วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแร็ทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักตัวระหว่าง 200 – 300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา หนูทั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ 23-24°C ความชื้น 50-55% มีแสงระหว่างเวลา 06:00 – 18:00 น. ได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., ประเทศไทย) และน้ำประปาโดยไม่จำกัดปริมาณ วิธีการทดลองทั้งหมดได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจรรยาบรรณสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (หนังสือรับรอง ศธ 0521.11/408 Ref. 20/49)

2. ยาและสารเคมี

1. Acetic acid (CH_3COOH), Merck, Darmstadt, Germany
2. Albumin from bovine serum, Sigma, St. Louis, USA
3. Ammonium sulfamate ($H_6N_2O_3S$), Fluka, Buchs, Switzerland
4. Anthrone ($C_{14}H_{10}O$), Fluka, Buchs, Switzerland
5. Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$), Merck, Darmstadt, Germany
6. Cis-diaminedichloroplatinum [cisplatin, (NH_3)$2Cl_2Pt$], Dabur Pharma, Brotivala, Distt Solan, India
7. Copper (II) sulfate pentahydrate ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), Sigma, St. Louis, USA
8. D(-)-Fructose ($C_6H_{12}O_6$), Fluka, Buchs, Switzerland
9. D(+)-Glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$), Fluka, Buchs, Switzerland
10. Di-sodium hydrogen phosphate anhydrous (Na_2HPO_4), Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy
11. Enzymatic colorimetric test for urea (UREA liquicolor), Human, Wiesbaden, Germany
12. Glycine (NH_2CH_2COOH), Ajax Finechem, Seven Hill, New South Wales, Australia
13. Heparin, Leo pharmaceutical, Ballerup, Denmark
14. Hydrochloric acid (HCl), Merck, Darmstadt, Germany
15. 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulonic acid (HEPES, $C_8H_{18}N_2O_4S$), Fluka, Switzerland

16. Inulin, Sigma, Steinheim, Germany

17. Magnesium sulfate heptahydrate ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), Merck, Darmstadt, Germany

18. n-Butanol [$CH_3(CH_2)_3OH$], Lab-Scan Analytical Science, Bangkok, Thailand

19. N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride ($C_{12}H_{16}Cl_2N_2$), Merck, Darmstadt, Germany

20. Para-aminohippuric acid ($C_9H_{10}N_2O_3$), Sigma, London, United Kingdom

21. Pentobarbitone sodium (Nembutal®), Ceva Sante Animale, Libourne, France

22. Potassium chloride (KCl), Merck, Darmstadt, Germany

23. Sodium acetate trihydrate ($CH_3COONa \cdot 3H_2O$), Merck, Darmstadt, Germany

24. Sodium chloride (NaCl), Ajax Finechem, Seven Hill, New South Wales, Australia

25. Sodium dihydrogen phosphate dihydrate ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$), Merck, Darmstadt, Germany

26. Sodium dodecyl sulfate ($C_{12}H_{25}NaO_4S$), Fluka, Buchs, Switzerland

27. Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$), Riedel-de Haen, Seelze, Denmark

28. Sodium hydroxide (NaOH), Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy

29. Sodium nitrite ($NaNO_2$), Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy

30. Sulfuric acid (H_2SO_4), Merck, Darmstadt, Germany

31. 1,1,3,3-Tetramethoxypropane ($C_7H_{16}O_4$), Fluka, Buchs, Switzerland

32. 2-Thiobarbituric acid ($C_4H_4N_2O_2S$), Sigma, Deisenhofen, Germany

33. Trichloroacetic acid (CCl_3COOH), Carlo Erba Reagenti, Milan, Italy

3. อุปกรณ์

1. Automatic pipettes, Eppendorf, Geritebau, Hamburg, Germany

2. Balance, Model CC023D10ADBAAA, Avery Barkel, United Kingdom.

3. Centrifuge, Model 4232, A.L.C., Italy

4. Digital infusion syringe pump, Model SP101i, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA

5. Electrolyte analyzer, Model AVL 988-3AVL, AVL List GmbH Medizintechnik, Hersteller, Graz, Austria

6. Hand hormogenizer grinder, Model 41640-323, China

7. Homeothermic blanket control unit, Harvard, Southnatick, Massachusetts, USA

8. IEC Micro-Hematocrit centrifuge, Model MB, Needham Heights, Massachusetts, USA

9. Infusion pump, Model 075 A, Harvard, Southnatick, Massachusetts, USA

10. pH meter, Model UB-5, Denver Instruments, Denver, USA

11. Polyethylene tube, Clay Adams, Parsippany, New Jersey, USA

12. Polygraph, Model RPS7C 8B, Grass, Massachusetts, USA

13. Pressure transducer, Model Statham P23XL, Grass, Massachusetts, USA

14. Spectrophotometer, Model Spectro SC, Labomed, Culver City, California, USA

15. Spectrophotometer, Model Ultrospec III 80-2097-62, Pharmacia LKB, Biochrom, Cambridge, United Kingdom

16. Surgery set

17. Tachograph preamplifier, Model 7P44A, Grass, Massachusetts, USA

18. Thermostat-heater-circulator, Model D1, HAAKE, Denmark

19. Ultrasonic cleaning bath, Model 460/H, Elma, Germany

4. วิธีการวิจัย

4.1 วิธีการเตรียมสารสกัดจากกลีบเลี้ยงกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำ

กลีบเลี้ยงสดของกระเจี๊ยบแดง (*Hibiscus sabdariffa* Linn.) เก็บจากอำเภอะนะ จังหวัดสงขลา ตัวอย่างพืช (specimen NO. SKP 1090819) ถูกเก็บไว้ที่ herbarium ของคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กลีบเลี้ยงสดของกระเจี๊ยบแดงถูกนำมาทำให้แห้งโดยอบที่อุณหภูมิ 50°C จากนั้นนำกลีบเลี้ยงแห้ง 5 กก. ต้มในน้ำ 30 ลิตร เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายที่ได้มากรองด้วย nylon cloth และทำให้แห้งโดย vacuum dry ที่อุณหภูมิ 40°C นาน 8-10 ชม. ปริมาณ yield ที่ได้คือ 4.6% ของน้ำหนักกลีบเลี้ยงสด จากนั้นนำสารสกัดที่แห้งดีแล้วนี้เก็บไว้

ในภาชนะปิดที่แห้ง เก็บภาชนะใน desiccator ที่อุณหภูมิห้อง กลีบเลี้ยงของกระเจี๊ยบแดงที่ใช้ทำวิจัยนี้ได้รับการยอมรับโดยมาตรฐานของ RAISE (Rural and Agricultural Incomes with a Sustainable Environment) (http://www.raise.com) ซึ่งมีค่ามาตรฐานต่าง ๆ ดังนี้ total ash 7.81% (RAISE standard < 10%), moisture 6.2% (RAISE standard < 12%) and acid insoluble ash 0.12 (RAISE standard < 1.5%) และจากการวิเคราะห์สารบริสุทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบพบว่ามี quercetin ปริมาณ 0.433 mg/g และมี delphinidin-3-sambubioside ปริมาณ 3.74 mg

4.2 **การออกแบบการทดลอง**

การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ตอน โดยตอนที่ 1 เป็นการทดลองเพื่อศึกษาขนาดและการตอบสนองของยา cisplatin ต่อระดับ renal MDA และการทำงานของไต โดยจะเลือกขนาดของยาที่ต่ำที่สุดที่สามารถชักนำให้เกิดภาวะไตวายเฉียบพลันในหนูเพื่อใช้การศึกษาตอนที่ 2 ต่อไป ภาวะไตวายเฉียบพลันจะประเมินจากการลดลงของค่า glomerular filtration rate (< 50%) และ การเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของค่า blood urea nitrogen (BUN)

การทดลองตอนที่ 1 จะแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม (กลุ่มละ 12-17 ตัว) แต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีดยา cisplatin ทางช่องท้องด้วยขนาด 4.5, 6, 7.5 และ 9 mg/kg ตามลำดับ และอีก 1 กลุ่มจะได้รับการฉีด 0.9% NaCl (18 ml/kg) เพื่อใช้เป็นกลุ่ม vehicle control ในวันที่สามหลังการฉีดยาหนูทุกกลุ่มจะถูกนำมาวัดค่า renal function โดยใช้เทคนิค clearance และวัด renal lipid peroxidation โดยทำการวัดระดับ MDA

การทดลองตอนที่ 2 จะทำการศึกษาความสามารถในการป้องกันหรือความสามารถในลดการเกิดภาวะไตวายเฉียบพลันและลดกระบวนการ renal lipid peroxidation ที่เกิดจากยา cisplatin โดยการป้อนสารสกัดจากกระเจี๊ยบแดงด้วยน้ำแบบ short term (4 กลุ่ม) และแบบ long term (4 กลุ่ม) การให้สารสกัดแบบ short term ทำโดยป้อนสารสกัดแห้งที่ละลายในน้ำกลั่น ขนาด 250 mg/kg ปริมาตร 5 ml/kg จำนวน 2 ครั้งคือ 24 ชม. และ 10 นาทีก่อนฉีดยา cisplatin หรือ vehicle solvent ส่วนการให้สารสกัดแบบ long term ทำโดยป้อนสารสกัดแห้งที่ละลายในน้ำกลั่นด้วยขนาดและปริมาตรแต่ละครั้งเท่ากับแบบ short term แต่ให้จำนวน 10 ครั้ง คือวันละครั้ง 7 วันก่อนฉีดยา cisplatin และอีก 3 วันหลังฉีดยา หลังการให้ยา cisplatin แล้วสามวัน หนูทุกกลุ่มจะถูกนำมาวัดค่า renal functions และ renal MDA โดยจำนวนหนูที่ใช้คือ 11-26 ตัวต่อกลุ่ม

4.3 การเตรียมการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของไตโดยวิธี clearance

4.3.1 การเตรียมสารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ

สารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็น clearance markers ในการประเมินค่า glomerular filtration rate (GFR) และ renal plasma flow (RPF) ประกอบด้วย 10% inulin และ 1% para-aminohippuric acid (PAH) 4 โดยสารทั้งหมดละลายใน 0.9% NaCl

4.3.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในวันที่ทำการทดลองนำหนูมาชั่งน้ำหนัก สลบด้วย pentobarbitone sodium (Nembutal®) ขนาด 60 mg kg bw^{-1} ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal, i.p.) และให้เพิ่มเติมระหว่างการทดลองเมื่อมีความจำเป็น นำหนูวางบนเตียงผ่าตัดและควบคุมอุณหภูมิกายทางทวารหนักให้คงที่ที่ 37 °C ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ และดำเนินการผ่าตัดตามลำดับดังนี้

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

ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลอง ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตอย่างสงบโดยฉีดสารละลาย saturated magnesium sulfate เข้าทางหลอดเลือดดำและเปิดช่องท้องตัดไตทั้งสองข้างออก เลาะผนังหุ้มไตและเยื่อไขมันออก ซับให้แห้ง นำไตแต่ละข้างมาชั่งน้ำหนัก

4.3.3 **วิธีการทดลอง**

หลังจากเตรียมสัตว์ทดลองแล้วหนูทุกกลุ่มจะได้รับสารละลายที่ประกอบด้วย clearance markers ที่ละลายใน 0.9% NaCl เข้าทางหลอดเลือดดำ ด้วยอัตรา 1.6 ml/hr/100 g bw ตลอดการทดลอง โดยก่อนการทดลองจะให้สัตว์ทดลองทุกตัวมีช่วง equilibration ประมาณ 60 นาที จากนั้นจะเก็บตัวอย่างปัสสาวะและเลือดในเวลาสองชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างปัสสาวะต่อเนื่อง 4 ครั้ง ๆ ละ 30 นาทีและเก็บตัวอย่างเลือด 3 ครั้ง ๆ ละ 0.7 ml โดยครั้งแรกและครั้งสุดท้ายจะเก็บที่เวลากึ่งกลางเวลาของการเก็บปัสสาวะ ใช้ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้ 20 µl นำมาปั่นแยกเม็ดเลือดแดงเพื่อหาค่าปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (Hematocrit, Hct) โดยใช้วิธีปั่นแยกด้วยเครื่อง microhematocrit centrifuge ส่วนเลือดที่เหลือนำไปปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge (4000 rpm, 5 min) แยกเก็บเฉพาะ plasma ส่วนเม็ดเลือดแดงละลายใน 0.9% NaCl ให้ได้ปริมาตร 0.7 ml ฉีดคืนกลับทางหลอดเลือดดำ jugular ตัวอย่าง plasma และ urine นำไปวิเคราะห์หาความเข้มข้นของ inulin, PAH, Na^+, K^+ และ BUN ต่อไป

4.4 **วิธีวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสาร** (analytical methods)

4.4.1 **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

4.4.2 **การหาความเข้มข้นของ** inulin

การหาปริมาณความเข้มข้นของ inulin ที่มีอยู่ในตัวอย่าง plasma และ urine ใช้เทคนิค spectrophotometry อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometerโดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 620 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ inulin ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย fructose มาตรฐานตามวิธีของ Davidson *et al.*,1963

4.4.3 **การหาค่าความเข้มข้นของ** para-aminohippuric acid (PAH)

การหาปริมาณความเข้มข้นของ PAH ที่มีอยู่ในตัวอย่าง plasma และ urine ใช้เทคนิค spectrophotometry อ่านค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร อ่านค่าความเข้มข้นของ PAH ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PAH มาตรฐานตามวิธีของ Smith *et al.*, 1945

4.4.4 **การหาความเข้มข้นของ** blood urea nitrogen (BUN)

ค่า BUN ประมาณโดยวิธี enzymatic method โดยใช้ urease enzyme kit โดยอ่านค่า absorbance ที่ 578 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer

4.5 **การคำนวณ** (calculations)

4.5.1 **การคำนวณค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย** (mean arterial blood pressure, MABP)

คำนวณจากการอ่านค่าความดันเลือดที่บันทึกได้จากเครื่อง polygraph แล้วแทนค่าตามสูตร

MABP = DP + (1/3 × PP) หน่วยเป็น mmHg

โดยที่ DP = ค่าความดัน diastolic " mmHg

PP = ค่าแตกต่างระหว่างความดัน systolic กับ diastolic หน่วยเป็น mmHg

การคำนวณหาอัตราการไหลของ urine ทำโดยนำค่าน้ำหนักของปัสสาวะมาประมาณค่าของ urine flow rate โดยประมาณว่าน้ำหนัก urine 1 g มีปริมาตร 1 ml

4.5.2 **การคำนวณ clearance ของ** inulin, PAH, Na^+ **และ** K^+ คำนวณตามสูตร

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

โดยที่ C_X = clearance ของสาร X " ml/min

X = inulin, PAH, Na^+ หรือ K^+

$[U_X]$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน urine " mg% หรือ mmol/l

$[P_X]$ = ความเข้มข้นของสาร X ใน plasma " mg% หรือ mmol/l

$\dot{V}$ = urine flow rate " ml/min

4.5.3 **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

4.5.4 **การคำนวณค่า** fractional excretion, FE ของสารใด (X) สามารถคำนวณโดยใช้สูตร

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

โดยที่ FE_X = fractional excretion ของสาร X " %

C_X = clearance ของสาร X " ml/min

C_{In} = clearance ของ inulin " ml/min

4.6 **วิธีการวัด** renal lipid peroxidation

4.6.1 **การเตรียม** tissue homogenate

ในวันที่ทำการทดลอง หนูจะถูกนำมาทำให้สลบด้วย pentobarbitone sodium (60 mg/kg, i.p.) จากนั้นนำ cannula (PE-100) ที่บรรจุ ice-cold isotonic buffer (pH 7.4) 50 ml ที่ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่มีความเข้มข้นเป็น mM ดังนี้ 130 NaCl, 5 $NaHCO_3$, 1.6 Na_2HPO_4, 0.4 NaH_2PO_4, 1.3 $CaCl_2$, 5 KCl, 1 $MgSO_4$, 10 CH_3COONa, 10 HEPES, 3 glucoseและ 2 glycine มาสอดเข้าทาง abdominal aorta ส่วนที่อยู่ต่ำกว่า left renal artery เพื่อทำ retrograde perfusion ของไตทั้งสองข้าง เมื่อไตทั้งสองข้างถูกไล่เลือดออกไปจนใสแล้ว ตัดไตออกมาลอกผนังหุ้มออกลัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ หรือสับจนละเอียดด้วยใบมีด จากนั้นนำไป homogenize ใน ice-cold 1.15% KCl (4 ml/g tissue) โดยใช้ hand homogenizer และใส่ใน sonicator อีก 1 ชม.

4.6.2 **การวิเคราะห์ระดับ malondialdehyde ใน renal tissue homogenate**

ระดับ malondialdehyde (MDA) หาได้จากการวัดในรูป thiobarbituric acid reacting substances (ดัดแปลงจาก Ohkawa *et al.*, 1979) โดยปริมาณ thiobarbituric acid reactive substances ประมาณได้จาก standard curve ที่ได้จากปริมาณ MDA จากกระบวนการ acid hydrolysis ของ 1,1,3,3-tetramethoxypropane โดยมีหน่วยเป็น nmol/mg protein

4.6.3 **การวิเคราะห์ปริมาณ protein ใน renal tissue homogenate**

ปริมาณ protein ใน renal tissue homogenate วัดโดยใช้วิธี micro-biuret method (Itzhaki and Gill, 1964) โดยใช้ albumin จาก bovine serum เป็น standard

4.7 **การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

ข้อมูลต่าง ๆ จากการทดลองจะนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (mean และ S.E.M.) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่าง ๆ ระหว่างกลุ่มหรือภายในกลุ่มด้วย analysis of variance (one way ANOVA) และเมื่อทราบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยต่าง ๆ ภายในกลุ่มการทดลองทั้งหมด ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างด้วย Student-Newmen Keuls post hoc test โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ค่า $P<0.05$