บทที่ 3

ระเบียบวิธีการวิจัย

ก. ประชากรตัวอย่าง (Population sampled)

1. เลือกหนูพันธุ์ Sprague - dawley เพศเมีย ขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 200-250 กรัมอายุตั้งแต่ 8-9 สัปดาห์ ซึ่งผสมพันธุ์จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล

2. ทำให้เกิดโรคเบาหวาน โดยการฉีด Streptozotocin ขนาด 60 มก. ต่อ กก. ของน้ำหนักตัว เข้าภายในเยื่อบุช่องท้อง (intraperitoneum)

วิธีการเตรียม Streptozotocin

2.1 ใช้น้ำยา Citrate buffer เป็นตัวทำละลาย ซึ่งเตรียมโดยการผสมตามน้ำหนักดังนี้

สำหรับ buffer จำนวน 1 ลิตร

Sodium citrate	29.4	กรัม
Citric acid	21	กรัม
ddH_2O	800	มล.

ปรับ pH ให้ได้ 4.5 แล้ว นำไป ข้า autoclave

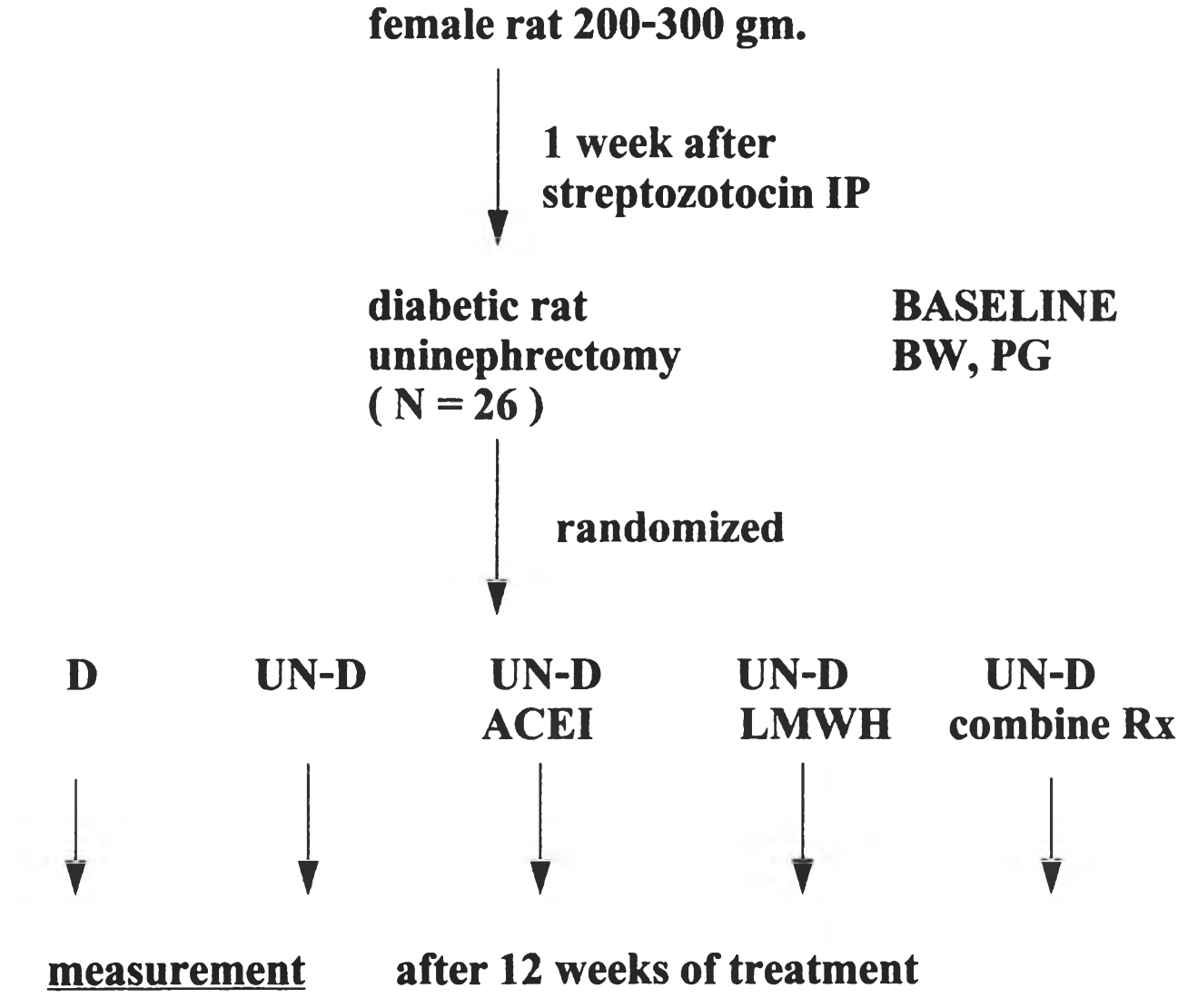
2.2 ผสม Citrate buffer เข้ากับ Streptozotocin ให้ได้ความเข้มข้น 60 มก./มล. และดังนั้น ขนาดยาที่ใช้จึงควรเป็น 0.1 มล./100 กรัมของน้ำหนักตัว

2.3 ฉีดยาเข้าเยื่อบุช่องท้องอย่างระมัดระวัง

3. คัดเลือกเฉพาะหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากฉีดยาไปได้ 1 สัปดาห์ โดยดูจากการตรวจ Capillary blood glucose ที่ปลายหางกำหนดให้ค่า Capillary blood glucose > 300 มก/ดล. (พบว่ามากกว่าร้อยละ 90 ของหนูที่ได้รับการฉีดยา จะกลายเป็นเบาหวาน)

4. แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว โดยการสุ่มตัวอย่าง (random sampling) แต่กำหนดให้มีระดับน้ำตาลในเลือดใกล้เคียงกันในแต่ละกลุ่ม (ดูรูปที่ 3.1)

รูปที่ 3.1 สรุประเบียบวิธีวิจัย



วิธีการทำ Unilateral Nephrectomy ในหนูกลุ่มที่ 2-5

หลังจากทำให้หนูเป็นเบาหวาน 1 สัปดาห์ จึงเริ่มทำการตัดไตข้างซ้ายออกโดย

4.1 ทำให้สลบด้วยการฉีด Pentobarbital (Nembutal^{R}) ผสมกับ Ketamine hydrochloride (Ketalar^{R}) เข้าเยื่อบุช่องท้องในอัตราส่วน 1:2.5 ปรับยาตามน้ำหนักตัวดังนี้

น้ำหนักตัว (กรัม)	ปริมาณยา (ที่ผสมเรียบร้อยแล้ว)(มล.)
< 200	0.25-0.3
> 200	0.3-0.35

หลังจากนั้น อาจเพิ่มเติมได้ 0.04-0.06 มล.

4.2 ทำการผ่าตัด mid-line incision ทางด้านหน้าท้อง

4.3 ผ่านเข้าสู่ retroperitoneum ด้านซ้ายจนสามารถแสดงไตซ้ายได้ชัดเจน

4.4 ปอก renal capsule โดย blunt dissection

4.5 หนีบหลอดเลือดเลี้ยงไต (renal blood vessels)แล้วจึงผูกและตัดหลอดเลือด

4.6 ทำการยกไตข้างซ้ายออก แล้วตรวจดูจุดเลือดออก

4.7 ปิดหน้าท้อง โดยการเย็บด้วยไหมดำ ขนาด 2-0 ทุกชั้น

ข. จำนวนตัวอย่าง (sample size)

กำหนดให้กลุ่มละ 6 ตัว เนื่องจากในหนูเบาหวานที่เคยมีการศึกษาผลของยา LMWH ใช้กลุ่มละ 6 ตัว และพบว่าได้ผลมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค. Intervention

แบ่งกลุ่มของหนูตามชนิดของการรักษาดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม หมายถึง Streptozotocin diabetic rat

กลุ่มที่ 2

กลุ่มหนูเบาหวานที่ถูกตัดไต 1ข้าง(Uninephrectomized diabetic rat :UN-D)

กลุ่มที่ 3 UN-D rat ซึ่งได้ ACEI (Inhibace^{R}) 5 มก/คล ในน้ำดื่มตลอดการศึกษา

กลุ่มที่ 4 UN-D rat ซึ่งได้ LMWH (Fraxiparine^{R}) 0.1 มล. (1,000 antiXa หรือ 10 มก.) โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous) วันเว้นวัน

กลุ่มที่ 5 UN-D rat ได้ ACEI 5 มก/คล. ในน้ำดื่มร่วมกับ LMWH 0.1 มล. ฉีดใต้ผิวหนัง วันเว้นวัน

หนูทุกกลุ่มจะได้รับอาหารตามปกติ ตลอดการศึกษา

นอกจากนี้หนูทุกตัวจะได้รับอินสุลินชนิดออกฤทธิ์ยาว (Long-acting insulin : Ultratard) ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในขนาด 4 unit วันเว้นวัน เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในเกณฑ์เหมาะสม

ง. วิธีการวัดผล (outcome measurement)

1. เก็บข้อมูลเบื้องต้น (baseline data) โดยการชั่งน้ำหนัก และเจาะเลือดเพื่อหาค่าระดับน้ำตาลในเลือด

2. ปลายสัปดาห์ที่ 12 ของการศึกษา จะทำการเก็บตัวอย่างเลือดและปัสสาวะตลอด 24 ชั่วโมง เพื่อหาค่าต่าง ๆ ดังนี้

2.1 Creatinine, glucose, HbA1c ในเลือด และ creatinine clearance

2.2 ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ (urine albumin excretion rate : UAE)

3. การผ่าศพเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อไต

3.1 ฉีด Lethal dose ของ Pentobarbital เข้าเยื่อบุช่องท้อง ประมาณ 0.5-0.7 มล.

3.2 เปิดหน้าท้อง midline incision

3 หนีบหลอดเลือดเลี้ยงไต (renal vessels) แล้วตัดไตด้านขวาออกอย่างเร็ว ตัดแบ่งไตตามแนวขวาง (cross-section)

3.5 ตัดแบ่งส่วน renal cortex เป็นขนาด 1*1*1 มม. แช่ใน 2.5 % glutaraldehyde สำหรับส่งตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

3.6เมื่อนำไตออกจากช่องท้องแล้วจึงทำการดูดเลือดจากหัวใจ(Right heart chamber) แล้วนำไปปั่นแยกพลาสมาเพื่อหาค่าของ Creatinine ในเลือด

4. การวัดความหนาของ glomerular basement membrane

หลังจากกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อไตเพื่อการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศนิอิเลคตรอนเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงทำการถ่ายภาพโกลเมอรูลัสโดยมีหลักเกณฑ์ดังนี้

4.1 เลือกสุ่ม (random) จากชิ้นเนื้อไต โดยเลือกถ่ายภาพ Capillary loop ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง อยู่ระหว่าง 5-8 ไมโครเมตร จำนวน 4 วง

4.2 เลือกจุดที่จะวัดความหนาของ GBM โดยวิธีประยุกต์ Orthogonal intercept method[43]

4.3 วางตารางที่มีเส้นแบ่งแนวตั้ง และแนวนอน ทาบบนภาพถ่ายของ Capillary loop ดังภาพที่ 3.2

4.4 เลือกวัดความหนาของ GBM ณ จุดตัดของเส้นตารางกับ GBM โดยวัดตั้งฉากกับ endothelium ขึ้นไปจนถึงขอบด้าน podocyte

4.5 ค่าเฉลี่ยของจำนวนจุดที่ถูกวัด = 30+/-5 (mean+/-SD) ต่อ1 capillary loop

4.6 หาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้ทั้งหมด

5. การตรวจทางชีวเคมี

Creatinine โดยวิธี creatininase , glucose โดยเครื่อง glucometer, HbA1c โดย Boehringer Mannheim Gmbh kit

การตรวจปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ โดยวิธี radial immunodiffusion[44]
ใช้ antiserum ต่ออัลบูมินของหนู rat (ดูในภาคผนวก)

หมายเหตุ การวัดความหนาของ GBM , ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะ รวมทั้ง HbA1c จะทำโดยผู้วัดไม่ทราบว่าตัวอย่างใดเป็นของกลุ่มใด (Blind observer)

จ.การรวบรวมข้อมูล (Data collection)

ข้อมูลที่สำคัญประกอบด้วย

1 การตรวจเลือด

ข้อมูลการตรวจเลือดโดยผู้ตรวจซึ่งไม่ทราบกลุ่มของหนู (blind observer) ประกอบด้วย Creatinine, glucose และ HbA1 C โดยวิธีมาตรฐาน

2 การตรวจปัสสาวะ

ข้อมูลประกอบด้วยอัลบูมินในปัสสาวะและ creatinine clearance โดย blind observer

3 การตรวจทางพยาธิวิทยา

ข้อมูลจากการวัดความหนาของ glomerular basement membrane ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนโดย blind observer

ฉ.การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

<u>การสรุปข้อมูล</u>

ตัวแปรที่ได้ประกอบด้วย น้ำหนักตัว (กรัม) , ระดับน้ำตาล (มก %) HbA1c (%) GFR มล/นาที/นน.ตัว

อัลบูมินในปัสสาวะ (มก./วัน) , ปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะต่อหนึ่งหน่วยไต (urine albumin excretion rate per glomerular filtration rate : UAE/GFR)

ความหนาของ glomerular basement membrane (นาโนเมตร) รายงานเป็นค่าเฉลี่ย และ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

<u>การนำเสนอข้อมูล</u>

ตารางเปรียบเทียบและ แผนภูมิรูปแท่ง

<u>การทดสอบสมมุติฐาน</u>

โดยใช้ analysis of variance (ANOVA)

ช.ข้อจำกัดในการวิจัย และแนวทางแก้ไข

1.ความรุนแรงของโรค (Disease severity)

เมื่อสิ้นสุดการศึกษา จะทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือด (random plasma glucose) และ HbA1c เพื่อเปรียบเทียบความรุนแรงของโรค โดยพบว่าพยาธิสภาพของไตจะมีความสัมพันธ์กับระดับน้ำตาลในเลือดและ HbA1c

เนื่องจากหนูทดลอง ได้ถูกแบ่งกลุ่มโดยวิธีสุ่มตัวอย่าง (randomization) ตามระดับน้ำตาลในเลือด ตั้งแต่เริ่มต้นทำการศึกษา หลังจากนั้นจะควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ใน

เกณฑ์พอเหมาะ (ประมาณ 300-500 มก/คล.) โดยให้อินสุลิน (long-acting insulin ; Ultratard) ฉีดให้ผิวหนังวันเว้นวัน ดังนั้นจึงไม่สามารถควบคุมให้ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือดและ HbA1c เมื่อจบการศึกษา ให้เท่ากันในแต่ละกลุ่มได้

2. ผลของการให้อินสุลิน (Co-intervention)

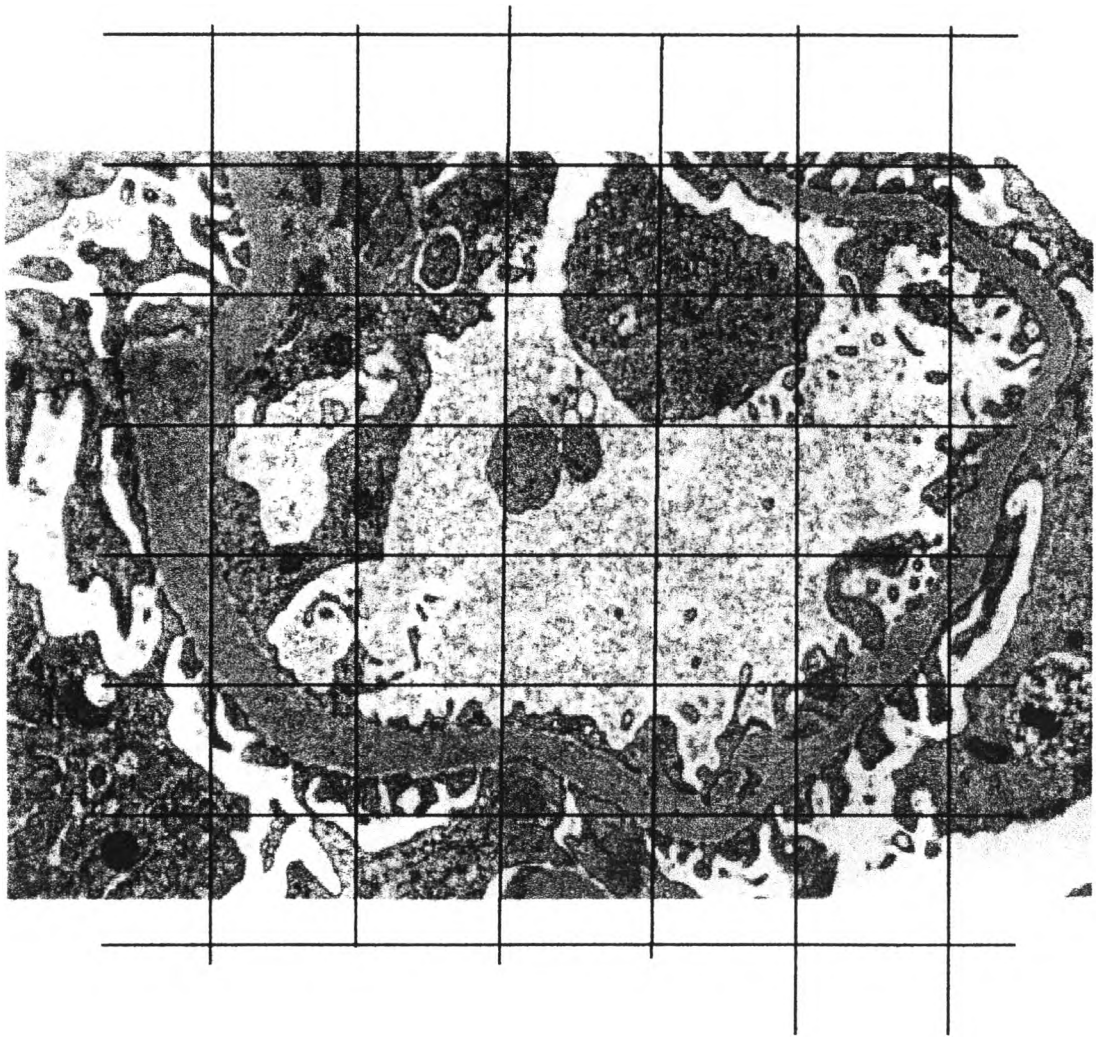
การศึกษาผลของอินสุลินต่อพยาธิสภาพในไตพบว่า มีผลยับยั้งการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพได้เช่นเดียวกัน (ดูรายละเอียดในบทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ไม่ได้ควบคุมระดับน้ำตาลจนอยู่ในเกณฑ์ปกติ จึงไม่สามารถยับยั้งพยาธิสภาพในไตได้ทั้งหมด นอกจากนี้ในหนูทั้ง 5 กลุ่มที่ทำการศึกษา ก็ได้รับอินสุลินฉีดในขนาดที่เท่ากันทั้งหมด จึงไม่ควรจะมีผลต่อการวัดผลมากนัก

3. โรคที่เกิดร่วมและภาวะแทรกซ้อน

หนูที่เป็นเบาหวานจะมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง จึงมีโอกาสเกิดโรคติดเชื้อได้ง่าย เช่นติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ,ติดเชื้อในช่องท้องภายหลังการผ่าตัดและติดเชื้อที่ผิวหนังจากการฉีดยา

การศึกษานี้มีหนูจำนวนหนึ่งต้องเสียชีวิตไปก่อนจบการศึกษา ซึ่งส่วนใหญ่น่าจะมีสาเหตุจากการติดเชื้อ รองลงมาเกิดจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงมาก อย่างไรก็ตามไม่พบว่าการติดเชื้อในที่ต่างๆจะมีผลต่อพยาธิสภาพในโกลเมอรูลัสรวมถึงไม่มีผลต่อความหนาของ GBM. ด้วย

I19207561X



รูปที่ 3.2 แสดงวิธีการวัดความหนาของ GBM โดยประยุกต์ orthogonal intercept method เลือกวัดตรงตำแหน่งที่เป็นจุดตัดของเส้นกับ GBM.