



บทที่ 3

วิธีและขั้นตอนในการวิจัย

การศึกษาไขหนูแรทพันธุ์วิสตาร์ (Wistar rats) จำนวน 50 ตัว เพศผู้ น้ำหนักตัวอยู่ระหว่าง 250 - 350 กรัม แบ่งการทดลองเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของหย้าหมวดแมว ต่อการทำงานของไต และระบบไหลเวียนเลือด โดยการให้น้ำขังละลายหย้าหมวดแมวเพียงครั้งเดียวอย่างเฉียบพลัน แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม มีหนูทดลองกลุ่มละ 10 ตัว คือ

- กลุ่มที่ 1 ทำการศึกษาภายหลังจากการเตรียมตัวสัตว์ทดลอง แล้วแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ
  - ระยะควบคุม (Control) ให้น้ำทางสายยางสู่กระเพาะอาหาร 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 15 นาที เริ่มเก็บปัสสาวะทุก ๆ 10 นาที จนถึงนาทีที่ 55 ในช่วงนาทีที่ 35 ทำการเก็บตัวอย่างเลือด
  - ระยะทดลอง ให้น้ำขังหย้าหมวดแมวขนาด 10 % น้ำหนักต่อปริมาตร (W/V) จำนวน 1 มิลลิลิตร หลังจากนั้น 15 นาที เริ่มเก็บปัสสาวะและเลือด ศึกษาการทำงานของไต บันทึกระบบไหลเวียนเลือดในช่วงเวลาเหมือนระยะควบคุมไปจนครบ 2 ชั่วโมง ภายหลังจากให้น้ำขังหย้าหมวดแมว

- กลุ่มที่ 2 ทำการศึกษาเหมือนกลุ่มที่ 1 โดยเปลี่ยนน้ำขังหย้าหมวดแมวเป็นน้ำขังละลายโปแตสเซียม (36 มิลลิกรัมวาลีนท์ ต่อลิตร) ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตามขนาดที่พบในหย้าหมวดแมว 10% น้ำหนักต่อปริมาตร (W/V)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของหย้าหมวดแมวที่ให้สัตว์ทดลองกินน้ำขังหย้าหมวดแมวเป็นระยะเวลานาน 7 วัน ไขหนูทดลองจำนวน 30 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว ก่อนการทดลองสัตว์ทุกตัวเลี้ยงในกรง Metabolic cage ที่สามารถแยกการวัดปริมาณน้ำกิน ปริมาณปัสสาวะ และอุจจาระจากกันได้ ให้สัตว์ทดลองคุ้นเคยกับสภาพกรงก่อนเริ่มการทดลอง 3 วัน พร้อมกับวัดปริมาณน้ำกิน น้ำปัสสาวะ ต่อวันติดต่อกันทุกวัน หลังจากนั้นทำการทดลองแบ่งเป็น

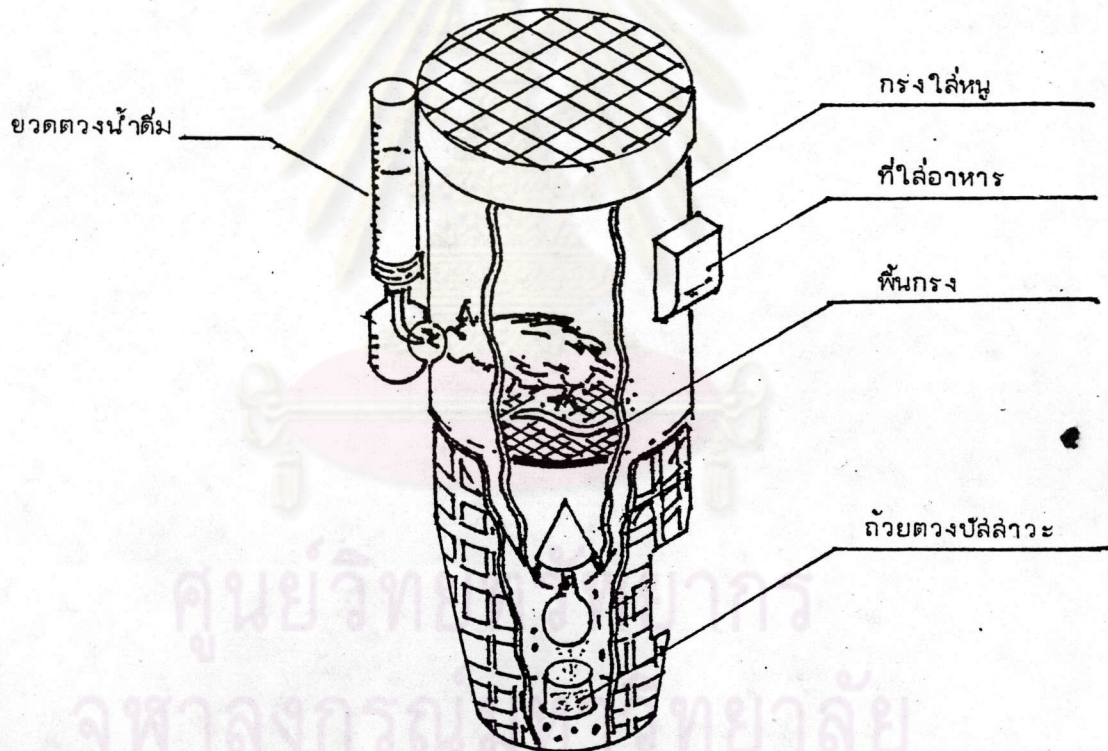
- กลุ่มที่ 1 ไขหนู 10 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม ให้กินน้ำเปล่าตลอดการทดลอง



เป็นเวลา 14 วัน เมื่อครบกำหนด นำมาสังเกตขั้นตอนการเตรียมสัตว์เหมือนการทดลองที่ 1 และศึกษาถึงการทำงานของไต พร้อมกับระบบไหลเวียนเลือด

- กลุ่มที่ 2 ให้หนูกินน้ำเปล่า 7 วัน เพื่อควบคุม วัดจำนวนน้ำกิน และน้ำปัสสาวะ โดยการตวง หลังจากนั้นให้กินน้ำขิงละลายหย้าหนวดแมว เป็นเวลา 7 วัน บันทึกปริมาณไว้เช่นกัน เมื่อครบกำหนดนำไปศึกษาเหมือนกลุ่มที่ 1

- กลุ่มที่ 3 ให้หนูกินน้ำเปล่า 7 วัน เพื่อควบคุม วัด จำนวนน้ำกิน และน้ำปัสสาวะโดยการตวง หลังจากนั้นให้กินน้ำขิงละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ (36 มิลลิกรัมวาเลนทีต่อลิตร) เป็นเวลา 7 วัน บันทึกปริมาณไว้เช่นกัน เมื่อครบกำหนดนำไปศึกษาเหมือนกลุ่มที่ 1



รูปที่ 2 แสดงลักษณะของกรงเลี้ยงหนูที่ใช้ในการทดลอง



วิธีสกัดน้ำขังละลายยาหน้าหมวดแมว 10% น้ำหนักต่อปริมาณ

นำยาหน้าหมวดแมวส่วน ต้น ใบ ดอก ทั้งหมดตากแห้งด้วยวิธีตากแดด เป็นเวลา 7 วัน นำส่วนทั้งหมดตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ยึ่งน้ำหนักโดยใช้ยาหน้าหมวดแมว 10 กรัม ต้มในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ที่ความร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที กรองแต่น้ำ ส่วนที่ต้มได้ออกมา จนกระทั่งได้ปริมาณที่ต้องการ

วิธีทำน้ำยาละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 36 มิลลิกรัมวาลีนัท ต่อลิตร

นำโปแตสเซียมคลอไรด์ชั่ง 2.684 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร จะได้น้ำยาละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ 36 มิลลิกรัมวาลีนัทต่อลิตร

การเตรียมตัวสัตว์ทดลองในการศึกษาหน้าที่ของไตและระบบไหลเวียนเลือด

งดอาหารน้ำดื่ม 12 ชั่วโมงก่อนผ่าตัด ให้ยูเรเทน (Urethane) เป็นยาสลบ ขนาด 140 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม ฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoniun) เมื่อหนูสลบเริ่มทำผ่าตัดผิวหนังบริเวณคอเหนือหลอดคอ (trachea) แยกเนื้อเยื่อออกให้เห็นชัดเจน และใส่ท่อช่วยหายใจเข้าทางหลอดคอเพื่อให้หนูหายใจสะดวกขึ้น ถ้ามีเสมหะช่วยดูดทิ้งให้ผูกท่อเข้ากับหลอดคอให้แน่น ป้องกันมิให้หลุดจากแผลผ่าตัดบริเวณคอนี้สามารถแยกหลอดเลือดแดงคาโรทิด (Common carotid) และหลอดเลือดดำjugular ให้เห็นชัดเจนได้ เมื่อได้หลอดเลือดแล้วสอดท่อพลาสติกเบอร์ 20 (PE.20) เข้าทางหลอดเลือดแดงคาโรทิดต่อเข้ากับเครื่องเพื่อบันทึกความดันโลหิต อัตราการเต้นหัวใจ และเก็บตัวอย่างเลือดประมาณ 0.8 มิลลิลิตร/ครั้ง และให้เลือดทดแทนซึ่งได้จากการนำเม็ดเลือดแดงผสมในน้ำเกลือ ทดแทนเท่าปริมาณเลือดที่เก็บเป็นตัวอย่างในแต่ละครั้ง สอดท่อพลาสติกเบอร์ 20 (PE.20) เข้าทางหลอดเลือดดำjugular เพื่อฉีดสารละลายที่ประกอบด้วย Inulin 3 กรัม % และ Para-aminohippuric acid (PAH) 0.5 กรัม % ในน้ำเกลือ 0.9% เป็นขนาดยาที่ฉีดนำโดยให้ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 300 กรัม หลังจากนั้นให้สารละลายที่ประกอบด้วย Inulin 0.6 กรัม % และ Para-aminohippuric acid (PAH) 0.1 กรัม % ด้วยอัตราลุ่ม่าเล็ม (continuous infusion) คือ 0.06 มิลลิลิตร/นาที เพื่อรักษาความเข้มข้นของระดับ Inulin ในพลาสมา ให้มีค่าประมาณ 20 - 40 มิลลิกรัม % และ PAH ประมาณ 2 - 4 มิลลิกรัม % ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง ภายหลังฉีดสารละลายดังกล่าวจึงเริ่มเก็บตัวอย่าง สอดท่อพลาสติกเบอร์ 200 (PE.200)



ผ่านทางปากสู่กระเพาะอาหารเพื่อให้สารละลายต่าง ๆ เปิดหน้าท้องเหนือบริเวณหัวเหน่าลัด  
ท่อพลาสติกเบอร์ 100 (PE.100) เข้าสู่กระเพาะปลั้ววาระ เย็บรูตแบบ Purse sting ป้องกัน  
การหลุดให้เป็นทางไหลของปลั้ววาระหลังผ่าตัดเรียบร้อยเริ่มการทดลอง ตลอดการทดลองควบคุม  
อุณหภูมิร่างกายให้อยู่ในระดับ 36 - 37 องศาเซลเซียสตลอดการทดลอง

#### การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างเลือด และปลั้ววาระนำไปตรวจหาความเข้มข้นของโซเดียม โปแตสเซียม โดยใช้ Flame  
photometry (Beckman instrument) ตรวจคลอไรด์โดยใช้ Chloridometer (Buchler  
digital chloridometry) ตรวจหาออสโมลาลิตี (Osmolality) โดยวิธี Freezing point  
depression หาค่า Inulin โดยวิธี Antrone method (Hilger และคณะ 1958) และ  
PAH โดยวิธีของ Smith (1962) ตรวจหาระดับ pH โดยเครื่อง pH.meter นอกจากนี้ ตัวอย่าง  
เลือดยังนำมาหาปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่น โดยใช้ Microcapillary centrifuge

#### อักษรย่อที่ใช้ในการศึกษา

อักษรย่อเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับการคำนวณและอยู่ในตารางภาพ

C. group	=	กลุ่มควบคุมที่กินน้ำเปล่า
Y. group	=	กลุ่มการทดลองที่กินน้ำขังละลายหญ้าหนวดแมว
K. group	=	กลุ่มการทดลองที่กินน้ำขังละลายโปแตสเซียมคลอไรด์
MABP.	=	ค่าความดันโลหิตแดงเฉลี่ย (มิลลิเมตร -ปรอท)
V <sub>i</sub>	=	อัตราการขับปลั้ววาระ (มิลลิลิตร ต่อนาที)
P <sub>PAH</sub>	=	ระดับความเข้มข้นของสาร พี เอ เอช (PAH) ในพลาสมา (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)
U <sub>PAH</sub>	=	ระดับความเข้มข้นของสารพี เอ เอช (PAH) ในปลั้ววาระ (ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร)
P <sub>In</sub>	=	ระดับความเข้มข้นของอินนูลิน (Inulin) ในพลาสมา (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)



$P_{Osm}$	= ความเข้มข้นของออสโมลาลิตี (Osmolality) ในปัสสาวะ (มิลลิออสโม ต่อ กิโลกรัม น้ำ)
$U_{Osm}$	= ความเข้มข้นของออสโมลาลิตี (Osmolality) ในปัสสาวะ (มิลลิออสโม ต่อ กิโลกรัม น้ำ)
$P_{Na}$	= ความเข้มข้นของโซเดียมในพลาสมา (มิลลิออสโม ต่อ ลิตร)
$U_{Na}$	= ความเข้มข้นของโซเดียมในปัสสาวะ (มิลลิออสโม ต่อ ลิตร)
$P_K$	= ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในพลาสมา (มิลลิออสโม ต่อ ลิตร)
$U_K$	= ความเข้มข้นของโพแทสเซียมในปัสสาวะ (มิลลิออสโม ต่อ ลิตร)
$P_{Cl}$	= ความเข้มข้นของคลอไรด์ในพลาสมา (มิลลิออสโม ต่อ ลิตร)
Hct	= ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงอัดแน่น (%)
RVR	= ความต้านทานของหลอดเลือดไต $\text{mm Hg}\cdot\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$

#### ความหมายของค่า

- PAH. Clearance ใช้แทนอัตราการไหลของพลาสมาผ่านไต (Effective renal plasma flow) หน่วยเป็นมิลลิลิตร ต่อ นาที
- Inulin Clearance ใช้แทนค่าอัตราการกรองผ่านไต (Glomerular filtration rate) หน่วยเป็นมิลลิลิตร ต่อ นาที
- Renal blood flow เป็นปริมาณเลือดที่ไหลผ่านไต หน่วยเป็นมิลลิลิตร ต่อ นาที
- Free water clearance เป็นปริมาณน้ำอิสระในปัสสาวะ หน่วยเป็นไมโครลิตร ต่อ นาที
- Urinary excretion of electrolyte เป็นปริมาณสารอิเล็กโทรไลต์ที่ถูกขับออกจากปัสสาวะ หน่วยเป็นไมโครออสโมลต่อลิตร ต่อ นาที
- Fractional excretion of electrolyte คือ สัดส่วนของสารที่ขับทิ้งต่ออัตราการกรอง หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

Filtration fraction คือ สัดส่วนการกรองของไต ต่อปริมาณพลาสมาที่ผ่านเข้าไต หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

สูตรการคำนวณ

$$\begin{aligned} \text{Plasma clearance ของสาร } n &= \frac{U_n \cdot V}{P_n} \\ \text{Renal blood flow (RBF)} &= \frac{\text{Renal plasma flow} \times 100}{100 - \text{Hct}} \\ \text{Urinary excretion of Electrolyte} &= U_E \cdot V \\ \text{Free water clearance (C}_{H_2O}\text{)} &= V - \text{Osmolar clearance} \\ \text{Fractional excretion of Electrolyte (FE)} &= \frac{U_E \cdot V}{\text{GFR} \cdot P_E} \times 100 \% \\ \text{Filtered load of Electrolyte (FL)} &= \text{GFR} \cdot P_E \\ \text{Filtration Fraction (FF)} &= \frac{\text{GFR} \times 100\%}{\text{Renal Plasma Flow}} \\ \text{Renal Vascular Resistance (RVR)} &= \frac{\text{MABP}}{\text{RBF}} \end{aligned}$$

สถิติวิเคราะห์

การทดลองที่หนึ่ง การศึกษาผลของหญ้าหนวดแมวและน้ำละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ที่หนูแรทได้รับแบบเฉียบพลันเพียงครั้งเดียว ใช้ Paired t-test เปรียบเทียบกับค่าควบคุม ที่ได้จากหนูตัวเดียวกัน

การทดลองที่สอง การศึกษาผลของหญ้าหนวดแมว และน้ำละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ที่หนูได้รับเป็นระยะเวลานาน 7 วัน ซึ่งแบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย โดยใช้สถิติ ดังนี้

Unpaired t-test เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มย่อยทั้ง 3 กลุ่ม

Paired t-test เปรียบเทียบภายในกลุ่มเดียวกันกับค่าควบคุม

กำหนดให้ระดับความเชื่อมั่นมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$