บทที่ 2
อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

เคมีภัณฑ์และแหล่งที่มา

1. Alcohol 95% (องค์การเภสัชกรรม)
2. Heparin : (5,000 iu/ml) (Leo)
3. Inulin (Sigma Chemical Company)
4. Manidipine hydrochloride (Takeda Chemical Industries)
5. P-Aminohippuric acid (Sigma Chemical Company)
6. Pentobarbital Sodium (Gane's Chemical Works, inc.)
7. Polyethyleneglycol-400 (Srichand United Dispensary Co.,LTD.)
8. Sodium Chloride (Srichand United Dispensary Co.,LTD)

เครื่องมือและแหล่งที่มา

1. เครื่อง physiograph (Narco bio-systems, inc.)
2. เครื่อง pressure transducer (Linear-core P-100 A, Narco bio-systems, inc.)
3. เครื่อง respiratory pump (Harvard apparatus Co.,inc, speed control)
4. เครื่อง micro tube pump MP-3 (Eyela)
5. เครื่อง centrifuge (ALC Apparecchi per Labolatori chemici Sri)

วิธีดำเนินการวิจัย

1 ใช้สุนัขพันธุ์ผสมเพศผู้โตเต็มที่ ร่างกายแข็งแรงน้ำหนัก 10-15 กิโลกรัม จำนวน 25 ตัว แบ่งศึกษาเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว

กลุ่มที่ 1 ศึกษาผลของ polyethyleneglycol-400 (PEG-400)

กลุ่มที่ 2 ศึกษาผลของยา manidipine

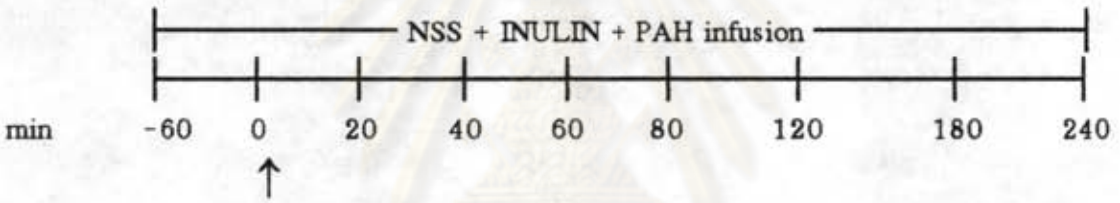
กลุ่มที่ 3 ศึกษาผลของยา manidipine ที่ให้ก่อนการฉีดพิษงูแมวเซา

กลุ่มที่ 4 ศึกษาผลของยา manidipine ที่ให้หลังการฉีดพิษงูแมวเซา

กลุ่มที่ 5 ศึกษาผลของพิษงูแมวเซา

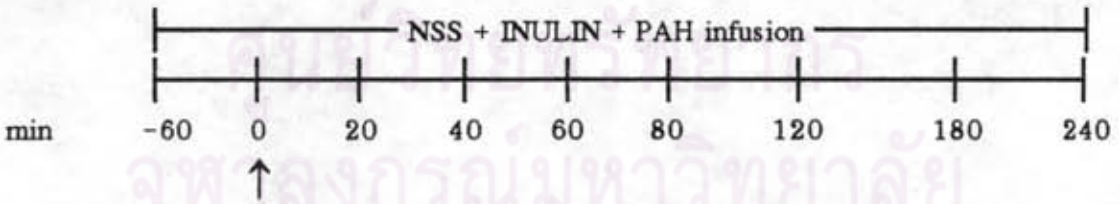
2 สุนัขที่นำมาศึกษาให้งดอาหาร 12 ชั่วโมงก่อนการศึกษา ทำให้สุนัขสลบด้วยการฉีดยา 2.5% pentobarbital sodium ในขนาด 25 มก./กก. เข้าหลอดเลือดดำ เจาะคอใส่ท่อรูปตัวที (T) แล้วต่อสายยางเข้ากับ respiratory pump เพื่อช่วยการหายใจ สอดท่อ (PE 200) เข้าสู่หลอดเลือดดำ femoral ด้านขวา เพื่อให้สารละลาย normal saline solution (NSS) สารที่ใช้ศึกษาการทำงานของไต inulin และ para-aminohippuric acid (PAH) รวมทั้งยาและพิษงูแมวเซา สอดท่อพลาสติกอีกท่อเข้าสู่หลอดเลือดแดง femoral ด้านขวา เพื่อบันทึกความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ และเก็บตัวอย่างเลือดขณะทำการทดลอง ผ่าตัดบริเวณถัดจากใต้ชายโครงด้านซ้ายประมาณ 1 นิ้ว เปิดหาท่อปัสสาวะ สอดท่อเข้าสู่ท่อปัสสาวะ (ureter) เพื่อเก็บตัวอย่างปัสสาวะและวัดปริมาณปัสสาวะ ปล่อยให้การทำงานของร่างกายอยู่ในสภาวะสมดุลย์ 1 ชั่วโมง จึงเริ่มการทดลอง ตามแผนผังที่แสดง

<u>กลุ่มที่ 1</u>



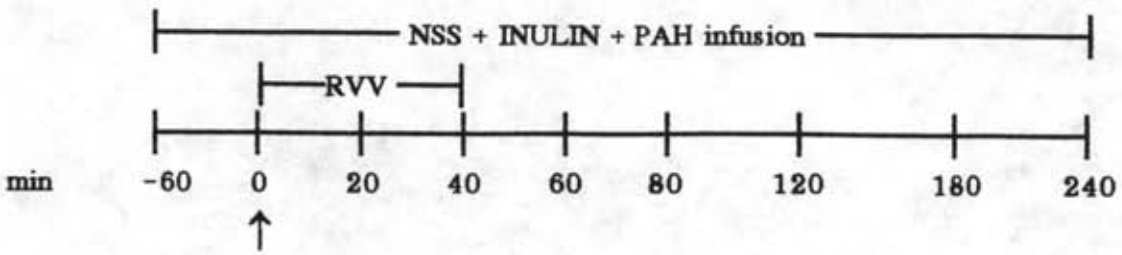
solvent (0.01 ml PEG-400/kgbw. diluted with NSS to2 ml) IV

<u>กลุ่มที่ 2</u>



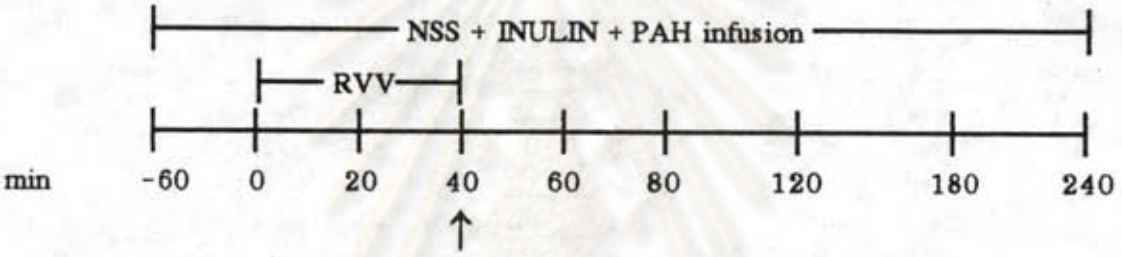
Manidipine in solvent 2 ml IV (10 μg/kgbw.)

กลุ่มที่ 3



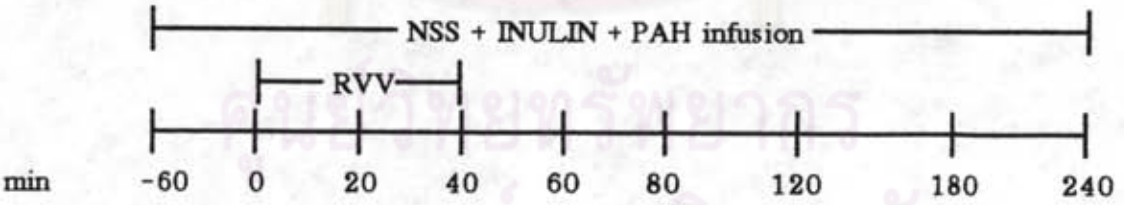
Manidipine in solvent 2 ml IV (10 μg/kgbw.)

กลุ่มที่ 4



Manidipine in solvent 2 ml IV (10 μg/kgbw.)

กลุ่มที่ 5



รูปที่ 5 แผนผังแสดงเวลาในการให้สารละลายกรดพาราอะมิโนฮิปปุริคและอินนูลิน พิษงูแมวเซา และยาแมนิดีปีนใน 5 กลุ่มการศึกษา

3 การให้สารศึกษาการทำงานของไต จะฉีดสารละลายที่มีกรดพาราอะมิโนฮิปปุริค (PAH) ความเข้มข้น 1.2% และสารละลายอินนูลิน (inulin) ความเข้มข้น 5% จำนวน 0.5 มล. /กก. เข้าหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นให้สารละลาย PAH และ inulin ซึ่งเจือจางด้วยน้ำเกลือความ

เข้มข้น 0.9% (NSS) ในอัตรา 1: 10 เท่า ให้สารละลายในอัตราคงที่คือ 1.8 มล/นาที ตลอดการทดลอง

4 การให้พิษงูแมวเซาในขนาด 0.1 มก./กก. ทำโดยละลายพิษงูแมวเซาใน 0.9% NaCl ให้ได้สารละลายปริมาตร 20 มล. เข้าหลอดเลือดดำด้วยอัตรา 0.5 มล./นาที นาน 40 นาที

5 การให้ยา manidipine ละลายด้วย polyethyleneglycol-400 ขนาด 0.01 มล./นน.ตัว ใน 0.9% NaCl ให้ได้ปริมาตร 2 มล.

6 บันทึกอัตราการเต้นของหัวใจ ความดันโลหิตตลอดการทดลอง

7 เก็บตัวอย่างปัสสาวะภายในเวลา 20 นาที ที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180, 240 นาที

8 เก็บตัวอย่างเลือดที่เวลา 0, 20, 40, 60, 80, 120, 180, 240 นาที แยกพลาสมาใส่หลอดพลาสติกแช่เย็น -20° c หรือต่ำกว่า เพื่อรอการวิเคราะห์

9 นำตัวอย่างพลาสมาและปัสสาวะไปวิเคราะห์หาปริมาณ inulin โดยวิธี anthrone calorimetric method หาปริมาณ PAH โดยวิธีของ Bratton และ Marshall ซึ่งอธิบายโดย Smith (1962) หาปริมาณโซเดียมและโปตัสเซียม โดยใช้ flame photometer และหาปริมาณคลอไรด์ด้วย chloridometer

10 วัดปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่นในเลือด (packed cell volumn) โดยวิธีบรรจุเลือดในหลอด microcapillary แล้ว centrifuge และอ่านด้วย micro-capillary reader

11 คำนวณหาค่า parameters ต่าง ๆ เกี่ยวกับการทำงานของไตดังนี้

Mean Arterial Pressure (MAP) = (SBP-DBP)/3 + DBP

Glomerular Filtration Rate (GFR) = $\frac{Uin\ V}{Pin}$

Effective Renal Plasma Flow (ERPF) = $\frac{U_{PAH}\ V}{P_{PAH}}$

Effective Renal Blood Flow (ERBF) = $\frac{ERPF \times 100}{100 - PCV}$

Filtration Fraction (FF) = $\frac{GFR}{ERPF}$

Renal Vascular Resistance (RVR) = $\frac{MAP \times 1330 \times 60}{ERBF \times 100}$

Urinary electrolyte Excretion = UeV

Fractional Excretion of electrolyte (FEe) = $\frac{UeV}{GFR \times Pe}$

อธิบายความหมายของคำ การคำนวณและหน่วยค่านั้น ๆ

1. Mean Arterial Blood Pressure คือ ค่าเฉลี่ยความดันเลือดแดง
   มีหน่วยเป็น มม.ปรอท
2. Glomerular Filtration Rate คือ อัตราการกรองที่โกลเมอรูลัส
   มีหน่วยเป็น มล./นาที แต่แสดงค่าต่อหน่วยน้ำหนักตัว 1 กก.
3. Effective Renal Plasma Flow คือ อัตราการไหลของพลาสมาที่ไต
   มีหน่วยเป็น มล./นาที แต่แสดงค่าต่อหน่วยน้ำหนักตัว 1 กก.
4. Effective Renal Blood Flow คือ อัตราการไหลของเลือดที่ไต
   มีหน่วยเป็น มล./นาที แต่แสดงค่าต่อหน่วยน้ำหนักตัว 1 กก.
5. Filtration Fraction หรือ อัตราส่วนการกรอง คือ อัตราส่วนของพลาสมาที่ไหลผ่านไตแล้วถูกกรองได้
6. Renal Vascular Resistance คือ ความต้านทานภายในหลอดเลือดแดง
   มีหน่วยเป็น 10^3 dyne-sec/cm^5
7. Urinary Electrlyte Excretion คือ ปริมาณอิเลคโตรไลท์ที่ถูกขับถ่ายออกมาในปัสสาวะ หรือปริมาณการขับถ่ายอิเลคโตรไลท์
   มีหน่วยเป็น ไมโครอิควิวาเลนซ์/นาที แต่แสดงค่าต่อหน่วยน้ำหนักตัว 1 กก.
8. Fractional electrolyte Excretion คือ อัตราส่วนการ clear electrolyte ออกจากพลาสมา ขับออกมาทางปัสสาวะ (clearance) เปรียบเทียบกับอัตราการกรองที่โกลเมอรูลัส
   ไม่มีหน่วย แต่แสดงค่าเป็นร้อยละ

สถิติที่ใช้ในการวิจัย

ข้อมูลนำเสนอเป็นค่า mean±SE ทดสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างในกลุ่มเดียวกันโดยใช้ Paired t-test เมื่อ p-value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ