

การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ที่ผลิตโดยศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ

กานดา วีระเวชสุกิจ และ จิรวัดน์ โชนงน้อย

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม 73170

บทคัดย่อ หนูแรทสายพันธุ์ Wistar นิยมใช้เป็น animal model สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา การตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดเป็นการทดสอบเพื่อหาความผิดปกติของกลไกการห้ามเลือด ซึ่งปัจจุบันศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติไม่เคยศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ที่ผลิตได้มาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ ค่า prothrombin time (PT) และค่า activated partial thromboplastin time (APTT) ในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR โดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติ SYSMEX CA-660 จากผลการศึกษาพบว่าทั้งเพศและอายุส่งผลต่อค่าเฉลี่ยของค่า PT และ APTT อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$) ในแง่ของความเสถียรของตัวอย่าง ตัวอย่าง plasma ที่ผ่านการเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ มักส่งผลให้ค่า PT ลดลง แต่ค่า APTT ยาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) นอกจากนี้หนูแรท Mlac:WR กลุ่มที่ผ่านการรับ sterile water ด้วยวิธี oral gavage เป็นเวลา 90 วันติดต่อกัน ให้ค่าการแข็งตัวของเลือดไม่ต่างจากกลุ่ม non-oral gavage ยกเว้นค่า APTT ของเพศผู้ที่มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม oral gavage ($p < 0.001$) การศึกษาชี้ให้เห็นว่าเพศ อายุ และกิจวัตรประจำวันที่แตกต่างกันของสัตว์ทดลอง รวมถึงวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์สามารถส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ได้

คำสำคัญ: หนูแรท Mlac:WR, การแข็งตัวของเลือด, ค่า prothrombin time (PT), ค่า activated partial thromboplastin time (APTT), ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด

Corresponding author E-mail: kanda.vee@mahidol.ac.th

Received: 2 February 2026

Revised: 5 June 2026

Accepted: 10 June 2026

บทนำ

การแข็งตัวของเลือด (blood coagulation หรือ blood clotting) เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่ร่างกายใช้เพื่อหยุดการไหลของเลือดเมื่อมีการบาดเจ็บหรือมีบาดแผลเกิดขึ้นกับหลอดเลือด กระบวนการนี้ช่วยป้องกันไม่ให้ร่างกายเสียเลือดมากเกินไป องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องและมีบทบาทสำคัญต่อการห้ามเลือด ได้แก่ เกล็ดเลือด (platelets) และปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (coagulation factors) การสร้างลิ่มเลือดเกิดจากการทำงานของ coagulation factors จนได้ fibrin ที่จะตกตะกอนลงมากลายเป็นลิ่มเลือดที่มีความแข็งแรงและห้ามเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพ กระบวนการนี้เป็นกระบวนการที่ซับซ้อนโดยจะเปลี่ยน coagulation factors ที่อยู่ในรูป inactive form (zymogen) ให้เป็น active form ที่มีฤทธิ์เป็น protease ซึ่งจะไปกระตุ้น coagulation factors ตัวต่อๆ ไปใน pathway ของตัวเองตามลำดับ โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 pathways ดังนี้ 1) intrinsic pathway 2) extrinsic pathway และ 3) common pathway⁽¹⁻³⁾

International Conference on Harmonization (ICH) guidelines ได้ระบุว่า prothrombin time (PT) และ activated partial thromboplastin time (APTT) เป็น routine parameters ร่วมกับการนับจำนวนเกล็ดเลือด การดู gross lesion และ histopathological slide เพื่อประเมินผลกระทบของสารเคมีหรือผลิตภัณฑ์ทางเภสัชกรรมต่อระบบการแข็งตัวของเลือด⁽⁴⁾ สอดคล้องกับ American Society for Veterinary Clinical Pathology (ASVCP) ที่แนะนำว่าค่า PT และ APTT เป็นพารามิเตอร์ที่ควรบรรจุไว้ใน preclinical safety studies เพื่อใช้ประเมินผลกระทบต่อระบบการแข็งตัวของเลือด เมื่อได้รับ xenobiotics เข้าสู่ร่างกาย⁽⁵⁾ โดยค่า PT เป็น screening test สำหรับประเมินการทำงานของ coagulation factor ที่เกี่ยวข้องกับ extrinsic pathway และ common pathway ได้แก่ factor I, II, V, VII และ X ใช้ประเมินสถานะขาดวิตามิน K ในระยะแรก ใช้ติดตามผลการรักษาด้วย warfarin และภาวะที่ร่างกายได้รับยาฆ่าหนู ในขณะที่ APTT ถูกใช้ในการประเมิน

การทำงานของระบบ intrinsic pathway และ common pathway ได้แก่ coagulation factor I, II, V, VIII, IX, X, XI และ XII การเกิดภาวะ (Disseminated Intravascular Coagulation (DIC) และใช้ติดตามผลการรักษาด้วย heparin หากค่า APTT สูงขึ้นผิดปกติอาจบ่งบอกถึงสภาวะบกพร่องของ coagulation factor VIII, IX, XI และ XII หรือการได้รับ inhibitor อย่าง heparin เข้าสู่ร่างกาย^(3,6,7)

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ นอกจากเป็นหน่วยงานหลักของประเทศด้านการผลิตสัตว์ทดลอง เช่น หนูเมาส์ หนูแรท หนูตะเภา และกระต่าย ยังเป็นหน่วยงานแรกของประเทศไทยที่ได้รับการรับรองจากสำนักมาตรฐานห้องปฏิบัติการ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ให้เป็นหน่วยงานที่สามารถให้บริการทดสอบความปลอดภัยในด้านการพัฒนายาและผลิตภัณฑ์ด้านสุขภาพของประเทศไทย ตามหลักการของ The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Good Laboratory Practice (GLP): OECD GLP โดยเฉพาะอย่างยิ่ง test guideline no.408 ซึ่งเป็นหนึ่งใน test guideline ที่ได้รับความนิยมและมีลูกค้ามาใช้บริการกับศูนย์อย่างต่อเนื่อง การทดสอบใน test guideline no.408 เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังในสัตว์ฟันแทะที่ได้รับสารทดสอบผ่านทางปากอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 90 วัน⁽⁸⁾ ในบางกรณีของการให้บริการตาม test guideline no.408 จำเป็นต้องให้สารทดสอบผ่านทางท่อหรือเข็มให้อาหารสอดเข้าปากแล้วส่งสารทดสอบสู่หลอดอาหารหรือกระเพาะอาหารโดยตรง เรียกวิธีนี้ว่า oral gavage⁽⁹⁾ ซึ่งการให้สารน้ำหรืออาหารแก่สัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่องติดต่อกันหลายวันผ่านวิธี oral gavage นอกจากจะทำให้ทางเดินอาหารของสัตว์ทดลองเสี่ยงต่อการระคายเคืองแล้ว อาจทำให้อัตราการเต้นของหัวใจและความดันโลหิตเปลี่ยนแปลง รวมไปถึงทำให้เกิดความเครียดสะสมในสัตว์ทดลองได้⁽¹⁰⁾

หนู Wistar rat เป็นสัตว์ฟันแทะที่นิยมใช้ในงานวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีขนาดตัวที่เหมาะสมสำหรับการทำหัตถการหรือปฏิบัติงานในขั้นตอนต่างๆ อีกทั้งมีสรีรวิทยาและพันธุกรรมที่มีลักษณะเฉพาะช่วยให้

สามารถสรุปผลการทดลองเทียบเคียงกับในมนุษย์ได้ นอกจากนี้ Wistar rat มีอัตราการรอดชีวิตที่ดี อัตราการเกิดเนื้องอกด้วยตัวเองต่ำ จึงนิยมใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการทดสอบความเป็นพิษ⁽¹¹⁾ ปัจจุบันการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ยังมีไม่มาก รวมถึงหนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ที่ผลิตโดยศูนย์ฯ ยังไม่เคยมีการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดมาก่อน ดังนั้นเพื่อให้ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบค่า PT และ APTT ของหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียในช่วงอายุ 4-8 สัปดาห์, 10-12 สัปดาห์, 18-20 สัปดาห์ และมากกว่า 35 สัปดาห์ เพื่อนำมาวิเคราะห์ถึงอิทธิพลของเพศและอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด และเพื่อเป็นการพิสูจน์ข้อแนะนำของ Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI document H21-A5) ซึ่งระบุว่าหากไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดได้ทันทีภายใน 2-4 ชั่วโมง สามารถเก็บรักษาตัวอย่าง plasma ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์⁽¹²⁾ การศึกษานี้จึงศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือดหากจำเป็นต้องแช่แข็งตัวอย่าง plasma ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ตามคำแนะนำของ CLSI guidelines และศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูกลุ่มที่ได้รับ sterile water ผ่านการทำ oral gavage อย่างต่อเนื่องทุกวัน เป็นเวลา 90 วัน ซึ่งคล้ายคลึงกับหนูในกลุ่มควบคุมของงาน toxicity test study อีกด้วย

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลอง

หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ผลิตโดยศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 4 ช่วงอายุ ได้แก่ 4-8 สัปดาห์, 10-12 สัปดาห์, 18-20 สัปดาห์ และมากกว่า 35 สัปดาห์ ช่วงอายุละ 40 ตัว (แบ่งเป็น เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 20 ตัว) ถูกใช้ในการเก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำมาศึกษาอิทธิพลของเพศและอายุ รวมถึงการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างหลังผ่านการแช่แข็ง ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ค่าการ

แข็งตัวของเลือด ในขณะที่หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR อีกกลุ่มที่อายุ 6 สัปดาห์ เพศละ 22 ตัว จะถูกใช้สำหรับศึกษาผลกระทบของการทำ oral gavage ติดต่อกัน เป็นเวลา 90 วัน ที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด

วิธีการ

สัตว์ทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงภายใต้ระบบ HVAC (Heating, Ventilation, and Air Conditioning) ที่มีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ความชื้นสัมพัทธ์ระหว่าง 30-70% อัตราการระบายอากาศ 15-20 รอบต่อชั่วโมง ระยะเวลาการให้แสงสว่าง (light:dark) เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง และควบคุมเสียงภายในห้องเลี้ยงให้ไม่เกิน 85 เดซิเบล สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในกรงสแตนเลสพื้นต้นที่มีวัสดุรองนอนทำจากแกนข้าวโพด (corn cob) ผสมผักตบชวา (water hyacinth) ที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อไอน้ำ (autoclave) (รุ่น Getinge GE6915AR-1, Getinge, Sweden) ก่อนนำมาใช้งาน และได้รับอาหารที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อก่อนนำมาให้กิน น้ำที่ใช้เลี้ยงเป็น reverse osmosis (RO) water ที่ผสมคลอรีนเข้มข้น 5-7 ppm โดยมีเครื่องเตรียมคลอรีน (รุ่น Beta/4, ProMinent GmbH Heidelberg, Germany)

ในการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดของหนูในกลุ่มที่ผ่านการทำ oral gavage หนู Mlac:WR อายุ 6 สัปดาห์ เพศละ 22 ตัว จะถูกให้ sterile water (General Hospital Products, Thailand) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัวสัตว์ 100 กรัม ผ่านการสอดท่อ feeding needle (P.A.C.K. Trading, Thailand) เข้าทางปากผ่านไปยังหลอดอาหาร และฉีด sterile water เข้าสู่กระเพาะอาหารโดยตรงทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกันเป็นระยะเวลา 90 วัน เมื่อ feeding จนครบ 90 วัน สัตว์ทดลองจะถูกนำไปเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด และนำค่าที่ทดสอบได้ไปเปรียบเทียบกับหนูช่วงอายุ 18-20 สัปดาห์ กลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage (non-oral gavage)

การสลบสัตว์และการเก็บเลือด

คืนก่อนวันที่จะเก็บตัวอย่างสัตว์ทดลองทุกตัว จะถูกงดให้อาหาร (fasting) อย่างน้อย 8 ชั่วโมง ก่อนนำมาเก็บตัวอย่าง (แต่ยังให้น้ำตามปกติ) สัตว์ทดลอง

จะถูกทำให้สลบด้วยก๊าซ CO₂ (Charoennakhon Welding, Thailand) แล้วทำการผ่าเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเลือดจากเส้นเลือด posterior vena cava เลือดจะถูกถ่ายไปยังหลอดเก็บเลือดที่บรรจุสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (anticoagulant) ชนิด 3.2% sodium citrate (รุ่น Minicollect, Greiner BIO-ONE, Austria) โดยอัตราส่วนระหว่างเลือดและ sodium citrate เท่ากับ 9:1 ทำการ mixed เลือดเบาๆ ทันทีเพื่อให้เลือดและ anticoagulant ผสมเข้ากันอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปปั่นที่เครื่อง centrifuge (รุ่น Multifuge X1R Pro, Thermo Fisher Scientific, Germany) เพื่อแยก citrate-plasma ด้วยความเร็วรอบ 1,500 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 25°C

ในการศึกษาความเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือดเมื่อนำตัวอย่างไปแช่แข็งที่ตู้แช่แข็ง (รุ่น PLR 386, Thermo Fisher Scientific, Germany) ก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ citrate-plasma ที่ได้จากสัตว์ทดลอง 1 ตัว จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชุด ชุดที่ 1 เรียกว่า fresh citrate-plasma เป็นชุดที่ citrate-plasma จะถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีภายใน 4 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่าง และชุดที่ 2 เรียกว่า freeze citrate-plasma เป็นชุดที่ citrate-plasma จะถูกนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด

ตัวอย่าง citrate-plasma ที่มีลักษณะของ hemolysis หรือพบว่ามี partial clot เกิดขึ้นจะไม่ถูกนำมาใช้ในการตรวจวิเคราะห์

การตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือด

ค่าการแข็งตัวของเลือด PT และ APTT ถูกทดสอบโดยใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติ (automated coagulation analyzer) SYSMECA-660 (Sysmex Corporation, Japan) ก่อนตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างต้องทดสอบ standard control samples ก่อน เพื่อตรวจสอบคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ ในการทดสอบค่า PT ตัวอย่าง citrate-plasma ปริมาตร 50 µL จะถูกผสมเข้ากับ PT reagent (ThromborelS; Sysmex

Corporation, Japan) การทดสอบค่า APTT ตัวอย่าง citrate-plasma ปริมาตร 50 µL จะถูกผสมเข้ากับ APTT reagents ที่ประกอบด้วย ActinFS และ CaCl₂ (Sysmex Corporation, Japan) เครื่องตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดแบบอัตโนมัติจะวัดระยะเวลาตั้งแต่ตัวอย่าง citrate-plasma ผสมกับ reagent จนกระทั่งเกิดการ clot ที่สมบูรณ์ และรายงานเป็นค่าการแข็งตัวของเลือดในหน่วยวินาที

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดได้ใช้โปรแกรม GraphPad Prism Software (version 10.5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) เป็นเครื่องมือในการทดสอบ โดยการศึกษาอิทธิพลของเพศและการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดระหว่างสัตว์ทดลองกลุ่ม non-oral gavage และ oral gavage ได้ใช้ Mann Whitney test ในการทดสอบ ส่วนการศึกษาผลกระทบของอายุต่อค่าการแข็งตัวของเลือดจะทดสอบโดยใช้ Kruskal-Wallis test และการเปรียบเทียบความเสถียรของตัวอย่างระหว่าง fresh citrate-plasma และ freeze citrate-plasma จะทดสอบโดยใช้ Wilcoxon matched-pairs signed rank test

จริยธรรมการวิจัย

การใช้และการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองในงานวิจัยนี้ผ่านการรับรองและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล National Laboratory Animal Center Animal Care and Use Committee (NLAC-ACUC) National Laboratory Animal Center, Mahidol University (หมายเลขโครงการ RA 2023-11) เมื่อวันที่ 29 กันยายน พ.ศ. 2566

ผล

ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า PT และ APTT ของหนู Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ โดยจะแสดงจำนวนตัวอย่าง (n) ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

(mean±SD) ค่ามัธยฐาน (median) ค่าเฉลี่ยของลำดับที่ (mean rank) ค่าสูงสุด (max) ค่าต่ำสุด (min) และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (%CV)

เพศของสัตว์ทดลองมีอิทธิพลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด

ผลการศึกษาความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือด (ค่า PT และ APTT) ในหนู Mlac:WR อันเนื่องมาจากอิทธิพลของเพศ ดังแสดงในตารางที่ 1

และ 2 ตามลำดับ พบว่าทุกช่วงอายุของสัตว์ทดลองค่า PT ในหนูเพศผู้จะนานกว่าในเพศเมียอย่างมีนัยสำคัญ (4–8 weeks; $p < 0.01$ ส่วน 10–12 weeks, 18–20 weeks และ > 35 weeks; $p < 0.001$) ในทางตรงกันข้ามในหนูเพศ Mlac:WR ที่อายุมากกว่า 10 สัปดาห์ขึ้นไปค่า APTT ในหนูเพศเมียกลับยาวนานกว่าในเพศผู้ อย่างมีนัยสำคัญ (10–12 weeks; $p < 0.05$ แต่ที่ 18–20 weeks และ > 35 weeks; $p < 0.001$)

ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบค่า PT ของหนู Mlac:WR ระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ

AGE	n	Mean±SD	Median	Mean rank	Max	Min	%CV
Male							
4–8 Weeks	20	7.3±0.18	7.30	25.45**	7.7	6.9	2.48
10–12 Weeks	20	8.5±0.24	8.50	30.10***	8.8	8.0	2.83
18–20 Weeks	20	7.8±0.22	7.80	28.25***	8.4	7.5	2.78
> 35 Weeks	20	7.7±0.39	7.85	26.45***	8.2	6.9	5.04
Female							
4–8 Weeks	19	7.1±0.20	7.10	14.26	7.5	6.7	2.77
10–12 Weeks	20	7.7±0.37	7.75	10.90	8.2	6.9	4.82
18–20 Weeks	19	7.4±0.23	7.30	11.32	7.7	6.9	3.10
> 35 Weeks	20	7.3±0.20	7.40	14.55	7.7	6.8	2.74

หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ และ ***at $p < 0.001$

ตารางที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบค่า APTT ของหนู Mlac:WR ระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ช่วงอายุต่างๆ

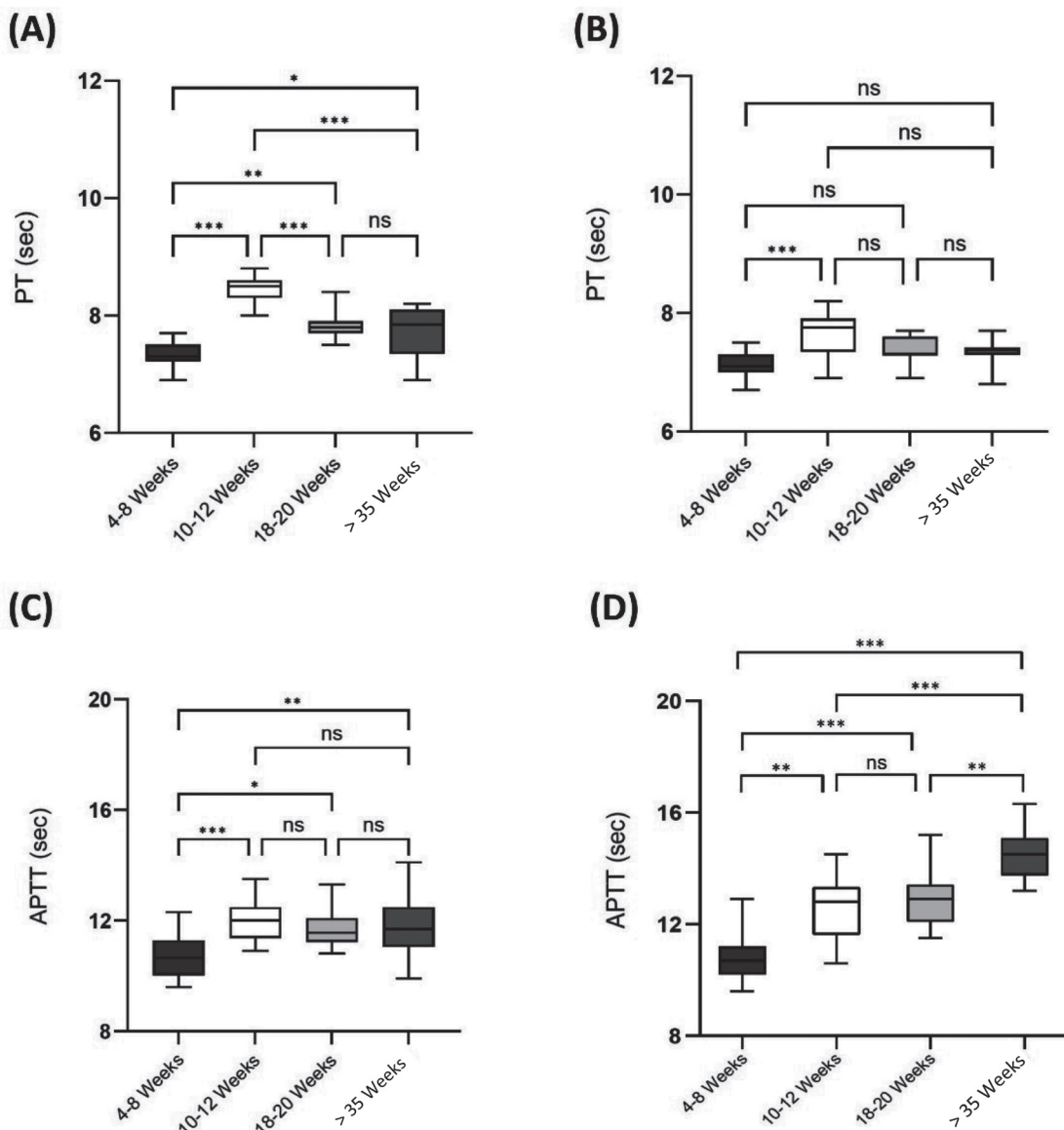
AGE	n	Mean±SD	Median	Mean rank	Max	Min	%CV
Male							
4–8 Weeks	20	10.7±0.81	10.65	19.78	12.3	9.6	7.60
10–12 Weeks	20	12.0±0.71	12.00	16.65	13.5	10.9	5.94
18–20 Weeks	20	11.7±0.65	11.55	12.93	13.3	10.8	5.59
> 35 Weeks	20	11.8±1.12	11.70	10.98	14.1	9.9	9.47
Female							
4–8 Weeks	19	10.8±0.84	10.70	20.24	12.9	9.6	7.81
10–12 Weeks	20	12.6±1.07	12.80	24.35*	14.5	10.6	8.51
18–20 Weeks	19	12.9±0.90	12.90	27.45***	15.2	11.5	6.96
> 35 Weeks	20	14.5±0.83	14.50	30.03***	16.3	13.2	5.71

หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ และ ***at $p < 0.001$

ค่าการแข็งตัวของเลือดอาจจะแตกต่างกันได้ในแต่ละช่วงอายุ

ในการศึกษาปัจจัยด้านอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด พบว่าอายุส่งผลต่อค่า PT และ APTT ทั้งในหนู Mlac:WR เพศผู้และเพศเมีย ดังนี้ 1) ในหนูเพศผู้ ค่า PT ของแต่ละช่วงอายุมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นในช่วงอายุ 18–20 weeks และ > 35 weeks ที่ไม่พบความแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1(A) 2) ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า PT

ในหนูเพศเมียของแต่ละช่วงอายุ ยกเว้นอายุ 4–8 weeks ที่แตกต่างจาก 10–12 weeks ดังแสดงในภาพที่ 1(B) 3) มีเพียงหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์เพศผู้อายุ 4–8 weeks ที่มีค่า APTT แตกต่างจากช่วงอายุอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 1(C) และ 4) ค่า APTT ในหนูเพศเมียมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในทุกช่วงอายุ ยกเว้นในหนู 10–12 weeks และ 18–20 weeks ที่ไม่พบความแตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 1(D)



หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 1 กราฟแสดงความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ที่ช่วงอายุต่างๆ (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

การแช่แข็งตัวอย่าง citrate-plasma ส่งผลให้ค่าการแข็งตัวของเลือดเปลี่ยนแปลงไป

-20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (freeze citrate-plasma) ดังแสดงในตารางที่ 3 ตามลำดับ

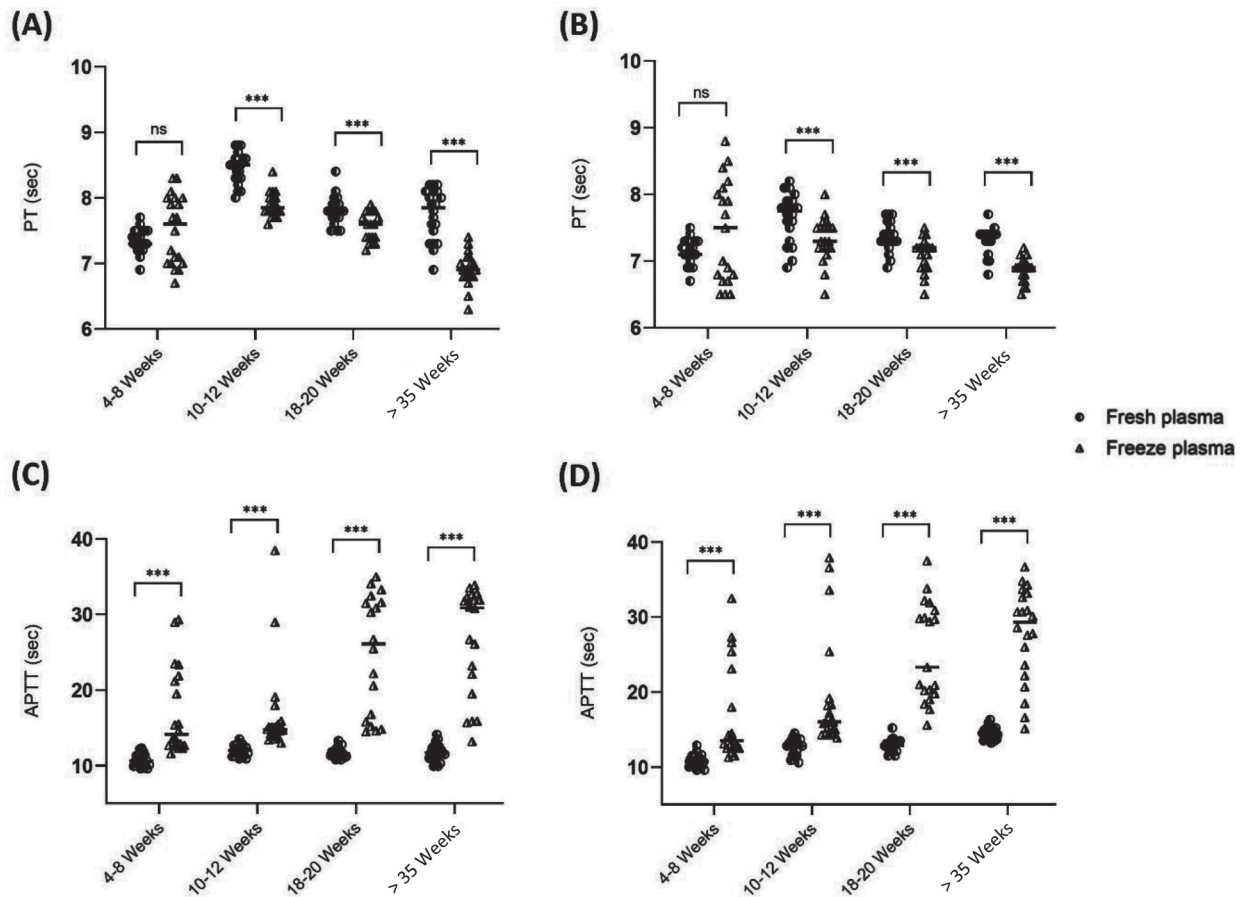
ผลการตรวจวิเคราะห์ค่า PT และ APTT ของตัวอย่างจากหนู Mlac:WR ที่ผ่านการแช่แข็งที่อุณหภูมิ

ตารางที่ 3 แสดงค่า PT และ APTT ของตัวอย่างในชุด freeze citrate-plasma

AGE	n	Mean±SD	Median	Max	Min	%CV
PT of Male						
4-8 Weeks	20	7.5±0.53	7.6	8.3	6.7	7.03
10-12 Weeks	20	7.9±0.19	7.9	8.4	7.6	2.38
18-20 Weeks	18	7.6±0.22	7.6	7.9	7.2	2.91
> 35 Weeks	20	6.9±0.25	6.9	7.4	6.3	3.66
PT of Female						
4-8 Weeks	19	7.4±0.77	7.5	8.8	6.5	10.9
10-12 Weeks	20	7.3±0.33	7.3	8.0	6.5	4.51
18-20 Weeks	19	7.1±0.26	7.2	7.5	6.5	3.61
> 35 Weeks	20	6.9±0.18	6.9	7.2	6.5	2.60
APTT of Male						
4-8 Weeks	20	17.0±5.73	14.2	29.3	11.6	33.68
10-12 Weeks	20	16.8±6.17	14.8	38.5	13.0	36.73
18-20 Weeks	18	24.8±7.88	26.1	35.0	14.5	31.82
> 35 Weeks	20	26.6±7.11	30.9	33.9	13.2	26.72
APTT of Female						
4-8 Weeks	19	16.9±6.57	13.5	32.5	11.3	38.94
10-12 Weeks	20	19.4±7.65	16.0	37.9	13.9	39.45
18-20 Weeks	19	25.3±6.60	23.3	37.5	15.6	26.04
> 35 Weeks	20	27.7±6.35	29.4	36.7	15.1	22.90

การทดสอบเพื่อดูความแตกต่างของค่าการแข็งตัวของเลือดระหว่าง citrate-plasma ที่ถูกนำไปตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีภายใน 4 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่าง (fresh citrate-plasma) และ citrate-plasma ที่ถูกเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือด (freeze citrate-plasma) พบว่าค่า PT ในกลุ่ม freeze citrate-plasma ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

ที่ $p < 0.001$ ในเกือบทุกช่วงอายุ ยกเว้นในหนูช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์อายุ 4-8 weeks ทั้งในเพศผู้และเพศเมียที่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 2(A) และ 2(B) ซึ่งสวนทางกับค่า APTT ที่ตัวอย่างในชุด freeze citrate-plasma กลับมีค่ายาวนานขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ในทุกช่วงอายุทั้งเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพที่ 2(C) และ 2(D)



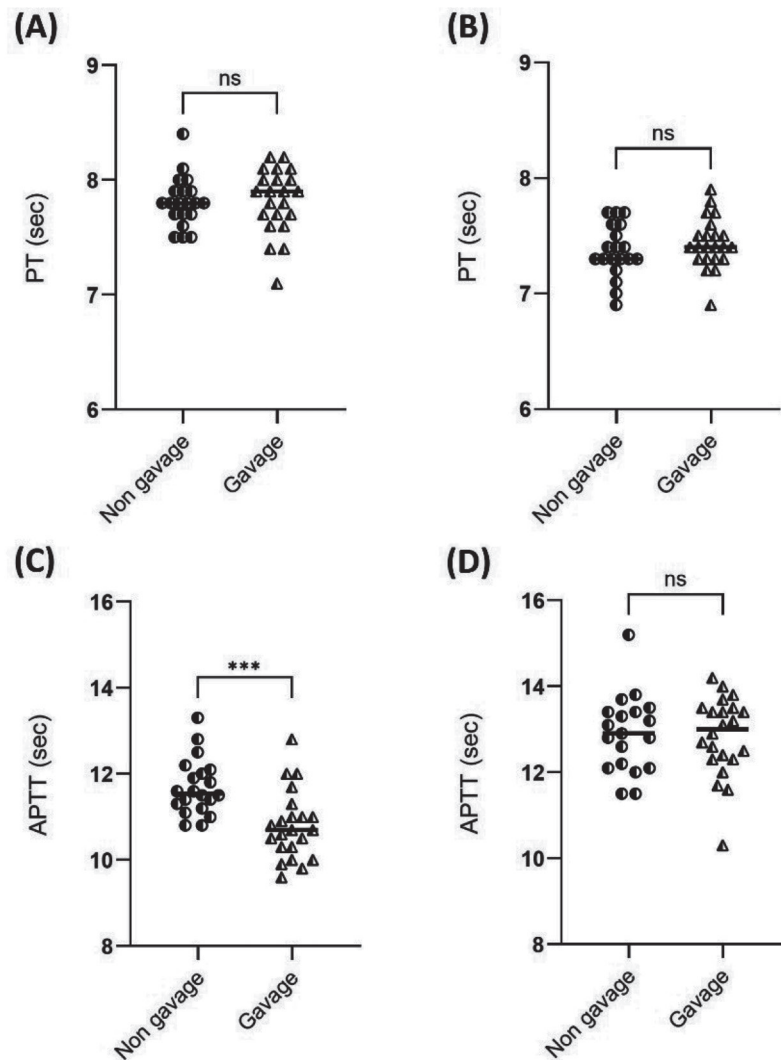
หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าการแข็งตัวของเลือด โดยเปรียบเทียบระหว่าง fresh citrate-plasma และ freeze citrate-plasma; (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

ค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ทดลองที่ผ่านการทำ oral gavage

เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการทำ oral gavage ต่อค่าการแข็งตัวของเลือด หนู Mlac:WR ทั้งเพศผู้และเพศเมียถูกป้อน sterile water ด้วยวิธี oral gavage วันละ 1 ครั้ง ต่อเนื่องกัน เป็นระยะเวลา 90 วัน แล้วนำค่าการแข็งตัวของเลือดมาเปรียบเทียบกับหนูก่อนที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage ที่มีอายุใกล้เคียงกัน (หนูก่อน

18–20 weeks) ดังแสดงในภาพที่ 3 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการทำ oral gavage ไม่ส่งผลต่อค่า PT ทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย ดังแสดงในภาพ 3(A) และ 3(B) อีกทั้งยังไม่ส่งผลต่อค่า APTT ในหนูเพศเมียอีกด้วย ดังแสดงในภาพ 3(D) แต่กลับส่งผลต่อค่า APTT ในหนูเพศผู้ให้สั้นกว่าหนูก่อน non-oral gavage อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.001$ ดังแสดงในภาพ 3(C)



หมายเหตุ: *Significant parameters at $p < 0.05$; **at $p < 0.01$ ***at $p < 0.001$

ภาพที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดของหนู Mlac:WR ระหว่างกลุ่มที่ผ่านการทำและไม่ได้ทำ oral gavage (A) ค่า PT ในหนูเพศผู้, (B) ค่า PT ในหนูเพศเมีย, (C) ค่า APTT ในหนูเพศผู้ และ (D) ค่า APTT ในหนูเพศเมีย

วิจารณ์

ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติเป็นหน่วยงานหลักของประเทศที่เปิดให้บริการการทดสอบความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์สุขภาพต่างๆ ทั้งนี้ศูนย์ฯ ได้เลือกใช้หนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR ที่ศูนย์ฯ ผลิตขึ้นเองมาเป็น animal model สำหรับการทดสอบความเป็นพิษใน OECD test guideline no.407 และ 408 เป็นต้น และเพื่อเป็นการประเมินความเป็นพิษของสารทดสอบที่มีต่อระบบการแข็งตัวของเลือดศูนย์ฯ จำเป็นต้องขยายขอบข่ายการตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดขึ้น

ได้แก่ PT และ APTT เพื่อมารองรับการทดสอบและช่วยเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบความเป็นพิษให้มากยิ่งขึ้น แต่เนื่องจากศูนย์ฯ ยังไม่เคยศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ทดลองใดๆ ที่ผลิตได้เองมาก่อน จึงตัดสินใจเลือกศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat สายพันธุ์ Mlac:WR เป็นอันดับแรกเนื่องจากเป็นสายพันธุ์หลักที่ใช้ในงานทดสอบความเป็นพิษและอาจเป็นประโยชน์ต่องานทดสอบความเป็นพิษของศูนย์ฯ ในอนาคตได้

ในอดีตมีคณะทำงานที่ได้ศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat มาก่อน เช่น คณะทำงานของ Lemini C และคณะ ซึ่งระบุค่า PT และ APTT ของหนู Wistar rat โตเต็มวัยเพศผู้ เท่ากับ 16.9 ± 0.30 และ 22.5 ± 0.60 ตามลำดับ ส่วนในเพศเมียโตเต็มวัยมีค่า PT และ APTT เป็น 18.4 ± 0.20 และ 19.7 ± 0.40 ตามลำดับ⁽¹³⁾ ในการศึกษาของ Goyal VK และคณะ ที่รายงานค่า PT และ APTT ในหนู Wistar rat อายุ 6-8 สัปดาห์ เพศผู้เป็น 15.32 ± 0.78 และ 13.15 ± 1.63 ตามลำดับ และในเพศเมียมีค่า 16.72 ± 0.99 และ 12.28 ± 1.72 ตามลำดับ⁽¹⁴⁾ จะเห็นได้ว่าค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ของแต่ละคณะทำงานมีค่าที่แตกต่างกันค่อนข้างมาก แม้ว่าจะทำการทดสอบค่าการแข็งตัวของเลือดในสัตว์ species เดียวกันก็ตาม อาจเนื่องมาจาก experimental conditions ที่ใช้ในการทดสอบของแต่ละห้องปฏิบัติการนั้นแตกต่างกัน อาทิ วิธีการเก็บตัวอย่างหรือตำแหน่งที่ใช้เจาะเก็บตัวอย่าง ชนิดและความเข้มข้นของ anticoagulant ที่เลือกใช้ นิยมใช้ sodium citrate ที่ 3.2% หรือ 3.8% ระยะเวลาและวิธีการเก็บเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างก่อนนำมาตรวจวิเคราะห์ และที่สำคัญที่สุด คือ coagulation test reagents และเครื่องตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดที่เลือกใช้⁽¹³⁾ ในการเก็บตัวอย่างเลือดสำหรับตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือด นิยมใช้สารประกอบ citrate เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด โดยใช้เลือด 9 ส่วน ผสมกับ citrate 1 ส่วน หากเก็บเลือดได้ปริมาณน้อยกว่าที่กำหนดหรือการที่สัตว์มีค่า hematocrit ที่สูงผิดปกติเนื่องจากมีภาวะ dehydration จะทำให้อัตราส่วนของ citrate เพิ่มขึ้น ซึ่งการมี citrate ที่เข้มข้นเกินไปจะสามารถเหนี่ยวนำให้ค่า PT และ APTT ยาวนานกว่าปกติได้⁽¹⁵⁻¹⁸⁾ PT reagent มักจะเป็นส่วนผสมระหว่าง tissue thromboplastin และ Ca^{2+} ส่วน APTT reagent ประกอบด้วย surface activator, phospholipid และ Ca^{2+} ซึ่งผู้ผลิตแต่ละบริษัทจะมีสูตรและส่วนผสมที่ต่างกัน ในการวัดค่า PT และ APTT เป็นการวัดการเกิด clot formation หลังจากเติม PT/APTT reagent ลงไปในปฏิกิริยา และหลักในการวัดปฏิกิริยาการเกิด plasma clotting ของ

เครื่องตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทั่วไปมี 2 วิธี ได้แก่ 1) monitoring turbidity of plasma during plasma coagulation และ 2) monitoring plasma viscosity during coagulation^(4,19) ดังนั้นค่า PT และ APTT ของแต่ละห้องปฏิบัติการอาจต่างกันได้ถึงแม้จะทดสอบในสัตว์สายพันธุ์เดียวกัน ทั้งนี้ขึ้นกับ coagulation test reagents และเครื่องมือที่ใช้ ซึ่งอาจมีหลักการตรวจและให้ equipment sensitivity ที่ต่างกัน

ในการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Wistar rat ของ Lemini C และคณะ พบว่าเพศของหนู Wistar rat ส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศ โดยพบว่าค่า PT และ APTT ของหนู Wistar rat เพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (ovariectomized Wistar rat) กับหนู Wistar rat เพศผู้ มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹³⁾ สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ที่พบว่าฮอร์โมน estrogen สามารถทำให้ค่า PT สั้นลงได้⁽²⁰⁾ อีกทั้งมีการศึกษาที่พบว่าฮอร์โมน 17β -oestradiol มีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานของ blood coagulation factor gene และ transcription factor ของ factor XII ซึ่งเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการ coagulation cascade activation รวมไปถึงการเกิด fibrinolysis อีกด้วย^(21,22) ผลการศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ของการศึกษานี้พบว่าค่า PT ในหนูเพศเมียสั้นกว่าในหนูเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดจากอิทธิพลของ steroid sex hormones ตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ร่วมกับการให้สัตว์ทดลองทำ fasting ในคืนก่อนที่จะตรวจวิเคราะห์อีกด้วย จึงมีผลให้ค่า PT ในหนูเพศผู้สั้นขึ้นกว่าปกติได้⁽²³⁾ ในทางตรงกันข้ามค่า APTT ของหนู Mlac:WR เพศเมียบกลับมีค่าที่นานกว่าในเพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ การที่ค่า APTT ของหนูเพศ Mlac:WR ในเพศเมียใช้เวลานานกว่าในเพศผู้ขัดแย้งกับผลของการศึกษาค่า APTT ในหนู Wistar rat ของคณะทำงานอื่นๆ ที่ค่า APTT ในเพศผู้และเมียมักจะใกล้เคียงกันหรือเพศเมียสั้นกว่าเล็กน้อย^(13,14) ซึ่งยังไม่ทราบเหตุผลที่แน่ชัดว่าเป็นเพราะเหตุใด แต่อาจเป็นไปได้ว่าปริมาณสัดส่วนของ fibrinogen หรือ coagulation factors

ในส่วนของ intrinsic pathway ในหนู Mlac:WR เพศเมียน่าจะมีในระดับที่ต่ำกว่าในเพศผู้ จึงส่งผลให้เกิด plasma clot หลังจากโดนกระตุ้นได้ช้ากว่าในเพศผู้ ก็เป็นไปได้ว่าจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ในแง่ปัจจัยด้านอายุที่มีต่อค่าการแข็งตัวของเลือด ได้เลือกศึกษาหนู Mlac:WR ทั้งหมด 4 ช่วงอายุ เพื่อเป็นตัวแทนระยะพัฒนาการของหนูในช่วงต่างๆ และสัมพันธ์กับการใช้งาน ดังนี้ 1) หนู 4-8 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์หรือหนูเด็ก โดยในงานทดสอบความเป็นพิษมักเริ่มให้สารทดสอบในช่วงอายุนี้นี้ (นิยม treat สารทดสอบในหนูอายุ 5-6 สัปดาห์) 2) หนู 10-12 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูวัยเจริญพันธุ์หรือวัยรุ่น เป็นช่วงอายุที่เริ่มจับมาผสมพันธุ์ได้ อีกทั้งเป็นช่วงที่อายุใกล้เคียงกับหนูที่ผ่านโครงการ repeated dose 28-days oral toxicity study in rodents 3) หนู 18-20 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูโตเต็มวัย และมีอายุใกล้เคียงกับหนูที่ผ่านโครงการ repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents และ 4) หนูอายุมากกว่า 35 สัปดาห์ เป็นตัวแทนของหนูที่เริ่มเข้าสู่วัยชราหรือเสื่อมสภาพ จากผลการเปรียบเทียบค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูแต่ละช่วงอายุ พบว่าอายุส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด (PT และ APTT) ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย โดยหนูก่อนวัยเจริญพันธุ์มักให้ค่าการแข็งตัวของเลือดที่สั้นกว่าช่วงอายุอื่นๆ และค่าการแข็งตัวของเลือดจะค่อนข้างเสถียรเมื่อหนูเริ่มโตเต็มวัย ซึ่งระบบต่างๆ ภายในร่างกายได้พัฒนาอย่างสมบูรณ์เต็มที่แล้ว สังเกตได้จากค่าการแข็งตัวของเลือดในหนูช่วงอายุ 18-20 สัปดาห์ และช่วงอายุมากกว่า 35 สัปดาห์ มักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้นค่า APTT ของในหนูเพศเมีย การที่อายุส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือด อาจเป็นเพราะแต่ละช่วงอายุมีพัฒนาการของระบบต่างๆ รวมถึงระบบการแข็งตัวของเลือด ปริมาณของเกล็ดเลือด และระดับฮอร์โมนที่ต่างกันในแต่ละช่วงอายุ สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ชี้ให้เห็นว่าอายุมีความเกี่ยวข้องกับค่าทางโลหิตวิทยาและค่าทางเคมีคลินิกของหนู Wistar rat^(24,25)

แม้จะมีการแนะนำให้ตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง แต่ในความเป็นจริง

แล้วห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่มักไม่สามารถทดสอบตัวอย่างได้ในทันที เนื่องจากข้อจำกัดต่างๆ เช่น จำนวนสัตว์ทดลองที่ต้องเก็บตัวอย่างในคราวเดียวกันมีจำนวนมาก ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ยุ่งยากและต้องใช้เวลา จำนวนเครื่องมือหรือแม้แต่ผู้ปฏิบัติงานไม่สอดคล้องกับจำนวนตัวอย่าง เป็นต้น ในกรณีที่ไม่สามารถทดสอบตัวอย่างในวันเดียวกับที่มีการเก็บตัวอย่างได้ ห้องปฏิบัติการบางแห่งจึงเลือกนำตัวอย่างไปแช่แข็งเพื่อรักษาสภาพของตัวอย่างก่อนนำไปตรวจในวันถัดไป ดังนั้นการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างเพื่อศึกษาผลกระทบของการเก็บรักษาทั้งในแง่ของระยะเวลาและอุณหภูมิอาจมีความจำเป็น เพื่อให้ผลการทดสอบมีความน่าเชื่อถือและสอดคล้องกับค่าจริงให้มากที่สุด ตามที่ CLSI guidelines ได้แนะนำว่าการตรวจวิเคราะห์ค่าการแข็งตัวของเลือดควรปฏิบัติให้เสร็จสิ้นภายใน 2-4 ชั่วโมง หากตัวอย่าง plasma อยู่ภายใต้อุณหภูมิห้อง แต่สามารถเก็บตัวอย่าง plasma ได้นานถึง 2 สัปดาห์ หากเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20°C ⁽¹²⁾ การศึกษาครั้งนี้จึงทำการทดสอบความเสถียรของตัวอย่างตามข้อแนะนำดังกล่าวและพบว่า freeze citrate-plasma ของหนู Mlac:WR ที่ผ่านการแช่แข็งที่ตู้ -20°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำให้ค่า PT และ APTT เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีผลให้ค่า PT สั้นลง แต่ทำให้ค่า APTT ยาวนานขึ้น ผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Goyal VK และคณะ ที่แสดงให้เห็นว่าแม้จะแช่แข็ง citrate-plasma ของหนู wistar rat ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถทำให้ค่า PT และ APTT เปลี่ยนแปลงไปอย่างมีนัยสำคัญได้เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่าง citrate-plasma ที่ทำการตรวจวิเคราะห์ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง⁽¹⁴⁾ การที่ค่าการแข็งตัวของเลือดในตัวอย่างที่ผ่านการแช่แข็งเปลี่ยนแปลงไป อาจเนื่องมาจากการสูญเสียหรือลดประสิทธิภาพการทำงานของโปรตีนที่เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือด มีรายงานระบุว่าค่า PT และ APTT ที่ยาวนานขึ้นมีความสัมพันธ์กับการลดปริมาณของโปรตีนที่เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือด factor ไต factor หนึ่งอย่างมีนัยสำคัญ⁽²⁶⁾ นอกจากนี้ความล่าช้าในการขนส่งและการเตรียมตัวอย่าง อาจทำให้ factor

ที่มีความเสถียรค่อนข้างต่ำ อย่าง factor V และ VIII ลดปริมาณลง จึงส่งผลให้กระบวนการ clotting เกิดได้ช้าลงตามไปด้วย⁽²⁷⁾ อย่างไรก็ตามค่า PT ของ freeze citrate-plasma ในการศึกษานี้กลับสั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับ fresh citrate-plasma ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดว่าเพราะเหตุใด แต่เคยมีรายงานว่า factor VII ซึ่งเป็น coagulation factor ในส่วนของ extrinsic pathway เป็นปัจจัยการแข็งตัวของเลือดที่มีความ stable มาก สามารถทนต่ออุณหภูมิต่างๆ และใช้เวลาการสลายตัวค่อนข้างนานกว่า factor อื่นๆ^(12,28,29) แต่สามารถถูกกระตุ้นการทำงานได้ด้วยความเย็น (Cold activation)⁽³⁰⁾ การได้รับสารกระตุ้น เช่น kaolin⁽³¹⁾ และ Microclot ที่ปะปนในตัวอย่างที่มีกระบวนการจัดการที่ไม่เหมาะสม⁽¹²⁾ ซึ่งสามารถส่งผลให้ค่า PT สั้นลงกว่าปกติได้

การทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ฟันแทะที่ได้รับสารทดสอบผ่านทางปากในบางโครงการ อาจต้องใช้วิธี oral gavage ในการช่วยส่งสารทดสอบเข้าสู่ร่างกายของสัตว์ทดลอง เพื่อให้แน่ใจว่าสัตว์ทดลองจะได้รับปริมาณยาที่ถูกต้องตามที่กำหนดและมีความสม่ำเสมอ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองอย่างต่อเนื่องสามารถทำให้สัตว์เกิดความเครียด รวมถึงเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความดันโลหิตและอัตราการเต้นของหัวใจ และมีระดับ corticosteroid ใน plasma สูงขึ้นได้^(9,10) เพื่อทดสอบผลการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองซ้ำๆ ว่าจะส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดหรือไม่ คณะผู้วิจัยจึงได้จำลองกลุ่มสัตว์ทดลองให้คล้ายกับกลุ่ม control ในงาน repeated dose 90-days oral toxicity study in rodents ของ OECD test guideline no.408 โดยป้อน sterile water ผ่านวิธี oral gavage ให้แก่หนู Mlac:WR วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 90 วันต่อเนื่องกัน แล้ววัดค่าการแข็งตัวของเลือดเปรียบเทียบกับ หนู Mlac:WR ที่ไม่ได้ผ่านการทำ oral gavage ที่มีช่วงอายุเดียวกัน (18-20 สัปดาห์) เป็นตัวเปรียบเทียบ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหนู Mlac:WR ที่ผ่านการทำ oral gavage ให้ค่าการแข็งตัวของเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่ม non-oral gavage ยกเว้นค่า APTT ของหนูเพศผู้ที่สั้นลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม oral gavage การที่ค่า APTT

ในกลุ่ม oral gavage สั้นกว่านั้น อาจเชื่อมโยงกับสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำ oral gavage ในสัตว์ทดลองกลุ่มนี้ (stress-induced hypercoagulability) สอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าความเครียดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน cortisol ออกมาได้ โดยฮอร์โมนชนิดนี้มีอิทธิพลต่อการสังเคราะห์และการทำงานของปัจจัยการแข็งตัวของเลือดหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง factor VIII, vWF และ fibrinogen ซึ่งเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการห้ามเลือดในฝั่ง intrinsic pathway^(32,33) อย่างไรก็ตามประเด็นความแตกต่างที่ปรากฏเฉพาะในหนูเพศผู้ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตเพื่อหาข้อสรุปที่แน่ชัดต่อไป แม้การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ในครั้งนี้จะใช้จำนวนตัวอย่างเพียงกลุ่มละประมาณ 20 ตัวเท่านั้น แต่ทำให้เห็นแนวโน้มและทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR อย่างคร่าวๆ ได้ ทั้งนี้เพื่อใช้เป็นแนวทางในการตัดสินใจเลือกกระบวนการตรวจวิเคราะห์และการเลือกตัวอย่างให้เหมาะสมกับการเป็นตัวแทนกลุ่ม เพื่อนำมาใช้ในการจัดทำค่า reference interval ในอนาคต ที่จำเพาะเจาะจง และสามารถสะท้อนถึงสภาวะของระบบการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ที่แท้จริงได้

สรุป

การศึกษาค่าการแข็งตัวของเลือดในหนู Mlac:WR ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าเพศ อายุ กระบวนการจัดการกับตัวอย่าง daily activity ที่ต่างกันของกลุ่มตัวอย่าง และ experimental conditions ที่เลือกใช้ในการทดสอบอาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดได้ การทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่อาจส่งผลต่อค่าการแข็งตัวของเลือดนอกจากจะทำให้หลีกเลี่ยงปัจจัยเสี่ยงที่อาจส่งผลให้ผลการตรวจวิเคราะห์ไม่สะท้อนกับภาวะสุขภาพของสัตว์ทดลองอย่างแท้จริงแล้ว ยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการจัดทำค่า reference interval ในอนาคตได้ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่แต่ละห้องปฏิบัติการต้องเป็นผู้กำหนดค่า reference interval ด้วยตัวเอง เพื่อให้มีความจำเพาะเจาะจงและเหมาะสมกับกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษามากยิ่งขึ้น

และเพิ่มความน่าเชื่อถือในการประเมินภาวะสุขภาพของสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในงานทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลองของผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์และเภสัชกรรม เช่น ยา สารเคมี สมุนไพร และวัคซีน เป็นต้น

การเปิดเผยการใช้ปัญญาประดิษฐ์

การจัดเตรียมต้นฉบับของบทความนี้มีการใช้ปัญญาประดิษฐ์ Gemini (Google, USA) เพื่อช่วยในการสืบค้นวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องและช่วยปรับปรุงแก้ไขภาษาอังกฤษให้ถูกต้องตามหลักไวยากรณ์ยิ่งขึ้น ทั้งนี้ผู้พิมพ์ได้ตรวจสอบความถูกต้องเหมาะสมของเนื้อหาและเอกสารอ้างอิงด้วยตนเองแล้ว นอกจากนี้ได้มีการใช้ GraphPad Prism Software (version 10.5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA) ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ รวมถึงการสร้างกราฟและรูปภาพที่ได้จากการศึกษานี้อีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สถาบันวัคซีนแห่งชาติ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการดำเนินงานและอนุมัติให้เผยแพร่ผลงานที่เกี่ยวข้องกับการตรวจวิเคราะห์การแข็งตัวของเลือดในหนูแรทสายพันธุ์ Mlac:WR ซึ่งเป็นข้อมูลภายใต้โครงการพัฒนาศักยภาพของการตรวจคุณภาพสัตว์ทดลอง เพื่อรองรับการผลิตวัคซีนของประเทศ ภายใต้สัญญาเลขที่ 2566.4/1 และ 2567.4/1 และขอขอบคุณ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ที่ให้การสนับสนุนในการศึกษาครั้งนี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Gale AJ. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. *Toxicol Pathol* 2011; 39(1): 273-80.
2. Palta S, Saroa R, Palta A. Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014; 58(5): 515-23.
3. Winter WE, Flax SD, Harris NS. Coagulation testing in the core laboratory. *Lab Med* 2017; 48(4): 295-313.
4. Kurata M, Horii I. Blood coagulation tests in toxicological studies--review of methods and their significance for drug safety assessment. *J Toxicol Sci* 2004; 29(1): 13-32.
5. Tomlinson L, Boone LI, Ramaiah L, Penraat KA, von Beust BR, Ameri M, et al. Best practices for veterinary toxicologic clinical pathology, with emphasis on the pharmaceutical and biotechnology industries. *Vet Clin Pathol* 2013; 42(3): 252-69.
6. Zaidi SRH, Rout P. Interpretation of blood clotting studies and values (PT, PTT, aPTT, INR, anti-factor Xa, D-dimer) [updated 2025 Oct 8]. In: StatPearls. [online]. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing; 2026. [cited 2026 May 10]. Available from: URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK604215>.
7. Levi M, Seligsohn U, Kaushansky K. Classification, clinical manifestations, and evaluation of disorders of hemostasis. In: Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M, editors. *Williams hematology*. 9th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2016. p. 1985-1992.
8. Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). Test Guideline No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. [online]. 2025; [cited 2026 May 10]; [17 screens]. Available from: URL: https://www.oecd.org/content/dam/oecd/en/publications/reports/2018/06/test-no-408-repeated-dose-90-day-oral-toxicity-study-in-rodents_g1gh2931/9789264070707-en.pdf.
9. Bonnicksen M, Dragsted N, Hansen AK. The welfare impact of gavage laboratory rats. *Anim Welf* 2005; 14(3): 223-7.
10. Brown AP, Dinger N, Levine BS. Stress produced by gavage administration in the rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2000; 39(1): 17-21.
11. Clements PJM, Bolon B, McInnes E, Mukaratirwa S, Scudamore C. Chapter 17, Animal models in toxicologic research: rodents. In: Haschek and Rousseaux's handbook of

- toxicologic pathology Vol. 1. 4th ed. London: Academic Press; 2022. p. 653-694.
12. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays; approved guideline. 5th ed. [online]. 2008; [cited 2026 May 10]; [11 screens]. Available from: URL: https://webstore.ansi.org/preview-pages/clsi/preview_h21-a5.pdf.
 13. Lemini C, Jaimez R, Franco Y. Gender and inter-species influence on coagulation tests of rats and mice. *Thromb Res* 2007; 120(3): 415-9.
 14. Goyal VK, Kakade S, Pandey SK, Gothi AK, Nirogi R. Determining the effect of storage conditions on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen concentration in rat plasma samples. *Lab Anim* 2015; 49(4): 311-8.
 15. Ingram GI, Hills M. The prothrombin time test: effect of varying citrate concentration. *Thromb Haemost* 1976; 36(1): 230-6.
 16. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA. Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 1997; 107(1): 105-10.
 17. O'Brien SR, Sellers TS, Meyer DJ. Artifactual prolongation of the activated partial thromboplastin time associated with hemoconcentration in dogs. *J Vet Intern Med* 1995; 9(3): 169-70.
 18. Kurata M, Noguchi N, Kasuga Y, Sugimoto T, Tanaka K, Hasegawa T. Prolongation of PT and APTT under excessive anticoagulant in plasma from rats and dogs. *J Toxicol Sci* 1998; 23(2): 149-53.
 19. Quick AJ, Stanley-Brown M, Bancroft FW. A study of the coagulation defect in hemophilia and in jaundice. *Am J Med Sci* 1935; 190(4): 501-11.
 20. Jolly DW, Kadis BM, Nelson TE Jr. Estrogen and prothrombin synthesis. The prothrombinogenic action of estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; 74(1): 41-9.
 21. Kaplan AP, Silverberg M. The coagulation-kinin pathway of human plasma. *Blood* 1987; 70(1): 1-15.
 22. Cushman M. Effects of hormone replacement therapy and estrogen receptor modulators on markers of inflammation and coagulation. *Am J Cardiol* 2002; 90(1 Suppl 1): F7-F10.
 23. Tabata H, Nakamura S, Matszawa T. Some species differences in the false prolongation of prothrombin times and activated partial thromboplastin times in toxicology. *Comp Haematol Int* 1995; 5: 140-4.
 24. Boehm O, Zur B, Koch A, Tran N, Freyenhagen R, Hartmann M, et al. Clinical chemistry reference database for Wistar rats and C57/BL6 mice. *Biol Chem* 2007; 388(5): 547-54.
 25. Patel S, Patel S, Kotadiya A, Patel S, Shrimali B, Joshi N, et al. Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats. *Lab Anim Res* 2024; 40(1): 7. (12 pages).
 26. Casella S, Giannetto C, Fazio F, Giudice E, Piccione G. Assessment of prothrombin time, activated partial thromboplastin time, and fibrinogen concentration on equine plasma samples following different storage conditions. *J Vet Diagn Invest* 2009; 21(5): 674-8.
 27. Favaloro EJ, Funk DM, Lippi G. Pre-analytical variables in coagulation testing associated with diagnostic errors in hemostasis. *Lab Med* 2012; 43(2): 1-10.
 28. Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2001; 12(4): 229-36.
 29. Zürcher M, Sulzer I, Barizzi G, Lämmle B, Alberio L. Stability of coagulation assays performed in plasma from citrated whole blood

- transported at ambient temperature. *Thromb Haemost* 2008; 99(2): 416-26.
30. Seligsohn U, Zivelin A, Bar-Shani S. Cold-promoted activation of factor VII: is it a problem under blood bank conditions? *Haemostasis* 1983; 13(3): 186-91.
 31. Saito H, Ratnoff OD. Alteration of factor VII activity by activated Fletcher factor (a plasma kallikrein): a potential link between the intrinsic and extrinsic blood-clotting systems. *J Lab Clin Med* 1975; 85(3): 405-15.
 32. Obeagu EI. Stress-induced hemostasis: mechanisms and implications for health. *Ann Med Surg (Lond)* 2025; 87(6): 3300-9.
 33. von Känel R, Mills PJ, Fainman C, Dimsdale JE. Effects of psychological stress and psychiatric disorders on blood coagulation and fibrinolysis: a biobehavioral pathway to coronary artery disease?. *Psychosom Med* 2001; 63(4): 531-44.
-

Study of Blood Coagulation Parameters in Mlac:WR Rat Produced by the National Laboratory Animal Center

Kanda Veeravechsukij and Jirawat Khanongnoi

National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170, Thailand

ABSTRACT Wistar rats have been used as animal models for testing the toxicity of pharmacological products. Blood coagulation tests are used to detect abnormalities in the blood clotting mechanism. Currently, the Wistar rats produced by the National Laboratory Animal Center have not been studied for their blood coagulation values. Therefore, this study measured the blood coagulation parameters, prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), in Mlac:WR rats using a SYSMEX CA-660 automated coagulation analyzer. The results showed that both sex and age significantly affected the mean PT and APTT values at the 95% confidence level ($p < 0.05$). In terms of stability, plasma samples stored at -20°C for 2 weeks prior to analysis tended to have shorter PT values but significantly prolonged APTT values ($p < 0.001$). Furthermore, Mlac:WR rats that received sterile water via oral gavage for 90 consecutive days showed no significant differences in coagulation values compared to the non-oral gavage group, except for the male APTT value, which significantly decreased in the oral gavage group ($p < 0.001$). This study demonstrates that sex, age, and variations in the daily routines of experimental animals, as well as pre-analytical sample storage conditions, can influence blood coagulation parameters in Wistar rats.

Keywords: Mlac:WR rat, Blood coagulation, Prothrombin time (PT), Activated partial thromboplastin time (APTT), Coagulation factors