

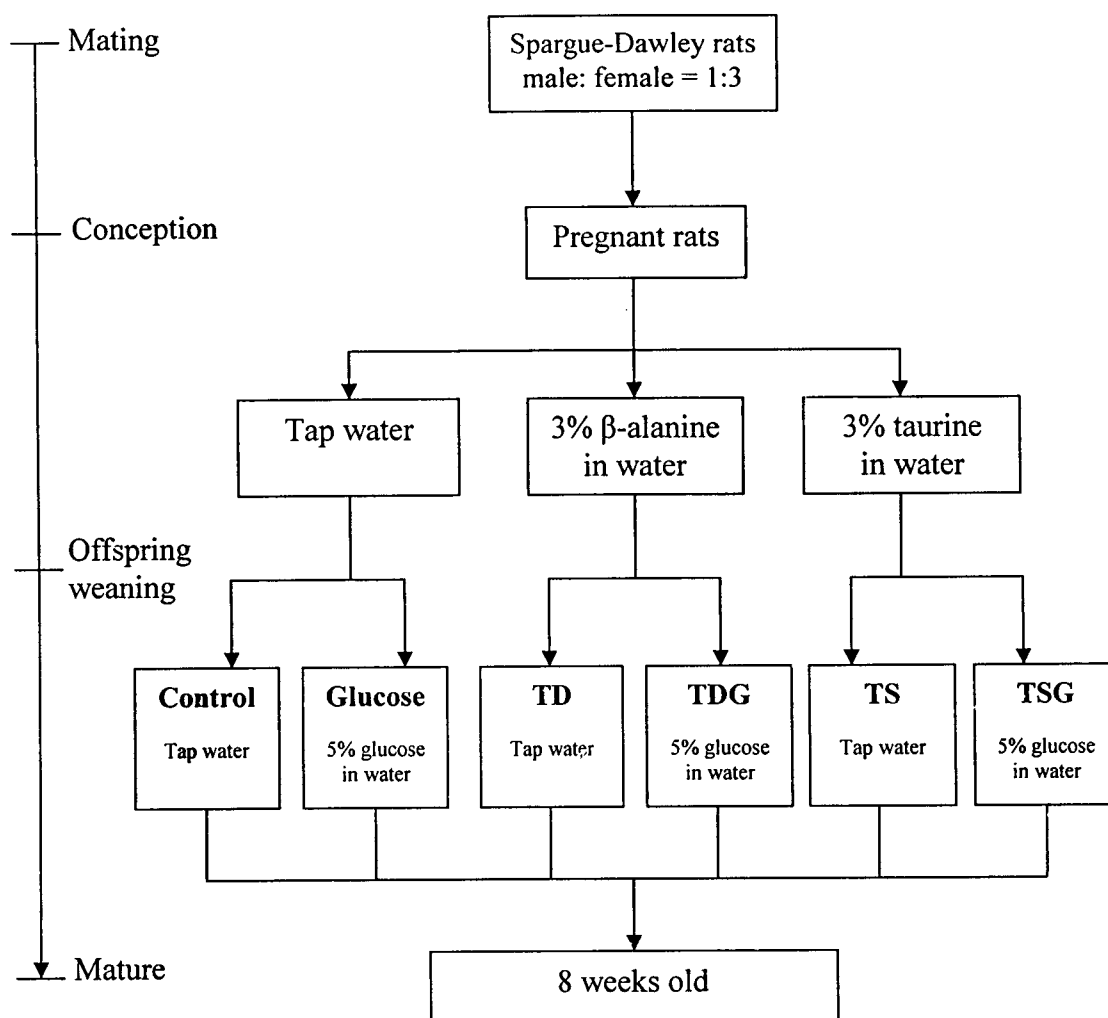
บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและแผนการทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูขาวพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้และเพศเมีย สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ควบคุมแสงสว่างระหว่างวันตั้งแต่ 06.00 – 18.00 น. ให้อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง (บริษัทซีพีอาหารสัตว์) และน้ำดื่ม (น้ำประปา) อย่างเพียงพอตลอดการทดลอง กลุ่มได้รับทอรีนเสริมถูกเลี้ยงด้วยทอรีนผสมในน้ำประปา (3% taurine) ส่วนกลุ่มที่ขาดทอรีนกระทำโดยการให้บีตาอะลานีนผสมในน้ำประปา (3% β -alanine) กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตสูง กระทำโดยผสมกลูโคสในน้ำดื่ม (5% glucose หรือ กลูโคส 50 กรัม ต่อ 1 ลิตร) การทดลองครั้งนี้ แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มดังนี้

1. กลุ่มควบคุม (Control) หนูเพศผู้ได้รับอาหารและน้ำประปาตามปกติตลอดการทดลอง
2. กลุ่มได้รับคาร์โบไฮเดรตมาก (Glucose) หนูเพศผู้ได้รับอาหารปกติและได้รับน้ำประปาผสมกลูโคสตั้งแต่ห่านจนสิ้นสุดการทดลอง (ยกเว้น 1 คืนก่อนทำ glucose tolerance test (GTT) จดกลูโคสในน้ำดื่ม)
3. กลุ่มขาดทอรีนในช่วงแรกของชีวิต (taurine depletion; TD) แม่หนูเพศเมียได้รับบีตาอะลานีน (3% β -alanine) ผสมในน้ำประปาตั้งแต่เริ่มตั้งครรภ์ เมื่อห่านมลูกหนูเพศผู้ได้รับน้ำประปาต่อไปตลอดการทดลอง
4. กลุ่มขาดทอรีนในช่วงแรกของชีวิต และได้รับคาร์โบไฮเดรตมาก (taurine depletion with high glucose; TDG) แม่หนูเพศเมียได้รับบีตาอะลานีน (3 % β -alanine) ผสมในน้ำประปาตั้งแต่เริ่มตั้งครรภ์ เมื่อห่านมลูกหนูเพศผู้ได้รับน้ำประปาผสมกลูโคสตั้งแต่ห่านจนสิ้นสุดการทดลอง (ยกเว้น 1 คืนก่อนทำ glucose tolerance test (GTT) จดกลูโคสในน้ำดื่ม)
5. กลุ่มได้รับทอรีนเสริมในช่วงแรกของชีวิต (taurine supplementation; TS) แม่หนูเพศเมียได้รับทอรีน (3 % taurine) ผสมในน้ำ ประปาตั้งแต่เริ่มตั้งครรภ์ เมื่อห่านมลูกหนูเพศผู้ได้รับน้ำประปาต่อไปตลอดการทดลอง
6. กลุ่มได้รับทอรีนเสริมในช่วงแรกของชีวิต และ ได้รับคาร์โบไฮเดรตมาก (taurine supplementation with high glucose; TSG) แม่หนูเพศเมียได้รับทอรีน (3 % taurine) ผสมในน้ำประปาตั้งแต่เริ่มตั้งครรภ์ เมื่อห่านมลูกหนูเพศผู้ได้รับน้ำประปาผสมกลูโคสตั้งแต่ห่านจนสิ้นสุดการทดลอง (ยกเว้น 1 คืนก่อนทำ glucose tolerance test (GTT) จดกลูโคสในน้ำดื่ม)



รูปที่ 3-1 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการเหนี่ยวนำด้วยบีตาอะลานีน และทอรีนตั้งแต่เริ่มตั้งครรภ์จนกระทั่งลูกหนูหย่านม และให้กลูโคสตั้งแต่หลังหย่านมจนกระทั่งอายุครบ 8 สัปดาห์

เมื่อหนูเพศผู้ในแต่ละกลุ่มอายุ 7-8 สัปดาห์ วางยาสลบด้วย thiopental ทำการผ่าตัดใส่หลอดสวนหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำฟิเอมอรัล (femoral artery and femoral vein) หลังผ่าตัดให้หนูพักฟื้นเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง ให้น้ำและอาหารตามปกติโดยแยกเลี้ยงเดี่ยว ทำการตรวจสอบหลอดสวนหลอดเลือดโดยใช้น้ำเกลือผสมเฮพาริน (20 unit / ml) ทำการตรวจสอบหลอดสวนหลอดเลือดทุกวัน

หลังจากที่หนูพักฟื้นอย่างน้อย 24 ชั่วโมงจึงทำการงดอาหารเป็นเวลา 1 คืน (ประมาณ 8-10 ชั่วโมง) และทำการเปิดหลอดสวนหลอดเลือดแดงและดำด้วยน้ำเกลือผสมเฮพาริน (20 unit/ml) ในเวลา 06.00 – 08.00 น. ของวันรุ่งขึ้น เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำไปวัดระดับกลูโคสในเลือดในภาวะอดอาหาร (fasting blood glucose, FBG) ไชเคียมโพแทสเซียม BUN และครีเอตินีน ในพลาสมา โดยหนูทดลองจะได้รับเลือดทดแทนจากหนูกลุ่มเดียวกัน ในปริมาตรเท่ากับตัวอย่างเลือดที่เสียไป และทดสอบความทนต่อกลูโคส (glucose tolerance test, GTT) โดยฉีดสารละลายกลูโคสขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กลูโคส 0.66 กรัมใน 0.9% NaCl 1 มิลลิลิตร)

เข้าทางหลอดเลือดดำจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดแดง เพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่ 30, 60 และ 120 นาที หลังฉีดกลูโคส

เมื่อเสร็จการทดสอบความทนต่อกลูโคสหนูจะได้รับน้ำและอาหารตามที่กำหนดในแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะที่มีสติ โดยนำหนูใส่กรงที่มีวัฏจักรนอนเหมือนกับที่เลี้ยงตามปกติ หลอดสวนหลอดเลือดแดงและดำจะถูกเปิดโดยการฉีด heparinize saline (20 unit/ml heparin in normal saline) และต่อหลอดสวนหลอดเลือดแดงกับ pressure transducer เพื่อวัด arterial pulse และต่อหลอดเลือดดำกับ infusion pump เพื่อฉีดสารละลาย หลังจากหนูพักประมาณ 15-20 นาทีจึงเก็บเลือดจากหลอดเลือดแดงพีเมอรัลเพื่อนำไปวัดระดับกลูโคสในเลือด โซเดียม โพแทสเซียม BUN และครีเอตินีน ในพลาสมา ในภาวะไม่อดอาหาร (non-fasting blood glucose, FBG) โดยหนูทดลองจะได้รับเลือดทดแทนจากหนูในกลุ่มเดียวกันในปริมาณเท่ากับที่เสียไป 30 นาทีต่อมาฉีด สารละลายฟีนิลเอพรีน (Phenylephrine, PE) เข้าทางหลอดเลือดดำแล้วรอให้ความดันเลือดคงที่อย่างน้อย 20 นาที จึงฉีดโซเดียมไนโตรปริสไซด์ (Sodium Nitroprusside, SN) เข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อทดสอบความไวของ รีเฟล็กบาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจและระบบประสาทอัตโนมัติเมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น หรือลดลงในภาวะที่มีสติ ซึ่งในระหว่างการทดลองจะงดน้ำและอาหารชั่วคราว

จากนั้นให้น้ำและอาหารตามที่กำหนดในแต่ละกลุ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะที่วางยาสลบ หนูถูกทำให้สลบด้วย thiopental แล้วจึงยึดหนูทดลองติดกับพื้นพลาสติกในท่านอนหงาย และเปิดหลอดสวนหลอดเลือดแดงและดำพีเมอรัลเพื่อ วัด arterial pulse และฉีดสารละลายตามลำดับ จากนั้นเปิดหน้าท้องและแยกโครงสร้างภายในช่องท้องด้วย retractor เพื่อเปิดให้เห็นไตข้างขวา แล้วสอด stainless steel electrode (12MΩ, 0.01 Taper A-M system, FL, USA) ซึ่งควบคุมโดย micromanipulator อย่างช้า ๆ ภายใต้กล้องผ่าตัดกำลังขยาย 40X เข้าบริเวณเส้นประสาท ที่อยู่รอบ ๆ หลอดเลือดแดงส่วนไตในแนวเกือบขนานกับหลอดเลือด หลังการเตรียมสัตว์ทดลองและอุปกรณ์ จะให้หนูพักจนสัญญาณประสาทและความดันเลือดมีอัตราคงที่อย่างน้อย 30 นาที จึงทดสอบการตอบสนองของการเต้นของหัวใจและ renal nerve activity ต่อการเพิ่มหรือลดความดันเลือด ด้วยการฉีดสารละลายในทำนอง เดียวกับการศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะที่มีสติ

อัตราสัญญาณประสาทไตในขณะพักจะถูกเก็บโดยคอมพิวเตอร์ทุกสองนาที่เป็นเวลา 30 นาที การ เปลี่ยนแปรของอัตราสัญญาณประสาทไตเมื่อความดันเลือดแดงเพิ่มหรือลดกระทำโดยกำหนด nerve unit ที่ ชัดเจน (1-5 unit) ในขณะพัก แล้วดูอัตราสัญญาณประสาทไตของ unit เดิม เมื่อความดันเลือดเปลี่ยนแปลงไป โดยเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าขณะพัก และดำเนินการวิเคราะห์ตัวแปรต่าง ๆ คือ ความดันเลือดแดงเฉลี่ย, อัตรา การเต้นของหัวใจ, arterial pressure variability (APV), baroreflex sensitivity (BS), ระดับโซเดียม, โพแทสเซียม, BUN และครีเอตินีน ในพลาสมา เมื่อสิ้นสุดการทดลองทั้งหมด หนูทุกกลุ่มถูกฆ่าโดยการให้ยาสลบขนาดสูง แล้วจึงทำการเปิดหน้าท้อง และทรวงอกตัดหัวใจเพื่อชั่งน้ำหนัก (wet weight)

วิธีการทดลอง

1. การผ่าตัดใส่หลอดเลือดสวนหลอดเลือด

ทำการวางยาสลบหนูโดยการฉีด thiopental (50 mg/kg) เข้าทางหน้าท้อง เมื่อหนูสลบจึงโกนขนบริเวณต้นขาด้านหน้าทั้งสองข้าง หน้าท้อง และด้านหลังคอ การผ่าตัดหลอดเลือดสวนหลอดเลือดฟีมอรัล (femoral vein and artery) เริ่มจากใช้กรรไกรตัดหนังบริเวณต้นขาด้านในข้างขวาประมาณ 1 เซนติเมตร แยกหนัง และกล้ามเนื้อจนเห็นหลอดเลือด ทำการแยกเส้นประสาทออกจากหลอดเลือด แล้วจึงแยกหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำฟีมอรัลออกจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วย arterial forceps สอดหลอดเลือด (PE50 เชื่อมกับ PE10) ซึ่งบรรจุด้วยน้ำเกลือ (0.9% NaCl) ผสมเฮพาริน (20 unit/ml) เข้าหลอดเลือดดำและหลอดเลือดแดงฟีมอรัลตามลำดับ โดยสอดปลายหลอดเลือด (PE10) เข้าไปใน inferior vena cava ประมาณ 2-3 เซนติเมตร และเข้า abdominal aorta ประมาณ 3-4 เซนติเมตร เพื่อใช้ในการฉีดสาร และวัด aortic pressure ตามลำดับ ใช้กรรไกรตัดหนังที่บริเวณต้นคอด้านหลัง จากนั้นสอดปลายหลอดเลือดสวนหลอดเลือดอีกด้าน (PE50) ผ่านชั้นใต้ผิวหนังไปโผล่ที่ต้นคอด้านหลัง ให้ปลายที่โผล่ยาวประมาณ 3 เซนติเมตรจากผิวหนัง แล้วยึดติดหลอดเลือดนี้ด้วย dental acrylic ทดสอบการอุดตันของหลอดเลือดด้วยน้ำเกลือผสมเฮพาริน อุดหลอดเลือดด้วยโลหะที่ไม่เป็นสนิม แล้วเย็บปิดแผลหน้าขาด้วยลวดเย็บอัตโนมัติ (autoclip applier, Becton Dickinson, NY, USA)

2. การศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะมีสติ

ประมาณ 36-48 ชั่วโมงหลังการผ่าตัด หนูจะถูกนำไปใส่กรงโลหะและมี rat bed เหมือนกรงที่เลี้ยงตามปกติแต่งคอกอาหารและน้ำดื่ม femoral arterial and venous cannulation จะถูกเปิดโดยการฉีด heparinize saline (20 unit/ml heparin in normal saline) 0.2-0.3 มิลลิลิตร จากนั้นต่อหลอดเลือดแดงเข้ากับ pressure transducer ซึ่งเชื่อมต่อกับ DA100, UM100, MP100 และคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Window ME) ตามลำดับ (Biopac system, CA, USA) สำหรับวัด arterial pressure และ heart rate อย่างต่อเนื่องด้วย Acknowledge software version 3.5.5 (sampling rate = 2000/sec) ส่วนหลอดเลือดดำฟีมอรัลต่อกับ infusion pump (model No.975, Harvard apparatus, USA) เพื่อฉีดสารละลาย หลังเตรียมสัตว์ทดลองเสร็จ ให้หนูพัก 15-20 นาที หรือจนความดันเลือดคงที่ประมาณ 15 นาที จึงดูดเลือดจากหลอดเลือดแดงฟีมอรัล 1.0 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัด ระดับโซเดียม โพแทสเซียม BUN ครีเอตินีน hematocrit และ blood sugar ปริมาตรเลือดที่เสียไปนี้จะถูกทดแทนด้วยปริมาตรเลือด 1.0 มิลลิลิตร จากหนูที่เป็นกลุ่มเดียวกัน โดยให้ทางหลอดเลือดแดงทันทีหลังเก็บตัวอย่างเลือด หลังจากนั้นให้หนู พัก 30 นาทีหรือจนความดันเลือดคงที่อย่างน้อย 20 นาที เพื่อคำนวณค่าขณะพักของความดันเลือด อัตราการเต้นของหัวใจ และการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ จากนั้นจึงฉีด phenylephrine ซึ่งเป็น specific alpha-adrenergic agonist (100 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิลิตรต่ออนาที เป็นเวลา 2 นาที หรือจนความดันเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 20-30 มิลลิเมตรปรอท เพื่อทดสอบความไวของ รีเฟล็กบาโรรีเซพเตอร์ ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ และระบบประสาทอัตโนมัติเมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นให้หนูพัก 30 นาที หรือจนกระทั่งความดันเลือดแดงมีค่าคงที่อย่างน้อย 20 นาที จึงฉีด sodium nitroprusside (25 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิลิตรต่ออนาทีเป็นเวลา 2 นาที หรือจนกระทั่งความดันเลือดแดงเฉลี่ยลดลง 20-30 มิลลิเมตรปรอท เพื่อทดสอบความไวของ รีเฟล็กบาโรรีเซพเตอร์ ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ และระบบประสาทอัตโนมัติเมื่อความดันเลือดลดลง

เสร็จแล้วให้หนูพักจนความดันเลือดแดงคงที่ประมาณ 5-10 นาที จึงถอดสายที่ต่อกับหลอดสวนหลอดเลือดออก
 ดันเลือดที่ค้างในหลอดสวนเข้าร่างกายหนูจนหมดด้วย heparinized saline อุดปลายหลอดสวนด้วยโลหะที่ไม่เป็น
 สนิม นำสัตว์ทดลองใส่กรงเดี่ยว ให้อาหารและน้ำตามที่กำหนดในแต่ละกลุ่มต่อไป

ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย อัตราการเต้นของหัวใจ การเปลี่ยนแปลงอัตราการเต้นของหัวใจ การเปลี่ยนแปลง
 แปรความดันเลือดแดง การทำงานของประสาทซิมพาเทติกและพาราซิมพาเทติก และความไวของรีเฟล็กซ์
 บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุมหัวใจ และระบบประสาทอัตโนมัติ จะถูกคำนวณหลังการทดสอบโดยใช้ Acknowledge
 software version 3.5.5

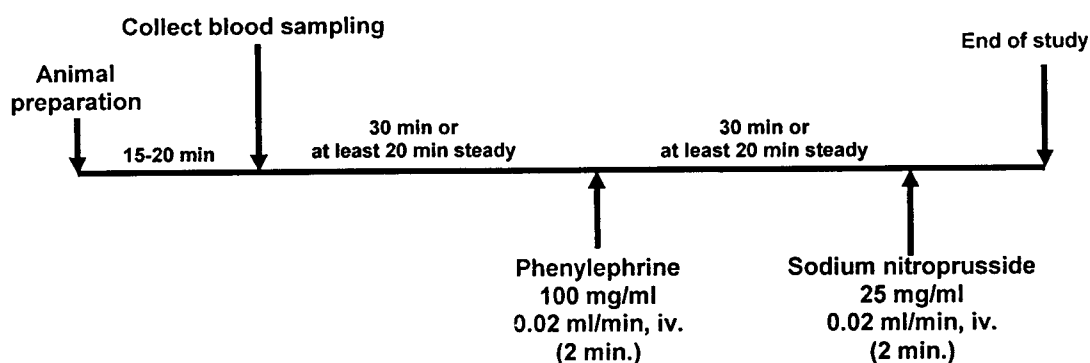
3. การศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะที่

วางยาสลบ

ประมาณ 72 ชั่วโมงหลังการผ่าตัดหรือ 24 ชั่วโมงหลังการทดลองก่อนหน้านี้ หนูที่เลี้ยงในกรงเดี่ยว
 จะถูกสลบด้วย thiopental (50 mg/kg) ในท่านอนหงายและยึดติดกับเตียงผ่าตัดพลาสติก หลอดเลือดแดงและค่า
 ฟิเมอรัลจะถูกเปิดเพื่อวัด arterial pressure, heart rate และนิตสารละลาย ตามลำดับ คล้ายกับการศึกษาการทำงานของ
 ของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือดในภาวะที่มีสติ อุณหภูมิกายจะถูกวัดและถูกควบคุมด้วย
 rectal probe ที่ต่อกับเครื่องวัดอุณหภูมิ (YSI Tele-thermometer model No.43 TD, Chicago, USA) ซึ่งควบคุม
 ความร้อนโดยใช้คอมไฟส่องสว่าง อุณหภูมิจะถูกควบคุมให้อยู่ในช่วง $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ จากนั้นเปิดหน้าท้องโดยใช้
 กรรไกรตัดบริเวณกลางหน้าท้องในแนวกลาง ลำไส้ที่คลุมไว้จะถูกเปิดและแยกกันออกโดยใช้ retractor ลำไส้
 และโครงสร้างภายในช่องท้องจะถูกทำให้ชื้นตลอดเวลา โดยคลุมด้วยผ้าก๊อสน้ำเกลือ (0.9% NaCl)
 connective tissue ที่ปกคลุมบริเวณ renal pelvis จะถูกแยกออกอย่างหยาบ ๆ เพื่อเปิดให้เห็น renal artery และ
 ป้องกันการฉีกขาดของ renal nerve

stainless steel electrode (12M Ω , 0.01 Taper, A-M system, FL, USA) ซึ่งควบคุมโดย
 micromanipulator ถูกสอดอย่างช้า ๆ ภายใต้อกล้องผ่าตัดกำลังขยาย 40X เข้าบริเวณเส้นประสาทที่อยู่รอบ ๆ
 หลอดเลือดแดงส่วนไต ในแนวเกือบขนานกับหลอดเลือด อีเล็กโทรดต่อเชื่อมกับ DAM800 (WPI, USA) ซึ่งทำ
 หน้าที่ย้าย (1000X) และควบคุม band pass (500-1000 Hz) สัญญาณจาก DAM800 ถูกส่งเข้า UM100, MP100
 และคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Window XP) ตามลำดับ (Biopac system, CA, USA) ข้อมูลจะถูกเก็บเป็น file
 ย่อย ๆ (sampling rate = 6,000 sample/sec) และถูกบันทึกทุกสองนาที่โดยอัตโนมัติอย่างต่อเนื่อง หลังการเตรียม
 สัตว์ทดลองและอุปกรณ์ จะให้หนูพักจนสัญญาณประสาทและความดันเลือดมีอัตราคงที่อย่างน้อย 20 นาที จึง
 ทดสอบการตอบสนองของการเต้นของหัวใจและ renal nerve activity ต่อการเพิ่มหรือลดความดันเลือด ด้วยการ
 นิตสารละลายในท่านอนเดียวกับการศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติในการควบคุมความดันเลือด
 ในภาวะที่มีสติ โดยตำแหน่งที่วัดสัญญาณประสาทจะเลือกเฉพาะที่ตอบสนองต่อการเพิ่มหรือลดความดันเลือด
 แดงเท่านั้น (pressure-dependent renal nerve activity)

เมื่อเสร็จการทดลองแล้วหนูจะถูกฆ่าโดยใช้ไอเทอร์ คัดไตและหัวใจซึ่งนำหนักทันที การเปลี่ยนแปลง
 ของอัตราสัญญาณประสาทไตเมื่อความดันเลือดแดงเพิ่มหรือลดกระทำโดยกำหนด nerve unit ที่ชัดเจน (1-5 unit)
 ในขณะพัก แล้วดูอัตราสัญญาณประสาทไตของ unit เดิม เมื่อความดันเลือดเปลี่ยนแปลงไปโดยเทียบเป็น
 เปอร์เซ็นต์ของค่าขณะพัก



รูปที่ 3-2 แสดงช่วงเวลาของการศึกษาการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติที่ควบคุมความดันเลือด ทั้งในภาวะมีสติและวางยาสลบ

4. การบันทึกและวิเคราะห์ความดันเลือดแดง

ทำการบันทึกความดันเลือดด้วย pressure transducer ซึ่งต่อกับ DA100, UM 100 และ MP100 ของ Biopac system (Biopac system, CA, USA) และบันทึกด้วยคอมพิวเตอร์ (PC, Window XP) ความดันเลือดเฉลี่ยและอัตราการเต้นของหัวใจถูกวิเคราะห์หลังการวัดด้วย Biopac software (AcqKnowledge® III for the MP100WSW, Version 3.5.5)

5. การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความดันเลือดแดง (arterial pressure variability, APV)

APV ถูกวิเคราะห์หลังการวัด (off-line analysis) ด้วย Biopac software (Acqknowledge®III Version 3.2.1 for the MP 100WSW) ดังนี้

5.1 เลือกความดันเลือดแดงขณะพัก (baseline) ในช่วง 10 นาที

5.2 วิเคราะห์ Fast Fourier Transform (FFT) โดยเลือก

- Window: Hanning
- Pad with zeros
- Remove mean
- Remove trend
- Magnitude: linear

5.3 อินทิกรัลคลื่นความถี่ 2 ช่วงแยกกัน

- low frequency (LF) 0.3-0.5 Hz บ่งชี้ sympathetic outflow (20;29;158)
- high frequency (HF) 0.5-4.0 Hz บ่งชี้ parasympathetic outflow (29)

5.4 คำนวณค่า absolute power spectrum density โดยการยกกำลังสองของแต่ละช่วงความถี่ (LF-APV²; HF-APV²) ประเมินค่าแต่ละช่วงความถี่เป็นร้อยละของทั้งสองช่วง และหาอัตราส่วนของ LF-APV ต่อ HF-APV เพื่อประเมิน autonomic interaction

6. การวิเคราะห์ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ (baroreflex sensitivity control of heart rate, BSR)

6.1 ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น (BSR-PE)

บันทึกความดันเลือดขณะพัก จนความดันเลือดคงที่อย่างน้อย 20 นาที ฉีด phenylephrine ซึ่งเป็น specific alpha-adrenergic agonist (100 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิกรัมต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกว่าความดันเลือดแดงสูงขึ้นประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท แล้ววิเคราะห์ความดันเลือดแดงเฉลี่ยและอัตราการเต้นของหัวใจ ก่อนและหลังฉีดสาร อัตราการเต้นของหัวใจที่เปลี่ยนไปหารด้วยความดันเลือดแดงที่เปลี่ยนไปคือ BSR-PE

6.2 ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ เมื่อความดันเลือดลดลง (BSR-SN)

เมื่อสิ้นสุดการวัด BSR-PE รอจนกระทั่งความดันเลือดคืนสู่ค่าปกติและคงที่อย่างน้อย 20 นาที จึงฉีด sodium nitroprusside (25 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิกรัมต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หรือจนความดันเลือดแดงลดลงไปประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท แล้ววิเคราะห์ความดันเลือด และอัตราการเต้นของหัวใจก่อนและหลังฉีดสาร และคำนวณ BSR-SN เช่นเดียวกับ BSR-PE

7. การวิเคราะห์ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุม renal sympathetic nerve activity (baroreflex sensitivity control of renal sympathetic nerve activity, BSN)

7.1 ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุม renal sympathetic nerve activity เมื่อความดันเลือดเพิ่มขึ้น (BSN-PE)

บันทึกสัญญาณประสาทขณะพัก จนสัญญาณประสาทคงที่อย่างน้อย 20 นาที ฉีด phenylephrine ซึ่งเป็น specific alpha-adrenergic agonist (100 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิกรัมต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที หรือจนกว่าความดันเลือดแดงสูงขึ้นประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท แล้ววิเคราะห์อัตราสัญญาณประสาทและอัตราการเต้นของหัวใจ ก่อนและหลังฉีดสาร การเปลี่ยนแปลงของอัตราสัญญาณประสาทได้เมื่อความดันเลือดแดงเพิ่มหรือลดกระทำโดยกำหนด nerve unit ที่ชัดเจน 1-5 unit แล้วคูณอัตราสัญญาณประสาทได้ของ unit เดิมเมื่อความดันเลือดเปลี่ยนไปโดยเทียบกับค่าขณะพัก

7.2 ความไวของรีเฟล็กซ์บาโรรีเซพเตอร์ที่ควบคุม renal sympathetic nerve activity เมื่อความดันเลือดลดลง (BSN-SN)

เมื่อสิ้นสุดการวัด BSN-PE รอจนกระทั่งความดันเลือดคืนสู่ค่าปกติและสัญญาณประสาทคงที่อย่างน้อย 20 นาที จึงฉีด sodium nitroprusside (25 mg/ml in saline) ทางหลอดเลือดดำในอัตรา 0.02 มิลลิกรัมต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที หรือจนความดันเลือดแดงลดลงไปประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท แล้ววิเคราะห์อัตราสัญญาณประสาทและอัตราการเต้นของหัวใจก่อนและหลังฉีดสาร และคำนวณ BSN-SN เช่นเดียวกับ BSN-PE

8. การวัดฮีมาโทคริต

ฮีมาโทคริตถูกวัดโดยวิธี micro method ทันทีเมื่อเก็บเลือดโดยใส่เลือดเข้า capillary tube อุดปลายหลอดด้านหนึ่งด้วยดินน้ำมัน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วประมาณ 11,000 รอบ/นาที ด้วยเครื่อง Haemofuge A

(Heraeus Christ, Germany) เป็นเวลา 5 นาที แล้วอ่านค่าปริมาตรเม็ดเลือดแดงอัดแน่นเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรเลือดทั้งหมด

9. การวิเคราะห์ BUN และ Creatinine

เก็บเลือดจากสายสวนหลอดเลือดแดงฟิโมรัลปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (International Equipment Company, MA, USA) และแยกพลาสมาจำนวน 100 μ l. ด้วยปิเปตต์อัตโนมัติ (Digital micro pipette; model 5000 DG, Nichiryo, Tokyo, Japan) แล้วจึงส่งตรวจที่ห้องปฏิบัติการเคมีโรงพยาบาลศรีนครินทร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งใช้การตรวจด้วยเครื่อง Cobas Integra (Cobas integra 700, USA) โดยการวัดระดับ creatinine ใช้วิธี enzymatic, colorimetric method (PAP) ด้วยปฏิกิริยา catalyses ของ enzyme โดยใช้ enzyme creatinine iminohydrolase (CRIMI), N-methylhydantoinase (NMHase) และ N-carbamoylsarcosine amidohydrolase (CSHase) ปฏิกิริยาออกซิเดชันของ sarcosine โดย sarcosine oxidase (SOD) ทำให้เกิด hydrogenperoxide ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ oxidative coupling of 4-aminoantipyrine (4-AAP) กับ N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine (TOPS) ทำให้เกิดสีแดงของ quinoneimine dye ความเข้มของสีจึงเป็นตัวบ่งชี้ความเข้มข้นของ creatinine โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 552 นาโนเมตร

ส่วนการวัดระดับ BUN ใช้วิธี kinetic test with urease and glutamate dehydrogenase โดยมีหลักการว่า urea จะถูก hydrolyze ด้วย urease กลายเป็น ammonium และ carbonate จากนั้นเหนี่ยวนำให้ ammonium เกิดปฏิกิริยากับ 2-oxoglutarate ด้วย glutamate dehydrogenase (GLDH) และ coenzyme NADH เพื่อให้เกิด L-glutamate ดังนั้นอัตราการลดลงของ NADH เป็นตัวบ่งชี้ความเข้มข้นของ urea หรือ BUN ในพลาสมา โดยอ่านค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 340 นาโนเมตร

10. การวิเคราะห์ Na^+ และ K^+

ทำการวัด Na^+ และ K^+ ในพลาสมาด้วย flame photometer (Hitachi, Tokyo, Japan) เริ่มจากเตรียม dilute lithium solution โดยใช้ lithium stock standard for dilution 20 มิลลิกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 5 มิลลิลิตร เจือจางในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 1 ลิตร (อัตราส่วน 1:200) จากนั้นนำตัวอย่างพลาสมา 10 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปราศจากไอออน 15 ไมโครลิตร (อัตราส่วน 1:2.5) ใส่หลอดทดลองแล้วเติม dilute lithium solution 5 มิลลิลิตร ลงไปผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่า Na^+ และ K^+ ในพลาสมาด้วยเครื่อง flame photometer

11. การทดสอบความทนต่อกลูโคส

ภาวะต้านทานอินซูลินอนุมานจากผลการทดสอบความทนต่อกลูโคส โดยให้หนูกอดอาหาร 1 คืน จากนั้นเริ่มทำการทดสอบความทนต่อกลูโคสในเวลา 06.00-08.00 น. โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดแดงหลอดเลือด และวัดกลูโคสในเลือดด้วย glucometer และ glucostrip (Accu-Chek Advantage II, Roche, U.S.A.) ค่านี้คือ fasting blood glucose (FBG) แล้วฉีดกลูโคสขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (กลูโคส 0.66 กรัม ใน 0.9% NaCl 1 มิลลิลิตร) เข้าทางหลอดเลือดดำ หลังจากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดที่ 30, 60 และ 120 นาที หลังฉีดกลูโคส เพื่อวัดระดับกลูโคสในเลือด

วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. Biopac system for PC, DA100, MP100, pressure transducer และ โปรแกรม Acknowledge®III for the MP100 WSW (version 3.5.5) (BIOPAC System, CA, USA) ใช้ร่วมกับคอมพิวเตอร์ส่วนบุคคล (Window XP)
2. DAM800 (WPI, USA)
3. อิเล็กโทรดเพื่อใช้วัด RENA Stainless steel electrode (12MΩ, 0.01 Taper A-M system, FL, USA)
4. Micromanipulator (Serial No.7633, Brinkmann, NY, USA)
5. Flame photometer (Hitachi, Tokyo, Japan)
6. เครื่องชั่งสาร (model BP 2100 S, model AC 211S, Sartorius, Goettingen, Germany)
7. Infusion pump (model No.975, Havard apparatus, USA)
8. Haemofuge A (Heraeus Chirst, Germany)
9. pH meter (Mettler-Toledo GmbH2003, Germany)
10. Centrifuge (International Equipment Company, MA, USA)
11. Glucometer และ Glucostrip (Accu-Chek Advantage II, Roche, U.S.A.)
12. เครื่องมือผ่าตัด 1 ชุด (stainless steel)
13. Sugical silk 3/0 (Natural silk, braided, coated, non-absorbable,BLACK) Silkam®
14. Autoclip applier B-2350 พร้อม autoclip® B-2355 ขนาด 9 mm stainless steel (Becton Dickinson, NY, USA)
15. Digital micro pipette (model 5000 DG, Nichiryo, Tokyo, Japan), transfer pipette system (Sherwood Medical, MO, USA) และ Eppendorf microliter pipette (Beckman instrument, NY, USA)
16. Polyethylene tube ได้แก่ PE-50 (No.7411), PE-10 (No.7401) (Clay Adums, USA)
17. Micro-hematocrit tubes (AM-heparinized 80 unit/ml)
18. Microtube tube เพื่อเก็บตัวอย่างเลือด
19. กระบอกฉีดยาขนาด 1, 5 และ 10 ซีซี
20. เข็มฉีดยาเบอร์ 20, 23 และ 26
21. ลวดโลหะที่ไม่เป็นสนิม
22. Beaker ขนาด 50, 100, 250 และ 1000 ซีซี
23. ตะเกียงแอลกอฮอล์
24. ถุงมือผ่าตัด ผ้ากอส สำลี ดินน้ำมัน เทปขาว
25. โคมไฟผ่าตัดพร้อมเตียงผ่าตัดพลาสติก

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ทั่วไป
 - NaCl (CARLO ERBA, Reagenti)]
 - Normal saline solution (pH =7.4)
2. สารเคมีที่ใช้ทดสอบ baroreflex sensitivity
 - L-Penlephine(C₉H₁₃NO₂.HCL) (Sigma)
 - Sodium nitroprusside (Sodiumnitroferrocyanide)(Sigma)
3. สารเคมีที่ใช้ทดสอบระดับน้ำตาลในเลือด
 - D (+) –Glucose anhydrous [Dextrose](C₆H₁₂O₆)(Fluka Chemika)
4. สารเคมีที่ใช้ในการผ่าตัด
 - Thiopental Sodium
 - Heparin (LEO, Denmark)
 - Dental cement และ acrylic acid (Meliodent sc.)(Fluka Chemical)
5. สารเคมีที่ใช้กับเครื่อง flame photometer (Hitachi) ประกอบด้วย
 - Stock standard for serum Na⁺, K⁺ (A2)(Na 150 mEq/L, K 5 mEq/L, Urea 15)(Daiichi Pure Chemical, Tokyo, Japan)
 - Lithium carbonate (Li₂CO₃)(Sigma)
6. สารเคมีที่ใช้ผสมในน้ำดื่มประกอบด้วย
 - D (+) –Glucose anhydrous [Dextrose](C₆H₁₂O₆)(Fluka Chemika)
 - β -alanine ([2S]-1-[3-Mercapto-2-methylpropionyl]-L- proline) (Sigma)
 - taurine (2-aminoethane sulfonic acid) (Sigma)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์และรวบรวมข้อมูลด้วยคอมพิวเตอร์ (Window XP) และนำเสนอในรูปค่า mean ± SEM วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Statmost version 3.6, UT, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย ANOVA (One way) และวิเคราะห์หากกลุ่มที่ต่างกันด้วย Post Hoc test (Duncan's Multi-Range) และวิเคราะห์ความแตกต่างภายในกลุ่มเดียวกันด้วย paired t-test โดยกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $P < 0.05$