2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแร็ทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักตัว 273.0±6.0 กรัม จำนวน 60 ตัว จากหน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูกลุ่มนี้ถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ 25°C ควบคุมแสงให้มีสัดส่วนระหว่างสว่าง : มืดเท่ากับ 12 :12 ชั่วโมง ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., ประเทศไทย) และน้ำประปาโดยไม่จำกัดปริมาณ

2. ยาและสารเคมี

2.1 Anthrone ($C_{14}H_{10}O$), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์

2.2 Ammonium sulfamate ($H_6N_2O_3S$), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์

2.3 Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Merck, เยอรมัน

2.4 Digoxin, Glaxo Wellcome, อังกฤษ

2.5 D(+)- Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์

2.6 D(-)-Fructose ($C_6H_{12}O_6$), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์

2.7 Heparin, LEO, เดนมาร์ก

2.8 Hydrochloric acid (HCl), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.9 Inactin [5-ethyl-5(L-methylpropyl)-2 thiobarbituric acid], RBI, สหรัฐอเมริกา

2.10 Inulin, Sigma, สหรัฐอเมริกา

2.11 Lithium chloride (LiCl), Baker, สหรัฐอเมริกา

2.12 Magnesium chloride hexahydrate ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.13 Magnesium sulfate ($MgSO_4$), Baker, สหรัฐอเมริกา

2.14 N- (1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride ($C_{12}H_{16}C_{12}N_2$), Merck, เยอรมัน

2.15 Para-aminohippuric acid, sodium salt ($C_9H_9N_2O_3Na$), Merck, เยอรมัน

2.16 Potassium chloride (KCl), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.17 Sodium chloride (NaCl), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.18 Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.19 Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$), Merck, สหรัฐอเมริกา

2.20 Sodium hydroxide (NaOH), May and Baker, อังกฤษ

2.21 Sodium nitrite ($NaNO_2$), Monteoison, สหรัฐอเมริกา

2.22 Sulfuric acid (H_2SO_4), Baker, สหรัฐอเมริกา

2.23 Trichloroacetic acid (CCl_3COOH), Fluka, สวิสเซอร์แลนด์

อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
2. เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (themostat-heater-circulator), Model D1, HAAKE, เดนมาร์ก
3. เครื่องชั่งอย่างละเอียด, Model CC023D10ADBAAA, Avery Barkel, อังกฤษ
4. ไปเปตต์อัตโนมัติ (automatic pipettes), Eppendorf, เยอรมัน
5. เครื่องบันทึกกราฟ (polygraph), Model 7P1F, Grass, สหรัฐอเมริกา พร้อมอุปกรณ์ประกอบด้วย tachograph preamplifier, Model 7P44A, Grass, สหรัฐอเมริกา และ force transducer, Model FT03, Grass, สหรัฐอเมริกา
6. เครื่องแปลงสัญญาณความดัน (pressure transducer), Model Statham P23XL, Grass, สหรัฐอเมริกา
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), Model CyberScan pH 2000, Eutech, สิงคโปร์
8. ชุด organ bath ขนาด 20 ml
9. ถังก๊าซคาร์โบเจน (95% O_2 + 5%CO_2) พร้อมตัวปรับก๊าซ (gas regulator)
10. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge), Model 4232, A.L.C., อิตาลี
11. เครื่องปั่นแยกเม็ดเลือดแดง (microhematocrit centrifuge), Model MB, IEC, สหรัฐอเมริกา
12. ท่อ polyethylene, Clay Adams, สหรัฐอเมริกา
13. เครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump), Model 975, Harvard, สหรัฐอเมริกา
14. เครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer), Model AVL ISE 988-3, ออสเตรีย
15. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุ (inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer), Model Plasma 1000, สหรัฐอเมริกา
16. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer), Model Spectronic 21, สหรัฐอเมริกา
17. เครื่องควบคุมอุณหภูมิสัตว์ทดลองทางทวารหนัก (electronic rectal temperature probe), Harvard, สหรัฐอเมริกา

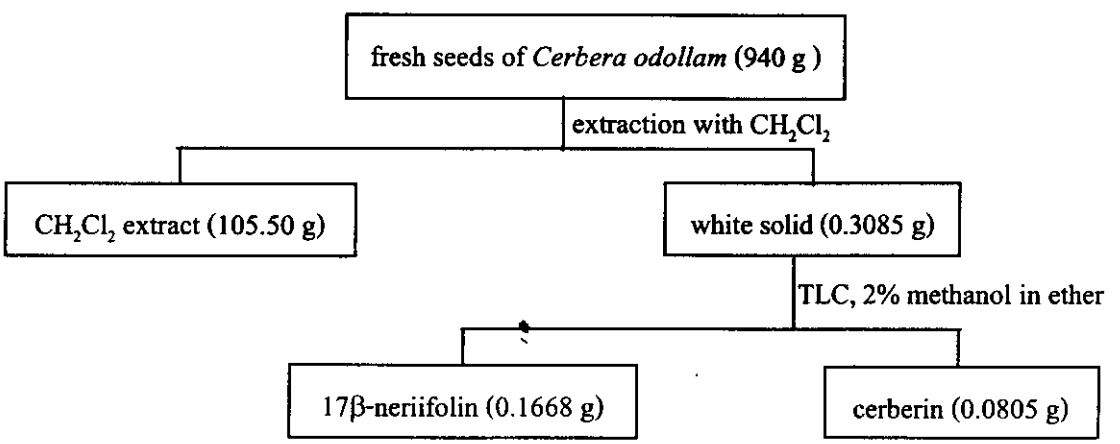
วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 *In vitro* experiment

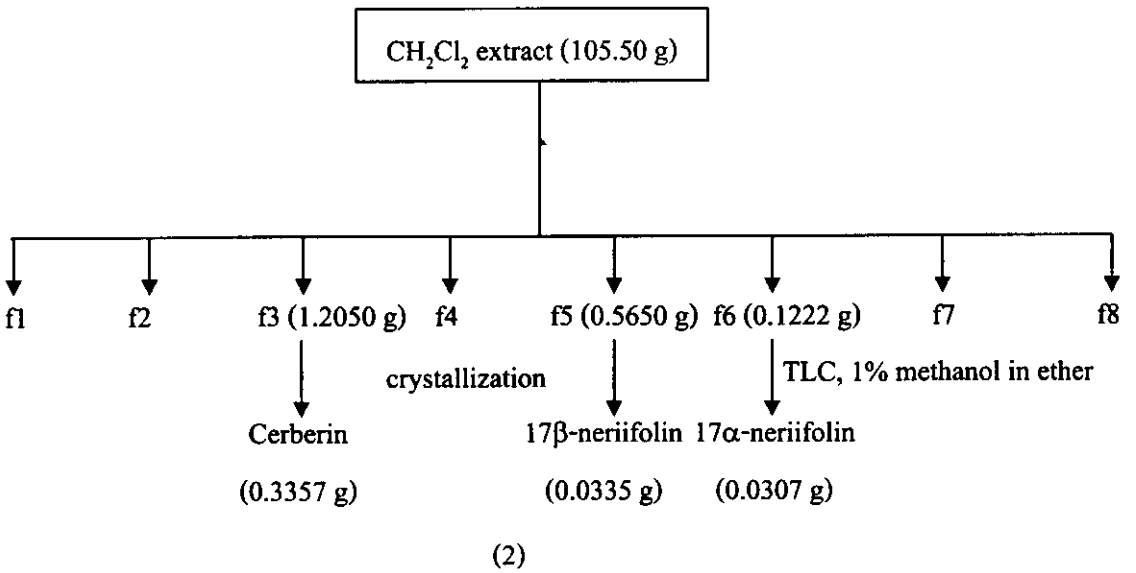
การศึกษาผลของ cardenolide glycoside 2 สารคือ cerberin และ 17β-neriifolin ต่อการบีบตัวของหัวใจห้องบน (atrium) ที่แยกออกจากตัวโดยวัดความแรงในการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจ และเปรียบเทียบผลกับ digoxin

1.1 การสกัดสารจากเมล็ดของตีนเป็ดทะเล (*Cerbera odollam*) (รูปที่ 2.1)

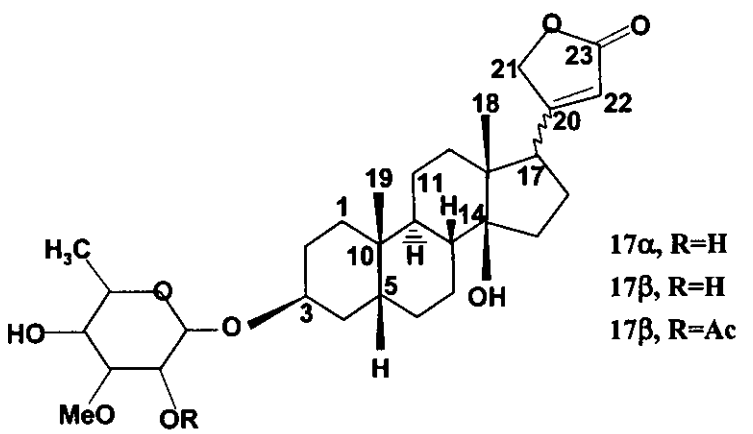
นำผลสดของตีนเป็ดทะเลมาแยกเมล็ดออก นำเมล็ดที่ได้ (940 g) มาแช่ใน methylene chloride (CH_2Cl_2) ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำสารผสมที่ได้มากรองจะได้ส่วนของตะกอนสีขาว (0.3085 g) และส่วนที่เป็นของเหลวสีเหลือง นำส่วนตะกอนสีขาวมาแยกสารด้วยวิธี thin layer chromatography (TLC) โดยใช้ 2% methanol ใน ether เป็นตัวชะ จะได้สาร cardenolide glycoside 2 ชนิด คือ cerberin (0.0805 g) กับ 17β-neriifolin (0.1668 g) (รูปที่ 2.1 (1)) สำหรับส่วนที่เป็นของเหลวสีเหลืองนำมาระเหยตัวทำละลายออกโดยใช้เครื่องระเหยสารแบบหมุนจะได้เป็นน้ำมันสีเหลือง (105.50 g) แล้วจึงใช้วิธี column chromatography (CC) แยกสารออกมาได้ทั้งหมด 8 fractions (f) นำ f3 (1.2050 g) และ f5 (0.5650 g) มาทำการตกผลึก (crystallization) จะได้สาร cerberin (0.3357 g) กับ 17β-neriifolin (0.0335 g) ตามลำดับ ซึ่งนอกจากจะได้17β-neriifolin ยังได้ 17α-neriifolin (0.0307 g) จาก f6 (0.1222 g) โดยวิธี TLC และใช้ 1% methanol ใน ether เป็นตัวชะ (รูปที่ 2.1 (2)) ซึ่งสูตรโครงสร้างของสารทั้งสามตัวแสดงดังรูปที่ 2.2



(1)



รูปที่ 2.1 แสดงแผนภูมิการสกัดสารทางเคมีจากเมล็ดสดของตีนเป็ดทะเล



รูปที่ 2.2 แสดงสูตรโครงสร้างของ cerberin (17β, R= Ac), 17β-neriifolin (17β, R= H) และ 17α-neriifolin (17α, R= H) (Laphookhieo *et al.*, 2004)
(การทดลองส่วนนี้รับผิดชอบโดยภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

1.2 การเตรียมสารละลาย Tyrode

สารละลาย Tyrode ประกอบด้วยสารต่างๆ ที่ความเข้มข้น g l^{-1} ดังนี้ NaCl 8.0, KCl 0.20, $MgCl_2$ 0.10, $CaCl_2$ 0.20, NaH_2PO_4 0.05, $NaHCO_3$ 1.0 และ glucose 1.0 ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่น จากนั้นวัด pH ของสารละลายโดยใช้ pH meter ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 โดยใช้ 0.2 M HCl หรือ 0.2 M NaOH

1.3 การเตรียมกล้ามเนื้อหัวใจห้องบน

นำหนูที่จะใช้ในการทดลองมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นทำให้หนูเสียชีวิตโดยวิธีการดึงคอ เปิดช่องอกตัดเอาหัวใจออกมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีสารละลาย Tyrode อุณหภูมิ 37°C ปล่อยให้หัวใจบีบตัวขับเลือดออกมาให้หมด แล้วใช้กรรไกรตัดแยกหัวใจห้องบน ทั้งสองข้างออกจาก ventricle ใช้ตะขอลวดเกี่ยวหัวใจห้องบน โดยที่ตะขออันหนึ่งจะยึดติดกับแท่งแก้วรูปตัวแอล และใช้ตะขออีกอันที่มีด้ายผูกไว้เกี่ยวที่ส่วนของหัวใจห้องบน อีกข้างหนึ่ง จากนั้นนำหัวใจห้องบน ที่มีตะขอเกี่ยวเรียบร้อยแล้วแขวนใน organ bath ซึ่งมีสารละลาย Tyrode บรรจุอยู่ 20 ml มีก๊าซคาร์โบเจน (95% O_2+ 5% CO_2) ผ่านตลอดเวลาและควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C โดยนำตะขอที่มีด้ายผูกไว้ไปยึด force displacement transducer ซึ่งต่อเข้ากับเครื่อง polygraph เพื่อบันทึกผลการทดลอง

1.4 แผนการทดลอง

ก่อนเริ่มทำการทดลองทุกครั้งทำการ calibrate เครื่องบันทึก polygraph โดยใช้ตุ้มน้ำหนัก 1 กรัม แขวนที่ force displacement transducer แล้วปรับให้เส้นบันทึกเลื่อนขึ้น 1 cm ส่วน tachograph ปรับปุ่ม 4CM TACH SCALE B/M ไปที่ 200-600 ปรับปุ่ม SCALE ไปที่ center ใช้ไขควงปรับให้เส้นบันทึกอยู่ตรงกลาง แล้วปรับไปที่ +2 cm ปรับให้เส้นบันทึกเลื่อนขึ้นจาก center 2 cm จากนั้นปรับไปที่ –2 cm แล้วปรับให้เส้นบันทึกเลื่อนลงจาก center 2 cm ปรับปุ่ม SCALE ไปที่ A.C. fast ปรับปุ่ม threshold ให้มีไฟกระพริบที่ตำแหน่ง tachograph

หลังจากเตรียมหัวใจห้องบน ดังข้อ 1.3 และ calibrate เครื่อง polygraph แล้ว รอให้ความแรงของการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจคงที่ (ความกว้างของเส้นบันทึกประมาณ 1 cm) บันทึกค่า control เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงหยดสารละลาย absolute ethanol หรือ cardenolide glycoside (cerberin หรือ 17β-neriifolin ที่ละลายใน absolute ethanol) หรือ digoxin ที่ความเข้มข้นจากต่ำไปสูง โดยแต่ละความเข้มข้นบันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 20 นาที ก่อนที่จะทดลองความเข้มข้นที่สูงขึ้นทำการล้างด้วยสารละลาย Tyrode แล้วรอให้เส้นบันทึกคงที่และบันทึกค่า control ทุกครั้งก่อนหยดสารละลายครั้งต่อไป ผลการทดลองจะอ่าน 3 ช่วงเวลาคือ นาทีที่ 0-1, 1-10 และ 10-20 โดยเปรียบเทียบกับช่วง control และแสดงผลการเปลี่ยนแปลงเป็นร้อยละของค่า control โดยค่าที่ลดลงจาก control จะแสดงเป็นค่าติดลบ

1.5 การออกแบบการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1.5.1 กลุ่มควบคุม จำนวน 6 ตัว โดย หัวใจห้องบนของหนูกลุ่มนี้ได้รับ absolute ethanol ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสารสกัด cerberin และ 17β-neriifolin ปริมาตร 5, 10, 25, 50 และ 75 µl หยดลงใน organ bath ขนาด 20 ml ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของ ethanol ใน organ bath มีค่า 0.012, 0.025, 0.062, 0.125 และ 0.188 % ตามลำดับ

1.5.2 กลุ่มที่ได้รับ cerberin จำนวน 7 ตัว หัวใจห้องบนของหนูกลุ่มนี้ได้รับ cerberin ขนาดความเข้มข้นใน organ bath มีค่าเท่ากับ 0.25, 2.5, 6.25, 12.5 และ 18.75 $\mu g\ ml^{-1}$ ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นมี ethanol ผสมอยู่ปริมาตร 5, 10, 25, 50 และ 75 µl ตามลำดับ

1.5.3 กลุ่มที่ได้รับ 17β-neriifolin จำนวน 6 ตัว หัวใจห้องบนของหนูกลุ่มนี้ได้รับ 17β-neriifolin ขนาดความเข้มข้นใน organ bath มีค่าเท่ากับ 0.25, 2.5, 6.25, 12.5 และ 18.75 $\mu g\ ml^{-1}$ ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นมี ethanol ผสมอยู่ปริมาตร 5, 10, 25, 50 และ 75 µl ตามลำดับ

1.5.4 กลุ่มที่ได้รับ digoxin จำนวน 9 ตัว หัวใจห้องบนของหนูกลุ่มนี้ได้รับ digoxin ขนาดความเข้มข้นใน organ bath มีค่าเท่ากับ 0.25, 2.5, 6.25, 12.5 และ 18.75 $\mu g\ ml^{-1}$ ตามลำดับ

1.6 การคำนวณ

การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากค่า control คำนวณจากการอ่านค่าที่บันทึกได้จากเครื่อง polygraph แล้วแทนค่าดังนี้

$$\frac{\text{ความกว้างของเส้นบันทึกหลังหยดสาร (cm)} - \text{ความกว้างของเส้นบันทึกก่อนหยดสาร (cm)}}{\text{ความกว้างของเส้นบันทึกก่อนหยดสาร (cm)}} \times 100$$

1.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลความแรงของการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบน หลังจากนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากค่า control แล้วจะรายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean) และค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (standard error of mean, S.E.M.) ของความแรงในการบีบตัวและอัตราการเต้นของหัวใจห้องบนที่แยกออกจากตัว วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละความเข้มข้นกับค่า control โดยใช้ paired *t*-test โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P< 0.05$

ตอนที่ 2 *In vivo* experiment

การศึกษาผลของ 17β-neriifolin ต่อความดันเลือดแดงและการทำงานของไตในหนูขาวโดยเปรียบเทียบผลกับ digoxin

การศึกษาผลของ 17β-neriifolin และ digoxin ต่อการทำงานของไตจะศึกษาผลในแง่การไหลเวียนของพลาสมาที่ไต (renal plasma flow, RPF) อัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate, GFR) การขับทิ้ง sodium และ potassium (sodium and potassium excretion) และการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วนต้น (proximal tubular reabsorption of sodium)

2.1 การเตรียมอาหารหนูทดลองเพื่อเพิ่มระดับ lithium ใน plasma

ในการศึกษาค่าการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal จะใช้เทคนิค lithium clearance (Thomsen *et al.*, 1984) โดยก่อนวันทดลอง 2 วันให้หนูทดลองได้รับอาหารที่เพิ่ม

lithium chloride (LiCl) 0.636 mg (15 mmol) ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม ทำโดยบดอาหารหนู 1 กิโลกรัมเติมน้ำกลั่น 500 ml และ LiCl 0.636 mg ผสมจนเข้ากันดี อัดเป็นก้อน แล้วนำไปอบให้แห้งใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง (Zhuo, 1990)

2.2. การเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของไตโดยวิธี clearance

2.2.1 การเตรียมสารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ

สารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็น clearance markers ในการประเมินค่า glomerular filtration rate (GFR) renal plasma flow (RPF) การดูดกลับของเหลวของหลอดไตฝอยส่วน proximal ประกอบด้วย 10% inulin, 1% para-aminohippuric acid (PAH) และ 4 mmol l^{-1} LiCl โดยสารทั้งหมดละลายใน 0.9% NaCl

2.2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง (รูปที่ 2.3)

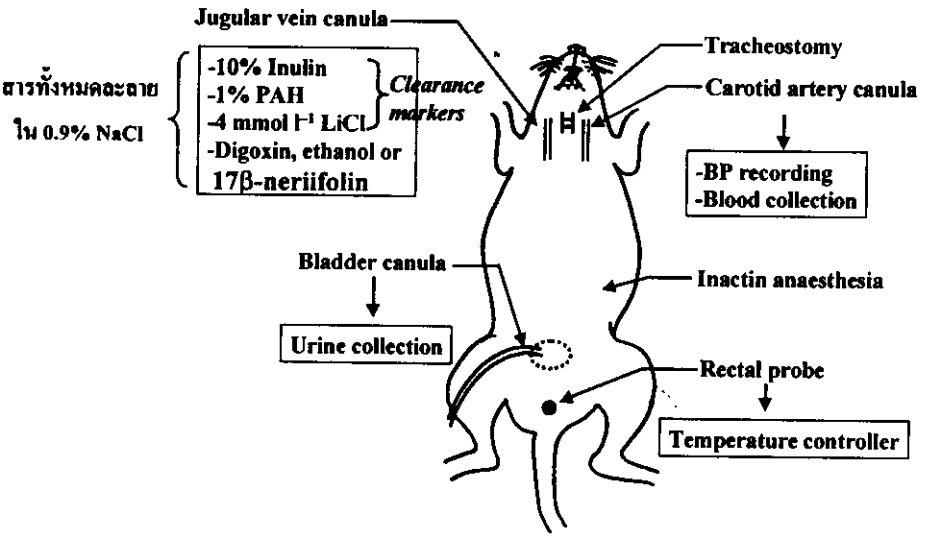
ในวันที่ทำการทดลองนำหนูมาชั่งน้ำหนัก สลบด้วย inactin ขนาด 110 mg $kgbw^{-1}$ ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) และให้เพิ่มเติมระหว่างการทดลองเมื่อมีความจำเป็น นำหนูวางบนเตียงผ่าตัดและควบคุมอุณหภูมิกายทางทวารหนักให้คงที่ที่ 37 °C ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิและดำเนินการผ่าตัดตามลำดับดังนี้

1) สอดท่อหลอดลม (tracheostomy) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-240) เพื่อช่วยในการถ่ายเทอากาศและระบายเสมหะ

2) สอดท่อหลอดเลือดแดง (arterial catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-50) ที่บรรจุสาร heparinized saline (อัตราส่วนระหว่าง heparin: 0.9% NaCl เท่ากับ 1:100) สอดเข้าหลอดเลือดแดง carotid ข้างขวา แล้วต่อเข้ากับ pressure transducer เพื่อบันทึกความดันเลือดแดงด้วยเครื่อง polygraph และใช้เป็นทางสำหรับเก็บตัวอย่างเลือด

3) สอดท่อหลอดเลือดดำ (venous catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-50) ที่บรรจุด้วยสารละลายที่ใช้เป็น clearance markers สอดเข้าหลอดเลือดดำ jugular ข้างซ้าย โดยต่อกับเครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump) เพื่อฉีดสารละลายที่ใช้เป็น clearance markers และสารต่างๆ ที่ใช้ในการทดลอง และใช้เป็นทางสำหรับคืนเลือด

4) สอดท่อกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder catheterization) โดยใช้ท่อ polyethylene (PE-200) สำหรับเก็บตัวอย่างปัสสาวะ



รูปที่ 2.3 ภาพการเตรียมสัตว์ทดลองเพื่อใช้ในการศึกษาการทำงานของไตโดยวิธี clearance (PAH = para-aminohippuric acid, BP = blood pressure)

ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลอง ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตอย่างสงบโดยฉีดสารละลาย saturated magnesium sulfate เข้าทางหลอดเลือดดำและเปิดช่องท้องตัดไตทั้งสองข้างออก เลาะผนังหุ้มไตและเยื่อไขมันออกซับให้แห้ง นำไตแต่ละข้างมาชั่งน้ำหนัก

2.2.3 แผนการทดลอง

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองตามข้อ 2.2.2 แล้วหนูทุกกลุ่มจะได้รับสารละลายที่ประกอบด้วย clearance markers ที่ละลายใน 0.9% NaCl เข้าทางหลอดเลือดดำ ด้วยอัตรา 1.6 ml hr^{-1} 100 g bw^{-1} ตลอดการทดลอง โดยก่อนการทดลองจะให้สัตว์ทดลองทุกตัวมีช่วง equilibration ประมาณ 60 นาที จากนั้นจะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงเวลา ช่วงเวลาละ 60 นาที คือ 1) ช่วงเวลา control 2) ช่วงเวลา treatment คือช่วงเวลาที่ให้สารละลาย ethanol, 17β-neriifolin หรือ digoxin และ 3) ช่วงเวลา post-treatment ซึ่งเป็นช่วงหลังจากหยุดให้สารละลาย ethanol, 17β-neriifolin หรือ digoxin การเก็บตัวอย่าง urine ของแต่ละช่วงเวลาการทดลองจะเก็บต่อเนื่องทั้ง 3 ช่วง ช่วงละ 20 นาที และการเก็บตัวอย่างเลือดจะเก็บช่วงเวลาละ 1 ครั้ง ครั้งละ 0.7 ml รวมทั้งสิ้น 3 ครั้ง (โดยเก็บในนาทีที่ 10, 30 และ 50 ของช่วงเวลา control, treatment และ post-treatment ตามลำดับ) ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บมาแบ่งเลือด 20 µl ปั่นแยกเม็ดเลือดแดงเพื่อหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, Hct) โดยใช้วิธีปั่นแยกด้วยเครื่อง microhematocrit centrifuge ส่วนเลือดที่เหลือนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge แยกเก็บเฉพาะ plasma ส่วนเม็ดเลือดแดงละลายใน 0.9% NaCl ให้ได้ปริมาตร 0.7 ml ฉีดคืนกลับทางหลอดเลือดดำ jugular ตัวอย่าง plasma และ urine นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ inulin, PAH, Na^+, K^+ และ Li^+ ต่อไป

2.2.4 การออกแบบการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

1) กลุ่ม time control จำนวน 8 ตัว ซึ่งหนูกลุ่มนี้ในช่วงเวลาทดลองทั้ง 3 ช่วงจะได้รับสารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำที่ใช้เป็น clearance markers เท่านั้น

2) กลุ่ม vehicle control จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้เป็น clearance markers และ absolute ethanol 5 μl 100g bw^{-1} การให้ ethanol จะให้ในลักษณะ continuous infusion เป็นเวลา 60 นาที ในช่วงเวลา treatment

3) กลุ่ม cardenolide glycoside จำนวน 8 ตัว เป็นหนูกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้เป็น clearance markers และ 17β-neriifolin ขนาด 2.4 mg kg bw^{-1} ซึ่งการให้ 17β-neriifolin ก็จะให้ในลักษณะ continuous infusion เป็นเวลา 60 นาที ในช่วงเวลา treatment

4) กลุ่ม digoxin จำนวน 8 ตัว เป็นกลุ่มที่ได้รับสารที่ใช้เป็น clearance markers และ digoxin ขนาด 2.4 mg kg bw^{-1} การให้ digoxin จะให้ในลักษณะ continuous infusion เป็นเวลา 60 นาที ในช่วงเวลา treatment

2.2.5 วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร (analytical methods)

2.2.5.1 การหาความเข้มข้นของ sodium และ potassium

ความเข้มข้นของ sodium และ potassium ในตัวอย่าง plasma และ urine วิเคราะห์ด้วยเครื่อง electrolyte analyzer ทำโดยนำตัวอย่าง urine เจือจางใน urine diluent ตามปริมาตรที่เหมาะสม ซึ่งขึ้นกับอัตราการไหลของ urine ส่วนตัวอย่าง plasma สามารถวิเคราะห์ผลได้โดยตรง

2.2.5.2 การหาความเข้มข้นของ inulin

การหาปริมาณความเข้มข้นของ inulin ที่มีอยู่ในตัวอย่าง plasma และ urine ใช้เทคนิค spectrophotometry (ภาคผนวกที่ 1) อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ inulin ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย fructose มาตรฐานตามวิธีของ Davidson และคณะ (1963)

2.2.5.3 การหาค่าความเข้มข้นของ para-aminohippuric acid (PAH)

การหาปริมาณความเข้มข้นของ PAH ที่มีอยู่ในตัวอย่าง plasma และ urine ใช้เทคนิค spectrophotometry (ภาคผนวกที่ 2) อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ PAH ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PAH มาตรฐานตามวิธีของ Smith และคณะ (1945)

2.2.5.4 การหาความเข้มข้นของ lithium

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ lithium ที่มีอยู่ในตัวอย่าง plasma และ urine โดยใช้เทคนิค atomic emission spectrometer (ภาคผนวกที่ 3) โดยเจือจางตัวอย่าง plasma และ urine ด้วย lithium diluent แล้ววัดด้วยเครื่อง inductively coupled plasma-atomic emission spectrometer (ICP-AES) ที่ช่วงคลื่น 670.8 นาโนเมตร ความเข้มข้นของ lithium สามารถประมาณได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับ emission counts ของสารละลาย lithium มาตรฐาน

การคำนวณ (calculations)

1. การคำนวณค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MABP) คำนวณจากการอ่านค่าความดันเลือดที่บันทึกได้จากเครื่อง polygraph แล้วแทนค่าตามสูตร

$$MABP = DP + (1/3 \times PP)$$ หน่วยเป็น mmHg

โดยที่ DP = ค่าความดัน diastolic ” mmHg

PP = ค่าแตกต่างระหว่างความดัน systolic กับ diastolic ” mmHg

2. การคำนวณหาอัตราการไหลของ urine ทำโดยนำค่าน้ำหนักความแตกต่างของน้ำหนัก eppendorf ที่บรรจุ urine กับน้ำหนัก eppendorf ก่อนบรรจุ urine มาประมาณค่าของ urine โดยประมาณว่าน้ำหนัก urine 1 g มีค่า 1 ml

$$\dot{V}\ (\mu l/min) = \frac{\text{น้ำหนัก eppendorf หลังเก็บ urine (g) - น้ำหนัก eppendorf ก่อนเก็บ urine (g)} \times 1000}{20\ min}$$

3. การคำนวณ clearance ของ inulin, PAH, Na^+, K^+ และ Li^+ คำนวณตามสูตร

$$C_X = [U_X] \times \dot{V} / [P_X]$$ หน่วยเป็น $ml\ min^{-1}$

โดยที่ C_X = clearance ของสาร X ” $ml\ min^{-1}$

X = inulin, PAH, Na^+, K^+ หรือ Li^+

$[U_X]$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน urine ” mg% หรือ $mmol\ l^{-1}$

$[P_X]$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน plasma ” mg% หรือ $mmol\ l^{-1}$

$\dot{V}$ = urine flow rate ” $ml\ min^{-1}$

4. การคำนวณ GFR และ RPF

ใช้ clearance ของ inulin ในการประมาณค่า GFR (Bergend, 1965) ส่วน clearance ของ PAH ใช้ประมาณค่า effective renal plasma flow (ERPF) แต่เนื่องจากมี plasma บางส่วนที่ไม่ผ่าน

glomeruli และบางส่วนผ่านไปยังเนื้อเยื่อไตที่ไม่มีการคัดหลั่ง PAH extraction ratio ของ PAH มีค่าประมาณ 0.9 (Valtin and Schafer, 1989) ดังนั้นในการคำนวณค่าประมาณของ total renal plasma flow (TRPF) จึงใช้ค่า ERPF/0.9 ml min^{-1} โดยในการทดลองครั้งนี้จะใช้อักษรย่อ RPF แทนค่า TRPF

สำหรับค่า fractional excretion, FE ของสารใด (X) สามารถคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$FE_X = (C_X/C_{In}) \times 100$ หน่วยเป็น %

โดยที่ FE_X = fractional excretion ของสาร X " %

C_X = clearance ของสาร X " ml min^{-1}

C_{In} = clearance ของ inulin " ml min^{-1}

5. การคำนวณค่า filtration fraction (FF) คำนวณจากสูตร

$FF = (C_{In}/RPF) \times 100$ หน่วยเป็น %

โดยที่ FF = filtration fraction " %

C_{In} = clearance ของ inulin " ml min^{-1}

RPF = renal plasma flow " ml min^{-1}

6. การคำนวณการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional proximal sodium reabsorption, FPR_{Na}) สามารถประมาณได้จากค่าการดูดกลับของ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional lithium reabsorption, FR_{Li}) เนื่องจากพบว่า lithium จะถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เท่านั้น (Thomsen *et al.*, 1984) และคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$FPR_{Na} = \frac{(C_{In} \times P_{Li})-(U_{Li} \times \dot{V}) \times 100}{(C_{In} \times P_{Li})}$$ หน่วยเป็น %

โดยที่ FPR_{Na} = fractional proximal sodium reabsorption " %

C_{In} = clearance ของ inulin " ml min^{-1}

P_{Li} = ความเข้มข้นของสาร Li ใน plasma " mg% หรือ mmol l^{-1}

U_{Li} = ความเข้มข้นของสารี Li ใน urine " mg% หรือ mmol l^{-1}

$\dot{V}$ = urine flow rate " ml min^{-1}

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆ จากการทดลองจะนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (mean และ S.E.M.) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่างๆ ระหว่างกลุ่มหรือภายในกลุ่มด้วย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่างๆ จากการทดลองจะนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (mean และ S.E.M.) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่างๆ ระหว่างกลุ่มหรือภายในกลุ่มด้วย analysis of variance (ANOVA) และเมื่อทราบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่างๆ ภายในกลุ่มการทดลองทั้งหมด ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Student-Newmen Keuls post hoc test โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$