วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1.สัตว์ทดลอง

การทดลองใช้หนูแร็ท (rat) เพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 30 ตัว น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 215-232 กรัม จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ หนูถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ^{0}C ควบคุมแสงให้มีสัดส่วนระหว่างสว่าง : มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง (สว่างตั้งแต่ 6:00 น.-18:00 น.).ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T.,ประเทศไทย) และอาหารเพิ่มลิเธียม ให้น้ำประปาโดยไม่จำกัดปริมาณ

2.ยาและสารเคมี

2.1 Ammonium Sulfamate ($H_6N_2O_3S$)

2.2 Anthrone ($C_{14}H_{10}O$)

2.3 Heparin

2.4 Hydrochloric acid (HCl)

2.5 Inactin [5-ethyl-5(L-methylpropyl)-2 thiobarbituric acid]

2.6 Magnesium Sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)

2.7 N-(1-naphtyl)-ethylendiamin dihydrochloride ($C_{12}H_{16}CL_{12}H_2$)

2.8 Para-aminohippuric acid sodium salt, ($C_9H_9N_2O_3Na$)

2.9 Cisplatin

2.10 Polyfructosan

2.11 Sodium chloride (NaCl)

2.12 Sodium hydroxide (NaOH)

2.13 Sodium nitrite ($NaNo_2$)

2.14 Sulfuric acid (H_2SO_4)

2.15 Trichloroacetic acid (CCl_3COOH)

2.16 Zinc sulfate ($ZnSO_4.7H_2O$)

อุปกรณ์

1. เครื่องโพลีกราฟ (polygraph)
2. ตัวแปลงสัญญาณความดันเลือด (pressure transducer)
3. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge)
4. เตียงผ่าตัดสัตว์ทดลอง (operatimg table)

5. เครื่องควบคุมอุณหภูมิ(homeothermic blanket control unit)

6. เครื่องวัดอุณหภูมิทางทวารหนัก (electronic rectal temperature probe)

7. ชุดเครื่องมือผ่าตัด (surgical set)

8. เครื่องชั่ง (balance)

9. เครื่องผสมสาร (mixer)

10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

11. เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (circulating bath)

12. เครื่องฉีดสารละลายต่อเนื่อง (infusion pump)

13. เครื่องดูดสารอัตโนมัติ (autopipette)

14. เครื่องวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือแร่ (electrolyte analyzer)

15. เครื่องปั่นแยก (micro haematocrit centrifuge)

16. ท่อโพลีเอธิลลีน (polyethylene, PE) เบอร์ 50, 200, 240

17. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุ (inductivelycoupled plasma-atommic emission spectrometer)

วิธีการทดลอง

1.วิธีเตรียมอาหารหนูทดลองเพื่อเพิ่มระดับ lithium ใน plasma

ให้หนูทดลองได้รับอาหารที่เพิ่ม lithium chloride (LiCl) 0.636 mg (15 mmol) ต่อน้ำหนักอาหาร 1 กิโลกรัม ก่อนวันทดลอง 2 วัน (Zhuo,1990) ซึ่งทำโดยบดอาหารหนู 1 กิโลกรัม เติมน้ำกลั่น 600 ml และ LiCl 0.636 mg ผสมจนเข้ากันดี นำไปอบให้แห้ง ที่อุณหภูมิ 40-45^{0}C เวลา 10-12 ชั่วโมง ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง 2 วัน ก่อนนำมาทำการทดลอง

2. การเตรียมสารละลายเพื่อศึกษาด้วยวิธี clearance

สารละลายที่ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็น clearance markers ในการประมาณค่า glomerular filtration rate (GFR), renal plasma flow (RPF) และการดูดกลับของของเหลวของหลอดไตฝอยส่วน proximal ประกอบด้วย 8% polyfructosan (PFS), 1% para-aminohippuric acid (PAH) และ LiCl 4 mmol/l ในสารละลาย 0.9% NaCl

ค่า clearance ของ PFS ใช้แทน clearance ของ inulin ได้ จึงสามารถใช้ประมาณค่า GFR ได้เช่นกัน (Berglund,1965) clearance ของ PAH ใช้ประมาณค่า RPF (Smith,.et al.,1945) และ clearance ของ lithium ใช้ประมาณ ค่า proximal tubular sodium reabsorption ได้ (Thomsen, K and Schou, M.,1968)

3. การเตรียมสัตว์ทดลอง ก่อนทำการทดลอง

แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 2 กลุ่ม

3.1 กลุ่ม control ฉีดน้ำเกลือ เข้าช่องท้อง (intraperitoneal) โดยให้ปริมาตร 1.8 ml/100 g BW ในวันที่หนึ่งและให้อาหารปกติ ส่วนในวันที่สองและสามเปลี่ยนเป็นอาหารผสม LiCl ที่เตรียมไว้ วันที่สี่ชั่งน้ำหนัก นำไปทดลอง

3.2 กลุ่มทดลอง ฉีดยา cisplatin ขนาด 1, 3, 6, 9 mg/kg BW เป็น single dose เข้าช่องท้องเป็นปริมาตร 0.2, 0.6, 1.2, 1.8 ml/100 gBW ตามลำดับและให้อาหารเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม

4. การผ่าตัดสัตว์ทดลองในวันทำการทดลอง นำหนูทุกตัวมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการผ่าตัด ทำให้หนูสลบด้วย inactin ขนาด 110 mg/kg BW ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากหนูสลบดีแล้วโกนขนบริเวณคอและหน้าท้อง นำหนูวางบนเตียงผ่าตัดและควบคุมอุณหภูมิกายทางทวารหนักให้คงที่ที่ 37^{0}C ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิและดำเนินการผ่าตัดตามลำดับดังนี้

4.1 สอดท่อหลอดลม (trachea canulation) PE-240 เพื่อเป็นทางผ่านของอากาศ ในการหายใจและดูดระบายเสมหะ

4.2 สอดท่อหลอดเลือดแดง (arterial catheterization) ทางหลอดเลือดแดง carotid ข้างขวาโดยใช้ท่อ PE-50 ที่บรรจุสาร heparinized saline (1:100) แล้วต่อเข้ากับ pressure transducer เพื่อบันทึกความดันเลือดด้วยเครื่อง polygraph เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด การเก็บตัวอย่างเลือด ใช้หลอดแก้วขนาดความจุ 0.7 ml เก็บเลือดครั้งละ 0.7 ml แล้วนำไปปั่นแยกเอาเฉพาะ plasma (นำไปวิเคราะห์) เก็บในหลอด พลาสติก (microtube) ขนาดความจุ 0.5 ml แล้วเติม NSS ในเม็ดเลือดแดงให้ปริมาตรเท่าเดิม ใช้ pipette ดูดใส่ beaker 5 ml ไว้เพื่อคืนทางหลอดเลือดดำ

4.3 สอดท่อหลอดเลือดดำ (venous catheterization) ทางหลอดเลือดดำ jugular ข้างซ้าย โดยใช้ท่อ PE-50 สอดเข้าเพื่อฉีดสารที่ใช้วิเคราะห์หาเคลียรานซ์ (clearance marker) และคืนเลือด

4.4 สอดท่อกระเพาะปัสสาวะ (urinary bladder catheterization) ใช้ PE-200 เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะ

4.5 เมื่อเสร็จการทดลอง ทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตโดยฉีดสารละลาย saturated magnesium sulfate เข้าทางหลอดเลือดดำและเปิดช่องท้องตัดไตทั้งสองข้างออกจากตัวสัตว์ เลาะผนังหุ้มไตและเยื่อไขมันออกซับให้แห้ง นำไตแต่ละข้างมาชั่งน้ำหนัก

5. แผนการทดลอง

การทดลองแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่

5.1 กลุ่มควบคุม (control group) จำนวน 6 ตัว

5.2 กลุ่มทดลอง (treatment group) แบ่งเป็น 4 กลุ่มย่อย

5.2.1 cisplatin ขนาด 1 mg/kg BW จำนวน 6 ตัว

5.2.2 cisplatin ขนาด 3 mg/kg BW จำนวน 6 ตัว

5.2.3 cisplatin ขนาด 6 mg/kg BW จำนวน 6 ตัว

5.2.4 cisplatin ขนาด 9 mg/kg BW จำนวน 6 ตัว

หลังจากผ่าตัดเสร็จเรียบร้อย หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารละลายที่ประกอบด้วย clearance marker เข้าทางหลอดเลือดดำ jugular ด้วยอัตรา 1.6 ml/100 g BW/ hr ตลอดการทดลอง โดย 60 นาที จะแรกเป็นช่วง equilibration จากนั้นเก็บตัวอย่างปัสสาวะ ทุก 30 นาที จำนวน 6 ตัวอย่าง นำปัสสาวะที่ได้แต่ละครั้งไปชั่งน้ำหนัก เพื่อใช้คำนวณ ค่าของ urine flow rate (V) และนำปัสสาวะไปวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของ PFS, PAH, Na^+, K^+ และ Li^+ เก็บตัวอย่างเลือด 3 ครั้ง โดยที่ครั้งแรกเก็บ 15 นาทีหลังจากเริ่มเก็บปัสสาวะ เก็บครั้งที่สองตรงกับช่วงเวลาเก็บปัสสาวะครั้งที่สามและเก็บเลือดครั้งสุดท้ายก่อนเก็บปัสสาวะครั้งที่หก 15 นาทีจากนั้นนำตัวอย่างเลือดไป หาค่า haematocrit และปั่นแยกเก็บ พลาสมาไว้ตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะวิเคราะห์ หาค่าความเข้มข้นของสารต่างๆ เช่นเดียวกับในตัวอย่างปัสสาวะและวัดค่า BUN

6. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของสารในตัวอย่างปัสสาวะและพลาสมา

6.1 การวิเคราะห์หา polyfructosan (PFS)

การหาปริมาณของ PFS ที่มีอยู่ในปัสสาวะและพลาสมา เพื่อใช้ประมาณค่า อัตราการกรอง (GFR) ใช้วิธีของ Berglund,1965 โดยการนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 620 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer21 อ่านค่าความเข้มข้นของ PFS ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PFS มาตรฐาน

6.2 การวิเคราะห์หา para-aminohippuric acid (PAH)

การหาความเข้มข้นของ PAH ในตัวอย่างปัสสาวะและพลาสมา เพื่อใช้ประมาณค่า RPF ซึ่งใช้วิธีของ Smith et al.,1945 โดยการนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสารอาศัยคุณสมบัติการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 540 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer21 อ่านค่าความเข้มข้นของ PAH ได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นกับค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย PAH มาตรฐาน

6.3 การวิเคราะห์หา sodium (Na^+) potassium (K^+)

หาค่าความเข้มข้นของโซเดียมและโปแตสเซียมในตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ โดยการอ่านจากเครื่อง electrolyte analyzer model 988-3

6.4 การวิเคราะห์หา lithium (Li^+)

หาความเข้มข้นของ lithium เพื่อใช้หาการดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน proximal ทำได้โดยนำตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะ เจือจางใน lithium diluent วิเคราะห์หาปริมาณด้วยเครื่อง inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) ที่ความยาวคลื่น 670.8 nm ความเข้มข้นของ lithium ในพลาสมาและปัสสาวะ สามารถอ่านได้จากกราฟความสัมพันธ์ของความเข้มข้นมาตรฐาน

6.5 การวิเคราะห์หา BUN (blood urea nitrogen)

การหาปริมาณ urea ในเลือด ทำโดยหาความเข้มข้นของ urea ในพลาสมา อาศัยการดูดกลืนแสง (spectrophotometry) ที่ความยาวคลื่น 600 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer21 แล้วคำนวณค่าที่ได้จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ BUN กับค่าการดูดกลืนแสง

7. การคำนวณ

7.1 หาค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial blood pressure, MABP)

คำนวณจากค่าความดันเลือดค่าบน (systolic) และค่าล่าง (diastolic) ที่บันทึกได้จากเครื่อง polygraph model 7D แล้วแทนค่าตามสูตร

MABP = DP + (1/3 *PP) mmHg

โดยที่ DP = ค่าความดัน diatolic mmHg

PP = ค่าความแตกต่างระหว่างความดัน systolic กับ diastolic mmHg

7.2 การคำนวณหาอัตราการไหลของปัสสาวะ (urine flow rate, V)

การเก็บตัวอย่างปัสสาวะเก็บโดยใช้วิธี gravitational method โดยการประมาณค่า specific gravity ของตัวอย่างปัสสาวะเท่ากับ 1.0 (ปัสสาวะ 1.0 g = ปริมาตร 1.0 ml) นำ microtube ชั่งน้ำหนักและจดบันทึกก่อนนำไปเก็บตัวอย่าง และเมื่อเก็บเสร็จแล้ว นำไปชั่งน้ำหนักจดบันทึกอีกครั้งนำค่าที่ได้คำนวณดังนี้

V = น้ำหนักหลังเก็บ – น้ำหนักก่อนเก็บ = ปริมาตรของปัสสาวะ / เวลา 30 นาที µl/min

7.3 การคำนวณเคลียรานซ์ของ PFS, PAH, K^+, Na^+ และ Li

คำนวณตามสูตร

$C_x = [U_x] \times V / [P_x]$ ml/min

โดยที่ X = PFS, PAH, ...

C_x = เครียรานซ์ของสาร X ml/min

$[U_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในตัวอย่างปัสสาวะ mg%

$[P_x]$ = ความเข้มข้นของสาร X ในตัวอย่างพลาสมา mg%

V = อัตราการไหลของปัสสาวะ µl /min

7.4 การคำนวณอัตราการกรองผ่านโกลเมอรูลัส และพลาสมาที่ไหลผ่านไต (GFR, RPF)

การคำนวณอัตราการกรองผ่านโกลเมอรูลัส (GFR) ได้จากการประมาณค่าเคลียรานซ์ของ PFS (C_{PFS}) ส่วนปริมาณพลาสมาที่ไหลผ่านไตต่อนาที (RPF) ได้จากการประมาณค่าเคลียรานซ์ของ PAH (C_{PAH})ซึ่งใช้ประมาณค่า effective renal plasma flow (ERPF) แต่มีพลาสมาบางส่วนที่ไม่ผ่าน glomerulus จึงไม่ถูกกรองทำให้ extraction ratio ของ PAH = 0.9 ดังนั้น total renal plasma flow (TRPF) ในรายงาน ใช้ค่า RPF (Zhuo, et al., 1990)

RPF = ERPF / 0.9 ml /min

7.5 การคำนวณอัตราการขับทิ้ง (filtration excretion , FE) ของสารใดๆ (X) ใช้สูตร

$FE_{(x)} = [C_X / GFR] \times 100$ %

X = Na, K, Li

7.6 การคำนวณการดูดกลับโซเดียม

ค่าการดูดกลับ sodium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional proximal sodium reabsorption, FPR_{Na}) สามารถประมาณได้จากค่าการดูดกลับของ lithium ที่หลอดไตฝอยส่วน proximal (fractional lithium reabsorption,FR_{Li}) เนื่องจากพบว่า lithium จะถูกดูดกลับที่หลอดไตฝอยส่วน proximal เท่านั้น (Thomsen,1984)

$FPR_{Na} = (C_{PFS} \times P_{Li})-(U_{Li} \times V)/(C_{PFS} \times P_{Li}) \times 100$ %

7.7 การคำนวณ filtration fraction (FF)

FF = GFR/RPF X 100 %

8. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าที่ได้จากการศึกษานำเสนอเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M. และนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ *Student' s t-test* และ analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย post-hoc multiple comparison โดยจะยอมรับค่าความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ P value < 0.05