



บทที่ 5

วัสดุและวิธีการ

วัสดุ

1. ประชากรและตัวอย่าง

1.1 หลักเกณฑ์ในการคัดเลือก

(ก) เป็นผู้ป่วยกลุ่มอาการเนโฟรติกที่ไม่ทราบสาเหตุ โดยอาศัยเกณฑ์ในการวินิจฉัย คือ มีอาการบวม, โปรตีนในปัสสาวะมากกว่าหรือเท่ากับ 3.5 กรัมต่อวัน และระดับอัลบูมินในเลือดน้อยกว่า 3.0 กรัม/ดล.

(ข) ผู้ป่วยต้องได้รับการเจาะไตแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง

(ค) ระดับซีรั่มครีอะตินินน้อยกว่า 4 มก./ดล.

(ง) อายุ 15 ปีขึ้นไป

(จ) ผู้ป่วยอาจได้รับการรักษาด้วยยาเพรดนิโซโลนมาก่อนหรือไม่ก็ได้

1.2 เกณฑ์ในการคัดออก

(ก) มีอาการหรืออาการแสดงของกลุ่มอาการเนโฟรติกที่เกิดจากสาเหตุอื่น เช่น โรคเกี่ยวกับคอลลาเจน, ซิฟิลิส, เบาหวาน, เอดส์, ประวัติติดยาเสพติด เป็นต้น

(ข) มีการเสื่อมการทำงานของไตมาก (ระดับซีรั่มครีอะตินินมากกว่า 4 มก./ดล.)

(ค) มีครรภ์

2. การคำนวณขนาดตัวอย่าง

ใช้การคำนวณขนาดตัวอย่างของข้อมูลเชิงปริมาณที่ได้จากการวัด (quantitative data)

$$\text{จากสูตร } N = \frac{S^2}{SE^2}$$

การทำการวิจัยนำร่องหาค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของ renal vascular transit time ในประชากร (S) = 1.54 วินาที กำหนดที่ระดับความเชื่อมั่น 95% มี S.E. = 0.4

$$\begin{aligned} \text{แทนค่า } N &= \frac{(1.54)^2}{(0.4)^2} \\ &= \frac{2.37}{0.16} = 15 \text{ คน} \end{aligned}$$

ในการแบ่งกลุ่มแต่ละกลุ่มของกลุ่มอาการเนโฟรติกที่ไม่ทราบสาเหตุ ได้แก่ mesangial proliferative glomerulonephritis, (IgM และ IgA), membranous glomerulonephritis, membranoproliferative GN, focal and segmental glomerulosclerosis ควรให้มีปริมาณประชากรในแต่ละกลุ่มอย่างน้อย 15 คน เพื่อขจัด β error

3. การสังเกตและการวัด

ผู้ป่วยที่ได้รับการคัดเลือกและให้ความยินยอม จะได้รับการรวบรวมประวัติย้อนหลังในอดีต และบันทึกประวัติไว้ได้แก่

- (1) ประวัติส่วนตัว เช่น อายุ, เพศ, อาชีพ, ภูมิลำเนา
- (2) ประวัติของโรค ตั้งแต่เริ่มวินิจฉัยได้ และเมื่อเริ่มให้การรักษาแล้ว บันทึกการตอบสนองของโรคต่อยา
- (3) ผลการตรวจทางชิ้นเนื้อ
- (4) ตรวจร่างกายทั่วไป วัดความดันโลหิต ส่วนสูง น้ำหนัก

ผู้ป่วยจะได้รับการตรวจทางห้องปฏิบัติการดังนี้

BUN, creatinine, albumin, globulin, cholesterol, triglyceride

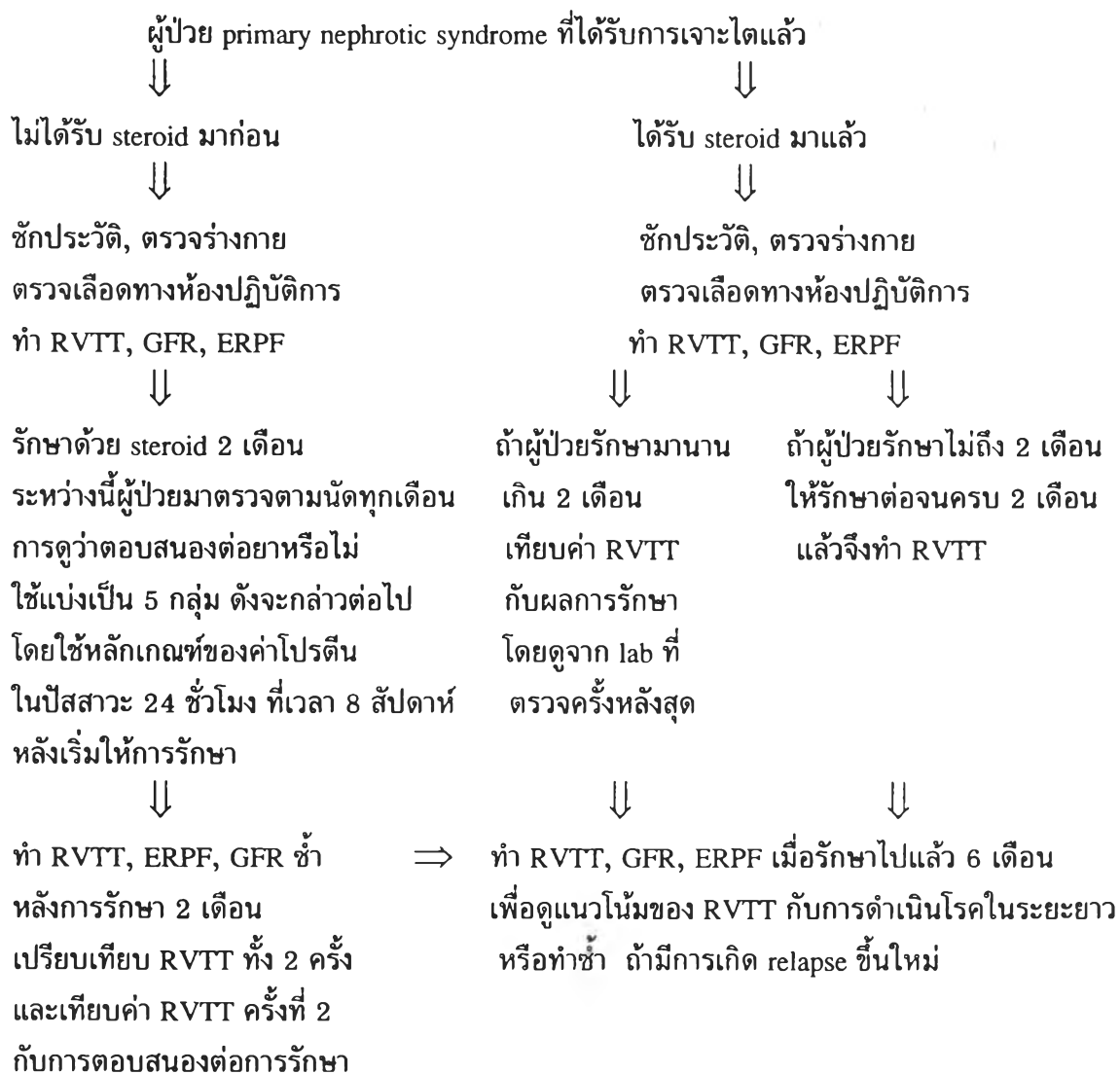
CBC

ปัสสาวะ 24 ชั่วโมง หาค่าโปรตีนด้วยวิธี Biuret และ creatinine clearance

4. วิธีการ

ผู้ป่วยทุกรายจะได้รับการตรวจ renal vascular transit time ที่หน่วยเวชศาสตร์นิวเคลียร์ ภาควิชารังสีวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้สาร ^{131}I Hippuran และ $^{99\text{m}}\text{TcDTPA}$ พร้อมกันนี้ตรวจหา GFR และ effective renal plasma flow, filtration fraction ด้วยเป็นข้อมูลพื้นฐาน

หลังจากได้รับการตรวจครั้งแรกแล้ว จะทำซ้ำถ้าผู้ป่วยมีการดำเนินโรคเปลี่ยนไป ได้แก่ มีการกลับเป็นซ้ำ (Relapse), รักษาไม่ได้ผล (Resistant) เป็นต้น แต่ถ้าผู้ป่วยมีอาการคงที่ จะทำซ้ำหลังจากครั้งแรกนาน 6 เดือน



5. การติดตามการรักษา

ผู้ป่วยจะมารับการตรวจรักษาเป็นระยะที่ OPD รพ.จุฬาลงกรณ์ อย่างน้อยทุก 1 เดือน เพื่อประเมินการตอบสนองต่อยาด้วยการเจาะเลือด BUN, creatinine, ตรวจปัสสาวะ 24 ชั่วโมงดู ปริมาณไข่ขาวในปัสสาวะ และปรับยา

6. การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

แพทย์ผู้ทำวิจัย จะบันทึกตัววัดทางคลินิก (Clinical parameter) 4 ตัว ได้แก่

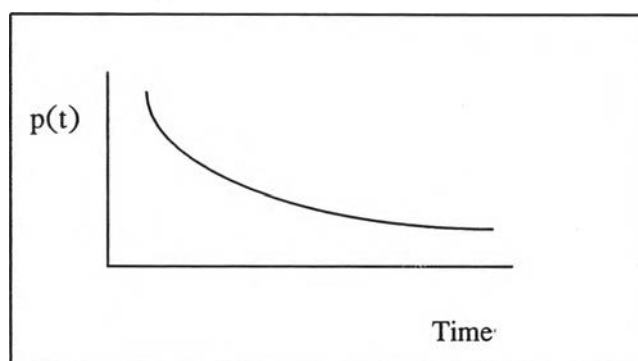
- ชนิดของ nephrotic syndrome
- อายุ
- เพศ
- ความดัน systolic และ diastolic

และ laboratory parameters ได้แก่

- serum albumin
- serum cholesterol
- serum triglyceride
- creatinine clearance (คำนวณจากปัสสาวะ 24 ชั่วโมง)
- GFR (จากสารไอโซโทป) - Effective renal plasma flow (ERPF)
- RVTT

7. การคำนวณค่า clearance ด้วยวิธีการทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์

การคำนวณค่า clearance ด้วยวิธีการทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์ นั้น ทำได้โดยการฉีดสารเภสัชรังสีที่ถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดโดยทางไต เข้าเส้นเลือดดำ จากนั้นวัดอัตราการลดลงของสารดังกล่าวในกระแสเลือด โดยการเจาะเลือดมาวัดปริมาณเภสัชรังสีเป็นระยะ ๆ แล้วพล็อตข้อมูลบนกระดาษกราฟ โดยให้แกน x เป็นเวลา และแกน y เป็น ปริมาณเภสัชรังสีใน plasma จะได้ plasma disappearance curve ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 Plasma disappearance curve

การคำนวณ clearance โดยสูตร UV/P ถ้าพิจารณาจากช่วงเวลาสั้น ๆ (dt) แล้ว urine volume จะเป็น dV ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{Clearance} &= U dV / P dt \\ &= UV / \int P dt \dots\dots\dots 1 \end{aligned}$$

จากสมการที่ 1 ถ้าติดตามศึกษาไปถึง time infinity แล้ว ค่า UV หรือ ปริมาณเภสัชรังสีที่ถูกขับถ่ายออกมา ย่อมเท่ากับปริมาณทั้งหมดที่ฉีดเข้าไป (Q) ดังนั้น

$$\text{Clearance} = Q / \int P dt \dots\dots\dots 2$$

ซึ่ง $\int P dt$ ก็คือ พื้นที่ใต้ plasma disappearance curve นั้นเอง

ส่วน clearance จะเป็นค่าอะไรนั้น ขึ้นกับชนิดของเภสัชรังสีที่ใช้ ถ้าใช้ Tc-99m DTPA ค่า clearance ก็จะเป็น glomerular filtration rate (GFR) แต่ถ้าใช้ I-131 Hippuran ค่า clearance ก็จะเป็น

effective renal plasma flow (ERPF) อย่างไรก็ดี เราสามารถศึกษาได้ทั้ง glomerular filtration rate และ effective renal plasma flow ไปพร้อมกันได้ในการศึกษาเดียวเลย เนื่องจากเราสามารถวัดปริมาณ Tc-99m และ I-131 แยกจากกันได้

การวัด Renal vascular transit time ด้วยวิธีการทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์

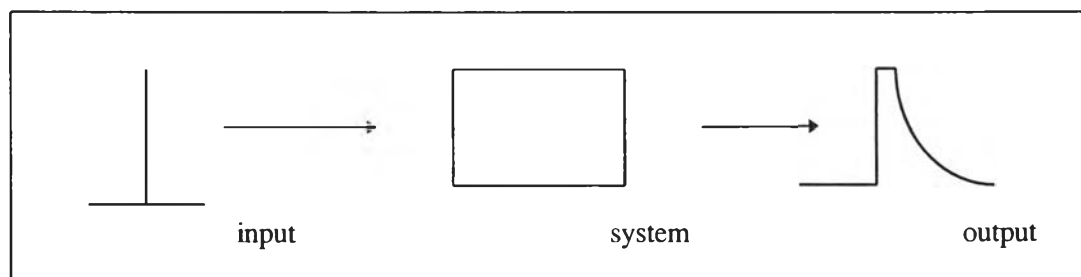
ในทางเวชศาสตร์นิวเคลียร์นั้น เราสามารถศึกษาถึงการทำงานของอวัยวะต่างๆ หรือแม้กระทั่งการไหลเวียนของเลือดได้ โดยการฉีดสารซึ่งสามารถปล่อยรังสี gamma ออกมา (เภสัชรังสี) ให้ตรวจวัดได้จากภายนอกร่างกาย ทำให้สามารถติดตามการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงของสารดังกล่าว ซึ่งจะเป็นการบ่งบอกถึงการทำงานของอวัยวะที่เกี่ยวข้องได้ การศึกษาดังกล่าวจะสามารถทำได้โดยอาศัยความรู้ทางคณิตศาสตร์ คือ convolution และ deconvolution

Convolution สามารถนิยามได้ว่าเป็นวิธีการประเมินผลของการตอบสนองของระบบใดระบบหนึ่งต่อสิ่งที่มากระทำ, กระตุ่น หรือที่ให้อำนาจที่เรารู้ค่าที่แน่นอน (Known input function)

วิธีการนี้มีใช้กันมากในงานเทคโนโลยีต่าง ๆ รวมทั้งในทางการแพทย์ด้วย เช่น การกรองกระแสไฟฟ้าให้ได้กระแสที่เรียบขึ้น หรือการทำให้ภาพที่ได้จากวิธีการทางรังสีวิทยานุ่มนวลและดูง่ายขึ้น หรือใช้ในการคำนวณการตอบสนองของไตต่อสารที่ฉีดเข้าไป โดยที่เมื่อเรารู้ค่า input function และ function ของการตอบสนองของระบบ (response function) เราก็จะสามารถคำนวณผลลัพธ์ (output) ได้ เช่น ถ้าเราต้องการทำให้กราฟเส้นหนึ่งเรียบขึ้น (smooth a curve) เมื่อเรามีกราฟดังกล่าวเป็น input function และทราบถึง function ที่จะทำให้กราฟเรียบขึ้น (smoothing function) เราก็สามารถได้ผลลัพธ์เป็นกราฟที่เรียบขึ้น

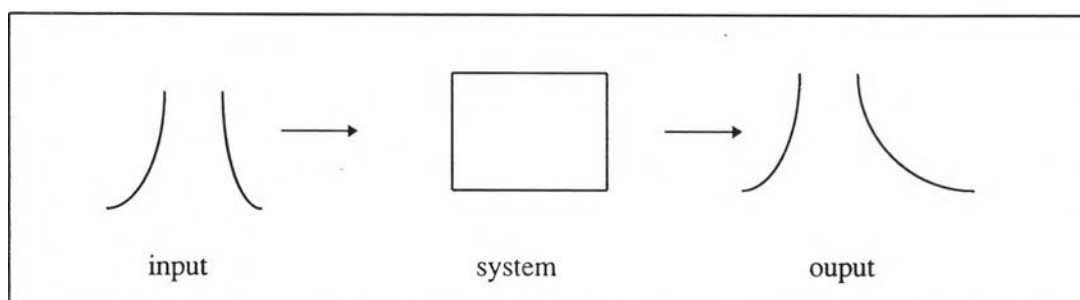
การสร้างภาพทางรังสีวิทยาไม่ว่าจะเป็น CT, SPECT หรือ MRI มีความจำเป็นที่จะต้องใช้วิธี Convolution ทั้งสิ้น เช่น ในการทำ CT scan นั้นจะมีข้อมูลมากมายจากการส่งผ่านรังสี X ในการถ่ายภาพแต่ละมุม (projections) การสร้างภาพนั้น จะต้องนำข้อมูลเหล่านี้จากแต่ละ projection มา “รวมเข้าด้วยกัน” ซึ่งเรียกว่าขบวนการ “back projection” อย่างไรก็ตามภาพที่ได้จะไม่ชัดเจน (blurring) จำเป็นจะต้องผ่านการ convolution ด้วย filter function เพื่อขจัดความไม่ชัดเจนดังกล่าว ทำให้ได้ภาพที่ดูชัดเจนและนุ่มนวลมากขึ้น

สำหรับการศึกษาถึง response function ของระบบใด ๆ ในร่างกายของมนุษย์ต่อ input ที่มีลักษณะเป็น impulse ที่แคบมาก ๆ ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2

ในสภาวะนี้ input จะ convolve กับ response function ของระบบได้เป็น output แต่เนื่องจาก input มีลักษณะเป็น impulse ที่แคบมาก ๆ ดังนั้น output จึงถือเป็น response function หรือเรียกว่า impulse response function อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้ว input มักจะเป็น function ที่สลับซับซ้อนทำให้ลักษณะ output ที่ได้มีลักษณะที่ไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับลักษณะของ input function ทำให้เป็นการยากที่จะศึกษาคุณสมบัติจริง ๆ ของระบบ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3

ในการศึกษาการไหลเวียนของเลือดในไตนั้นเมื่อเภสัชรังสีที่ฉีดเข้าเส้นไหลเข้าสู่ไตเราสามารถวัด function ของการไหลของเภสัชรังสีดังกล่าวที่บริเวณ aorta และบริเวณไต เป็น input และ output function ตามลำดับ ถ้า input function นี้เป็น impulse ที่แคบมาก ๆ แล้ว output function ที่ได้ก็จะเป็น impulse response function ดังที่กล่าวแล้ว ซึ่งไม่มีทางเป็นไปได้ในทางปฏิบัติเนื่องจากการที่จะได้ input function เป็น impulse ที่แคบมาก ๆ นั้นจะต้องใช้วิธีฉีดเภสัชรังสีเข้าเส้นเลือดแดงของไตโดยตรงและใช้เภสัชรังสีในปริมาณที่น้อยมาก ๆ อย่างไรก็ตามเราสามารถพิจารณาได้ว่า input function ที่สลับซับซ้อนนั้นเกิดจาก impulse input หลาย ๆ input ต่อ ๆ กัน ทำให้ output function ที่ได้เกิดจาก convolution ระหว่าง input function นั้นกับ impulse response function ของระบบไหลเวียนของเลือดในไต

ยกตัวอย่างระบบที่ประกอบด้วยท่อ 4 ท่อที่มีความยาวต่าง ๆ กัน ถ้าฉีดเภสัชรังสีเป็น impulse input 1 unit เข้าไปในระบบดังกล่าว แล้วเภสัชรังสีนี้จะแบ่งไหลเข้าสู่ท่อต่าง ๆ ในจำนวนเท่า ๆ กัน เนื่องจากท่อยาวไม่เท่ากัน โดยสมมติให้เวลาที่ใช้ในการไหลในแต่ละท่อเป็น 3, 4, 5 และ 6 วินาทีตามลำดับ ก็จะมีพบว่าปริมาณเภสัชรังสีที่ตรวจพบได้ในระบบในช่วง 3 วินาทีแรกจะเป็น 100 % คือ 1 unit ($H_1 = 1, H_2 = 1, H_3 = 1$) ส่วนเมื่อถึงวินาทีที่ 4 เภสัชรังสีจะไหลออกจากระบบ 25 % ($H_4 = 0.75$) และเมื่อถึงวินาทีที่ 5 เภสัชรังสีจะไหลออกจากระบบอีก 25 % ($H_5 = 0.50$) และในทำนองเดียวกันเมื่อถึงวินาทีที่ 6 ($H_6 = 0.25$) การลดลงเป็นลำดับของ impulse response function นี้เป็นการแสดงถึง ระยะเวลา ของการไหล และปริมาณของเภสัชรังสีในท่อต่าง ๆ ของระบบ

จากนั้นก็สามารที่จะคำนวณ ลักษณะการตอบสนองของระบบต่อ input function ใด ๆ ได้ โดยคิดว่า input function นั้น ประกอบขึ้นด้วย impulse input function หลาย ๆ function ต่อ ๆ กัน (I_1, I_2, I_3, \dots) จากนั้นก็เป็นการง่ายที่จะคำนวณการตอบสนองของระบบต่อ impulse input function แต่ละ function, ถ้า H คือ impulse response ดังนั้น I_1H และ I_2H จึงเป็นการตอบสนองต่อ input I_1 และ I_2

ตามลำดับ แต่เนื่องจาก I_2 เกิดหลังจาก I_1 1 วินาที ดังนั้น I_2H จึงเกิด 1 วินาทีหลังจาก I_1H และการตอบสนองต่อ input $I_3, I_4, I_5 \dots$ ก็ในทำนองเดียวกัน

การตอบสนองของระบบต่อ input ทั้งหมด จึงสามารถคำนวณได้จากการรวมกันของ impulse response แต่ละอันคือ

$$\begin{aligned} R_1 &= I_1H_1 \\ R_2 &= I_1H_2 + I_2H_1 \\ R_3 &= I_1H_3 + I_2H_2 + I_3H_1 \\ R_4 &= I_1H_4 + I_2H_3 + I_3H_2 + I_4H_1 \end{aligned}$$

หรือเขียนเป็นสมการทั่วไปได้เป็น

$$R_i = \sum_{j=1}^i I_j H_{i-j+1} \Delta t \quad I = 1, 2, 3, \dots$$

Δt เป็นช่วงเวลาที่ใช้ในการคำนวณ

ถ้า Δt สั้นลงเรื่อยๆ ก็จะกลายเป็น function ต่อเนื่อง และเขียนเป็นสมการได้คือ

$$R(t) = \int I(\tau)H(t-\tau)d\tau$$

สมการดังกล่าวเป็น convolution integral และบางครั้งเขียนเป็น

$$R(t) = I(t) \otimes H(t) \dots\dots\dots 3$$

- โดยที่ $R(t)$ คือ output function
- $I(t)$ คือ input function
- $H(t)$ คือ impulse response function
- \otimes มีความหมายว่า 'convolve with'

จากสมการจะเห็นว่า output function จะมีลักษณะอย่างไรนั้นขึ้นกับ input function โดยตรง และโดยที่ input function นั้นขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ตำแหน่ง, ลักษณะ และอัตราการฉีดเภสัชรังสีเข้าสู่เส้นเลือดดำ เป็นต้น ทำให้ renal output function (หรือ renal blood flow function) มีลักษณะไม่แน่นอนอนเป็นการยากที่จะเปรียบเทียบ renal blood flow function ของผู้ป่วยแต่ละคน หรือแม้กระทั่งผู้ป่วยคนเดียวกันเมื่อทำการศึกษาหลายครั้ง

Deconvolution จากชื่อก็บ่งชัดแล้วว่าเป็นขบวนการกลับของ convolution จากสมการที่ 3 เมื่อจัดเรียงนิพจน์ต่างใหม่จะได้เป็น

$$H(t) = R(t) \oslash I(t)$$

โดยที่ \otimes มีความหมายว่า 'deconvolve with'

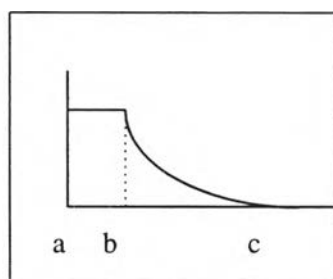
จึงเห็นได้ว่า impulse response function สามารถคำนวณได้จาก Output function 'Deconvolve' กับ input function

Deconvolution นั้นสามารถกระทำได้หลายวิธีเช่น

- Fourier analysis (division in frequency domain)
- Laplace transforms (semi-analytical)
- Optimisation (use in image processing)
- Discrete methods

แต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียและที่ใช้ต่าง ๆ กันขึ้นอยู่กับลักษณะของข้อมูล ซึ่งจะไม่กล่าวในรายละเอียดในที่นี้

Impulse response function ของระบบการไหลเวียนของเลือดในไตจะเป็นดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 Impulse response function (H(t))

จากภาพ ช่วงเวลา a-b และ a-c เป็นช่วงเวลาที่สั้นที่สุด และ ยาวที่สุด ที่เลือดไหลเวียนอยู่ในระบบการไหลเวียนในไตตามลำดับ และสามารถคำนวณเวลาเฉลี่ยที่เลือดไหลเวียนอยู่ (mean transit time) ได้ดังสมการ

$$\text{mean transit time} = \frac{\int H(t) dt}{H(t=0)}$$

$$\begin{aligned} \text{โดยที่ } \int H(t) dt &= \text{พื้นที่ใต้ impulse response function (H(t))} \\ H(t=0) &= \text{ค่า H(t) เมื่อ } t=0 \end{aligned}$$

8. วิธีการศึกษา

ผู้ป่วยนอนราบบนเตียงตรวจ จัดให้ gamma camera อยู่ทางด้านหลังของผู้ป่วยในตำแหน่งของไต การศึกษาใช้ Tc-99m DTPA ปริมาณ 10 mCi และ I-131 Hippuran 200 μ Ci ฉีดเข้าที่เส้นเลือด

ดำที่แขน การบันทึกภาพจะบันทึกเฉพาะ Tc-99m DTPA เท่านั้น เพื่อใช้ในการคำนวณ RVTT โดยใช้ collimator แบบ all-purpose low-energy parallel-hole บันทึกภาพต่อเนื่องด้วยอัตรา 1 ภาพ ต่อ 1 วินาที เป็นจำนวน 60 ภาพ บน ขนาด matrix 128 x 128 word mode

ทำการเจาะตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย เป็นระยะๆ ที่เวลา 5, 10, 20, 30, 50, 60, 75, 120, 180 และ 240 นาที หลัง ฉีดเภสัชรังสี ครั้งละ 5 ml. แล้วนำ พลาสมา ไปตรวจวัดความเข้มข้นของเภสัชรังสี เพื่อเขียน plasma disappearance curve และคำนวณ ทั้ง GFR และ ERPF ตั้งวิธีที่อธิบายข้างต้น

สำหรับการคำนวณ RVTT ทำได้โดยสร้าง blood flow curve โดยวาด region of interest (ROIs) ตรงตำแหน่งของ aorta และ ไตซ้าย (ไม่ศึกษาไตด้านขวาเนื่องจากซ้อนอยู่กับตับ ทำให้ไม่สามารถแยก blood flow ของทั้งสองอวัยวะออกจากกันได้) จากนั้นให้คอมพิวเตอร์สร้างกราฟระหว่างเวลากับค่านับวัด ในบริเวณ ROIs ดังกล่าว จะได้กราฟ 2 เส้น คือ aortic blood flow curve และ renal blood flow curve จากนั้นจึงให้คอมพิวเตอร์ทำการ deconvolution ของกราฟ ทั้งสอง โดยให้ renal blood flow curve เป็น output function (R(t)) และ aortic blood flow curve เป็น input function (I(t)) ก็จะได้ impulse response function H(t) และคำนวณ renal vascular transit time ได้จาก H(t) อีกที่หนึ่ง

9. Pathological parameters แบ่งเป็น

1. Glomerular change ได้แก่ - Glomerular sclerosis นับเป็นสัดส่วนของ glomeruli ทั้งหมดในชิ้นเนื้อที่เจาะได้

- Mesangial cellularity

- Periglomerular fibrosis

2. Interstitial change - fibrosis และ/หรือ atrophy

- Abnormal infiltration เช่น foam cell หรือ inflammatory cells

โดยใช้ในรหัส 0 = ไม่มี

1 = น้อย 2 = ปานกลาง

3. Vasculatures

normal = 0

3 = รุนแรง

abnormal = 1

10. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลของค่า RVTT กลุ่มอาการเนโฟรติก รวมทั้งตัวแปรอื่นๆ ในกลุ่มโรคที่มีพยาธิสภาพต่าง ๆ กัน เสนอเป็นค่า \pm standard error การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) แบบทางเดียว โดยจัดลำดับความสำคัญทางนัยสถิติที่น้อยกว่า 0.05 การเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวแปรเมื่อเริ่มการศึกษาและ 6 เดือนต่อมาใช้ Paired t-test จัดระดับความสำคัญทางนัยสถิติที่น้อยกว่า 0.05 (two-tailed) ความสัมพันธ์ของ RVTT และ ตัวแปรที่เป็นจำนวนนับใช้การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) จัดระดับความสำคัญที่ระดับ = 0.05 การเปรียบเทียบ RVTT ตามกลุ่มโรค แยกตามความรุนแรงของพยาธิวิทยา ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบสองทาง (Two way Analysis of Variance) การเปรียบเทียบตัวแปรของกลุ่มที่ตอบสนองและไม่ตอบสนองต่อการรักษาใช้ student's unpaired t-test จัดระดับสำคัญทางนัยสถิติที่น้อยกว่า 0.05 (two-tailed)