

รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-20



รายงานการวิจัย

ผลของการให้ทอรีนเสริมในช่วงแรกของชีวิตและการออกกำลังกายต่อ
การป้องกันโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงในหนู
(Effects of Taurine Supplement in Perinatal Period and
Exercise on Prevention of Diabetes Mellitus and
Hypertension in Rats)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

ผลของการให้ทอรีนเสริมในช่วงแรกของชีวิตและการออกกำลังกายต่อ
การป้องกันโรคเบาหวานและความดันโลหิตสูงในหนู
(Effects of Taurine Supplement in Perinatal Period and
Exercise on Prevention of Diabetes Mellitus and
Hypertension in Rats)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. อัจฉราพร แถงหมอ

สาขาวิชาปรีคลินิก
สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

ผู้ร่วมวิจัย

นาย ปุณณพัฒน์ แต่งเผือก

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2563

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาจากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่มอบทุนวิจัยสนับสนุนนักวิจัย ผู้วิจัยตระหนักถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของมหาวิทยาลัยที่ต้องการสนับสนุนให้อาจารย์ทำงานวิจัย และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้เป็นประโยชน์แก่ผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอมอบความกตัญญูทเวทิตาคคุณ แต่บิดา มารดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่างๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

ผู้วิจัย

กันยายน 2563



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบสมมติฐานที่ว่า การให้ทอรีนเสริมในระยะปริกำเนิด-แรกเกิดช่วยป้องกันเบาหวานและโรคความดันโลหิตสูงในลูกหนูเพศผู้โตเต็มวัยที่มีแม่เป็นเบาหวาน โดยหนูเพศเมียพันธุ์วิสตาได้ถูกเลี้ยงด้วยอาหารและน้ำบริสุทธ์ แบ่งเป็นกลุ่มที่เป็นเบาหวานและกลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวาน ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยสเตรบิโตโซโตซิน โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ก่อนการตั้งครรภ์ จากนั้นนำไปผสมพันธุ์ เพื่อให้ตั้งครรภ์ ระหว่างตั้งครรภ์ แม่หนูจะถูกแบ่งเป็น กลุ่มแม่หนูที่ได้รับทอรีนเสริม 3% ในน้ำบริสุทธ์ [กลุ่มควบคุม+เสริมทอรีน (T) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+เสริมทอรีน (DMT)] และกลุ่มแม่หนูที่ได้น้ำบริสุทธ์ [กลุ่มควบคุม+ได้น้ำบริสุทธ์ (C) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+ได้น้ำบริสุทธ์ (DM)] หลังจากหย่านมลูกหนูทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและบริสุทธ์ จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง เมื่ออายุครบ 4 สัปดาห์ ลูกหนูในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มที่ไม่ได้ออกกำลังกาย [กลุ่มควบคุม+ได้น้ำบริสุทธ์ (C) กลุ่มควบคุม+เสริมทอรีน (T) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+ได้น้ำบริสุทธ์ (DM) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+เสริมทอรีน (DMT)] และกลุ่มที่ออกกำลังกาย [กลุ่มควบคุม+ออกกำลังกาย (Ex) กลุ่มควบคุม+เสริมทอรีน+ออกกำลังกาย (TEx) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+ได้น้ำบริสุทธ์+ออกกำลังกาย (DMEx) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน+เสริมทอรีน+ออกกำลังกาย (DMTEx)] กลุ่มที่ออกกำลังกาย ลูกหนูจะถูกบังคับให้ว่ายน้ำในอ่างทรงกระบอกเป็นเวลา 12 สัปดาห์ จนกระทั่งหนูเพศผู้ทุกกลุ่มอายุ 16 สัปดาห์ ได้ถูกนำมาศึกษาค่าเคมีในเลือดและพารามิเตอร์เกี่ยวกับระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด ซึ่งการศึกษาพบว่า หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานน้ำหนักตัวลดลง ค่าน้ำตาลเพิ่มขึ้นแต่ค่าอิซูลินลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า ขนาดของไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและออกกำลังกาย เมื่อให้สารทอรีนตั้งแต่ในครรภ์ จนกระทั่งหย่านมร่วมกับผลของการออกกำลังกายในลูกหนู ค่าน้ำตาลในเลือดลดลง, ค่าอิซูลินและขนาดของไอส์เลตออฟแลงเกอร์ฮานส์กลับเพิ่มขึ้น จากการศึกษา ในกลุ่มลูกหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน ค่าความดันเลือดแดงสูง แต่ค่าอัตราการเต้นของหัวใจลดลงในลูกหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน ค่าความไวในการตอบสนองของบาริเรเซพเตอร์ ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่ตอบสนองต่อฟีนิลเอพรีนและโซเดียมไนโตรพัสไซด์ลดลง การแสดงออกของจินแองจิโอเทนซิน รีเซพเตอร์ ที่ 1 ในหัวใจและไตเพิ่มขึ้น เมื่อให้ทอรีนร่วมกับการออกกำลังกายกลับทำให้ค่าความไวในการตอบสนองต่อบาริเรเซพเตอร์เพิ่มขึ้น การแสดงออกของจินแองจิโอเทนซิน รีเซพเตอร์ ที่ 1 ในหัวใจและไตลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มลูกหนูที่แม่ไม่เป็นเบาหวาน โดยสรุป การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการให้ทอรีนเสริมในช่วงแรกของชีวิตและการออกกำลังกายในหนูที่มีแม่มีภาวะเบาหวานอาจมีประโยชน์ในการป้องกันการเกิดโรคจากการบกพร่องของเมแทบอลิซึมในลูกหนูที่โตเต็มวัยหรือการดำเนินไปของโรคหลอดเลือดและหัวใจได้

Abstract

This study tested the hypothesis that perinatal-neonatal taurine supplementation prevents dyslipidemia and hypertension in male adult offspring of maternal diabetic rats. Female Wistar rats were fed normal rat chow and reverse osmosis water (RO) without diabetic (Control groups) or with diabetic (Diabetic groups) induction by intraperitoneal streptozotocin injection before pregnancy. After that, rats were allowed to mate for the pregnancy. During pregnancy, they were supplemented with 3% taurine in water [Control+T (T), Diabetic+T (DMT) groups] or water alone [Control+RO (C), Diabetic+RO (DM) groups]. After weaning, male offspring were fed normal rat chow and RO throughout the study. At 4 weeks of age in male offspring in each group were divided into non-exercise [Control+RO (C), Control+T (T), Diabetic+RO (DM), Diabetic+T (DMT) groups] and exercise groups [Control+Ex (Ex), Control+T+Ex (TEx), Diabetic+RO+Ex (DMEx), Diabetic+T+Ex (DMTEx) groups]. In male offspring, exercise group was forced to swim in the cylinder tank for 12 weeks. Blood chemistry and cardiovascular parameters were studied at 16 weeks of age. In their adult offspring, results showed that decreased in body weight increased FBS and decreased insulin level in diabetes group. However, Islet of Langerhans is the small size in diabetes group when compared with control group. When taurine supplementation with exercise reduced FBS, increased insulin level and increased the size of Islet of Langerhans. Mean arterial pressures (MAP) were found to increase in diabetes group but cannot change in heart rate (HR). The Baroreflex sensitivity of heart rate response to phenylephrine and sodium nitroprusside were depressed but expression of the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor in the tissue of heart and kidney were increased in diabetes. When taurine supplementation with exercise has increased significantly in baroreflex sensitivity and expression of the angiotensin II type 1 (AT₁) receptor in the tissue of heart and kidney were decreased. In conclusion, the present study demonstrated that taurine supplementation during perinatal-neonatal period and exercise in diabetic mothers may be the prevention of development or progression of diabetes mellitus and cardiovascular disease in their offspring .

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ข้อตกลงเบื้องต้น	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	
ผลของระยะปรักำเนิตต่อการทำงานและการเกิดโรคในวัยผู้ใหญ่.....	6
แม่ที่เป็นเบาหวานระหว่างตั้งครรภ์ต่อการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตสูงในลูก....	6
ทอริกับเบาหวานและความดันโลหิตสูง.....	7
การออกกำลังกายกับเบาหวานและความดันโลหิตสูง.....	8
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสัตว์ทดลอง.....	10
การออกกำลังกาย.....	10
การออกแบบการทดลอง.....	12
การผ่าตัดใส่สายสวนเข้าในหลอดเลือด.....	12
การวัดความดันและความไวของบารอรีเซพเตอร์.....	12
การวัดค่าเคมีในเลือด.....	15
วัดระดับอินซูลิน.....	15
การศึกษาโครงสร้างของตับอ่อน.....	16
การวัดการแสดงออกของจีน AT1 receptor.....	17
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	19

บทที่ 4 ผลการวิจัย	
น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะและค่าเคมี	20
ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและความไวของบารอรีเฟล็กซ์.....	24
ขนาดของ Islet of Langerhans ในตับอ่อน.....	29
การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในหัวใจและไต.....	31
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล	
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะและค่าเคมี	35
สรุปผลการวิจัยค่าเคมี.....	36
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและความไวของบารอ รีเฟล็กซ์.....	38
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล ขนาดของ Islet of Langerhans ในตับอ่อน.....	40
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในหัวใจและไต.....	40
บรรณานุกรม	42

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 น้ำหนักตัว หัวใจและไต.....	21
ตารางที่ 2 ค่าเคมีในเลือด.....	22
ตารางที่ 3 ค่ายูเรีย ไตโตรเจน ครีเอทีนีน SGOT และ SGPT.....	23



สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงช่วงเวลาการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง.....	11
รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนและช่วงเวลาการออกกำลังภายในสัตว์ทดลอง.....	11
รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลอง.....	14
รูปที่ 4 ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย.....	24
รูปที่ 5 อัตราการเต้นของหัวใจ.....	26
รูปที่ 6 ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่ตอบสนองต่อ Phenylephrine.....	27
รูปที่ 7 ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่ตอบสนองต่อ Sodium nitroprusside.....	28
รูปที่ 8 Islet of Langerhans ของตับอ่อนย้อม H&E.....	29
รูปที่ 10 การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในหัวใจ.....	30
รูปที่ 11 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในหัวใจ.....	31
รูปที่ 12 การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในไต.....	32
รูปที่ 13 เปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ AT ₁ receptor ในไต.....	33



บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

จากสมมุติฐานการกำหนด (programming hypothesis) พบว่ามารดาที่ขาดสารอาหาร โดยเฉพาะโปรตีน (Aerts and Van Assche, 2002) และมารดาที่เป็นเบาหวานทั้งก่อนและขณะตั้งครรภ์จะส่งผลให้ลูกมีโอกาสเกิดกลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome) ในวัยผู้ใหญ่และวัยชราเพิ่มขึ้น กลุ่มอาการเมแทบอลิก (metabolic syndrome) เป็นกลุ่มอาการที่มีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเผาผลาญอาหารในร่างกายที่ผิดปกติ อันได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Galjaard et al, 2013) ปัจจุบันอัตราการเกิดโรคเบาหวานและ/หรือความดันโลหิตสูงเพิ่มขึ้นทุกปี นอกจากนี้ยังพบว่าโรคเบาหวานก่อให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงตามมา หรือเมื่อเกิดภาวะความดันโลหิตสูงแล้วยังมีภาวะแทรกซ้อนต่างๆตามมามากมายซึ่งนำไปสู่การเสียชีวิต ทำให้รัฐบาลต้องสูญเสียงบประมาณในการรักษาเยียวยาโรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อนดังกล่าว สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานและ/หรือความดันโลหิตสูงนั้นมีหลายสาเหตุด้วยกันทั้งจากพันธุกรรมและจากสิ่งแวดล้อม สาเหตุจากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เกิดจากแบบการดำเนินชีวิตที่เปลี่ยนไปในยุคปัจจุบัน ที่นิยมรับประทานอาหารที่มีส่วนผสมของแป้ง น้ำตาลและเกลือ เพิ่มขึ้น อาทิ อาหารขยะ (junk food) ขนมขบเคี้ยว น้ำอัดลม และอาหารประเภทดังกล่าวยังหาซื้อได้ง่ายส่งผลให้แบบแผนการรับประทานอาหารเปลี่ยนไปก่อให้เกิดโรคดังกล่าวเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมา ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลองพบว่าพันธุกรรมเป็นสาเหตุหลักที่ก่อให้เกิดโรคเบาหวาน ในมารดาที่เป็นโรคเบาหวานทั้งก่อนตั้งครรภ์และขณะตั้งครรภ์พบว่าลูกที่เกิดมาจะมีโอกาสเกิดโรคเบาหวานมากกว่าในมารดาที่ไม่ได้เป็นโรคเบาหวาน จากการศึกษาในสัตว์ทดลองของ L. Aerts และ F.A. van Assche โดยใช้สารเคมีในการทำลายปีศาจเซลล์ หรือการให้หนูกินน้ำตาลอย่างต่อเนื่องระหว่างตั้งครรภ์พบว่าหนูกลุ่มนี้เป็นเบาหวานจากการที่ขาดอินซูลิน จากปีศาจเซลล์ถูกทำลาย และลูกที่เกิดจากแม่ในกลุ่มดังกล่าวเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ และวัยชราล้วนแต่เป็นโรคเบาหวานซึ่งเป็นไปตามสมมุติฐานการถูกกำหนด (programming theory) ในกลุ่มที่มารดามีภาวะเบาหวานปานกลางลูกจะขาดอินซูลินสร้างอินซูลินได้น้อย ปีศาจเซลล์จะมีขนาดเล็กลง แต่ในกลุ่มที่มารดาเป็นเบาหวานแบบรุนแรงการสร้างอินซูลินในลูกจะมีมากเกินกว่าระดับปกติแต่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ (insulin resistance) นอกจากนี้ยังมีบางรายงานพบว่าลูกที่คลอดจากแม่ที่เป็นเบาหวานเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่และวัยชราอาจเสี่ยงต่อ โรคอ้วน และโรคความดันโลหิตสูงด้วย ในบางงานวิจัยมีรายงานว่าภาวะที่มิภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) คือ

ภาวะที่มีการคัดหลั่งอินซูลินออกมาปกติหรือหลังมากกว่าปกติ แต่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติได้นั้นเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กระตุ้นให้เกิดความดันโลหิตสูง โดยอาจจะไปกระตุ้นระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซิน หรืออาจจะไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดแดงหรือไปเพิ่มความหนืดของเลือดทำให้ความต้านทานภายในหลอดเลือดเพิ่มขึ้นส่งผลให้ความดันโลหิตสูง

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการออกกำลังกายแบบปานกลาง (moderate exercise) โดยวิ่งบนกรังเจอร์หรือว่ายน้ำ และออกเป็นประจำทุกวันติดต่อกันอย่างน้อย 6-15 สัปดาห์ จะช่วยการคัดหลั่งของอินซูลินและระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติและลดภาวะแทรกซ้อนจากการเป็นโรคเบาหวาน เช่น ลดการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน, ลดการอักเสบ (inflammation), ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) , ลดโอกาสเกิดโรคความดันโลหิตสูง (hypertension) ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานบางงานวิจัยพบว่าการออกกำลังกายช่วยยับยั้งอินซูลินไม่ให้ไปทำลายหลอดเลือดแดงลดโอกาสเกิดความดันโลหิตสูงในกลุ่มคนที่เบาหวานได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ทอรีนซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดหนึ่งที่มีความจำเป็นในการสร้างเซลล์สมองและเซลล์ประสาทในขณะที่อยู่ในครรภ์มารดา ยังสามารถยับยั้งการเกิดเบาหวานและภาวะดื้ออินซูลินได้ด้วยเช่นกัน จากรายงานที่ผ่านมาพบว่าถ้าขาดโปรตีนชนิดนี้ในขณะที่มารดาตั้งครรภ์จะส่งผลให้ลูกที่คลอดจากแม่กลุ่มนี้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิด metabolic syndrome ด้วยเช่นกัน

(Aerts and Van Assche . 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าทอรีนสามารถยับยั้งภาวะดื้ออินซูลินในหนูเบาหวานได้ ทำหน้าที่ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการเกิดความดันโลหิตสูงได้โดยผ่านกลไกเรนินร่วมแองจิโอเทนซินและระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติก

อย่างไรก็ตาม ที่ผ่านมายังไม่มีผู้ใดศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการได้รับทอรีนเสริมในระยะของชีวิตขณะที่อยู่ในครรภ์มารดาในมารดาที่เป็นเบาหวานต่อการต้าน หรือป้องกันโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดเบาหวานในลูกและยังไม่มีการอธิบายที่ชัดเจนว่าเมื่อให้ทอรีนเสริมในระยะแรกของชีวิต ร่วมกับการออกกำลังกายจะออกฤทธิ์ร่วมกันต้านหรือป้องกันการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตได้หรือไม่/อย่างไร ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมุ่งศึกษาในประเด็นนี้เพื่อให้ได้องค์ความรู้ใหม่ และลดค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคดังกล่าว

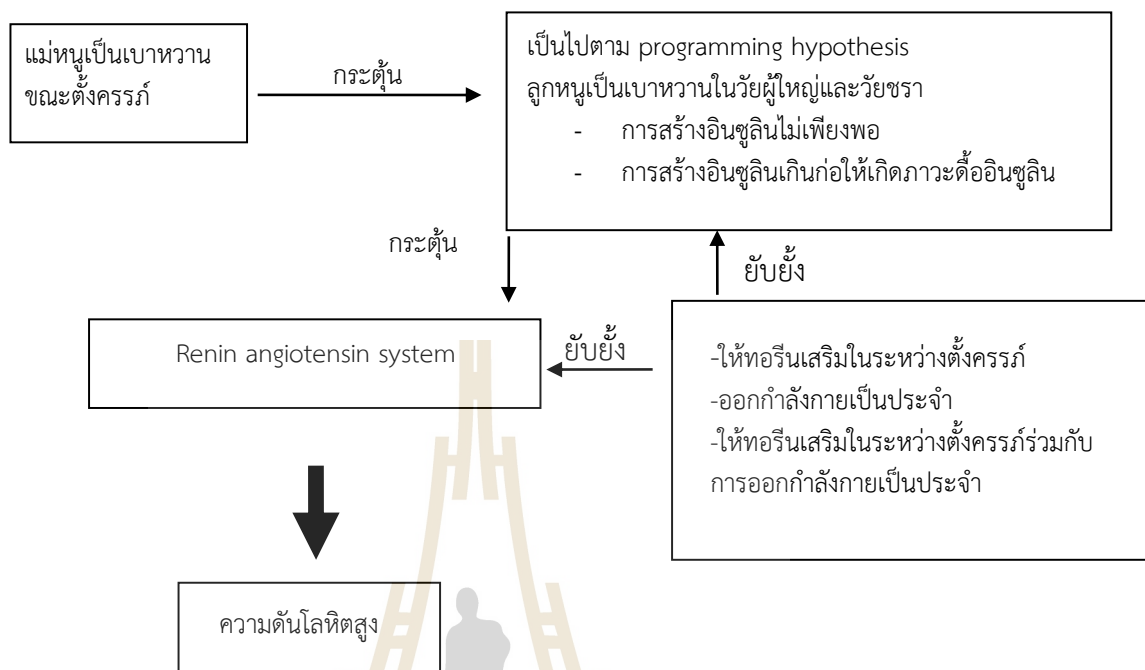
วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์และความสามารถในการป้องกันโรคของการให้ทอรีนเสริมในระยะแรกของชีวิตร่วมกับการออกกำลังกายต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดและระดับอินซูลินที่มีผลต่อการเกิดความดันโลหิตสูงผ่านระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซินในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษานี้ทำการศึกษาในหนู Wistar rat ที่กำลังตั้งครรภ์ หนูถูกแบ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและกลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน กลุ่มที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานจะถูกเหนี่ยวนำโดย streptozocin (STZ) ขนาด 50 mg/kg ทางหลอดเลือดดำ 1 ครั้งเมื่ออายุครรภ์ 1 วัน หลังจากนั้นแบ่งแม่หนูที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานออกเป็นกลุ่มที่ให้กินน้ำสะอาดและกลุ่มที่ให้ 3% ทอรีน ผสมในน้ำดื่ม ให้แม่หนูที่ตั้งครรภ์ดื่มจนกระทั่งถึงระยะให้นมบุตรและลูกหนูหย่านม ให้ดื่มทุกวันตามอิสระ หลังลูกหนูหย่านมเลือกเอาเฉพาะหนูตัวผู้ในแต่ละกลุ่มมาแบ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับการออกกำลังกายและไม่ได้ออกกำลังกาย หนูที่ใช้การทดลองครั้งนี้มีทั้งหมด 8 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว รวมทั้งสิ้น 80 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 คือกลุ่มควบคุมเป็นหนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับน้ำสะอาด (C) กลุ่มที่ 2 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาด (T) กลุ่มที่ 3 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้รับน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (Ex) กลุ่มที่ 4 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (T+Ex) กลุ่มที่ 5 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับน้ำสะอาด (cDM) กลุ่มที่ 6 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาด (DM+T) กลุ่มที่ 7 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้รับน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (DM+Ex) กลุ่มที่ 8 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (DM+T+Ex) หนูในกลุ่มที่ได้รับ 3% ทอรีน จะได้รับน้ำสะอาดผสมทอรีนตั้งแต่เริ่มตั้งครรรภ์จนกระทั่งหย่านมหลังจากนั้นจะให้น้ำสะอาดจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับการออกกำลังกายจะเริ่มออกกำลังกายตั้งแต่หลังการหย่านมเมื่อหนูอายุ 4 สัปดาห์ ออกกำลังกายทุกวันโดยการว่ายน้ำในอ่างทรงกระบอกเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยสัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 11 ให้อ่างน้ำเป็นเวลา 15 นาทีต่อวัน ว่ายน้ำสัปดาห์ละ 5 วัน ในสัปดาห์ที่ 12 ให้อ่างน้ำ 1 ชั่วโมงต่อวัน ว่ายน้ำสัปดาห์ละ 3 วัน การทดลองในขั้นตอนต่อไปจะเริ่มเมื่อหนูทุกกลุ่มอายุ 16 สัปดาห์ หนูจะถูกนำมาศึกษาผลการตอบสนองทางสรีรวิทยา ได้แก่ ความดันเลือดแดง ข้อมูลเหล่านี้จะถูกบันทึกและวิเคราะห์ด้วยคอมพิวเตอร์โดยใช้ระบบ Power lab เก็บเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในเลือดและค่าอินซูลิน เก็บตับอ่อนเพื่อนำไปศึกษาจุลกายวิภาค และเก็บชิ้นเนื้อของหัวใจและไต ไปตรวจ Angiotensin II Receptor Type 1 Gene Expression (AT1 receptor)

ข้อตกลงเบื้องต้น



ตามสมมุติฐานการกำหนด (programming hypothesis) ของ Aerts L แม่หนูที่เป็นเบาหวาน ในขณะที่ตั้งครรภ์ จะส่งผลให้ลูกที่คลอดออกมามีโอกาสเกิดเบาหวานในระยะผู้ใหญ่และวัยชรา ด้วยโดยอาจเกิดเบาหวานแบบที่มีการคัดหลั่งของอินซูลินในระดับต่ำ ทำให้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ได้ หรืออาจเกิดจากการที่มีการคัดหลั่งของอินซูลินมากเกินไป ก่อให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินทำให้ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้เช่นกัน ซึ่งการที่มีภาวะดื้ออินซูลินหรืออินซูลินเกิน เป็นหนึ่งในสาเหตุที่ก่อให้เกิดความดันโลหิตสูงโดยอาจจะไปกระตุ้นการทำงานของระบบเรนินร่วม แองจิโอเทนซินให้ทำงานเพิ่มขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าทอรีน และการออกกำลังกายสามารถลดการเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ แต่ยังคงขาดการศึกษาถึงการให้ทอรีนเสริมในระยะแรกของชีวิตกับการออกกำลังกาย สามารถลดโอกาสหรือป้องกันการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตได้ในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้โดยผู้วิจัยเชื่อว่าการการให้ทอรีนเสริมในระยะแรกของชีวิต การออกกำลังกายสามารถลดโอกาสเกิดหรือป้องกันการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตได้

สมมุติฐาน: การให้ทอรีนเสริมในระยะแรกของชีวิตร่วมกับการออกกำลังกายในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดสามารถลดโอกาสหรือป้องกันการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตสูงโดยไปยับยั้งการทำงานของระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซินได้

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป : ได้องค์ความรู้ใหม่ในการป้องกันการเกิดโรคเบาหวานและความดันในกลุ่มคนที่มีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคดังกล่าว และเป็นแนวทางในการศึกษากลไก (mechanism) ในการป้องกันโรคต่อไป



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

5.1 ผลของระยะปริกำเนิดต่อการทำงานและการเกิดโรคในวัยผู้ใหญ่

จากการศึกษาหลายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าลูกที่เกิดจากแม่ที่เป็นเบาหวานเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่มีโอกาสเกิดความทนต่อน้ำตาลลดลงหรือภาวะดื้ออินซูลินซึ่งนำไปสู่การเกิดโรคเบาหวานได้ (Cottrell, Ozanne, 2008) นอกจากนี้การขาดโปรตีนและการเป็นเบาหวานในขณะตั้งครรภ์มีผลต่อการเกิดความดันโลหิตสูงด้วยเช่นกัน จากสมมุติฐานการกำหนด (programming hypothesis) พบว่ามารดาที่ขาดสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีน (Aerts and Van Assche, 2002) และมารดาที่เป็นเบาหวานทั้งก่อนและขณะตั้งครรภ์จะส่งผลกระทบต่อลูก ทำให้ลูกที่เกิดมามีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดภาวะเมแทบอลิซึม (metabolic syndrome) ในวัยผู้ใหญ่และวัยชรา อันได้แก่ โรคอ้วน โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง เป็นต้น (Galjaard et al, 2013) metabolic syndrome เป็นภาวะที่มีความผิดปกติของการเผาผลาญในร่างกาย การเกิด metabolic syndrome ภาวะนี้มีผลต่อทั้ง genotype และ phenotype การเกิดโรคเบาหวานนั้นมีสาเหตุมาจากไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ ซึ่งสาเหตุของการควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับปกติไม่ได้นั้นอาจเป็นผลมาจากอินซูลิน เมื่อมีการคัดหลั่งของอินซูลินจากบีต้าเซลล์น้อยหรือไม่มีการคัดหลั่งของอินซูลินก็ส่งผลให้ควบคุมระดับน้ำตาลไม่ได้ก่อให้เกิดน้ำตาลในเลือดสูง นำไปสู่การเป็นเบาหวาน หรืออาจเกิดจากการที่อินซูลินถูกคัดหลั่งออกมามากเกินทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ภาวะนี้จะพบว่ามีปริมาณของอินซูลินมากแต่ไม่สามารถทำงานได้สมบูรณ์ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับปกติได้นำไปสู่โรคเบาหวานเช่นกัน จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการทำลายบีต้าเซลล์ของแม่หนูที่ตั้งครรภ์พบว่าเมื่อลูกคลอดออกมาเข้าสู่วัยผู้ใหญ่หนูเหล่านี้เป็นโรคเบาหวาน (Aerts, F.A. Van Assche, 2006)

5.2 แม่ที่เป็นเบาหวานระหว่างตั้งครรภ์ต่อการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตสูงในลูก

งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าลูกที่เกิดจากแม่ที่เป็นเบาหวานมีโอกาสเกิดภาวะไขมันสูงการเพิ่มขึ้นของคลอเลสเตอรอลและ LDL เกิดหลอดเลือดอักเสบและหลอดเลือดชั้นในสูญเสียหน้าที่โดยจะพบการเพิ่มขึ้นของ biomarker อันได้แก่ plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), vascular adhesion molecule-1 (VCAM), intercellular adhesion molecule1 (ICAM), E-selectin, insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุให้เกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้น eNOS oxidative stress ซึ่งสัมพันธ์กับการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (John Hall et al, 2010)

การเกิดโรคความดันโลหิตสูงมีหลายสาเหตุ ปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิดโรคคือเงินและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมส่วนใหญ่เกิดจากพฤติกรรมการกินเป็นหลัก เช่น การกินอาหารที่มีเกลือเป็นส่วนผสมมาก (Frisoli et al, 2012; Carlson et al, 2001) หรือกินอาหารในกลุ่มคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีส่วนประกอบของแป้งและน้ำตาลมาก (Feig 2010) ซึ่งอาหารสำเร็จรูปและขนมรวมทั้งเครื่องดื่มต่างๆในปัจจุบันล้วนแล้วแต่มีส่วนผสมของเกลือและน้ำตาลมากซึ่งเป็นสาเหตุก่อให้เกิดความดันโลหิตสูงได้ จากการศึกษาทางานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การได้รับเกลือหรือน้ำตาลมากทำให้เกิดความดันโลหิตสูงได้ โดยทั้งเกลือหรือน้ำตาลมีผลไปกระตุ้นการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติกส่งผลให้หลอดเลือดแดงหดตัวนำไปสู่ภาวะความดันโลหิตสูงและโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด (Aerts L et al, 1990). นอกจากนี้ยังพบว่า การกินน้ำตาลมากทำให้มีการคัดหลั่งของอินซูลินเพิ่มขึ้นและปริมาณของอินซูลินที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นทั้งระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซิน (renin – angiotensin system) และกระตุ้นซิมพาเทติกให้ทำงานเพิ่มขึ้น เมื่อเรนินแองจิโอเทนซินถูกเปลี่ยนเป็นแองจิโอเทนซินทู (angiotensin II, AngII) มีผลกระตุ้นให้หลอดเลือดสูญเสียหน้าที่หรือหดตัวส่งผลให้เกิดความดันโลหิตสูง นอกจากนี้ยังพบว่าอินซูลินที่มีมากเกินไปมีผลต่อการทำลายโครงสร้างในชั้น endothelial ของหลอดเลือดแดงเล็กทำให้ไม่มีการหลั่งสารที่มีผลทำให้หลอดเลือดคลายตัวออกจาก endothelial เช่น nitric oxide (NO) และ local metabolite ส่งผลให้หลอดเลือดหดตัว ความต้านทานภายในหลอดเลือดเพิ่มสูงขึ้นก่อให้เกิดความดันโลหิตสูงตามมา (SAMY et al, 2001). นอกจากนี้ยังพบว่าภาวะดื้ออินซูลินจะกระตุ้นการทำงานของระบบเรนินร่วมแองจิโอเทนซินทำโดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบผ่าน nuclear factor-kappaB ทำให้หลอดเลือดชั้นในสูญเสียหน้าที่ (endothelial dysfunction) ส่งผลให้หลอดเลือดเอ็นโดทีเลียมสร้าง nitric oxide (NO) ลดลง หลอดเลือดหดตัวเพิ่มขึ้น (Liz 2007)

5.3 ทอรีนกับเบาหวานและความดันโลหิตสูง

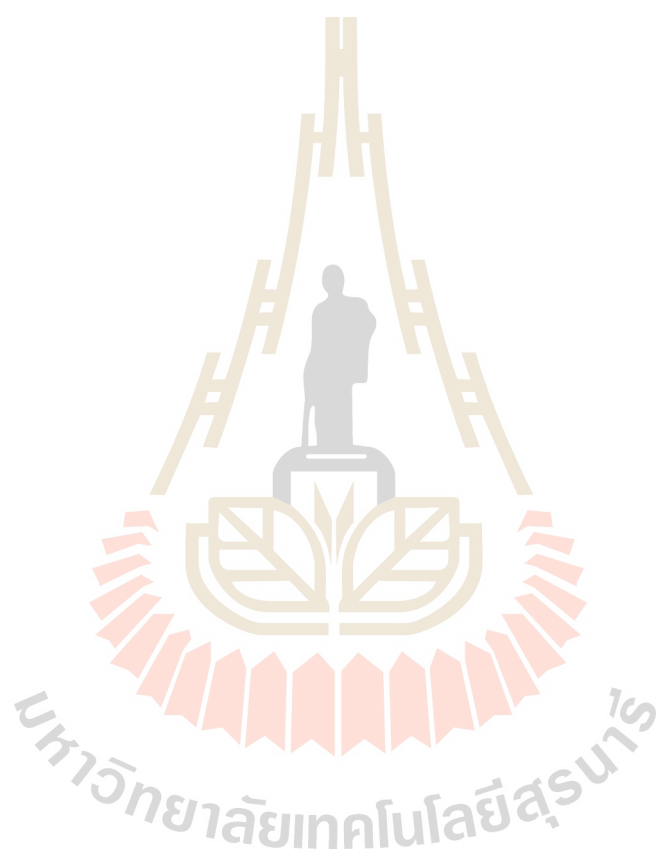
ทอรีนเป็นกรดอะมิโนที่มีกำมะถันเป็นส่วนประกอบและอยู่อย่างอิสระในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น กล้ามเนื้อ เกร็ดเลือด และในสมองที่กำลังเจริญเติบโต ทอรีนจะมีปริมาณสูงในนมแม่และอาหารทะเล จะพบในสัตว์เท่านั้นไม่พบในพืช การสังเคราะห์ทอรีนต้องใช้เอ็นไซม์ cystathionine synthase, cystathionase, และ cysteine sulphonic acid decarboxidase (CSAD) ซึ่งต้องอาศัยวิตามินบี 6 เป็นโคแฟกเตอร์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การให้ทอรีนสามารถลดการเกิดภาวะดื้ออินซูลินและการเกิดเบาหวานในหนูที่เป็นเบาหวานได้แต่กลไกยังไม่ชัดเจน (Takashi Ito et al, 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าทอรีนสามารถกระตุ้นบีต้าเซลล์ให้หลั่งอินซูลินได้ดีขึ้น (Idrissi et al, 2012) นอกจากนี้ทอรีนยังสามารถลดความดันโลหิตได้โดยการยับยั้งการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติก หรือ อีกกลไกคือไปมีผลยับยั้งกลไกเรนินร่วมแองจิโอเทนซิน ทำให้ความดันลดลงสู่ภาวะปกติ (Thaeomor et al, 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าทอรีนมีผลเพิ่ม GABA_A receptor ที่ endothelial ส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัวลดความต้านทานภายในหลอดเลือด ทำให้ความดันลดลง

เข้าสู่ภาวะปกติ (Idrissi et al, 2012; Abebe et al, 2011) แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงการป้องกันการเกิด ความดันโลหิตสูงในกลุ่มคนที่มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นความดันสูงและเบาหวาน กลุ่มผู้วิจัยจึงสนใจ ศึกษาฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคดังกล่าว

5.4 การออกกำลังกายกับเบาหวานและความดันโลหิตสูง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การออกกำลังกายสามารถเพิ่มการคัดหลั่งอินซูลินในกลุ่มคนเบาหวานที่ขาดอินซูลิน ในขณะที่เดียวกันการออกกำลังกายก็สามารถลดการเกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยกระตุ้นให้อินซูลินสามารถทำงานและเพิ่มการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มลดลง ในผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะดื้ออินซูลินจะกระตุ้นการทำงานของซิมพาเทติกเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้การทำงานของบารอรีเฟล็กซ์ลดลง (Dela et al., 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มคนที่มีความไวของบารอรีเฟล็กซ์ลดลงเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อออกกำลังกายพบว่า การออกกำลังกายจะช่วยให้ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ดีขึ้น ระหว่างออกกำลังกายจะพบว่าความดันโลหิตและการเพิ่มขึ้นของความดันนี้เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ cardiac output ในขณะที่ความต้านทานส่วนปลายลดลง ความดันที่สูงขึ้นพบว่าค่า systolic จะเพิ่มสูงขึ้นแต่ diastolic แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง ความดันที่สูงขึ้นจากการออกกำลังกายจะช่วยให้ resetting ความไวบารอรีเฟล็กซ์ (Brooks et al., 1996) การออกกำลังกายเบาๆในผู้ใหญ่ปกติ (Uusitalo et al., 2002). และผู้ป่วยหัวใจล้มเหลว (Malfatto et al., 2002) จะช่วยให้ระบบประสาทอัตโนมัติทำงานได้ดีขึ้น บางการศึกษาพบว่า การออกกำลังกายจะทำให้ระบบประสาทพาราซิมเทติกทำงานมากขึ้น (Rovere et al., 2002) ลดการทำงานของซิมพาเทติกที่มีผลทำให้ความดันเพิ่มสูงขึ้น (Radaelli et al., 1996) บางการศึกษาพบว่า การออกกำลังกายช่วยให้ผู้ป่วยเบาหวาน หัวใจและหลอดเลือด ระบบประสาทมีอาการดีขึ้น. (Howorka et al., 1997; Svacinová et al., 2001; Frattola et al., 1997; Soška et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าคนผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และการเกิดภาวะน้ำตาลต่ำในผู้ป่วยเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการทำลายระบบหัวใจและหลอดเลือดและทำให้สูญเสียการทำงานของระบบดังกล่าว (Gerstein et al., 2008; Patel et al., 2008; Duckworth et al., 2009) โดยภาวะน้ำตาลต่ำนั้นจะไปกระตุ้นให้ระบบ renin-angiotensin-aldosterone ทำงานเพิ่มมากขึ้น หลอดเลือดชั้นในสูญเสียหน้าที่ การทำงานของบารอรีเฟล็กซ์ลดลง และมีการกระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติกให้ทำงานมากขึ้นด้วย (Adler et al., 2010; Joy et al., 2015; Hoffman et al., 1994; Limberg et al., 2014). นอกจากนี้การออกกำลังกายยังสามารถป้องกันการเกิด metabolic syndrome ได้ด้วย แต่กลไกในการป้องกันนั้นยังไม่ชัดเจน (Kleitton Augusto dos Santos Silva et al 2012; Moraes-Silva IC et al, 2013)

เนื่องจากยังไม่มีผู้ทำการศึกษาการป้องกันการเกิดโรคตั้งแต่เนิ่นๆโดยการให้ทอรินเสริมตั้งแต่ช่วงแรกของชีวิตร่วมกับการออกกำลังกายที่ผู้วิจัยที่สนใจและมุ่งมั่นเพื่อหาการป้องกันการเกิดโรคตั้งแต่เนิ่นๆในกลุ่มที่มีโอกาสเสี่ยงเป็นโรคดังกล่าว



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการวิจัย

3.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์วิสตาเรพซัสและเพคเมียน้ำหนัก 250-300 กรัม ถูกเลี้ยงในหน่วยสัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยรักษาค่าความชื้น ($60 \pm 5\%$), อุณหภูมิ ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) หนูอยู่ในที่มืดและสว่างสลับกันทุก 12 ชั่วโมง หนูทุกตัวจะได้รับอาหารและน้ำแบบอิสระ หนูเพศเมียจะถูกแบ่งออกเป็นสองกลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยฉีด streptozotocin 1 ขนาดเข้าทางช่องท้อง (50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ตามด้วย 20 เปอร์เซ็นต์กลูโคสละลายในน้ำสะอาดภายใน 24 ชั่วโมงหลังฉีดเพื่อป้องกันการตายของหนูเบาหวานจากภาวะน้ำตาลต่ำ (hypoglycemia) สามวันถัดมาทำการวัดค่าน้ำตาลเพื่อยืนยันผลการเป็นเบาหวานโดยหนูที่มีค่าน้ำตาลในช่วง 280-350 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร จะถูกนำมาผสมพันธุ์กับเพศผู้จนตั้งครรภ์ เมื่อตั้งครรภ์แม่หนูจะถูกแยกกรงนำมาเลี้ยงเดี่ยวและถูกแบ่งเพื่อเลี้ยงด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ทอรีนละลายในน้ำสะอาด และกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยน้ำสะอาด หนูเพศเมียอีกกลุ่มเป็นกลุ่มที่ไม่เป็นเบาหวาน จะถูกนำมาผสมพันธุ์กับเพศผู้จนตั้งครรภ์ เมื่อตั้งครรภ์แม่หนูจะถูกแยกกรงนำมาเลี้ยงเดี่ยวและถูกแบ่งเพื่อเลี้ยงด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ทอรีนละลายในน้ำสะอาดและกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยน้ำสะอาดเช่นกัน แม่หนูทุกกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ทอรีนละลายในน้ำสะอาดและกลุ่มที่ถูกเลี้ยงด้วยน้ำสะอาดจะถูกเลี้ยงไปจนกระทั่งลูกหนูหย่านม หลังหย่านมลูกหนูเพศผู้จะถูกเลี้ยงด้วยอาหารและน้ำปกติจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองเมื่อลูกหนูอายุครบ 16 สัปดาห์

3.1.2 การออกกำลังกาย

ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับการออกกำลังกายจะเริ่มออกกำลังกายตั้งแต่หลังการหย่านมเมื่อหนูอายุ 4 สัปดาห์ ออกกำลังทุกวันโดยการว่ายน้ำในอ่างทรงกระบอกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางและความสูง 60 และ 100 เซนติเมตร ตามลำดับ อุณหภูมิในอ่างประมาณ 36 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ โดยสัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 11 ให้อ่างน้ำเป็นเวลา 15 นาทีต่อวัน ว่ายน้ำสัปดาห์ละ 5 วัน ในสัปดาห์ที่ 12 ให้อ่างน้ำ 1 ชั่วโมงต่อวัน ว่ายน้ำสัปดาห์ละ 3 วัน (Santos et al., 2010).

ลูกหนูทุกกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับน้ำสะอาด (C)

กลุ่มที่ 2 หนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาด

(T)

กลุ่มที่ 3 หนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้รับน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (Ex)

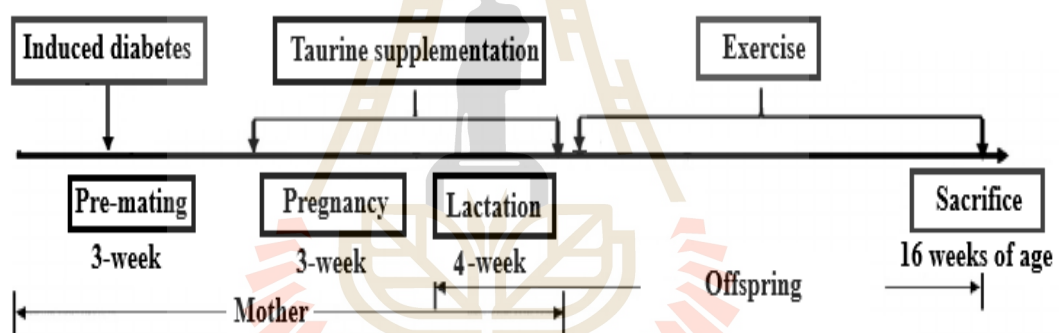
กลุ่มที่ 4 คือกลุ่มหนูที่เกิดจากแม่ที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (TEx)

กลุ่มที่ 5 หนูที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับน้ำสะอาด (DM)

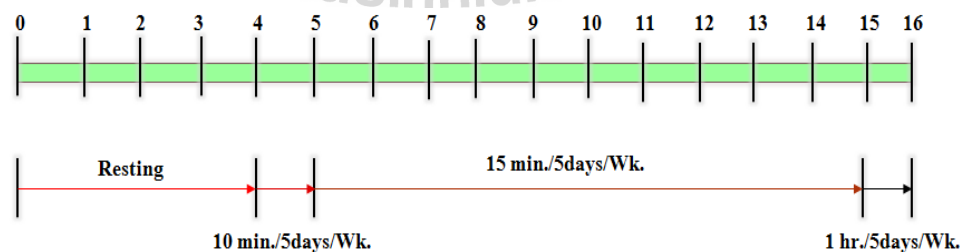
กลุ่มที่ 6 หนูที่เกิดจากแม่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาด (DMT)

กลุ่มที่ 7 หนูที่เกิดจากแม่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานได้รับน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (DMEx)

กลุ่มที่ 8 หนูที่เกิดจากแม่ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับ 3% ทอรีนผสมในน้ำสะอาดร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEx)



รูปที่ 1 แสดงช่วงเวลาการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนและช่วงเวลาการออกกำลังกายในสัตว์ทดลอง

3.1.3 การออกแบบการทดลอง

เมื่อเลี้ยงครบ 16 สัปดาห์หนูจะถูกเจาะเลือดที่หางเพื่อนำไปตรวจค่าน้ำตาลและอินซูลิน สองวันถัดมา หนูจะถูกวางยาสลบด้วยการฉีด thiopental เข้าช่องท้อง ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เพื่อทำการใส่สายสวนเข้าในหลอดเลือดดำและแดงบริเวณโคนขา หลังจากนั้น 1 วันถัดมา หนูจะถูกนำมาวัดความดันเลือดแดงและทดสอบความไวของบารอริเซ็ปเตอร์ ด้วยการฉีด phenylephrine (เพิ่มความดันเลือดแดง) เมื่อความดันเลือดกลับเข้าสู่ระดับปกติฉีด sodium nitroprusside (ลดความดันเลือดแดง) ตามลำดับ บันทึกผลการทดลองโดย Power lab หลังจากนั้น หนูจะถูกนำมา perfusion ด้วย 4% paraformaldehyde และเก็บตับอ่อน ตับอ่อนจะถูก fixative ด้วย 4% paraformaldehyde เพื่อใช้ในการศึกษาจุลกายวิภาค เก็บหัวใจและไต เพื่อนำไปตรวจ Angiotensin II Receptor Type 1 Gene Expression

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

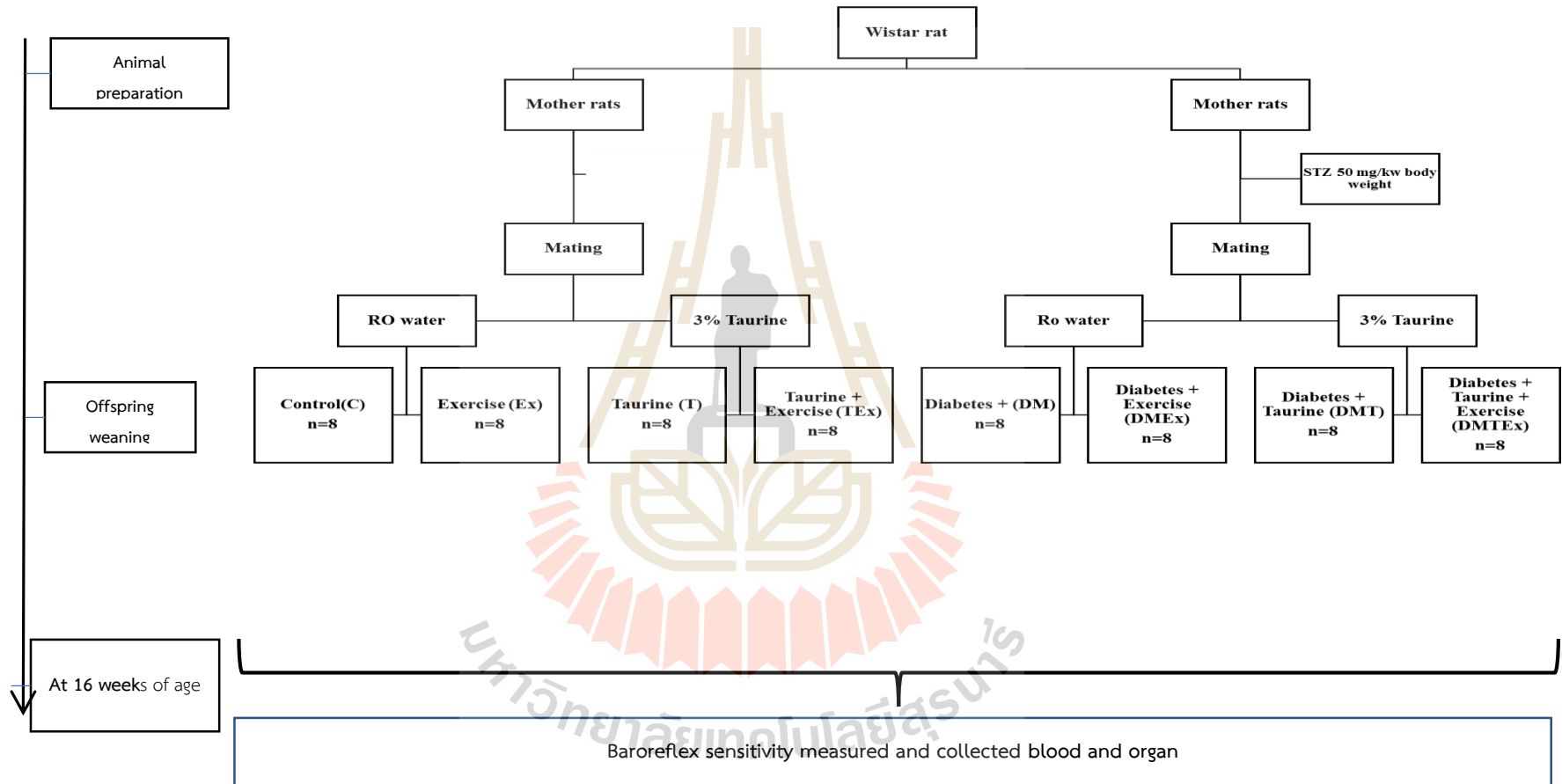
3.2.1 การผ่าตัดใส่สายสวนเข้าในหลอดเลือด

หนูจะถูกวางยาสลบด้วยการฉีด thiopental เข้าช่องท้อง ในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หลังจากนั้นโกนขนขา ตัดผิวหนังบริเวณโคนขา แยกกล้ามเนื้อต้นขาเพื่อจะหาตำแหน่งที่ใช้ในการสวนหลอดเลือดทั้งหลอดเลือดแดงและดำของต้นขา เมื่อพบหลอดเลือดแดงและดำของต้นขาแล้ว ใส่สายสวนที่ทำจากพอลิเอทิลีนขนาด 10 ที่เชื่อมต่อกับสายสวนขนาด 50 โดยนำท่อขนาด 10 สวนเข้าไปในหลอดเลือดเส้นละ 1 ท่อ ลึกประมาณ 2-3 เซนติเมตร ปลายท่อขนาด 50 เชื่อมต่อกับเครื่องปั๊มส่งน้ำสารเข้าสู่หลอดเลือดดำ ส่วนปลายสายท่อ 50 ที่สวนเข้าหลอดเลือดแดง เชื่อมต่อกับเครื่องวัดความเลือด ภายในท่อสายสวนบรรจุ 0.9% NaCl และเฮพาริน (Jespersen et al., 2012).

3.2.2 การวัดค่าความไวของบารอริเซ็ปเตอร์

หลังจากใส่สายสวน หนูจะถูกจัดทำให้อยู่ในท่านอนหงายและเจาะคอเพื่อใส่ท่อช่วยหายใจ ทำการยึดตรึงแขนและขาหนูให้เหยียดตรง เชื่อมต่อสายสวนที่ต้นขาหนูโดยสายที่สวนเข้าหลอดเลือดแดงเชื่อมกับเครื่องตัวแปลงสัญญาณความดันและ เครื่องบันทึกความดัน ส่วนสายสวนที่สวนเข้าหลอดเลือดดำ เชื่อมต่อกับเครื่องปั๊มแช่ เพื่อฉีดสารที่ใช้ทดสอบความไวของบารอริเซ็ปเตอร์ หนูจะถูกวัดอุณหภูมิ ภายตลอดการทดลองโดยวัดที่ก้นและมีการให้ความอบอุ่นกับหนูโดยอยู่ภายใต้หลอดไฟตลอดการวัดความเลือด การวัดความไวบารอริเซ็ปเตอร์นั้นเริ่มต้นจากการวัดความดันเลือดเพื่อได้ค่าพื้นฐานก่อน เมื่อค่าความดันนิ่งคงที่เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เริ่มฉีดสาร phenylephrine (เป็นสารเพิ่มความดันเลือดแดงมีฤทธิ์ไปกระตุ้น α -adrenergic receptor) เมื่อความดันเลือดกลับ

เข้าสู่ระดับปกติฉีด sodium nitroprusside (เป็นสารลดความดันเลือดแดงมีฤทธิ์ไปยับยั้งการหลั่งไนตริกออกไซด์) ตามลำดับ บันทึกผลการทดลองโดย Power lab การฉีด phenylephrine ให้ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อ saline 1 มิลลิลิตร ให้โดยสายสวนเชื่อมต่อกับ syringe pump ให้ในอัตรา 0.02 มิลลิลิตรต่อ 1 นาที นาน 2 นาที ระหว่างที่ฉีดสารนี้ความดันจะเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท รอจนกระทั่งค่าความดันลดลงอยู่ในระดับพื้นฐานจึงเริ่มฉีด sodium nitroprusside ขนาด 25 มิลลิกรัมต่อ saline 1 มิลลิลิตร ฉีดจนกระทั่งความดันลดลงจากค่าพื้นฐานประมาณ 20-30 มิลลิเมตรปรอท . วิธีการหาค่าความไวบารอรีเฟล็กซ์สามารถคำนวณได้โดยนำค่าเดลต้าของอัตราการเต้นของหัวใจหารด้วยค่าเดลต้าของความดันเลือดแดงเฉลี่ยระหว่าง ($\Delta HR/ \Delta BP$) ที่ความดันเพิ่มสูงขึ้นหรือลดลง การวิเคราะห์ข้อมูลต้องใช้โปรแกรม Chart 6 (Power Lab System, CA, USA). และต้องปิดเครื่องวัดความดันในขณะที่วิเคราะห์ข้อมูล



รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลอง

3.2.3 การวัดค่าเคมีในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลองหนูจะถูกเก็บเลือดโดยการเก็บที่หัวใจหลังจากนั้นจะนำไปปั่นแยกเก็บทั้งซีรัมและพลาสมา และนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส ส่งตรวจค่าเคมีต่างที่โรงพยาบาลมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดังนี้ triglyceride (TG), total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL), low-density lipoprotein cholesterol (LDL), Blood Urea Nitrogen (BUN), Creatinine (Cr), Alanine Aminotransferase (ALT) and Aspartate aminotransferase (AST) วัดโดยใช้วิธี automatic blood analyzer (Jeon and Kim, 2006; Yamamoto et al., 2000)

3.2.4 วัดระดับอินซูลิน

3.2.4.1 การเตรียมสิ่งส่งตรวจ

เลือดทั้งหมดถูกเก็บลงในหลอดทดลองที่ไม่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวทิ้งไว้ประมาณ 30 นาทีหลังจากนั้นนำไปปั่นที่ 2000 g นาน 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเลือดใส่หลอดทดลองเก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้

3.2.4.2 ขั้นตอนการทดสอบ

นำน้ำยาที่ต้องใช้ในการทดสอบตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนำ wash buffer มาทำให้เจือจางโดยเติมน้ำ de-ionized water (DW) ลงไป 450 มิลลิลิตร ทำการล้าง plate 3 รอบ ครั้งละ 300 ไมโครลิตร หลังจากนั้นหยด assay buffer (0.05 M phosphosaline pH 7.4, 0.025M EDTA, 0.08% sodium azide and 1% BSA) ลงในแต่ละ well จำนวน 10 ไมโครลิตร ตามด้วย matrix solution (Charcoal stripped pooled mouse serum) ลงใน blank standard and control wells จำนวน 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้น หยด insulin standards ลงใน appropriate wells จำนวน 10 ไมโครลิตร ตามด้วย duplicate 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นหยด Rat/Mouse insulin quality control 1 (QC1) และ Rat/Mouse insulin quality control 2 (QC2) ลงใน appropriate wells อย่างละ 10 ไมโครลิตร ขั้นตอนต่อไปหยด samples ลงไป well ละ 10 ไมโครลิตร ตามด้วย Detection Antibody (Pre-titered biotinylated anti-insulin antibody) จำนวน 80 ไมโครลิตร ปิด plate ด้วย plate sealer ตั้งบน orbital microtiter plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็ว 400 ถึง 500 rpm นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นดูดสารออกจาก wells และทำการล้างด้วย wash buffer 3 รอบ หลังจากดูดน้ำยาล้างออก

ให้เติม Enzyme Solution (Pre-titered streptavidin-horseradish peroxidase conjugate in buffer) ลงไปในแต่ละ wells จำนวน 100 ไมโครลิตร ปิด plate แล้วนำไปตั้งไว้บน microtiter plate shaker ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที หลังจากนั้นทำการล้างด้วย Wash Buffer 6 รอบ รอบละ 300 ไมโครลิตร ต่อ well หลังจากนั้นดูดน้ำยาล้างออกและเติม Substrate Solution (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine in buffer) ลงในแต่ละ well จำนวน 100 ไมโครลิตร นำไปวางบน plate shaker นาน 5-20 นาที จะเห็นการเปลี่ยนแปลงของสีเป็นสีฟ้า หลังจากนั้นหยุด stop solution (0.3M HCl) จำนวน 100 ไมโครลิตรและเขย่าเบาๆ สังเกตสีจะเปลี่ยนจากสีฟ้าไปเป็นสีเหลือง ขั้นตอนสุดท้ายนำ plate ไปอ่าน ในเครื่อง plate reader อ่านค่าในช่วง absorbance ที่ 450 nm และ 590 นาโนเมตร นาน 5 นาที (Tulin et al., 2012; Nakagawa et al., 2011; Zhen et al., 2011).

3.2.5 การศึกษาโครงสร้างของตับอ่อน

ตับอ่อนถูกเก็บหลังสิ้นสุดการทดลอง หลังแยกของจากตัวหนูจะทำการซังน้ำหนักและล้างตับอ่อนด้วย saline ทันทที และนำไปแช่ใน 4% paraformaldehyde. ในขั้นตอนการเตรียมตับอ่อนขึ้น block จะต้องนำตับอ่อนไป fixed และทำให้สูญเสียน้ำ หลังจาก embedded ใน paraffin blocks เรียบร้อยแล้ว นำ paraffin ไปตัดเป็นชิ้นบางๆ ขนาด 4 ไมโครมิเตอร์ โดย rotary microtome. ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดจะนำไปย้อมด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ชิ้นเนื้อที่ถูกตัดจะถูกนำไปแช่ใน xylene เพื่อล้างเอาพาราฟินออกหลังจากนั้นจะถูกเติมน้ำด้วยการแช่แอลกอฮอล์ไล่ระดับความเข้มข้นจาก 100 ไป 70 เปอร์เซ็นต์และน้ำ ตามด้วยการย้อมด้วย hematoxylin นาน 3-5 นาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาดจนกระทั่งเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงิน ตามด้วย 1% acid alcohol (1% HCl in 70% alcohol) นาน 5 mins แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าอีกครั้งจนกระทั่งเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอีกหลังจากนั้นนำไปจุ่มใน alkaline solution เช่น ammonia water ตามด้วยน้ำเปล่าและนำไปย้อมใน 1% eosin Y นาน 10 นาที ตามด้วยการล้างด้วยน้ำสะอาดอีกครั้งนาน 1-5 นาที ขั้นตอนต่อไปทำให้ section นั้น ขาดน้ำ โดยการแช่ลงในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นสูง ขั้นตอนสุดท้าย samples mount ใน mounting media (Rahier et al., 2008; Longnecker, 2014). และนำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ islet of Langerhans สามารถคำนวณได้จากแต่ละ section และใช้รูป 10 microscopic fields จำนวนเปอร์เซ็นต์ของ islet of Langerhans สามารถคำนวณได้ดังสูตรนี้

$$\text{Percentage of number islet of Langerhans} = \frac{\text{number islet of Langerhans}}{\text{Total number islet of Langerhans}} \times 100$$

3.2.6 การวัดการแสดงออกของจีน AT1 receptor

3.2.6.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำเนื้อเยื่อของหัวใจและไตถูกแช่ใน liquid nitrogen ก่อนนำไปเก็บไว้ในตู้แช่ - 20°C มาทำการบดเพื่อให้มีขนาดเล็กลงในน้ำยา phosphatase inhibitor (cocktail 1:100, 100mM NaF 1:100, 100mM NaV₂O₅ 1:100, 500mM β-glycophosphate 1:100 และ RIPA (50mM Tris-base PH 8.0, 150 mM NaCl PH 8.0, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS). ระหว่างที่บดในน้ำยาต้องทำในน้ำแข็งหรือที่เย็นหลังบดเสร็จจุด sample หลอดเติมไปใส่ในหลอดใหม่แล้วนำไปปั่นที่ 12,000 g นาน 20 นาที หลังจากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนที่ลอยอยู่เหนือตะกอนมาใส่ในหลอดใหม่ปริมาณ 2-5 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าปริมาณโปรตีน ในเครื่อง microplate reader และคำนวณหาปริมาณโปรตีน หลังจากนั้นนำ sample ที่ต้องใช้ทั้งหมดไปใส่ในหลอดใหม่แล้วหยด RIPA (50mM Tris-base PH 8.0, 150 mM NaCl PH 8.0, 0.5% DOC, 1% NP-40, 0.1% SDS) และ mixed with dye (1:5) ผสมให้เข้ากันด้วย vortex หลังจากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที และรอให้เย็นเพื่อนำไป run gel ในขั้นตอนต่อไป

3.2.6.2 การเตรียมเจลสำหรับรันโปรตีน

เตรียม 10 เปอร์เซ็นต์เจล Persulfate (Ammonium Persulfate 30 mg, H₂O 270 μl) ใช้เป็นเจลส่วนล่าง (Lower gel) เตรียมโดยการผสม 12% gel (DDW 4.3 ml, 40% acrylamide 3.0 ml) กับ Lower buffer ปริมาตร 2.6 มิลลิลิตร (1.5M Tris base pH 8.8 18.16 g, 0.4% SDS 0.4 g, DDW 100 ml), Persulfate 0.20 ml, TEMED 0.004 mL) ปริมาตรโดยรวมทั้งสิ้น 100 มิลลิลิตร หลังจากนั้นหยด lower gel ลงใน block และตามด้วย isopropanol เพื่อกำจัดฟองอากาศ ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อให้เจลแข็งตัว หลังจากนั้นล้างเจลด้วยน้ำสะอาด 3 รอบ ขั้นตอนต่อไปเตรียมเจลส่วนบน (upper gel) 5 เปอร์เซ็นต์ (DDW 3.1 ml, 40% acrylamide 0.62 ml,

Upper buffer 1.26 ml (0.5 M Tris base pH 8.8 6.055 g, 0.4% SDS 0.4 g, DDW 100 ml), Persulfate 50 μ l,) ปริมาตรโดยรวมทั้งสิ้น 5 มิลลิลิตร นำไปหยดลงเหนือเจลส่วนล่าง หลังจากนั้นเสียบหัวลงเหนือเจลรอจนกระทั่งเจลแข็งตัว ขั้นตอนสุดท้ายดึงหัวออกจากเจลและหยอด sample ลงในหลุมตามร่องหัวประมาณหลุมละ 5 ไมโครลิตร ทำการเปิดระบบไฟฟ้ารันเจลด้วยกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์

3.2.6.3 ขั้นตอนการขนถ่าย (transfer) AT1

เตรียมฟองน้ำ กระดาษกรอง กระดาษขนถ่าย (transfer paper polyvinylidene difluoride ,PVDF) แขนให้เปียกชุ่มใน transfer buffer (Glycine 14.4 g, Trizma base 3.03 g, DW 800 ml, Methanol 200 ml). นำทั้งหมดที่กล่าวข้างต้นมาประกบกันคล้ายกับแซนวิชนำไปวางใน black/red holder เรียงลำดับจาก cassette สีดำไปยังด้าน cassette สีแดง ดังนี้ ฟองน้ำ กระดาษกรอง เจล membrane paper (PVDF) ฟองน้ำ ตามลำดับ หลังจากนั้นนำ holder ไปวางไว้ในกล่องที่บรรจุ น้ำยา transfer buffer และ ice pack และเปิดสวิทช์เครื่อง transfer ที่ 100 โวลต์ นาน 1 ชั่วโมง ระหว่างที่รอไปทำการเตรียม milk blocking solution (150 ml/membrane: PBS pH7.4 150 ml, non-fat dry milk 7.5 g, 0.1% Tween 150 μ l) ผสมสารให้เข้ากันด้วย stirring bar เมื่อครบกำหนดเวลา 1 ชั่วโมง นำ holder มาแกะเพื่อนำเอา membrane paper มา stain ใน Ponceau นาน 1 นาที หลังจากนั้นทำการล้างด้วย DW และตัดกระดาษ membrane ให้มีขนาดเล็กและเหมาะกับ plastic container หลังตัดเสร็จนำกระดาษไปแช่ใน plastic container ที่บรรจุ milk blocking solution ปริมาณ 10 ml และนำกล่องดังกล่าวไปวางบน rocker ปรับความเร็วที่ระดับ 4 ทำการเปลี่ยน milk blocking solution ทุกๆ 15 นาที ใน 1 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนด 1 ชั่วโมง ให้เติม antibody (Rabbit Anti-AT₁ receptor affinity purified polyclonal antibody: 1:500, AB15552-50UL, Millipore, USA) ลงใน milk solution และบ่มไว้บน rocker ด้วยความเร็วระดับ 2 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืน ขั้นตอนถัดไป ล้าง membrane ด้วย milk solution ทุกๆ 15 นาที นาน 45 นาที ตามด้วย tris-buffered saline (TBS) (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl) ทุกๆ 15 นาที นาน 30 นาที ระหว่างนี้ทำการเตรียม Chemiluminescent reagent 1X ECL reagent (12630, Cell Signaling Technology, USA) โดย diluting one-part 2X reagent A and part 2X reagent B (for 10 ml, add 5 ml Reagent A and 5 ml reagent B) และผสมให้เข้ากัน เมื่อล้างด้วย TBS solution ครบ 30 นาทีแล้ว ให้ดูดน้ำยาล้างทิ้งไป และหยด chemiluminescent reagent ลงใน transfer membrane ทิ้งไว้ 1 นาที หลังจากนั้นนำกระดาษนี้ไปวางในเครื่อง develop box เพื่อถ่ายภาพ

3.2.6.4 ขั้นตอนการขนถ่าย actin

ใช้ membrane เดิม จากการทำ AT1 มาวางลงบน rectangular plastic container และทำการล้างโดยเติม milk blocking solution ลงไป 10 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปวางบน rocker ปรับความเร็วไปที่ระดับ 4 ทำการเปลี่ยน milk blocking solution ทุกๆ 15 นาที นาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาให้เท milk blocking solution ที่ทิ้ง ขั้นตอนต่อไปเติม Anti-Actin (Monoclonal: 1:500, MAB1501, Millipore, USA) และ milk blocking solution แล้วนำไปวางลงบน rocker ปรับความเร็วที่ระดับ 2 และบ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 2 ชั่วโมง ขั้นตอนต่อไปเท milk blocking solution ที่ทิ้ง และล้าง transfer membrane ด้วย TBS (25mM Tris pH 7.5, 150mM NaCl) 3 ครั้ง ครั้งละ for 3-5 นาที หลังจากนั้นเติม TBS with milk solution ลงใน transfer membrane ตามด้วย secondary antibody (A goat anti-mouse IgG (H+L) HRP conjugated, 1: 5,000: AP124P, Millipore, USA) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 60 นาที เมื่อครบกำหนดทำการล้าง transfer membrane ด้วย TBS 3 ครั้ง ครั้งละ 3-5 นาที ขั้นตอนสุดท้ายเป็นการถ่ายภาพโดยใช้ chemiluminescent reagent ในการตรวจ band ของ actin. การวิเคราะห์ความหนาแน่นการ แสดงออกของจีน angiotensin II type 1 (AT₁) ใช้โปรแกรม image J ในแต่ละ band จะทำการสุ่ม 5 พื้นที่ เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความหนาแน่นของ band การทดลองจะถูกทดสอบซ้ำจาก 5 sample ที่ไม่ซ้ำกัน ความหนาแน่นจะถูกทดสอบทางสถิติ ด้วยค่า mean \pm S.D. การเปรียบเทียบค่า means ระหว่าง กลุ่ม จะถูกทดสอบโดย one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Duncan's multiple range test. ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญค่า p- values น้อยกว่า 0.05 (P<0.05)

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

รายงานผลเป็นค่า mean \pm SD และนำข้อมูลมาวิเคราะห์สถิติระหว่างกลุ่มโดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย *post hoc* Duncan's Multiple Range test (StatMost32 version 3.6, Dataxiom, CA, USA). กำหนดความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P<0.05

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 น้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะและค่าเคมี

หนูเพศผู้อายุ 16 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวของหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (384 ± 15.27 versus 357 ± 7.55 , $P \leq 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ออกกำลังกายกับหนูที่ไม่ออกกำลังกายพบว่าหนูที่ออกกำลังกายทั้งหมดมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูที่ไม่ออกกำลังกาย นอกจากนี้ยังพบว่าค่าน้ำหนักหัวใจและไตในหนูที่ออกกำลังกายมีน้ำหนักมากกว่าหนูที่ไม่ออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 1)

ค่าน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดพบว่าในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) มีค่านี้มากกว่าหนูที่แม่ไม่ได้เป็นเบาหวาน (C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (116.1 ± 12.30 versus 82.5 ± 6.04 , $P \leq 0.05$) ส่วนค่าพลาสมาอินซูลินนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (7.2 ± 1.81 versus 10.1 ± 13.00 , $P \leq 0.05$) ในทางกลับกัน ค่าน้ำตาลในเลือดและไตรกลีเซอไรด์กลับลดลงในกลุ่มที่ออกกำลังกายเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างของคอเลสเตอรอลระหว่างกลุ่ม ส่วนค่า HDL นั้น ในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) มีค่าต่ำกว่าหนูที่แม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) อย่างมีนัยสำคัญ (51.7 ± 6.20 versus 62.0 ± 3.89 , $P \leq 0.05$). แต่ในทางกลับกันจากการทดลองพบว่าค่า LDL มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเทียบกับหนูที่แม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (122.0 ± 15.91 versus 106.6 ± 5.50 , $P \leq 0.05$) (ตารางที่ 2). ระดับ HDL เพิ่มขึ้นแต่ LDL ลดลงในหนูที่ออกกำลังกาย

ค่า ยูเรีย ไนโตรเจน ในเลือด (BUN) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเทียบกับหนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (23.1 ± 3.60 versus 25.1 ± 1.40 , $P \leq 0.05$) ส่วนครีเอตินินนั้นไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ส่วนค่าเอนไซม์จากตับ SGOT สูงขึ้นแต่ SGPT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่แม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (106.3 ± 9.91 versus 134.8 ± 15.18 , $P \leq 0.05$) (33.5 ± 6.40 versus 44.7 ± 7.10 , $P \leq 0.05$) ตามลำดับ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่า SGOT and SGPT เพิ่มขึ้น ในหนูที่แม่ไม่ได้เป็นเบาหวานแล้วได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (TEX)

ตารางที่ 1 น้ำหนักตัว หัวใจและไต

Treatment	Body weight (g)	Heart weight (g)	Kidney weight (g)	HW/BW (%)	KW/BW (%)
C	384 ± 15.27 ^a	1.29 ± 0.09 ^b	1.38 ± 0.13 ^a	0.34 ± 0.02 ^d	0.36 ± 0.04 ^b
T	386 ± 19.80 ^a	1.29 ± 0.09 ^b	1.27 ± 0.10 ^b	0.34 ± 0.01 ^d	0.33 ± 0.01 ^c
DM	357 ± 7.55 ^b	1.33 ± 0.09 ^b	1.15 ± 0.08 ^c	0.37 ± 0.03 ^c	0.32 ± 0.02 ^c
DMT	347 ± 14.63 ^b	1.30 ± 0.11 ^b	1.14 ± 0.08 ^c	0.38 ± 0.03 ^c	0.33 ± 0.02 ^c
Ex	322 ± 3.70 ^c	1.42 ± 0.01 ^a	1.37 ± 0.04 ^a	0.44 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.01 ^a
TEx	313 ± 4.70 ^{cd}	1.43 ± 0.01 ^a	1.38 ± 0.05 ^a	0.46 ± 0.03 ^{ab}	0.44 ± 0.01 ^a
DMEx	298 ± 4.34 ^e	1.37 ± 0.01 ^{ab}	1.30 ± 0.03 ^{ab}	0.46 ± 0.01 ^{ab}	0.44 ± 0.03 ^a
DMTEx	304 ± 5.02 ^{de}	1.42 ± 0.01 ^a	1.36 ± 0.01 ^a	0.47 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.02 ^a

แสดงค่า mean ± SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม (P<0.05). (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย).

ตารางที่ 2 ค่าเคมีในเลือด

Treatment	Fasting blood sugar (mg/dl)	Insulin level (ng/ml)	Triglyceride (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)
C	82.5 ± 6.04 ^c	10.1 ± 13.00 ^{ab}	130.0 ± 14.45 ^b	80.3 ± 13.84 ^a	62.0 ± 3.89 ^b	106.6 ± 5.50 ^b
T	82.4 ± 3.34 ^{cd}	14.5 ± 3.41 ^{ab}	124.5 ± 11.60 ^b	77.8 ± 9.53 ^a	60.6 ± 4.74 ^b	105.6 ± 8.89 ^b
DM	116.1 ± 12.30 ^a	7.2 ± 1.81 ^c	166.6 ± 19.80 ^a	85.2 ± 18.79 ^a	51.7 ± 6.20 ^c	122.0 ± 15.91 ^a
DMT	85.3 ± 4.51 ^c	10.7 ± 2.61 ^{bc}	132.6 ± 19.20 ^b	80.2 ± 15.30 ^a	61.5 ± 4.14 ^b	102.0 ± 9.65 ^b
Ex	76.6 ± 7.60 ^d	16.0 ± 5.23 ^a	121.0 ± 10.50 ^b	82.2 ± 10.60 ^a	74.1 ± 7.07 ^a	103.7 ± 7.40 ^b
TEx	77.8 ± 8.01 ^d	15.6 ± 5.12 ^a	121.6 ± 10.80 ^b	84.1 ± 9.40 ^a	74.0 ± 6.78 ^a	106.0 ± 7.70 ^b
DMEx	92.6 ± 5.02 ^b	14.5 ± 4.11 ^{ab}	123.0 ± 6.70 ^b	90.7 ± 13.90 ^a	75.0 ± 8.51 ^a	108.3 ± 15.30 ^b
DMTEX	81.1 ± 5.80 ^{cd}	14.6 ± 5.41 ^{ab}	120.0 ± 11.60 ^b	83.5 ± 9.10 ^a	76.7 ± 10.56 ^a	102.0 ± 11.70 ^b

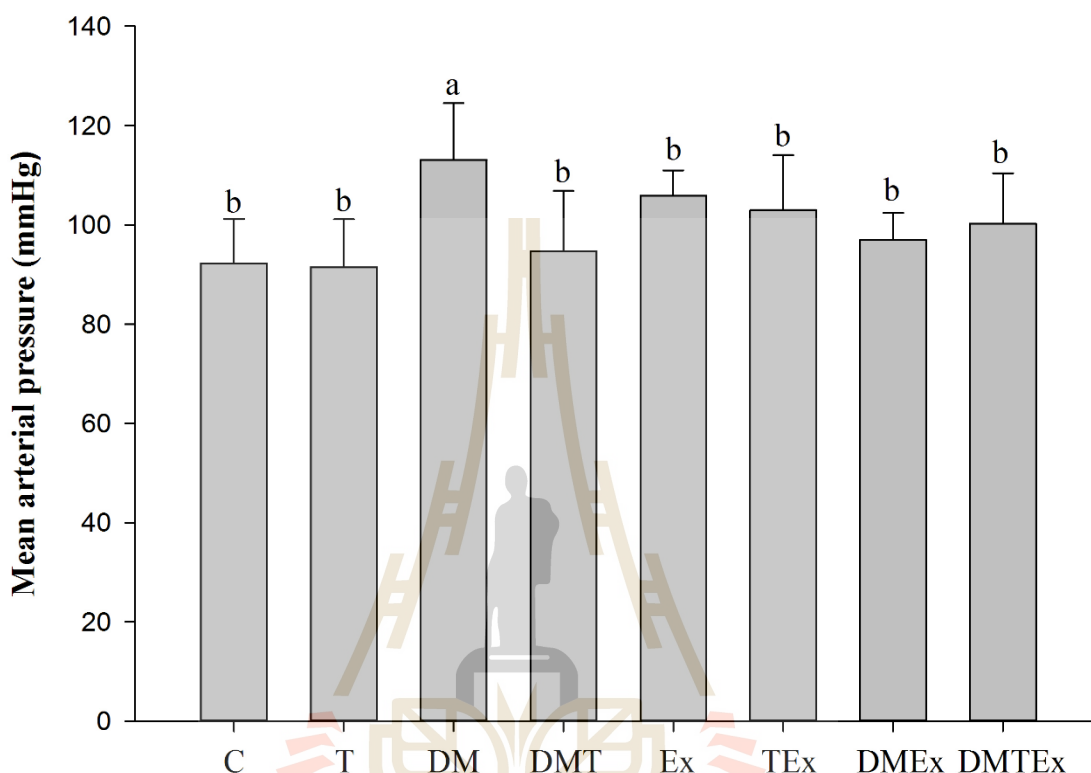
แสดงค่า mean ± SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P \leq 0.05$) (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม). (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEX, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย) (HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein).

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย ไตโตรเจน ครีเอตินีน SGOT และ SGPT

Treatment	Blood Urea Nitrogen (mg/dl)	Serum creatinine (mg/dl)	SGOT (μ /l)	SGPT (μ /l)
C	25.1 \pm 1.40 ^{ab}	0.45 \pm 0.11 ^a	134.8 \pm 15.18 ^a	44.7 \pm 7.10 ^a
T	24.7 \pm 1.80 ^{ab}	0.43 \pm 0.10 ^a	142.1 \pm 15.68 ^a	41.8 \pm 6.70 ^b
DM	23.1 \pm 3.60 ^c	0.41 \pm 0.11 ^a	106.3 \pm 9.91 ^b	33.5 \pm 6.40 ^c
DMT	25.1 \pm 1.91 ^{ab}	0.41 \pm 0.08 ^a	134.3 \pm 14.90 ^a	35.8 \pm 7.10 ^c
Ex	26.2 \pm 2.31 ^a	0.49 \pm 0.11 ^a	133.7 \pm 14.00 ^a	50.6 \pm 8.70 ^a
TEx	26.1 \pm 1.92 ^a	0.40 \pm 0.13 ^a	143.0 \pm 12.70 ^a	45.2 \pm 6.41 ^a
DMEx	23.3 \pm 3.20 ^{ab}	0.39 \pm 0.12 ^a	125.1 \pm 9.50 ^a	44.7 \pm 6.90 ^a
DMTEx	24.7 \pm 3.20 ^{ab}	0.43 \pm 0.07 ^a	135.8 \pm 10.60 ^a	41.5 \pm 6.61 ^b

แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

4.2 ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและความไวของบารอรีเฟล็กซ์



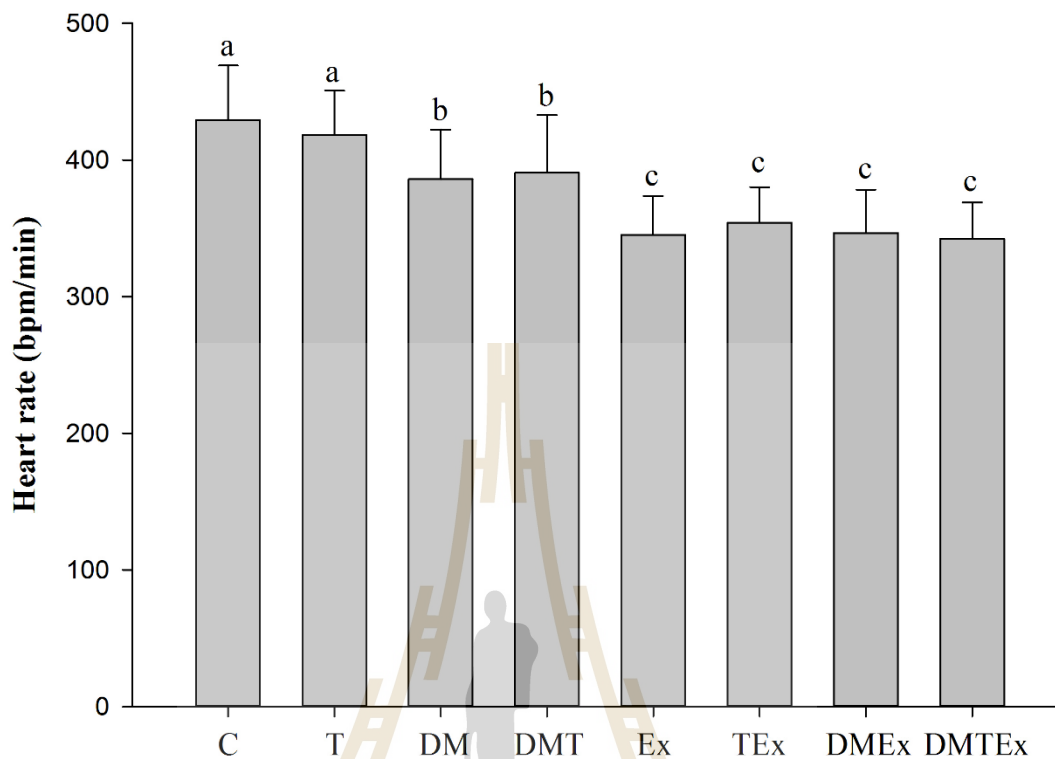
รูปที่ 4 ค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP) ในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) มีค่าสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติ การได้ทอรีนเสริมและการออกกำลังกายสามารถรักษาค่าความดันให้ไม่สูงขึ้นได้จากข้อมูลจะพบว่าในกลุ่มที่ได้รับทอรีนเสริมและการออกกำลังกายช่วยควบคุมความดันเลือดได้ ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่ออกกำลังกายกับกลุ่มที่ออกกำลังกายพบว่าในกลุ่ม

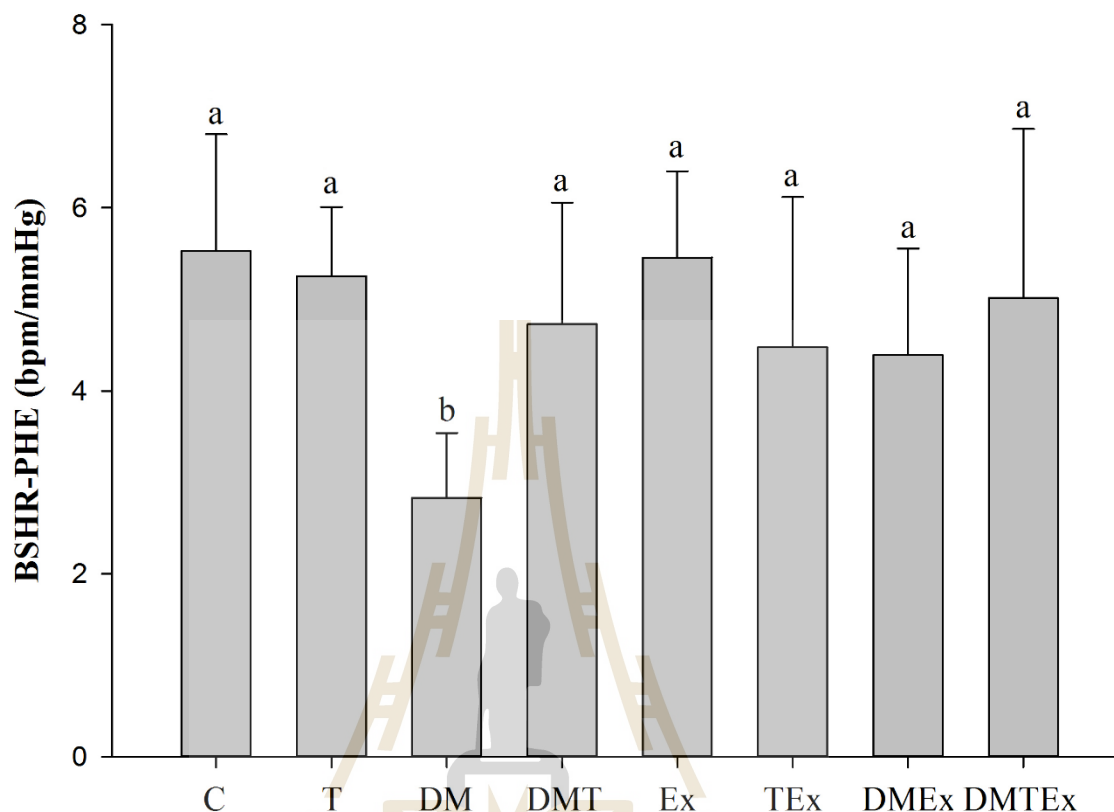
ที่ออกกำลังกายมีอัตราการเต้นของหัวใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) และกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวานแล้วได้รับทอรีนเสริม (DMT) ในทางตรงกันข้ามในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEX) นั้นพบว่ามีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและอัตราการเต้นของหัวใจลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ออกกำลังกาย (DMT)

ส่วนค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยความไวของบารอรีเฟล็กซ์ เมื่อได้รับทั้ง phenylephrine (PHE) และ sodium nitroprusside (SNP) ในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) พบว่ามีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่ม ในทางตรงกันข้ามเมื่อได้รับทอรีนเสริมในระยะเริ่มแรกของชีวิตมีผลช่วยลดผลข้างเคียงจากการที่มีแม่เป็นเบาหวานได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อค่าพารามิเตอร์การไหลเวียนผลที่ได้ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าความไวของบารอรีเฟล็กซ์จะพบว่าในกลุ่มที่ออกกำลังกายจะมีความไวสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ออกกำลังกาย

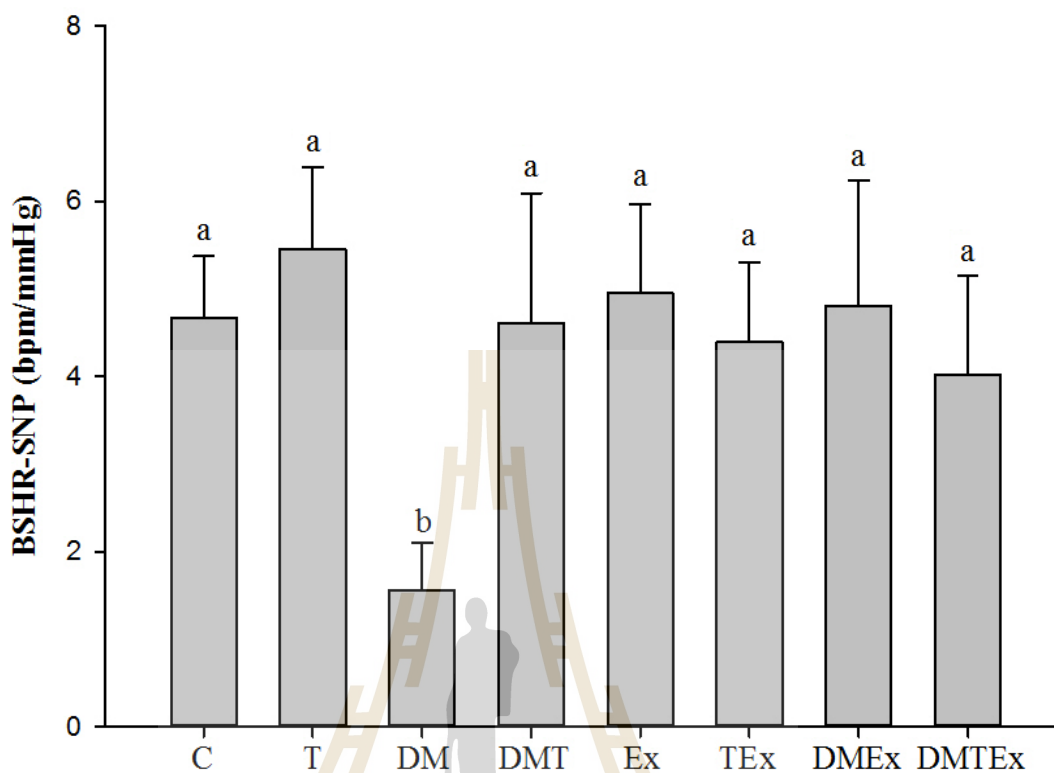




รูปที่ 5 อัตราการเต้นของหัวใจ แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

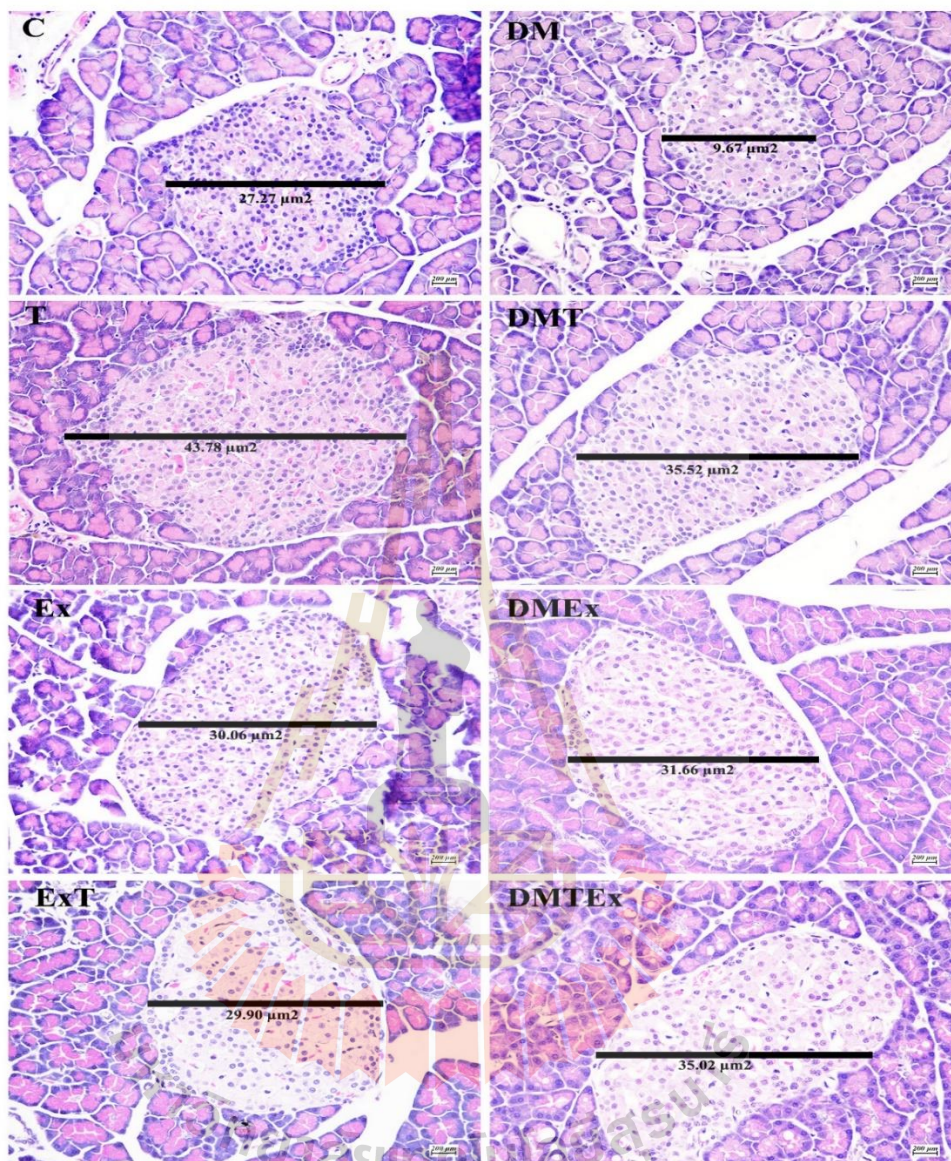


รูปที่ 6 ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่ตอบสนองต่อ phenylephrine. แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)



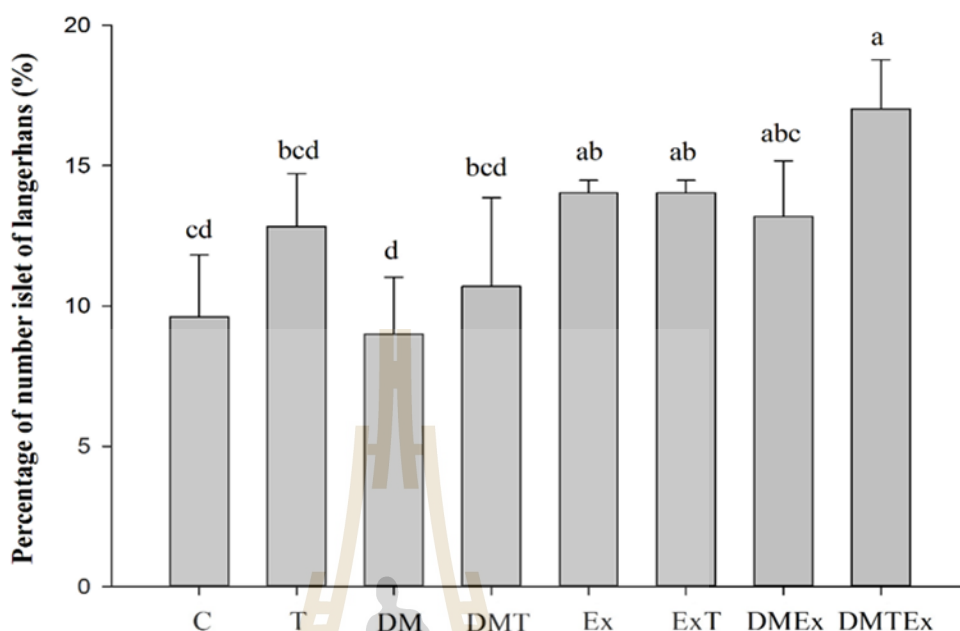
รูปที่ 7 ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ต่ออัตราการเต้นของหัวใจที่ตอบสนองต่อ sodium nitroprusside แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

4.4 ขนาดของ Islet of Langerhans ในตับอ่อน



รูปที่ 8 Islet of Langerhans ของตับอ่อนยอม H&E. Scale Bars = 200 μm

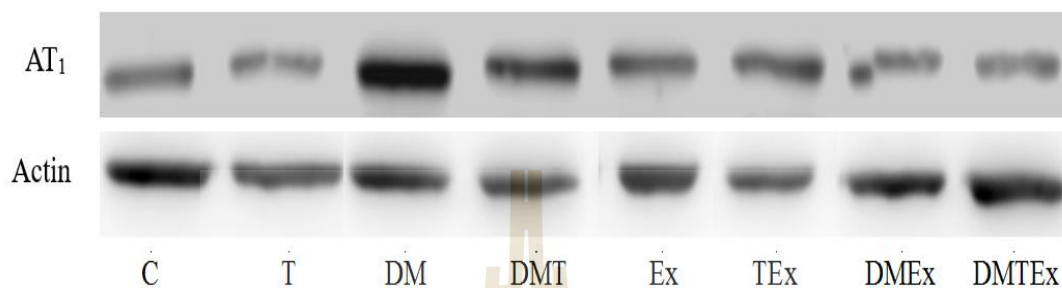
Islet of Langerhans ของตับอ่อนยอม H and E (รูปที่ 8) พบว่าหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานมีขนาดของ Islet of Langerhans เล็กกว่ากลุ่มอื่นๆ (9.67 versus 27.27 μm^2). แต่ในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม หรือได้ออกกำลังกาย ขนาดของ Islet of Langerhans เพิ่มขึ้น



รูปที่ 9 เปอร์เซนต์จำนวนของ Islet of Langerhans แสดงค่า mean \pm SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P < 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TE, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTE, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

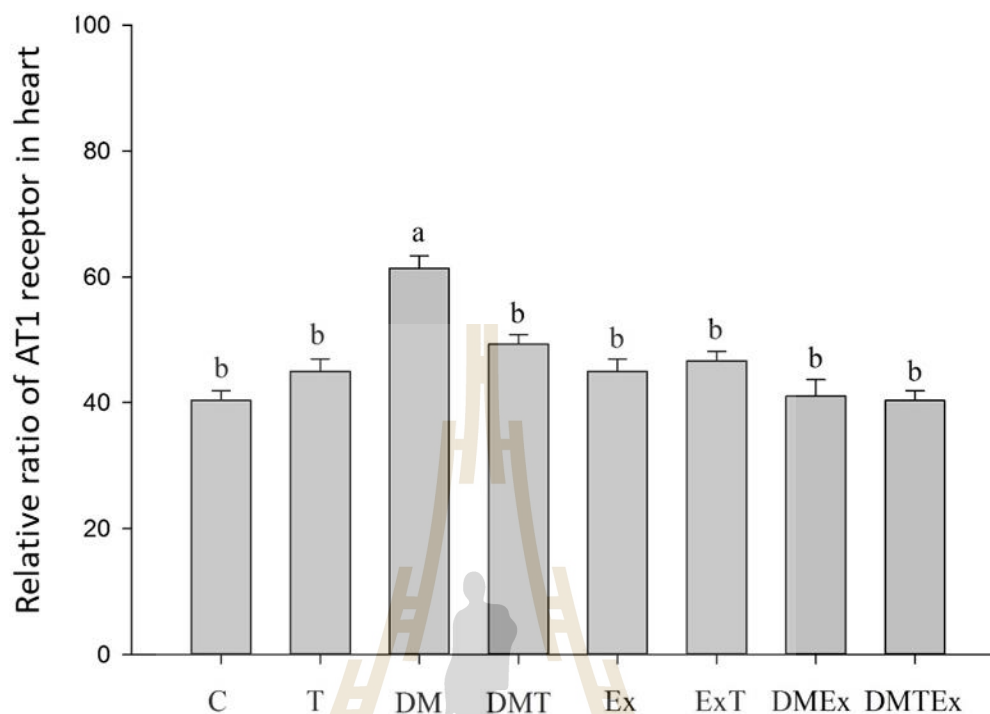
เปอร์เซนต์จำนวนของ Islet of Langerhans ไม่พบความแตกต่างในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวานเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้ทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย พบว่ามี เปอร์เซนต์จำนวนของ Islet of Langerhans สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น

4.5 การแสดงออกของ AT₁ receptor ในหัวใจและไต

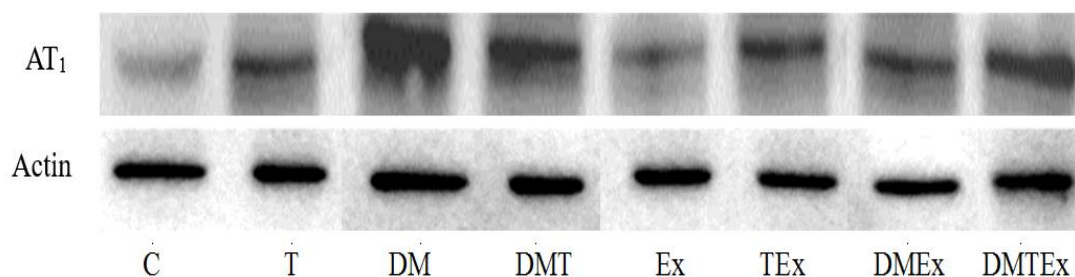


รูปที่ 10 การแสดงออกของ AT₁ receptor ในหัวใจ

อัตราส่วนสัมพันธ์ของ Percentages expression of AT₁ receptor ในหัวใจพบว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) มีการแสดงออกมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($61.33 \pm 1.53\%$ versus $40.66 \pm 2.52\%$, $P < 0.05$). แต่อย่างไรก็ตามในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานเมื่อได้รับทอรีนเสริม (DMT) หรือออกกำลังกาย (DMEx) หรือได้รับทั้งทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEEx) พบว่าการแสดงออกของจิ้นต่ำกว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) อย่างเดียว

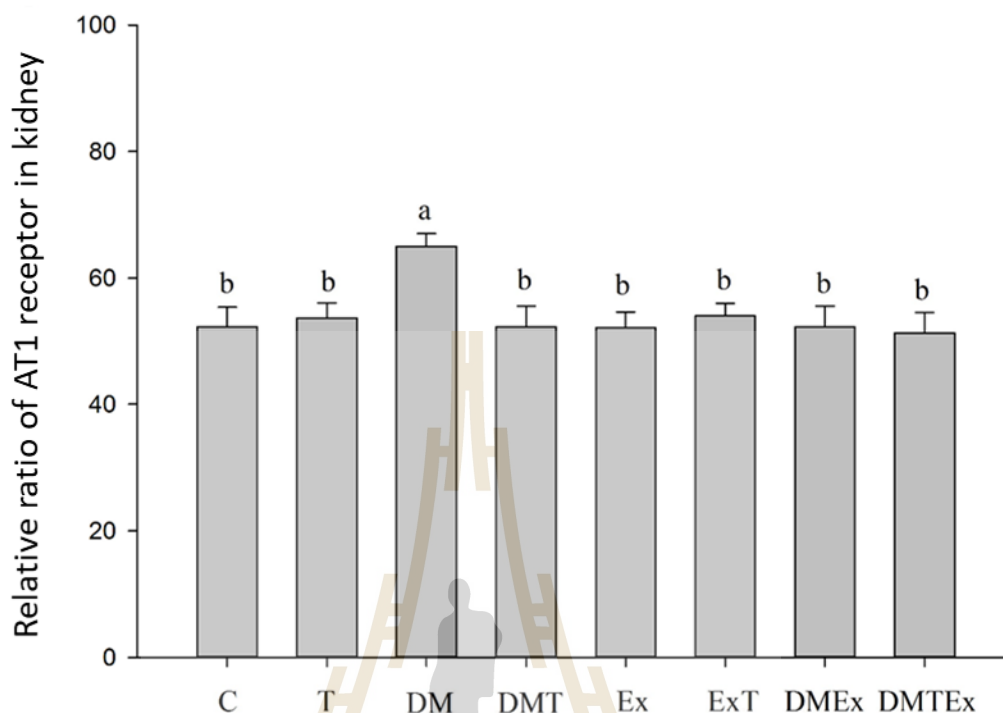


รูปที่ 11 อัตราส่วนสัมพัทธ์ของ AT₁ receptor ในหัวใจ แสดงค่า mean ± SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P \leq 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)



รูปที่ 12 การแสดงออกของ AT₁ receptor ในไต

อัตราส่วนสัมพันธ์ของ Percentages expression of AT₁ receptor ในหัวใจพบว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) มีการแสดงออกมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($65.05 \pm 2.53\%$ versus $41.94 \pm 1.78\%$, $P < 0.05$) แต่อย่างไรก็ตามในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานเมื่อได้รับทอรีนเสริม (DMT) หรือออกกำลังกาย (DMEEx) หรือได้รับทั้งทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEEx) พบว่าการแสดงออกของจิ้นต่ำกว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) อย่างเดียว



รูปที่ 13 อัตราส่วนสัมพัทธ์ของ AT₁ receptor ในหัวใจ แสดงค่า mean ± SD ในแต่ละกลุ่ม. การทดสอบ ANOVA ตามด้วย post hoc Duncan's multiple range test. ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างมีความนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม ($P \leq 0.05$). (a และ b, เปรียบเทียบกับทุกกลุ่ม) (C, ควบคุม; T, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; DM, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน; DMT, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม; Ex, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและออกกำลังกาย; TEx, หนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย; DMEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานร่วมกับการออกกำลังกาย; DMTEx, หนูที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย)

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

5.1 น้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำหนักตัวของหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานนั้นมีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (384 ± 15.27 versus 357 ± 7.55 , $P \leq 0.05$). จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในผู้ป่วยเบาหวานจะมีภูมิในการทำลายบีต้าเซลล์ในตับอ่อนส่งผลให้การหลั่งอินซูลินลดลงนำไปสู่โรคทางเมตาบอลิซึมอื่นๆที่เกิดร่วมกับเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่าอินซูลินมีผลต่อชีวเคมีตัวอื่นๆที่ส่งผลในการทำลายเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการลดเมตาบอลิซึมของน้ำตาลซึ่งมีผลทำให้น้ำหนักลดและทำให้กล้ามเนื้อลายอ่อนแรงได้ (Raju and Raju, 2010) การหลั่งของอินซูลินแบบไม่เต็มที่อาจจะหลั่งน้อยหรือหลั่งมากเกินไปจนเกิดภาวะดื้ออินซูลิน จะส่งผลให้ไม่สามารถควบคุมการสลายไขมันและก่อให้เกิดกรดไขมันในเลือดสูงขึ้น นอกจากนี้การมีภาวะดื้ออินซูลินยังส่งผลต่อการเก็บน้ำตาลเข้าเซลล์ลดลง การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่ตับถูกควบคุมด้วยการหลั่งอินซูลิน หากมีอินซูลินน้อยหรือมีภาวะอินซูลินเกินจะส่งผลให้กระบวนการฟอสโฟริเลตกลูโคสในตับลดลงและมีการขนส่งน้ำตาลออกจากตับมายังพลาสมาเพิ่มขึ้น (Raju and Raju, 2010).

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูที่ออกกำลังกายกับหนูที่ไม่ออกกำลังกายพบว่าหนูที่ออกกำลังกายทั้งหมดมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูที่ไม่ออกกำลังกาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับการฝึกออกกำลังกายระดับปานกลางเป็นประจำหลังสัปดาห์ที่ 12 ของการออกกำลังกายในสัตว์ทดลองจะมีการดึงพลังงานมาใช้ในการออกกำลังกายเพิ่มขึ้น มีการสะสมไกลโคเจนในกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Kiens et al. 1993). มีการสลายไขมันและเพิ่มการออกซิโดซีไขมันมากขึ้น (Wilmore and Costill 1994)

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าน้ำหนักหัวใจและไตในหนูที่ออกกำลังกายมีน้ำหนักมากกว่าหนูที่ไม่ออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาที่ผ่านมาในสัตว์ทดลองพบว่าชนิดของการออกกำลังกาย ความหนักและระยะเวลาของการออกกำลังกายมีผลทำให้เกิดภาวะหัวใจโตได้ เนื่องจากขณะที่ออกกำลังกายเลือดไหลกลับเข้าสู่หัวใจมากขึ้น หัวใจออกแรงบีบตัวแรงขึ้น ทำงานเพิ่มขึ้น ทำให้หัวใจมีมวลของกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น (Scheuer et al., 1977).

นอกจากนี้ยังพบว่าค่าน้ำหนักของไตในหนูที่ออกกำลังกายมีน้ำหนักมากกว่าหนูที่ไม่ออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาของ Shizuru (Shizuru et al., 1991) พบว่าการออกกำลังกายเบาๆ จะทำให้เลือดไปที่ไตเพิ่มขึ้น มีการสร้างน้ำปัสสาวะเพิ่มขึ้น ไตทำงานเพิ่มขึ้นส่งผลให้ขนาดและ

น้ำหนักของไตเพิ่มขึ้นด้วย แต่หากออกกำลังกายอย่างหนักผลเลือดไปที่ไตลดลง การสร้างน้ำปัสสาวะลดลง เป็นผลการฮอร์โมนวาโซเพรสซินและอัลโดสเตอโรล ทำให้มีการดูดกลับของเกลือและน้ำเพิ่มขึ้น ปัสสาวะจึงลดลง (Oliveira et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของค่า cardiac output และความดันเลือดระหว่างออกกำลังกายทำให้เกิด stress ซึ่งส่งผลให้ไตทำงานมากขึ้นจึงก่อให้เกิดไตมีขนาดและน้ำหนักมากขึ้นด้วย (Chang et al., 1995; Nagaraja and Jeganathan, 1999) และอาจนำไปสู่การโตของไตโดยเพิ่มทั้งขนาดเซลล์และจำนวนเซลล์ของไต (Marti et al., 1993; Tuli et al., 1995) ในกรณีที่ออกกำลังกายแบบหนักหน่วงอาจจะก่อให้เกิดการทำลายตับและไตให้เกิดการบาดเจ็บได้ (Fojt et al., 1976)

5.2 ค่าเคมีในเลือด

ในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) พบค่าน้ำตาลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดพบว่ามากกว่าหนูที่แม่ไม่ได้เป็นเบาหวาน (C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (116.1 ± 12.30 versus 82.5 ± 6.04 , $P < 0.05$) จากการศึกษาของ Schalaan พบว่า การเพิ่มขึ้นของน้ำตาลในเลือดในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานเกิดจากเบต้าเซลล์ถูกทำลายจากการฉีด ในแม่หนูส่งผลต่อลูกในรุ่นลูกพบว่าการหลั่งอินซูลินลดลง (Schalaan et al., 2009; Wohsieb et al., 1987) การเพิ่มขึ้นของกลูโคสในเลือดอาจเกิดจากการขนส่งเข้าสู่เซลล์เนื้อเยื่อส่วนปลายกล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมันลดลง (Beck-Nielsen, 2002) มีการสลายไกลโคเจนเพิ่มขึ้น (Gold et al., 1970) รวมทั้งการเพิ่มการสร้างกลูโคสรวมถึงการสร้างกลูโคสในตับ (Raju et al., 2001) ส่วนค่าพลาสมาอินซูลินนั้นลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (7.2 ± 1.81 versus 10.1 ± 13.00 , $P < 0.05$) หนูที่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมหรือหนูที่ได้ออกกำลังกาย พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงและระดับอินซูลินเพิ่มสูงขึ้น ผลการทดลองที่ได้เหมือนกับการศึกษาของ Miyazaki (Miyazaki et al., 2004). ซึ่งพบว่าการออกกำลังกายจะเพิ่มการขนส่งกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์มากขึ้นส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง นอกจากนี้ยังพบการไหลของเลือดไปยังกล้ามเนื้อที่ทำงานเพิ่มขึ้นส่งผลให้มีการไหลของเลือดไปยังหลอดเลือดฝอยของกล้ามเนื้อนั้นเพิ่มมากขึ้นและพบจำนวนของ insulin receptor เพิ่มขึ้นด้วย (Wahren et al., 1971) การออกกำลังกายยังส่งผลต่อการควบคุมค่า glycemic โดยไปเพิ่มความไวของอินซูลิน และยังเพิ่มการสร้างไกลโคเจนในกล้ามเนื้อ (Vranic et al., 1979) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าการได้รับทอรีนเสริมในระหว่างตั้งครรภ์ในแม่ที่เป็นเบาหวานจะช่วยลดการตายของเซลล์โดยไปกระตุ้น IL-1 (Merezak et al., 2001) ส่งผลต่อการสังเคราะห์ DNA ป้องกันความผิดปกติในการพัฒนาตับอ่อนของฟีตัส (Boujender et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณทอรีนในแม่หนูเบาหวานที่ตั้งครรภ์จะส่งผลต่อการดำรงชีวิตและอายุขัยของลูกและมีผลต่อฟีตัสในรุ่นถัดไป เป็นไปตาม "fetal programming" จาก

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การให้ทอรีนเสริมระหว่างตั้งครรภ์ จะช่วยป้องกันการเกิดภาวะดื้ออินซูลินและภาวะความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมในลูกหนูที่เข้าสู่วัยผู้ใหญ่และในรุ่นถัดไปด้วย (Aerts and Van, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่า การได้ทอรีนมากกว่า 4 สัปดาห์ จะไปเพิ่มการเจริญของเบต้าเซลล์ในตับอ่อนซึ่งส่งผลต่อการหลั่งอินซูลิน (Idrissi et al., 2009) และป้องกันการตายของเบต้าเซลล์จากภาวะเครียด ภาวะน้ำตาลสูงและภาวะไขมันสูง ด้วย (Oprescu et al., 2007; Chang, 2000; Tang et al., 2007) ในทางกลับกัน ค่าน้ำตาลในเลือดและไตรกลีเซอไรด์กลับลดลงในกลุ่มที่ออกกำลังกายเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ออกกำลังกายอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบความแตกต่างของคลอเลสเตอรอลระหว่างกลุ่ม ส่วนค่า HDL นั้น ในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) มีค่าต่ำกว่าหนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) อย่างมีนัยสำคัญ (51.7 ± 6.20 versus 62.0 ± 3.89 , $P \leq 0.05$) แต่ในทางกลับกันจากการทดลองพบว่าค่า LDL มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเทียบกับหนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (122.0 ± 15.91 versus 106.6 ± 5.50 , $P \leq 0.05$) (ตารางที่ 2). ระดับ HDL เพิ่มขึ้นแต่ LDL ลดลงในหนูที่ออกกำลังกาย การสร้างอินซูลินมีผลต่อการควบคุม apolipoprotein เอ็นไซม์ lipoprotein lipase และตัวขนส่งคลอเลสเตอรอลเอสเทอ ก่อให้เกิดการสะสมของไขมันในคนที่เบาหวาน การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การขาดอินซูลินจะลดการทำงานของเอ็นไซม์ไลเปสในตับและเอ็นไซม์ไลโปโปรตีนไลเปสก่อให้เกิดการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ และมีการลดลงของ HDL ในคนที่เบาหวาน (Grundy et al., 2004; Wang et al., 2012) การเพิ่มขึ้นของไตรกลีเซอไรด์ มีสาเหตุมาจาก very low-density lipoprotein (VLDL) triglyceride lipoproteins และการเพิ่มขึ้น nutrient levels ส่งผลต่อการหลังกรดไขมันและกลูโคสไตรกลีเซอไรด์ (Ginsberg, 2005). จากรายงานที่ผ่านมาพบค่าไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ คลอเลสเตอรอล LDL แต่ HDL ลดลง การสะสมของไตรกลีเซอไรด์และคลอเลสเตอรอลในตับเพิ่มขึ้นส่งผลให้การสะสมไกลโคเจนในตับลดลง เพิ่มขึ้นทำให้เกิดไขมันพอกตับ โรคอ้วน (Schaalan et al. 2009). ไขมันในเลือดสูง เบาหวานและภาวะดื้ออินซูลินได้ (Harrison et al., 2002). ในปัจจุบันพบว่า การศึกษาในหนูโดยให้หนูว่ายน้ำจะส่งผลให้ค่า HDL เพิ่มสูงขึ้น แต่ LDL ลดลง (Oyelola and Rufai, 1993) การออกกำลังกายเป็นประจำจะช่วยเพิ่ม HDL (Thompson et al., 2001; Silva and Lima, 2002; Bembem and Bembem, 2000) ลด LDL และคลอเลสเตอรอล (Silva et al., 2002).

ค่า ยูเรีย ไนโตรเจน ในเลือด (BUN) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเทียบกับหนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (23.1 ± 3.60 versus 25.1 ± 1.40 , $P \leq 0.05$) ส่วนครีเอตินินนั้น ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ส่วนค่าเอนไซม์จากตับ SGOT สูงขึ้นแต่ SGPT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มหนูที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูที่มีแม่ไม่เป็นเบาหวาน (C) (106.3 ± 9.91 versus 134.8 ± 15.18 , $P \leq 0.05$) (33.5 ± 6.40 versus 44.7 ± 7.10 , $P \leq 0.05$) ตามลำดับ (ตาราง

ที่ 3) นอกจากนี้ยังพบว่า SGOT and SGPT เพิ่มสูงขึ้น ในหนูที่แม่ไม่ได้เป็นเบาหวานแล้วได้รับทอรีนเสริม ร่วมกับการออกกำลังกาย (TEx) ผลการศึกษาที่ได้นี้คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำการศึกษาโดยให้ออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำพบว่าค่า SGOT และ BUN เพิ่มสูงขึ้น เป็นผลมาจากกล้ามเนื้อ ตับ ไต ถูกทำลาย ในกลุ่มที่ออกกำลังกายนานๆ (Bowers et al., 1987; AntunesNeto et al., 2006; Decombaz et al., 1979; Haralambie and Berg, 1976; Raimondi et al., 1975; Riley et al., 1975; Rougier and Babin, 1975; Soloman, 1979) นอกจากนี้ยังพบว่าการออกกำลังกายเป็นประจำจะมีผลไปเพิ่มการทำลายไตในหนูที่มีความดันโลหิตสูง (Kuru et al., 2005). การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในผู้ป่วยเบาหวานจะมีค่า SGOT, SGPT and ALP (Alkaline phosphatase) ในเลือดเพิ่มสูงขึ้น และในหนูที่แม่เป็นเบาหวานจะมีการเปลี่ยนแปลงค่าโดยตรงซึ่งสัมพันธ์กับเมตาบอลิซึมและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมด้วยเช่นกัน โดยมีเอนไซม์ transaminases จะทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อขาดอินซูลินส่งผลให้มีการสลายโปรตีนเป็นกรดอะมิโนมากขึ้นและยังเพิ่มการสร้างน้ำตาลและคีโตนมากขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน . (Kumaresan et al., 2004)

5.3 ความดันเลือดแดงและความไวของบารอรีเฟล็กซ์

จากการศึกษาพบว่า ความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP) ในหนูที่แม่เป็นเบาหวาน (DM) มีค่าสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้ทอรีนเสริมและการออกกำลังกายสามารถรักษาค่าความดันให้ไม่สูงขึ้นได้จากข้อมูลจะพบว่าในกลุ่มที่ได้รับทอรีนเสริมและการออกกำลังกายช่วยควบคุมความดันเลือดได้ ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจนั้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ไม่ออกกำลังกายกับกลุ่มที่ออกกำลังกายพบว่าในกลุ่มที่ออกกำลังกายมีอัตราการเต้นของหัวใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่แม่เป็นเบาหวาน (DM) และกลุ่มที่แม่เป็นเบาหวานแล้วได้รับทอรีนเสริม (DMT) ในทางตรงกันข้ามในหนูที่แม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEx) นั้นพบว่ามีค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและอัตราการเต้นของหัวใจลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ออกกำลังกาย (DMT) ซึ่งตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความดันและอัตราการเต้นของหัวใจเพิ่มขึ้นในกลุ่มเบาหวาน (Grossmann et al, 1996; Brands et al., 1996) แต่จากการทดลองนี้อัตราการเต้นของหัวใจของกลุ่มที่แม่เป็นเบาหวานไม่มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งยังไม่สามารถอธิบายกลไกได้ แต่การเพิ่มขึ้นของความดันเลือดแดงนั้นสามารถอธิบายได้ดังนี้ อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีความบกพร่องในการควบคุมค่า glycemic จะมีความดันสูงขึ้น (Brands and Hopkins, 1996). และ amplitude สูงขึ้น ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากหลอดเลือดส่วนปลายหดตัว ความดันสูงขึ้นแม้จะมีการขับโซเดียมและปัสสาวะเพิ่มขึ้นก็ตาม แต่ในกลุ่มเบาหวานที่สามารถควบคุมค่า glycemic ได้กลับมี

ความดันลดลง (Brands and Hopkins, 1996) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเบาหวานมีผลต่อค่า hemodynamic โดยตรง มีผลทำให้หลอดเลือดหดตัว cardiac output ลดลงในช่วงสัปดาห์แรกของการเป็นเบาหวานและนำไปสู่การลดความสมดุลของโซเดียมในร่างกาย ความผิดปกติที่เกิดขึ้นทั้งหมดจะพบในกลุ่มเบาหวานที่ไม่สามารถควบคุมค่า glycemetic ได้ (Michael et al., 2001). ส่วนค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยและความไวของบารอรีเฟล็กซ์ เมื่อได้รับทั้ง phenylephrine (PHE) และ sodium nitroprusside (SNP) ในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) พบว่ามีค่าต่ำกว่าทุกกลุ่ม ในทางตรงกันข้ามเมื่อได้รับทอรีนเสริมในระยะเริ่มแรกของชีวิตมีผลช่วยลดผลข้างเคียงจากการที่มีแม่เป็นเบาหวานได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อค่าพารามิเตอร์การไหลเวียนผลที่ได้ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าความไวของบารอรีเฟล็กซ์จะพบว่าในกลุ่มที่ออกกำลังกายจะมีความไวสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ออกกำลังกาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อความไวของบารอรีเฟล็กซ์ลดลงเกิดจากระบบประสาทอัตโนมัติสูญเสียการทำงานที่ส่งผลให้มีการทำงานของระบบประสาทซิมพาเทติกเพิ่มสูงขึ้นและมีการลดลงของ heart rate variability (HRV) ส่วนใหญ่จะพบในคนที่มีความผิดปกติของเมตาบอลิซึม ในผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลินจะกระตุ้นการทำงานของซิมพาเทติกเพิ่มมากขึ้นเป็นผลให้การทำงานของบารอรีเฟล็กซ์ลดลง (Dela et al., 1994) นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่มคนที่มีความไวของบารอรีเฟล็กซ์ลดลงเพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเสียชีวิตเพิ่มขึ้นด้วย แต่เมื่อออกกำลังกายพบว่าการออกกำลังกายจะช่วยให้ความไวของบารอรีเฟล็กซ์ดีขึ้น ระหว่างออกกำลังกายจะพบว่าความดันโลหิตและการเพิ่มขึ้นของความดันนี้เป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ cardiac output ในขณะที่ความดันส่วนปลายลดลง ความดันที่สูงขึ้นพบว่าค่า systolic จะเพิ่มขึ้นแต่ diastolic แทบไม่มีการเปลี่ยนแปลง ความดันที่สูงขึ้นจากการออกกำลังกายจะช่วย resetting ความไวบารอรีเฟล็กซ์ (Brooks et al., 1996) การออกกำลังกายเบาๆในผู้ใหญ่ปกติ (Uusitalo et al., 2002). และผู้ป่วยหัวใจล้มเหลว(Malfatto et al., 2002)จะช่วยให้ระบบประสาทอัตโนมัติทำงานได้ดีขึ้น บางการศึกษาพบว่าการออกกำลังกายจะทำให้ระบบประสาทซิมพาเทติกทำงานมากขึ้น(Rovere et al., 2002) ลดการทำงานของซิมพาเทติกที่มีผลทำให้ความดันเพิ่มสูงขึ้น (Radaelli et al., 1996) บางการศึกษาพบว่าการออกกำลังกายช่วยให้ผู้ป่วยเบาหวาน หัวใจและหลอดเลือด ระบบประสาทมีอาการดีขึ้น. (Howorka et al., 1997; Svacinová et al., 2001; Frattola et al., 1997; Soška et al., 2001) นอกจากนี้ยังพบว่าคนผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และการเกิดภาวะน้ำตาลต่ำในผู้ป่วยเหล่านี้เป็นสาเหตุของการเกิดการทำลายระบบหัวใจและหลอดเลือดและทำให้สูญเสียการทำงานของระบบดังกล่าว(Gerstein et al., 2008; Patel et al., 2008; Duckworth et al., 2009) โดยภาวะน้ำตาลต่ำนั้นจะไปกระตุ้นให้ระบบ renin-angiotensin-aldosterone ทำงานเพิ่มมากขึ้น หลอดเลือดชั้นในสูญเสียหน้าที่ การทำงาน

ของบารออีเฟล็กซ์ลดลง และมีการกระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติให้ทำงานมากขึ้นด้วย (Adler et al., 2010; Joy et al., 2015; Hoffman et al., 1994; Limberg et al., 2014).

5.4 การศึกษาจุลกายวิภาคของ islet of Langerhans ในตับอ่อน

จากการศึกษานี้พบว่า Islet of Langerhans ของตับอ่อนยอม H and E พบว่าหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานมีขนาดของ Islet of Langerhans เล็กกว่ากลุ่มอื่นๆ (9.67 versus 27.27 μm^2) ซึ่งผลการศึกษาคล้ายกับการศึกษาของ Saito (Saito et al., 1979) เบาหวานทำให้ islet of Langerhans มีขนาดลดลง น่าจะเกิดจากการที่มี oxidative stress เพิ่มขึ้น แต่เอนไซม์ superoxide dismutase ลดลง นอกจากนี้ยังพบการสะสมของ amyloid ในเบาหวานชนิดที่ 2 เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เปอร์เซ็นต์ของบีต้าเซลล์ลดลง และยังกระตุ้นให้เกิด apoptosis ของบีต้าเซลล์ (Lorenzo et al., 1994) แต่ในกลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวานและได้รับทอรีนเสริม หรือได้ออกกำลังกาย ขนาดของ Islet of Langerhans เพิ่มขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าทอรีนจะมีผลไปกระตุ้นการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการเกิด apoptosis ของบีต้าเซลล์ (Huxtable, 1992; Hansen, 2001). มากไปกว่านั้น ทอรีนยังมีผลไปกระตุ้นความไวของอินซูลินด้วย (Nakaya et al. 2000; Anuradha and Balakrishnan, 1999) จากการศึกษาในแม่หนูที่ขาดโปรตีนพบว่า ลูกหนูที่เกิดมามีโอกาสเป็นเบาหวานเพิ่มขึ้นเนื่องจากการหลั่งอินซูลินลดลง แต่ในกลุ่มที่แม่หนูขาดโปรตีน แต่ได้รับทอรีนเสริมในน้ำดื่มนั้นพบว่าการหลั่งอินซูลินอยู่ในระดับปกติ (Cherif et al. 1998). ถึงแม้ว่าการได้รับทอรีนเสริมในแม่หนูที่ขาดโปรตีนนั้นจะช่วยให้โครงสร้างของหลอดเลือดปกติ ยังช่วยให้น้ำหนักและโครงสร้างของเบต้าเซลล์ปกติในระยะพีตัส (Boujendar et al. 2003). อย่างไรก็ตามในปัจจุบันมีรายงานพบว่าหนูที่เกิดจากแม่ขาดโปรตีนแต่ได้ทอรีนเสริมในระยะตั้งครรภ์และระยะให้นมบุตรนั้นเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่การทำงานของเบต้าเซลล์จะลดลง (Merezak et al. 2004)

5.5 การแสดงออกของจีน AT₁ receptor ในหัวใจและไต

การศึกษานี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ Percentages expression of AT₁ receptor ในหัวใจและไตพบว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (C) กลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน(DM) มีการแสดงออกมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาที่ได้คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งพบว่าในแม่ที่ตั้งครรภ์ขาดโปรตีนหรือในแม่ที่ตั้งครรภ์แล้วเป็นเบาหวานพบว่าลูกที่เกิดมาจะมีความผิดปกติทั้งโครงสร้างและหน้าที่ของไตซึ่งมีสาเหตุจากการที่มีการหลั่ง glucocorticoid เพิ่มขึ้น หรืออาจจะมีการกระตุ้นให้ระบบ renin-angiotensin-aldosterone system เพิ่มมากขึ้น หรือทำให้เกิด apoptosis หรือ มี DNA methylation นอกจากนี้ยังพบว่าการขาดโปรตีนหรือเป็นเบาหวานระหว่าง

ตั้งครรภ์ยังไปลดการทำงานของ 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase และการที่มี glucocorticoid สูงขึ้นในระยะ fetus จะส่งผลต่อการ resetting the hypothalamic pituitary- adrenal axis ในลูกหนู มากไปกว่านั้นจะมีการเพิ่มขึ้นของ AngII receptors ส่งผลให้ไ้มีการปรับตัวในทุกช่วงอายุของลูก (José et al., 2015) และยังกระตุ้นให้เกิดการตี้อของอินซูลิน โดยไปยังยังการทำงานของตัวขนส่ง GLUT4 ในกล้ามเนื้อลาย ผ่านกลไกการกระตุ้น mitogen-activated protein (MAP) kinases ERK1/2 ยิ่งยั้ง ตัวรับอินซูลิน substrate 1/2 (IRS-1/2) ซึ่งมีผลยับยั้ง nitration of Akt โดยตรง นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้น tyrosine phosphorylation ของ IRS-1 โดย Janus kinase 2 สัมพันธ์กับการกระตุ้น AT₁ receptor ส่งผลให้ insulin ไปเหนี่ยวนำให้ phosphatidylinositol-3-kinase associated กับ IRS-1, ส่งผลให้ความไวของอินซูลินลดลง (Kifor et al., 1991). การกระตุ้น AT₁ receptor ทำให้เกิดหลอดเลือดที่ไตหดตัว มีการดุดกลับโซเดียมที่ท่อไตมากขึ้น ความไวของ tubulo-glomerular feedback ลดลงยับยั้ง pressure-natriuresis (Carey et al., 2003) เป็นสาเหตุให้เกิดความดันโลหิตสูง (Ferrario et al., 2006; Goldblatt et al., 1983). ในทางตรงกันข้าม เมื่อมีการกระตุ้น AT₂ receptor ผลจะตรงข้ามกับการกระตุ้น AT₁ receptor เนื่องจาก AT₂ จะมีผลไปกระตุ้น การหลั่งของ bradykinin และ nitric oxide ส่งผลให้หลอดเลือดคลายตัว (Arima and Ito, 2000).

แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าในหนูที่มีแม่เป็นเบาหวานเมื่อได้รับทอรีนเสริม (DMT) หรือออกกำลังกาย (DMEx) หรือได้รับทั้งทอรีนเสริมร่วมกับการออกกำลังกาย (DMTEEx) พบว่าการแสดงออกของจีน AT₁ receptor ต่ำกว่ากลุ่มที่มีแม่เป็นเบาหวาน (DM) อย่างเดียว จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า การออกกำลังกายเป็นประจำจะส่งผลต่อการไหลเวียนของระบบ renin-angiotensin-aldosterone system โดยไปลดการทำงานของเอนไซม์ angiotensin converting และ การกระตุ้นระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติกลดลงรวมทั้งที่ไตด้วย ส่งผลให้ ปริมาณของฮอโมน Ang II ในเลือดลดลง การแสดงออกของจีน AT₁ receptor ก็ลดลงด้วย (Mousa et al., 2008; Braith et al., 1999)

จากการทดลองครั้งนี้ได้ข้อสรุปว่า ทอรีนมีผลต่อสุขภาพและป้องกันโรคได้ จากการศึกษาพบว่าแม่หนูที่เป็นเบาหวานจะส่งผลต่อการเกิดโรคในระบบเมตาบอลิซึมและหัวใจและหลอดเลือดในหนูรุ่นลูกเมื่อเข้าสู่วัยผู้ใหญ่ได้ แต่เมื่อให้ทอรีนเสริมในหนูตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของชีวิตจนถึงระยะหย่านมในแม่หนูที่เป็นเบาหวานจะสามารถป้องกันการเกิดเบาหวานและความดันโลหิตสูงในรุ่นลูกได้

บรรณานุกรม

- Abdeslem El Idrissi, Evelyn Okeke, Xin Yan, Françoise Sidime and Lorenz Neuwirth. Taurine regulation of blood pressure and vascular resistance. *Taurine in Health and Disease*, 2012: 53-73 ISBN: 978-81-7895-520-9.
- Aerts L, Holemans K, Van Assche FA. Maternal diabetes during pregnancy: consequences for the offspring. *Diabetes Metabolism Reviews*. 6:147-67. 1990.
- Aerts L and Van Assche FA. Taurine and taurine-deficiency in the perinatal period. *Journal of Perinatal Medicine* 30:281-286. 2002.
- Armitage JA, Taylor PD, Poston L. Experimental models of developmental programming: consequences of exposure to an energy rich diet during development. *Journal of Physiology* 565:3-8. 2005.
- Brands MW, Hopkins T E. Poor glycemic control induces hypertension in diabetes mellitus. *Hypertension*. 27:735-9. 1996.
- Beck-Nielsen H. Insulin resistance: organ manifestations and cellular mechanisms. *Ugeskrift for Laeger*. 164(16):2130-5. 2002.
- Benicky J, Hafko R, Sanchez-Lemus E, Aguilera G, Saavedra JM. Six commercially available angiotensin II AT1 receptor antibodies are non-specific. *Cellular Molecular Neurobiology* 32:1353-65. 2012.
- Chang L.T, Kras K, Suzuki G, Strasburg CD, Rodgers RA, Schemmel. Voluntary running in male S5B/PlRas rats fed high fat or high carbohydrate diets. *Physiology & Behavior*. 57,3. 501-508. 1995.
- Chang T W, Goldberg A L. The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle. *The Journal of Biological Chemistry*. 253.3685-3693.
- Christopher Morrison. Interaction Between Exercise and Leptin in the Treatment of Obesity. *DIABETES* 57:164-165. 2008.
- Cottrell EC, Ozanne SE, Early life programming of obesity and metabolic disease. *Physiology & Behavior* 94:17-28. 2008.

Edite Teixeira de Lemos. Differential Effects of Acute (Extenuating) and Chronic (Training) Exercise on Inflammation and Oxidative Stress Status in an Animal Model of Type 2 Diabetes Mellitus. *Mediators of Inflammation*, 2011.

Feig DI. Sugar-sweetened beverages and hypertension. *Future Cardiology* 6:773-6. 2010.

Fojt E, Ekelund L G, Hultman E . Enzyme activities in hepatic venous blood under strenuous physical exercise. *Pflugers Arch.* 24;361(3):287-96. 1976.

Gold A H. The effect of diabetes and insulin on liver glycogen synthetase activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 25;245(4):903-5. 1970.

Frisoli TM, Schmieder RE, Grodzicki T, Messerli FH. Salt and hypertension: is salt dietary reduction worth the effort?. *The American Journal of Medicine* 125:433-9. 2012.

John E. Hall, Alexandre A. da Silva, Jussara David E. ,Stec Hamza, Shankar Munusamy, Grant Smith and M. do Carmo, John Dubinion, Shereen. Obesity-induced Hypertension: Role of Sympathetic Nervous System, Leptin, and Melanocortins. *Journal of Biological Chemistry.* 285:17271-17276. 2010.

Galjaard S, Devlieger R, Van Assche FA. Fetal growth and developmental programming. *Journal of Perinatal Medicine* 41:101-5. 2013.

Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. The renin-angiotensin system: a link between obesity, inflammation and insulin resistance. *Obesity Reviews* 13:136-49. 2012.

Kazuko M. Obesity-related Hypertension:Role of the Sympathetic Nervous System, Insulin, and Leptin. *Current Hypertension Reports* 4:112–118. 2002.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative* 288:R127–33. 2005.

Kiens B , Essen-Gustavsson B, Christensen N J , Saltin B. Skeletal muscle substrate utilization during submaximal exercise in man: effect of endurance training. *The Journal of Physiology.* 469:459-78. 1993.

Kleitton Augusto dos Santos Silva, Rafael da Silva Luiz¹, Rodolfo Rosseto Rampaso, Nayda Parí sio de Abreu, E´dson Dias Moreira, Cristiano Teixeira Mostarda, Ka´ tia De Angelis, Vicente de Paulo CastroTeixeira, Maria Cla´udia Irigoyen, Nestor Schor. Previous Exercise Training Has a Beneficial Effect on Renal and Cardiovascular Function in a Model of Diabetes. Previous Exercise Training and Diabetes Mellitus. DIABETES 7:11. 2012.

Liu Z. The renin-angiotensin system and insulin resistance. Current Diabetes Reports 7:34-42. 2007.

Marcelo BS Flores, Maria Fernanda A. Fernandes, Eduardo R. Ropelle, Marcel C. Faria, Mirian Ueno, Licio A. Velloso, Mario J.A. Saad, and Joseñ B.C. Carvalheira. Exercise Improves Insulin and Leptin Sensitivity in Hypothalamus of Wistar Rats. DIABETES 55: 2554-2556. 2006.

Martí O, Gavaldà A, Jolin T, Armario A. Effect of regularity of exposure to chronic immobilization stress on the circadian pattern of pituitary adrenal hormones, growth hormone, and thyroid stimulating hormone in the adult male rat. Psychoneuroendocrinology. 18(1):67-77. 1993.

Michael W. Brands, Sharyn M. Fitzgerald. Arterial pressure control at the onset of Type I diabetes: the role of nitric oxide and the renin-angiotensin system. American Journal of Hypertension. 14. 126S–131S.2001.

Miyazaki T, Matsuzaki Y , Ikegami T , Miyakawa S , Doy M, Tanaka N , Bouscarel B. Optimal and effective oral dose of taurine to prolong exercise performance in rat. Amino Acids. 27(3-4):291-8. 2004.

Moraes-Silva IC, Mostarda CT, Moreira ED, Silva KA, Dos Santos F, De Angelis K, Farah VD, Irigoyen MC. Preventive role of exercise training in autonomic, hemodynamic and metabolic parameters in rats under high risk of metabolic syndrome development. Journal of Applied Physiology 114:786-91. 2013.

Nagaraja H S, Jeganathan P S. FORCED SWIMMING STRESS-INDUCED CHANGES IN THE PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL PARAMETERS IN ALBINO RATS.Indian Journal of Physiology Pharmacology .43(1):53-9. 1999.

Prpic V, Watson PM, Frampton IC, Sabol MA, Jezek GE, Gettys TW. Differential mechanisms and development of leptin resistance in A/J versus C57BL/6J mice during diet-induced obesity. *Endocrinology* 144:1155–63. 2003.

Raju, S.M. and Raju, B.. Cheia Majeed, Ahmed M. Al-Shammari, Eman H. Yausif, Nahi Y. Yaseen, Ayman Ali Husien, Rajha A. Al-Naimi, Adnan Ajeel. BM-MSCs Differentiated Insulin-Producing Cells Produce More Insulin in Presence of EGF than of FGF. *Stem Cell Discovery*. 2010.

SAMY I. MCFARLANE, MARYANN BANERJI, AND JAMES R. SOWERS Insulin Resistance and Cardiovascular Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86; .2001.

Schaalan M, .El-Abhar H S, Barakat M, ^c.El-Denshary ES. Westernized-like-diet-fed rats: effect on glucose homeostasis, lipid profile, and adipocyte hormones and their modulation by rosiglitazone and glimepiride. *Journal of Diabetes and its Complications*. 23, 3. 199-2082009.

Scott H. Carlson ,Sanya Roysomutti , Ning Peng and J. Michael Wyss. The Role of the central nervous system in NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension* 14:155S-162S. 2001.

Smith and Sudhesh Kumar, Alison Harte, Philip McTernan, Rajkumar Chetty, Simon Coppack, Jonathan Katz, Stephen Smith and Sudhesh Kumar. Adipocytes Is Reduced by Rosiglitazone Insulin-Mediated Upregulation of the Renin Angiotensin System in Human Subcutaneous . *Circulation* 111:1954-1961. 2005.

Takashi Ito, Stephen W. Schaffer, Junichi Azuma. The potential usefulness of taurine on diabetes mellitus and its complications. *Amino Acids* 42:1529–1539. 2012.

Thaeomor A, Wyss JM, Jirakulsomchok D, Roysommuti S. High sugar intake via the renin-angiotensin system blunts the baroreceptor reflex in adult rats that were perinatally depleted of taurine. *Journal of Biomedical Science* 24:17. 2010.

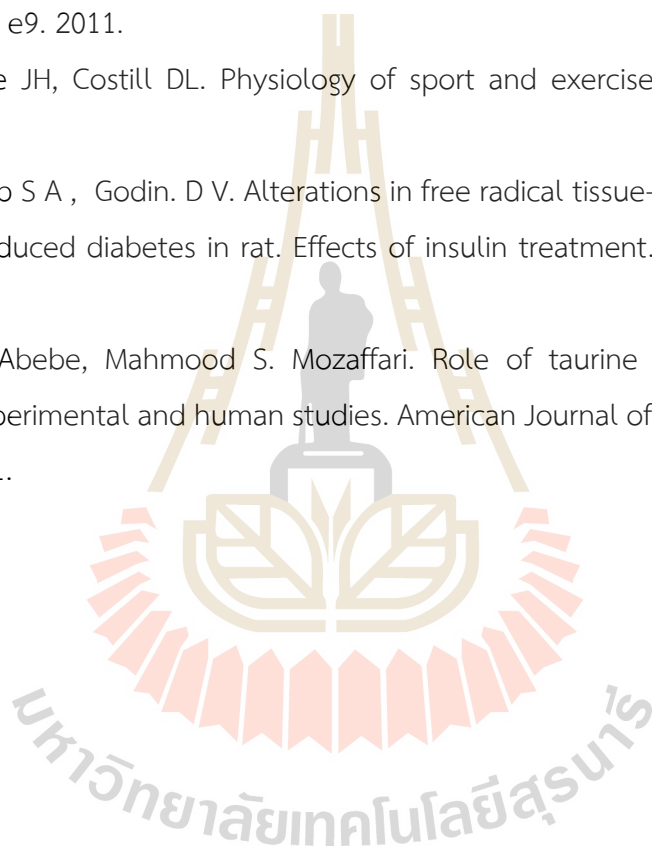
Tuli J.S, Smith J .A, Morton D.B. Effects of acute and chronic restraint on the adrenal gland weight and serum corticosterone concentration of mice and their faecal output of oocysts after infection with *Eimeria apionodes*. Research in Veterinary Science. 82-86. 1995.

Vitor E. Valenti, Luiz Carlos de Abreu, Hugo Macedo Junior, Oseas F. Moura Filho. Baroreflex sensitivity differs among same strain Wistar rats from the same laboratory. Heart International 6: e9. 2011.

Wilmore JH, Costill DL. Physiology of sport and exercise. Champaign,IL: Human Kinetics.1994.

Wohaieb S A , Godin. D V. Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. Diabetes. 36(9):1014-8. 1987.

Worku Abebe, Mahmood S. Mozaffari. Role of taurine in the vasculature: an overview of experimental and human studies. American Journal of Cardiovascular Disease 1:293-311. 2011.



ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ ชื่อ นางสาว อัจฉราพร แถวมอ

Miss Atcharaporn Thaeomor

หมายเลขบัตรประชาชน 3409900084579

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

สถานที่ทำงาน สาขาวิชาปรีคลินิก สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา

โทรศัพท์ 044-224348, 081-5450859

E-mail atcharaporn@sut.ac.th

ประวัติการศึกษา: ปรัชญาดุชะฎิบัณฑิตสาขาสรวิทยาทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ: การควบคุมความดันเลือดแดง



มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี