด ที่ cycle 2, 3 และหลังรับการรักษา 6 เดือน

จุดยุติรอง (Secondary endpoints): เพื่อประเมินการตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษา และเภสัชจลนศาสตร์ ในเรื่อง

1. เพิ่มการตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด เมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาที่ cycle ที่ 3 และ 6 โดยจะประเมินการตอบสนองเป็น complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD) ตามเกณฑ์ของ Recist criteria
2. ตรวจวัดระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินในพลาสมา เมื่อผู้ป่วยเข้ารับการรักษาดด้วยเคมีบำบัด ณ โรงพยาบาล โดยเก็บตัวอย่างเลือด cycle ละ 1 ครั้ง เป็นจำนวน 4 cycle ซึ่งตัวอย่างเลือด 4 ครั้ง นี้ จะเก็บตัวอย่างกลางคืน 2 ครั้ง (ช่วงเวลา 20.30-21.30) และเช้า 2 ครั้ง (ช่วงเวลา 6.30 – 8.30)
3. ตรวจวัดระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินในน้ำลาย เมื่อผู้ป่วยเข้ารับการรักษาดด้วยเคมีบำบัด ณ โรงพยาบาล และหรือระหว่างที่รับการรักษาหรือติดตามที่หน่วยผู้ป่วยนอก โดยจะเก็บตัวอย่างน้ำลาย cycle ละ 2 ครั้ง (หรือเฉลี่ยเดือนละ 2 ครั้ง กรณีผู้ป่วยที่มารักษาที่หน่วยผู้ป่วยนอก) โดยเก็บตัวอย่างน้ำลายในเวลากลางคืน ที่เวลา 30 นาที และ 60 นาทีหลังรับประทานเมลาโทนิน

4. ตรวจวัดปริมาณ MDA ในเลือด และ 8-isoprostane (8-epi PGF_{2α}) ในปัสสาวะ โดยเก็บตัวอย่าง เดือนละ 1 ครั้ง

การคำนวณจำนวนตัวอย่าง (sample size calculation)

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีสมมุติฐาน และจุดยุติที่เกี่ยวข้องหลายสมมุติฐานและหลายตัวแปร การคำนวณจำนวนตัวอย่างที่ได้เลือกทั้งหมด 120 คน โดยมี 40 คน ต่อกลุ่มการรักษาสามารถให้กำลังการศึกษาในการพิสูจน์แต่ละสมมุติฐานได้ไม่ต่ำกว่า 80% หลักการคำนวณขนาดตัวอย่างขึ้นอยู่กับแบบทดสอบทางสถิติและชนิดของตัวแปรจุดยุติ ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 2 ลักษณะ ได้แก่ ตัวแปรทวิภาค (binary variables) (ที่ได้นำเอาตัวแปรจัดประเภท (categorical variables) ที่ผ่านการสุ่มเพื่อลดความซับซ้อนในการคำนวณขนาดตัวอย่างลง เนื่องจากไม่สามารถหาข้อมูลอ้างอิงถึงอัตราการเกิด (incidence rates) สำหรับแต่ละประเภทของตัวแปรจัดประเภทได้ เช่น คะแนนความรุนแรงของอาการข้างเคียงตาม Common Toxicity Criteria เป็นต้น) และตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

หลักการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับจุดยุติของตัวแปรทวิภาคในการพิสูจน์สมมุติฐานที่ 1 และ 3:

สำหรับตัวแปรทวิภาคสูตรในการคำนวณขนาดตัวอย่างแสดงในสมการที่ 1 (Machin et al., 1997)

$$m = \frac{\left\{ Z_{1-\alpha/2} \sqrt{(1+\varphi)\bar{\pi}(1-\bar{\pi})} + Z_{1-\beta} \sqrt{\varphi\pi_1(1-\pi_1) + \pi_2(1-\pi_2)} \right\}^2}{\varphi\delta^2} \quad \text{สมการที่ 1}$$

เมื่อ

m = จำนวนตัวอย่างในกลุ่มควบคุมที่ได้รับเพียงเคมีบำบัด (ได้รับยาหลอก)

φ = สัดส่วนของจำนวนตัวอย่างในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเมลาโทนิน φ = 2 (เมื่อ n = φ m หรือ n = 2m)

π₁ = จุดยุติของตัวแปรทวิภาคในกลุ่มที่รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว

π₂ = จุดยุติของตัวแปรทวิภาคในกลุ่มในกลุ่มที่รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและเมลาโทนิน (ขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม)

$$\bar{\pi} = \frac{\pi_1 + \varphi\pi_2}{1 + \varphi}$$

$$\delta = \pi_2 - \pi_1$$

α = ระดับนัยสำคัญ กำหนดไว้ที่ 0.05

β = ความน่าจะเป็นของการยอมรับสมมุติฐานทางเลือก กำหนดไว้ที่ 0.20

สำหรับจุดยุติด้านอาการไม่พึงประสงค์ของเคมีบำบัด

การคำนวณขนาดตัวอย่างจะคำนวณโดยใช้อาการข้างเคียงหลักเพียง 2 ชนิด คือ การกดไขกระดูก และ น้ำหนักลดมากกว่า 10% ของน้ำหนักตัวก่อนรับเคมีบำบัด เนื่องจากเป็นจุดยุติที่มีลักษณะเป็นรูปธรรม (objective) และวัดได้ และมีข้อมูลสนับสนุนจากการวิจัยที่ผ่านมาว่าเห็นการเปลี่ยนแปลงหลังใช้เมลาโทนิน

Bone Marrow Suppression

π_1 = อัตราการเกิด Bone Marrow Suppression ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (จาก
ประสบการณ์การดูแลผู้ป่วยของนักวิจัย) เท่ากับ 0.8

π_2 = อัตราการเกิด Bone Marrow Suppression ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและเมลาโทอิน
(ขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม) ที่นักวิจัยต้องการพิสูจน์เท่ากับ 0.5

$$\bar{\pi} = \frac{\pi_1 + \varphi\pi_2}{1 + \varphi} = \frac{0.8 + (2)(0.5)}{1 + 2} = 0.6$$

$$\delta = \pi_2 - \pi_1 = -0.3$$

$$\alpha = 0.05 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\alpha/2} = 1.96, \beta = 0.2 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\beta} = 0.84$$

เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ลงในสมการที่ 1 จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างกลุ่มละไม่น้อยกว่า 30 คน การเลือกใช้
จำนวนตัวอย่าง 40 คนต่อกลุ่มการรักษาจึงให้กำลังการศึกษาได้มากกว่า 80%

น้ำหนักตัวลดมากกว่า 10% ของน้ำหนักตัวก่อนรับเคมีบำบัด

π_1 = อัตราการเกิดน้ำหนักตัวลดมากกว่า 10% ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (จาก
ประสบการณ์การดูแลผู้ป่วยของนักวิจัย) เท่ากับ 1.0

π_2 = อัตราการเกิดน้ำหนักตัวลดมากกว่า 10% ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและเมลาโทอิน (ขนาด
10 และ 20 มิลลิกรัม) ที่นักวิจัยต้องการพิสูจน์เท่ากับ 0.8

$$\bar{\pi} = \frac{\pi_1 + \varphi\pi_2}{1 + \varphi} = \frac{1.0 + (2)(0.8)}{1 + 2} = 0.877$$

$$\delta = \pi_2 - \pi_1 = -0.2$$

$$\alpha = 0.05 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\alpha/2} = 1.96, \beta = 0.2 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\beta} = 0.84$$

เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ลงในสมการที่ 1 จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างกลุ่มละไม่น้อยกว่า 28 คน การเลือกใช้
จำนวนตัวอย่าง 40 คนต่อกลุ่มการรักษาจึงให้กำลังการศึกษาได้มากกว่า 80%

สำหรับจุดยุติ: การตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษา

π_1 = อัตราการตอบสนองของมะเร็ง (complete and partial response) เท่ากับ 0.15 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษา
ด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (Lissoni, 1999)

π_2 = อัตราการตอบสนองของมะเร็ง (complete and partial response) ที่ต้องการพิสูจน์ในการวิจัยนี้เท่ากับ
0.4 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและเมลาโทอิน (ขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม) (Lissoni,
1999)

$$\bar{\pi} = \frac{\pi_1 + \varphi\pi_2}{1 + \varphi} = \frac{0.15 + (2)(0.4)}{1 + 2} = 0.317$$

$$\delta = \pi_2 - \pi_1 = 0.25$$

$$\alpha = 0.05 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\alpha/2} = 1.96, \beta = 0.2 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\beta} = 0.84$$

เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ลงในสมการที่ 1 จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างกลุ่มละไม่น้อยกว่า 38 คน การเลือกใช้
จำนวนตัวอย่าง 40 คนต่อกลุ่มการรักษาจึงให้กำลังการศึกษาที่ต้องการได้

สำหรับจุดยุติ: อัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 1 ปี

π_1 = อัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 1 ปี เท่ากับ 0.2 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดเพียงอย่างเดียว (Lissoni et al., 2003)

π_2 = อัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 1 ปี ที่ต้องการพิสูจน์ในการวิจัยนี้เท่ากับ 0.6 ในกลุ่มที่ได้รับการรักษา

$$\begin{aligned} \text{ด้วยเคมีบำบัดและเมลาโทนิน (ขนาด 10 และ 20 mg) (Lissoni et al., 2003) } \bar{\pi} &= \frac{\pi_1 + \phi\pi_2}{1 + \phi} \\ &= \frac{0.2 + (2)(0.6)}{1 + 2} = 0.467 \end{aligned}$$

$$\delta = \pi_2 - \pi_1 = 0.4$$

$$\alpha = 0.05 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\alpha/2} = 1.96, \beta = 0.2 \text{ ได้ค่า } Z_{1-\beta} = 0.84$$

เมื่อแทนค่าพารามิเตอร์ลงในสมการที่ 1 จะต้องใช้จำนวนตัวอย่างกลุ่มละไม่น้อยกว่า 17 คน การเลือกใช้จำนวนตัวอย่าง 40 คนต่อกลุ่มการรักษาจึงให้กำลังการศึกษาได้มากกว่า 80%

หลักการคำนวณขนาดตัวอย่างสำหรับจุดยุติของตัวแปรต่อเนื่องในการพิสูจน์สมมุติฐานที่ 2

สำหรับตัวแปรต่อเนื่อง ที่ต้องการเปรียบเทียบผลกระทบบะหว่างการรักษาด้วยยาหลอก และเมลาโทนินสองขนาด (10 และ 20 มิลลิกรัม) สูตรในการคำนวณขนาดตัวอย่างแสดงในสมการที่ 2 (Montgomery, 2001)

$$\Phi^2 = \frac{nD^2}{2a\sigma^2} \quad \text{สมการที่ 2}$$

เมื่อ

Φ = พารามิเตอร์ทางสถิติในกราฟดำเนินลักษณะเฉพาะ (operating characteristic curve) แสดงในรูปที่ 3

D = ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของจุดยุติตามสมมุติฐาน ที่เมื่อความแตกต่างมีค่ามากกว่า

D สมมุติฐานว่างจะถูกปฏิเสธ (ดูสมการที่ 3 และ 4 หน้า 37 ประกอบ)

a = จำนวนกลุ่มรักษาเท่ากับ 3

σ = เป็นส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานในจุดยุติตามสมมุติฐาน (กรณีไม่ทราบค่าที่แท้จริงจะใช้ค่าประมาณแทน)

โดยกำหนดให้ความน่าจะเป็นในการปฏิเสธสมมุติฐานว่าง หรือ กำลังการศึกษา (power of study) ไม่น้อยกว่า 0.80 ($1-\beta$) ที่ระดับความเชื่อมั่น (α) เท่ากับ 0.05

สำหรับจุดยุติ: คะแนนคุณภาพชีวิต

D = กำหนดให้ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคะแนนคุณภาพชีวิตที่ต้องการพิสูจน์อย่างน้อย 10 คะแนน

^

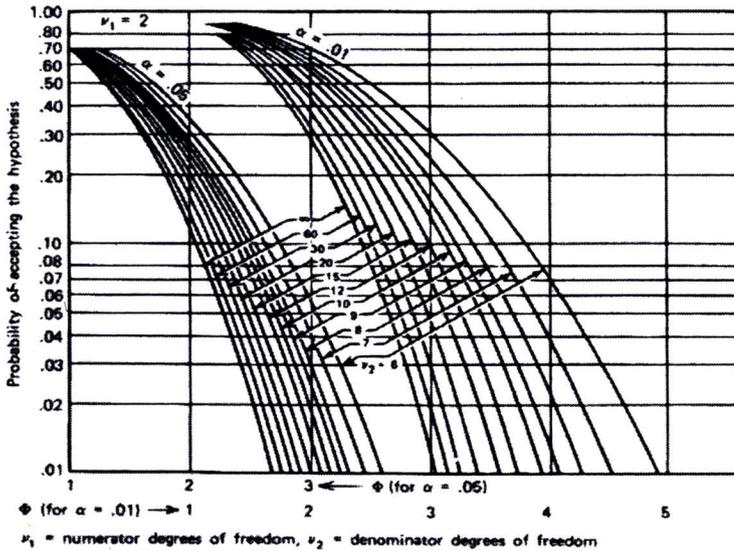
σ = ค่าประมาณของส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจุดยุติคะแนนคุณภาพชีวิตประมาณจาก เท่ากับ 10

คะแนน (Ratanatharathorn, 2001)

ดังนั้น

$$\Phi^2 = \frac{n(10)^2}{2(3)(10^2)} = 0.167n$$

เมื่อเลือกขนาดตัวอย่างกลุ่มละ 40 คน ค่า Φ^2 จะได้เท่ากับ 2.89 เมื่ออ่านจากกราฟดำเนินลักษณะเฉพาะในรูปที่ 4 ที่ $\alpha = 0.05$ จะได้ $1 - \beta > 0.80$



รูปที่ 4 กราฟดำเนินลักษณะเฉพาะ (Operating Characteristic Curve) ของการวิเคราะห์ความแปรปรวน (จาก Montgomery DC. Design and Analysis of Experiments in Design and Analysis of Experiments, 4th, John Wiley & Sons, Inc., 2001, pages 647)

การสุ่มผู้ป่วยลงกลุ่มรักษา (randomization of treatment allocation)

ผู้ป่วยที่เข้าเกณฑ์การศึกษาจะถูกสุ่มให้เข้าสู่กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ศึกษา (เมลาโทนิน 10 หรือ 20 มิลลิกรัม) โดยใช้วิธี mixed-box randomization และ stratify ตามชนิดของมะเร็ง ซึ่งรหัส (code) ของการสุ่มตัวอย่างจะสร้างขึ้นด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์โดยนักสถิติประจำโครงการวิจัยล่วงหน้า ใส่ในซองปิดผนึก และจะมีเพียงเภสัชกรที่ทำหน้าที่เตรียม/จ่ายเมลาโทนิน หรือ ยาหลอก ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการประเมินผลลัพธ์ด้านอาการข้างเคียง คุณภาพชีวิต หรือการตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษา ทราบว่าผู้ป่วยแต่ละคนจะได้รับการรักษาอะไร (จะไม่มีกรณีใดที่รหัสถูกเปิด)

เกณฑ์การคัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการ (Inclusion criteria)

1. เพศชายหรือหญิง
2. อายุระหว่าง 18 – 70 ปี
3. ได้รับวินิจฉัยว่าเป็นมะเร็งครั้งแรก โดยมีผลการวินิจฉัยทางพยาธิวิทยา (histological biopsy) ยืนยันว่าเป็นมะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ระยะที่มากกว่าหรือเท่ากับ 3B มะเร็ง head and neck ที่อยู่ในระยะแพร่กระจาย หรือ มะเร็ง soft tissue sarcoma ระยะแพร่กระจาย

4. ไม่เคยได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดมาก่อน
5. ไม่เคยได้รับ biological therapy เช่น Interferon, interleukin
6. มีสมรรถภาพทางร่างกายค่อนข้างดี ประเมินจาก ECOG score โดยต้องมีค่า ECOG score น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2 นั่นคือ ในเวลากลางวัน ใช้เวลานอนน้อยบนเตียงน้อยกว่า 50% สามารถเคลื่อนไหวได้ และช่วยเหลือตนเองได้ แต่ไม่สามารถทำงานได้
7. ยินดีเข้าร่วมการศึกษา และไม่มีปัญหาในการให้ตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ และน้ำลาย และลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมการวิจัยทางคลินิก
8. เป็นผู้ป่วยที่มีการทำงานของระบบเลือด ไต ตับ หัวใจ ปกติ นั่นคือ
 - มีเกล็ดเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ $100,000 \text{ cells/mm}^3$ เม็ดเลือดขาวมากกว่าหรือเท่ากับ $3,000 \text{ cells/mm}^3$ และ hemoglobin มากกว่าหรือเท่ากับ 10 g/dL
 - ระดับ serum creatinine น้อยกว่าหรือเท่ากับ 1.5 mg/dL
 - ระดับ bilirubin น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.0 mg/dL และ AST น้อยกว่าหรือเท่ากับ 2.5 เท่าของค่าปกติ หรือน้อยกว่า 4 เท่าของค่าปกติ ในกรณีที่มี liver metastasis
 - New York Heart Association Functional (NYHA) Classification น้อยกว่าหรือเท่ากับระดับ 2

เกณฑ์การแยกผู้ป่วยออกจากโครงการ (Exclusion criteria)

1. มีการสูญเสียระบบรับความรู้สึกส่วนปลาย โดยมีอาการชาในระดับมากกว่าหรือเท่ากับ 2 ตามเกณฑ์ของ CTCAE version 3 นั่นคือ อาการชาบวมการใช้แขน มือ หรือนิ้ว แต่ยังไม่รบกวนกิจวัตรประจำวัน
2. มีมะเร็งมากกว่า 1 ชนิด
3. มีการกระจายของมะเร็งไปยังสมอง
4. ภาวะโรคแทรกซ้อนที่ยังควบคุมไม่ได้ ในที่นี้ ได้แก่ uncontrolled diabetes mellitus (blood glucose > 200 mg/dL), uncontrolled hypertension, unstable angina, มีประวัติ congestive heart failure หรือมีประวัติ myocardial infarction ในช่วง 1 ปีที่ผ่านมา
5. มีภาวะติดเชื้อมาร่วมด้วย
6. ได้รับการผ่าตัดหรือรังสีรักษาภายในช่วงระยะเวลา 1 เดือนที่ผ่านมา

เมลาโทนินที่ใช้ในการศึกษา

เนื่องจากยังไม่มีกรขึ้นทะเบียนเมลาโทนินในประเทศไทย เมลาโทนินที่ใช้ในการศึกษานี้จะต้องขอรับอนุมัติการนำเข้าวัตถุดิบเพื่อการศึกษาจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา กระทรวงสาธารณสุข ก่อนจากนั้นจะมีการเตรียมเป็นรูปแบบผลิตภัณฑ์ เพื่อใช้สำหรับการศึกษาวิจัยในคน ณ General Drug House ซึ่งเป็นโรงงานผลิตยาที่มี Good Manufacturing Practice (GMP) การวิจัยนี้จะใช้สูตรตำรับของเมลาโทนินในรูปแบบแคปซูล ขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม ผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจะมีการทดสอบคุณภาพ สารปนเปื้อน ปริมาณและความคงตัวก่อนนำมาใช้ในการศึกษาทุกหน่วยการผลิต ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตแล้วจะเก็บไว้ในตู้เย็นช่องธรรมดา

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในคน

ก่อนเริ่มการศึกษา

โครงการวิจัยต้องได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการศึกษาวิจัยในคน คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ก่อนเริ่มการศึกษา จากนั้นแพทย์นักวิจัยร่วมจะเป็นผู้คัดเลือกผู้ป่วยเข้าร่วมโครงการตามเกณฑ์ที่กำหนด แพทย์นักวิจัยร่วมอธิบายผู้ป่วยเกี่ยวกับรายละเอียดของโครงการวิจัย รวมถึงสิ่งที่ผู้ป่วยต้องปฏิบัติ และผู้ป่วยลงนามในใบยินยอมเข้าร่วมโครงการวิจัย (รูปที่ 5 และ 6)

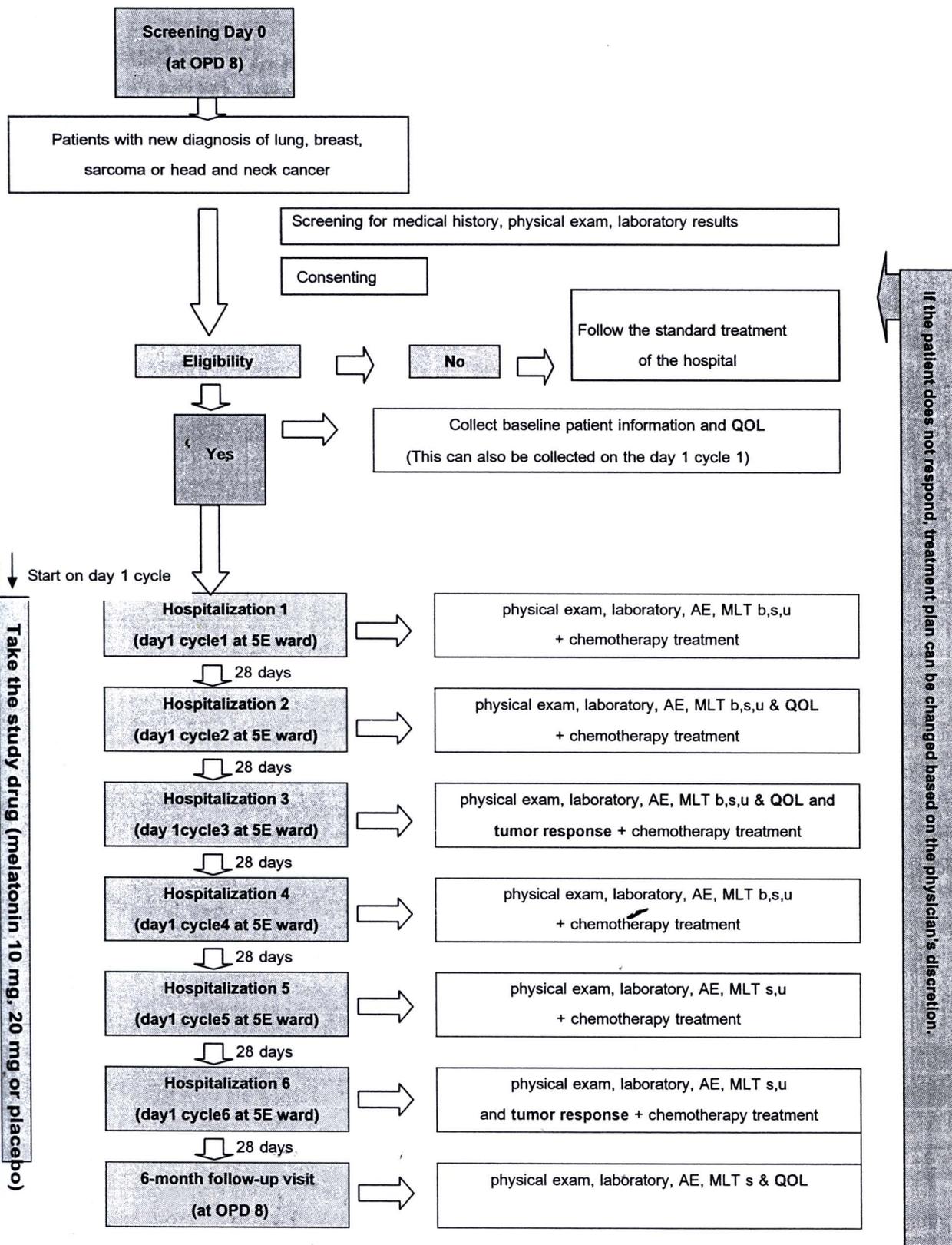
ระหว่างการศึกษา

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษา นอกจากจะได้รับแผนการรักษาเคมีบำบัด และการติดตามการรักษาตามมาตรฐานของโรงพยาบาลศรีนครินทร์แล้ว ผู้ป่วยต้องรับประทานยาที่ศึกษาตามกำหนด โดยจะมีการประเมินผลลัพธ์ของการรักษาในด้านอาการข้างเคียงและคุณภาพชีวิต และเก็บตัวอย่างเลือด น้ำลาย และปัสสาวะตามกำหนดเวลาของการศึกษา (รูปที่ 5 และ 6) ตามแบบแผนการสุ่มตัวอย่างที่กำหนดไว้ล่วงหน้าโดย

กลุ่มศึกษา: ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดตามแบบแผนการรักษาตามชนิดของมะเร็งที่ผู้ป่วย ได้รับการวินิจฉัยร่วมกับเมลาโทอิน โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

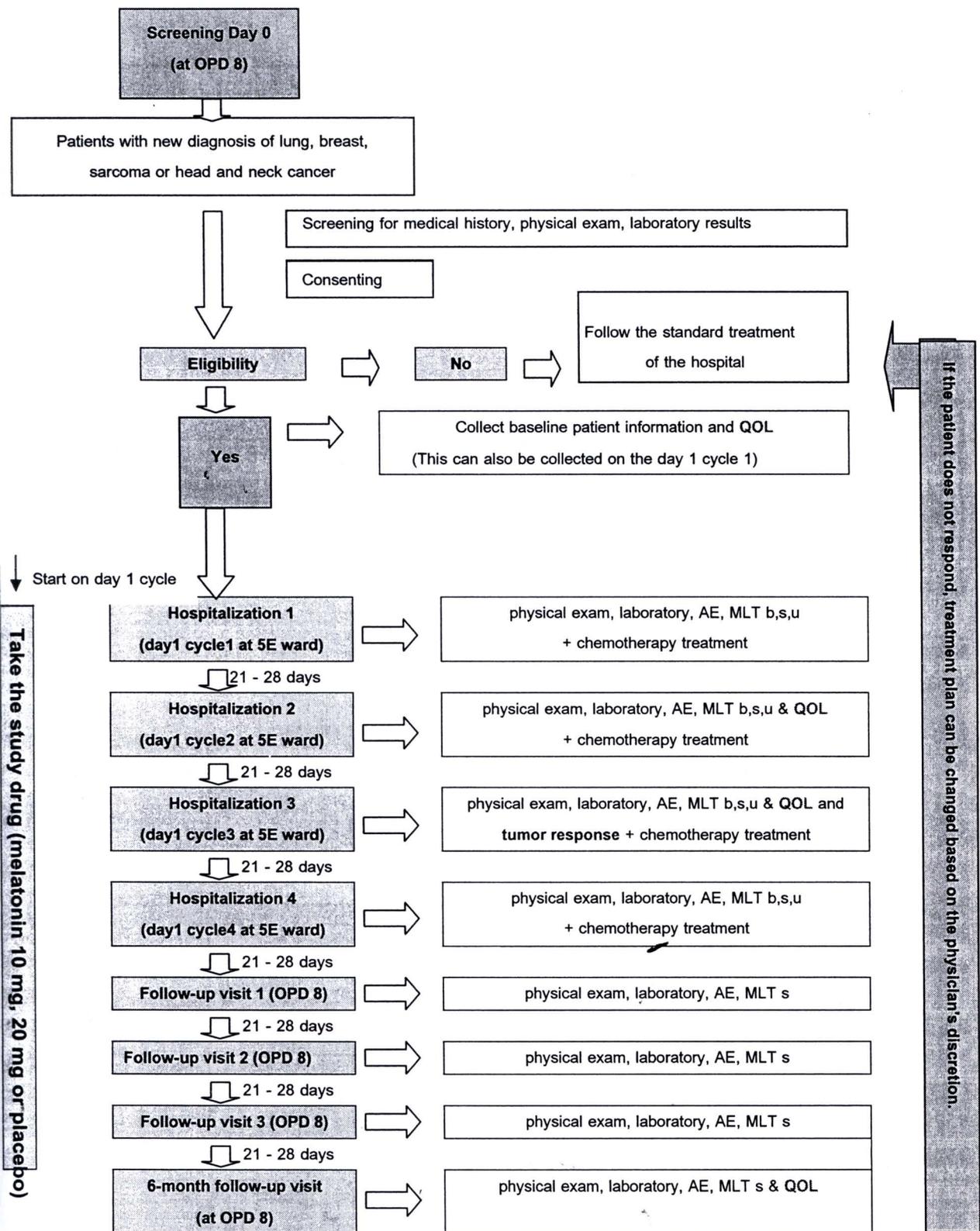
- **กลุ่มศึกษาที่ 1** รับประทานเมลาโทอินขนาด 10 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ในเวลาก่อนนอน ในวันแรกที่เข้ารับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และรับประทานเมลาโทอินทุกวันติดต่อกันจนกระทั่งจบคอร์สการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออย่างน้อย 6 เดือน
- **กลุ่มศึกษาที่ 2** รับประทานเมลาโทอินขนาด 20 มิลลิกรัม วันละ 1 ครั้ง ในเวลาก่อนนอน ในวันแรกที่เข้ารับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และรับประทานเมลาโทอินทุกวันติดต่อกันจนกระทั่งจบคอร์สการรักษาด้วยเคมีบำบัด หรืออย่างน้อย 6 เดือน

กลุ่มควบคุม: ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดตามแบบแผนการรักษาตามชนิดของมะเร็งที่ผู้ป่วยได้รับการวินิจฉัยร่วมกับยาหลอกวันละ 1 ครั้ง ในเวลากลางคืน ในวันแรกที่เข้ารับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และรับประทานทุกวันติดต่อกันจนกระทั่งจบคอร์สการรักษาด้วยเคมีบำบัด



รูปที่ 5 Diagram of the trial for sarcoma and head/neck cancer patients

AE = Adverse events, MLT = Melatonin, b = blood, s = saliva, u = urine, OPD = Out patient department, QOL = Quality of life



រូបភាព ៦ Diagram of the trial for lung and breast cancer patients

AE = Adverse events, MLT = Melatonin, b = blood, s = saliva, u = urine, OPD = Out patient department, QOL = Quality of life
 Patients with breast cancer will receive chemotherapy at OPD for all six cycles. Only MLT from saliva will be collected.

เมลาโทนินและยาหลอกที่ใช้ในการศึกษา

บริษัท General Drug House จะเตรียมยาหลอกและเมลาโทนินในขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม ซึ่งจะใช้ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตใน lot เดียวกันทั้งการศึกษา โดยจะมีการบันทึกวันที่ผลิต และวันหมดอายุไว้เป็นข้อมูลด้วย ผู้ป่วยจะรับประทาน เมลาโทนินหรือยาหลอกวันละครั้ง ครั้งละ 1 แคปซูล ในเวลาก่อนนอน โดยระบุให้เป็นเวลาหลัง 21.00 น. เป็นต้นไป และกำหนดให้ผู้ป่วยบันทึกเวลาที่แน่นอนที่ตนเองรับประทานยาทุกวัน เพื่อใช้ในการคำนวณค่าทางเภสัชจลนศาสตร์

เฉพาะวันแรกของการรับเคมีบำบัดที่โรงพยาบาล ใน cycle ที่ 1 - 4 ซึ่งเป็นวันที่จะเก็บตัวอย่างเลือดนั้น จะปรับเวลาให้ยาเป็น 19.00 น. เพื่อจะได้ไม่รบกวนผู้ป่วยในการเก็บตัวอย่างเลือดหลังจากรับประทานยา (ประมาณ 1 ชั่วโมงหลังจากรับประทานยา)

แบบแผนการรักษาด้วยเคมีบำบัดตามชนิดของมะเร็ง

ผู้ป่วยมะเร็งที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดตามแบบแผนการรักษาของโรงพยาบาลศรียุทธินทร์ โดยผู้ป่วยเป็นผู้รับผิดชอบค่าใช้จ่ายด้านการรักษาด้วยเคมีบำบัดและการรักษาอื่นๆในระหว่างที่อยู่ในโรงพยาบาล ตามสิทธิการรักษาของผู้ป่วย รายละเอียดของการรักษามีดังต่อไปนี้

1. มะเร็งปอดชนิด non-small cell lung cancer ระยะ III, IV ได้รับยาสูตรมาตรฐาน ตามสิทธิการรักษา ดังต่อไปนี้
 - a. PE regimen ประกอบด้วย cisplatinum 75 mg/m^2 D1 และ etoposide 100 mg/m^2 D1-3 ให้ทุก 3 สัปดาห์ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 4 cycles สำหรับผู้ป่วยที่ใช้สิทธิบัตรทอง
 - b. Paclitaxel and carboplatin regimen ประกอบด้วย paclitaxel 200 mg/m^2 D1 และ carboplatin AUC 6 D2 ให้ทุก 3 สัปดาห์ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 4 cycles สำหรับผู้ป่วยที่ใช้สิทธิราชการ ประกันสังคม หรือจ่ายเงินเอง
2. มะเร็งเต้านมระยะแพร่กระจาย
ได้รับยาสูตร FAC ซึ่งประกอบด้วย 5-fluorouracil 500 mg/m^2 และ adriamycin 50 mg/m^2 และ cyclophosphamide 500 mg/m^2 D1 ให้ห่างกันทุก 3 สัปดาห์ เป็นจำนวนทั้งสิ้น 6 cycles
3. มะเร็งศีรษะและลำคอระยะแพร่กระจาย
สูตรมาตรฐานคือ cisplatinum 100 mg/m^2 D1 ร่วมกับ 5-fluorouracil 1000 mg/m^2 D1-5 ให้ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 6 cycles
4. มะเร็งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระยะแพร่กระจาย
ได้รับ adriamycin 50 mg/m^2 D1 ร่วมกับ ifosfamide 2.5 gm/m^2 D1-2 ร่วมกับ mesna 60 % of total ifosfamide dose ในแต่ละวัน ให้ห่างกันทุก 4 สัปดาห์ จำนวนทั้งสิ้น 6 cycles

การรักษาอื่น ๆ ที่ผู้ป่วยได้รับ

การศึกษานี้เป็นแบบ intention to treat การรักษาอื่น ๆ จะได้รับตามมาตรฐานที่เป็นวิธีการปกติของการดูแลผู้ป่วยของหน่วยมะเร็งวิทยา ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยผู้ป่วยจะได้รับการป้องกันอาการคลื่นไส้อาเจียนโดยยากลุ่ม ondansetron 16 mg IV ร่วมกับ dexamethasone 10 mg IV วันละหนึ่งครั้งในช่วงที่ได้ยาเคมีบำบัด ยกเว้นผู้ป่วยมะเร็งศีรษะและลำคอระยะแพร่กระจาย และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระยะแพร่กระจาย ที่จะได้รับ ยกกลุ่ม ondansetron 24 mg IV ร่วมกับ dexamethasone 10 mg IV วันละหนึ่งครั้งในช่วงที่ได้ยาเคมีบำบัด และผู้ป่วยทุกคนจะได้รับยา plasil (10 mg) 1 เม็ด 3 เวลาในระหว่างช่วงที่ผู้ป่วยอยู่โรงพยาบาล และจะให้กลับไปรับประทานต่อที่บ้านเป็นเวลา 5 วัน เพื่อบรรเทาอาการคลื่นไส้อาเจียนถ้าผู้ป่วยมีอาการคลื่นไส้อาเจียน

มากระหว่างอยู่โรงพยาบาล ส่วนเรื่องผลข้างเคียงเรื่องการกดไขกระดูก จะใช้ยากระตุ้นเม็ดเลือดขาวเฉพาะตามที่มีข้อบ่งชี้เท่านั้น จะไม่ใช่เป็น primary prophylaxis ในผู้ป่วยที่ไม่เคยมีปัญหาเรื่องเม็ดเลือดขาวต่ำร่วมกับมีไข้ (febrile neutropenia) จะไม่มีการใช้ยาอื่นใดในการป้องกันหรือลดผลข้างเคียง เช่น ยา amifostine เป็นต้น

การตัดสินใจรักษาด้วยเคมีบำบัดสูตรที่สองหรือสามขึ้นอยู่กับดุลพินิจของแพทย์หลังจากที่ประเมินการตอบสนองต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัดในช่วงแรกคือหลัง 3 cycles ในกรณีที่ผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษา แพทย์สามารถตัดสินใจปรับเปลี่ยนแผนการรักษาได้ตามความเหมาะสม

การตรวจร่างกายและการตรวจทางห้องปฏิบัติการ

ผู้ป่วยที่เข้าร่วมการศึกษาจะได้รับการตรวจร่างกาย และการตรวจทางห้องปฏิบัติการตามแบบแผนการดูแลผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัดของโรงพยาบาลศรีนครินทร์ (ตารางที่ 2) ได้แก่

การตรวจร่างกาย

จะประเมินก่อนผู้ป่วยรับการรักษา และทุกครั้งที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาด้วยเคมีบำบัด เป็นการตรวจโดยแพทย์ประจำทีมวิจัยในเรื่อง สัญญาณชีพ (vital sign) ของผู้ป่วย (ความดันโลหิต ชีพจร อัตราการหายใจ และอุณหภูมิ) น้ำหนัก รวมถึงอาการและอาการแสดงอื่นๆตามหลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติของการประเมินอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดต่อระบบต่างๆของผู้ป่วยตามเกณฑ์การประเมินของ Common Toxicity Criteria (version 3.0)

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

จะตรวจก่อนผู้ป่วยรับการรักษา และทุกครั้งที่ผู้ป่วยเข้ารับการรักษาด้วยเคมีบำบัด ตามรายละเอียดดังต่อไปนี้

- Clinical chemistry ได้แก่ total and direct bilirubin, aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase, albumin, blood sugar, blood urea, creatinine, potassium, sodium, chloride, bicarbonate
- Haematology ได้แก่ hemoglobin, hematocrit, white blood count, red blood cell, reticulocyte count, platelet count, differential count: neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils
- Routine urinalyses ได้แก่ appearance, pH, bacteria, WBC, RBC, sugar

การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์-เภสัชพลศาสตร์ของเมลาโทนิน

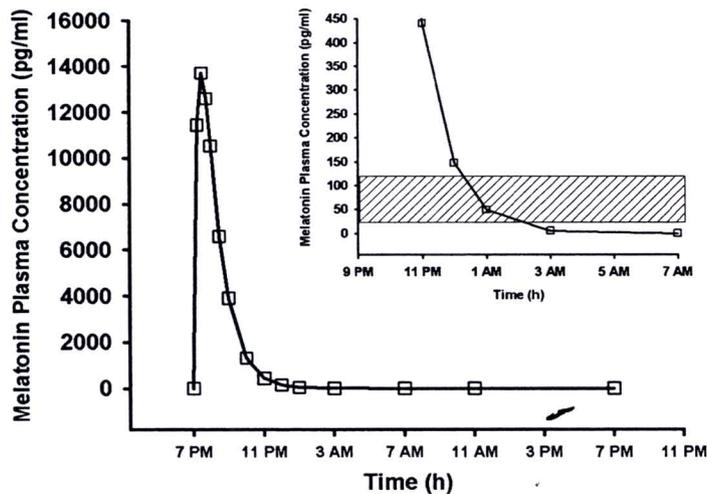
การศึกษาเภสัชจลนศาสตร์-เภสัชพลศาสตร์ของเมลาโทนินอาศัยการตรวจวัดระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินในพลาสมา และ น้ำลาย การเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำลาย ถูกออกแบบเพื่อให้สามารถประมาณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ประชากรของเมลาโทนินในผู้ป่วยที่เข้าร่วมการวิจัยทางคลินิกได้ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด 4 ครั้ง คือ cycle ละ 1 ครั้ง เป็นจำนวน 4 cycle ซึ่งจะกำหนดให้เก็บที่เวลาประมาณ 1 ชั่วโมงหลังรับประทานยา นั่นคือช่วงเวลา 20.30-21.30 จำนวน 2 ครั้ง (cycle ที่ 1 และ 3) และ เก็บตัวอย่างที่เวลาประมาณ 12 ชั่วโมงหลังรับประทานยา นั่นคือ ที่ช่วงเวลา 6.30 – 8.30 จำนวน 2 ครั้ง (cycle ที่ 2 และ 4)¹

¹ การศึกษาระบุให้ผู้ป่วยรับประทานยาก่อนนอน และถ้าเป็นไปได้ ควรเป็นหลังเวลา 21.00 น. เป็นต้นไป แต่ในวันแรกของการรับเคมีบำบัดแต่ละ cycle จะกำหนดให้ผู้ป่วยรับประทานยาเวลา 19.00 น. เพื่อไม่ให้เกิดการเก็บตัวอย่างเลือดและน้ำลายรบกวนเวลานอนของผู้ป่วย

ส่วนตัวอย่างน้ำลายจะเก็บ cycle ละ 2 ครั้ง (หรือเฉลี่ยเดือนละ 2 ครั้ง กรณีผู้ป่วยที่มารักษาที่หน่วยผู้ป่วยนอก) โดยเก็บตัวอย่างน้ำลายในเวลากลางคืน หลังรับประทานเมลาโทนิน 30 นาที และ 60 นาที ตามลำดับ นอกจากนี้ จะเก็บตัวอย่างปัสสาวะสะสมตลอดคืน โดยเก็บเฉพาะในเดือนที่ผู้ป่วยมารับเคมีบำบัดที่หอผู้ป่วย cycle ละ 1 ครั้ง

ซึ่งเป็นจุดเวลาที่ได้รับการออกแบบด้วยเทคนิค (D optimal sampling) ด้วยโปรแกรม ADAPT II (D'Argenio, D.Z. and Schumitzky A, 1997.) เพื่อให้สามารถประมาณค่าพารามิเตอร์ของประชากร ได้แก่ เคลียแรนซ์ (CL/F) ปริมาตรการกระจายตัว (V/F) และค่าคงที่ของอัตราการดูดซึมของเมลาโทนิน (k_a) ได้ โดยอาศัยการจำลองจากผลการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ของสารละลายเมลาโทนินขนาด 750 μg ในอาสาสมัครสุขภาพดี จำนวน 11 คน (Konsil, 1997) ระดับความเข้มข้นที่ได้จะนำไปประมาณค่าพารามิเตอร์ทางเภสัชจลนศาสตร์ของประชากร ด้วยโปรแกรม Kinetic 4.0 หรือ NONMEM และกราฟระดับความเข้มข้น-เวลาของเมลาโทนินในผู้ป่วยแต่ละคน จะประมาณ

ผลการจำลองระดับความเข้มข้นของเมลาโทนิน-เวลา หลังรับประทานเมลาโทนิน 10 mg เมื่อเวลา 1 ทุ่ม ตรง (19:00 น) โดยอาศัยข้อมูลจากการศึกษาเภสัชจลนศาสตร์ประชากรของเมลาโทนินของ Konsil (Konsil, 1997) ด้วยโปรแกรม ADAPT II แสดงในรูปที่ 7 ซึ่งแสดงให้เห็นว่า มีโอกาสสูงที่เมลาโทนินที่ได้จากการรับประทานในขนาด 10 และ 20 mg จะถูกกำจัดหมดจากร่างกายหลังจากตื่นนอน ทำให้คาดการณ์ได้ว่าอาการข้างเคียงที่เกิดจากระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินที่สูงกว่าระดับความเข้มข้นปกติที่หลังจากต่อมไพเนียลน่าจะเกิดขึ้นได้น้อย



รูปที่ 7 ผลการจำลองระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินที่ได้จากการรับประทานสารละลายเมลาโทนิน 10 mg เวลา 19:00 น กับผู้ป่วย (สำหรับขนาด 20 มิลลิกรัมจะให้ระดับความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของขนาด 10 มิลลิกรัม) พื้นที่แรเงาในกราฟภาพเล็กแสดงช่วงระดับความเข้มข้นของเมลาโทนินที่หลังจากต่อมไพเนียลในเวลากลางคืนในอาสาสมัครสุขภาพดี (Konsil, 1997)

การประเมินผลด้านลัพท์ของการรักษา

อาการไม่พึงประสงค์จากเคมีบำบัด

อาการข้างเคียงจากเคมีบำบัดที่พบก่อน และในระหว่างคอร์สการรักษาด้วยเคมีบำบัดจะมีการบันทึกตาเกณฑ์มาตรฐานของ Common Toxicity Criteria (version 3.0) ซึ่งจะเก็บข้อมูลโดยแพทย์นักวิจัยในวันแรกที่ผู้ป่วย

มารับการรักษาที่โรงพยาบาลในแต่ละ cycle หรือที่หน่วยผู้ป่วยนอก กรณีติดตามการรักษา หรือในผู้ป่วยที่ไม่ได้มารับเคมีบำบัดที่โรงพยาบาล (ตารางที่ 2)

คุณภาพชีวิต

คุณภาพชีวิตจะประเมินโดยใช้แบบประเมิน FACT-G ร่วมกับอาการที่เฉพาะกับมะเร็งหรืออาการข้างเคียงบางชนิด ซึ่งในที่นี้ได้แก่ FACT-B, FACT-L และ FACT-Head& neck (รายละเอียดดูในการประเมินคุณภาพชีวิต) เนื่องจากผู้ป่วยมะเร็งแต่ละชนิด มีระยะเวลาการรับยาแตกต่างกัน จึงกำหนดช่วงเวลาของการเก็บข้อมูลคุณภาพชีวิต เพื่อให้ประเมินคุณภาพชีวิตได้ใกล้เคียงกับ cycle ที่มารับยาให้มากที่สุด การประเมินผลด้านคุณภาพชีวิตกำหนดทั้งในระยะสั้น และระยะยาว โดยแบ่งเป็น ประเมินก่อนรับการรักษาด้วยเคมีบำบัด และหลังเริ่มรับการรักษาด้วยเคมีบำบัดเป็นเวลาประมาณ 1 เดือน (สัปดาห์ที่ 4 – 5), 2 เดือน (สัปดาห์ที่ 7 – 9) และ 6 เดือน (สัปดาห์ที่ 25-26) ซึ่งในที่นี้หมายถึง วันเริ่มเข้าการศึกษา (baseline) วันแรกของการรับเคมีบำบัด cycle ที่ 2 และ cycle ที่ 3 และ หลังรับการรักษา 6 เดือน (สัปดาห์ที่ 24)

การเก็บข้อมูลคุณภาพชีวิตจะใช้วิธีการสัมภาษณ์ โดยใช้ผู้สัมภาษณ์ 2 คน และก่อนเก็บข้อมูล จะมีการอบรมผู้สัมภาษณ์ และประเมินความเที่ยงของผู้สัมภาษณ์ (inter-rater reliability) โดยต้องมีค่าสัมประสิทธิ์ความเที่ยง (intra-class correlation) มากกว่า 0.7 ก่อนเริ่มเก็บข้อมูลจริง

การตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษา

แพทย์นักวิจัยร่วมจะประเมินการตอบสนองของมะเร็งต่อการรักษาด้วยเคมีบำบัด ที่การรักษา cycle ที่ 3 และ cycle ที่ 6 (เฉพาะผู้ป่วยที่ตอบสนอง) โดยจะประเมินการตอบสนองเป็น complete response (CR), partial response (PR), stable disease (SD), progressive disease (PD)ตามเกณฑ์ของ RECIST criteria โดย CR หมายความว่ารอยโรคหายไปทั้งหมด และไม่มีรอยโรคใหม่เกิดขึ้นในระหว่างการรักษา PR หมายความว่ามีความที่วัดในแนวยาวที่สุดของรอยโรคลดลงร้อยละ 30 เทียบกับก่อนการรักษาและไม่มีรอยโรคใหม่เกิดขึ้น SD หมายความว่าไม่มีรอยโรคที่ยุบได้มากกว่าร้อยละ 30 และไม่มี การเพิ่มขนาดขึ้นร้อยละ 20 PD หมายความว่าก่อนเดิมมีขนาดโตขึ้นมากกว่าร้อยละ 20 หรือมีรอยโรคใหม่เกิดขึ้นในช่วงระหว่างการรักษา โดยการตอบสนองที่ถือว่ามีความสำคัญทางคลินิกคือ CR หรือ PR โดยจะเปรียบเทียบเป็นสัดส่วนของผู้ป่วยที่ได้รับการตอบสนองแบบมี clinical significant ระหว่างสองกลุ่มการรักษา

การประเมินคุณภาพชีวิต

การวิจัยนี้จะประเมินทั้งคุณภาพชีวิตทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็ง และเฉพาะโรคมะเร็ง และเฉพาะอาการข้างเคียง โดยใช้แบบประเมิน Functional Assessment of Cancer Therapy (FACT) version 4 ของทีมวิจัย Functional Assessment of Chronic Illness Therapy (FACIT) ซึ่ง conceptual framework ของคุณภาพชีวิตแบบทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็ง (FACT-G) ในการศึกษา นี้ หมายถึง มิติทางร่างกาย (physical well-being) สังคม (social well-being) จิตใจ (emotional well-being) และการประกอบกิจกรรม (functional well-being) โดยจะประเมินร่วมกับแบบประเมินคุณภาพชีวิตแบบเฉพาะ ซึ่งได้แก่ เฉพาะกับมะเร็งเต้านม (FACT-B) มะเร็งปอด (FACT-L) และมะเร็ง head&neck (FACT-H&N) โดยมีรายละเอียดของแบบประเมินในตารางที่ 3

แบบประเมินคุณภาพชีวิต FACT สร้างโดย Cella และทีม โดยสร้างจากข้อคำถามที่มาจากทั้งผู้เชี่ยวชาญ และผู้ป่วยมะเร็งโดยตรง จึงมีความสอดคล้องกับกลุ่มผู้ป่วยดังกล่าว โดยมีรายงานยืนยันผลความตรง (validity) จากการทดสอบด้วยวิธี known group validity ซึ่งสามารถแยกแยะกลุ่มผู้ป่วยตามความรุนแรงของโรคได้ และมีข้อมูลยืนยันความตรงตามโครงสร้างของแบบสอบถาม จากการวิเคราะห์ด้วย factor analysis แบบสอบถามมีความสามารถ

ในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลง (responsiveness) จึงมีความไวที่ดีและสามารถใช้ประเมินผลการรักษาที่เวลาต่าง ๆ ได้ ผลการทดสอบความเที่ยงพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเที่ยง (Cronbach's alpha) มากกว่า 0.7 ซึ่งแสดงถึงความน่าเชื่อถือของข้อคำถามในแบบประเมินแต่ละมิติ และพบค่าสัมประสิทธิ์ความเที่ยงจากการทดสอบซ้ำ (test-retest reliability) มากกว่า 0.7 ซึ่งแสดงค่าแบบสอบถามมีความเที่ยงในการวัดข้อมูลซ้ำ (Cella et al., 1993) นอกจากนี้ แบบประเมิน FACT ได้มีการทดสอบ 'minimal important difference (MID)' ซึ่งหมายถึง ระดับการเปลี่ยนแปลงของคะแนนขั้นต่ำที่ให้ผลนัยสำคัญทางคลินิกกับผู้ป่วย ดังนั้น ทำให้การแปลผลของคะแนนคุณภาพชีวิตจากแบบสอบถามดังกล่าวมีความสอดคล้องกับผู้ป่วยมากขึ้น (Eton et al., 2004)

แบบประเมินคุณภาพชีวิต FACT ฉบับภาษาไทย มีการแปลและทดสอบด้วยกระบวนการ cross-cultural validation เพื่อให้สอดคล้องกับคนไทย ซึ่งผลการทดสอบในผู้ป่วยมะเร็ง 364 คนได้ผลตรงกับแบบสอบถามต้นฉบับ (Ratanatharathorn et al., 2001) โดยมีความตรงทั้งโดยวิธี factor analysis และ known group validation โดยสามารถแยกผู้ป่วยที่มีภาวะโรคแตกต่างกันได้ แบบสอบถามมีความเที่ยงที่ดี ทั้งการทดสอบโดย test-retest reliability และ Cronbach's alpha (0.75 – 0.90) นอกจากนี้ การทดสอบการใช้แบบประเมินด้วยวิธีสัมภาษณ์ (n = 424) ในผู้ป่วยที่มีการศึกษาน้อย โดยเป็นการศึกษาระดับประถมหรือต่ำกว่าถึง 80% และประชากรส่วนหนึ่งเป็นผู้ป่วยที่รับบริการที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรที่จะใช้ในการศึกษานี้ พบว่ามีสัมประสิทธิ์ความเที่ยงอยู่ในช่วง 0.71 – 0.82 และมีความตรงตามโครงสร้าง โดยสามารถแจกแจงผู้ป่วยที่มี performance status ที่แตกต่างกันได้อย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งมีความไวต่อความเปลี่ยนแปลงของอาการปวดได้ดี (Pratheepawanit et al., 2005)

ตารางที่ 3 รายละเอียดแบบสอบถามคุณภาพชีวิตที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดแบบสอบถาม	รายละเอียด	จำนวนมิติ	จำนวนคำถาม
แบบทั่วไป			
FACT-G	ประเมินคุณภาพชีวิตทั่วไปของผู้ป่วยมะเร็ง	4	27
แบบเฉพาะ			
FACT-B*	ประเมินคุณภาพชีวิตเฉพาะของผู้ป่วยมะเร็งเต้านม	1	10
FACT-L*	ประเมินคุณภาพชีวิตเฉพาะของผู้ป่วยมะเร็งปอด	1	9
FACT-H&N*	ประเมินคุณภาพชีวิตเฉพาะของผู้ป่วยมะเร็ง head&neck	1	12

* ผู้ป่วยแต่ละคนเลือกใช้เพียง 1 แบบ ขึ้นกับชนิดของมะเร็งของผู้ป่วย ยกเว้น ผู้ป่วย sarcoma ซึ่งจะใช้เฉพาะแบบประเมินคุณภาพชีวิตแบบทั่วไป เนื่องจากยังไม่มีการพัฒนาแบบประเมินคุณภาพชีวิตที่เฉพาะสำหรับผู้ป่วยกลุ่มนี้



Melatonin / placebo dosing
 (Take the study drug for 6 months despite a progressive disease)

Melatonin 10 mg at 21:00 pm
 Melatonin 20 mg at 21:00 pm
 Placebo at 21:00 pm

Start double-blind placebo dosing
 ← 21 - 28 days → ← 21 - 28 days →

No. Hospitalization/Visit	1 st cycle		2 nd cycle		3 rd cycle		4 th cycle		5 th cycle		6 th cycle		6-month FU	6-month FU	25-26													
	H1	H1	H2	H2	H3	H3	H4	H4	H5	H5	O1	O2				H6	O3											
Chemotherapy (Lung & breast)																												
Chemotherapy (Sarcoma & H/N)																												
Screening Lung & breast	x/																											
Screening Sarcoma and H/N	x/																											
Study week	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24				
Informed consent																												
Medical history	x/			x/																								
Physical exam	x/			x/																								
Laboratory tests	x/			x/																								
Compliance	x/			x/																								
Primary endpoints																												
- Thrombocytopenia	x/			x/																								
- Neutropenia	x/			x/																								
- Anemia	x/			x/																								
- ECOG / fatigue	x/			x/																								
- Cachexia	x/			x/																								
- Neurotoxicity	x/			x/																								
- Nephrotoxicity	x/			x/																								
- Cardiotoxicity	x/			x/																								
- FACT (QOL)	x/			x/																								
Secondary endpoints																												
- Tumor response																												
- Survival																												
- Melatonin in plasma	x/			x/																								
- Melabolite in urine	x/			x/																								
- Melatonin in saliva	x/			x/																								
- Adverse events (tx)	x/			x/																								
- Safety (melatonin)	x/			x/																								
- Sleep quality	x/			x/																								

Note: 1) x = for lung and breast cancer patients, / = for sarcoma and head & neck cancer patients, ECOG = Eastern Cooperative Oncology Group, H = hospitalization, O = Out patient department, QOL = Quality of life, tx = treatment,
 2) Patients with breast cancer will receive chemotherapy at outpatient department in all six cycles. Only melatonin concentrations from saliva will be collected from these patients.

การตรวจวัดระดับความเครียดออกซิเดชัน

โครงการวิจัยได้วางแผนตรวจระดับความเครียดออกซิเดชัน โดยใช้ 2 ตัวชี้วัด คือ ปริมาณ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) และ 8-isoprostane (8-epi-PGF₂ α) ในปัสสาวะ แต่ภายหลังมีปัญหาความไม่พร้อมของเครื่องมือ HPLC ที่กำหนดสำหรับวัด ปริมาณ 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) จึงได้เปลี่ยนมาเป็นการวัดระดับ Malondialdehyde (MDA) ในพลาสมาแทน โดยมีรายละเอียดการวิเคราะห์ดังนี้

การตรวจวัดระดับ Malondialdehyde (MDA) ในตัวอย่างพลาสมา

การตรวจวัดระดับ Malondialdehyde (MDA) ในตัวอย่างพลาสมาใช้วิธี TBA โดยใช้ตัวอย่างพลาสมา 1 มิลลิลิตร เติม 0.5 ml 5 mM EDTA และเขย่า จากนั้นใส่ 8.1% SDS solution ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่า และใส่ 10% TCA reagent จำนวน 1 มิลลิลิตร ปิดฝา และ incubate ที่อุณหภูมิ 95 °C ใน waterbath เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในภาคน้ำแข็ง นำเข้าเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 3000 rpm (550 g) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น pipette ส่วนที่ใสไปใส่ใน 3.5 ml quartz cuvette วัดค่าความดูดกลืนแสงของ MDA-TBA pink complex formed ที่ค่าความยาวคลื่น 532 nm

การตรวจวัดระดับ 8-isoprostane (8-epi-PGF₂ α) ในตัวอย่างปัสสาวะ

ระดับ 8-isoprostane เป็นผลลัพธ์ของกระบวนการ lipid peroxidation การทดสอบใช้ชุดตรวจวิเคราะห์ ACE Competitive Enzyme Immunoassay 516315 test kit (Cayman Chemical, Inc, MI USA) การวิเคราะห์ใช้สารละลายตัวอย่างจำนวน 8 ความเข้มข้น (0–500 pg/ml of 8-isoprostane) วิเคราะห์ความเข้มข้นละสองตัวอย่าง เพื่อใช้สร้างกราฟมาตรฐาน น้ำที่ใช้ล้างและเจือจางตัวอย่างและสารมาตรฐานใช้ Ultrapure water (Cayman Chemical, Inc, MI USA) โดย Elisa เพลสที่เตรียมแล้วนำไปอ่านค่าด้วยเครื่อง Anthos ELISA reader (Labtec Instruments, Sabzburg, Austria) ที่การดูดกลืนแสง 450 nm ร่วมกับโปรแกรม ADAP 1.6 software

ชุดวิเคราะห์นี้มีรายงาน Cross-reactivities ของ EIA แอนติบอดี กับ 8-iso-PGF₂a ต่ำ โดยรายงาน cross-reactivities > 0.1% สำหรับ 8-iso Prostaglandin F₃ α 20.6%, 2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F₂ α 4.00%, 8-iso Prostaglandin E₂ 1.84%, 2,3-dinor-8-iso Prostaglandin F₁ α 1.70%, 8-iso Prostaglandin E₁ 1.56%, Prostaglandin F₁ α 0.71%, Prostaglandin F₃ α 0.66%, Prostaglandin E₁ 0.39%, Prostaglandin D₂ 0.16%, 6-keto Prostaglandin F₁ α 0.14%, Prostaglandin F₂ α 0.14% ทั้งนี้ แม้ว่ามีรายงาน cross-reactivity กับ 8-iso Prostaglandin F₃ α (20.6%) สูง แต่สารนี้ไม่พบในปัสสาวะของมนุษย์ Proudfoot et al., 1999) อีกทั้ง cross-reactivity เหล่านี้ไม่มีผลรบกวนความถูกต้องของการวิเคราะห์ปริมาณ 8-isoprotane ในตัวอย่าง ชุดวิเคราะห์สามารถวัดปริมาณ 8-isoprotane ได้ต่ำถึง 2.7 pg/ml (80% B/B0).

การวิเคราะห์ระดับเมลาโทนินในเลือด

ทีมวิจัยได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์เมลาโทนินในพลาสมา โดยใช้ HPLC – fluorescence detector (HPLC SpectraSystems P1500 isocratic pump and SpectraSystems FL2000 detector, Thermo Scientific, USA). เนื่องจากจะช่วยประหยัดต้นทุนในการวิเคราะห์ ได้มากกว่าวิธีวิเคราะห์มาตรฐานอื่นๆ เช่น RIA หรือ ELISA และเพื่อเพิ่มศักยภาพของทีมวิจัยในการวิเคราะห์ระดับเมลาโทนินในงานวิจัยอื่นๆต่อไป ซึ่งวิธีวิเคราะห์ดังกล่าวจะสามารถใช้กับการวิเคราะห์เมลาโทนินในน้ำลายได้ด้วย การทดสอบวิธีการวิเคราะห์เมลาโทนินในพลาสมานั้น ศึกษาโดยใช้ blank plasma ที่ได้จากคลังเลือดกลาง โรงพยาบาลศรีนครินทร์ เตรียมตัวอย่างพลาสมาจากอาสาสมัคร 6 คน โดย aliquot ปริมาณ 5 มิลลิลิตร จากตัวอย่างแต่ละคน ตัวอย่างที่ได้เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะใช้วิเคราะห์ ตรวจวัด interference, selectivity และ limit of quantification (LOQ) และเลือกใช้ N-acetylserotonin (NAS) เป็น internal standard เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับเมลาโทนิน มีความคงตัว และดูดกลืนแสงที่ค่าเดียวกับเมลาโทนิน

เตรียมสารละลายเมลาโทนินมาตรฐาน (Shanghai Chemical Co. Ltd., PR China) ตามความเข้มข้นที่กำหนด จากนั้นเติม NAS (2,000 ng/mL) และ dichloromethane (500 µL) นำไปเขย่าที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 10 นาทีด้วย Wrist shaker (Wrist Action Shaker, Burrell Corporation, USA) แล้วจึงนำเข้าเครื่อง centrifuged (Ultracentrifuge Kubota 6200, Kubota Corporation, Japan) ที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที รอให้ตกตะกอนเป็นเวลา 5 นาที pipette ส่วนชั้น organic ชั้นล่างไปใส่ใน Eppendorf tube ใหม่ แล้วระเหย dichloromethane ออกโดยแก๊สไนโตรเจน จากนั้นละลายส่วนที่เหลือใน 100% acetonitrile (Labscan Asia Co., Thailand) จำนวน 50 µL นำไป sonicate เป็นเวลา 30 นาที ด้วยเครื่อง Ultrasonic bath, Crest Ultrasonic, Malaysia). ฉีดตัวอย่างเข้าไปในเครื่อง HPLC (SpectraSystems P1500 isocratic pump, USA) โดยใช้ HiQ Sil C18V column (5 µm, 250 mm x 4.6 mm, 25 °C) (KYA Tech Corporation, Japan) และใช้ 25% acetonitrile/phosphate buffer เป็น mobile phase, pH 7.0 (pH meter SevenEasy Mettler Toledo, Thermo Fisher Scientific, UK) กำหนด flow rate ที่ความเร็ว 1.0 mL/min และกำหนด Fluorescence excitation and emission wavelengths (SpectraSystems FL2000 detector, Thermo Scientific, USA) ที่ 286 nm และ 346 nm ตามลำดับ การวิเคราะห์ทำโดยใช้เครื่อง Clarity Software (DataPlex, USA)

ทำการทดสอบวิธี HPLC มาตรฐานที่กำหนด โดยวัด linearity and range ใช้เมลาโทนินความเข้มข้น 86.4, 302.4, 1,080 และ 2,160 ng/mL ทำการเตรียมสารละลายมาตรฐานใหม่ทุกสัปดาห์ จากนั้นวัด precision โดยการฉีดเมลาโทนินความเข้มข้น 86.4 ng/mL จำนวน 5 ครั้ง แล้ววัด %CV นอกจากนี้ ตรวจวิเคราะห์หา accuracy, inter-day precision และ intra-day precision โดยใช้ spiked เมลาโทนินมาตรฐานความเข้มข้น 86.4 302.4, 1,080 ng/mL โดยทำการวัด 3 ครั้ง และทำ calibration curve ในแต่ละวัน จากนั้นวัด recovery โดยคำนวณเปรียบเทียบกับ calibration curve ที่เตรียมจากการละลายเมลาโทนินมาตรฐานใน 100% acetonitrile เปรียบเทียบกับเมลาโทนินมาตรฐานที่ได้จากการสกัดจากพลาสมา ซึ่งตามเกณฑ์ Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation กำหนดให้ accuracy และ recovery ของมาตรฐานเมลาโทนินอยู่ในช่วง 82 – 110% (ทำซ้ำ 3 ครั้ง) และ %CV < 10%.

การประเมินความปลอดภัยของเมลาโทนิน

การศึกษาจะประเมินอาการข้างเคียง (adverse effects: AEs) ของเมลาโทนินตลอดการศึกษา AEs ในที่นี้หมายถึง ความผิดปกติทางคลินิกหรือทางห้องปฏิบัติการที่เริ่มพบ หรือที่เพิ่มความรุนแรงภายในเวลา 7 วันของการเริ่มการศึกษา ซึ่งได้มาจากการตรวจร่างกาย และข้อมูลการซักประวัติอื่นๆ เช่น เวลาที่เริ่มมีอาการ ความรุนแรงของอาการ ระยะเวลาของอาการ และการรักษาอื่นๆร่วมด้วย โดยใช้เกณฑ์การประเมินของ Common Toxicity Criteria (version 3.0) ทั้งนี้ให้แพทย์ประจำทีมวิจัยเป็นผู้พิจารณาและวินิจฉัยอาการข้างเคียงที่พบดังกล่าว กรณีอาการที่พบบคล้ายกับอาการข้างเคียงของเคมีบำบัดให้แพทย์ประจำทีมวิจัยเป็นผู้ตัดสินใจชี้ขาด

เกณฑ์การให้ผู้ป่วยเลิกจากการศึกษา (Discontinuation criteria)

- 1 ผู้ป่วยสมัครใจถอนตัวออกจากกิจกรรมการวิจัยทางคลินิก
- 2 ผู้ป่วยมีปัญหาทางสุขภาพที่เป็นอุปสรรคต่อความปลอดภัย ทั้งนี้ให้อยู่ในดุลยพินิจของแพทย์นักวิจัยร่วม

เกณฑ์การพิจารณาเลิกหรือยุติการศึกษาทั้งโครงการ (Termination criteria)

การคัดเลือกอาสาสมัครและการศึกษาวิจัยในคนจะถูกระงับชั่วคราวเมื่อพบเหตุการณ์ไม่พึงประสงค์ร้ายแรงระหว่างการศึกษา (serious adverse event, SAEs) ตามมาตรฐานของเกณฑ์การพิจารณาของ Common Toxicity Criteria (version 3.0) ตั้งแต่เกรด 3 ขึ้นไป และยังไม่สามารถสรุปผลการสอบสวนสาเหตุของ SAEs นั้นได้

การศึกษาวิจัยทางคลินิกจะถูกยุติทั้งโครงการหากพบว่ามี SAEs ที่เกิดจากเมลาโทนินที่ให้ ทั้งนี้การสอบสวนและตัดสินใจยุติการศึกษาจะอยู่ในดุลยพินิจของแพทย์นักวิจัยร่วม ทีมนักวิจัย โดยจะมีการปรึกษากับคณะกรรมการพิจารณาการศึกษาวิจัยในคนของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แบบทดสอบทางสถิติ ที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับชนิดของตัวแปรจุดยุติสำหรับแต่ละสมมุติฐาน สำหรับการพิสูจน์ว่าเมลาโทนินจะสามารถเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยได้ทั้งในระหว่างและหลังจบคอร์ส เคมีบำบัด หรือ การเปรียบเทียบผลกระทบของเมลาโทนินที่มีต่อตัวแปรจุดยุติที่เป็นตัวแปรต่อเนื่อง ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมกับการทดสอบคอนทราสต์เชิงตั้งฉาก (orthogonal contrast) โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ (coefficients) ของคอนทราสต์เชิงตั้งฉาก ที่เกี่ยวข้อง 3 กลุ่มรักษา กล่าวคือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (ยาหลอก) กลุ่มที่ 2 และ 3 ได้รับเมลาโทนินในขนาด 10 และ 20 มิลลิกรัม ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบสถิติผลกระทบของเมลาโทนินที่มีต่อจุดยุติที่เป็นตัวแปรทวิภาค เช่น การกดไขกระดูก น้ำหนักลดมากกว่า 10% ของน้ำหนักตัวที่วัดได้ก่อนได้รับเคมีบำบัด การตอบสนองของมะเร็ง (คำนวณเป็นร้อยละของ Complete response (CR) Partial response (PR) และ CR ร่วมกับ PR อัตราการรอดชีวิตในระยะเวลา 1 ปี และอาการข้างเคียง (ร้อยละของการเกิด) ใช้แบบทดสอบทางสถิติไคกำลังสอง (chi-square test) โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

สำหรับการทดสอบสถิติผลกระทบของเมลาโทนินที่มีต่อจุดยุติที่เป็นตัวแปรจัดประเภท เช่น อาการข้างเคียงที่เกิดขึ้นและมีการให้เกรดตาม CTCAE และ ระดับพารามิเตอร์ของภาวะออกซิเดชัน จะใช้แบบทดสอบสถิติของ Mann Whitney U Test โดยกำหนดนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

การวิเคราะห์สถิติไคกำลังสอง Mann Whitney U Test การทดสอบความแปรปรวน และการทดสอบคอนทราสต์เชิงตั้งฉากทำในโปรแกรม SPSS (version 12) และ STATGRAPHICS Plus 5.0 (Manugistics, Stragraphics Plus for Windows Manual, Manugistics, 2001)

การวิเคราะห์ผลลัพธ์ด้านคุณภาพชีวิต

ข้อมูลคุณภาพชีวิตจะมีการป้อนรหัสใหม่ (recode) และกีดคะแนนตามหลักเกณฑ์และแนวทางปฏิบัติ การคำนวณคะแนนของ FACT โดยคะแนนจะมีลักษณะต่อเนื่อง และมีคะแนนเต็มในช่วง 108 – 156 คะแนน ขึ้นกับชนิดของแบบสอบถาม ซึ่งคะแนนที่มากจะหมายถึงคุณภาพชีวิตที่ดี จากนั้นจะวิเคราะห์ความแตกต่างของคะแนนคุณภาพชีวิตที่เวลาต่างๆ โดยใช้ repeated measure analysis และประเมินผลของการให้เมลาโทนินต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยใช้ linear regression โดยควบคุมปัจจัยในด้านอายุ ชนิดของมะเร็ง ระยะของโรค และระดับคุณภาพชีวิตก่อนเริ่มรับการรักษา (baseline) จากนั้นแสดงข้อมูลเป็นร้อยละของผู้ป่วยที่คุณภาพชีวิตดีขึ้น (improved) ไม่เปลี่ยนแปลง (stable) และแย่ลง (declined) นั่นคือ คะแนน FACT-G เพิ่มขึ้นมากกว่าหรือเท่ากับ 6 คะแนน เปลี่ยนแปลงน้อยกว่า 6 คะแนน และลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 6 คะแนน โดยคำนวณจากการเปลี่ยนแปลงของคะแนน FACT-G 6 คะแนน ที่มีผลนัยทางคลินิก (clinically significant) (Eton, 2004) ร้อยละของกลุ่มผู้ป่วยในแต่ละผลลัพธ์คุณภาพชีวิต ที่เวลาต่างๆ เปรียบเทียบระหว่างเมลาโทนินและยาหลอก วิเคราะห์โดยใช้สถิติ Chi-square test