บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร/สัตว์ที่ศึกษา

แมวพันธุ์ผสม คละเพศ จำนวน 19 ตัว อายุ 1-3 ปี น้ำหนักประมาณ 2-4 กิโลกรัม แมวทุกตัวมีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ปราศจากความผิดปกติของระบบขับถ่ายปัสสาวะซึ่งผ่านการพิจารณาจากตรวจประเมินสภาพร่างกายทั่วไป ตรวจค่าเลือด ตรวจปัสสาวะ อัลตราซาวนด์ไตภาพถ่ายเอกซเรย์ช่องท้องและตรวจภาพรังสีของไตโดยการฉีดสีพิเศษเข้าสู่เส้นเลือดดำ (IVP) ทั้งนี้ได้ชี้แจงขั้นตอนการใช้ยา และได้รับความยินยอมจากเจ้าของสัตว์ พร้อมทั้งผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ให้เป็นไปตามจรรยาบรรณของ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แบ่งสัตว์ทดลองโดยเลือกตามลักษณะของ เพศ อายุ น้ำหนักตัว จำนวนเม็ดเลือดและค่าทางเคมีโลหิตออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6-7 ตัว ให้มีค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันโดยการสุ่ม

กลุ่มที่ 1: แมว 7 ตัว (กลุ่มทดลอง) ได้รับยากรดโทลเฟนามิก

กลุ่มที่ 2: แมว 6 ตัว (กลุ่มทดลอง) ได้รับยาวีดาโปรเฟน

กลุ่มที่ 3: แมว 6 ตัว (กลุ่มควบคุม) ไม่ได้รับยาใดๆ

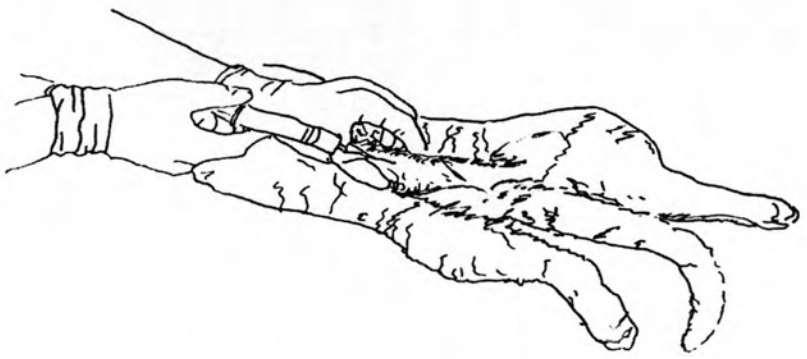
วิธีการศึกษา

1.การเตรียมตัวแมวก่อนเริ่มทำการศึกษา

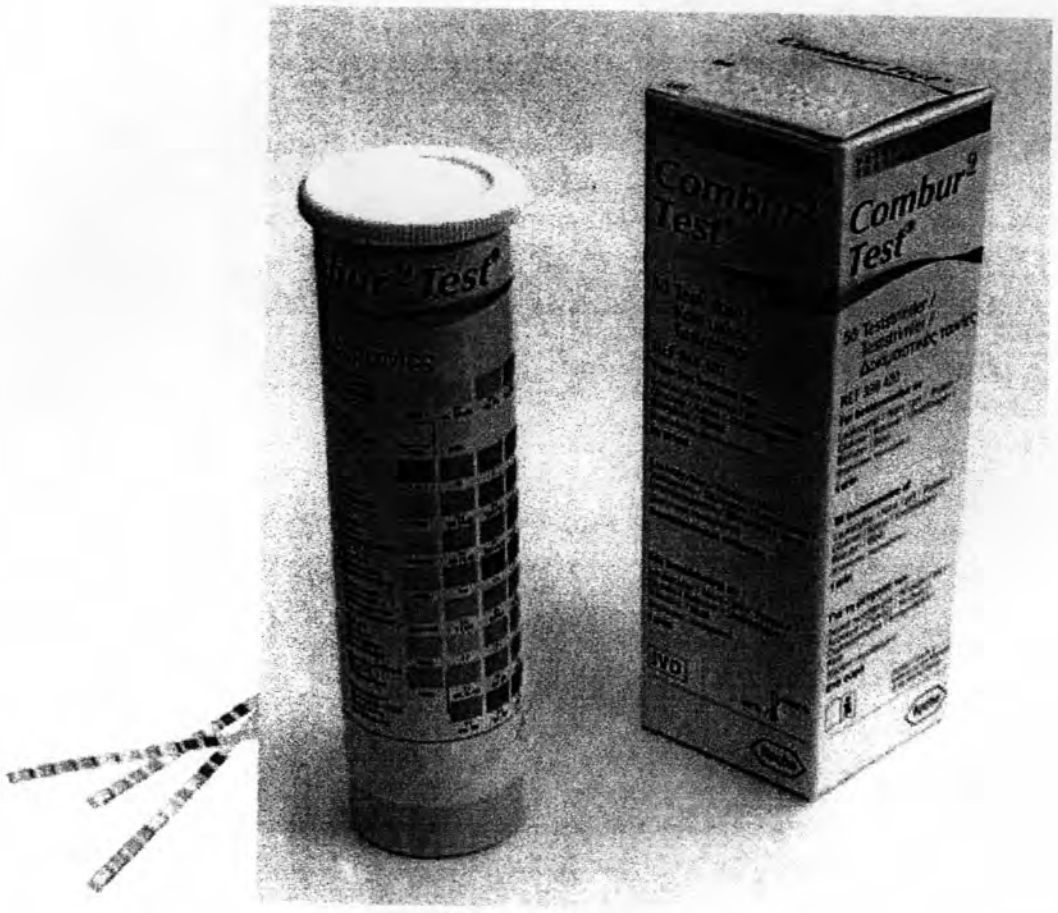
1.1 ตรวจประเมินสภาพร่างกายทั่วไป โดยทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักตัว วัดอุณหภูมิ สังเกตุสีเยื่อเมือก สีและลักษณะของอุจจาระ ปัสสาวะและการขับถ่าย พฤติกรรมการแสดงออกของสัตว์

1.2 เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจ complete blood count (CBC), serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total protein, BUN, creatinine และพยาธิในเลือด (blood parasites) ตัวอย่างทั้งหมดตรวจวิเคราะห์ที่โดยห้องปฏิบัติการหน่วยพยาธิ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวทยาลัย

1.3 เก็บตัวอย่างน้ำปัสสาวะเพื่อตรวจวิเคราะห์ (urinalysis) โดยการเก็บปัสสาวะผ่านทางผนังหน้าท้อง (cystocentesis) (ภาพที่ 9) ตรวจวินิจฉัยความถ่วงจำเพาะค่าความเป็นกรด-ด่าง โปรตีน กลูโคส คีโตน ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวในน้ำปัสสาวะโดยใช้ dipsticks test (ภาพที่ 10) ปั่นเหวี่ยงน้ำปัสสาวะด้วยความเร็ว 1000 – 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 – 5 นาทีและศึกษาตะกอนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง



ภาพที่ 9 แสดงเทคนิคการเก็บตัวอย่างน้ำปัสสาวะผ่านทางผนังช่องท้อง



ภาพที่ 10 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจตัวอย่างน้ำปัสสาวะ

1.4 ทำการถ่ายภาพเอกซเรย์บริเวณช่องท้องในท่านอนตะแคงขวา/นอนหงายร่วมกับการทำ IVP โดยฉีด iohexol ซึ่งเป็นสารประกอบ iodine ทึบรังสีเข้าทางหลอดเลือดดำ และทำการตรวจด้วยเครื่อง fluoroscope เพื่อดูลักษณะทางโครงสร้างและขนาดของไต

1.5 ตรวจอัลตราซาวด์ (Ultrasound) หาความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ ภายในช่องท้องโดยเฉพาะอย่างยิ่งตรวจหานิ่วในเนื้อไต และท่อกรวยไต ตรวจหาเนื้องอกและซิสต์ของไต วัดขนาดไต หาความผิดปกติของไตที่อาจเกิดขึ้นแต่กำเนิด

ทั้งหมดนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าแมวมีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรงดี ปราศจากโรคทางระบบต่างๆ โดยเฉพาะความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบการทำงานของไต ก่อนเริ่มทำการทดลอง

2. การให้ยาระงับปวด บรรเทาอักเสบ กลุ่มที่ไม่ใช่สเตียรอยด์

2.1 กรดโทลเฟนามิก* ชนิดเม็ดสำหรับกิน: ยา A

2.2 วีดาโพรเฟน† ชนิดเจลสำหรับกิน: ยา B

โดย

กลุ่มที่ 1: ได้รับยา A วันละ 1 ครั้ง พร้อมอาหารมื้อเช้าในขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ติดต่อกันนาน 14 วัน (ภาพที่ 11)

กลุ่มที่ 2: ได้รับยา B วันละ 1 ครั้ง พร้อมอาหารมื้อเช้าในขนาด 4 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ติดต่อกันนาน 14 วัน (ภาพที่ 12)

กลุ่มที่ 3: กลุ่มควบคุม ได้รับการป้อนยาหลอกคือ อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 1 ครั้ง วันละ 1 ครั้ง

ภาพที่ 11 แสดงรูปแบบของยาที่ใช้ในการทดลอง : ยา A (ชนิดเม็ด)

ภาพที่ 12 แสดงรูปแบบของยาที่ใช้ในการทดลอง : ยา B (ชนิดเจล)

---

* Tolfedine®, Vétoquinol Ltd., France

† Quadrisol®, Intervet International BV., Netherlands

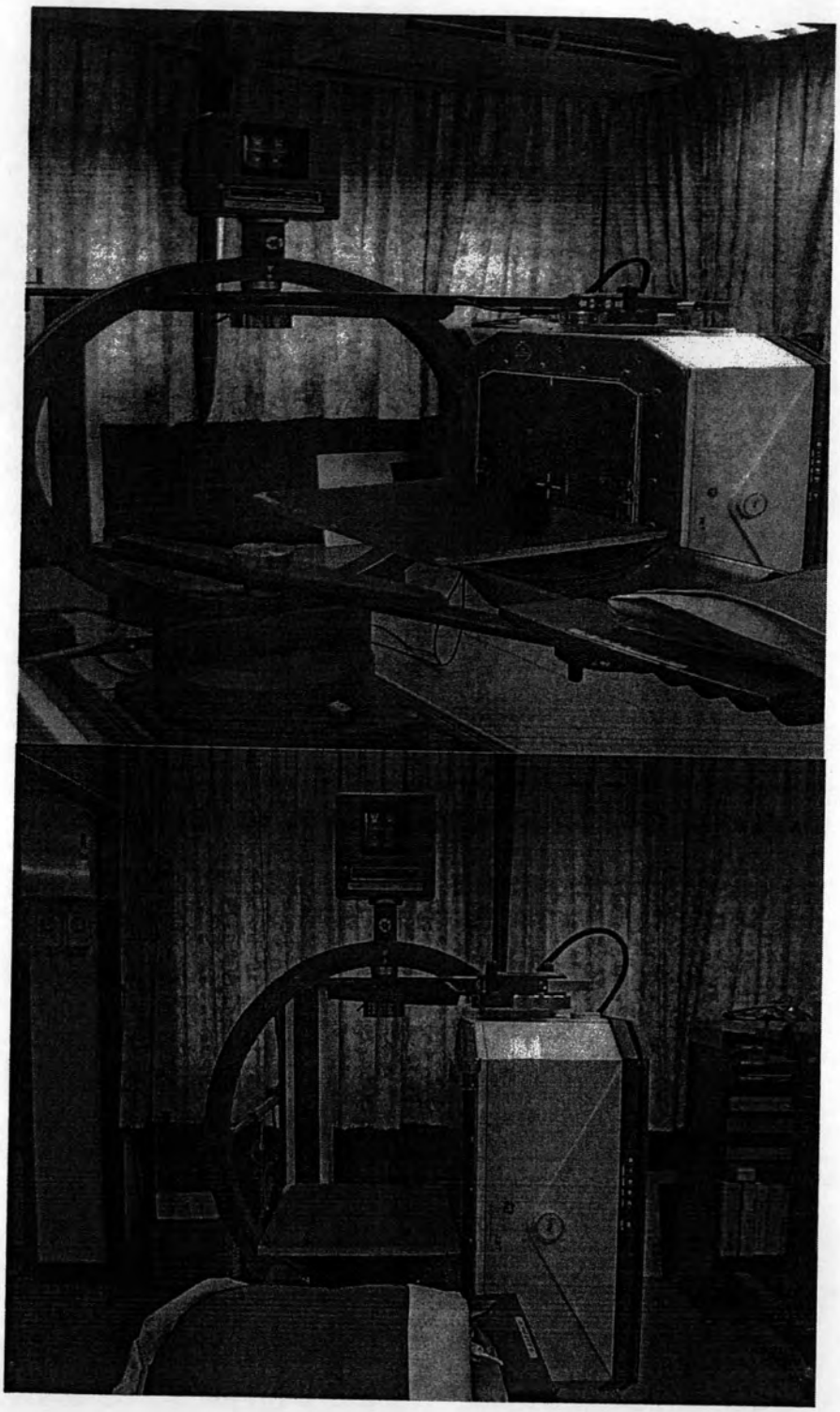
3. การตรวจโลหิตวิทยาและค่าเคมีโลหิต แมวทุกตัวในทุกกลุ่มจะได้รับการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจ CBC, total protein, SGPT, ALP, BUN และ creatinine ภายหลังจากการได้รับยาเป็นเวลา 4, 10 และ14 วันและหลังจากหยุดยาไปแล้ว 30 วัน

4. การสังเกตและบันทึกความผิดปกติอื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นทุกวัน วันละครั้ง ตลอดการทดลองในแมวทุกตัว ได้แก่ พฤติกรรม สีเยื่อเมือก capillary refill time (CRT) หรือระยะเวลาในการคืนกลับของเลือดที่เหงือก ความอยากอาหาร อุณหภูมิร่างกาย การขับถ่ายอุจจาระปัสสาวะ รวมถึงสีและการมีตะกอนเลือดปน

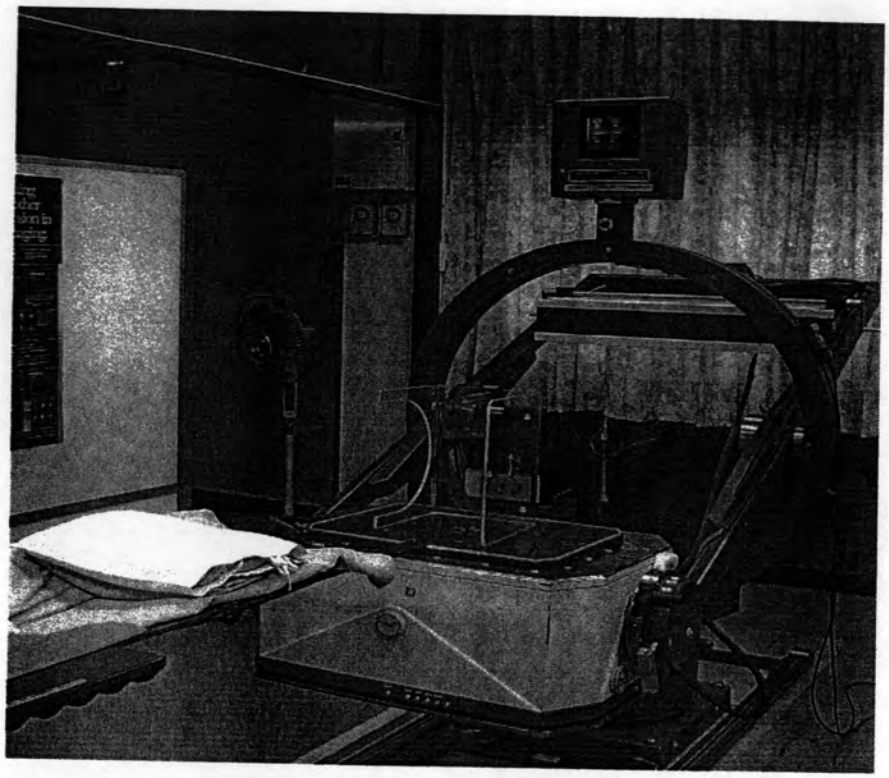
5. การประเมินค่าการทำงานของไตด้วยวิธี scintigraphy โดยจะประเมินค่าการทำงานของไตก่อนเริ่มให้ยา (วันที่ 0 ของการทดลอง) และทำการประเมินซ้ำอีกหลังจากให้ยา 4 วัน 10 วัน และ 14 วัน รวมทั้ง 30 วันหลังจากหยุดให้ยา (วันที่ 45 ของการทดลอง) ในการตรวจประเมินค่าการทำงานของไตด้วยวิธี scintigraphy แมวต้องมีการเคลื่อนไหวให้น้อยที่สุด เป็นเวลาอย่างน้อย 6 นาที (Newell et al., 1997) จึงจำเป็นจะต้องได้รับยาเพื่อสงบประสาทก่อนจะทำการตรวจวัด โดยในการทดลองนี้เลือกใช้ ยาดมสลบ isoflurane* ซึ่งโดยปกติมีค่า minimal alveolar concentration ในแมวเท่ากับ 1.2% และยาเริ่มออกฤทธิ์หลังจากให้ยาแบบ induction และมีฤทธิ์สงบประสาทได้นานขึ้นกับระยะเวลาและระดับความเข้มข้นของยาที่ให้ ยา isoflurane จะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วผ่านทาง alveoli และขับทิ้งออกทางลมหายใจออก มีเปอร์เซ็นต์ของยาที่น้อยมากที่จะผ่านกระแสเลือดไปเมตาบอไลต์ที่ตับ (Plumb, 2002) โดยแมวที่อยู่ภายใต้ฤทธิ์ของยาดมสลบโดยผ่านทางหน้ากากดมสลบนั้น จะถูกจับให้นอนตะแคงด้านขวาลง และจะได้รับการฉีดสารกัมมันตภาพรังสี ^{99m}Tc-DTPA ขนาดประมาณ 74-111 MBq เข้าทางหลอดเลือดดำแบบ bolus โดยผ่านทาง 3 way และ intravenous catheter (Kerl and Cook, 2005) หลังจากฉีดสารเภสัชรังสีแล้วจะมีการให้สารน้ำ isotonic normal saline ผ่านทาง 3 way และ extension tube ปริมาณ 5 มิลลิลิตรเพื่อไล่สารเภสัชรังสีที่ค้างอยู่ในสาย extension tubeให้หมด (ภาพที่ 13-16) และทำการถ่ายภาพทันทีด้วยกล้อง gamma camera ซึ่งอยู่ในทิศ dorsal view ของตัวสัตว์ให้ได้ภาพเคลื่อนไหวต่อเนื่อง (dynamic images) โดยถ่ายทุก 1 วินาที เป็นเวลาทั้งสิ้น 8 นาที

---

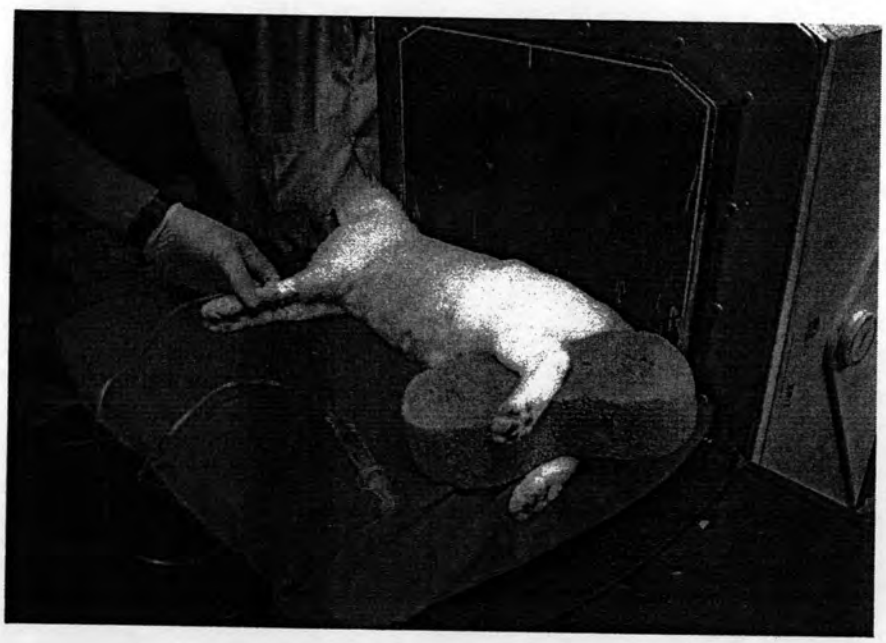
* Terrell ™, Minrad INC., USA



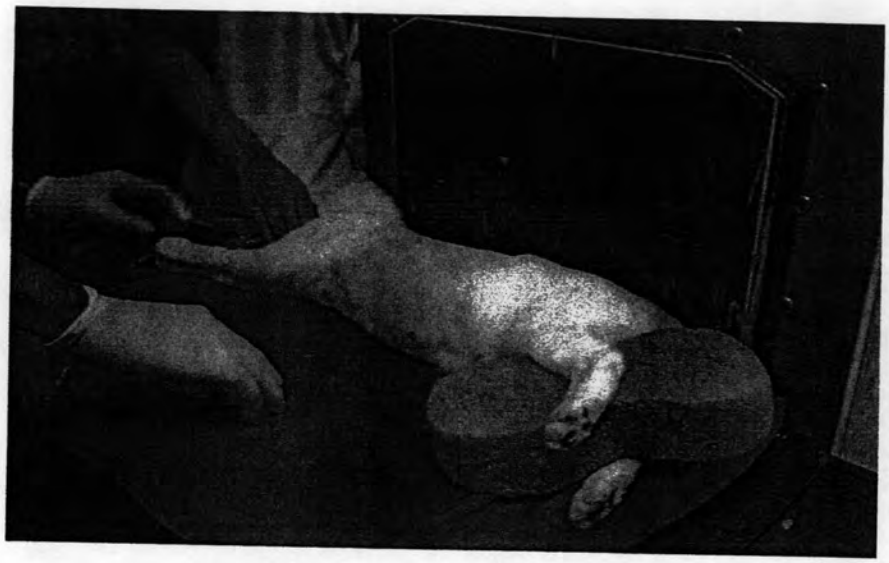
ภาพที่ 13 แสดงกล้องถ่ายภาพรังสีแกมม่า



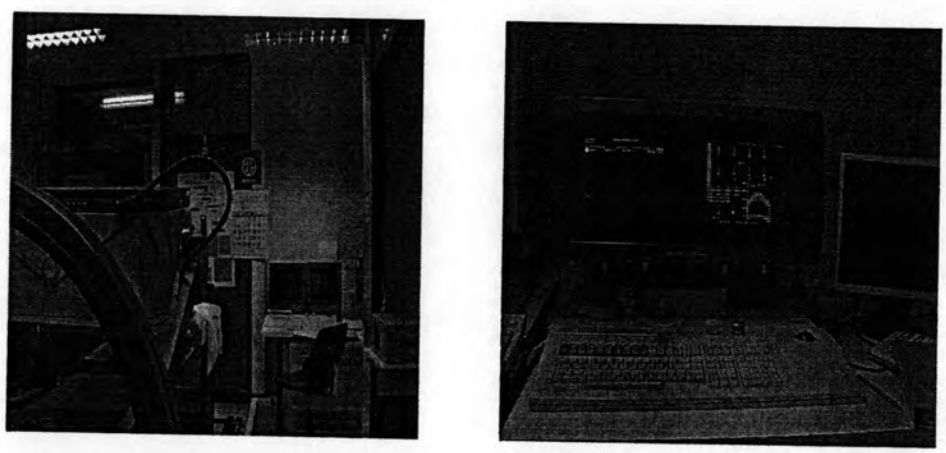
ภาพที่ 14 แสดงการวัด pre-injection count



ภาพที่ 15 แสดงขั้นตอนก่อนการฉีดสารเภสัชรังสีในสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 16 แสดงขั้นตอนขณะฉีดสารเภสัชรังสีในสัตว์ทดลอง



ภาพที่ 17 แสดงอุปกรณ์คอมพิวเตอร์ที่ใช้ในขั้นตอนการทำ renal scintigraphy

สารเภสัชรังสี ^{99m}Tc-DTPA[*] ขนาดประมาณ 74 MBq ที่เตรียมไว้สำหรับศึกษาครั้งนี้จะบรรจุอยู่ในกระบอกฉีดยาที่ห่อหุ้มด้วยปลอกป้องกันรังสีทำจากตะกั่ว และจำเป็นจะต้องทำการถ่ายภาพกระบอกฉีดยา ก่อนฉีดให้แก่สัตว์ทดลอง (pre-injection count) (ภาพที่ 14) โดยวางห่างจากกล้องเป็นระยะ 26 เซนติเมตร และจะถ่ายภาพกระบอกฉีดยา รวมทั้ง intravenous

---

[*] งานเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ประเทศไทย

catheter, extension tube หลังฉีดอีกครั้งหนึ่ง (post-injection count) ให้ได้ภาพแบบ static เป็นเวลาประมาณ 2 นาที (โดยกระทำทันทีหลังจากถ่ายภาพครบ 8 นาทีแล้ว) เพื่อใช้ในการคำนวณปริมาณสารเภสัชรังสีที่ฉีดเข้าไปจริงๆ

เมื่อฉีดสาร ^{99m}Tc-DTPA เข้าสู่หลอดเลือดดำของสัตว์ทดลองแล้วสาร ^{99m}Tc-DTPA จะไหลเวียนไปตามระบบไหลเวียนโลหิตของสัตว์ทดลองเข้าสู่ไตโดยทางเส้นเลือดที่ไปเลี้ยงไต และถูกกรองผ่านทาง glomerular filtration เข้าสู่หน่วยไต ซึ่งจะสามารถถ่ายภาพสารเภสัชรังสีได้ชัดเจนที่ไตทั้ง 2 ข้างภายหลังการฉีด 1-3 นาที (ศิริอนงค์, 2005) และในช่วงท้ายจะพบภาพของสารเภสัชรังสีได้ที่บริเวณกระเพาะปัสสาวะ

การถ่ายภาพทั้งหมดด้วย gamma camera จะถูกเก็บไว้ในเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยข้อมูลจะแบ่งเป็น 3 แฟ้มข้อมูลคือ

5.1 ภาพถ่ายตัวสัตว์ทดลองหลังจากฉีดสารเภสัชรังสีทันที 480 ภาพ

5.2 ภาพถ่าย pre-injection count

5.3 ภาพถ่าย post-injection count

การวิเคราะห์ข้อมูลทำได้โดยผู้วิจัยวาดเส้นรอบขอบเขตพื้นที่บริเวณที่สนใจนั่นคือบริเวณรอบไตทั้ง 2 ข้าง (Region of Interested (ROI)) และบริเวณด้านล่างของไตข้างขวา (background) ซึ่งจะนำมาใช้ในการคำนวณเพื่อหักลบพื้นหลังของเนื้อเยื่ออ่อนเพื่อหาค่า activity ของสารเภสัชรังสีที่ไปที่ไตเท่านั้น จากนั้นเครื่องคอมพิวเตอร์จะสร้าง renogram curve ซึ่งเป็นกราฟข้อมูลระหว่าง radioactivity ของสารเภสัชรังสีที่อยู่ในไต กับระยะเวลาที่ผ่านไป ในบางครั้งจึงเรียกว่า renal time-activity curve โดยข้อมูล radioactivity ของสารเภสัชรังสีที่อยู่ในไต แต่ละข้างคำนวณได้ดังสูตร

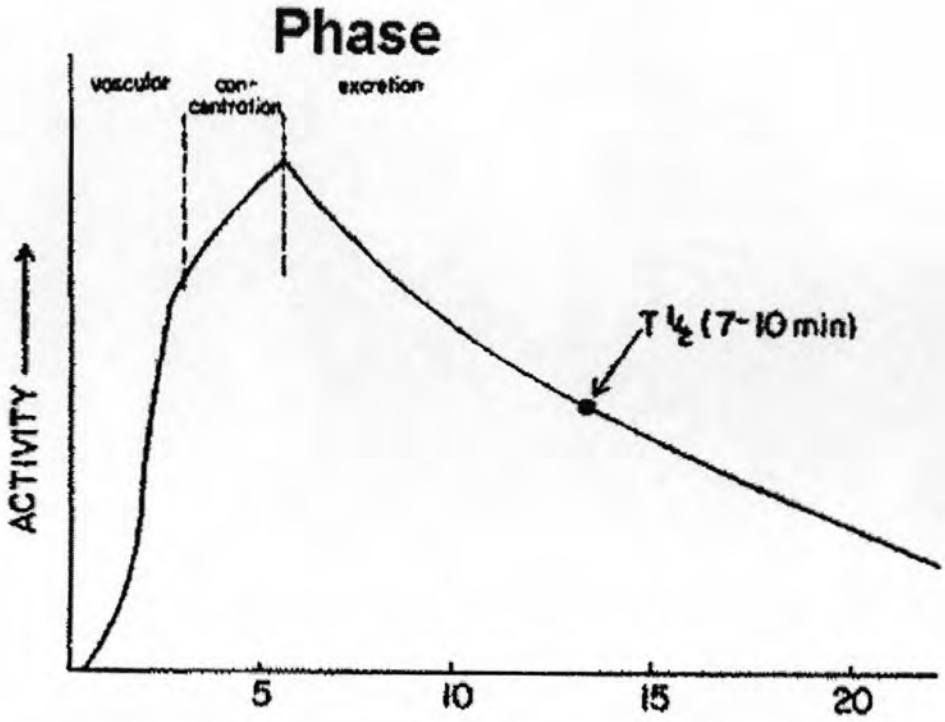
Net kidney cts=(kidney cts)−[(background cts/# background pixels)×(# kidney pixels)]

โดยทั่วไปแล้วในคนปกติ renogram curve จะแบ่งออกเป็น 3 phases (ภาพที่18)

1. Vascular phase เป็นระยะแรกที่จะมี initial rise in activity ซึ่งแสดงถึงปริมาณเลือด ที่มาเลี้ยงไตแต่ละข้าง vascular phase นี้จะมีระยะเวลาที่สั้นมาก ประมาณ 30 วินาที

2. Parenchymal phase หรือ Accumulation phase ในระยะนี้จะเห็นว่ามี radioactivity ในไตค่อย ๆ เพิ่มขึ้นเป็น slope จนกระทั่งถึง peak หรือจุดที่มี maximal renal activity ระยะเวลาที่ radioactivity มาถึงไต จนกระทั่งถึง peak เรียกว่า transit time หรือ Tmax ซึ่งจะกินเวลานานประมาณ 3-5 นาที Tmax นี้จะขึ้นอยู่กับหลาย factors เช่น urine flow rate perfusion, mechanical obstruction เป็นต้น

3. Excretory phase หรือ Washout phase ในระยะนี้จะเห็นว่า radioactivity ในไตจะลดลงอย่างรวดเร็ว โดยสารเภสัชรังสีจะถูกขับออกจากไตเข้าสู่ collecting system ท่อไตและกระเพาะปัสสาวะ ภาวะหรือโรคต่างๆ ที่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของ excretory function ของไต จะมีผลต่อ phase นี้ทั้งนั้นเมื่อนำข้อมูลในชุดที่ 2 และ3 มาร่วมกันคำนวณในสูตร Percent renal uptake (ID)= net kidney cts/[(preinjection cts)−(postinjection cts)] ×100 ซึ่งจะได้ค่าร้อยละของ ^{99m}Tc-DTPA ที่เข้าสู่ไตทั้ง 2 ข้างโดยไม่จำเป็นต้องมีการคิด depth correction เช่น ในสุนัขและคน เนื่องจากแมวมีไตทั้ง 2 ข้างอยู่ในระดับเดียวกัน และมีความหนาของเนื้อเยื่ออ่อนเมื่อวัดจากส้นหลังถึงไตค่อนข้างบาง จึงอาจไม่แตกต่างกันมากในแมวแต่ละตัว (Uribe et al., 1992) หลังจากนั้นค่าร้อยละของ ^{99m}Tc-DTPA ที่เข้าสู่ไตทั้ง 2 ข้างก็จะนำไปสู่การประเมินค่าการทำงานของไตต่อไป ทั้งนี้ net kidney cts ที่ใช้ในการคำนวณนั้นได้จาก net kidney cts ในช่วง 3 นาทีของ parenchymal phase



ภาพที่ 18 แสดง renogram curve **ในคนปกติที่ได้จากการฉีดสารเภสัชรังสี** ^{99m}Tc-EDTA (ศิริอนงค์, 2005)

หมายเหตุ: เมื่อใดที่พบว่าค่าการทำงานของไต มีค่าลดลงมากกว่าหรือเท่ากับ 50% เมื่อเทียบกับวันที่ 0 ของการทดลอง ซึ่งเป็นการบ่งบอกว่าไตของสัตว์ทดลองอาจเกิดปัญหาเนื่องจากยาที่ได้รับ ผู้วิจัยจะทำการคัดสัตว์ทดลองที่เกิดปัญหาเหล่านั้นออกจากการทดลองทันที และหากพบความผิดปกติของค่าการทำงานของไตที่ประเมินได้ของภายหลังจากป้อนยาครบ 14 วัน (วันที่ 15 ของการทดลอง) ก็จะทำการตรวจและประเมินค่าต่างๆ ซ้ำอีกครั้งในวันที่ 30 ของการทดลอง และจะทำการรักษาเพื่อให้ไตกลับสู่สภาพปกติต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

ประเมินและวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ รวมถึงค่าการทำงานของไต โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean±SD) ที่วัดได้จากแมวภายในกลุ่มเดียวกันแต่ละช่วงเวลา ตั้งแต่ก่อนให้ยาจนเสร็จสิ้นการทดลอง ด้วยวิธี Repeated measures ANOVA และเปรียบเทียบค่าต่างๆ ดังที่กล่าวมาระหว่างกลุ่มที่ให้ยา A, B และกลุ่มควบคุม ในแต่ละช่วงเวลา ด้วยวิธี unpaired *t*-test