บทที่ 3
วิธีการวิจัย (Methodology)

วิธีดำเนินการวิจัยจำแนกออกเป็นแต่ละส่วนเพื่อความชัดเจนดังนี้

3.1 กลุ่มตัวอย่าง (Subjects)จำนวนทั้งสิ้น 80 คน โดยแยกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครที่ มีสุขภาพดีจำนวน 40 คน (ชาย = 20, หญิง = 20) โดยทราบจากข้อมูลส่วนตัวด้านสุขภาพ ประวัติการเจ็บป่วย และการตรวจร่างกาย อาสาสมัครได้เซ็นเพื่อยินยอมเข้าร่วมการวิจัยครั้งนี้ โดยใช้เกณฑ์ต่อไปนี้(Horowitz, 2008)

-เกณฑ์ที่อาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการ (inclusion criteria)

เป็นอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี อายุระหว่าง 20-40 ปี สัญญาณชีพปกติ (normal vital signs) ความดันโลหิตปกติ ผลการตรวจร่างกายปกติ (normal physical examination)

- เกณฑ์ที่ต้องคัดออกจากโครงการวิจัย (exclusion criteria)

การใช้ยา (drug use), พักฟื้นหลังการผ่าตัด (recent surgery) ตั้งครรภ์ (pregnancy) สูบบุหรี่ หรือดื่มสุรา การออกกำลังกายก่อนมาเจาะเลือดการติดเชื้อชนิดต่างๆ ทางเลือด (blood borne infection) เช่น ไวรัสตับอักเสบบี หรือซี เอดส์ ซิฟิลิส เป็นต้น

2) กลุ่มตัวอย่างเป็นอาสาสมัครที่ มีสุขภาพดี แต่มีภาวะความดันโลหิตสูงในระยะเริ่มแรก จำนวน 40 คน ใช้เกณฑ์เดียวกับกลุ่มอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี แต่มีภาวะความดันโลหิตสูงระยะเริ่มแรกโดยใช้การวัดความดันโลหิตขณะพัก 5 นาที (resting clinic blood pressure) 2 ครั้ง แล้วนำมาคิดค่าเฉลี่ยของความดันโลหิต โดย systolic blood pressure (SBP) มากกว่า 120 แต่น้อยกว่า 139 มิลลิเมตรปรอท (mmHg) และ/หรือ diastolic blood pressure (DBP) มากกว่า 80 แต่น้อยกว่า 89 มิลลิเมตรปรอท ตามเกณฑ์ของ Prehypertension; Joint National Comission 7 criteria (Chobanian et al., 2003)

ซึ่งโครงการวิจัยนี้ต้องผ่านความเห็นชอบจาก ผู้อำนวยการของโรงพยาบาล และคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ ของโรงพยาบาลกุดจับ (ภาคผนวก) โดยตัวอย่างต้องเขียนชื่อ สกุล AN HN ward อายุ เพศ ส่วนสูง น้ำหนัก วันเวลาที่เก็บ ติดกับภาชนะให้ชัดเจน พร้อมทั้งแจ้งรายละเอียดของสิ่งส่งตรวจนั้นๆในใบ request ให้ถูกต้องตรงกันด้วย

3.2 การเตรียมตัวอย่าง (Specimen collection and handling)

เจาะเลือดจากหลอดเลือดดำจำนวน6 ml หลังจากให้อาสาสมัครแต่ละคนอดอาหารเป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง นำเลือด 3 ml ใส่หลอดเก็บเลือดสำหรับ เตรียมซีรั่ม เพื่อวิเคราะห์ระดับ hs-CRP ในเลือด และระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterolและ HDL-cholesterol

3.3 วิธีการทดลอง (Methods)

ปั่นแยกซีรัม (3,000 rpm/5 min)นำซีรัมที่แยกได้นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ COBAS INTEGRA® 400 plus(Roche-diagnostics, Switzerland) (รูปที่ 3.1) การวัดระดับ hs-CRP โดยใช้หลักการimmunonephelometry หรือ turbidimetry โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ CRP จับกับ CRP ในซีรั่ม แล้วเกิดปฏิกิริยาเกาะกลุ่ม (agglutination) ทำให้สารละลายขุ่น ความขุ่นของสารละลายจะแปรผันตรงกับปริมาณ CRP ในตัวอย่างโดยเทียบกับตัวอย่างมาตรฐาน รายงานผลการวิเคราะห์ hs-CRP เป็น mg/l ส่วนการตรวจระดับไขมันในเลือดได้แก่ total cholesterol, triglyceride, LDL- cholesterolและ HDL-cholesterol โดยใช้หลักการ absorbance photometry ซึ่งคุณสมบัติและหลักการวิเคราะห์ของเครื่องอัตโนมัติ COBAS INTEGRA® 400 plusแสดงไว้ในภาคผนวก การ วิเคราะห์ดังกล่าวจะทำควบคู่ไปกับตัวอย่างควบคุมคุณภาพ (control materials) ในระดับต่ำ และสูง ขั้นตอนวิเคราะห์ทำตามวิธีการของบริษัทผู้ผลิต

รูปที่ 3.1 COBAS INTEGRA® 400 plus(Roche-diagnostics, Switzerland)

3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติใช้โปรแกรม SPSS computer program version 11.0 (SPSS, Chicago, IL) นำค่าของ hs-CRP และระดับไขมันในเลือดของ ตัวอย่างที่นำมาทดสอบ อายุ เพศ ดัชนีมวลกาย (body mass index, BMI) ความดันโลหิต แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย (means) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviations, SD) แสดงค่าสถิติเป็นเชิงพรรณนา ส่วนการเปรียบเทียบค่า hs-CRP ในเลือดระหว่างผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงระยะเริ่มแรก (prehypertension) กับผู้ที่ไม่มีภาวะความดันโลหิตสูงระยะเริ่มแรกและ การเปรียบเทียบค่า hs-CRP ในเลือดร่วมกับระดับไขมันในเลือด อายุ และดัชนีมวลกาย ระหว่างผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงระยะเริ่มแรก (prehypertension) กับผู้ที่ไม่มีภาวะความดันโลหิตสูงระยะเริ่มแรกนั้นวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติ student *t-test* ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มตัวอย่างใช้ $\alpha < 0.05$ (two-tailed) หรือ $p < 0.05$นอกจากนี้ทำ

การคำนวณค่า odd ratio และ relative risk โดยใช้กลุ่มตัวอย่างที่มีค่า hs-CRP $\geq$ 3 mg/l และกลุ่มตัวอย่างที่มีค่าhs-CRP< 3 mg/l เพื่อประเมินความเสี่ยงต่อภาวะ prehypertension