วิธีดำเนินการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้จะทำในหนูขาวใหญ่สายพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักตัวระหว่าง 190-290 กรัม จากเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยทำให้สลบก่อนด้วยการฉีด Inactin (RBI, USA) ขนาด 110 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จากนั้นจึงนำมาวางบนเตียงที่ควบคุมอุณหภูมิร่างกายให้คงที่ที่ 37 องศาเซลเซียส เจาะคอและสอดท่อหายใจ วัดความดันโลหิตแดงทาง carotid artery และให้ 0.9%NaCl ทาง jugular vein ในอัตรา 1.6 มิลลิลิตรต่อชั่วโมงต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม จากนั้นทำการสอดท่อผ่านกระเพาะปัสสาวะเพื่อระบายปัสสาวะออก แล้วจึงเปิดหาไตด้านซ้าย ลอกไขมันและผนังหุ้มออกนำมาวางใน kidney cup สอดท่อเข้า ureter ซ้ายเพื่อระบายปัสสาวะ และป้องกันการขยับไปมาของไตในขณะสัตว์ทดลองหายใจด้วยการเท 3% agar ที่ละลายใน 0.9%NaCl ขณะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงไปใน kidney cup หลังจากที่ agar แข็งตัวแล้วจึงตัดผิวด้านบนออกเพื่อส่องหา proximal tubule ด้วยกล้อง stereomicroscope แล้วจึงเริ่มทำการทดลอง

หลังจากเสร็จการทดลองแล้ว ใช้ KCl ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำเพื่อให้สัตว์ทดลองเสียชีวิต

การเตรียม micropipettes สำหรับทำวิธี micropuncture

ทั้ง single และ double barrelled micropipette เตรียมจาก borosilicate glass capillary tubes (TGC 100-15 และ TGC 150-15, Harvard Apparatus, England) โดยเริ่มจากทำความสะอาดโดยต้มในน้ำกลั่นจนเดือดและทำให้แห้งโดยการอบ จากนั้นทั้ง single และ double barrelled micropipette นำมาดึงยืดออกโดยใช้ micropipette puller (Model PE-2, Narishige, Japan) โดยปรับค่า heater และ magnet ให้เหมาะสมกับขนาดที่จะใช้งานแล้วจึงนำมา grind โดยใช้เครื่อง micropipette beveller ภายใต้กล้อง binocular microscope (Model 14168, WPI, USA) โดยให้มีหยดน้ำไหลบนแผ่นหินขัดอย่างต่อเนื่องเพื่อขจัดฝุ่นและเศษแก้ว จนกระทั่ง ได้ single barrelled micropipette ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-10 μm และ double barrelled micropipette ขนาด 10-13 μm ซึ่งจะถูกนำมาทำความสะอาดที่ส่วนปลายแหลมโดยใช้ chromic-sulfuric solution, distilled water และทำให้แห้งโดย acetone ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งจะทำให้มนโดยผ่านเปลวไฟเพื่อเตรียมไว้ต่อกับท่อ polyethylene เพื่อบรรจุสารละลายที่ต้องการทำการทดลอง

ในการบรรจุสารละลายลงใน double barrelled micropipette ต้องใช้ข้อต่อที่ทำจาก glass micropipette (GCi 50-15, Harvard Apparatus, England) โดยนำมาดึงยืดในเปลวไฟด้วยมือ และตัดให้ได้ขนาดที่จะสอดเข้าไปใน double barrelled micropipette ทั้งสองข้างโดยยืดให้ติด

กันด้วยขี้ผึ้งลนไฟและรอจนแห้งยึดติดกันสนิท ข้างหนึ่งของ double barrelled micropipette จะถูกบรรจุโดย sudan black ที่ละลายใน castor oil ส่วนอีกด้านจะเป็นสารละลายที่ต้องการทดสอบ

สารละลายที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดก่อนที่จะถูกบรรจุใน single และ double barrelled micropipette ต้องผ่านการกรองโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 μm ส่วน sudan black ที่ละลายใน castor oil ใช้ขนาด 0.4 μm

วิธีทดลองโดยเทคนิค split droplet micropuncture

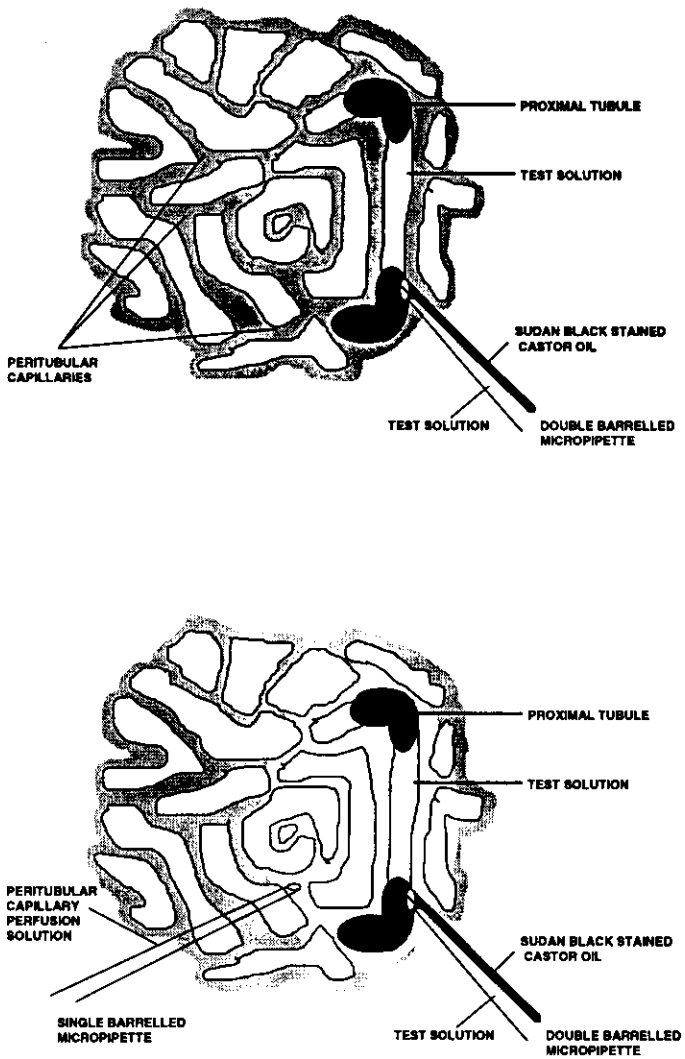
หลังจากเลือก proximal tubule ของ superficial nephron ที่จะทำการทดลองได้แล้ว นำ double barrelled micropipette ที่ด้านหนึ่งบรรจุ sudan black ที่ละลายใน castor oil และอีกด้านหนึ่งบรรจุสารละลายที่เป็น control หรือ mid-proximal tubular fluid (TF) ที่ประกอบด้วย (in mM) NaCl 145; $NaHCO_3$ 5; KCl 5 and $CaCl_2$ 1.5) pH 7.4 สำหรับ double barrelled micropipette ที่บรรจุสารทั้งสองด้านไว้แล้วจะถูกวางไว้บน micromanipulator (Leica, Switzerland) การฉีดสารละลาย sudan black ที่ละลายใน castor oil เข้าสู่ proximal tubule ทำโดยใช้ micrometer ส่วนการฉีดสารละลายที่ต้องการทดสอบทำโดยใช้การอัดอากาศผ่าน glass syringe ขนาด 50 ml โดยฉีดให้ oil column มีความยาวประมาณ 20 เท่าของเส้นผ่าศูนย์กลางของ proximal tubule ก่อนทางด้าน distal ของท่อแล้วจึงแยก (split) oil column ด้วย TF หรือ test solution อื่นๆ (ดังแสดงในภาพบนของรูปที่ 4) ขณะที่สารละลายใน proximal tubule ถูกดูดกลับจะทำให้ oil column ที่ถูกแยกออกตอนแรกเคลื่อนเข้าหากัน ในขณะเดียวกันจะมีการบันทึกภาพ image ของ shrinking split-drop แบบ digital ไว้ทุกๆ 1 วินาที เพื่อนำมาวิเคราะห์และคำนวณค่าอัตราการดูดกลับของของเหลว

วิธีทดลอง peritubular capillary perfusion

ในการทดลองที่ศึกษาอัตราการดูดกลับของของเหลวจากปัจจัยที่เกิดจากด้าน peritubular fluid จะต้องมีเทคนิค peritubular capillary perfusion ร่วมอยู่กับเทคนิค shrinking split-droplet micropuncture โดยตอนแรกจะต้องฉีด oil column เข้าไปใน proximal tubule ก่อน แล้วจึงใช้ single barrelled micropipette ฉีดสารเข้าไปในเส้นเลือดฝอย (capillary) บริเวณ vascular star ที่ห่างจาก proximal tubule ที่จะทำการศึกษา 2 หรือ 3 เท่าของขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง capillary (Spitzer & Windhager, 1972; Gyбry, 1974; Sato, 1975) สารละลายที่ฉีดเข้าไปหรือ artificial peritubular fluid (PTF) of protein-free plasma-like composition ประกอบด้วย (in mM) NaCl 98.3; $NaHCO_3$ 35; Na_2HPO_4 1.6; NaH_2PO_4 0.2; KCl 5; $CaCl_2$ 1.5; $MgCl_2$ 0.8; and CH_3COONa 10 mM ที่ pH 7.4 โดยใช้ carbogen gas (5%CO_2 + 95%O_2) ที่ความดัน 10 psi เป็นตัวดันสารละลาย PTF ที่ถูกเติมใน single barrelled micropipette จนเต็มก่อนแล้วโดยการเปิด

value ที่ต่อกับถัง carbogen gas สำหรับ single barrelled micropipette ที่ใช้นี้จะถูกวางไว้บน micromanipulator (Leitz, Switzerland) ในการ perfuse เส้นเลือดฝอยนี้จะถือว่าสมบูรณ์เมื่อบริเวณรอบท่อ proximal tubule ที่ต้องการศึกษาไม่มีเลือดไหลผ่านได้เลย (ดังแสดงในภาพล่างของรูปที่ 3) หลังจาก perfuse เป็นเวลา 10 วินาทีแล้วจึงแยก oil column ที่ฉีดเข้าไปก่อนด้วยสารละลาย TF หรือสารละลาย TF ที่มี candesartan 10^{-8}M ขึ้นกับกลุ่มการทดลอง ในขณะที่สารละลายใน proximal tubule ถูกดูดกลับ ภาพ digital image จะถูกบันทึกไว้ทุก 1 วินาที อัตราการดูดกลับของเหลวหรือค่า initial Jv_a จะคำนวณจากค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองที่ perfuse ท่อ proximal tubule ด้วย TF ที่ถูกเลือกแบบ random จำนวน 2-4 ท่อ ในทำนองเดียวกันขณะที่มี peritubular capillary perfusion ด้วย PTF ค่าเฉลี่ยของ Jv_a ก็จะคำนวณได้จากการทดลองใน 2-5 ท่อ

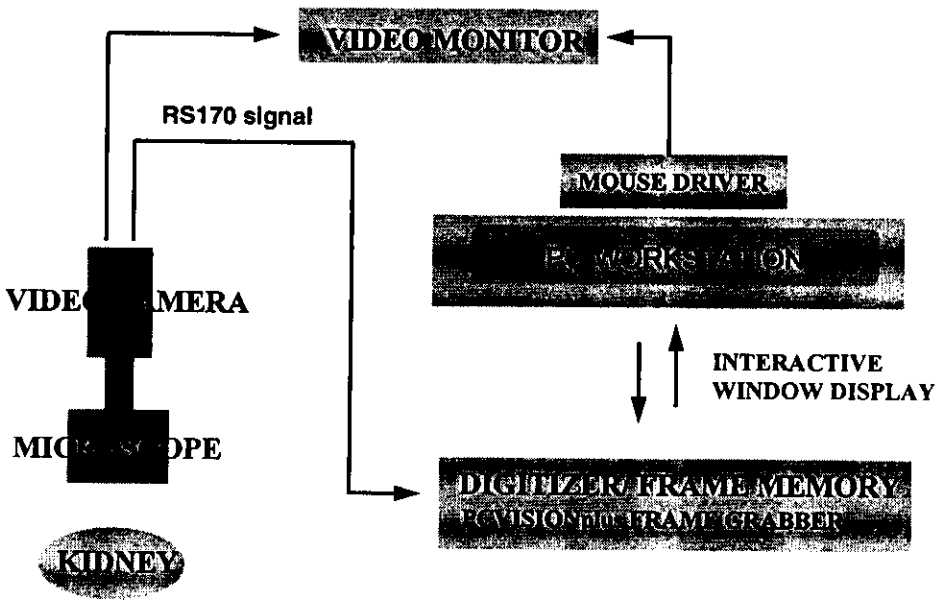
รูปที่ 3 Schematic representation of the method of shrinking split-drop micropuncture (top panel) and with simultaneous perfusion of peritubular capillaries (bottom panel).



Digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture

ในการหาค่า proximal tubular fluid reabsorption ใช้เทคนิค video-based method for computerized digital image capture and analysis of shrinking split-drop micropuncture ซึ่งถูก modified โดย Harris *et al.* (1987) ดังแผนภาพที่แสดงในรูปที่ 4

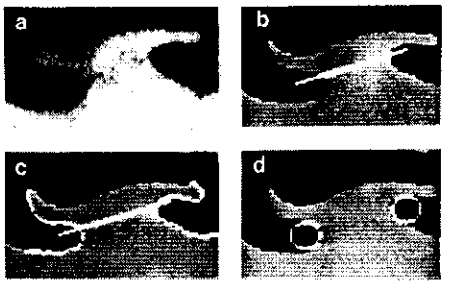
รูปที่ 4 Schematic representation of digital image capture and analysis.



โดยหลังจากที่เตรียมไตสัตว์ทดลองเพื่อให้ได้ proximal tubule สำหรับทำ microperfusion แล้ว จะใช้กล้อง stereomicroscope (Model M420, Leica, Switzerland) ส่องดู proximal tubule ด้วยกำลังขยายรวมทั้งสิ้น 64 เท่า ส่วน phototube ของ stereomicroscope ต่อกับ video camera (Model JAI 1202, IAI Protec, Japan) โดยสัญญาณ RS 170 จาก video camera จะถูกแสดงบน video monitor และสัญญาณนี้ยังถูกผ่านไปยัง video digitizer และ frame memory (PCVISIONplus frame grabber, Imaging Technology Incorperated, USA) เพื่อเปลี่ยนสัญญาณ analog เป็น digital เพื่อการเก็บข้อมูล (stored images) ขนาด 512x512 pixels, 256 grey levels ในการเก็บและวิเคราะห์ digital images นั้นทำโดย computer program ที่เขียนด้วยภาษา C และ pascal บน MSDOS version 6.2 โดยเครื่อง PC

ขณะกำลังเก็บภาพ images นั้นโปรแกรมทำงานจะอยู่ในส่วน store sequence และด้วยการใช้ mouse กดเลือกขนาดภาพที่ต้องการบน monitor โดยเฉลี่ยมีขนาดประมาณ 5,000-8,000 pixels ครอบคลุมขนาดความยาวของท่อ proximal tubule ที่กำลังทดลอง ภาพ images จะถูกเก็บไว้ทุกๆ 1 วินาที หลังจากเก็บภาพที่ต้องการเป็นชุดของเวลาแล้ว จะนำมาคำนวนต่อไป โดยใช้โปรแกรมทำงานในส่วน verify sequence ซึ่งประกอบด้วยชุดโปรแกรมย่อยดังนี้ 1) edit sequence ใช้เพื่อเลือกเฉพาะ frame ที่ต้องการใช้วิเคราะห์โดยเลือกส่วนที่เป็น straight portion ของ proximal tubule และต้องมีความยาวระหว่าง miniscus ของ oil column มากกว่าเส้นผ่าศูนย์กลาง tubule 2) Find Boundary ใช้ในการหาขอบเขตของบริเวณปลาย oil column โดยใช้ boundary-tracking algorithm 3) Compute circles เป็นการใช้ algorithm สำหรับวาดวงกลมที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กที่สุดที่จะพอดีกับขนาดท่อ proximal tubule และ 4) Compute Data ใช้คำนวณข้อมูลแต่ละ frame ทั้งหมดที่ประกอบด้วย 4.1) ระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางของวงกลมที่ได้จากข้อ 3 มีหน่วยเป็น microns (μm), 4.2) ค่า half time ($t_{1/2}$) ของอัตราการลดลงของปริมาตรของ split-drop, 4.3) ค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางและรัศมีของท่อ proximal tubule, 4.4) ค่า volume flux ต่อหน่วยพื้นที่ (Jv_a), และ 4.5) ค่า volume flux ต่อหน่วยความยาวท่อ (Jv_l) ตัวอย่างการเก็บภาพ image และการวิเคราะห์ภาพดังแสดงให้ดูในรูปที่ 5

รูปที่ 5 Successive stages in the capture and analysis of a single frame from a shrinking split-drop sequence. a) Photomicrograph showing droplet before image processing. b) Digital image retrieved from store after threshold processing. c) Limits of oil column defined by Find Boundaries program. d) Circles fitted to tips of oil columns by Calculate Circles program (from Harris *et al.*, 1987).



การแบ่งกลุ่มการทดลอง

การวิจัยครั้งนี้จะทำในหนู 4 กลุ่มๆละ 6-8 ตัว โดยจะวัดอัตราการดูดกลับของเหลวที่ท่อไตส่วนต้น (proximal tubular fluid reabsorption rate หรือ Jv_a) ค่า Jv_a จะเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากท่อไต 3-7 ท่อของหนูแต่ละตัว โดยฉีดสารเข้าสู่ lumen ของท่อไตพร้อมกับ peritubular capillary

สำหรับการศึกษา locally produced AngII ที่ proximal tubule และ circulating AngII ใน peritubular capillary ทำโดยใช้ highly potent and long-acting Ang II receptor antagonist คือ candesartan หรือ CV11974 (25) โดยกำหนดแผนการทดลองดังนี้

	luminal perfusion	peritubular capillary perfusion
กลุ่มที่ 1	no Ang II blocker	no Ang II blocker
กลุ่มที่ 2	candesartan	no Ang II blocker
กลุ่มที่ 3	no Ang II blocker	candesartan
กลุ่มที่ 4	candesartan	candesartan

การคำนวณ

ค่า Jv_a ที่ได้จากการทดลองใน proximal tubule จำนวน 2-5 ท่อจะนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและแสดงผลเป็นค่า mean ± s.e.m. (standard error of mean) ส่วนเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงค่า Jv_a จากผลของการทดลอง จะคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ change in } Jv_a = \frac{Jv_a \text{ (test solution)} - Jv_a \text{ (control TF solution)} \times 100}{Jv_a \text{ (control (TF) solution)}}$$

ค่าเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงจากค่า initial Jv_a ขณะที่มี peritubular capillary perfusion ด้วย PTF หรือ PTF + candesartan จะคำนวณจากสมการ

$$\% \text{ change in } Jv_a = \frac{Jv_a \text{ (PTF หรือ PTF+candesartan)} - Jv_a \text{ (control TF solution)} \times 100}{Jv_a \text{ (control (TF) solution)}}$$

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การเปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของ initial Jv_a จาก TF perfusion กับค่า Jv_a จาก TF+ candesartan หรือกับ PTF อย่างเดียว หรือกับ PTF+ candesartan ใช้ Student's paired t-test โดยจะถือค่ามีนัยสำคัญที่ P value น้อยกว่า 0.05

ในกรณีที่มีการทดลองมากกว่า 2 ประเภทในหนูตัวเดียว การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Jv_a จะใช้ two way ANOVA และทำ post hoc multiple comparison โดยใช้ Neuman-Keuls Method โดยจะถือค่ามีนัยสำคัญที่ P value น้อยกว่า 0.05