

การศึกษาย้อนหลังทางพยาธิวิทยา และการศึกษาทางคลินิกของความเป็นพิษของ
ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 1 ในสุนัข



นางสาวอัจฉราวรรณ ไลหะวณิชย์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

RETROSPECTIVE OF PATHOLOGY AND CLINICAL STUDIES OF FIRST GENERATION
ANTICOAGULANT RODENTICIDE INTOXICATION IN DOGS



Miss Acharawan Lohavanijaya

คุณย์วิทย์ทรัพย์ภากร
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Department of Veterinary Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การศึกษาย้อนหลังทางพยาธิวิทยา และการศึกษาทาง
คลินิกของความเป็นพิษของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัว
ของเลือดรุ่นที่ 1 ในสุนัข (Retrospective of pathology and
clinical studies of first generation anticoagulant
rodenticide intoxication in dogs)

โดย

นางสาวอัจฉราวรรณ โลหะวณิชย์

สาขาวิชา

เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

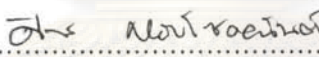
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต


..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.มงคล เตชะกำพูน)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิรินทร หีบโชคอนันต์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.วรา พานิชเกรียงไกร)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.กาญจนา อิมศิลป)

อัจฉราวรรณ โลหะวณิชย์: การศึกษาย้อนหลังทางพยาธิวิทยา และการศึกษาทางคลินิก
ของความเป็นพิษของยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 1 ในสุนัข

(RETROSPECTIVE OF PATHOLOGY AND CLINICAL STUDIES OF FIRST
GENERATION ANTICOAGULANT RODENTICIDE INTOXICATION IN DOGS)

อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ภญ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ร่วม : อ.นสพ.ดร.ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์, 76 หน้า.

ยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมารินเป็นสาเหตุของความเป็นพิษที่พบบ่อยที่สุดชนิดหนึ่งในสัตว์
เลี้ยง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมารินใน
สุนัข โดยการใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ร่วมกับ fluorescence
detector เพื่อตรวจหายาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากพลาสมา และเปรียบเทียบกับ
ค่าการแข็งตัวของเลือด activated partial thromboplastin time (APTT), One stage
prothrombin time (OSPT) และ Thrombin time (TT) จากสุนัขทั้งกลุ่มที่สงสัยการได้รับสารพิษ
และกลุ่มที่มีหลักฐานแน่ชัดว่าได้รับสารพิษชนิดนี้ ผลจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าการแข็งตัวของ
เลือด และความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 1 ในเลือดไม่มี
ความสัมพันธ์กันโดยที่ค่าการแข็งตัวของเลือดยังคงเป็นปกติภายในวันแรกหลังจากการได้รับ
สารพิษ จากการสอบถามประวัติการเบื่อหนูภายในบ้านจากเจ้าของสัตว์ป่วย และการ
วิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมารินโดย HPLC พบว่าเหยื่อที่มีการนำมาใช้สำหรับเป็นยา
เบื่อหนู และสัตว์เลี้ยงกินเข้าไปโดยไม่เจตนาคือ warfarin ผลการตรวจหาสารด้านการแข็งตัวของ
เลือดจากเลือดสามารถยืนยันได้ว่า warfarin และ coumatetralyl ดูดซึมได้อย่างรวดเร็วเมื่อได้รับ
โดยการกิน

จากการศึกษาย้อนหลังของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของสุนัขที่ได้รับพิษจากยาเบื่อหนู
ชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด แสดงถึงการมีเลือดออกอย่างรุนแรงตามอวัยวะต่างๆ โดย
อวัยวะที่พบจุดเลือดออกมากที่สุดคือตับ รองลงมาคือไต, ลำไส้, หัวใจ และปอด โดยสุนัขแต่ละตัว
ที่ได้รับสารพิษนั้นมีความรุนแรงของการเกิดจุดเลือดออกที่แตกต่างกันโดยขึ้นอยู่กับชนิดและ
ปริมาณของสารพิษที่กินเข้าไป ตลอดจนสภาวะของตัวสัตว์เอง

ภาควิชาเภสัชวิทยา.....

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์.....

ปีการศึกษา 2552.....

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5075565031 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEYWORDS : COUMARIN DERIVATIVE RODENTICIDES / DOG / INTOXICATION /

ACHARAWAN LOHAVANIJAYA : RETROSPECTIVE OF PATHOLOGY AND
CLINICAL STUDIES OF FIRST GENERATION ANTICOAGULANT

RODENTICIDE INTOXICATION IN DOGS. THESIS ADVISOR :

ASSOC.PROF.SUPATRA SRICHAIRAT Ph.D., THESIS CO-ADVISOR :

THEERAYUT KEAWAMATAVONG D.V.M., Ph.D., 76 pp.

Anticoagulant rodenticides are one of the most common cause of companion animal intoxication. The aim of this study was to investigate the anticoagulant rodenticide poisoning in dogs. The presence of anticoagulant rodenticides in plasma was determined by HPLC with fluorescence detector. Activated partial thromboplastin time, prothrombin time and thrombin time were also investigated and compared in suspected and proved intoxicated dogs. No significant correlation was found between all coagulation times and the first generation rodenticide level in blood of the intoxicated dogs. All coagulation tests were normal in the first 24 hours after ingestion of anticoagulant rodenticides. According to their owner interview and HPLC identification, warfarin was the most accidental bait used rodenticides. The HPLC determination of these anticoagulants in blood confirmed that warfarin and coumatetralyl absorbed rapidly by oral ingestion.

The retrospective study of histopathological lesions of anticoagulant rodenticide intoxicated dogs showed that there was excessive bleeding in various organs. Accordingly, the most excessive bleeding organs were liver, followed by kidneys, intestines, heart and lungs respectively. The severity of hemorrhage in these organs of intoxicated dogs were different. Types and amount of anticoagulant rodenticides ingested as well as animal status were considered to be the main factors of their toxic severity.

Department : Pharmacology.....

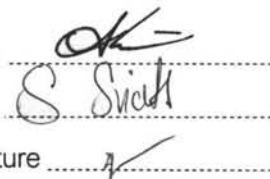
Student's Signature

Field of Study : Veterinary Pharmacology...

Advisor's Signature

Academic Year : 2009.....

Co-Advisor's Signature



กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์เภสัชกรหญิง ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาผู้ประสิทธิประสาทความรู้ทางด้านพิษวิทยาให้แก่ข้าพเจ้า ผู้ซึ่งทำให้มีกำลังใจในยามที่ท้อแท้ และไม่เคยละความพยายามในการให้คำแนะนำรวมทั้งเป็นที่ปรึกษาในทุกๆเรื่อง และอาจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.ธีระยุทธ แก้วอมดวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่คอยให้คำปรึกษาและแง่คิดดีๆเกี่ยวกับการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้เสร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.ศิรินทร หยิบโชค อนันต์, รองศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.วรา พานิชเกรียงไกร, ผู้ช่วยศาสตราจารย์สัตวแพทย์หญิง ดร.กาญจนา อิมศิลป์, รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ ดร.กฤษ อังคนาพร คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาใช้เวลาและให้คำแนะนำต่างๆซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ถูกต้องและสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณนันทิดา ศรีเผือก และคุณสุรศักดิ์ จันทร์ศิริพรชัย เจ้าหน้าที่บริษัท สิทธิพร แอสโซซิเอต จำกัด ผู้ซึ่งข้าพเจ้านับถือเสมือนอาจารย์ท่านหนึ่งที่กรุณาสอนทุกเรื่องเกี่ยวกับ HPLC จากคนที่ไม่เคยรู้จักและไม่เคยศึกษาเรื่องนี้มาก่อนจนสามารถใช้งานได้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ คุณปิยะวรรณ เจริญเลิศกุล และคุณกรณิศ พัฒนชัย ที่ช่วยสอนเทคนิคต่างๆภายในห้องปฏิบัติการพิษวิทยา และขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ประจำภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ คุณสุประดิษฐ์ หวังในธรรม ที่ช่วยสอนเทคนิคต่างๆในการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด

ขอขอบคุณบริษัทไบเออร์ จำกัด และบริษัทโนวาริตส ประเทศไทย จำกัด ที่กรุณาสำหรับสารมาตรฐานของอนุพันธ์คูมารินเพื่อให้การศึกษาครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ที่ให้โอกาสลาศึกษาต่อในขณะที่ยังปฏิบัติงานอยู่ และให้การสนับสนุนด้านเงินทุนเพื่อการศึกษาต่อ

และที่สำคัญขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่ช่วยให้กำลังใจ และสนับสนุนอย่างเต็มที่ในการทำวิทยานิพนธ์ให้ดำเนินการสำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณสัตวแพทย์ทุกท่านจากโรงพยาบาลสัตว์เล็กคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเพื่อนๆร่วมรุ่น VET.MED.MUT.63 ที่ช่วยเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยให้ทั้งที่อยู่ไกลถึงต่างจังหวัด และในกรุงเทพฯ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
วิธีดำเนินการวิจัย.....	4
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
กลไกการออกฤทธิ์.....	9
จลนศาสตร์ของการเกิดพิษ.....	12
ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด.....	14
การวินิจฉัยความเป็นพิษ.....	20
อาการทางคลินิก.....	21
การรักษา.....	21
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
อุปกรณ์ และสารเคมี.....	24
ประชากร/สัตว์ที่ศึกษา.....	24
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย.....	24

บทที่	หน้า
3	วิธีดำเนินการวิจัย (ต่อ)..... 25
	อุปกรณ์และสารเคมี (ต่อ)..... 25
	สารเคมี..... 25
	วิธีการศึกษา..... 25
	การเก็บตัวอย่าง..... 25
	การทดสอบเฉพาะทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยภาวะเลือดออก ผิดปกติ..... 26
	การวิเคราะห์สารอนุพันธ์คูมารินจากเลือดโดยใช้ High performance liquid chromatography..... 28
	วิธีการสกัด..... 28
	วิธีการตรวจหายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดย HPLC..... 28
	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์..... 30
	การศึกษาผลทางพยาธิวิทยา..... 31
	การวิเคราะห์ข้อมูล..... 32
4	ผลการทดลอง..... 33
	ผลการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย..... 33
	ผลการชันประวัติ และการตรวจสภาพร่างกายสัตว์..... 33
	ผลการตรวจจำนวนเม็ดเลือดแดง และค่าเลือด..... 33
	ผลตรวจค่าชีวเคมีของเลือดที่แสดงถึงค่าการทำงานของตับและไต..... 34
	ผลการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด..... 34
	ผลการวิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดโดย HPLC..... 35
	การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) หา ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือด..... 35
	ความแม่นยำ (Precision)..... 35
	เปอร์เซ็นต์การค้นพบ (%Recovery)..... 35
	ความคงตัว (Stability)..... 36
	ความไว (Sensitivity)..... 36

บทที่	หน้า
4 ผลการทดลอง (ต่อ).....	38
ผลการตรวจวิเคราะห์หาสารต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดโดย HPLC.....	38
ผลการหาความสัมพันธ์ของปริมาณยาเป็อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของ เลือดในเลือดกับค่าการแข็งตัวของเลือด.....	38
ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสัตว์ที่ได้รับยาเป็อหนูชนิด อนุพันธ์คูมาริน.....	50
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	52
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	52
การวิเคราะห์หายาเป็อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดโดย HPLC.....	52
การตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดและตรวจวิเคราะห์สารอนุพันธ์คูมา รินจากเลือดโดย HPLC.....	53
การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสัตว์ที่ได้รับยาเป็อหนูชนิด ต้านการแข็งตัวของเลือด.....	57
ข้อเสนอแนะ.....	59
รายการอ้างอิง.....	61
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	76
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	77

สารบัญญัตินำ

ตาราง	หน้า
ตารางที่ 1	7
CAS name และ IUPAC name ของยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด.....	7
ตารางที่ 2	9
ชื่อการค้าของยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดบางส่วนทั้งในประเทศ (จากการสำรวจ) และต่างประเทศ.....	9
ตารางที่ 3	15
คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีของยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด...	15
ตารางที่ 4	17
ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดในสุนัข.....	17
ตารางที่ 5	19
ปฏิกิริยาต่อกันของยาและอาหารประเภทต่างๆต่อ warfarin แบ่งตามชนิดการทำงาน.....	19
ตารางที่ 6	22
แสดงความแตกต่างของผลการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือดในโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด.....	22
ตารางที่ 7	32
เกณฑ์การให้คะแนนจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆโดยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา.....	32
ตารางที่ 8	35
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของความแม่นยำ (Precision) ของการวิเคราะห์	35
ตารางที่ 9	36
ค่าเฉลี่ย % recovery ของ warfarin และ coumatetralyl จาก plasma.....	36
ตารางที่ 10	38
แสดงความคงตัว (stability) ของ warfarin และ coumatetralyl ที่อยู่ในรูปสารละลาย และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20° C.....	38
ตารางที่ 11	40
ประวัติการตรวจสภาพร่างกายสัตว์ป่วยที่สงสัยการได้รับยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด.....	40
ตารางที่ 12	42
ประวัติการตรวจสภาพร่างกายสุนัขที่ได้รับยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด.....	42
ตารางที่ 13	43
แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเลือดของสุนัขที่สงสัยได้รับและได้รับยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรก.....	43
ตารางที่ 14	45
แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดงค่าเลือดของสุนัขที่สงสัยว่าได้รับและได้รับยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดที่สามารถติดตามผลการรักษาได้.....	45
ตารางที่ 15	46
ค่าทางเคมีที่บ่งบอกการทำงานของตับและไตจากสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ (ลำดับที่ 1-8) และได้รับ (ลำดับที่ 9-14) ยาเบื้อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรก.....	46

ตาราง		หน้า
ตารางที่ 16	การเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีที่บ่งบอกการทำงานของตับและไตจากสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ(ลำดับที่ 1-8) และได้รับ(ลำดับที่ 9-14) ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่สามารถติดตามผลการรักษาได้.....	47
ตารางที่ 17	ผลการตรวจหายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดย HPLC และค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ป่วย.....	48
ตารางที่ 18	ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของจุดเลือดออกจากสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด.....	50



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
ภาพที่ 1	8
ภาพที่ 2	10
ภาพที่ 3	11
ภาพที่ 4	13
ภาพที่ 5	18
ภาพที่ 6	29
ภาพที่ 7	30
ภาพที่ 8	30
ภาพที่ 9	37
ภาพที่ 10	37
ภาพที่ 11	49
ภาพที่ 12	51
ภาพที่ 13	51
ภาพที่ 14	51
ภาพที่ 15	51
ภาพที่ 16	51
ภาพที่ 17	69

ภาพ	หน้า
ภาพที่ 18 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน coumatetralyl ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 40 นก./มล.....	70
ภาพที่ 19 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 8 ที่ได้รับ coumatetralyl.....	71
ภาพที่ 20 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 11 ที่ได้รับ warfarin.....	71
ภาพที่ 21 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 12 ที่ได้รับ warfarin.....	71
ภาพที่ 22 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 13 ที่ได้รับ warfarin.....	72
ภาพที่ 23 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 14 ที่ได้รับ warfarin.....	72
ภาพที่ 24 แสดงภาพการเกิดไฟบรินจากการทดสอบ prothrombin time.....	73
ภาพที่ 25 Warfarin ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด.....	73
ภาพที่ 26 Coumatetralyl ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด.....	73
ภาพที่ 27 Flocoumafen ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด.....	73
ภาพที่ 28 Difethialone ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด.....	73
ภาพที่ 29 Difenacoum ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด.....	74
ภาพที่ 30 สัตว์ป่วยรายที่ 12 ขณะทำการอาเจียน warfarin ที่กินเข้าไป.....	74



ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันมีสัตว์ป่วยที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลเนื่องจากสารพิษเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะพิษที่เกิดจากยาเบื่อหนู ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant rodenticides) นั้นจัดเป็นยาเบื่อหนูกลุ่มใหญ่ที่สุดที่มีการนำมาใช้สำหรับกำจัดหนู (Valchev et al., 2008) และควบคุมสัตว์ฟันแทะขนาดเล็กที่ก่อความรำคาญมากที่สุดในโลก (Eason et al., 2002) จากรายงานของ Binev และคณะ (2005) ระบุว่าเหยื่อที่ทำไว้สำหรับล่อสัตว์ฟันแทะซึ่งรวมถึงหนูภายในครัวเรือนคิดเป็น 95% จากยาเบื่อหนูทั้งหมดเป็นยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากสารต้านการแข็งตัวของเลือดมีผลต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จึงมีความเป็นพิษต่อสัตว์ชนิดอื่นๆด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่งสัตว์เลี้ยง การที่สัตว์เลี้ยงจะได้รับสารพิษเหล่านี้เกิดจากการกินเหยื่อที่ทำไว้สำหรับล่อหนูจนเกิดความเป็นพิษขึ้น พบว่าสารต้านการแข็งตัวของเลือดก่อให้เกิดความเป็นพิษในสุนัขมากกว่าแมว (Waddell and Poppenga, 2004) เนื่องจากสุนัขมีพฤติกรรมในการเลือกกินน้อยกว่า มีรายงานว่าสุนัขที่เกิดความเป็นพิษจากยาเบื่อหนูมีสูงถึง 63.1% เมื่อเทียบกับสัตว์ชนิดอื่นๆ เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับมนุษย์มาก (Lorgue et al., 1986) จากการศึกษาของ Wang และคณะ (2007) พบว่าสัตว์เลี้ยงที่ได้รับพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดคิดเป็น 18.9% จากสารกำจัดศัตรูพืชทั้งหมด ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดสามารถหาซื้อได้ง่ายตามท้องตลาดในประเทศไทย เช่น coumatetralyl, warfarin, flocoumafen, difethialone, difenacoum และ bromadiolone เป็นต้น จากความหลากหลายของจำนวนสารเคมีในกลุ่มนี้ และการที่สารต้านการแข็งตัวของเลือดบางชนิด เช่น warfarin เป็นยารักษาโรคในมนุษย์ทำให้โอกาสที่สัตว์เลี้ยงภายในบ้านจะได้รับสารพิษในกลุ่มนี้เข้าไปมีเพิ่มมากขึ้นจนก่อให้เกิดความเป็นพิษได้

ปัจจุบันยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดมีการพัฒนาให้เป็นพิษต่อหนูมากขึ้นโดยการทำให้ระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้นลง และมีความแรงในการก่อพิษเพิ่มขึ้น ร่วมกับสถานการณ์จริงทางคลินิกที่มักไม่ทราบชนิด และขนาดของสารพิษที่สัตว์ได้รับ สัตวแพทย์จึงเลือกที่จะประเมินอาการของสัตว์จากระยะเวลาที่ใช้ในการแข็งตัวของเลือด และทำการรักษาจนกว่าค่าการแข็งตัวของเลือดจะกลับสู่ภาวะปกติ ดังนั้นหากทำการวินิจฉัยปริมาณและชนิดของสารพิษที่ได้รับเข้าไปได้ก็จะสามารถประเมินระยะเวลาของการเกิดพิษ ความรุนแรง และทำการรักษาได้อย่างถูกต้องและแม่นยำยิ่งขึ้น การตรวจชนิดและความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้วิเคราะห์หาความเป็นพิษ และใช้ประเมินผลสำเร็จตลอดจน

ระยะเวลาที่ใช้ในการรักษา อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของค่าการแข็งตัวของเลือดกับระดับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาทางคลินิก

ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant rodenticides) หรือยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมารินออกฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดโดยมีกลไกขัดขวางการทำงานของ vitamin K1 epoxide reductase ที่ทำหน้าที่เปลี่ยน vitamin K1 ให้กลับไปเป็นในรูปที่พร้อมทำงาน เป็นผลให้ขาดแคลน vitamin K1 ในปฏิกิริยาการสร้างปัจจัยสำหรับการแข็งตัวของเลือดอันได้แก่ปัจจัยที่ 2, 7, 9 และ 10 (Harrell, 2003; Murphy, 2007) ทำให้เลือดไหลไม่หยุด ดังแสดงให้เห็นจากอาการทางคลินิก เช่น การพบ subcutaneous hemorrhage, hemoptysis, hematuria, hematochezia เป็นต้น (Kohn et al., 2003; Means, 2003; Murphy, 2007) การตรวจทางมหาพยาธิวิทยาจากการได้รับสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในสุนัข พบจุดเลือดออกตามอวัยวะทั่วไป รวมทั้งที่มดลูก และไต (Padgett et al., 1998; Radi and Thompson, 2004) ในขณะที่ Palmer และคณะ (1999) รายงานการพบจุดเลือดออกที่ปอดในคนที่ได้รับยาต้านการแข็งตัวของเลือด และจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา Liggett และคณะ (2002) ที่รายงานการพบจุดเลือดออกที่ไตแล้ว อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาเป็นเพียงรายงานการพบจุดเลือดออกเท่านั้น และยังไม่มีผู้ศึกษาลักษณะรอยโรคดังกล่าวอย่างเป็นระบบเพื่อใช้เชื่อมโยงกลไกของการเกิดความเป็นพิษกับรอยโรค ดังนั้นจุดประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของค่าการแข็งตัวของเลือดกับระดับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด เพื่อใช้ประโยชน์ในการรักษาทางคลินิก และรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในอวัยวะต่างๆ จากการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในสุนัข รวมทั้งได้ทำการพัฒนาระบบการให้คะแนนรอยโรคของการพบจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ เพื่อใช้เป็นหลักการพื้นฐานในการศึกษารอยโรคดังกล่าวต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. หาแนวทางวินิจฉัยความเป็นพิษที่สามารถนำไปใช้ได้ทางคลินิกโดยประเมินจากค่าความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือด และค่าการแข็งตัวของเลือดจากสุนัขที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ศึกษาย้อนหลังทางจุลพยาธิวิทยาของภาวะการมีเลือดออกในสุนัขที่เสียชีวิตจากการได้รับสารพิษชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดที่ส่งเพื่อชันสูตรโรค ณ หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการยืนยันผลการตรวจหาสารพิษชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดในระดับโดยวิธี thin layer chromatography (TLC) ร่วมกับใช้เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมทรีเพื่อตรวจรูปแบบสเปคตรัม จากหน่วยพิษวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาระดับความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดและค่าการแข็งตัวของเลือดจากสุนัขที่ได้รับสารพิษชนิดนี้ รวมทั้งศึกษาย้อนหลังทางพยาธิวิทยาของภาวะการมีเลือดออกจากการได้รับยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดในสุนัข

ข้อตกลงเบื้องต้น

ตรวจคัดกรองเพื่อวินิจฉัยแยกภาวะเลือดออกผิดปกติจากยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดและภาวะโรคอื่นโดยการทดสอบเฉพาะห้องปฏิบัติการ ได้แก่ activated partial thromboplastin time (APTT), one stage prothrombin time (OSPT หรือ PT) และ thrombin time (TT) และทำการวิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดโดยใช้ high performance liquid chromatography (HPLC) ร่วมกับ fluorescence detection

ศึกษารอยโรคของภาวะการมีเลือดออกทางพยาธิวิทยาทั้งมหภาค และจุลพยาธิวิทยาจากสุนัขที่ได้รับสารพิษชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากประวัติสัตว์ป่วยย้อนหลังซึ่งได้รับการยืนยันผลโดยวิธี thin layer chromatography ร่วมกับใช้เทคนิคทางสเปกโตรโฟโตเมทรีเพื่อตรวจรูปแบบสเปคตรัม

ข้อจำกัดของการวิจัย

การเก็บตัวอย่างสุนัขที่ได้รับสารพิษและเข้ามารักษาในโรงพยาบาลนั้นไม่สามารถกำหนดปัจจัยต่างๆทางด้านสุขภาพซึ่งอาจมีผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด และการคงอยู่ของสารพิษในเลือดในสัตว์แต่ละตัวได้

การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากสัตว์ที่ได้รับสารพิษกลุ่มด้านการแข็งตัวของเลือดเป็นการศึกษาย้อนหลังอาจทำให้ได้ประวัติ และข้อมูลไม่ครบถ้วน

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant rodenticides) ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1920 จากการสังเกตพบโคในเมือง Wisconsin กินพืชสวิตโคลเวอร์ (sweet clover) ที่ขึ้นราแล้วมีอัตราการตายสูง อีกทั้งยังพบเลือดออกจากอวัยวะภายในอีกด้วย พบว่า coumarin ที่เกิดตามธรรมชาติในพืชชนิดนี้เปลี่ยนไปเป็นอนุพันธ์ dicoumarol โดยเชื้อรา ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตในโคเนื่องจากการที่เลือดไม่แข็งตัว ต่อมาได้มีการสังเคราะห์ขึ้นจากสารที่ได้จากพืชที่มีการเจริญเติบโตของเชื้อรา สารตัวแรกในกลุ่มนี้คือ warfarin ที่ได้จากการสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นยาสำหรับแก้ไขภาวะลิ่มเลือดอุดตันของหลอดเลือด และนำมาใช้เป็นสารกำจัดหนู และเป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดขณะนั้นชื่อ WARFARIN มีที่มาจากส่วนหนึ่งของชื่อองค์กรที่สนับสนุนงานวิจัยเรื่องนี้คือ “Wisconsin Alumni Research Foundation” (Merola, 2002; Murphy, 2007)

Warfarin เป็นยาเบื่อหนูตัวแรกที่ได้รับคามนิยมมากในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 และแพร่หลายอย่างรวดเร็วในหลายประเทศ ต่อมาจึงมีการสังเคราะห์สารต้านการแข็งตัวของเลือดอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมือน warfarin ขึ้นมา ยาเบื่อหนูที่มีฤทธิ์ต้านการแข็งตัวในระยะแรก หรือรุ่นที่ 1 นี้ถูกเรียกว่า “first generation anticoagulant rodenticides” ซึ่งยารุ่นนี้จะมีฤทธิ์ความเป็นพิษในระดับปานกลาง (moderate toxicity) และนำมาใช้โดยการผสมกับเหยื่อเพื่อล่อสัตว์ฟันแทะมากิน หลังจากนั้นไม่นานพบว่ามีสัตว์ฟันแทะหลายชนิดดื้อต่อ warfarin อาจเนื่องมาจากการได้รับมาเป็นระยะเวลาอันยาวนาน จึงได้มีการปรับโครงสร้างทางเคมีแล้วทำการสังเคราะห์ตัวขึ้นมาใหม่ สารกลุ่มใหม่นี้ออกฤทธิ์รุนแรงมากกว่ากลุ่มที่ 1 เรียกสารกลุ่มนี้ว่าสารรุ่นที่ 2 หรือ “second-generation anticoagulant rodenticides” หรือ “superwarfarin” (Murphy, 2007) สารรุ่นที่ 2 นี้เพิ่มความน่ากินสูงในสัตว์ฟันแทะ อีกทั้งยังผลิตออกมาเป็นหลายรูปแบบ ได้แก่ grain-based pellets, minipellets, wax-paraffin blocks, meal baits, tracking powder, ground spray, whole and broken grains, nylon pouches, coated talc และ dust ด้วยเหตุนี้จึงพบว่าความเป็นพิษสามารถเกิดขึ้นในสัตว์ชนิดอื่นจากการกินสารพวกนี้ได้เช่นกัน (Merola, 2002) สารรุ่นที่ 2 นี้สามารถออกฤทธิ์ได้นาน และรุนแรงกว่ารุ่นที่ 1 (Murphy and Talcott, 2006)

EHC 175 (1995), Watt และคณะ (2005) และ Vandenbroucke และคณะ (2008) จำแนกความแตกต่างของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดยุคที่ 1 และรุ่นที่ 2 ได้ดังนี้

1. สารรุ่นที่ 1 จับกับตัวรับที่ตับ (hepatic receptor) แบบไม่แน่นอน ในขณะที่สารรุ่นที่ 2 มีความสามารถในการจับต่อ vitamin K1 2, 3-epoxide reductase (hepatic receptor) ได้ดีกว่าสารรุ่นที่ 1
2. สารรุ่นที่ 2 มีความสามารถยับยั้ง vitamin K1 epoxide cycle ได้มากกว่า 1 ตำแหน่ง
3. สารรุ่นที่ 2 มีการสะสม และคงอยู่ที่ตับได้มากกว่าสารรุ่นที่ 1
4. สารรุ่นที่ 2 มีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนานกว่าสารรุ่นที่ 1 ซึ่งมีผลโดยตรงมาจากคุณสมบัติการละลายได้ดีในไขมัน และมีการดูดซึมกลับหลังจากขับออกมาทางน้ำดีในทางเดินอาหาร (enterohepatic recirculation)
5. สารรุ่นที่ 2 สามารถจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ได้ดีกว่าสารรุ่นที่ 1

ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามโครงสร้างทางเคมี (Murphy, 2007; Valchev et al., 2008) คือ

1. Hydroxycoumarin rodenticides สารประกอบในกลุ่มนี้มีวงแหวนของ 4-hydroxycoumarin ที่มีส่วนประกอบของ side chain แตกต่างกัน 3 ตำแหน่งแบ่งเป็น 2 ประเภท
 - a. First generation compounds: coumachlor, coumafuryl, coumatetralyl และ warfarin
 - b. Second generation compounds: brodifacoum, bromadiolone, difenacoum, difethialone และ flocoumafen
2. Indandione rodenticides สารประกอบในกลุ่มนี้มีโครงสร้าง 1, 3 indandione ที่มีตำแหน่งของ side chain แตกต่างกัน 2 ตำแหน่ง ยาเบื่อหนูกลุ่มนี้ได้แก่ chlorophacinone, diphacinone, pindone และ valone

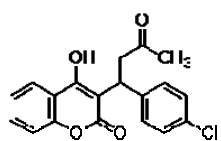
Binev และคณะ (2005) ระบุว่าการใช้ยาเบื่อหนูกลุ่ม hydroxycoumarin ก่อให้เกิดความเสียหายของ vascular permeability ได้รุนแรงกว่ายาในกลุ่ม indandione การที่ยาเบื่อหนูกลุ่ม hydroxycoumarin ทำให้สัตว์ฟันแทะมีเลือดออกอย่างรุนแรง และทำให้ถึงแก่ความตายได้อย่างรวดเร็ว

การเรียกชื่อทางเคมีที่แตกต่างของระบบ CAS (Chemical Abstracts Service) และ IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) แสดงในตารางที่ 1 ส่วนโครงสร้างทางเคมีของสารดังกล่าวแสดงในภาพที่ 1 และยาเบื่อหนูที่มีวางจำหน่ายเป็นจำนวนมากทั้งใน และต่างประเทศ และชื่อการค้าแสดงในตารางที่ 2

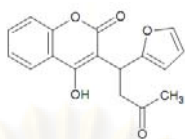
ตารางที่ 1 CAS name และ IUPAC name ของยาเป็อนหนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (EHC 175, 1995)

Common name	CAS name	IUPAC name
<i>First generation hydroxycoumarins</i>		
Coumachlor	3-[1-(4-chlorophenyl)-3 oxobutyl]-4-hydroxy-2H-1benzopyran-2-one	3-[1-(4-chlorophenyl)-3-oxobutyl]-4-hydroxycoumarin
Coumafuryl	3-[1-(2-furanyl)-3 oxobutyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran -2-one	3-[1-(2-furyl)-3-oxobutyl]-4-hydroxycoumarin
Coumatetralyl	4-hydroxy-3-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl)- 2H-1-benzopyran-2-one	4-hydroxy-3-(1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl) coumarin
Warfarin	4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl)-2H-1-benzopyran-2-one	(RS)4-hydroxy-3-(3-oxo-1-phenylbutyl) coumarin
<i>Second generation hydroxycoumarins</i>		
Brodifacoum	3-[3-(4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran -2-one	3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxycoumarin
Bromadiolone	3-[3-(4'-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one	3-[3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-3-hydroxy-1-phenylpropyl]- 4-hydroxycoumarin
Difenacoum	3-[3-(1,1'-biphenyl)-4-yl]-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-4-hydroxy-2H-1-benzopyran-2-one	3-(3-biphenyl-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthyl)- 4-hydroxycoumarin
Difethialone	3-[3-(4-bromo-[1,1'-biphenyl]-4-yl)-1,2,3,4-tetrahydro-1-naphthalenyl]-4-hydroxy-2H-1-benzothiopyran-2-one	3-[1RS,3RS;1RS,3SR)-3-(4'-bromobiphenyl-4-yl)-1,2,3,4- tetrahydro-1-naphthyl]-4-hydroxy-1-benzothi-in-2-one
Flocoumafen	4-hydroxy-3-[1,2,3,4-tetrahydro-3-[4-[-(trifluoromethyl)phenyl]methoxy]phenyl-1-naphthalenyl]-2H-1-benzopyran-2-one	4-hydroxy-3-[1,2,3,4-tetrahydro-3-[4-(4-trifluoromethylbenzyloxy) phenyl]-1-naphthyl] coumarin
<i>Indandione derivatives</i>		
Chlorophacinone	2-[(4-chlorophenyl)phenylacetyl]-1H-indene-1,3 (2H)-dione	2-[2-(4-chlorophenyl)-2-phenylacetyl]indan-1,3-dione
Diphacinone	2-(diphenylacetyl)-1H-indene-1,3 (2H)-dione	2-(diphenylacetyl)indan-1,3-dione
Pindone	2-(2,2-dimethyl-1-oxopropyl)-1H-indene-1,3 (2H)-dione	2-pivaloylindan-1,3-dione
Valone	2-(3-methyl-1-oxopropyl)-1H-indene-1,3 (2H)-dione	2-isovaleryl-1,3-indandione

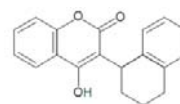
Hydroxycoumarin group



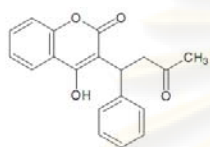
Coumachlor



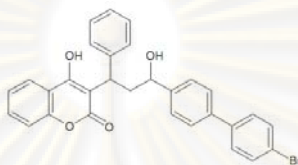
Coumafuryl



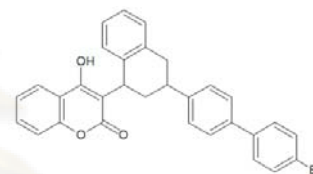
Coumatetralyl



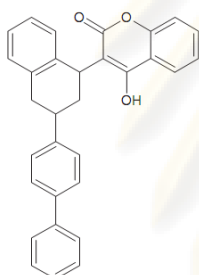
Warfarin



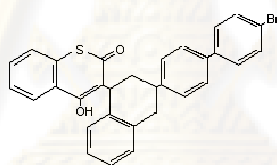
Bromadiolone



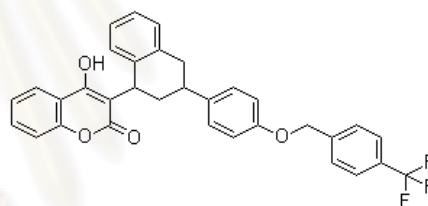
Brodifacoum



Difenacoum

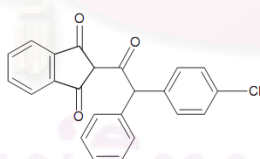


Difethialone

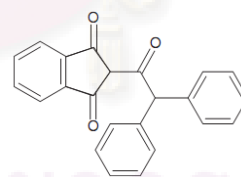


Flocoumafen

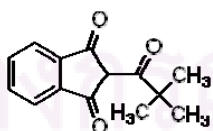
Indanedione group



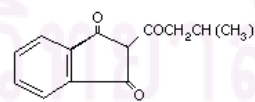
Chlorophacinone



Diphacinone



Pindone



Valone

ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (EHC 175, 1995; Murphy, 2007)

ตารางที่ 2 ชื่อการค้าของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดบางส่วนทั้งในประเทศ (จากการสำรวจ) และต่างประเทศ (Murphy and Talcott, 2006; Valchev et al, 2008)

ชื่อเคมี	ชื่อการค้า
Coumachlor	Famarin, Ratilan, Tomorin
Coumafuryl	Fumarin, Kill-Ko rat and Mouse blues, Kumatox, Ratafin
Coumatetralyl	Kukbo Stunt, Racoumin*, Racoumin Paste*, Racoumin contact dust, Rodentin
Warfarin	Bar bait, Contrax-W, C0-Rax, Coumafene, Cov-R-Tox, Denkarin, Dethmor, Dicusat E, Final, Kpfarin, Luxarin, Place-Pax, Prolin, Ramorin, Rat and Mouse Killer, Ratoxin, RAX, Rodex , Rodex Blox, Salsbury Ropax Bar, Tox-Hid, Warfarin concentrate, Warfarin Plus, Warfarin Q, Warfotex, Woprodenticide, Zoocoumarin, ART Rat Killer*, Warfarat
Bromadiolone	Acilone, Banarat, Boot Hill, Bromacal, Bromalone, Bromapoint, Bromone, Bromorat, Cekurat, Contracts, Contrac, Hawk, Just one bite, Kill rat, Kukbo Rat KO, Lafar, Lightning, Maki, Musal, Raterex, Ratimus, Ratox, Rosex, Super Caid, Warf 42, Warficide, Lanirat, Distroy*, เซ็ด-ฮาร์, แรนเทค*, โบมาเทค*
Brodifacoum	D-Con,D-Con Mouse-Prufe II, Enforcer Mouse Kill, Forwarat, Havoc, Jaquar 50 Rodenticide Plece Pac, Klerat, Kukbo yaong, Lim-N8, Matikus, Nofar, Ratak Plus, Ropax, Talon, Volid, WeatherBlok, Kill-Ko rat and Mouse blues, Neosorexa, Sorexa, Folgorat, Rodend
Difenacoum	Castrix D, Frunax-DS, Matrak, Ratak, Nocurat Pasta*, Roban Liquid concentrate, Aswin Rat*, Ratgon Pellet*, Matrac, Rastop, Silo, Neosorexa Blocks*, Kill-Ko rat and Mouse blues, Sorexa
Difethialone	D-Cease,Frap, Quell, บาราคี*
Flocoumafen	Statagem, Strom*
Chlorophacinone	Atosin C, Caid, Chlorocal, Delta, Dicusat M, Drat, Lepit, Liphadione, LM 91, Microzul, Mole Patrol, Mouse out, Ramucide, Ratomet, Raviac, Rodentin, Rozol, Topitox, Trokat Bait
Diphacinone	Diphacin, Ditrac, Ratindan, Ratik
Pindone	Pivacin, Pival, Pivaldione, Pival Parakakes, Pivalyn, Tri-ban
Valone	PMP tracking powder

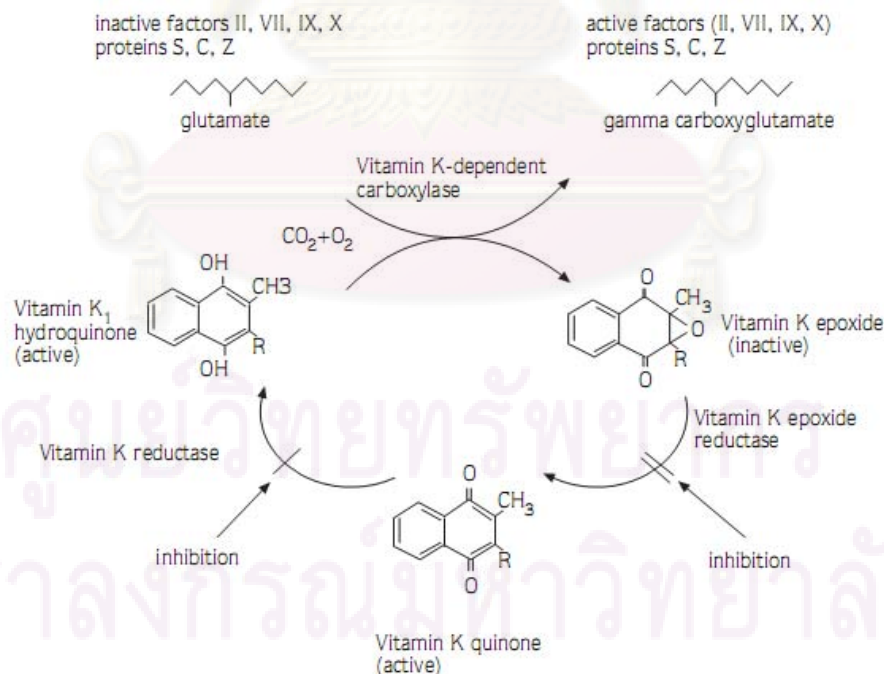
* ยาเบื่อหนูที่มีขายในประเทศไทย

กลไกการออกฤทธิ์

หลังจากที่สัตว์ได้รับสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากการกินแล้ว สารพิษชนิดนี้จะถูกนำส่งไปยังตับผ่านทาง portal vein หรือ chylomicrons (Murphy, 2002) ขณะที่ยังอยู่ในตับสารพิษชนิดนี้ออกฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดในสัตว์โดยไปมีผลรบกวนการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดอันได้แก่ ปัจจัยที่ 2 (prothrombin) ปัจจัยที่ 7 (proconvertin) ปัจจัยที่ 9 (christmas factor) และปัจจัยที่ 10 (Stuart-Prower factor) ภาพที่ 2 แสดงให้

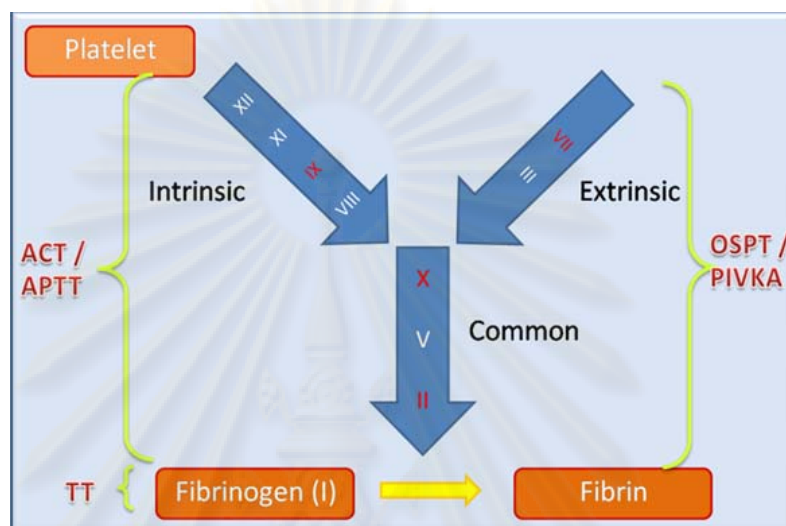
เห็นการทำงานของปัจจัยทั้ง 4 ซึ่งจะทำงานเมื่ออยู่ในรูป active อาศัยปฏิกิริยากระตุ้นจาก inactive proenzyme (โปรตีนตั้งต้นของปัจจัยทั้ง 4) ให้กลายเป็น active ซึ่งปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นได้ก็ต้องอาศัย vitamin K₂ (hydroquinolone) หรือ vitamin K₁ ที่อยู่ในรูปแบบ active และเอนไซม์ carboxylase (เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเติม dicarboxylic acid ให้กับรูปแบบ inactive proenzyme ให้กลายเป็น carboxylated prozymogen หรือปัจจัยทั้ง 4 ที่ active) และยังแสดงให้เห็นถึงการยับยั้งการทำงานของจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่เกิดขึ้น

Vitamin K₁ hydroquinone หรือ vitamin K₂ hydroquinone (active form) จะเปลี่ยนรูปกลับไปเป็น vitamin K₁ ที่ inactive ซึ่งเรียกว่า "vitamin K₁ epoxide" โดยอาศัยเอนไซม์ vitamin K₁ epoxide reductase ไปเป็น vitamin K₁ (Quinone) และ vitamin K₁ reductase ให้ไปเป็น vitamin K₂ hydroquinone อีกครั้ง warfarin ครอบคลุม หรือขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 2 นี้ เป็นผลให้ vitamin K₁ อยู่ในรูปแบบไม่พร้อมทำงาน (inactive) เป็นส่วนใหญ่ การขาดแคลน vitamin K₁ ที่พร้อมทำงาน (active) เป็นผลทำให้ร่างกายไม่สามารถสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดได้อย่างพอเพียง จากการที่ขาดปัจจัยการแข็งตัวของเลือดทั้ง 4 ตัวดังกล่าวมาแล้ว ทำให้กระบวนการแข็งตัวของเลือดถูกยับยั้งจนมีผลทำให้เลือดไหลไม่หยุด (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 แสดงถึงกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่อาศัย vitamin K₁ ในการสร้างปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่ 2, 7, 9 และ 10 (Valchev et al., 2008)

การทำงานของปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดที่ 2, 7, 9 และ 10 ซึ่งเป็น serine protease ในกระบวนการแข็งตัวของเลือดทั้ง intrinsic, extrinsic และ common pathways (Harrell et al., 2003) แสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงเกี่ยวกับปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดซึ่งขึ้นอยู่กับ vitamin K ได้แก่ปัจจัยที่ 2, 7, 9 และ 10 (แสดงให้เห็นเป็นตัวสีแดง) ซึ่งปัจจัยที่ 9 อยู่ใน intrinsic pathway ปัจจัยที่ 7 อยู่ใน extrinsic pathway และปัจจัยที่ 2 และ 10 อยู่ใน common pathway (Harrell et al., 2003) ดังนั้นค่า one-stage prothrombin time (OSPT), activated partial thromboplastin time (APTT), activated clotting time (ACT) และ protein induced in vitamin K antagonism (PIVKA) จึงยาวนานขึ้น (Daly and Giger, 2007; Murphy and Talcott, 2006)

ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด มีผลรบกวนการทำงานของเอนไซม์ vitamin K1 epoxide reductase เป็นผลให้ขาดแคลน vitamin K1 ในปฏิกิริยา และผลที่เกิดตามมาก็คือ ทำให้มีการสังเคราะห์ ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด 2, 7, 9 และ 10 ไม่สมบูรณ์ และเนื่องจาก ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดที่ 2, 7, 9 และ 10 มีค่าครึ่งชีวิตที่ 41, 6.2, 13.9 และ 16.5 ชั่วโมง ตามลำดับ (Merola, 2002; Murphy and Talcott, 2006) ดังนั้นผลที่เกิดจากการ ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดเหล่านี้จะเริ่มแสดงให้เห็นในวันที่ 3-5 หลังจากที่สัตว์กินเหยื่อเข้าไป แล้ว อย่างไรก็ตามการแสดงอาการยังขึ้นอยู่กับชนิด และปริมาณของสารพิษที่กินเข้าไป ถ้าไม่ได้รับการรักษาทันที ความรุนแรงของอาการเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (Murphy and Talcott, 2006; Murphy, 2007)

Eason และ Wickstrom (2001) รายงานเกี่ยวกับสารเมตาบอไลต์ของ warfarin ว่าประกอบด้วยกัน 2 ส่วนคือ hydroxycoumarin และ benzalacetone สารทั้งสองตัวนี้ทำให้เกิด

ความเป็นพิษที่แตกต่างกัน โดย hydroxycoumarin ออกฤทธิ์ยับยั้งการเกิด prothrombin และลดการทำงานในกระบวนการแข็งตัวของเลือด ส่วน benzalacetone นั้นหากมีปริมาณมากเพียงพอจะก่อให้เกิดความเสียหายของหลอดเลือดขนาดเล็กซึ่งจะส่งเสริมการเกิดเลือดออก

จลนศาสตร์ของการเกิดพิษ (Toxicokinetics)

ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเข้าสู่ร่างกายได้หลายทางทั้งจากทางเดินอาหาร การดูดซึมผ่านผิวหนัง และระบบทางเดินหายใจ (EHC 175, 1995; Murphy, 2007) พบว่าเมื่อให้โดยการกินสามารถดูดซึมผ่านทางเดินอาหารได้ดีและรวดเร็ว โดยดูดซึมได้มากกว่า 95% ในมนุษย์ (Park, 1988) ค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ (bioavailability) ขึ้นกับชนิดของสารต้านการแข็งตัวของเลือด โดยทั่วไปยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดถูกดูดซึมได้ดีจากการกิน และตรวจพบระดับสูงสุดในพลาสมาภายใน 12 ชั่วโมง และสามารถจับกับโปรตีนในพลาสมาได้สูงถึง 90-95% ในสัตว์ (Mean, 2003; Valchev et al., 2008) หลังจากกิน warfarin เข้าไปสามารถตรวจพบได้ในพลาสมาภายใน 1 ชั่วโมง และความเข้มข้นสูงสุดเกิดขึ้นภายใน 2-8 ชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตของ warfarin อยู่ในช่วง 20-60 ชั่วโมง และระยะเวลาในการออกฤทธิ์ครั้งสุดท้ายประมาณ 5 วันในมนุษย์ (D' Andrea et al., 2008) ส่วนค่าครึ่งชีวิตของ warfarin ในสุนัขประมาณ 14.5 ± 4.1 ชั่วโมง ระยะเวลาในการออกฤทธิ์หลังจากกินเข้าไปเพียงครั้งเดียวในสัตว์นานประมาณ 14 วันสำหรับ warfarin 21 วันสำหรับ bromadiolone และ 30 วันสำหรับ brodifacoum (Valchev et al., 2008) ดังนั้นการออกฤทธิ์ได้สูงสุดของ warfarin เกิดขึ้นหลังจากกินเข้าไป 48 ชั่วโมง และอาการจะเพิ่มมากขึ้นในวันถัดไปหากไม่ได้รับการรักษา (D' Andrea et al., 2008)

โดยทั่วไป warfarin มีอยู่ในรูปแบบทั้ง R- และ S- enantiomers ซึ่งมีความแตกต่างกันในด้านการออกฤทธิ์ และเมตาบอลิซึม Smith และคณะ (2000) อธิบายถึง warfarin enantiomers ไว้ว่า ทั้ง 2 รูปแบบสามารถจับกับโปรตีนในเลือดได้สูงมาก (>99%) ในแมว และ warfarin ในพลาสมาทั้งหมดจับกับโปรตีนชนิดอัลบูมิน (albumin protein) เท่านั้น ผลจากการจับกับโปรตีนได้สูงนี้ทำให้คาดการณ์ว่า warfarin อีสารที่ไม่ได้จับกับโปรตีนนั้นเกิดจาก 1) มีการแพร่กระจายออกไปนอก albumin compartment 2) เกิดเมตาบอลิซึมขึ้นด้วยเอนไซม์ไมโครโซมและ 3) จับกับ vitamin K epoxide reductase ที่เป็นตำแหน่งออกฤทธิ์ โดยที่ binding site หลักสำหรับ warfarin enantiomers บน human albumin เป็นตำแหน่งที่ยาสามารถจับได้สูงสุด (high affinity drug binding site) กำหนดให้เป็น site 1 (รู้จักกันในนาม warfarin site) จากการศึกษา drug interaction บ่งชี้ว่าการจับที่ตำแหน่งนี้มีความจำเพาะต่อรูปแบบ

(enantioselective binding) โดยพบว่า albumin protein มีความสามารถจับกับ S-warfarin ได้มากกว่า R-warfarin นอกจากนี้ที่ site 1 บน human albumin นั้น S-warfarin มีความสามารถแย่งจับได้โดยตรงกว่าการจับของ R-warfarin ในขณะที่ R-warfarin เป็นตัวแย่งจับแบบอ้อมมากกว่า S-warfarin ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Palkimas และคณะ (2003) และ D' Andrea และคณะ (2008) ที่กล่าวไว้ว่า S-warfarin มีความแรงในการออกฤทธิ์ด้านการแข็งตัวของเลือดมากกว่า R-warfarin ประมาณ 3-5 เท่า และถูกกำจัดออกจากร่างกายได้ดีกว่า 1.5 เท่า

สารต้านการแข็งตัวของเลือดถูกเมตาบอไลซ์ที่ตับ โดยเอนไซม์ในกลุ่ม cytochrome P450 โดยมี CYP2C9 และ CYP2A6 เป็นหลัก เมตาบอไลต์ที่ได้คือ 7-hydroxycoumarin (7HC) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่มีความเป็นพิษต่ำ เนื่องจากสารต้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นแรก เช่น warfarin จับกับ hepatic receptor ได้อย่างไม่แน่นอน ทำให้มีการเมตาบอไลซ์ และขับทิ้งอย่างรวดเร็ว รวมทั้งไม่มีการตกค้างภายในร่างกายด้วย

Warfarin ถูกเมตาบอไลซ์ส่วนใหญ่ภายในตับ (extensive hepatic metabolism) นอกจากนี้ยังถูกเมตาบอไลซ์ภายนอกตับอีกด้วย (extra-hepatic metabolism) โดยสารตั้งต้น (parent compound) เปลี่ยนแปลงไปได้สารใหม่ที่มีความเป็นขั้วเพิ่มขึ้นหลายชนิดและขับออกทางปัสสาวะได้ดีกว่าสารตั้งต้น กระบวนการเมตาบอลิซึมประกอบด้วย 2 ระยะ คือ hydroxylations และ conjugations (Eason et al., 2002) โดยที่ S-warfarin จะถูกเมตาบอไลซ์โดย CYP2C9 ได้เป็น 6- และ 7-hydroxywarfarin ซึ่งเป็น inactive metabolites ที่ขับออกทางปัสสาวะและน้ำดี (D' Andrea et al., 2008; Siguret et al., 2008) ส่วน R-warfarin จะถูกเมตาบอไลซ์โดย CYP3A4, CYP1A2 และ CYP1A1 ได้เป็น 6- และ 8-hydroxywarfarin (ภาพที่ 4) ส่วน cytochrome P450 enzymes อื่นๆนั้นมีบทบาทกับ secondary metabolites เช่น CYP3A4 เปลี่ยน warfarin เป็น 9- และ 10- dehydroxywarfarin ในขณะที่เมตาบอไลต์จาก CYP2C8, CYP2C18, CYP2C19 ได้เป็น 4-, 6-, 7- และ 10-hydroxywarfarin (D'Andera et al., 2008; Palkimas et al., 2003) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายของ S-warfarin และ R-warfarin ผ่านทางระบบ Cytochrome P450

Eason และคณะ (2002) รายงานถึงสัดส่วนของขนาดที่ ได้รับและส่วนที่จับกับ active sites ในตับว่ามีความหลากหลายโดยขึ้นกับชนิดของสารและขนาดที่แตกต่างกัน หลังจากผ่านการเมตาบอลิซึมแล้วสารพวก diphacinone, coumatetralyl, difenacoum, bromadiolone, flocoumafen, brodifacoum และ difethialone จะถูกจับทิ้งในรูปที่ไม่เปลี่ยนแปลงออกทาง อุจจาระเป็นส่วนใหญ่ โดยสารต้านการแข็งตัวที่มีความแรงมากที่สุดจะมีการตกค้างมากที่สุด และมีแนวโน้มว่าจะมีการสะสมมากใน non-target species จากการศึกษาการแพร่กระจายบ่งชี้ว่า ตับเป็นอวัยวะที่มีความเข้มข้นของยาเบื่อหนูเหล่านี้สูงที่สุด ส่วนที่พบในปอด และไตเป็นความเข้มข้นสูงปานกลาง และความเข้มข้นที่ต่ำสุดพบได้ที่สมอง กล้ามเนื้อ เลือด และไขมัน ในบางครั้ง พบว่าในตับอ่อนอาจมีความเข้มข้นสูงกว่าตับได้

เนื่องจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดสามารถจับกับโปรตีนใน พลาสมาได้สูงสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูร่วมกับยาที่มีความสามารถในการจับกับโปรตีนในพลาสมาได้ สูงเช่นกันจะเกิดการแย่งกันจับกับโปรตีนในพลาสมา เป็นผลให้เกิดพิษจากยาเบื่อหนูที่อยู่ในรูป อิศระได้มากขึ้น สารต้านการแข็งตัวของเลือดถูกเมตาบอลิซึมที่ตับ และขับทิ้งได้ทั้งทางน้ำดี และ ปัสสาวะ ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดบางชนิด เช่น brodifacoum (Means, 2003) และ warfarin (EHC 175, 1995) มีการกำจัดทิ้งผ่านทางน้ำดีมายังทางเดินอาหารแล้วมีการดูดซึม กลับเข้ากระแสเลือดอีกครั้ง (enterohepatic recirculation)

ระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของสารต้านการแข็งตัวของเลือดขึ้นกับคุณสมบัติทาง พิสิกส์ และเคมี (ตารางที่ 3) ทั้งนี้พบว่าสารรุ่นที่ 2 จะออกฤทธิ์ยาวนานกว่าเนื่องจากอยู่ใน ร่างกายได้นานกว่า (ตารางที่ 4) เป็นผลให้เวลาที่ใช้ในการรักษาต้องยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังมี ปัจจัยอื่นที่อาจทำให้อาการเป็นพิษรุนแรงยิ่งขึ้น เช่นการได้รับยาปฏิชีวนะเป็นเวลานานจนมีผลทำ ให้การสังเคราะห์ vitamin K1 จากแบคทีเรียในลำไส้เล็กลดลงหรือจากการที่สัตว์มีการทำงานของ ตับบกพร่องมาก่อนหน้าได้รับสารพิษ

ปัจจัยที่มีผลต่อการตอบสนองของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ปัจจัยหลายประการมีผลต่อการตอบสนองต่อการแข็งตัวของเลือดที่เกิดขึ้นจาก warfarin ได้แก่ ปัจจัยจากภายนอก และภายในร่างกาย (ภาพที่ 5) เช่น อายุที่เพิ่มขึ้น ภาวะโรค พันธุกรรม และการให้ยาและอาหารร่วมมีผลทำให้ตอบสนองต่อความเป็นพิษของ warfarin ที่ แตกต่างกัน เป็นต้น (ตารางที่ 5) (CustÓdio das DÓres et al., 2007) ปัจจัยที่มีผลลดความเป็น พิษของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ อาหารที่มีส่วนประกอบของ vitamin K ใน ปริมาณที่สูง ผู้ป่วยที่มีปริมาณ และพื้นที่ผิวของตับมาก ปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้ต้องการปริมาณ

warfarin เพิ่มขึ้นสำหรับใช้ในการควบคุมการแข็งตัวของเลือดจากภาวะที่ผิดปกติ (Gage and Eby, 2003)

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางฟิสิกส์ และเคมีของยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมาริน (Danis ministry of the environment, 2008; Eason and Wickstrom, 2001; ICSC, 1995; IPCS, 2009; PMEP, 1993; PPDB, 2009)

ยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมาริน	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	คุณลักษณะ	จุดหลอมเหลว	ความสามารถละลายได้	อื่นๆ
Coumachlor	$C_{19}H_{15}ClO_4$	342.77	ผงผลึกสีขาว	170°C	ละลายน้ำได้ดีที่ 20 °C	-
Coumafuryl	$C_{17}H_{14}O_5$	298.29	-	124°C	ละลายน้ำได้ดีที่ 20 °C	-
Coumatetralyl	$C_{19}H_{16}O_3$	292.6	ผงผลึกสีขาว ถึง เหลืองอมเทา มีกลิ่นเล็กน้อย	168.8°C	ไม่ละลายน้ำ ละลายได้น้อยใน ether และ benzene ละลายได้ใน alcohol และ acetone ละลายได้อย่างรวดเร็วใน dimethyl formamide	-
Warfarin	$C_{19}H_{16}O_4$	308.3	ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ไม่มีรสชาด	161°C	ไม่ละลายน้ำ และ benzene ละลายได้ปานกลางใน alcohols ละลายได้อย่างรวดเร็วใน acetone ละลายได้ไม่จำกัดใน สารละลายต่าง	-
Brodifacoum	$C_{31}H_{23}BrO_3$	523.4	ผงสีขาวถึง เหลืองอมน้ำตาล ไม่มีกลิ่น	228-232°C	ละลายได้น้อยมากในน้ำ ละลายได้น้อยใน alcohols และ benzene ละลายได้ใน acetone	คงตัวที่อุณหภูมิห้อง
Bromadiolone	$C_{30}H_{23}BrO_4$	527.4	ผงสีขาว	200-210°C	ละลายได้น้อยมากในน้ำ ละลายได้น้อยใน ethanol ละลายได้ปานกลางใน ethyl acetate ละลายได้สูงใน dimethyl formamide	คงตัวที่อุณหภูมิ <200 °C
Difenacoum	$C_{31}H_{24}O_3$	444.5	ผงผลึกสีขาว	215-219°C	ละลายได้น้อยมากในน้ำ ละลายได้น้อยใน benzene ละลายได้ใน acetone และ chloroform	-
Difethialone	$C_{31}H_{23}BrO_2S$	539.5	ผงสีเหลือง	233-236°C	ละลายได้น้อยในน้ำ ละลายได้ใน dichloromethane และ hexane	-

ตารางที่ 3 (ต่อ) คุณสมบัติทางฟิสิกส์ และเคมีของยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมาริน (Danis ministry of the environment, 2008; Eason and Wickstrom, 2001; ICSC, 1995; IPCS, 2009; PMEP, 1993; PPDB, 2009)

ยาเบื่อหนูชนิดอนุพันธ์คูมาริน	สูตรเคมี	น้ำหนักโมเลกุล	คุณลักษณะ	จุดหลอมเหลว	ความสามารถละลายได้	อื่นๆ
Flocoumafen	$C_{33}H_{25}F_3O_4$	542.6	ผงสีขาว	181-191 °C	ละลายได้น้อยในน้ำ ละลายได้ใน acetone, alcohols, chloroform และ dichloromethane	คงตัวเมื่อเก็บที่ pH 7-9 นาน 28 วัน ที่ 50 °C
Clorophacinone	$C_{23}H_{15}ClO_3$	374.8	ผงผลึกสีขาว	140°C	ละลายได้น้อยในน้ำ ละลายได้ในสารละลายอินทรีย์	-
Diphacinone	$C_{23}H_{16}O_3$	362.4	ผงสีเหลืองอ่อน ไม่มีกลิ่น	146 -147 °C	ไม่ละลายใน benzene และ toluene ละลายได้ในน้ำ ละลายได้ดีในน้ำร้อน ethyl alcohol และ acetone	คงตัวที่อุณหภูมิห้อง
Pindone	$C_{14}H_{14}O_3$	230.3	ผงผลึกสีเหลือง	108.5-110.5 °C	ละลายได้น้อยในน้ำที่ 20-25°C	-

นอกจากปัจจัยเหล่านี้ที่มีผลเพิ่มความเป็นพิษของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดแล้ว ภาวะอื่นๆ เช่น การทำงานของตับบกพร่องจนมีผลรบกวนการสังเคราะห์ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด และการเมตาบอลิซึมสารพิษ ผู้ป่วยที่มีอายุมากมีความไวต่อความเป็นพิษของ warfarin มากกว่าผู้ป่วยที่มีอายุน้อยเนื่องมาจากความสามารถในการกำจัดยาที่ลดลง และสมรรถนะที่ลดลงของ vitamin K epoxide reductase อันเนื่องมาจากปริมาณของตับที่ลดลงตามความสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้นโดยตรง (D' Andrea et al., 2008) ภาวะที่มีโปรตีนชนิด albumin ในเลือดต่ำ hypermetabolic states จากภาวะไข้ หรือ hyperthyroidism สามารถเพิ่มการตอบสนองต่อ warfarin ได้ อาจมาจากการเพิ่มแคตาบอลิซึมของ vitamin K-dependent coagulation factors การตั้งครรภ์ ผู้ป่วยที่อยู่ในสภาวะขาดสารอาหาร ผู้ป่วยที่มีน้ำหนักน้อย ผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตบกพร่องอย่างรุนแรง (severe renal failure) ผู้ป่วยที่มีการทำงานของหัวใจล้มเหลว (congestive heart failure) ที่มีการไหลเวียนของเลือดลดลง (D' Andrea et al., 2008; Boothe, 2001; Gage and Eby, 2003; Jacobs, 2008; Siguret et al., 2008) ก็อาจส่งผลให้เพิ่มความเป็นพิษขึ้นได้

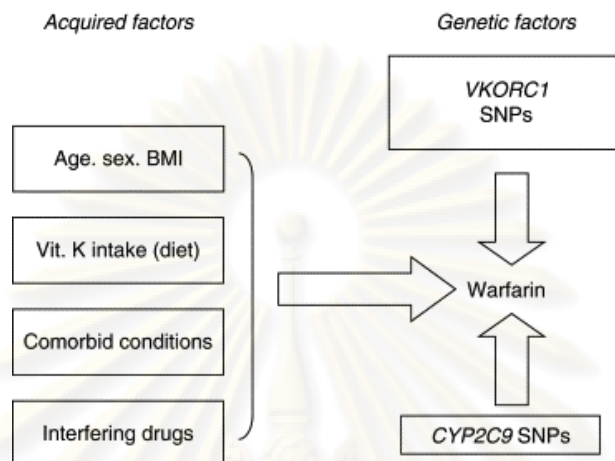
ตารางที่ 4 ค่าเภสัชจลนศาสตร์ของยาเบื้อหนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในสุนัข

ยาเบื้อหนุชนิด ต้านการแข็งตัวของเลือด	ค่าครึ่งชีวิต (half-life)	ขนาดที่ทำให้เสียชีวิตครึ่งหนึ่ง (LD ₅₀) (mg/kg)
Coumachlor		
Coumafuryl	-	900 ¹⁰
Coumatetralyl	-	0.4 ¹⁰
Warfarin	14.5 ± 4.1 ชม. ^{7,8}	16.5 ¹⁰
Brodifacoum	14.5 ชม. ⁴ , 14-15 ชม. ¹⁰ , 14.5 ± 4.1 ชม. ⁸	20 – 300 ^{4,5,7,58} (11 – 323) ^{10,50²}
Bromadiolone	120 วัน ^{4,10} , 1.4 วัน ⁶ , 0.9 – 4.7 วัน ⁹ , 6 วัน ⁷	0.2 – 4 ^{1,5,7} , 0.26 ¹⁰ , 0.25 – 3.6 ³
Difenacoum	-	11 – 15 ^{1,5,7} , 1.125 ¹⁰
Difethialone	-	1.8 ¹⁰
Flocoumafen	2.2 วัน และ 3.2 วัน ⁹	0.56 ¹⁰
Chlorophacinone	-	0.9 – 8 ¹ , 0.46 ¹⁰
Diphacinone	-	20.5 ¹⁰
Pindone	15 – 20 วัน ¹⁰	3 ¹⁰ , 0.9 – 8 ⁵
	-	50 ¹⁰ , 5 – 75 ^{5,7}

¹Brown and Waddell, 2009; ²Eason and Wickstrom, 2001; ³Eason et al., 2002; ⁴Mean, 2003; ⁵Murphy, 2002; ⁶Murphy, 2007; ⁷Murphy and Talcott, 2006; ⁸Neff-Davis et al., 2008; ⁹Robben et al., 1998; ¹⁰Valchev et al., 2008

นอกจากยาด้านจุลชีพบางชนิดที่มีผลลดการสังเคราะห์ vitamin K จากแบคทีเรียโดยตรงแล้ว ยาด้านจุลชีพบางชนิดมีผลทำให้ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของ warfarin เพิ่มขึ้น เช่น cephalosporins ที่มีฤทธิ์ยับยั้ง cyclic interconversion of vitamin K ยาในกลุ่ม thyroxine มีผลเพิ่มเมตาบอลิซึม ของ coagulation factors นอกจากนี้ยังมี clofibrate, erythromycin และ anabolic steroids ที่ทำให้ฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือดเพิ่มขึ้นโดยที่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ยาบางชนิดเช่น aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs, penicillins ขนาดสูง และ moxalactam มีผลทำให้ความเสี่ยงเกิดภาวะเลือดออกจาก warfarin เพิ่มมากขึ้นเมื่อให้ร่วมกัน เนื่องจากยาดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือด นอกจากนี้ aspirin และ non-steroidal anti-inflammatory drugs ยังทำให้เกิดภาวะ gastric erosion เนื่องจากฤทธิ์ยับยั้ง prostaglandin ที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง mucous ที่ผนังทางเดินอาหารเป็น

การเพิ่มความเสถียรต่อการเกิดเลือดออกที่ทางเดินอาหารส่วนต้นได้ สรุปผลของการเกิดอันตรรกิริยาร่วมกันของ warfarin กับยาอื่นๆในตารางที่ 5



ภาพที่ 5 ปัจจัยต่างๆทั้งภายนอก และภายในร่างกายที่มีผลต่อความเป็นพิษของ warfarin (Siguret et al., 2008)

จากรูปที่ 5 แสดงให้เห็นว่า นอกเหนือจากปัจจัยต่างๆ ดังที่ได้กล่าวแล้ว ปัจจัยทางพันธุกรรมยังมีความเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของ warfarin ด้วย พบว่า single nucleotide polymorphisms (SNPs) ที่บ่งชี้ว่ามีผลเป็นอย่างมากเมื่อมีการได้รับยา warfarin อย่างต่อเนื่อง ได้แก่ SNPs ของ vitamin K epoxide reductase complex subunit-1 (VKORC1) gene ซึ่งเป็นเอนไซม์เป้าหมายของ vitamin K antagonist และ SNPs ของ cytochrome P40 2C9 (CYP2C9) gene ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับขบวนการเมตาบอลิซึมที่ลดลงของ warfarin (Siguret et al., 2008)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 ปฏิกริยาต่อกันของยาและอาหารประเภทต่างๆต่อ warfarin แบ่งตามชนิดการทำงาน (Boothe, 2001; Merola, 2002; Olson et al., 2008; Park, 1998; Siguret et al., 2008)

ยาที่มีผลทำให้ prothrombin time ยาวนานขึ้น	
Inhibition of warfarin metabolism	Allopurinol, amiodarone, azole antifungal, capecitabine, chloramphenical, chlorpromazine, cimetidine, ciprofloxacin, clotrimazole, disulfiram, ethanol, fluconazole, flutamide, fluvoxamine, isoniazid (INH), metronidazole, norfloxacin, ofloxacin, omeprazole, phenylbutazone, propafenone, propoxyphene, quinidine, statins (particularly lovastatin and pravastatin), sulfonamides, tamoxifen, tolbutamide, zafirlukast, zileuton, <i>Ginkgo biloba</i> (Asian ginseng)
Inhibition of vitamin K activity	Parenteral cephalosporins (Oral cefaclor, cefixime, cefpodoxime, cefuroxime, cephalexin have not been shown to interact with warfarin), high dose of penicilins
Additive anticoagulant effect	Heparin, antiplatelet drugs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, steroids, <i>geum japonicum</i> (Asian ginseng), garlic, ginger, clove
Drug that interfere with protein binding	Chloral hydrate, clofibrate, diazoxide, ethacrynic acid, miconazole, nalidixic acid (displaces protein binding), salicylates, sulfonamides, sulfonyleureas, nonsteroidal anti-inflammatory drugs.
ยาที่มีผลทำให้ prothrombin time สั้นลง	
Inhibition of warfarin absorption	Cholestyramine, sucralfate, aluminum hydroxide, colestipol
Enhanced warfarin metabolism	Barbiturates, carbamazepine, ethanol, glutethimide, griseofulvin, rifampicin
สนับสนุนฤทธิ์ของ VITAMIN K	
Foods with very high vitamin K content (>200 µg)	Brussels sprouts, chick peas, collard greens, coriander endive, kale, liver, parsley, red leaf lettuce, Swiss chard, black/green teas, turnip greens, watercress
Foods with high vitamin K content (100-200 µg)	Basil, broccoli, butter head lettuce, canola oil, chives, coleslaw, cucumbers (with peel), green onions, mustard greens, soybean oil
Foods with medium vitamin K content (50-100µg)	Apples (green), asparagus, cabbage, cauliflower, mayonnaise, nuts (pistachio), summer squash
Foods with low vitamin K content (>50 µg)	Apples (red), avocados, beans, breads/grains, carrots, celery, cereal, coffee, corn, cucumbers (without the peel), dairy products, eggs, fruits, iceberg lettuce, meats/fish/poultry, pastas, peanuts, peas, potatoes, rice, tomatoes

การวินิจฉัยความเป็นพิษ

การวินิจฉัยทางคลินิกของการได้รับสารพิษจำพวกต้านการแข็งตัวของเลือดนั้น ต้องอาศัยข้อมูลหลายด้านประกอบกันเช่น ประวัติการได้รับสารพิษ อาการทางคลินิก การตอบสนองต่อการรักษาด้วย vitamin K1 และการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีเป็นต้น อย่างไรก็ตามในทางคลินิกปฏิบัติพบว่า การรักษาให้ประสบผลสำเร็จได้ส่วนใหญ่เนื่องจากการที่เจ้าของแจ้งประวัติการได้รับยาเบื่อหนูดังกล่าว การได้รับข้อมูลเพียงข้อเดียวอาจยังไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากประมาณ 25% ของสารต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดไม่ได้มาจากสารที่สงสัยเพียงอย่างเดียว (Nelson, 2006; Murphy, 2007) ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจที่จำเพาะเพิ่มเติมเพื่อความแม่นยำ และสัมฤทธิ์ผลในการรักษา ที่สำคัญการวินิจฉัยภาวะการเกิดเลือดออกจากการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดเพียงอย่างเดียวยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน มีความจำเป็นต้องทำการตรวจค่าอื่นร่วมด้วยเพื่อแยกให้ออกจากโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติ เช่น congenital factor deficiencies, platelet deficiencies, function defect (Von Willebrand's disease) เป็นต้น (Harrell et al., 2003; Murphy, 2007)

การทดสอบความผิดปกติของการจับตัวเป็นลิ่มเลือด หรือการแข็งตัวของเลือด (coagulation tests) เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญรองลงมาจากประวัติการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเพื่อการวินิจฉัยความเป็นพิษนี้ และการทดสอบนี้ต้องทำขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ และยืนยันผลโดยการชันสูตรซากหลังจากสัตว์เสียชีวิตแล้ว ค่าการแข็งตัวของเลือดที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติจากยาเบื่อหนูชนิดนี้ จะให้ค่าที่ยาวนานกว่าปกติของ activated partial thromboplastin time (APTT), activated clotting time (ACT), one stage prothrombin time (OSPT) และ protein induced in vitamin K antagonism (PIVKA) ในขณะที่ค่าที่ได้จากการตรวจ thrombin time (TT) fibrin degradation products (FDPs) และลักษณะของเม็ดเลือดแดงยังคงเป็นปกติ ดังแสดงให้เห็นในตารางที่ 6 การตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดทั้ง 4 แบบมีความแตกต่างกันทั้งจากรายงานของ Rozanski และคณะ (1999) และ Daly และ Giger (2007) กล่าวถึง PIVKA test ว่าเป็น modified PT ที่ใช้บ่งชี้การขาดปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดที่ 2, 7, 9 และ 10 เพราะเลือดใช้เวลาในการแข็งตัวนานกว่า PT ถึงแม้ว่าการทดสอบอาจมีความไวมากกว่า PT ในการตรวจพบความผิดปกติของปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดเหล่านี้ การทดสอบ PIVKA ต้องใช้อุปกรณ์ที่จำเพาะ และกินระยะเวลาที่นานกว่า PT ทำให้ไม่เป็นที่นิยม ส่วน ACT test นั้นเป็นวิธีที่มีความไวต่ำกว่า APTT ในการประเมิน intrinsic และ common system ของกระบวนการแข็งตัวของเลือดตามปกติจึงไม่เป็นที่นิยมเช่นกัน (Latimer et al., 2003)

การตรวจ PIVKA, PTT, PT และ ACT เป็นการตรวจปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดขั้นพื้นฐาน แต่การตรวจเหล่านี้ไม่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างการได้รับสารต้านการแข็งตัวของเลือด แบบออกฤทธิ์ระยะสั้น (short acting) และระยะยาว (long acting) ได้ อย่างไรก็ตาม ความแตกต่างนี้อาจแยกได้เมื่อมีการรักษาด้วย vitamin K1 โดยดูจากระยะเวลาการตอบสนองต่อการรักษาด้วย vitamin K1 (Murphy, 2007) นอกจากนี้การตรวจวิเคราะห์ทางเคมีสามารถพิสูจน์หาเอกลักษณ์และปริมาณยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเหล่านี้ได้ดี มีรายงานมากมายถึงวิธีการตรวจที่หลากหลายได้แก่ fluorimetry, gas chromatography (GC), thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC), mass spectroscopy (MS) และ antibody-mediated tests ปัจจุบันวิธีการตรวจหาชนิดและปริมาณยาเบื่อหนูด้วย HPLC เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด (Murphy, 2002; Murphy and Talcott, 2006; Murphy, 2007)

อาการทางคลินิก

อาการทางคลินิกจากการได้รับสารต้านการแข็งตัวของเลือดมีหลากหลาย ทั้งนี้ อาการทั่วไปที่สามารถพบได้ในระยะแรก และมักพบโดยเจ้าของสัตว์คือ lethargy, dyspnea, tachypnea, anorexia, weakness, pallor, lameness เป็นต้น (Binev et al., 2005; Murphy, 2007) และแสดงอาการที่จำเพาะต่อยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่มักเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของการแข็งตัวของเลือด เช่น การมีเลือดออกหรือเกิด hematoma, hematuria, hematemesis, hematochezia, melena เป็นต้น (Kohn et al., 2003; Mean, 2003; Murphy, 2007) ส่วนอาการอื่น ๆ ที่มีรายงานได้แก่ การเกิดภาวะการอุดตันของท่อทางเดินหายใจ (Blocker and Robert, 1999) มีรายงานถึงการพบก้อนเลือดที่ thymus ในลูกสุนัข (Liggett et al., 2002; Daly and Giger, 2007) การพบว่าที่กรวยไตมีปัสสาวะคั่งทั้งสองข้างจากการตรวจโดยเครื่องอัลตราซาวนด์ (Hansen and Beck, 2003) นอกจากนี้รายงานส่วนใหญ่ที่ได้จากการตรวจชันสูตรซากสุนัขที่ตายจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดมักระบุว่ามึเลือดออกภายในอวัยวะต่าง ๆ

การรักษา

เนื่องจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดนั้นมีกลไกการออกฤทธิ์โดยขัดขวางการทำงานของ vitamin K1 ซึ่งเป็นผลให้ขาดปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการแข็งตัวของเลือด ดังนั้นการรักษาที่ดีที่สุด และถือเป็นยาต้านฤทธิ์ของสารพิษในกลุ่มนี้โดยตรงคือ vitamin K1 โดย

ที่แนะนำให้โดยการกิน หรือการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การให้ vitamin K1 พร้อมกับอาหารที่มีไขมันสูงมีผลเพิ่มการดูดซึมของ vitamin K1 ได้ (Merola, 2002) โดยมีรายงานในสุนัขว่าหากให้ร่วมกับอาหารกระป๋องจะสามารถเพิ่มค่าชีวปริมาณออกฤทธิ์ได้ 4-5 เท่า (Murphy, 2007) การฉีด vitamin K1 เข้ากล้ามเนื้อเป็นสาเหตุให้เกิด hematoma และสัตว์จะแสดงอาการเจ็บปวดอย่างมาก และไม่แนะนำให้ฉีดเข้าเส้นเลือดดำเนื่องจากมีรายงานทำให้เกิด anaphylactic shock ได้ (Murphy, 2007) ทั้งนี้ระยะเวลาในการรักษาขึ้นกับชนิดของสารต้านการแข็งตัวของเลือดที่ได้รับ และสิ่งที่สำคัญคือจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจวัดค่าการแข็งตัวของเลือดก่อนการหยุดให้ยา

ตารางที่ 6 แสดงความแตกต่างของผลการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือดในโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการแข็งตัวของเลือด

Tests Diseases	APTT	OSPT	PIVKA	TT	FDPs	Fragmented RBC
Anticoagulant rodenticides	Prolonged	Prolonged	Prolonged	Normal	Negative	Negative
Disseminated Intravascular Coagulopathy	Prolonged	Prolonged	Prolonged	Prolonged	Positive	Schistocyte
Thrombocytopeny	Normal	Normal	Normal	-	-	-
References	Woody, 1992; Sheafor and Couto, 1999; Sokidoff, 2001; Daly and Giger, 2007	Woody, 1992; Sheafor and Couto, 1999; Sokidoff, 2001; Daly and Giger, 2007	Woody, 1992; Rozanski et al. 1999; Sheafor and Couto, 1999; Daly and Giger, 2007	Woody, 1992; Daly and Giger, 2007	Woody, 1992; Sheafor and Couto, 1999	Sokidoff, 2001; Sheafor and Couto, 1999

หมายเหตุ: APTT: activated partial thromboplastin time, ACT: activated clotting time, OSPT: one stage prothrombin time, PIVKA: protein induced in vitamin K antagonism, TT: thrombin time, FDPs: fibrin degradation products, fragmented RBC: fragmented Red Blood Cells, - : ไม่มีรายงานการตรวจ

ในกรณีที่สัตว์เพิ่งจะได้รับสารพิษภายใน 2-4 ชั่วโมงอาจทำการรักษาเบื้องต้นได้แก่ การทำให้อาเจียน (emesis) ร่วมกับการให้ activated charcoal แล้วตามด้วย cathartic (วรา พานิชเกรียงไกร, 2006; DuVall et al., 1989; Murphy and Talcott, 2006) ส่วนการรักษาภาวะอื่น ๆ นั้นขึ้นอยู่กับความรุนแรง หรืออาการของสัตว์เฉพาะราย เช่นการให้เลือด ออกซิเจน ยาปฏิชีวนะ และการทำ autotransfusion เป็นต้น นอกจากนี้การเจาะเอาของเหลวออกจากช่องอก (thoracocentesis) อาจมีความจำเป็นเพื่อบรรเทาภาวะ severe dyspnea และอาจมีความจำเป็นต้องเจาะเอาของเหลวออกจากเยื่อหุ้มหัวใจ pericardiocentesis เพื่อบรรเทาภาวะ cardiac tamponade (Harrell et al., 2003, Murphy and Talcott, 2006) และที่สำคัญควรให้สัตว์งดออกกำลังกายเมื่อสงสัยว่าได้รับสารพิษชนิดนี้เพื่อลดภาวะเลือดออก (Merola, 2002)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ และสารเคมี

ประชากร/สัตว์ที่ศึกษา แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มที่สงสัยว่าได้รับสารพิษ

สุนัขที่เข้ามารับการรักษาในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ/หรือคลินิกภายนอก ซึ่งได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นโดยสัตวแพทย์ว่า เกิดอาการพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ได้รับความยินยอมจากเจ้าของสัตว์เพื่อนำตัวอย่างมาตรวจ และใช้ข้อมูลในการทำวิจัย)

2. กลุ่มปกติ

สุนัขที่เข้ามาบริจาคเลือดในโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและ/หรือคลินิกภายนอก (การเก็บตัวอย่างจากสัตว์ได้รับความยินยอมจากเจ้าของสัตว์เพื่อนำตัวอย่างมาตรวจ และใช้ข้อมูลในการทำวิจัย)

3. กลุ่มศึกษาทางพยาธิวิทยา

ศึกษาผลทางจุลพยาธิวิทยาอื่นหลังจากสุนัขที่เสียชีวิตจากการได้รับสารพิษ ชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด ซึ่งได้รับการยืนยันผลโดยการตรวจหาสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในตับด้วยวิธี TLC ร่วมกับใช้เทคนิคทางสเปคโตรโฟโตเมทรีเพื่อตรวจรูปแบบของสเปคตรัม

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

Analytical balance (Sartorius analytic, Germany), autosampler vial and septum (Waters, USA), centrifuge (Hettich, Germany), fume hood (Captair, Thailand), glass solvent filter and pump (Millipore corporation, USA), hot air oven (Tuttlingen, Germany), HPLC Column Inersil® ODS-3 5µm, 4.6 x 150 mm (GL Science Inc, Japan), HPLC Guard column Inersil® ODS-3 5µm, 4.0 x 10 mm (GL Science Inc, Japan), HPLC Program (Data Apex Clarity™, The Czech Republic), nylon membrane filters 0.45 µm, 17 mm (Whatman®, England), micropipettes and micropipette tips (Socorex, Swiss), ultrasonic cleaner (TRU-Sweep™, Malaysia), vortex (Scientific industries Inc, USA), water bath (Hetoterm, Germany), Waters 600E Multisolvent Delivery system (Waters,

USA), Waters 474 Scanning Fluorescence detector (Waters, USA), Waters 717 Plus autosampler (Waters, USA)

สารเคมี

Acetic acid (glacial) 100% (Merck, Germany), acetonitrile HPLC grade (Lab-scan, Thailand), activated partial thromboplastin reagent (DG-APTT LA®) (Diagnostic Grifols, Spain), ammonium acetate (Carlo Erba reagents, Italy), bovine thrombin solution (DG-TT®) (Diagnostic Grifols, Spain), calcium chloride (DG-Calcium chloride®) (Diagnostic Grifols, Spain), coumatetralyl (Pestinal®, Germany), diethyl ether HPLC grade (Lab-scan, Thailand), helium gas (TIG, Thailand), hydrochloric acid (Merck, Germany), methanol gradient grade (Merck, Germany), nitrogen gas (TIG, Thailand), nitric acid 69-70% (Mallinckrodt Baker, Inc. USA), rabbit brain tissue thromboplastin (DG-PT®) (Diagnostic Grifols, Spain), sodium phosphate monobasic (Carlo Erba reagents, Italy), triethylamine for analysis (Carlo Erba reagents, Italy), water HPLC grade (Mallinckrodt Baker, Inc. USA), warfarin (Sigma ®, USA)

วิธีการศึกษา

1. การเก็บตัวอย่าง

1. เก็บเลือดจากสุนัขที่เข้ามารักษาจำนวน 14 ตัว และได้รับการวินิจฉัยเบื้องต้นโดยสัตวแพทย์ว่าเกิดจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดตัวละ 5 มล. เพื่อทำการตรวจ

1.1. ค่าการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ APTT และ OSPT (ตรวจตามลำดับหากมีค่าใดค่าหนึ่งปกติให้คัดสัตว์ป่วยนั้นออกจากการทดลอง) ส่วนค่า TT ที่ได้จะต้องอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน เก็บเลือดโดยใช้ 3.8% sodium citrate เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด

1.2. ตรวจเลือด (complete blood count, blood parasite, platelet count) เก็บเลือดโดยใช้ ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) และ ค่าทางเคมีของเลือด (blood chemistry) ได้แก่ alanine transferase (ALT), aspartate transferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), creatinine (CRE), blood urea nitrogen (BUN) เก็บเลือดโดยใช้ heparin เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด

1.3. วิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดย

วิธี HPLC โดยเก็บเลือดวิเคราะห์ 1.1 และ 1.2 ซ้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ เก็บเลือดโดยใช้ heparin เป็นสารต้านการแข็งตัวของเลือด

2. กลุ่มควบคุมได้จากเลือดจำนวน 2 มล. ของสุนัขที่เข้ามาบริจาคเลือดเพื่อหาค่าปกติของค่าการแข็งตัวของเลือดจำนวน 20 ตัว

3. เก็บรวบรวมผลทางพิษวิทยา และจุลพยาธิวิทยาจากสุนัขที่เสียชีวิตจากการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจำนวน 10 ตัว ซึ่งเข้ารับการชันสูตร ณ หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยย้อนหลังเป็นเวลา 2 ปี (ตั้งแต่ปี 2551 – 2552)

2. การทดสอบเฉพาะทางห้องปฏิบัติการเพื่อวินิจฉัยภาวะเลือดออกผิดปกติ

1. Activated partial thromboplastin time (APTT หรือ PTT)

ทดสอบหาระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดจาก citrated plasma เพื่อใช้สำหรับตรวจหาความผิดปกติของปัจจัยต่างๆ ใน intrinsic และ common coagulation system การทดสอบ PTT จะใช้สาร partial thromboplastin เช่น purified brain thromboplastin โดยเป็นสารประกอบ phospholipids ซึ่งทำหน้าที่คล้าย platelet factor 3 (PF₃) ที่ได้จากเกล็ดเลือด และเพื่อให้ปฏิกิริยาในแต่ละขั้นตอนอยู่ในระดับที่ดีจึงมีการเติมสารกระตุ้น partial thromboplastin ลงไปด้วยคือ ellagic acid ได้ activated partial thromboplastin reagent และเมื่อเติมสาร CaCl₂ ลงไปก็จะเกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด

ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากผสม citrated plasma และ activated partial thromboplastin reagent (DG-APTT-LA®, Spain) อย่างละ 0.1 มล. ลงไปในหลอดทดสอบขนาด 12 x 75 มม. ผสมส่วนผสมทั้งสองให้เข้ากัน และอุ่นที่ 37°C นาน 3 นาที แล้วเติม 0.025 M. CaCl₂ ซึ่งอุ่นไว้ก่อนแล้วที่ 37°C ลงไปอีก 0.1 มล. พร้อมกับเริ่มจับเวลาทันที หยุดจับเวลาเมื่อเห็น fibrin และการแข็งตัวของพลาสมาเกิดขึ้น ทำการทดสอบซ้ำ 2 ชุด (duplicate) แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อรายงานผล

2. One stage prothrombin time (OSPT หรือ PT)

การทดสอบหาระยะเวลาการแข็งตัวของเลือดจาก citrated plasma เพื่อใช้สำหรับตรวจหาความผิดปกติของปัจจัยต่างๆ ใน extrinsic และ common coagulation system โดยการเติมสาร rabbit brain tissue thromboplastin (Latimer et al., 2003) ซึ่งมีคุณสมบัติคล้าย tissue factor ในร่างกายและจัดเป็น complete thromboplastin ลงในพลาสมา แล้วเติม CaCl₂ ลงไปจะทำให้เกิดปฏิกิริยากับปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (ปัจจัยที่ 7, 10, 5 และ 2) ทำให้

prothrombin activator ไปย่อย prothrombin ได้เป็น thrombin และ thrombin จะไปย่อย fibrinogen ได้เป็น fibrin ทำให้มีการแข็งตัวของพลาสมาเกิดขึ้น (เกรียงศักดิ์ ไพโรหิรัญกิจ, 2007) เนื่องจากปัจจัยที่ 7 เป็นปัจจัยชนิดพึ่งพา vitamin K ที่มีค่าครึ่งชีวิตสั้นที่สุด ดังนั้นการขาดปัจจัยชนิดนี้จึงตรวจพบได้เร็วที่สุด ทำให้การตรวจค่า PT เป็นการทดสอบที่มีความไวต่อการได้รับสารพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดมากที่สุด สัตว์ที่ได้รับสารพิษดังกล่าวจะมีค่า TT ยาวนานกว่าปกติ (Prater and Tvedten, 2004)

ขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากอุ่น citrated plasma และน้ำยา rabbit brain tissue thromboplastin ซึ่งผสม CaCl_2 ไว้แล้วที่อุณหภูมิ 37°C นาน 2 นาที หลังจากนั้นดูด citrated plasma มา 0.1 มล. ลงในหลอดทดสอบขนาด 12×75 มม. และเติม DG-PT® ลงไป 0.2 มล. ผสมให้เข้ากันพร้อมกับเริ่มจับเวลาที่เติมน้ำยา DG-PT® จนกระทั่งเห็นสาย fibrin เกิดขึ้น คือเวลา prothrombin time ทำการทดสอบซ้ำอีกครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อรายงานผล หาก PT อยู่ในช่วงปกติค่าที่ได้จากการทำการทดสอบ 2 ชุด (duplicate) ห่างกันไม่เกิน 0.5 วินาที ควรทำการทดสอบกับพลาสมาควบคุมไปพร้อมๆกันด้วย

หมายเหตุ: ในบางรายงานจะแสดงผลค่า prothrombin time ออกมาในรูปแบบของ International Normalized Ratio (INR) เนื่องจากการผลิต tissue factor ในแต่ละชุดนั้นมีความแตกต่างกันไป ดังนั้นเพื่อให้มีผลของ INR ที่ได้เทียบเป็นค่ามาตรฐาน ทางบริษัทผู้ผลิต tissue factor จะให้ค่า international sensitivity index (ISI) สำหรับ tissue factor ทุกชนิดที่ผลิตขึ้นมา ค่า ISI เป็นการบ่งชี้ความจำเพาะของ tissue factor แต่ละชุดที่ผลิตนั้น อย่างไรก็ตามค่าปกติของ INR ยังขึ้นอยู่กับเทคนิค และวิธีการที่ใช้ในแต่ละห้องปฏิบัติการ (Lombardi et al., 2003)

$$\text{ค่า INR หาได้จากสมการ } \text{INR} = \left(\frac{\text{PT}_{\text{test}}}{\text{PT}_{\text{normal}}} \right)^{\text{ISI}}$$

การศึกษาในปัจจุบันใช้ชุดการตรวจเป็นชุดเดียวกันหมดซึ่งไม่จำเป็นต้องหาค่า INR

3. Thrombin time (TT)

TT เป็นการทดสอบเพื่อวัดระดับของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดเพียงชนิดเดียว คือ factor I (fibrinogen) โดยมีหลักการคือ การเติม thrombin ที่มีความเข้มข้นพอเหมาะลงในพลาสมา ซึ่ง thrombin จะไปย่อย fibrinogen ได้เป็น fibrin และเวลาที่ใช้ในการทำให้เกิด fibrin หลังจากเติม thrombin คือ thrombin time

วิธีการทำเริ่มจากเจือจาง bovine thrombin solution (DG-TT®, Spain) ด้วยอัตราส่วน 1:11 โดยใช้ DG-TT® 0.1 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 1 มล. หลังจากนั้นอุ่น citrated plasma และ DG-TT® working solution ใน water bath ที่ 37 °C เป็นเวลา 2 นาที แล้วดูดพลาสมาที่อุ่นไว้แล้วใส่ลงในหลอดทดสอบขนาด 12 x 75 มม. ปริมาณ 0.1 มล. ต่อจากนั้นนำ DG-TT® working solution ปริมาณ 0.2 มล. มาเติมลงในพลาสมาแล้วผสมให้เข้ากันดี จับเวลาทันทีที่ใส่ DG-TT® working solution ผสมกับพลาสมา หยุดเวลาเมื่อสังเกตเห็น fibrin (เกรียงศักดิ์ไพโรหิรัญกิจ, 2007) ทำการทดสอบซ้ำ 2 ชุด (duplicate) แล้วหาค่าเฉลี่ยเพื่อรายงานผล

3. การวิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดโดยใช้

High performance liquid chromatography

1. วิธีการสกัด (Shanmugan et al., 2007)

1.1 นำเลือดไปปั่นที่ 2000 g นาน 7 นาที และเก็บไว้ที่ -20 °C เพื่อรอตรวจวิเคราะห์หาปริมาณอนุพันธ์คูมาริน

1.2 นำพลาสมาจำนวน 100 ไมโครลิตรมาทำให้คลายความเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติม phosphate buffer (pH 2.0) จำนวน 150 ไมโครลิตรลงในพลาสมาเพื่อเพิ่มความเป็นกรดให้กับพลาสมา และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 2-3 วินาที

1.3 เติม diethyl ether จำนวน 1 มล. เพื่อตกตะกอนโปรตีนออกจากพลาสมา และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 1 นาที

1.4 นำไป centrifuge ที่ 13,000 g นาน 1 นาที หลังจากนั้นดูดส่วนใสด้านบนออกมาประมาณ 0.8 มล. ใส่ใน eppendorf tube

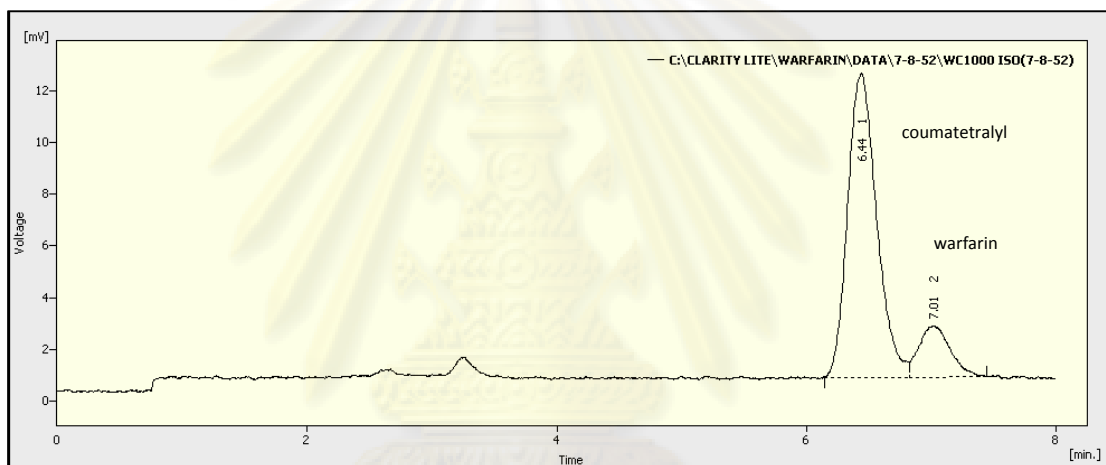
1.5 ทำขั้นตอนที่ 1.3 และ 1.4 ซ้ำ นำส่วนใสมารวมกัน แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยไอของไนโตรเจน

2. วิธีการตรวจหายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดย HPLC

(Rengel and Friedrich, 1997)

นำสารตกค้างที่แห้งมาเติม mobile phase (methanol และ ammonium acetate/triethylamine buffer (75:25)) จำนวน 400 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที แล้วนำไป sonicate เป็นเวลา 10 นาที เพื่อละลายส่วนที่ติดอยู่กับ eppendorf tube และผสมให้เข้ากันอีกรอบด้วยเครื่อง vortex เป็นเวลา 10 วินาที

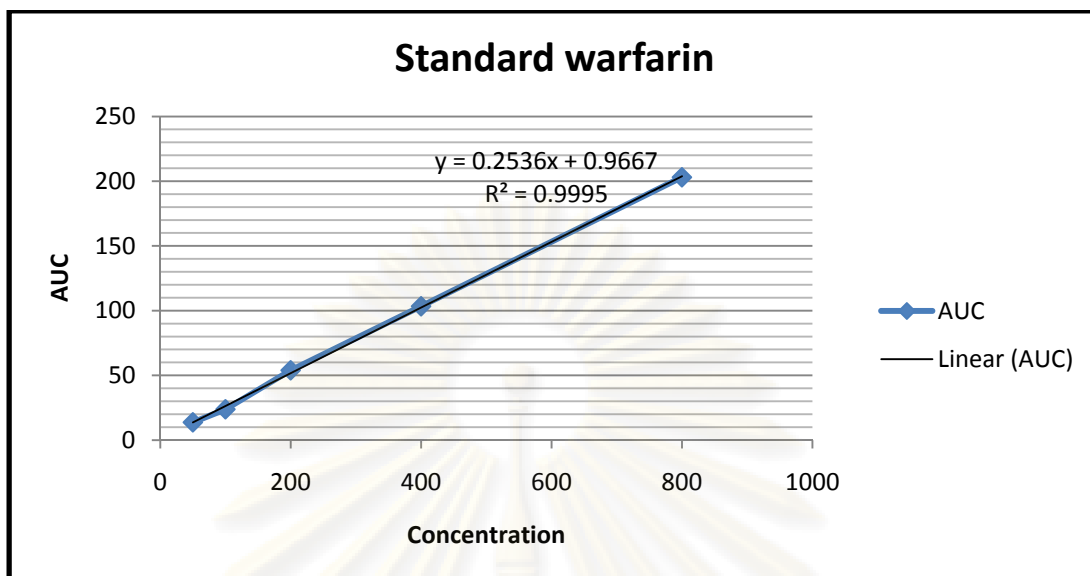
นำสารละลายที่ได้ไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC Waters 600E Multisolvant Delivery system (Millipore Corporation, Milford, USA) โดยใช้ Column Inertsil® ODS-3 (4.6 x 150 mm, GL Science Inc, Japan), autoinjector (Waters 717 Plus Autosampler, fluorescence detector (Waters 474 Scanning Fluorescence detector) โดยตั้งค่า excitation wavelength 318 nm และ emission wavelength 390 nm และทำการ equilibrate column 20 นาทีก่อนฉีดตัวอย่าง Flow rate ของการฉีดปริมาณสารตัวอย่างจำนวน 20 ไมโครลิตร คือ 1.0 มล./นาที และกำหนดให้ใช้เวลารวมเท่ากับ 8 นาที สำหรับการสังเคราะห์ในแต่ละครั้งโดย warfarin และ coumatetralyl มี retention time เท่ากับ 7.0 และ 6.4 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



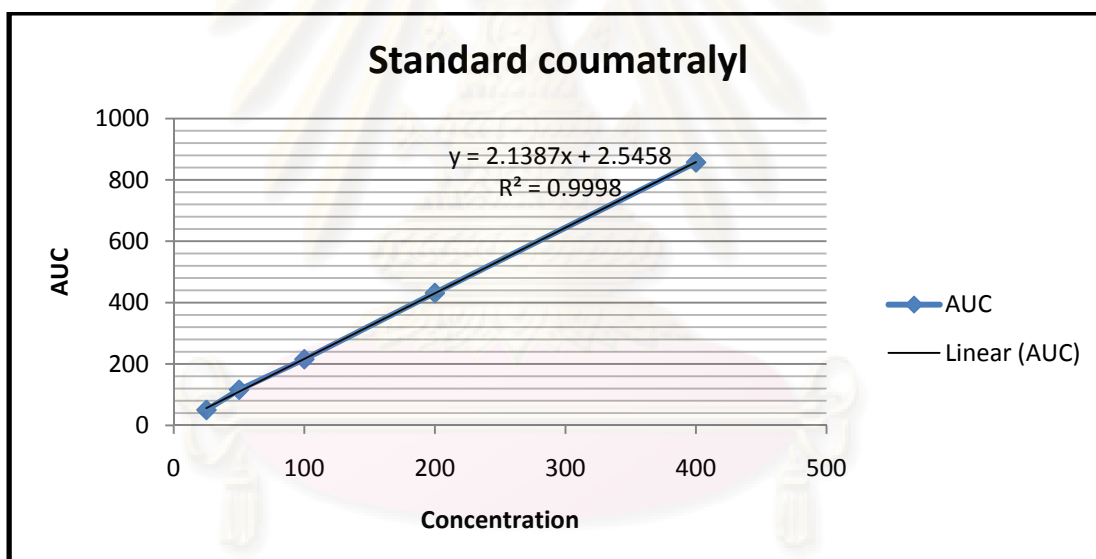
ภาพที่ 6 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน coumatetralyl และ warfarin ที่ระดับความเข้มข้น 50 นก./มล.

การตรวจหาปริมาณของ warfarin และ coumatetralyl โดยการทำการ integration ของ peak area (Data Apex Clarity™ HPLC Program), warfarin standard และ coumatetralyl standard สำหรับเติมในพลาสติกเพื่อทำการสกัดและทำ calibration curve เตรียมความเข้มข้นที่ 50 - 800 นก./มล. และ 25 - 400 นก./มล. ตามลำดับ(ภาพที่ 7 และ 8)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 Standard warfarin ที่ความเข้มข้น 50 - 800 นก./มล.



ภาพที่ 8 Standard coumatralyl ที่ความเข้มข้น 25 - 400 นก./มล.

3. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

(Shanmugan et al., 2007)

3.1 การตรวจสอบความแม่นยำของการวิเคราะห์หายาเบื้อหนูในกลุ่มต้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 1 โดยการวิเคราะห์ซ้ำ 5 ครั้งภายในวันเดียวกัน และทำซ้ำติดต่อกัน 5 วัน

3.2 หาความแม่นยำของการวิเคราะห์ (precisions) ประเมินจากผลการวิเคราะห์ตัวอย่างพลาสมาที่เตรียมชุดเดียวกันโดยมีความเข้มข้นของ warfarin และ coumatralyl ที่ขนาดต่ำ กลาง และสูง ตัวอย่างละ 5 ครั้ง ภายในวันเดียวกัน (intraday precision) และระหว่างวัน

(interday precision) รวม 5 วัน นำความเข้มข้นของ warfarin และ coumatetralyl ที่คำนวณได้ในตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย (mean) แล้วคำนวณหาสัมประสิทธิ์การกระจาย (coefficient of variation) หรือ %CV จากสูตร

$$\% CV = \frac{SD \times 100}{Mean} \quad \text{โดยค่า \%CV ควรไม่เกิน } \pm 15\%$$

3.3 ตรวจสอบความถูกต้อง (accuracy) ของวิธีการโดยหา % recovery ของการสกัดตัวอย่าง โดยการเติมยาเบื้อหนุที่ทราบชนิด และปริมาณลงไป ทำการสกัดตามขั้นตอนแล้ววิเคราะห์ด้วย HPLC เทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน โดยมีความเข้มข้นของ warfarin ที่ขนาดต่ำ กลาง และสูง อย่างละ 3 ครั้ง โดยคำนวณได้จาก

$$\% Recovery = \frac{100 \times \text{determined value}}{\text{expected value}}$$

3.4 หา linearity ของ calibration curve ที่ความเข้มข้น 50 - 800 นก./มล. สำหรับ warfarin และ 25 - 400 นก./มล. สำหรับ coumatetralyl

การศึกษาผลทางพยาธิวิทยา

เป็นการศึกษาย้อนหลังทางจุลพยาธิวิทยาของภาวะการมีเลือดออกในสุนัขที่เสียชีวิตจากการได้รับสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่ส่งเพื่อชันสูตรโรค ณ หน่วยพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้รับการยืนยันผลการตรวจหาสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในตับโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) ร่วมกับใช้เทคนิคทางสเปคโตรโฟโตเมตรีเพื่อตรวจรูปแบบของสเปคตรัม จากหน่วยพิษวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในช่วงปี พ.ศ. 2551 - 2552 จำนวน 10 ราย

ศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา โดยการเก็บตัวอย่างอวัยวะที่ปรากฏรอยโรคจากการชันสูตรซากมาทำการตัดและแช่ใน 10% buffer formalin นำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาผ่านเครื่องเตรียมชิ้นเนื้อ และตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4 ไมครอน ทำการย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin (H&E) ทำการศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และตรวจให้คะแนนรอยโรคของภาวะเลือดออกในแต่ละอวัยวะโดยนักพยาธิวิทยาทางสัตวแพทย์ 2 คน ในแต่ละสไลด์ทำการสุ่มตรวจ 3 พื้นที่บริเวณจุดเลือดออก ที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 4X โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนจุดเลือดออกในแต่ละอวัยวะแสดงในตารางที่ 7

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. หาความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดและค่าการแข็งตัวของเลือดจาก simple linear correlation โดยคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient) จากสมการ

$$r = \frac{\sum (x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum (x - \bar{x})^2 \sum (y - \bar{y})^2}}$$

และ simple linear regression คำนวณความสัมพันธ์จากสมการ $y = a + bx$ และแสดงการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม SPSS 15.0 สำหรับโปรแกรมวินโดวส์ ค่าที่ได้ถือว่ามีนัยสำคัญเมื่อ $p \leq 0.05$

2. ศึกษาผลทางพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือดจากรายงานสัตว์ป่วยย้อนหลัง 2 ปี โดยการใช้สถิติแบบพรรณนา (descriptive statistic)

ตารางที่ 7 เกณฑ์การให้คะแนนจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆ โดยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

Heart ²		Liver and kidneys ²	
Score	Criteria of hemorrhage	Score	Criteria of hemorrhage
0	Absent	0	Absent
1	Focal focus in one layer of heart	1	1-2 foci with diameter of focus around 100 µm or more
2	Multiple to diffuse foci in one layer of heart	2	3-4 foci with diameter of focus around 100 µm or more
3	Multiple to diffuse foci in two layer of heart	3	5-6 foci with diameter of focus around 100 µm or more
4	Multiple to diffuse foci in all three layer of heart	4	≥ 7 foci with diameter of focus around 100 µm or more
Intestines ²		Lungs ¹	
Score	Criteria of hemorrhage	Score	Criteria of hemorrhage
0	Absent	0	1-25 RBC/alveoli
1	Telangiectasia or dilatation of the intestinal vessels	1	26-50 RBC/alveoli
2	Multiple foci	2	1-3 alveoli with > 50 RBC
3	Mucosal hematomas	3	4-6 alveoli with > 50 RBC
4	Intraluminal clots	4	7-9 alveoli with > 50 RBC
		5	10 alveoli with > 50 RBC

¹ ดัดแปลงจาก Broccard และคณะ (1998), ² Schmidt และคณะ (1991)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วย

1.1. ผลการซักประวัติ และการตรวจสภาพร่างกายสัตว์

การคัดกรองเบื้องต้นสำหรับสัตว์ป่วยที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดยการซักประวัติจากเจ้าของถึงการได้รับยาเบื่อหนูในกลุ่มนี้ หรือปัจจัยโน้มนำที่อาจเกิดขึ้นได้ เช่น การปล่อยเดินเล่นนอกบ้าน การกินหนู หรือประวัติการวางยาเบื่อหนูในบริเวณบ้านใกล้เคียง และวินิจฉัยจากอาการทางคลินิกที่แสดงออกด้วยการมีเลือดออก สัตว์ป่วยมักแสดงอาการแรกเริ่มที่คล้ายคลึงกัน เช่น เฉื่อยชา อ่อนเพลีย หายใจลำบาก อาเจียน หรือท้องเสีย เป็นต้น ส่วนอาการที่แสดงออกต่อมาเป็นการมีเลือดออกได้แก่ การพบจุดเลือดออก หรือจ้ำเลือดตามร่างกาย อาเจียนเป็นเลือด ถ่ายเป็นเลือด เลือดกำเดาออก หรือกระทั่งการพบเลือดออกตามไรฟัน จากประวัติการตรวจสภาพร่างกายสัตว์ป่วยที่สงสัยว่าได้รับพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดนั้นสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่สงสัยการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (จำนวน 8 ราย) ดังตารางที่ 11 และกลุ่มที่มีหลักฐานแน่ชัดว่าได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด (จำนวน 6 ราย) ดังตารางที่ 12 สัตว์ป่วยในกลุ่มหลังนี้ได้รับยาเบื่อหนูที่เจ้าของใช้เบื่อหนูภายในบ้าน และสัตว์เลี้ยงไปกินโดยไม่ตั้งใจโดยเป็น warfarin 4 ราย bromadiolone 1 ราย และ flocoumafen 1 ราย ทำการตรวจเพื่อวินิจฉัยแยกจากภาวะอื่นๆ ตามอาการของสัตว์แต่ละราย เช่น ตรวจการหาเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดการอาเจียน หรือถ่ายเป็นเลือด ในกรณีที่สัตว์มีอาการหายใจลำบากจะตรวจโดยการฉายรังสีในส่วนของช่องอก สัตว์ป่วยทุกรายได้รับการตรวจค่าเลือดและปาราสิตในเลือด ค่าชีวเคมีของเลือดซึ่งแสดงถึงการทำงานของตับและไต ค่าการแข็งตัวของเลือด และการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดโดย HPLC

1.2. ผลการตรวจจำนวนเม็ดเลือดแดง และค่าเลือด

ผลการตรวจจำนวนเม็ดเลือดแดง และค่าเลือดของสัตว์ป่วยที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่ได้จากการตรวจครั้งแรก พบว่ามีเพียง 1 รายที่มีผลเลือดปกติ (รายที่ 14) ส่วนรายที่มีความผิดปกติสามารถจำแนกเป็นกลุ่มได้ดังนี้ 1) กลุ่มที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเม็ดเลือดแดง พบ 6 รายที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงและค่า Hct ต่ำ พบ 5 รายที่ค่า Hb ต่ำ และ 7 ราย ที่มีลักษณะรูปร่างของเม็ดเลือดแดงผิดปกติ 2) กลุ่มที่มีความผิดปกติ

เกี่ยวกับเม็ดเลือดขาว พบมี 4 รายที่มีปริมาณเม็ดเลือดขาวรวมสูงกว่าปกติ และ 2 รายที่ต่ำกว่าปกติ 3) กลุ่มที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับเกล็ดเลือด พบมี 5 รายที่เกล็ดเลือดต่ำ 4) กลุ่มที่ตรวจพบปรสิตในเลือด พบเพียง 1 รายที่ติดพยาธิ *Ehrlichia canis* ดังตารางที่ 13 และจากการตรวจค่าเลือดซ้ำในครั้งสุดท้ายเพื่อติดตามผลการรักษา ร่วมกับให้ vitamin K1 แล้วมีสัตว์ป่วย 3 จาก 6 รายที่ผลเลือดเป็นปกติ (รายที่ 6, 7 และ 14) โดยสัตว์ป่วยรายที่ 6 และ 7 มีปริมาณของเม็ดเลือดขาวรวมกลับมาเป็นปกติ ดังตารางที่ 14

1.3. ผลการตรวจค่าชีวเคมีของเลือดที่แสดงถึงค่าการทำงานของตับ และไต

จากผลการตรวจค่า ALT, AST และ ALP ที่บ่งบอกการทำงานของตับในสัตว์ป่วยที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่ได้จากการตรวจครั้งแรก พบว่ามี 10 จาก 14 รายที่ค่า ALT, AST และ ALP สูงกว่าปกติซึ่งแสดงว่ามีการทำงานของตับผิดปกติ (รายที่ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11 และ 12) ดังตารางที่ 15 และจากการตรวจค่าการทำงานของตับซ้ำในครั้งสุดท้ายเพื่อติดตามผลการรักษา ร่วมกับให้ vitamin K1 แล้ว มีสัตว์ป่วยเพียง 3 จาก 6 รายที่มีค่าการทำงานของตับสูงกว่าปกติ (รายที่ 6, 11 และ 14) โดยสัตว์ป่วยรายที่ 6 มีค่า AST สูงกว่าปกติ รายที่ 11 มีค่า ALT, AST และ ALP สูงกว่าปกติ และรายที่ 14 มีค่า ALT และ ALP สูงกว่าปกติ ดังตารางที่ 16 สำหรับค่า BUN และ CRE ที่บ่งบอกการทำงานของไตของสัตว์ป่วยที่ได้รับ และสงสัยการได้รับสารพิษจากยาเบื่อหนูที่ได้จากการตรวจครั้งแรกพบว่ามี 4 จาก 14 รายที่มีการทำงานของไตผิดปกติ โดยรายที่ 1, 2 และ 3 มีค่า BUN และ CRE สูงกว่าปกติ ส่วนรายที่ 9 มีค่า BUN สูงกว่าปกติ ดังตารางที่ 15 และจากการตรวจค่าการทำงานของไตซ้ำในครั้งสุดท้ายเพื่อติดตามผลการรักษา ร่วมกับให้ vitamin K1 แล้วมีสัตว์ป่วย 3 รายที่มีค่าการทำงานของไตผิดปกติ รายที่ 9, 13 และ 14 โดยมีค่า BUN สูงกว่าปกติ ดังตารางที่ 16

2. ผลการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด

จากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการตรวจหาค่ามาตรฐานของห้องปฏิบัติการสำหรับการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดชนิด PT, APTT และ TT โดยการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ปกติที่เข้ามาบริจาคเลือดในโรงพยาบาลสัตว์จำนวน 20 ตัว พบว่าค่ามาตรฐานของ PT อยู่ในช่วง 7-11 วินาที APTT อยู่ในช่วง 9-16 วินาที และ TT มีค่ามาตรฐานอยู่ในช่วง 6.5-10.5 วินาที

จากผลการตรวจค่า PT และ APTT จากสัตว์ป่วยที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรกจำนวน 14 ราย พบ 3 รายที่มีค่า PT ยาวนาน (รายที่ 2, 3 และ 4) และ 10 รายที่มีค่า APTT ยาวนาน (1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 11

และ 12) และจากการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดซ้ำในครั้งสุดท้ายเพื่อติดตามผลการรักษา ร่วมกับการให้ vitamin K1 แล้วพบว่าสัตว์ป่วยทั้ง 6 รายมีค่า PT และ APTT กลับมาเป็นปกติ

3. ผลการวิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดโดย HPLC

3.1. การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (method validation) หายาเบื่อหนู ชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือด

ความแม่นยำ (Precision)

การหาความแม่นยำ ของวิธีการนี้ทำโดยเตรียมสารละลาย warfarin และ coumatetralyl ที่ความเข้มข้น สูง กลาง และต่ำ และทำการตรวจวิเคราะห์ โดยการวิเคราะห์หาความแม่นยำภายในวันเดียวกัน (intra-day precision) ทำซ้ำ 5 ตัวอย่างภายในวันเดียวกัน และการวิเคราะห์หาความแม่นยำระหว่างวัน (inter-day precision) ทำซ้ำ 5 ตัวอย่างในแต่ละวัน ติดต่อกัน 5 วัน แสดงผลในรูปแบบของสัมประสิทธิ์การกระจาย (coefficient of variation) หรือ %CV สำหรับ intra-day precision ของ warfarin และ coumatetralyl มีค่า %CV อยู่ในช่วง 1.16-2.52 และ 1.44-1.88 ตามลำดับ และ inter-day precision ของ warfarin และ coumatetralyl มีค่า %CV อยู่ในช่วง 3.36-4.08 และ 4.22-5.55 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายของความแม่นยำ (precision) ของการวิเคราะห์

ความเข้มข้น (ng/mL)	Intra-day (n=5)			Inter-day (n=25)		
	100	200	400	100	200	400
Warfarin (%CV)	2.52	1.73	1.16	3.36	3.41	4.08
Coumatetralyl (%CV)	1.79	1.44	1.88	5.55	5.40	4.22

เปอร์เซ็นต์การค้นพบ (% Recovery)

การหาเปอร์เซ็นต์การค้นพบ หรือ % recovery ของวิธีการ โดยการเติมสารละลาย warfarin และ coumatetralyl ที่ความเข้มข้น สูง กลาง และต่ำ ลงไปใน plasma ที่บริสุทธิ์ ทำการสกัดตามขั้นตอน และวิเคราะห์โดย HPLC เทียบกับค่าที่ได้จากสารมาตรฐาน (standard curve) ทำซ้ำวันละ 3 ครั้ง ติดต่อกัน 3 วัน % recovery ของ warfarin ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 89.49%, 89.87% และ 99.21% ตามลำดับ ส่วน % recovery ของ

coumatetralyl ที่ความเข้มข้น ต่ำ กลาง สูง เท่ากับ 87.43%, 93.37% และ 94.9% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ย % recovery ของ warfarin และ coumatetralyl จาก plasma

ความเข้มข้น (ng/mL)	33.55	71.11	142.225
Warfarin (%)	89.49	89.97	99.21
Coumatetralyl (%)	87.43	93.37	94.9

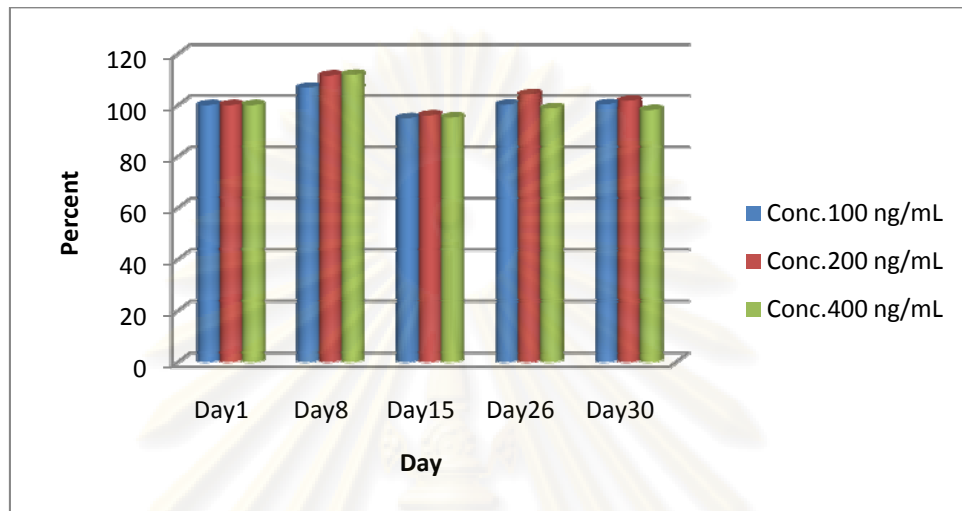
ความคงตัว (Stability)

การหาความคงตัวของสาร ทำโดยการเตรียมสารละลาย warfarin และ coumatetralyl ที่ความเข้มข้น สูง กลาง และต่ำ และทำการตรวจวิเคราะห์ในวันที่ 1, 8, 15, 26 และ 30 โดยใช้สารละลายชุดเดิมที่เตรียมไว้ในวันที่ 1 และเก็บส่วนที่เหลือไว้ที่อุณหภูมิ -20°C หาปริมาณของยาเบื้อหนุ้ทั้ง 2 ตัวพบว่า warfarin ที่เก็บไว้นาน 1 เดือนยังคงมีความคงตัวดี แต่ coumatetralyl มีความคงตัวต่ำกว่า warfarin คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับวันแรก แสดงข้อมูล ดังตารางที่ 10 และแสดงกราฟการเปลี่ยนแปลงของ warfarin และ coumatetralyl เมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือน ดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ

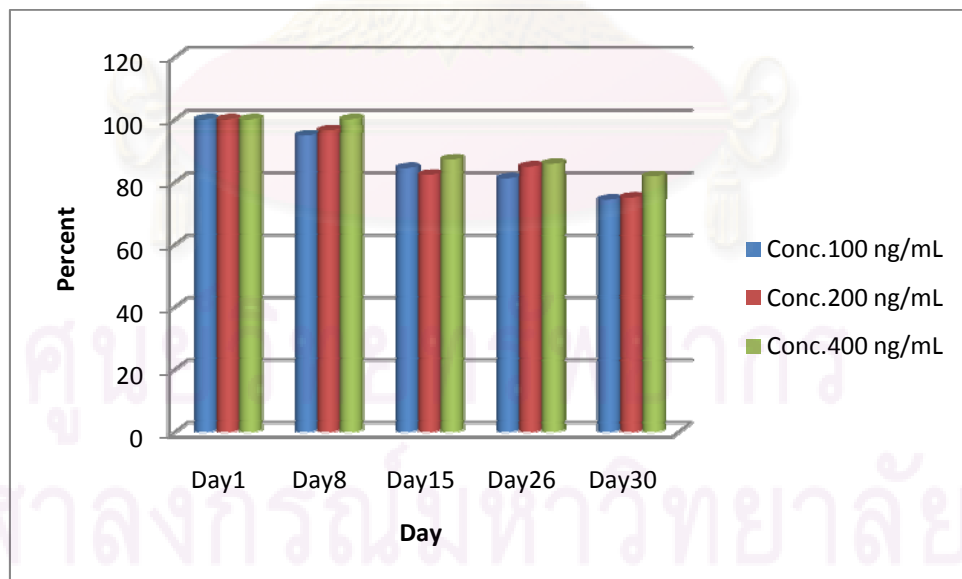
ความไว (Sensitivity)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณยาเบื้อหนุ้ชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด คำนวนจาก ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve; AUC) ค่า limit of detection (LOD) ของ warfarin มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.25 นก./มล. (ที่ Signal-to-Noise ratio (S/N) 4:1) และ coumatetralyl มีความเข้มข้นเท่ากับ 6.25 นก./มล. (ที่ S/N 5:1) พบว่า limit of quantitation (LOQ) ของ warfarin เท่ากับ 50 นก./มล. (ที่ S/N 13:1) และ coumatetralyl เท่ากับ 12.5 นก./มล. (ที่ S/N 12.5:1)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 9 แสดงความคงตัว (stability) ของ warfarin ที่อยู่ในรูปสารละลาย และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากสารละลาย 2 ตัวอย่าง)



ภาพที่ 10 แสดงความคงตัว (stability) ของ coumatetralyl ที่อยู่ในรูปสารละลาย และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C (ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยจากสารละลาย 2 ตัวอย่าง)

ตารางที่ 10 แสดงความคงตัว (stability) ของ warfarin และ coumatetralyl ที่อยู่ในรูปสารละลาย และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

Day	Day 1	Day 8	Day 15	Day 26	Day 30
Warfarin					
Conc. 100 ng/nL (%)	100	106.7 (106.98, 106.51)	94.8 (94, 95.79)	100.1 (99.53, 100.8)	100.3 (99.31, 101.44)
Conc. 200 ng/nL (%)	100	111.4 (111.13, 111.83)	95.9 (95.88, 96.08)	104.1 (103.78, 104.50)	101.6 (102.17, 101.2)
Conc. 400 ng/nL (%)	100	111.7 (111.81, 111.75)	95.1 (95.00, 95.30)	98.7 (98.26, 99.17)	98.0 (98.26, 97.82)
Coumatetralyl					
Conc. 100 ng/nL (%)	100	94.8 (98.03, 91.68)	84.4 (84.51, 84.39)	81.1 (81.34, 80.98)	74.3 (74.17, 74.45)
Conc. 200 ng/nL (%)	100	96.4 (94.06, 98.93)	82.2 (82.19, 82.36)	84.8 (84.58, 85.18)	74.9 (75.11, 74.86)
Conc. 400 ng/nL (%)	100	100.0 (101.25, 98.81)	87.1 (86.96, 87.37)	85.7 (85.80, 85.76)	81.7 (81.80, 81.76)

3.2 ผลการตรวจวิเคราะห์หาสารต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดโดย HPLC

จากผลการตรวจหาสารต้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 1 ในเลือดของสัตว์ป่วยทั้ง 14 รายตรวจพบ warfarin ในกระแสเลือดจำนวน 4 ราย (รายที่ 11, 12, 13 และ 14) และ coumatetralyl จำนวน 1 ราย (รายที่ 8) สัตว์ป่วยทุกรายที่ตรวจพบสารต้านการแข็งตัวของเลือด มีปริมาณความเข้มข้นของยาเป็อนุในกระแสเลือดสูงเกินค่า LOQ ยกเว้นสัตว์ป่วยรายที่ 11 ที่ตรวจพบในปริมาณที่ต่ำกว่าค่า LOQ แต่สูงกว่าค่า LOD โดยตรวจพบที่ปริมาณ 28.4 นก./มล.

3.3 ผลการหาความสัมพันธ์ของปริมาณยาเป็อนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดกับค่าการแข็งตัวของเลือด

ผลการตรวจหายาเป็อนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดภายในเลือดด้วย HPLC สามารถแบ่งผลการตรวจได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ตรวจพบ และตรวจไม่พบยาเป็อนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด โดยทั้ง 2 กลุ่มได้รับการตรวจค่าการแข็งตัวของเลือดควบคู่กันไปด้วย กลุ่มที่ตรวจพบยาเป็อนุชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด มี 2 รายที่ค่า PT และ APTT ยังคงเป็นปกติ (รายที่ 13 และ 14) และมี 3 รายที่ค่า PT ปกติ แต่ APTT ยาวนานขึ้น (รายที่ 8, 11 และ 12) กลุ่มที่

ตรวจไม่พบยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดมี 2 รายที่ค่า PT และค่า APTT ปกติ (รายที่ 7, 9 และ 10) 3 รายที่ค่า PT และ APTT ยาวนาน (รายที่ 2, 3 และ 4) แสดงดังตารางที่ 17

จากตารางที่ 17 แสดงให้เห็นว่าปริมาณยาเบื่อหนูที่ตรวจพบในเลือดไม่มีผลทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือด PT และ APTT มีความผิดปกติจากการเจาะเลือดครั้งแรก ทั้งกลุ่มที่ทราบประวัติการได้รับ และไม่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด ค่า PT ส่วนใหญ่ยังคงปกติ (11 จาก 14 ราย) และมีเพียง 4 รายที่ค่า PT และ APTT เป็นปกติทั้งในกรณีที่ได้รับ และไม่ได้รับ vitamin K1 ก่อนเจาะเลือด จากการติดตามผลการรักษาครั้งที่ 2 (วันที่ 7 หลังจากตรวจครั้งแรก) ในสัตว์ป่วย 6 รายพบว่า มี 4 รายที่ PT และ APTT ปกติ และ 1 รายที่ PT และ APTT ยังคงผิดปกติทั้งคู่ และการติดตามผลการรักษาครั้งที่ 3 (14 วันหลังจากตรวจครั้งแรก) ในสัตว์ป่วย 3 รายพบว่าทุกตัวมีค่า PT และ APTT กลับมาปกติ และจากการหาค่าความสัมพันธ์ทางสถิติพบว่าค่า PT และ APTT นั้นไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติโดยมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.43 แสดงในภาพที่ 11



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ประวัติการตรวจสภาพร่างกายสุนัขที่ส่งสัยการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ลำดับ	อายุ	เพศ	พันธุ์	ผลการรักษา	ประวัติ	อาการทางคลินิก	หมายเหตุ
1	10 ปี	ผู้	ผสม	ตาย	สงสัยมีผู้วางยา และได้รับ steroid ก่อนเจาะเลือด	lethargy, weakness, anorexia, unconscious, bradycardia, dyspnea, hypothermia, hamatochesia, pale-icterus mucous membrane, dehydrate 8%	-
2	4 เดือน	ผู้	โกlden รีทรีฟเวอร์	ตาย	ปล่อยให้เดินเล่นนอกบ้าน	lethargy, anorexia, weakness, epistaxis, vomiting, diarrhea, hemorrhage around both eyes, hematochezia, icterus mucous membrane	parvovirus and corona virus test negative
3	9 เดือน	ผู้	พิทบูล	ตาย	ปล่อยให้เดินเล่นนอกบ้าน	lethargy, anorexia, hemotochesia, scurvy, skin petechial hemorrhage, icterus membrane	parvovirus and corona virus test negative
4	-	ผู้	ผสม	ตาย	สงสัยโดนวางยา เนื่องจากเลี้ยงแบบปล่อย	lethargy, weakness, depress, anorexia, dyspnea	ภาพถ่ายรังสีพบมีของเหลวในช่องอก และผลการชันสูตรซากพบ hemorrhage ที่ตับ ไต กระเพาะอาหาร และปอด
5	4 ปี	ผู้	ผสม	รอดชีวิต	แถวบ้านมักมีการวางยาเบื่อสุนัขเป็นประจำ	lethargy, weakness, skin hemorrhage at abdomen, hematochezia, pale mucous membrane	-

ตารางที่ 11 (ต่อ) ประวัติการตรวจสภาพร่างกายสุนัขที่สงสัยการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ลำดับ	อายุ	เพศ	พันธุ์	ผลการรักษา	ประวัติ	อาการทางคลินิก	หมายเหตุ
6	4 ปี	ผู้	ชิสุห์	รอดชีวิต	สงสัยกินหนูที่ได้รับสารพิษ (พบซากหนูในคอกพักสัตว์)	lethargy, weakness, depress, anorexia, diarrhea, tachycardia, hematochezia, vomit, dehydrate 5%, pink mucous membrane, weak pulse	parvovirus and corona virus test negative
7	4 ปี	ผู้	ชิสุห์	รอดชีวิต	สงสัยกินหนูที่ได้รับสารพิษ (พบซากหนูในคอกพักสัตว์)	lethargy, anorexia, diarrhea, hematemesis, hematochezia	parvovirus and corona virus test negative
8	5 ปี	เมีย	ผสม	รอดชีวิต	สงสัยโดนวางยา ชีคตัวที่บ้านถ่ายเป็นเลือดแล้วตาย และบริเวณหมู่บ้านมีการวางยาเบื่อสุนัขเป็นประจำ	lethargy, weakness, depress, anorexia, emaciation, mild dyspnea, ascites, pale mucous membrane, dehydrate 6-7%, lung sound increase	parvovirus and corona virus test negative Snap 3DX (Ehrlichiosis, <i>Lyme Borreliosis</i> , <i>Dirofilaria immitis</i>) negative ภาพถ่ายรังสีพบ pleural effusion เมื่อเจาะพบเลือดที่ไม่แข็งตัว และตรวจทาง cytology พบ hemangiosarcoma

ตารางที่ 12 ประวัติการตรวจสภาพร่างกายสุนัขที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ลำดับ	อายุ	เพศ	พันธุ์	ผลการรักษา	ประวัติ	อาการทางคลินิก	หมายเหตุ
9	8 ปี	เมีย	ชิสุห์	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (bromadiolone) บ้อนนม และ อาเจียนหลังกินทันที	appetite, pink mucous membrane	เจาะเลือดภายใน 2 ชม.
10	2 เดือน	ผู้	โกลเด้น รีทรีฟเวอร์	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (flocoumafen) และทำอาเจียนหลัง กินภายใน 1 ชม.	alert, pink mucous membrane, normal temperature	เจาะเลือดภายใน 2 ชม.
11	7 ปี	เมีย	พูเดิ้ล	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (warfarin)	lethargy, anorexia, skin at abdominal hemorrhage, hematochezia, hematuria, vomit, pink-pale mucous membrane, weak pulse, hypothermia	พบ Coccidia cyst ในอุจจาระ
12	3 เดือน	ผู้	ผสม	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (warfarin) บ้อนน้ำข้าว ไข่ 1 ฟอง และอาเจียนหลังกินทันที	lethargy, vomit ออกมาเป็น warfarin เป็นจำนวนมาก serous nasal discharge	เจาะเลือดภายใน 2 ชม.
13	5 เดือน	ผู้	ปอมเมอเรเนียน	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (warfarin) บ้อนไข่ 1 ฟอง และ อาเจียนหลังกินภายใน 1 ชม.	alert, pink mucous membrane, normal temperature, excitement	เจาะเลือดภายใน 2 ชม.
14	5 เดือน	เมีย	ปอมเมอเรเนียน	รอดชีวิต	กินยาเบื่อหนูที่วางไว้ล่อหนู (warfarin) บ้อนไข่ 1 ฟอง และ อาเจียนหลังกินภายใน 1 ชม.	alert, pink mucous membrane, normal temperature, excitement	เจาะเลือดภายใน 2 ชม.

ตารางที่ 13 แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเลือดของสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรก

ลำดับ	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Blood morphology	WBC	Band-seg	Seg-N	Lymph.	Mono.	Eosino.	Baso.	NRBC	Blood parasite	Platelet
Normal range	5.5 - 8x10 ⁶ mL	12.0-18.0 g/dL	35-55 %	60-77 fl	22-25 pg	32-36 %	normal	6-17x10 ³ per mL	0-3 %	60-77 %	12.0-30 %	3.0-10 %	2.0-10 %	rare %	rare %	not found (NF)	10-40x10 ⁴ per mL
1	2.12	4.3	14.9	-	-	-	anisocytosis, polychromasia, poikilocytosis	51.6	-	91	3	1	2	-	3	NF	15
2	5.17	10.9	35.4	68.4	21.1	30.8	anisocytosis	31.4	-	79	16	5	-	-	-	NF	6.4
3	6.6	15.2	42.4	64.6	23.2	35.5	anisocytosis	37.1	-	94	4	2	-	-	-	NF	10.7
4	2.8	6.2	20	71.4	22.1	31	hypochromia	4.6	-	88	12	-	-	-	-	NF	1
5	1.51	2.7	10	66.3	18.2	27.5	anisocytosis, polychromasia, poikilocytosis	13	-	70	21	2	-	-	6	<i>Ehrlichia canis</i>	1.5
6	9.7	23	65	67	23.7	35.4	normal	11.3	-	87	10	2	1	-	5	NF	25
7	6	13.8	42.9	72	23	32	normal	32.7	-	88	9	3	7	-	-	NF	30.6
8	2.2	5	16	-	-	32	anisocytosis	2.7	6	72	14	6	2	-	-	NF	1.3

ตารางที่ 13 (ต่อ) แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเลือดของสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรก

ลำดับ	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Blood morphology	WBC	Band-seg	Seg-N	Lymph.	Mono.	Eosino.	Baso.	NRBC	Blood parasite	Platelet
Normal range	5.5 - 8x10 ⁶ mL	12.0-18.0 g/dL	35-55 %	60-77 fl	22-25 pg	32-36 %	normal	6-17x10 ³ per mL	0-3 %	60-77 %	12.0-30 %	3.0-10 %	2.0-10 %	rare %	rare %	not found (NF)	10-40x10 ⁴ per mL
9	7.01	15.3	44.5	63.5	21.8	34.4	normal	11.4	-	80	9.93	7.56	2.33	0.135	-	NF	28.7
10	5.6	13.5	38	68	24.2	35.5	anisocytosis, hypochromia	11.8	-	53	45	-	1	-	-	NF	10
11	6.42	12.7	42	-	-	-	normal	4.8	-	44	55	-	1	-	-	NF	23.9
12	4.7	9.6	28.5	60	20.2	33.7	normal	10.3	-	60	30	1	9	-	-	NF	4.3
13	5.41	12.7	34.7	64.2	23.4	36.4	normal	8.1	-	80.5	17.9	0.195	1.45	-	-	NF	32
14	6.2	14.3	39.4	63.5	23	36.2	normal	10.6	-	73	12	7	8	-	-	NF	32.8

ตารางที่ 14 แสดงจำนวนเม็ดเลือดแดง ค่าเลือดของสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ และได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่สามารถติดตามผลการรักษาได้

ลำดับ	ครั้งที่	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Blood morphology	WBC	Band-seg	Seg-N	Lymph.	Mono.	Eosino.	Baso.	NRBC	Blood parasite	Platelet
Normal range		5.5 - 8x10 ⁶ mL	12.0- 18.0 g/dL	35-55 %	60-77 fl	22-25 pg	32-36 %	normal	6- 17x10 ³ per mL	0-3 %	60-77 %	12.0-30 %	3.0-10 %	2.0-10 %	rare %	rare %	not found (NF)	10- 40x10 ⁴ per mL
6	1	9.7	23	65	67	23.7	35.4	normal	11.3	-	87	10	2	1	-	5	NF	25
	2	6.02	15	44	73	24.9	34.1	normal	14.7	-	73	18	3	6	-	2	NF	49
	3	6.76	16.9	48	71	25	35.2	atypical lymphocyte	14.9	-	73	17	6	9	-	2	NF	13.9
7	1	6	13.8	42.9	72	23	32	normal	32.7	-	88	9	3	7	-	-	NF	30.6
	2	7.32	16.7	49	67	22.8	34.1	normal	13.3	-	69	23	1	7	-	-	NF	34.9
	3	7.31	16.5	47	64	22.6	35.1	normal	9.8	-	75	24	1	-	-	-	NF	31.8
9	1	7.01	15.3	44.5	63.5	21.8	34.4	normal	11.4	-	80	9.93	7.56	2.33	0.135	-	NF	28.7
	2	7.85	14.5	49.1	63	18.5	29.5	normal	8.3	-	72	27	1	-	-	-	NF	47.5
11	1	6.42	12.7	42	-	-	-	normal	4.8	-	44	55	-	1	-	-	NF	23.9
	2	5.89	14	40.4	68.6	23.7	34.5	normal	28.3	-	85.5	6.08	6.8	0.884	0.667	-	NF	33.5
	3	5.66	11.7	39.5	70	20.8	29.7	normal	13.7	13	50	32	2	3	-	5	NF	22.5
13	1	5.41	12.7	34.7	64.2	23.4	36.4	normal	8.1	-	80.5	17.9	0.195	1.45	-	-	NF	32
	2	4.96	11.6	33.2	66.9	23.5	35.1	normal	14	-	44.6	50.5	4.4	0.438	0.099	-	NF	34.7
14	1	6.2	14.3	39.4	63.5	23	36.2	normal	10.6	-	73	12	7	8	-	-	NF	32.8
	2	5.91	13.9	39.9	67.4	23.5	34.9	normal	11.7	-	73	23	1	3	-	-	NF	41.8

หมายเหตุ: † = ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ห่างกัน ครั้งละ 7 วัน

ตารางที่ 15 ค่าชีวเคมีที่บ่งบอกการทำงานของตับ และไตจากสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ (ลำดับที่ 1-8) และได้รับ (ลำดับที่ 9-14) ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดจากการเก็บเลือดครั้งแรก

ลำดับ	ค่าการทำงานของตับ			ค่าการทำงานของไต	
	ALT (23-66 IU/L)	AST (21-102 IU/L)	ALP (0-140 IU/L)	BUN (10-28 mg/dL)	CRE (0.5-1.5 mg/dL)
1	327.5	463.8	1,946	233.6	7.4
2	91.1	68.3	1,024	147.1	7.4
3	-	49	203	39	2.9
4	85	69	53	24	1.5
5	30	22	384.1	14.9	0.6
6	72.8	140.3	435	18.9	0.68
7	27.8	126.9	244	23.2	0.8
8	53	42	40	14	1
9	29.7	29.2	119.5	35.1	1.2
10	89	84	40	18	1.5
11	-	207	118	18	1.1
12	30	28	380	10	0.8
13	20.4	36	120.3	22.1	0.9
14	35.2	56.9	110.3	27.1	1.1

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 16 การเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีที่บ่งบอกการทำงานของตับ และไตจากสุนัขที่สงสัยว่าได้รับ (ลำดับที่ 6-7) และได้รับ (ลำดับที่ 9-14) ยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดที่สามารถติดตามผลการรักษาได้

ลำดับ	ครั้งที่†	ค่าการทำงานของตับ			ค่าการทำงานของไต	
		ALT (23-66 IU/L)	AST (21-102 IU/L)	ALP (0-140 IU/L)	BUN (10-28 mg/dL)	CRE (0.5-1.5 mg/dL)
6	1	72.8	140.3	435	18.9	0.68
	2	24.3	120.3	147	25.6	0.82
	3	52.2	423.3	141	26.9	0.68
7	1	27.8	126.9	244	23.2	0.8
	2	31.1	269.4	142	16	0.66
	3	24.2	93.9	95	13.5	0.61
9	1	29.7	29.2	119.5	35.1	1.2
	2	30.3	26.6	84.5	71.7	1.4
11	1	-	207	118	18	1.1
	2	90	814	1670	9	0.6
	3	346	1,730	2,942.5	11.5	0.6
13	1	20.4	36	120.3	22.1	0.9
	2	55.9	53.4	109.7	30.6	1.1
14	1	35.2	56.9	110.3	27.1	1.1
	2	68.9	45.7	147.9	37.5	1.2

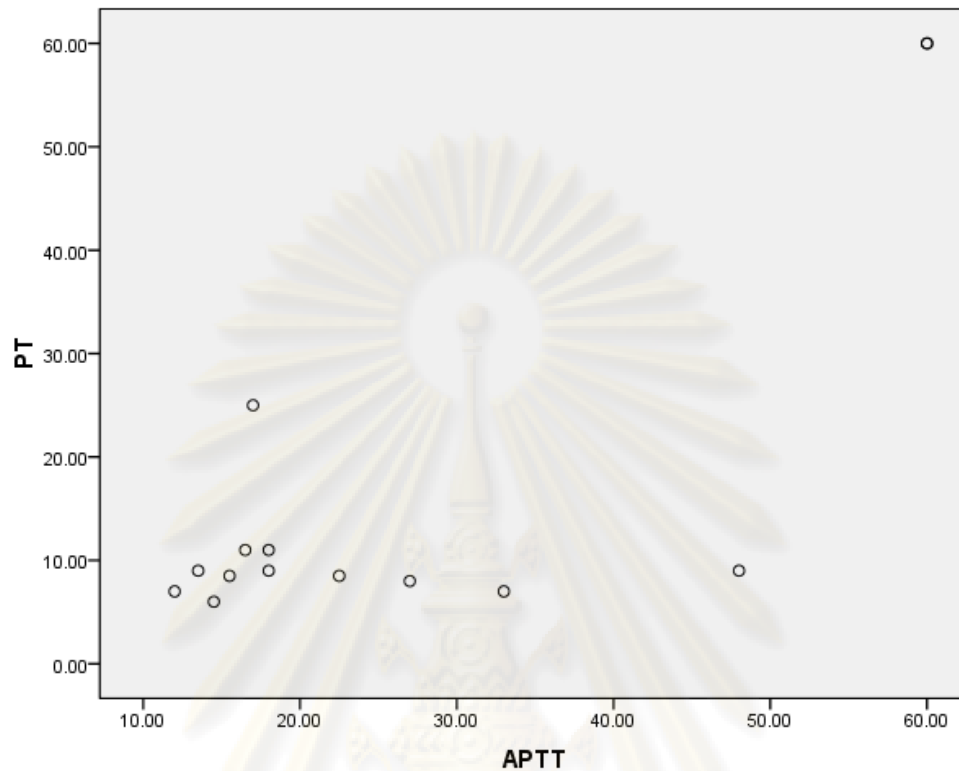
หมายเหตุ: † = ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ห่างกัน ครั้งละ 7 วัน

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 ผลการตรวจหายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดย HPLC และค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ป่วย

ลำดับ	ประวัติการได้รับยาเบื่อหนู	ยาเบื่อหนูที่ตรวจพบ	ปริมาณที่ตรวจพบโดย HPLC (ng/mL)			ได้รับ vitamin K1 ก่อนเจาะเลือด	ค่าการแข็งตัวของเลือด								
							PT (normal 7-11 sec)*			APTT (normal 9-16 sec)*			TT (normal 6.5-10.5 sec)*		
							1 st †	2 nd †	3 rd †	1 st †	2 nd †	3 rd †	1 st †	2 nd †	3 rd †
1	uk	-	nd	d	d	✓	9	-	-	48	-	-	19.5	-	-
2	uk	-	nd	d	d	✓	>60	-	-	>60	-	-	>60	-	-
3	uk	-	nd	d	d	✗	>60	-	-	>60	-	-	>60	-	-
4	uk	-	nd	d	d	✗	25	-	-	17	-	-	8	-	-
5	uk	-	nd	d	d	✓	7	-	-	33	-	-	19.5	-	-
6	uk	-	nd	nd	nd	✓	8.5	7	9	22.5	13	12	8	10	9
7	uk	-	nd	nd	nd	✓	8.5	12	9	15.5	15	14.5	8	11	8.5
8	uk	coumatetralyl	36.5	-	-	✓	11	-	-	18	-	-	8	-	-
9	bromadiolone	-	nd	nd	-	✗	9	7.5	-	13.5	12	-	6	10	-
10	flocoumafen	-	nd	-	-	✓	11	-	-	16.5	-	-	14	-	-
11	warfarin	warfarin	nq	nd	nd	✓	9	14	8.5	18	27	15	16	11.2	9
12	warfarin	warfarin	131.5	-	-	✗	8	-	-	27	-	-	16	-	-
13	warfarin	warfarin	95.9	nd	-	✓	7	8.5	-	12	12	-	8	10	-
14	warfarin	warfarin	166.7	nd	-	✗	6	7.5	-	14.5	15	-	5	10	-

หมายเหตุ: d = death, uk = unknown, nd = non detectable, nq = not qualify, - = un test, * = ค่าปกติของห้องปฏิบัติการนี้, † = ครั้งที่ 1, 2 และ 3 ห่างกัน ครั้งละ 7 วัน, ✓ = ได้รับ, ✗ = ไม่ได้รับ, warfarin: LOD = 6.25 ng/mL, LOQ = 50 ng/mL, coumatetralyl: LOD = 6.25 ng/mL, LOQ = 12.5 ng/mL



ภาพที่ 11 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของค่าการแข็งตัวของเลือด PT และ APTT ที่วัดได้จากเลือดสัตว์ป่วย จำนวน 14 ราย ที่ส่งสัยการได้รับและได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

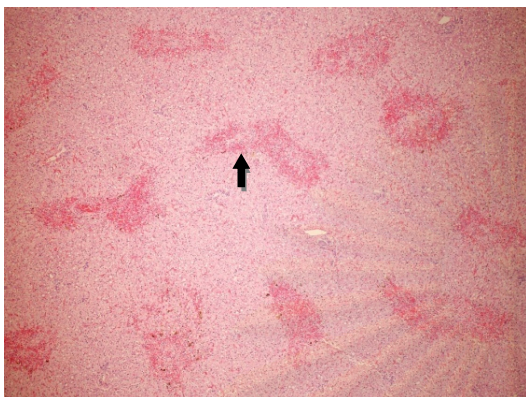
จากการศึกษาประวัติสัตว์ป่วยย้อนหลังพบว่า สุนัขที่เสียชีวิตและได้รับการยืนยันผลตรวจพบต้านการแข็งตัวของเลือดนั้น มักมีประวัติก่อนเสียชีวิต คือ ซึม เบื่ออาหารมาประมาณ 1 วัน และเสียชีวิตกะทันหัน บางรายพบอาการอาเจียน หายใจแรง และมีจ้ำเลือดที่บริเวณขาหนีบ เมื่อทำการชันสูตรซากพบมีจุดเลือดออกในหลายอวัยวะที่แตกต่างกันไปสุนัขแต่ละราย

จากรายงานย้อนหลังของการตรวจทางพยาธิวิทยาของจุดเลือดออกพบว่า อวัยวะที่มีรายงานการเกิดจุดเลือดออกมากที่สุดได้แก่ ปอด และลำไส้คิดเป็นร้อยละ 30 จากตัวอย่างที่ส่งตรวจ ในขณะที่ หัวใจ และตับ เป็นอันดับรองลงมาคิดเป็นร้อยละ 20 และ 10 ตามลำดับ แสดงผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของจุดเลือดออกสามารถให้คะแนนเฉลี่ยดังตารางที่ 18 โดยพบว่าตับเป็นอวัยวะที่พบจุดเลือดออกมากเป็นอันดับหนึ่ง ตามด้วยไต ปอด ลำไส้ และหัวใจ ตามลำดับ และแสดงเกณฑ์การให้คะแนนจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งย่อด้วยสี H&E ดังภาพที่ 12-16

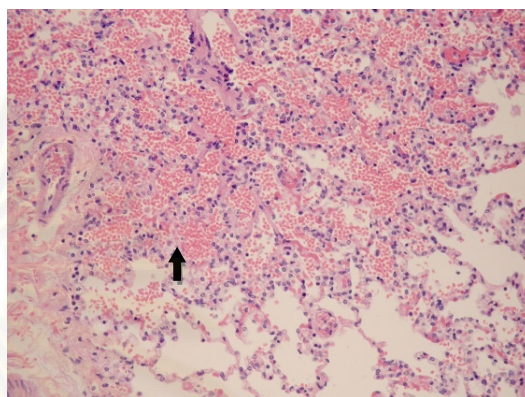
ตารางที่ 18 ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาของจุดเลือดออกจากสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

อวัยวะ รายที่	อวัยวะ	ตับ	ไต	ปอด	ลำไส้	หัวใจ
1	Autolysis		2	-	3	-
2		4	0	0	3	4
3		3	4	2	0	0
4	Autolysis		-	0	-	-
5		2	0	0	0	-
6		0	-	-	-	0
7		4	-	4	4	4
8	Autolysis		4	0	0	0
9		3	4	5	-	-
10		0	-	0	-	-
Mean		2.28	2	1.1	1	0.8
SD		1.94	2	1.69	1.63	1.68

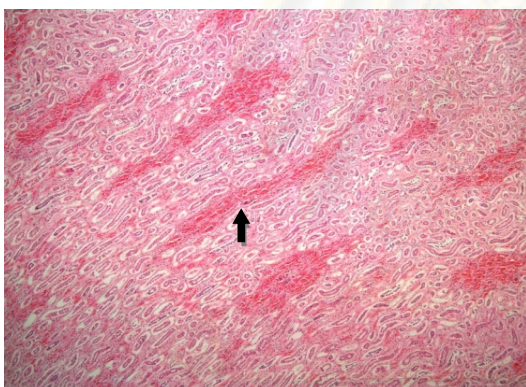
ภาพการให้คะแนนจากการตรวจทางจุลพยาธิวิทยาซึ่งย้อมด้วยสี H&E



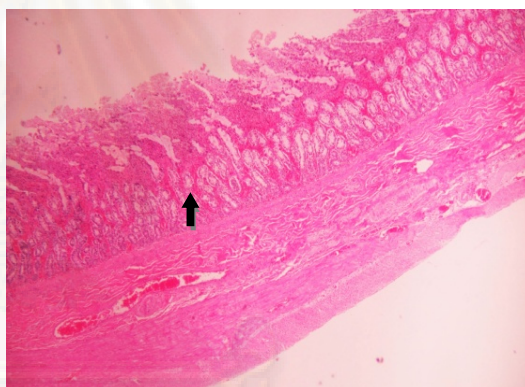
ภาพที่ 12 ภาพจุดเลือดออกที่ตับ กำลังขยาย 10
(Score 4: ≥ 7 foci with diameter of focus
around 100 μm or more)



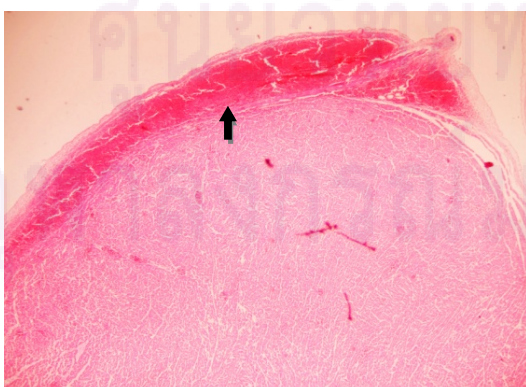
ภาพที่ 13 ภาพจุดเลือดออกที่ปอด กำลังขยาย 10
(Score 5: 10 alveoli with > 50 RBC)



ภาพที่ 14 ภาพจุดเลือดออกที่ไต กำลังขยาย 10
(Score 4: ≥ 7 foci with diameter of focus
around 100 μm or more)



ภาพที่ 15 ภาพจุดเลือดออกที่ลำไส้ กำลังขยาย 4
(Score 3: mucosal hematomas)



ภาพที่ 16 ภาพจุดเลือดออกที่หัวใจ กำลังขยาย 4
(Score 4: multiple to diffuse foci in all three layer of heart)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุป และอภิปรายผลการวิจัย

การวิเคราะห์หายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดโดย HPLC

ปัจจุบันเทคนิคสำหรับตรวจหาสารต้านการแข็งตัวของเลือดแต่ละชนิดในเลือดสามารถทำได้หลายวิธี เช่น GC-MS, TLC และ immunoassay เป็นต้น แต่การตรวจด้วยวิธีเหล่านี้มีข้อจำกัดในด้านความจำเพาะ (Vandenbroucke et al., 2008) และวิธีที่ได้รับความนิยมมาก คือการใช้ HPLC ร่วมกับ UV หรือ fluorescence detection (Marek et al., 2007) เนื่องจากมีความเร็ว ความแม่นยำ ความคงตัว และความจำเพาะที่สูง (Osman et al., 2005) และจากการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้เทคนิค HPLC ร่วมกับ fluorescence detection ตาม Rangel และ Friedrich (1997) เนื่องจาก fluorescence detector มีความไวมากกว่า UV detector (Rangel and Friedrich, 1997; Vandenbroucke et al., 2008)

การสกัดหาสารต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากเพื่อที่จะให้ได้มาซึ่งเปอร์เซ็นต์การค้นพบที่ดี แบ่งขั้นตอนการสกัดได้เป็น solid และ liquid extraction แต่เนื่องด้วย solid extraction เป็นการสกัดที่ต้องใช้เวลาในการเตรียมคอลัมน์ที่ค่อนข้างนานเพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสม (Lombardi et al., 2003) นอกจากนี้คอลัมน์สำเร็จรูปยังมีราคาแพง อีกทั้งการใช้ solid extraction จำเป็นต้องใช้ซีรัมเป็นจำนวนมาก (Murphy et al., 1989) ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการสกัดแบบ liquid-liquid extraction ตามวิธีของ Shanmugan และคณะ (2007) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้พลาสมาในปริมาณที่น้อย (100 ไมโครลิตร) และมีขั้นตอนการสกัดที่น้อยลงจึงเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย

จากผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์พบว่า การศึกษานี้มีค่าความแม่นยำของการตรวจวิเคราะห์ที่ดี โดยให้ค่า %CV ที่ดีกว่าการใช้ HPLC ร่วมกับ UV detection (Lombardi et al., 2003) และให้ค่าที่ใกล้เคียงกับรายงานของ Valle และคณะ (1999) ซึ่งใช้ HPLC ร่วมกับ fluorescence การศึกษานี้มี %recovery ที่สูง $\geq 89.49\%$ สำหรับ warfarin และ $\geq 87.43\%$ สำหรับ coumatetralyl และกำหนดค่าความไวเป็น LOQ เท่ากับการศึกษาของ Shanmugan และคณะ (2007) และได้ค่าที่ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Jin และคณะ (2007) จากการศึกษาครั้งนี้ LOQ ของการตรวจหา warfarin ในกระแสเลือดอยู่ที่ระดับ 50 นก./มล. จึงเพียงพอสำหรับการตรวจวัดระดับที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษในกระแสเลือดได้ ซึ่งเท่ากับ 10-12 มก./ล. (10-12 มคก./มล.) (Leikin and Paloucek, 2007; Mallinckridt and Meyer, 2009)

สำหรับการตรวจค่าเลือด ค่าทางเคมีของเลือดที่บ่งชี้ถึงการแสดงการทำงานของตับ และไต ค่าการแข็งตัวของเลือด เป็นการตรวจเพื่อประเมินสภาพสัตว์ก่อนที่จะเข้ารับการรักษา และติดตามผลการรักษาได้ดี แต่ไม่สามารถใช้เพื่อวินิจฉัยแยกความเป็นพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดได้ ดังรายงานของ Murphy และ Talcott (2006) ที่อธิบายเกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของ ALP เพียงเล็กน้อยไม่มีความจำเพาะต่อความเป็นพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด แต่มักเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของภาวะ hypoxia ซึ่งอาจมาจากภาวะโลหิตจางได้

การตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด และตรวจวิเคราะห์สารต้านการแข็งตัวของเลือดจากเลือดโดย HPLC

จากกลไกการออกฤทธิ์ของสารพิษชนิดนี้ที่มีผลลดปัจจัยการแข็งตัวของเลือด ชนิดที่ 2, 7, 9 และ 10 ซึ่งเป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดซึ่งอยู่ใน intrinsic, extrinsic และ common pathway จึงเป็นผลให้ค่า PT และ APTT ที่ได้ยาวนานขึ้น โดยที่สารพิษในกลุ่มนี้จะไม่ส่งผลต่อปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดชนิดที่ 1 (fibrinogen) การตรวจ TT เป็นการตรวจเพื่อหาความผิดปกติของ fibrinogen ดังนั้นค่าที่ได้ควรเป็นปกติในกรณีที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด แต่กรณีที่เกิดตัวอย่างจากสัตว์ป่วยที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาล การคัดกรองสัตว์ป่วยโดยการตรวจ TT เพื่อวินิจฉัยแยกจากภาวะเลือดออกจากโรคอื่นนั้นไม่สามารถกระทำได้นอกจากสัตว์ป่วยอาจมีพยาธิสภาพอื่นอยู่ก่อนที่จะได้รับยาเบื่อหนู เช่น โรคไต หรือโรคตับโดยมีผลลดการสร้างไฟบริโนเจนทำให้ค่า TT ที่วัดได้ยาวนานออกไป ดังแสดงให้เห็นในสัตว์ป่วยรายที่ 10, 11 และ 12 แสดงผลดังตารางที่ 17 ซึ่งเป็นสัตว์ที่ทราบประวัติแน่ชัดว่าได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด จากเหตุผลดังกล่าวจึงไม่มีการคัดสัตว์ป่วยที่มีค่า TT ที่ยาวนานออกจากการหาค่าความสัมพันธ์ของปริมาณยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดกับค่าการแข็งตัวของเลือด (PT และ APTT)

จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าในระยะแรกของการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด ค่าการแข็งตัวของเลือด PT และ APTT ไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของยาเบื่อหนูในกระแสเลือด ในกรณีที่เจาะเลือดมาตรวจหลังจากรับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเข้าไปและเจ้าของรีบพามาพบสัตวแพทย์ พบว่าค่า PT จะยังคงเป็นปกติอยู่เนื่องจากยังคงมีปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดที่ร่างกายสร้างขึ้นมาก่อนที่จะได้รับสารพิษ (Murphy และ Talcott, 2006) และระดับของปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 12-24 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารพิษครั้งแรก (Valchev et al., 2008) และค่า PT จะ

เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป 24-48 ชั่วโมงหลังจากได้รับยาเบื่อหนู เนื่องจากระยะเวลาในการออกฤทธิ์ (toxic effect) ของ warfarin นาน 14 วัน (Valchev et al., 2008) หากไม่ได้รับการรักษาจะยังคงลดติดต่อกันนาน 1-3 สัปดาห์ (Reigart and Robert, 1999) ดังนั้นการแปลผลจากค่าการแข็งตัวของเลือดหลังจากสัตว์ได้รับสารพิษจึงไม่เหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยการได้รับยาเบื่อหนูแบบเฉียบพลัน แต่สามารถนำมาใช้ประเมินอาการตอบสนองต่อการรักษาได้ดี การตรวจหาสารพิษในกระแสเลือดมีความเหมาะสมสำหรับการวินิจฉัยที่ถูกต้องเพื่อใช้วางแผนการรักษาให้เหมาะสมจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีสุนัข 3 รายที่ทราบประวัติแน่ชัดว่ากิน warfarin เข้าไป และทำการเจาะเก็บเลือดภายในเวลา 2 ชั่วโมงนั้นสามารถตรวจพบ warfarin ในกระแสเลือดได้ในระดับ (95.93, 131.51 และ 166.71 นก./มล.) แม้ว่าทำการแก้ไขทันทีหลังจากกินยาเบื่อหนู แสดงว่ายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดดูดซึมได้อย่างรวดเร็วภายในไม่กี่นาทีถึงชั่วโมง นอกจากนี้อาหารยังมีผลเพิ่มการดูดซึมได้ดียิ่งขึ้น (Murphy และ Talcott, 2006) จากการตรวจพบสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดอนุพันธ์คูมาริน และทราบได้ถึงปริมาณของสารต้านการแข็งตัวของเลือดในเลือดหลังจากกินยาเบื่อหนูเข้าไป เป็นการช่วยยืนยันการวินิจฉัยความเป็นพิษและยังเป็นประโยชน์สำหรับการวางแผนเพื่อเป็นแนวทางการรักษาด้วย vitamin K1 อย่างต่อเนื่องได้เป็นอย่างดี โดยสามารถคำนวณระยะเวลาในการรักษาจากการคำนวณปริมาณที่ตรวจพบประกอบกับค่าครึ่งชีวิตของสารต้านการแข็งตัวของเลือด จะทำให้ทราบระยะเวลาที่สารพิษลดลงไปจนถึงระดับที่ไม่ทำให้เป็นพิษ

จากการเจาะเลือดตรวจ PT และ APTT ภายในเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าค่า PT และ APTT ที่ตรวจได้ยังคงเป็นปกติโดยที่สัตว์ไม่ได้รับการรักษาด้วย vitamin K1 มาก่อน แต่ในกรณีที่ ไม่ทราบระยะเวลาของการได้รับยาเบื่อหนู และมีการรักษาด้วย vitamin K1 มาก่อนพบว่ามีสุนัข 2 รายที่ตรวจพบยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในกระแสเลือด และมีค่าความเข้มข้นของยาเบื่อหนูในระดับต่ำกว่าสัตว์ที่เพิ่งได้รับสารพิษมา (28.45 และ 36.55 นก./มล.) และพบว่าค่า APTT ยาวนานกว่าปกติในขณะที่ค่า PT กลับมาเป็นปกติแล้ว แต่ระดับความเข้มข้นของยาเบื่อหนูที่ตรวจพบในกระแสเลือดนั้น แสดงให้เห็นว่ามีผลต่อการแสดงอาการทางคลินิกที่ผิดปกติของสัตว์ป่วย และมีสัตว์ป่วย 2 รายที่เพิ่งได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดรุ่นที่ 2 เข้าไป และทำการเจาะเลือดตรวจภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากกิน โดยมีค่า PT และ APTT ปกติ แต่ตรวจไม่พบยาเบื่อหนูในเลือดเนื่องจากวิธีการตรวจหายาเบื่อหนูในห้องปฏิบัติการสามารถตรวจพบได้เฉพาะ warfarin และ coumatetralyl

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของยาเบื่อหนูที่ตรวจพบในกระแสเลือดไม่มีความสัมพันธ์กับค่าการแข็งตัวของเลือดแต่อย่างใด เนื่องจาก 1) ระดับความเข้มข้นของ

ยาเบื่อหนูที่ตรวจพบในเลือดขึ้นกับปริมาณที่สัตว์ได้รับเข้าไป และระยะเวลาที่เจาะเลือดตรวจ หลังจากได้รับสารพิษ (Mallinckridt and Meyer, 2009) และ 2) ค่าการแข็งตัวของเลือดที่แปรเปลี่ยนไปตามปัจจัยอื่นๆ เช่น สัตว์ป่วยด้วยภาวะโรคอื่นมาก่อน ได้แก่ โรคตับ โรคไต การติดเชื้อในกระแสเลือด ภาวะการขาดสารอาหาร ที่มีผลทำให้โปรตีนในกระแสเลือดต่ำ ตลอดจนการได้รับการรักษาด้วย vitamin K1 มาก่อนที่จะมีการเจาะเลือดตรวจ PT และ APTT เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในการสังเคราะห์ plasma protein รวมทั้งปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด (Demirkan et al., 2000) การที่ตับสูญเสียการทำงานย่อมมีผลทำให้ปัจจัยดังกล่าวลดลง จากการทดสอบทางสถิติพบว่าค่า PT และ APTT ไม่มีความสัมพันธ์กัน อาจเนื่องมาจากการได้รับ vitamin K1 มาก่อนที่จะมีการเจาะเลือดตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด หรือเป็นเพราะสัตว์ได้รับสารพิษร่วมกับภาวะโรคอื่นมาเป็นระยะเวลานานทำให้ค่าการแข็งตัวของเลือด PT, APTT และ TT ผิดปกติด้วย อีกทั้งการเก็บเลือดเพื่อตรวจ PT และ APTT ทันทีหลังจากที่สัตว์ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดทำให้ได้ค่าการตรวจ PT และ APTT ปกติ

จากการซักประวัติ และการตรวจสภาพร่างกายสัตว์พบว่า หากเจ้าของมีหลักฐานแน่ชัดถึงการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด และรีบพามารักษาจะทำให้สัตว์ป่วยมีโอกาสรอดชีวิตสูงกว่าสัตว์ที่ไม่ทราบประวัติ และพามารักษาต่อเมื่อสัตว์แสดงอาการผิดปกติ ในกรณีของสัตว์ที่มีอาการทางคลินิกที่แสดงถึงการมีเลือดออกนั้นไม่ได้เป็นการบ่งชี้อย่างจำเพาะถึงการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด เนื่องจากภาวะเลือดออกอาจมีสาเหตุมาจากโรคอื่น และได้รับสารพิษชนิดนี้ร่วมด้วยอาจเพิ่มความรุนแรงของการเกิดเลือดออกได้ เช่นสัตว์ที่เป็นพยาธิในเม็ดเลือด ซึ่งเป็นเหตุทำให้เกิดภาวะโลหิตจางอยู่แล้วร่วมกับมีการใช้เกล็ดเลือดเป็นจำนวนมาก หากได้รับสารพิษร่วมด้วยก็จะยิ่งทวีความรุนแรงของภาวะเลือดออกได้ ในบางกรณีที่สัตว์มีภาวะโรคไต หรือมะเร็งร่วมอยู่แล้วย่อมทำให้ความเป็นพิษของยาเบื่อหนูรุนแรงยิ่งขึ้น (Baker et al., 2004; Jacobs, 2008) จากรายงานของ Demirkan และคณะ (2000) เกี่ยวกับการได้รับ warfarin ในผู้ป่วย renal insufficiency (CRE \geq 1.5 มก./ดล.) โดยที่ภาวะ renal insufficiency จัดว่าเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเลือดออกจากการได้รับ warfarin สภาวะโรคไตมีผลทำให้ albumin protein ลดลง ดังนั้นส่วนของ ของ warfarin อิสระ (unbound fraction) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตเป็นปกติ ทำให้เกิดความเป็นพิษเพิ่มมากขึ้น (Jacobs, 2008) นอกจากนี้ผู้ป่วยโรคไตยังมีการทำงานของเกล็ดเลือดในขั้นตอน adhesion และ aggregation ผิดปกติอยู่แล้วจึงเป็นการเสริมฤทธิ์ให้เกิดภาวะเลือดออกได้ง่ายขึ้นในผู้ป่วยที่ได้รับสารต้านการแข็งตัวของเลือด (Thoreveska et al., 2004) การเกิด thrombosis หรือ DIC ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเกิดจุดเลือดออก หรือเกิดเป็นปื้นเลือดออกได้ที่ผิวหนัง เนื่องจากมีการ

เสียหายของหลอดเลือด และมีการใช้ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดมากขึ้นกัน ถึงแม้จะมีการสร้างขึ้นเพิ่มเติมด้วยก็ตาม (เกรียงศักดิ์ ไพโรหิรัญกิจ, 2007) นอกจากนี้สัตว์ที่มีภาวะ hemangiosarcoma อยู่ก่อนนั้นมีแนวโน้มในการเกิดพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดได้ง่าย โดยความรุนแรงอาจเพิ่มเป็นทวีคูณเนื่องจากการเกิดมะเร็งที่หลอดเลือดมีผลทำให้ใช้ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด และเกล็ดเลือดไปมากดังนั้นจึงง่ายต่อการเกิดเลือดออก

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ป่วยที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลจากหลายสถานที่ จึงทำให้ไม่สามารถควบคุมปัจจัยอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องได้ เช่น การที่สัตว์มีสภาวะโรคมาก่อน ภาวะขาดสารอาหาร หรือโปรตีนบางชนิด การมีโรคแทรกซ้อนซึ่งมีผลต่อการสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด การติดเชื้อปรสิตที่มีผลให้เกิดเลือดออก และมีการใช้ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดไปมาก หรือกระทั่งโรคตับ ซึ่งตับเป็นอวัยวะสำคัญที่มีการสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดทั้งชนิดที่พึ่งพา และไม่พึ่งพา vitamin K1 ดังนั้นหากตับเกิดพยาธิสภาพ หรือการทำงานที่ไม่สมบูรณ์อาจมีผลลดการสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดได้หลายชนิด (D'Andrea et al., 2008; Jacobs, 2008) เช่น fibrinogen (ปัจจัยที่ 1) เป็นผลให้การตรวจ TT ผิดปกติ ซึ่งอาจทำให้การคัดกรองเบื้องต้นผิดพลาดได้ ในกรณีที่สัตว์ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด ที่มีผลยับยั้ง VKOR จึงควรจะมีผลต่อยาที่ 2, 7, 9 และ 10 เท่านั้น ค่า TT ที่ได้ควรจะปกติ (Daly and Giger, 2007) แต่จากการศึกษาของ Valchev และคณะ (2008) รายงานว่าสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูรุ่นที่ 2 คือ bromadiolone และ brodifacoum มีผลทำให้ค่า TT ที่ได้ยาวนานออกไป รวมทั้งการวินิจฉัยจากการตอบสนองต่อการรักษาด้วย vitamin K1 อาจไม่เหมาะสมเนื่องจากตับอาจเกิดพยาธิสภาพจนทำให้ไม่สามารถสร้างปัจจัยตั้งต้นของปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดชนิดพึ่งพาวิตามินได้ด้วย (Murphy และ Talcott, 2006) และผลจากการเก็บตัวอย่างจากหลายสถานที่ทำให้ไม่สามารถกำหนดการรักษาก่อนเจาะเลือดได้เนื่องจากการเจาะเลือดเพื่อตรวจค่าการแข็งตัวของเลือด ควรเจาะและปั่นเก็บพลาสมาในเวลา 4 ชั่วโมง (Salvagno et al., 2009) ดังนั้นสัตวแพทย์ส่วนใหญ่จึงทำการรักษาด้วย vitamin K1 ก่อนเจาะเลือด เป็นผลให้ค่าการแข็งตัวของเลือดที่ได้ไม่สัมพันธ์กับการได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีสุนัขที่สงสัยและแสดงอาการว่าได้รับยาเบื่อหนู แต่ไม่สามารถตรวจพบยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดในกระแสเลือดสุนัขได้นั้นอาจเกิดจาก 1) ความไม่เหมาะสมของวิธีตรวจด้วย HPLC เนื่องจากวิธีการตรวจในครั้งนี้สามารถวิเคราะห์หาได้เฉพาะ warfarin และ coumatetralyl สัตว์ที่ได้รับสารพิษตัวอื่นในกลุ่มเดียวกันนี้จะทำให้ตรวจหาไม่พบ ดังเช่นสัตว์ป่วยรายที่ 10 และ 11 ซึ่งมีหลักฐานแน่ชัดว่าได้รับ bromadiolone และ flocoumafen 2) ระยะเวลาที่สัตว์ได้รับยาเบื่อหนูมาเป็นระยะเวลาสั้นเกิน 3 วันขึ้นไปจนแสดง

อาการผิดปกติก่อนที่จะมาพบสัตว์แพทย์ และทำการเจาะเลือดตรวจหาสารพิษ จากการศึกษาของ Neff-Davis และคณะ (2008) รายงานว่า warfarin มีค่าครึ่งชีวิตในสุนัขอยู่ที่ 14.5 ± 4.1 ชั่วโมง ดังนั้นหากสัตว์ได้รับสารพิษมาเป็นเวลา 2-3 วันแล้ว warfarin ในเลือดซึ่งลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีการกระจายตัวของ warfarin จากกระแสเลือดไปสะสมภายในตับอย่างรวดเร็ว ทำให้ปริมาณสารพิษในกระแสเลือดลดลง (Vandenbroucke et al., 2008) จนไม่สามารถตรวจพบได้เมื่อมีค่าต่ำกว่า 6.25 นก./มล. ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดที่สามารถตรวจพบได้ (LOD) จากการศึกษาในครั้งนี้ 3) การเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ -20°C นานเกิน 1 ปี แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์อาจมีการเสื่อมสลายของ warfarin และ coumatetralyl ได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าความคงตัวของ coumatetralyl นั้นมีความคงตัวต่ำเมื่อเทียบกับ warfarin และเมื่อเวลาผ่านไป 1 เดือนพบว่าที่ความเข้มข้น 400 นก./มล. ค่าความคงตัวของ warfarin และ coumatetralyl ลดลง 1.96% และ 18.21 % ตามลำดับ จึงมีความเป็นไปได้ว่ายาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดนั้นเสื่อมสลายไปหมดทำให้ตรวจไม่พบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Rangel และ Friedrich (1997) เกี่ยวกับการคงตัวของสารต้านการแข็งตัวของเลือดว่าไม่มีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนานเกิน 71 ชั่วโมง และปริมาณความเข้มข้นของสารต้านการแข็งตัวของเลือด (bromadiolone) อาจลดลงอย่างต่อเนื่องระหว่างที่มีการเก็บ (Vindenes et al., 2008) และ warfarin จะมีความคงตัวเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C นาน 72 ชั่วโมงหลังจากผ่านการละลาย 3 ครั้ง (Valle et al., 1999) 4) สัตว์อาจไม่ได้เกิดความเป็นพิษจากยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด แต่เนื่องจากการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วยมีการคัดกรองเบื้องต้นจากประวัติการสงสัยได้รับสารพิษจากเจ้าของ หรืออาการทางคลินิกของการมีเลือดออกซึ่งเป็นอาการเริ่มต้นที่คล้ายคลึงกับสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด อย่างไรก็ตามสามารถยืนยันได้ด้วยการตรวจวิเคราะห์ยาเบื่อหนูในเลือดด้วย HPLC ดังนั้นจึงควรทำการตรวจทันทีหลังเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อป้องกันการสูญเสียไปของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

การศึกษาทางพยาธิวิทยาจากตัวอย่างสัตว์ที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด

ผลที่ได้สอดคล้องกับกลไกการออกฤทธิ์ของยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดโดยพบว่าสัตว์ที่ได้รับสารพิษชนิดนี้เข้าไปเกิดภาวะเลือดออกตามอวัยวะต่างๆ นอกจากสารต้านการแข็งตัวของเลือดจะมีฤทธิ์ต่อกลไกการแข็งตัวของเลือดและมีผลโดยตรงต่อผนังหลอดเลือด capillary โดยทำให้เกิด vasodilatation และมีผลทำให้หลอดเลือดแตกได้ง่าย (vascular fragility) เป็นผลให้มีการสูญเสีย plasma protein ออกจากผนังหลอดเลือดและยังมีผลทำให้การ

รวมกลุ่มของเกล็ดเลือดเกิดแบบหลวมๆ (Forbes et al., 1973) แสดงให้เห็นได้จากการมีเลือดออกตามผิวหนัง และอวัยวะสำคัญต่างๆ เช่นตับ ปอด ไต ลำไส้ และหัวใจ ดังภาพที่ 12, 13, 14, 15 และ 16 ตามลำดับ ซึ่งผลจากการศึกษาย้อนหลังแสดงให้เห็นการตรวจทางมพยาธิวิทยาพบจุดเลือดออกอย่างรุนแรงตามอวัยวะทั่วไปของสุนัขที่ได้รับสารพิษชนิดนี้ และตับเป็นอวัยวะที่พบจุดเลือดออกรุนแรงและสังเกตเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดดูดซึมเข้าไปในกระแสเลือดแล้วกระจายตัวไปยังตับได้อย่างรวดเร็ว มีการสะสมอยู่ในตับเป็นส่วนใหญ่ (Vandenbroucke et al., 2008) อีกทั้งยังเป็นอวัยวะที่มีหลอดเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่มากจึงมีความเสียหายมากทำให้มีเลือดออกได้ง่ายตามรายงานของ Forbes และคณะ (1973) เนื่องจากตับเป็นอวัยวะสำคัญในการกำจัดของเสียรวมทั้งสารพิษในกลุ่มนี้ มีการไหลเวียนของเลือดเข้าออกตับสูงกว่าอวัยวะอื่นจึงทำให้มีโอกาสที่จะเกิดภาวะเลือดออกได้ง่าย นอกจากนี้การสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดส่วนใหญ่สร้างขึ้นที่ตับโดยตรง ดังนั้นหากเกิดพยาธิสภาพขึ้นที่ตับ หรือมีภาวะโรคตับอยู่ก่อนการได้รับยาเบื่อหนูก็จะทำให้ลดการสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือดจึงมีโอกาสโน้มนำให้มีเลือดออกได้ง่าย ส่วนรูปแบบการกระจายของรอยโรคในตับ พบว่ามีการกระจายตัวของรอยโรคเลือดออกทั่วทั้งตับ (diffuse pattern) แต่จะพบรอยโรคเด่นชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณโดยรอบ central vein หรือ centrilobular areas ซึ่งมักเป็นบริเวณส่วนแรกของตับที่จะได้รับผลกระทบจากการได้รับสารพิษ อวัยวะที่พบจุดเลือดออกรองลงมาคือไตซึ่งจะพบการกระจายของรอยโรคเป็นแบบ diffuse pattern เช่นกัน แต่จากการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบรอยโรคค่อนข้างเด่นชัดบริเวณเนื้อไตชั้นใน เนื่องจากสารต้านการแข็งตัวของเลือดชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดสามารถกระจายไปที่ไตได้อย่างรวดเร็ว จากการที่ไตเป็นอวัยวะสำคัญในการกรองและขับทิ้งสารพิษและมีเลือดมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก ประกอบกับมีเส้นเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปในไตจึงทำให้มีโอกาสจะพบจุดเลือดออกง่ายเช่นกัน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสุนัขแต่ละตัวที่ได้รับสารพิษนั้นมีความรุนแรงของการเกิดจุดเลือดออกที่แตกต่างกันซึ่งเกิดจากหลายปัจจัยด้วยกัน ปัจจัยหลักที่มีผลกระทบโดยตรงคือ ชนิด และปริมาณของสารพิษที่ได้รับเข้าไปในสุนัขแต่ละตัวนั้นไม่เท่ากัน (Kohn et al., 2003) และอาจมีปัจจัยอื่น ๆ ร่วมด้วย ซึ่ง Gage และ Eby (2003) ได้เรียกปัจจัยเสี่ยงในการทำให้เลือดออกได้ง่ายว่า COUMARINS โดยเป็นตัวอักษรย่อมาจากภาวะโรคต่างๆ ได้แก่ Chronic renal insufficiency, Other drugs (เช่น aspirin), Uncontrolled hypertension, Malignancy, Alcohol abuse, Rebleeding risk, Increased age, Neuropsychiatric physical impairment และ Stroke ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Olson และคณะ (2008) และ Jacobs (2008) เกี่ยวกับปัจจัยเสี่ยงดังกล่าว รวมทั้งสภาวะการทำงานของตับบกพร่อง ประวัติการเคยมีเลือดออกจาก

ทางเดินอาหาร และ hypoproteinemia เป็นต้น ภาวะดังกล่าวไม่สามารถตรวจได้ก่อนที่สัตว์จะเสียชีวิต นอกจากตับและไตแล้วยังมีอวัยวะอื่นๆอีกที่ตรวจพบจุดเลือดออก อันได้แก่ ลำไส้ หัวใจ ปอด ม้าม ไทมีส ต่อมหมวกไต และตับอ่อน ซึ่งล้วนเป็นอวัยวะที่มีเลือดมาเลี้ยงมากเช่นกัน และมีการแพร่กระจายของสารต้านการแข็งตัวของเลือดไปตับ ปอด ม้าม และไต (Olson et al., 2008) อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาจากประวัติย้อนหลัง และเป็นการตรวจพบจุดเลือดออกในอวัยวะที่แตกต่างกันในสุนัขบางรายเท่านั้นทำให้ได้ข้อมูลไม่ครบถ้วน และผลการให้คะแนนรอยโรคพบว่าความรุนแรงของพยาธิสภาพที่แตกต่างกันนั้นน่าจะมีผลมาจากการได้รับสารพิษในปริมาณที่แตกต่างกัน ผลจากการตรวจสอบโดยวิธี TLC นั้นเป็นการตรวจสอบแบบคัดกรองว่าสัตว์ได้รับสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือดเท่านั้น จึงไม่สามารถบ่งบอกได้ถึงชนิดและปริมาณของสารพิษที่รับเข้าไป

เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาใดๆที่ประเมินความรุนแรงของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาจากการพบจุดเลือดออกของสัตว์ที่ได้รับสารพิษชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการพัฒนารูปแบบการประเมินความรุนแรงของรอยโรคจากการพบจุดเลือดออกในอวัยวะต่างๆให้เป็นระบบและสามารถให้คะแนนเป็นตัวเลข โดยได้ดัดแปลงการให้คะแนนดังกล่าวมาจากการให้คะแนนรอยโรคจุดเลือดออกจากหลากหลายการศึกษาในแต่ละสภาวะโรคที่ต่างกักัน (Broccard et al., 1998 Schmidt et al., 1991)

2. ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถติดตามผลการรักษาได้ทุกราย มีเหตุผลจากหลายปัจจัยประกอบกัน เช่น เมื่อได้รับการรักษาผ่านไป 1 สัปดาห์แล้วสัตว์ที่รอดชีวิตมักมีอาการดีขึ้นจนสามารถวิ่งเล่นได้ตามปกติทำให้เจ้าของไม่พาสัตว์มาตรวจตามนัด อีกทั้งการเจาะเลือดเพื่อนำมาวิเคราะห์ต้องใช้เลือดอย่างน้อย 5 มล. หากเป็นสัตว์ป่วยตัวเล็กเจ้าของมักไม่ยินยอมให้เจาะเลือด และการเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วยที่เข้ามารักษาในโรงพยาบาลจากหลายสถานที่ทำให้ไม่สามารถควบคุมปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้ เช่น การที่สัตว์มีสภาวะโรคมาก่อน ภาวะขาดสารอาหารหรือโปรตีนบางชนิด ซึ่งมีผลต่อการสร้างปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด หากมีการศึกษาต่อในอนาคตควรทำการศึกษาในรูปแบบการทดลองซึ่งสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆที่มีผลกระทบได้ และสามารถทำการศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยใช้ระยะเวลาที่ยาวนานเพื่อรวบรวมผลให้สมบูรณ์

จากการสอบถามขณะเก็บตัวอย่างสัตว์ป่วยพบว่า มีสัตว์ป่วยจำนวนมากที่กินยาเบื่อหนูจากการวางยาเบื่อหนูภายในบ้าน การที่เจ้าของรีบพามาพบสัตวแพทย์โดยทันที ทำให้สัตว์เลี้ยงมีโอกาสรอดชีวิตเพิ่มมากกว่าสัตว์เลี้ยงที่เจ้าของพามาพบสัตวแพทย์หลังจากสัตว์แสดง

อาการผิดปกติ ดังนั้นสัตวแพทย์จึงควรมีบทบาทในด้านประชาสัมพันธ์ถึงความรุนแรง และผลอันสืบเนื่องจากการได้รับยาเบื่อหนูชนิดด้านการแข็งตัวของเลือด ในปัจจุบันการรักษาพิษของยาเบื่อหนูชนิดนี้หลังจากให้สัตว์ป่วยกลับบ้านได้ยังคงใช้ vitamin K1 ในรูปแบบยาน้ำสำหรับฉีดให้กินอยู่ซึ่งมักไม่สะดวกสำหรับการแบ่งยา และการเก็บรักษา อีกทั้งยังมีราคาที่สูงจนเป็นภาระของเจ้าของ ปัจจุบันมีการผลิต vitamin K1 ชนิดเม็ดสำหรับสุนัขออกมาจำหน่ายในต่างประเทศ โดยมีปริมาณความเข้มข้นของยาที่เหมาะสมสำหรับสุนัข และสามารถเก็บรักษาได้ง่ายดังนั้นหากเปลี่ยนจากรูปแบบยาน้ำมาเป็นยาเม็ดจะช่วยให้การรักษามีผลสำเร็จเพิ่มมากขึ้น

จากการตรวจความคงตัวของ warfarin ในวันที่ 8 พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และกลาง warfarin ตรวจพบในปริมาณที่สูงกว่าวันแรกอาจมีสาเหตุเนื่องจากปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ระหว่างการตรวจวิเคราะห์ เช่น อุณหภูมิ หรือ กระทั่งการระเหยไปของตัวทำละลาย ดังนั้นจึงควรทำ internal standard ร่วมด้วยทุกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผลที่ตรวจได้

จากการศึกษาทางพยาธิวิทยาซึ่งเป็นการศึกษาจากตัวอย่างย้อนหลัง ทำให้พบปัญหาในการเก็บตัวอย่างไม่ครอบคลุมทุกอวัยวะที่มีรอยโรคจึงไม่สามารถเปรียบเทียบความรุนแรงในแต่ละอวัยวะชัดเจน ในกรณีนี้ต้องการศึกษาความรุนแรงของรอยโรคให้ครบสมบูรณ์จึงควรทำการเก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อให้ครบทุกส่วนในแต่ละอวัยวะ เพื่อหาอุบัติการณ์ตำแหน่งที่พบจุดเลือดออกได้มาก หรือรูปแบบของการเกิดจุดเลือดออกในสัตว์ที่ได้รับสารพิษชนิดนี้ต่อไป

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เกรียงศักดิ์ ไพโรหิรัญกิจ. 2007 (2550). เลือดออกผิดปกติในสัตว์เลี้ยง และการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ : กรุงเทพฯ. 46-107.
- วรา พานิชเกรียงไกร. 2006 (2549). สารต้านการแข็งตัวของเลือด. ใน: สารพิษจากยาในสุนัขและแมว. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ตีรณสาร. 92-106.

ภาษาอังกฤษ

- Baker, R.I., Coughlin, P.B., Gallus, A.S., Harper, P.L., Salem, H.H. and Wood, E.M. 2004. Warfarin reversal: consensus guidelines, on behalf of the Australian society of thrombosis and haemostasis. M. J. A. 181(9): 492-496.
- Binev, R., Petko, P. and Rusenov, A. 2005. Intoxication with anticoagulant rodenticides bromadiolone in a dog – a case report. Vet. Arhiv. 75(3): 273-282.
- Blocker, T.L. and Robert, B.K. 1999. Acute tracheal obstruction associated with anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. J. Small. Anim. Pract. 40: 577-580.
- Boothe, D.M. 2001. Drug acting on blood or blood-forming organs. In: Small animal clinical pharmacology and therapeutics. Philadelphia. W.B. Saunders company. 107-124.
- Broccard, A.F., Hotchkiss, J.R., Kuwayama, N., Olson, D.A., Jamal, S., Wangensteen, D.O. and Maini, J.J. 1998. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. Am. J. Respir. Crit. Care. Med. 157: 1935-1942.
- Brown, A.J. and Waddell, L.S. 2009. Rodenticides. In: Small animal critical care medicine. D.C. Silverstein, K. Hopper. (eds.) Canada: Sauder Elsevier. 346-348.
- Custódio das Dôres, S.M., Booth, S.L., Martini, L.A., de Carvalho Gouvêa, V.H., Padovani, C.R., de Abreu Maffei, F.H., Campana, A.O. and Rupp de Paiva, S.A. 2007. Relationship between diet and anticoagulant response to warfarin. Eur. J. Nutr. 46: 147-154.

- D' Andrea, G., D' Ambosio, R. and Margaglione, M. 2008. Oral anticoagulants: pharmacogenetics relationship between genetic and non-genetic factors. *Blood*. 22: 127-140.
- Danis Minister of the environment. 2008. "Danish background document on Coumatetralyl" [Online]. Available: http://ecb.jrc.it.classlab/03206a1_DK_coumatetralyl.doc. [2009, August 18]
- Demirkan, K., Stephen, M.A., Newman, K.P. and Self, T.H. 2000. "Response to warfarin and other oral anticoagulants: effects of the disease states" [Online]. Available : <http://www.medscape.com/viewarticle/410539>. [2010, February 27]
- Daly, M.L. and Giger, U. 2007. A rodenticide exposed and bleeding beagle dog with hereditary factor VII deficiency. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*. 17(2): 170-174.
- DuVall, M.D., Murphy, M.J., Ray, A.C. and Reager, J.C. 1989. Canine studies on second-regeneration anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *J. Vet. Diag. Invest.* 1: 66-68.
- Eason, C.T., Murphy, E.C., Wright, G.R.G. and Spurr, E.B. 2002. Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *N. Z. L. Ecol.* 11: 35-48.
- Eason, C.T. and Wickstrom, M. 2001. Vertebrate pesticide toxicology manual (poisons) Information on poisons used in New Zealand as vertebrate pesticides-Department of conservation technical series 23. Wellington: Department of conservation. 41-74.
- Environmental Health Criteria 175. 1995. "Anticoagulant rodenticides" [Online]. Available : <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc175.htm>. [2007, July 22]
- Forbes, C.D., Thompson, C., Prentice, C.R.M., McNicol, G.P. and McEwan, A.D. 1973. Experimental warfarin poisoning in the dog: Platelet function, coagulation and fibrinolysis. *J. Comp. Path.* 83: 173-180.
- Gage, B.F. and Eby, C.S. 2003. Pharmacogenetics and anticoagulant therapy. *J. Thromb. Thrombolysis*. 16(1/2): 73-78.
- Hansen, N. and Beck, C. 2003. Bilateral hydronephrosis secondary to anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*. 13(2): 103-107.

- Harrell, T.W., Latimer, K.S., Batin, P.J. and Krimer, P.M. 2003. "Anticoagulant rodenticide toxicosis in the dog and cat" [Online]. Available:
<http://www.Vet.uga.edu/vpp/CLERK/Harrell/index.php>. [2007, August 9]
- Holbrook, A.M. Pereira, J.A., Labiris, R., Mcdonald, H., Douketis, J.D., Crowther, M and Wells, P.S. 2005. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch. Intern. Med.* 165: 1095-1106.
- International occupational Safety and health Information Centre. 1995. "Flocoumafen" [Online]. Available:
http://www.ilo.org/safework_bookshelf/english?d&nd=857172524. [2009, August 18]
- International Programme on Chemical Safety. 2009. "Data sheets on Pesticides No.62 Chlorophacinone" [Online]. Available:
http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest62_e.htm. [2009, August 18]
- International Programme on Chemical Safety. 2009. "Difenacoum Health and safety guide" [Online]. Available:
<http://www.inchem.org/documents/hsg/hsg/hsg095.htm#sectionNumber:1.2>. [2009, August 18]
- Jacobs, L.G. 2008. Warfain pharmacology, clinical management, and evaluation of hemorrhagic risk for the elderly. *Cardio. Clin.* 26: 157-167.
- Jin, M., Chen, X. and Li, X. 2007. Determination of five 4-hydroxycoumarin rodenticides in whole blood by performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Se. Pu.* 2(2): 214-216.
- Kohn, B., Weingart, C., and Gifer, U. 2003. Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *J. Feline. Med. Sur.* 5: 295-304.
- Latimer, K.S., Mahaffey, E.A. and Prasse, K.W. 2003. Laboratory evaluation of coagulation and fibrinolysis. In: *Veterinary laboratory medicine clinical pathology.* Iowa : Iowa State Press. 126-135, 339.
- Leikin, J.B. and Paloucek, F.P. 2007. *Poisoning and toxicology handbook.* 4th ed. New York : Informa Health Care. 1064.

- Liggett, A.D., Thompson, J., Frazier, K.S., Styer, E.L., and Sangster, L.T. 2002. Thymic hematoma in juvenile dogs associated with anticoagulant rodenticide toxicosis. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14: 416-419.
- Lombardi, R., Hantarangkul, V., Cataneo, M. and Tripodi, A. 2003. Measurement of warfarin in plasma by high performance liquid chromatography (HPLC) and its correlation with the international normalized ratio. *Thromb. Res.* 11: 281-284.
- Lorgue, G., Nahas, K., Keck, G. and Rampaud, M. 1986. Intoxication of domestic and wild animals by anticoagulant rodenticides – synthesis of data from the French national veterinary antipoison center. *Proceedings of the twelfth vertebrate pest conference.* California, USA: 82-87.
- Mallinckridt, V.G. and Meyer, L.V. 2009. Anticoagulants. In: *Clinical toxicological analysis; procedures, results, interpretation volume 1.* W.R. Külpmann (ed) Federal republic of Germany: Wiley-VCH. 301-311.
- Marek, L.J. and Koskinen, W.C. 2007. Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 55: 571-576.
- Means, C. 2003. Anticoagulant Rodenticides. In : *Clinical Veterinary Toxicology.* K.H. Plumlee (ed.) St.Louis: Mosby. 444-446.
- Merola, V. 2002. Anticoagulant rodenticides: Deadly for pets, dangerous for pets. *Vet. Med.* 97: 716-722.
- Murphy, M.J. 2007. Anticoagulant rodenticide. In: *Veterinary Toxicology Basic and Clinical Principles.* R.C. Gupta (ed.) Amsterdam: Elsevier. 527-547, 1077-1082, 1156.
- Murphy, M.J. 2002. Rodenticides. *Vet. Clin. Small. Anim.* 32: 469-484.
- Murphy, M.J. and Talcott, P.A. 2006. Anticoagulant rodenticide. In : *Small animal toxicology.* 2nd ed. M.E. Peterson, P.A. Talcott (eds.) St.Louis : Elsevier Saunders. 563-577.
- Neff-Davis, C.A., Davis, L.E. and Gillette, E.L. 2008. Warfarin in the dog: pharmacokinetics as related to clinical response. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 4(2): 135-140.

- Nelson, A.T. 2006. "Ingestion of superwarfarin leading to coagulopathy: A case report and review of the literature" [Online]. Available:
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868388>. [2008, May 20]
- Olson, K.R., Trickey, D.N., Miller, M.A. and Yungmann Hile L.M. 2008. "Toxicity, warfarin and superwarfarins" [Online]. Available :
<http://emedicine.medscape.com/article/821038-overview>. [2009, March 6]
- Osman, A., Arbring, K. and Lindahl, T.L. 2005. A new high-performance liquid chromatographic method for determination of warfarin enantiomers. *J. Chromatogr. B.* 826: 75-80.
- Padgett, S.L., Stokes, J.E., Tucker, R.L. and Wheaton, L.G. 1998. Hematometra secondary to anticoagulant rodenticide toxicity. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 34(5): 437-439.
- Palkimas, M.P., Skinner, H.M., andhi, P.J. and Gardner, A.J. 2003. Polymorphism induced sensitivity to warfarin: A review of the literature. *J. Thromb. Thrombolysis.* 15(3): 205-212.
- Palmer, R.B. Alakija, P., de Beca, J.E. and Nolte, K.B. 1999. Fetal brodifacoum rodenticide poisoning: autopsy and toxicologic findings. *J. Forensic. Sci.* 44: 851-855.
- Park, B.K. 1998. Warfarin: metabolism and mode of action. *Biochem. Pharmacol.* 37: 19-27.
- Pesticides properties database. 2009. "coumachlor" [Online]. Available:
<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ipuc/180.htm>. [2009, August 18]
- Pesticide Management education program. 1993. "Diphacinone" [Online]. Available:
<http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/extoxnet/dienochor-glyphosate/diphacinone-ext/html>. [2009, August 18]
- Prater, R. and Tvedten, H. 2004. Hemostatic Abnormalities. In: *Small animal's clinical diagnosis by laboratory methods*. 4th ed. M.D. Willard, H. Tvedten (eds.) St. Louis: Saunders. 92-112, 390-391.
- Radi, Z.A. and Thompson, L.J. 2004. Renal subcapsular hematoma associated with brodifacoum toxicosis in a dog. *Vet. Hum. Toxicol.* 46: 83-84.

- Rangel, I. and Friedrich, A. 1997. Detection of anticoagulant rodenticides (4-hydroxycoumarins) by thin layer chromatography and reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Vet. Res. Commun.* 17: 421-427.
- Reigart, J.R. and Robert, J.R. 1999. "Recognition and management of pesticide poisonings" [Online]. Available: <http://www.epa.gov/oppfead1/safety/healthcare/handbook/handbook.htm>. [2009, June 12]
- Robben, J.H., Kuijper, E.A. and Mout, H.C. 1998. Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *Vet.O.* 20(1): 24-27.
- Rozanski, E.A., Drobatz, K.J., Hughes, D, Scotti, M. and Giger, U. 1999. Thrombotest (PIVKA) Test Results in 25 Dogs with Acquired and Hereditary Coagulopathies. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 9(2): 73-78.
- Salvagno, G.L., Lippi, G., Montagnana, M., Franchini, M., Poli, G. and Guidi, G.C. 2009. Influence of temperature and time before centrifugation of specimens for routine coagulation testing. *Int. J. Lab. Hematol.* 31(4) : 462-467.
- Schmidt, J., Rattner, D.W., Lewandrowski, K., Compton, C.C., Mandavilli, U., Knoefel, W.T. and Warshaw, A.L. 1991. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg.* 215: 44-56.
- Sheafor, S.E. and Couto, C.G. 1999. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 35: 38-46.
- Siguret, V., Pautas, E. and Gouin-Thibault, I. 2008. Warfarin therapy: influence of pharmacogenetic and environmental factors on the anticoagulant response to warfarin. *Vitamins and Hormones.* 78: 247-264.
- Sokidoff, C.H. 2001. Diagnosis by clinical sign. In: *Laboratory profiles of small animal disease.* 3rd ed. St.Louis: Mosby. 240-243.
- Shanmugan, S., Lee, E.S., Jeong, T.C., Yong, C.S., Choi, H.G., Woo, J.S. and Yoo, B.K. 2007. The effect of 1- Furan-2-yl-3-pyridine-2-yl-propenone on pharmacokinetic parameters of warfarin. *Arch. Pharm. Res.* 30(7): 898-904.

- Smith, S.A., Kraft, S.L., Lewis, D.C. and Freeman, L.C. 2000. Plasma pharmacokinetics of warfarin enantiomers in cats. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 23: 329-337.
- Thoreveska, N., Amoateng-Adjepong, Y. Sabahi, R. Schiopescu, I. Salloum, A. Muralidharen, V. and Manthous, C. A. 2010. Anticoagulant in patients with renal insufficiency: a comparison of bleeding rates with unfractionated heparin vs enoxaparin. *Chest.* 125: 856-863.
- Vandenbroucke, V., Bousquet-Melou, A., De Backer, P. and Croubels, S. 2008. Pharmacokinetics of eight anticoagulant rodenticides in mice after single oral administration. *J. Vet. Pharmacol. Therap.* 31: 437-445.
- Vandenbroucke, V., Desmet, N., Backer, P.D. and Croubels, S. 2008. Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animals plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 869: 101-110.
- Valchev, I, Binev, R., Yordaniva, V. and Nikolov, Y. 2008. Anticoagulant rodenticides intoxication in animals - A review. *Turk. J. Anim. Sci.* 32(4): 237-243.
- Valle, E., Marcoux, M.J. and Lebel, M. 1999. "HPLC method with fluorescence detection for the determination of warfarin in human plasma" [Online]. Available: http://www.aapsj.org/abstracts/AM_1999/1258.htm. [2009, June 19]
- Vindenes, V., Karinen, R., Hasvold, I., Bernard, J.P., Mørland, J.G. and Christophersen, A.S. 2008. Bromadiolone poisoning: LC-MS method and pharmacokinetic data. *J. Forensic. Sci.* 53(4): 993-996.
- Waddell, R. and Poppenga, L.S. 2004. Respiratory toxicology. In: *Textbook of respiratory disease in dogs and cats.* L.G. King.(ed.) St.Louis: Saunders. 562-566.
- Wang, Y., Kruzik, P., Helsberg, A., Helsberg, I. and Rausch, W.D. 2007. Pesticide poisoning in domestic animals and livestock in Australia: 6 years retrospective study. *Forensic. Sci. Int.* 169: 157-160.
- Watt, B.E., Proudfoot, A.T., Badberry, S.M. and Vale, J.A. 2005. Anticoagulant rodenticides. *Toxicol. Rev.* 24(4): 259-269.

Woody, B.J. 1992. Clinical approach to the diagnosis of diseases and disorders in pets and domestic animals sometimes mistaken for anticoagulant toxicosis.

Proceedings of the Fifteenth Vertebrate Pest Conference. Mississippi, USA: 199-203.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



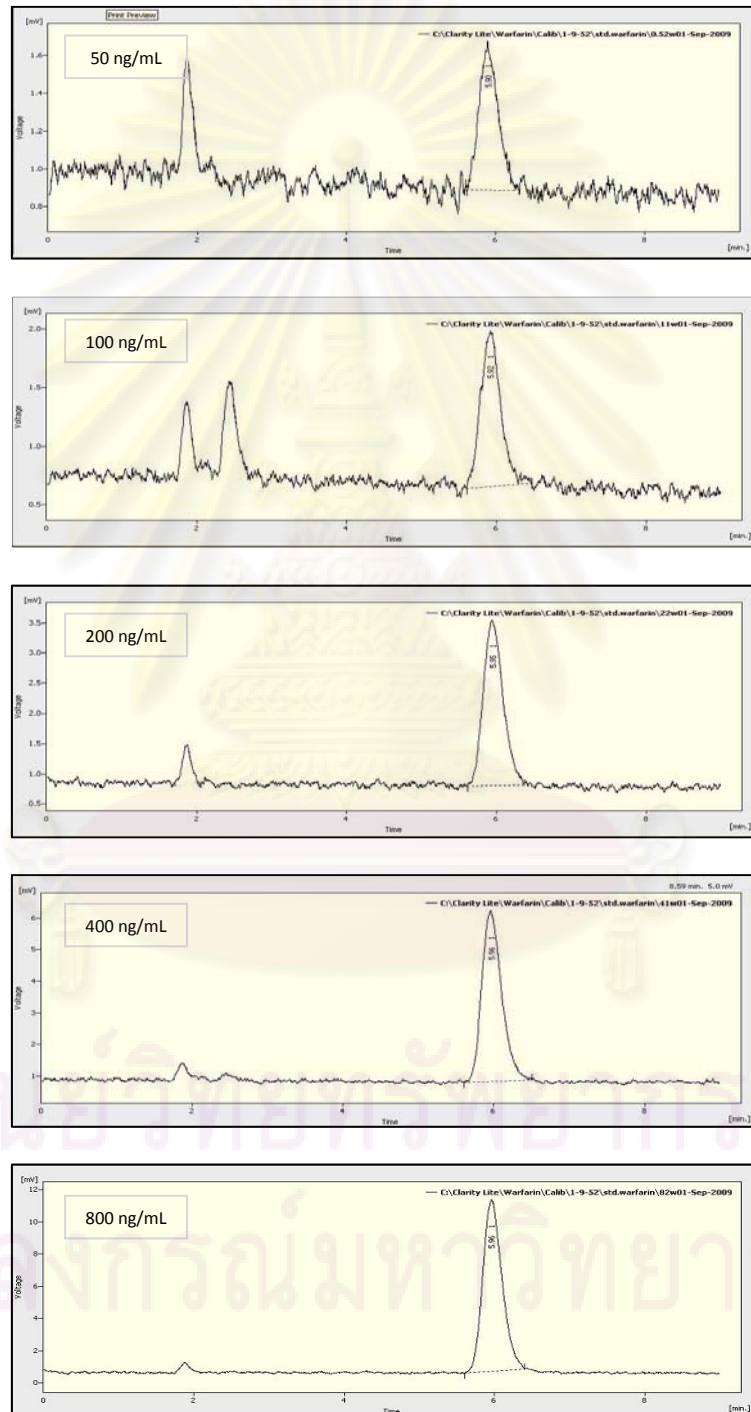
ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

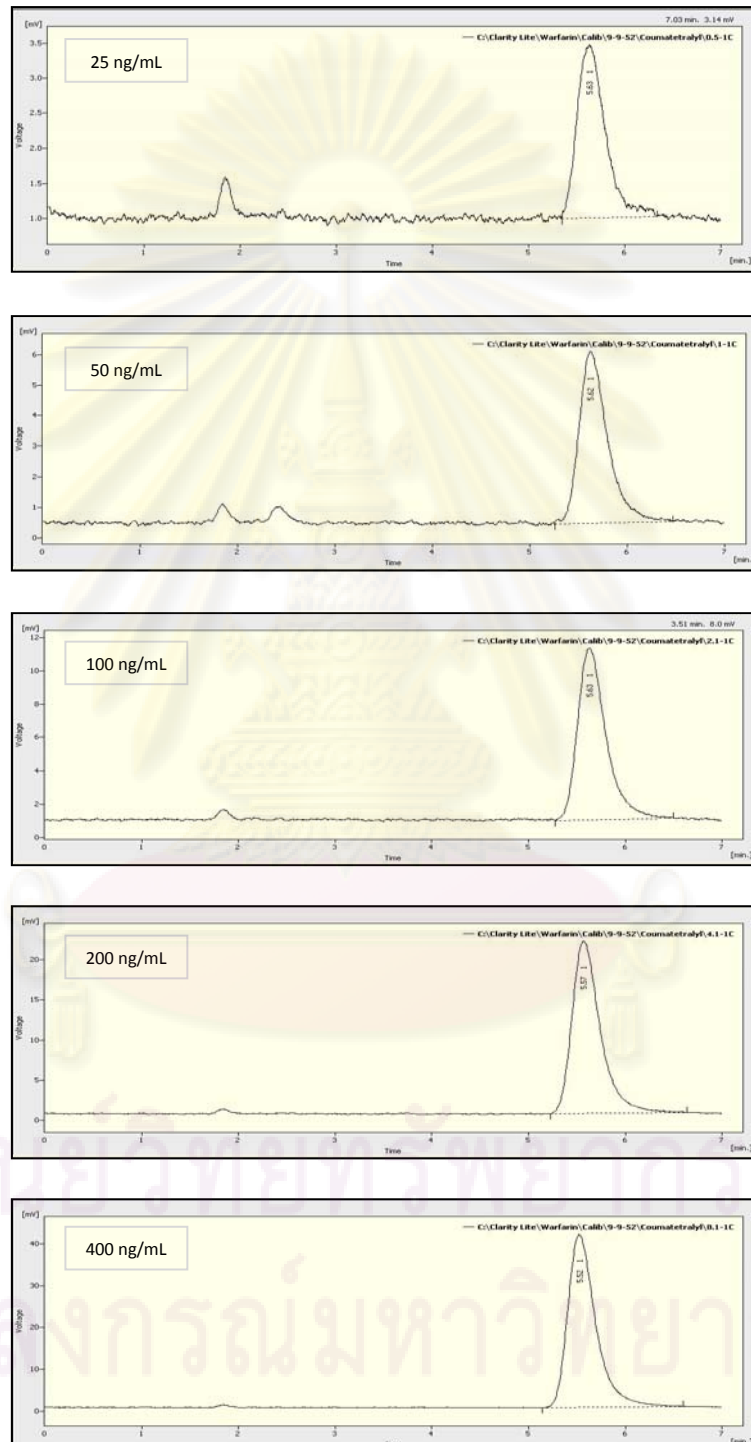
ภาคผนวก ก

รูปภาพ

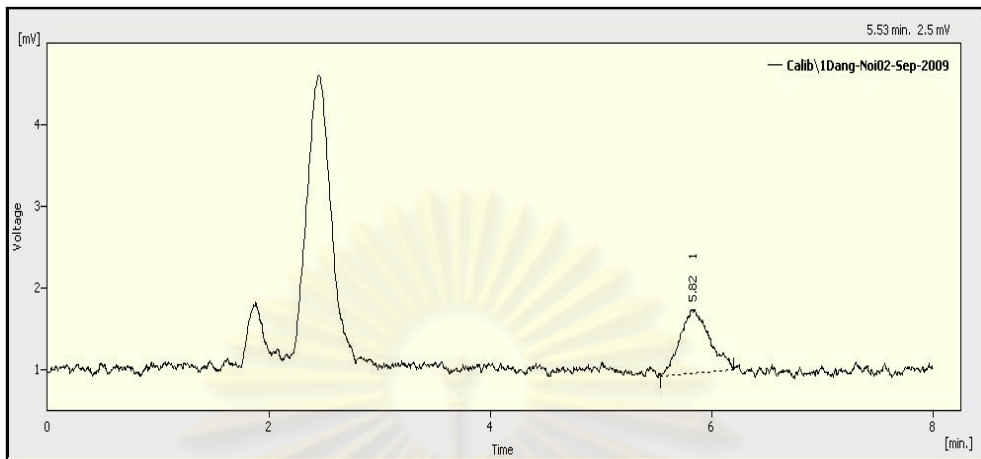
1. การตรวจหาชนิดและปริมาณของ warfarin และ coumatetralyl จากเลือดโดย HPLC



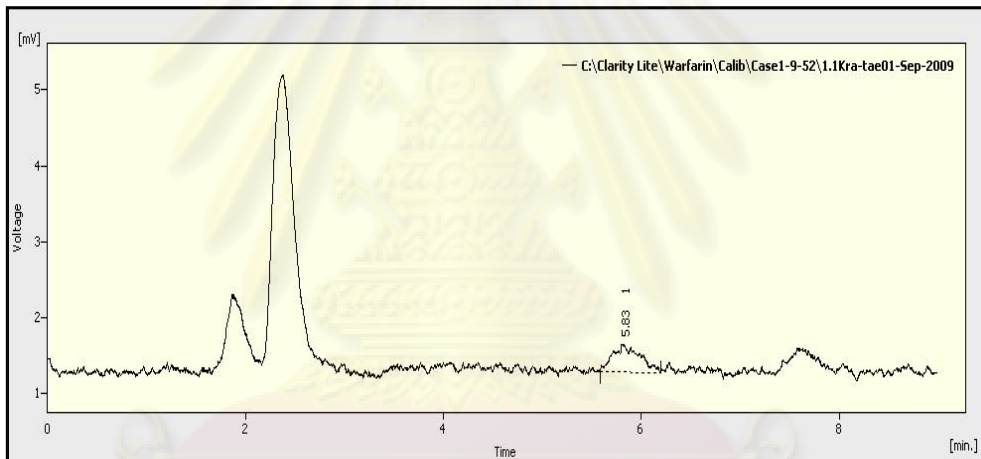
ภาพที่ 17 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน warfarin ที่ระดับความเข้มข้น 50, 100, 200, 400 และ 800 นก./มล. โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) เท่ากับ 13.68, 24.70, 49.96, 98.29 และ 195.82 ตามลำดับ



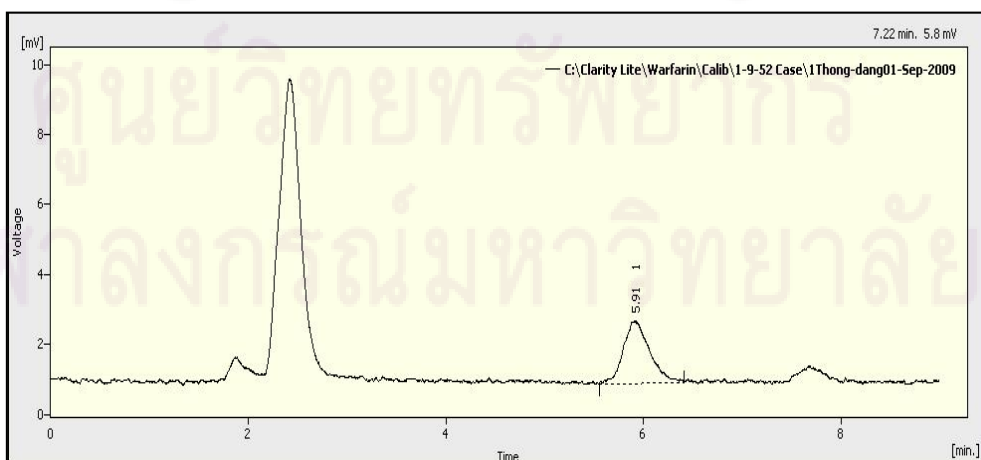
ภาพที่ 18 แสดง chromatogram ของสารมาตรฐาน coumatetralyl ที่ระดับความเข้มข้น 25, 50, 100, 200 และ 400 นก./มล. โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) เท่ากับ 47.91, 109.40, 205.24, 407.05 และ 868.35 ตามลำดับ



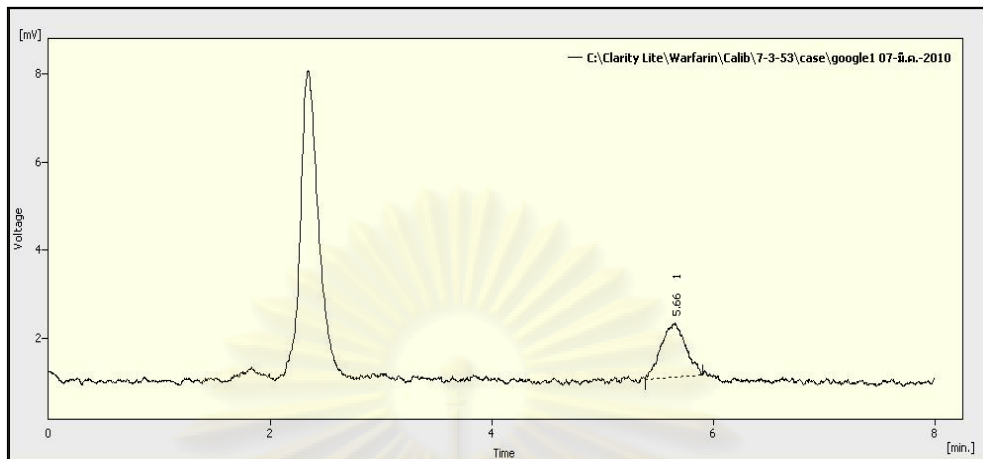
ภาพที่ 19 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 8 ที่ได้รับ coumatetralyl



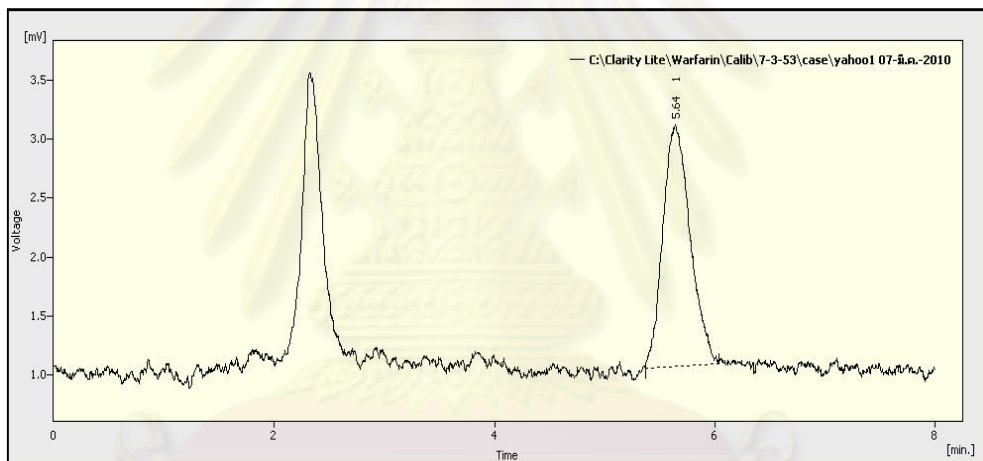
ภาพที่ 20 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 11 ที่ได้รับ warfarin



ภาพที่ 21 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 12 ที่ได้รับ warfarin



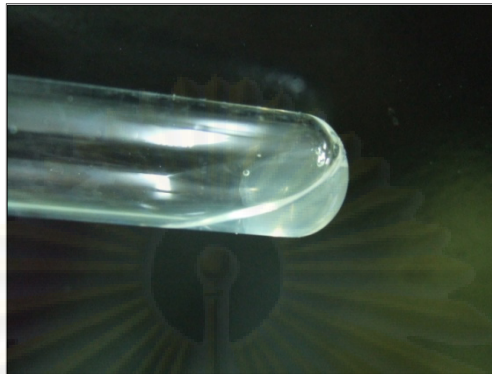
ภาพที่ 22 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 13 ที่ได้รับ warfarin



ภาพที่ 23 ภาพ chromatogram ของสัตว์ป่วยรายที่ 14 ที่ได้รับ warfarin

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ตรวจการแข็งตัวของเลือด (Coagulation tests)



ภาพที่ 24 แสดงภาพการเกิดไฟบรินจากการทดสอบ prothrombin time

3. ผลการสำรวจยาเบื่อหนูที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดในประเทศไทย



ภาพที่ 25 Warfarin



ภาพที่ 26 Coumatetralyl



ภาพที่ 27 Flocoumafen



ภาพที่ 28 Difethialone



ภาพที่ 29 Difenacoum

4. ภาพสัตว์ป่วยที่ได้รับยาเบื่อหนูชนิดต้านการแข็งตัวของเลือด



ภาพที่ 30 สัตว์ป่วยรายที่ 12 ขณะทำการอาเจียน warfarin ที่กินเข้าไป

ภาคผนวก ข

น้ำยาเคมี

1. Phosphate buffer 0.02 M, pH 21 ลิตร

Monosodium phosphate, monohydrate	2.76	กรัม
Water (HPLC grade) ปรับปริมาตรจนครบ	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย 1 N HCl

กรองด้วย nylon membrabe filters 0.45 μ m

2. Ammonium acetate/Triethylamine buffer, pH 5.2 1 ลิตร

Ammonium acetate	3.85	กรัม
Triethylamine	2	มล.
Glacial acetic acid	2	มล.
Water (HPLC grade) ปรับปริมาตรจนครบ	1	ลิตร

ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH

กรองด้วย nylon membrabe filters 0.45 μ m

3. Mobile phase สำหรับละลายสารที่สกัดได้ อัตราส่วน 75:25 , 100 มล.

Methanol (HPLC grade)	75	มล.
Ammonium acetate/Triethylamine buffer	25	มล.

กรองด้วย nylon membrabe filters 0.45 μ m

Degas ด้วยการ sonicate นาน 30 นาที

4. Mobile phase สำหรับ HPLC อัตราส่วน 62:38 , 1 ลิตร

Methanol (HPLC grade)	620	มล.
Ammonium acetate/Triethylamine buffer	380	มล.

กรองด้วย nylon membrabe filters 0.45 μ m

Degas ด้วยการ sonicate นาน 30 นาที และก๊าซ Helium

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอัจฉราวรรณ โลหะวนิชย์ เกิดเมื่อวันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ. 2523 ที่จังหวัด นครสวรรค์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ในปี พ.ศ. 2548 และเข้าทำงานเป็นอาจารย์ประจำภาควิชา เภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2548 จนถึง ปัจจุบัน และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตว แพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปี พ.ศ. 2550 โดยได้รับ ทูลอดหนุนวิทยานิพนธ์ในระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย