



โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจนในสมองส่วน
ฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้น
ได้เอง

ชื่อนิสิต นางสาวธนาภรณ์ บุษพาราม รหัสประจำตัว 6032027023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง
Changes of hypoxia-associated genes in the hippocampus and cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats

ชื่อนิสิต นางสาวธนาภรณ์ บุปผาราม

เลขประจำตัว 6032027023

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและ
ซีรีบรัมคอร์เท็กซ์หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง
Changes of hypoxia-associated genes in the hippocampus and cerebral cortex
of spontaneously hypertensive rats

นางสาวธนาภรณ์ บุปผาราม

อาจารย์ที่ปรึกษา
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
อาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ตริยะสัจกุลโกวิท

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก
โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดออกซิเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวธนาภรณ์ บุษผาราม
อาจารย์ที่ปรึกษา	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: อาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ตียะสัตย์กุลโกวิท
ภาควิชา	: ชีววิทยา

บทคัดย่อ

ความดันโลหิตสูงเป็นภาวะที่เกิดจากการมีความดันในหลอดเลือดขณะหัวใจบีบตัวและคลายตัวสูงมากกว่าระดับปกติ ซึ่งภาวะนี้สามารถส่งผลต่อการทำงานของระบบไหลเวียนโลหิต ทำให้เลือดไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายลดลงรวมถึงสมอง อันนำมาสู่ภาวะขาดเลือดและภาวะพร่องออกซิเจนได้ โดยภาวะพร่องออกซิเจนที่เกิดขึ้นจากการเหนี่ยวนำดังกล่าวสามารถกระตุ้นการทำงานของยีนในสมองซึ่งมีความสำคัญต่อการทำงานของสมองในบริเวณนั้น ๆ อย่างไรก็ตามการศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาของการเกิดความดันโลหิตสูงและการแสดงออกของยีนในสมองที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะพร่องออกซิเจน โดยเฉพาะสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจน ได้แก่ ยีน hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) และยีน heme oxygenase-1 (HO-1) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (SHR/KyoMlac) นำหนู SHR/KyoMlac และหนูความดันปกติ (WMN/NrsMlac) เพศผู้ที่มีอายุเท่ากัน ได้แก่ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ทำการการุณยฆาตและเก็บสมองทั้งสองส่วนมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีนดังกล่าวโดยเทคนิค qRT-PCR พบว่าอายุที่มากขึ้นไม่ได้ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน HIF-1 α ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของทั้ง WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน HO-1 ระหว่าง WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่ามีการแสดงออกของยีน HO-1 สูงขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24, และ 36 สัปดาห์ แต่ไม่พบในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ใน WMN/NrsMlac พบว่ามีการแสดงออกของยีน HO-1 มากขึ้นที่อายุ 24 สัปดาห์ สรุปได้ว่าความดันโลหิตสูงส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งตรวจพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการเกิดความดันโลหิตสูง

คำสำคัญ: ความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ, ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์, ภาวะพร่องออกซิเจน, ฮิปโปแคมปัส

Research Title : Changes of hypoxia-associated genes in the hippocampus
and cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats

Student name : Miss Thanaporn Bubparam

Advisor : Assistant Professor Sukanya Jaroenporn, Ph.D.

Co-Advisor : Wacharaporn Tiyasatkulkovit, D.V.M., Ph.D.

Department of : Biology

Abstract

Hypertension is a consistent elevation of systemic arterial blood pressure that contributes to ischemia and hypoxia. Hypoxia induced by hypertension can stimulates the expression of many genes in brain which is essential in maintaining its function. However, the relationship between the period of hypertension and the expression of hypoxia-associated genes in brain, especially in hippocampus and cerebral cortex is still not fully understood. Therefore, this study aimed to investigate the changes of hypoxia-associated genes (hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) and heme oxygenase-1 (HO-1)) in the hippocampus and cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats (SHR/KyoMlac), the animal model of primary hypertension. Male SHR/KyoMlac at 6, 12, 24, and 36 weeks of age and age/sex-matched normotensive wild-type rats (WMN/NrsMlac) were used to address this relationship. The results showed an advancing age did not affect mRNA expression of *HIF-1 α* in cerebral cortex and hippocampus of both WMN/NrsMlac and SHR/KyoMlac. When compare between WMN/NrsMlac and SHR/KyoMlac with age-matched group, the result demonstrated that the expression levels of *HO-1* in hippocampus of SHR/KyoMlac were significantly higher than WMN/NrsMlac at the age of 6, 12, 24 and 36 weeks. However, these changes did not show in the cerebral cortex of SHR/KyoMlac. In WMN/NrsMlac, the expression levels of *HO-1* were significantly increased only at the age of 24 weeks. These results suggesting that hypertension affects the changes of hypoxia-associated genes in hippocampus which could be detected at the onset of hypertension.

Keywords: HIF-1 α , HO-1, hypoxic condition, oxygen deficiency, oxidative stress, pressure overload

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำโครงการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษา สำหรับความช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทางในการทำงานวิจัย รวมถึงตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ และให้คำแนะนำที่ดีตลอดมา จนโครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ตริยะสัจย์กุลโกวิท สำหรับความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, อาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี, อาจารย์ ดร. มารุต เพ็ญอวรณ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชัย ดำรงโรจน์วัฒนา อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษา ปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำสั่งสอน และความรู้ต่าง ๆ เสมอมา

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยแคลเซียมและกระดูก ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่สนับสนุนตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยไพรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา และคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนเงินทุนสำหรับการทำโครงการในครั้งนี้

ขอขอบคุณนายรัฐพล สมสุระ ผู้ที่ให้ข้อมูลค่าความดันโลหิตและน้ำหนักตัวของตัวอย่างสัตว์ทดลอง รวมถึงให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือเสมอ

ขอขอบคุณนางสาวเกต พรถวัลศักดิ์ ผู้ที่คอยช่วยเหลือและให้ความร่วมมือในการทำงานวิจัยอย่างดีในทุกครั้ง

ขอขอบคุณครอบครัว เพื่อน พี่ และน้อง ๆ ในภาควิชาชีววิทยาแห่งนี้ทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือ คำแนะนำ รวมถึงกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
ABSTRACT.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ.....	1
1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	3
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	4
2.1. ภาวะความดันโลหิตสูง.....	4
2.1.1. <u>Primary hypertension (essential or idiopathic hypertension)</u>	4
2.1.2. <u>Secondary hypertension</u>	4
2.2. ภาวะพร่องออกซิเจน.....	5
2.2.1. <u>Hypoxemic hypoxia</u>	5
2.2.2. <u>Hypemic hypoxia</u>	5
2.2.3. <u>Ischemic หรือ stagnant hypoxia</u>	5
2.2.4. <u>Histotoxic hypoxia</u>	5
2.3. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α).....	6
2.4. Heme oxygenase-1 (HO-1).....	7
2.5. หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....	10
3.1. การสอบสวนเอกสารและการค้นคว้าข้อมูล.....	10
3.2. การทำวิจัยในสัตว์ทดลอง.....	10
3.3. การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เทกซ์ของหนูแรท.....	12
3.4. การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA.....	12
3.4.1. <u>การสกัด RNA</u>	12
3.4.2. <u>การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA</u>	13
3.4.3. <u>การสังเคราะห์ cDNA</u>	13

3.5. การออกแบบและทดสอบประสิทธิภาพของ primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR14	
3.5.1. การออกแบบ primer.....	14
3.5.2. การหา annealing temperature ที่เหมาะสม.....	15
3.6. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR.....	17
3.7. การวิเคราะห์ทางสถิติ	18
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	19
4.1. การเปลี่ยนแปลงของยีน <i>HIF-1α</i> และ <i>HO-1</i> ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac.....	19
4.1.1. การแสดงออกของยีน <i>HIF-1α</i>	19
4.1.2. การแสดงออกของยีน <i>HO-1</i>	20
4.2. การเปลี่ยนแปลงของยีน <i>HIF-1α</i> และ <i>HO-1</i> ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac.....	21
4.2.1. การแสดงออกของยีน <i>HIF-1α</i>	21
4.2.2. การแสดงออกของยีน <i>HO-1</i>	21
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา	23
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ	25
6.1. สรุปผลการศึกษา	25
6.2. ข้อเสนอแนะ	25
6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์	25
6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต.....	25
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3-1 ลำดับ primer ของยีน HIF-1 α และ HO-1 ใน <i>Rattus norvegicus</i>	14
ตารางที่ 3-2 ตำแหน่งการเข้าจับ primer ของยีน HIF-1 α และ HO-1 ใน <i>Rattus norvegicus</i> ...	15

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 การควบคุมแสดงออกของยีน HO-1 โดย HIF-1 α ภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจน.....	8
ภาพที่ 3-1 ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัวของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac.....	11
ภาพที่ 3-2 ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัวของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac.....	11
ภาพที่ 3-3 Brain sections สมองของหนูแรทแสดงบริเวณฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์.....	12
ภาพที่ 3-4 ผลการทดสอบ PCR product ของยีน HIF-1 α และ HO-1.....	17
ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของยีน HIF-1 α ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส.....	19
ภาพที่ 4-2 การแสดงออกของยีน HO-1 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส.....	20
ภาพที่ 4-3 การแสดงออกของยีน HIF-1 α ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์.....	21
ภาพที่ 4-4 การแสดงออกของยีน HO-1 ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์.....	22

บทที่ 1

บทนำ

1.1. ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

ความดันโลหิตสูง (hypertension) เป็นภาวะที่ความดันเลือดมีค่าสูงกว่าปกติในระยะพัก โดยความดันโลหิตสูงสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ ความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ (primary หรือ essential hypertension) ซึ่งไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด แต่อาจมีความเกี่ยวข้องกับการใช้ชีวิตประจำวัน เช่น การสูบบุหรี่ การบริโภคโซเดียมที่มากเกินไป กรรมพันธุ์ หรือความเครียด เป็นต้น และความดันโลหิตสูงทุติยภูมิ (secondary hypertension) ซึ่งมีสาเหตุมาจากโรคอื่น ๆ เช่น โรคไตเรื้อรัง โรคเบาหวาน การตั้งครรภ์ การเกิดความผิดปกติที่ต่อมไทรอยด์ ต่อมใต้สมองส่วนหน้าและต่อมพาราไทรอยด์ เป็นต้น (Rosto, 2013) โดยผู้ป่วยที่มีภาวะความดันโลหิตสูงกว่าร้อยละ 95 เป็นประเภท primary hypertension และมักจะไม่ทราบว่าตนเองมีภาวะนี้ เนื่องจากเป็นภาวะที่มักไม่พบการแสดงออกของอาการในเบื้องต้น ซึ่งความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวกับหัวใจและหลอดเลือด เช่น โรคหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง และโรคไต (McCance and Huether, 2019) นอกจากนี้ภาวะดังกล่าวยังส่งผลต่อการทำงานของสมอง ทำให้การส่งสัญญาณประสาทระหว่างเซลล์ประสาทที่บริเวณ synapse ลดลง และยังลดการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ synapse ในสมอง ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อการสร้างความทรงจำได้ (Tucsak et al., 2017)

ออกซิเจน (oxygen) เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งจะจับกับ Heme ของเม็ดเลือดแดงและถูกขนส่งผ่านหลอดเลือด ซึ่งส่วนของร่างกายที่จะมีการนำออกซิเจนไปใช้มากที่สุดคือ สมอง โดยจะมีการนำออกซิเจนไปใช้ถึงร้อยละ 20 (Ferdinand and Roffe, 2016) ซึ่งการมีภาวะความดันโลหิตสูงเป็นเวลานานจะส่งผลให้หลอดเลือดหดตัว (vasoconstriction) ความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือดลดลง และอัตราการไหลของเลือดต่ำลงซึ่งจะทำให้เลือดไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายลดลงรวมถึงสมอง ทำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด (ischemia) และออกซิเจนไม่เพียงพอ (hypoxia) ต่อความต้องการของเซลล์ภายในสมอง (Rosenberg, 2015) ซึ่งภาวะสมองขาดเลือดและภาวะพร่องออกซิเจนสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างเฉียบพลันขององค์ประกอบ ลิพิดและการทำงานของเอนไซม์ทั้งในเซลล์ประสาทและเซลล์เกลียได้ในเบื้องต้น และสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกและการสังเคราะห์โปรตีนได้ในระยะยาว ซึ่งทั้งสองภาวะดังกล่าวมีความเชื่อมโยงกับโรคทางระบบประสาทโดยเฉพาะโรคอัลไซเมอร์ (Nalivaeva and Rybnikova, 2019) อย่างไรก็ตามเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system) แต่ละเซลล์จะมีความไวต่อภาวะพร่องออกซิเจนแตกต่างกันทั้งในด้านการทำงานและอัตราเมแทบอลิซึม โดยเซลล์ประสาทที่อยู่ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะมีความไวมาก โดยหากเกิดภาวะพร่องออกซิเจนในระยะ

สั้น จะทำให้มีอาการขาดสมาธิและการตัดสินใจแย่ง และหากเกิดภาวะนี้จนถึงขั้นรุนแรงจะส่งผลให้หมดสติและเกิดความเสียหายที่สมองส่วนซีรีบริลคอร์ดเท็กซ์และก้านสมอง (Turetz and Crystal, 2007) ซึ่งจากหลักฐานที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าวพบว่าภาวะความดันโลหิตสูงสามารถทำให้เกิดการตายของ astrocyte (Li et al., 2016) และการเกิดภาวะพร่องออกซิเจนสามารถทำให้เกิดความผิดปกติของการจัดเรียงของเซลล์ในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ เช่น บริเวณ CA1 ของฮิปโปแคมปัสและ frontoparietal cortex เป็นต้น (Haddad and Yu, 2009)

จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่สามารถทำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจน อันส่งผลให้สมองเกิดความเสียหายได้ และมีความเสี่ยงโดยเฉพาะความดันโลหิตสูงประเภท primary hypertension เนื่องจากมีการแสดงออกของอาการไม่ชัดเจน โดยจากการศึกษาใน spontaneously hypertensive rat (SHR/KyoMlac) ซึ่งเป็นโมเดลที่ใช้ในการศึกษา primary hypertension อย่างแพร่หลายพบว่า SHR/KyoMlac จะเริ่มมีค่าความดันโลหิตเพิ่มขึ้นตอนอายุ 6-7 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับหนูปกติ และจะเริ่มมีความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลงเมื่ออายุ 9 สัปดาห์ (Anishchenko et al., 2015; Reckelhoff et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระยะเวลาที่เป็นความดันโลหิตสูงและการแสดงออกของยีนในสมองทั้งสองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะพร่องออกซิเจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของความดันโลหิตและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนว่ามีลำดับขั้นการเกิดเช่นไร และสัมพันธ์กันอย่างไรในหนูแรทเพศผู้ที่มีอายุมากขึ้นและหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (SHR/KyoMlac) โดยจะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 α) ซึ่ง HIF-1 α เป็น transcription factor ที่สำคัญในการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Helton et al., 2005) และยีน Heme oxygenase-1 (HO-1) ซึ่ง HO-1 เป็นเอนไซม์ที่สามารถถูกกระตุ้นให้ทำงานได้เมื่อเกิดความเครียดขึ้นในระบบประสาทส่วนกลาง เช่น oxidative stress, heat shock และ hypoxia เป็นต้น (Chen, 2014) ซึ่งใช้ตัวอย่างสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบริลคอร์ดเท็กซ์ของหนู SHR/KyoMlac อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ โดยเปรียบเทียบกับหนูที่มีความดันปกติที่อายุเท่ากันเพื่อประเมินว่าภาวะความดันโลหิตสูงส่งผลต่อการเกิดภาวะพร่องออกซิเจนอย่างไรในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบริลคอร์ดเท็กซ์ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด และโรคทางระบบประสาทที่เกิดจากภาวะความดันโลหิตสูง

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจน ได้แก่ ยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หนู แรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1. ภาวะความดันโลหิตสูง

ความดันโลหิตสูง (hypertension) เป็นภาวะที่ค่าความดันเลือดในขณะที่หัวใจบีบตัวและคลายตัวสูงสุดมีค่ามากกว่าปกติในขณะพัก ซึ่งได้มีการกำหนดค่าความดันที่แสดงถึงภาวะความดันโลหิตสูงว่ามีค่าความดันขณะหัวใจบีบตัวสูงสุด (systolic blood pressure: SBP) ตั้งแต่ 130 mmHg ขึ้นไปและค่าความดันขณะหัวใจคลายตัวสูงสุด (diastolic blood pressure: DBP) ตั้งแต่ 80 mmHg ขึ้นไป (McCance and Huether, 2019) โดยภาวะความดันโลหิตสูงสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท (Eckman and Share, 2012) ได้แก่

2.1.1. Primary hypertension (essential or idiopathic hypertension)

เป็นความดันโลหิตสูงที่เกิดขึ้นได้เองโดยไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด อาจเกิดจากกรรมพันธุ์ การมีอายุที่เพิ่มขึ้น หรือวิถีการใช้ชีวิต เช่น การกินอาหารที่มีไขมันหรือความเค็มสูง หรือการมีความเครียด เป็นต้น โดยกว่า 95% ของผู้ที่มีภาวะความดันโลหิตสูงจะอยู่ในประเภทนี้ (McCance and Huether, 2019)

2.1.2. Secondary hypertension

เป็นความดันโลหิตสูงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยโรคอื่นที่เป็นมาก่อน เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไต โรคที่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของต่อมไทรอยด์ ต่อมใต้สมอง หรือต่อมพาราไทรอยด์ โรคเบาหวาน หรือโรคทางระบบประสาท เป็นต้น

ปัจจัยต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิด primary hypertension จะทำให้ปริมาณเลือดที่ออกจากหัวใจต่อนาที (cardiac output) และความต้านทานของหลอดเลือด (total peripheral resistance) มีค่าเพิ่มขึ้น ทำให้หัวใจทำงานหนักและส่งผลให้ความดันที่เลือดกระทำต่อผนังหลอดเลือดมีค่าสูงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งภาวะเหล่านี้จะไม่แสดงอาการจนกว่าจะเกิดความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในหัวใจ สมอง หรือไต เมื่อปล่อยให้เกิดภาวะความดันโลหิตสูงเป็นเวลานานโดยไม่ได้รับการรักษา จะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อผนังหลอดเลือด มีการเข้ามาสะสมของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในรูหลอดเลือด (Eckman and Share, 2012) ส่งผลให้ขนาดรูหลอดเลือดแคบลง ผนังหลอดเลือดหนาตัวขึ้น ปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกายจึงลดลง รวมถึงสมอง อันนำมาสู่ภาวะขาดเลือดและภาวะพร่องออกซิเจนในที่สุด (Rosenberg, 2015)

2.2. ภาวะพร่องออกซิเจน

ภาวะพร่องออกซิเจน (hypoxia) เป็นภาวะที่เนื้อเยื่อของร่างกายได้รับปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอ (Manninen and Unger, 2016) ซึ่งภาวะพร่องออกซิเจนสามารถแบ่งออกเป็น 4 ประเภท (Britannica, 2020; Stone, 2007) ได้แก่

2.2.1. Hypoxemic hypoxia

เป็นภาวะพร่องออกซิเจนที่เกิดจากระดับของออกซิเจนในเลือดต่ำ อาจเกิดจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่ทำให้ร่างกายได้รับปริมาณของออกซิเจนน้อยลง เช่น การปีนเขาหรือการอาศัยอยู่ในสถานที่ที่สูงจากระดับน้ำทะเล เป็นต้น หรือเกิดจากประสิทธิภาพการแพร่ออกซิเจนจากถุงลมภายในปอดไปยังเลือดมีค่าน้อยลง

2.2.2. Hypemic hypoxia

เป็นภาวะพร่องออกซิเจนที่เกิดจากความสามารถในการขนส่งออกซิเจนของเฮโมโกลบินมีค่าน้อยลง อาจเกิดจากปริมาณเฮโมโกลบินมีน้อยเกินกว่าที่จะขนส่งออกซิเจนเพื่อตอบสนองความต้องการออกซิเจนของร่างกายได้ เช่น การที่ร่างกายเสียเลือดมากจากอุบัติเหตุ เป็นต้น หรืออาจเกิดจากเฮโมโกลบินทำงานผิดปกติ เช่น การที่ร่างกายได้รับแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ (carbon monoxide poisoning) ทำให้เฮโมโกลบินเข้าจับกับคาร์บอนมอนอกไซด์แทนออกซิเจน เป็นต้น

2.2.3. Ischemic หรือ stagnant hypoxia

เป็นภาวะพร่องออกซิเจนที่เกิดจากการไหลเวียนของเลือดภายในหลอดเลือดไปยังเนื้อเยื่อมีค่าน้อยลง อาจเกิดจากโรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจจึงทำให้เกิดความเสียหายกับระบบหมุนเวียนเลือด หรืออาจเกิดจากการได้รับการกระทบกระเทือนทางร่างกายหรือจิตใจอย่างรุนแรงจนส่งผลให้เกิดภาวะช็อก (shock)

2.2.4. Histotoxic hypoxia

เป็นภาวะพร่องออกซิเจนที่เกิดจากการที่เซลล์ของร่างกายไม่สามารถนำออกซิเจนไปใช้ได้ แม้ว่าปริมาณและการไหลของเลือดจะเป็นปกติก็ตาม อาจเกิดจากการที่ร่างกายได้รับไซยาไนด์หรือสารเคมีที่ส่งผลต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์ ทำให้ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติ (mitochondrial cytochrome poisoning)

สมองเป็นอวัยวะที่ใช้ออกซิเจนมากถึง 20% ของปริมาณการใช้ออกซิเจนทั้งหมดในร่างกาย เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนของไอออนผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์มาก สมองจึงมีความต้องการของ adenosine triphosphate (ATP) สูง ซึ่งการสร้าง ATP ในกระบวนการหายใจระดับเซลล์จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในการเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (Manninen and Unger, 2016) หากปล่อยให้ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นเวลานานจะส่งผลให้ Na^+/K^+ pump ทำงานผิดปกติ ซึ่งมีผลต่อศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ในระยะพัก การเกิด depolarization และการแลกเปลี่ยนของ Na^+ และ Ca^{2+} เข้ามาภายในเซลล์ ทำให้ osmolality ของเซลล์เปลี่ยนแปลงและทำให้น้ำสามารถเข้ามาภายในเซลล์ได้ ส่งผลให้เซลล์ประสาทเกิดความเสียหายและตายได้ในที่สุด (Turetz and Crystal, 2007) อย่างไรก็ตามเซลล์แต่ละเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางจะมีการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนแตกต่างกัน โดยเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความทรงจำจะมีความไวต่อภาวะภาวะออกซิเจนมาก (Turetz and Crystal, 2007) หากภาวะพร่องออกซิเจนมีความรุนแรงมากขึ้นจะทำให้ความเสียหายลุกลามไปถึงสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้และประมวลผลได้ (Turetz and Crystal, 2007)

2.3. Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)

Hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) เป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยสายพอลิเพปไทด์ 2 สาย คือ HIF-1 α และ HIF-1 β ซึ่ง HIF-1 เป็น transcription factor ที่สามารถถูกกระตุ้นให้ทำงานได้เมื่อเกิดภาวะพร่องออกซิเจน โดยจะเข้าจับกับบริเวณ response elements ของยีนเป้าหมายเพื่อทำให้เกิดการถอดรหัสของยีน ทำให้เซลล์นั้น ๆ สามารถอยู่รอดต่อไปได้ (Sharp et al., 2001)

ในภาวะที่ออกซิเจนในเซลล์ปกติ (normoxia) HIF-1 α จะถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxylation) ที่ตำแหน่ง proline-402 และ proline-564 โดยอาศัยการทำงานของ prolyl hydroxylases (PHDs) ซึ่งใช้ออกซิเจนเป็นสารตั้งต้นและใช้ ferrous iron (Fe^{2+}) เป็น cofactor ทั้งนี้ยังอาศัยการทำงานของ factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) ในการเติมหมู่ไฮดรอกซิลที่ asparagine-803 เพื่อไม่ให้เกิดการจับกันของ HIF-1 α และ co-activator ซึ่งคือ p300 และ CREB-binding protein (CBP) หลังจากนั้น von Hippel-Lindau (VHL) จะเข้าจับกับ HIF-1 α ที่ถูกเติมหมู่ไฮดรอกซิลเพื่อเติม ubiquitin (ubiquitination) เป็นการติดฉลาก ทำให้เกิด degradation หรือการย่อยด้วย proteasome ต่อไป ขณะที่ภาวะพร่องออกซิเจน การทำงานของ PHD และ FIH จะถูกยับยั้ง ไม่เกิด hydroxylation ทำให้ HIF-1 α มีความเสถียร และถูกขนส่งเข้าไปภายในนิวเคลียส และเข้าจับกับ HIF-1 β รวมถึง p300 และ CBP กลายเป็น transcriptional complex จากนั้นเข้าจับ

กับ DNA ที่บริเวณ hypoxia-responsive element (HRE) ซึ่งเป็น DNA sequence สำหรับจับกับ transcription factor ทำหน้าที่ควบคุมการเกิด transcription ดังภาพที่ 2-1 ซึ่งยื่นเป้าหมายอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) การลุกลามของมะเร็ง (metastasis) หรือการอยู่รอดของเซลล์ (Azimi, 2018) ยกตัวอย่างยื่นเป้าหมาย เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) และ heme oxygenase-1 (HO-1) เป็นต้น (Dengler et al., 2014)

จากการศึกษาผลของความดันโลหิตต่อการแสดงออกของ HIF-1 α ในงานวิจัยก่อนหน้าพบว่ามีการวิจัยที่น่าสนใจในหลากหลายอวัยวะ ยกตัวอย่างการศึกษาการแสดงออกของ HIF-1 α ในอวัยวะของหนูที่มีความดันโลหิตสูง (SHR/KyoMlac) พบว่ามีการแสดงออกของ HIF-1 α ที่มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ความดันปกติ โดยอาจมีสาเหตุมาจากความดันโลหิตสูงทำให้การไหลเวียนเลือดในอวัยวะลดลง (Colli et al., 2019) หรือการศึกษาการแสดงออกของยีน HIF-1 α ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ SHR/KyoMlac ที่อายุ 8, 16, 24 และ 36 สัปดาห์พบว่าการแสดงออกของยีน HIF-1 α ที่มากขึ้นในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ SHR/KyoMlac ที่อายุ 36 สัปดาห์เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ความดันปกติ (Ritz et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแสดงออกของยีน HIF-1 α ในหัวใจของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิด primary hypertension ด้วยการทำให้ transverse aortic constriction (TAC) พบว่าการแสดงออกของยีน HIF-1 α ที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้ทำ TAC (Tian et al., 2019) จะเห็นได้ชัดว่าภาวะความดันโลหิตสูงสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีน HIF-1 α และสามารถให้ผลที่แตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ

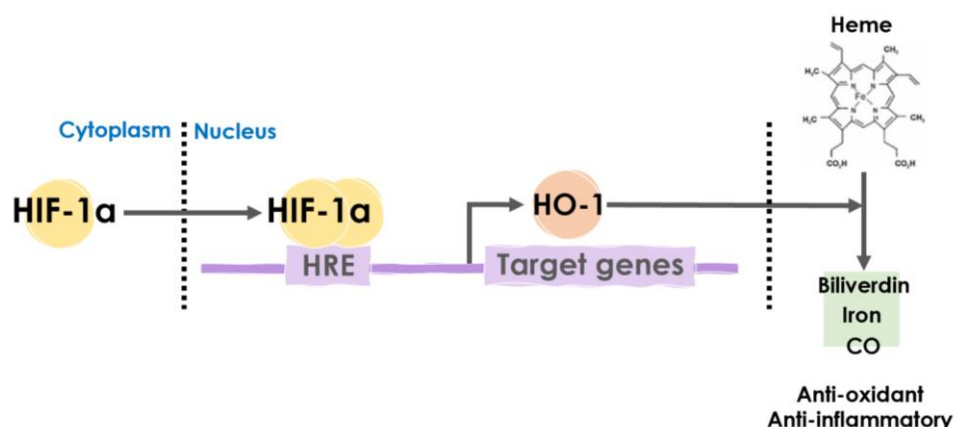
2.4. Heme oxygenase-1 (HO-1)

Heme oxygenase (HO) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สลาย heme ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมสามารถพบ HO ได้ 3 isoform ได้แก่ HO-1, HO-2 และ HO-3 ซึ่ง HO-2 และ HO-3 จะมีการสร้างอยู่ตลอดเวลา แต่ HO-1 นั้นจะมีการสร้างต่อเมื่อถูกกระตุ้น อาทิ การถูกกระตุ้นจาก pro-inflammatory cytokines, heat shock, bacterial endotoxin หรือการเกิดภาวะพร่องออกซิเจน เป็นต้น (D'Amico et al., 2006; Lazwa et al., 2011) ปกติหลังจากที่สังเคราะห์ HO-1 จะไปฝังอยู่ที่เอนโดพลาสมิก เรติคูลัม แต่สามารถเปลี่ยนที่อยู่ได้หากถูกกระตุ้น โดยจะไปอยู่ได้ทั้งบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ นิวเคลียส และไมโทคอนเดรีย (Chiang et al., 2018)

HO-1 หรือ heat shock protein 32 (Hsp32) เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยาการสลายของ heme ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO), ferrous iron (Fe²⁺) และ biliverdin ดังภาพที่ 2-1 โดยบทบาทของ CO ที่ได้คือเป็นตัวถ่ายทอดสัญญาณ

เพื่อให้มีการตอบสนองต่าง ๆ เช่น การต้านการอักเสบ ต้านการเกิดลิ่มเลือด ยับยั้งการตายของเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่ หรือการขยายหลอดเลือด เป็นต้น และเมื่อมีการสะสมของ Fe^{2+} มากขึ้น ทำให้มีการแสดงออกของ ferritin มากขึ้น อันมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระ รวมถึง biliverdin ที่ถูกเปลี่ยนเป็น bilirubin โดยอาศัยการทำงานของ biliverdin reductase ก็มีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระเช่นกัน (Chiang et al., 2018)

จากการศึกษาผลของความดันโลหิตต่อการแสดงออกของ HO-1 ในงานวิจัยก่อนหน้าพบว่าการศึกษาในหลากหลายบริเวณด้วยกัน ยกตัวอย่าง การศึกษาการแสดงออกของยีน HO-1 ใน Thoracic aorta ของ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน HO-1 ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ความดันปกติ ซึ่งการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นเกิดจากค่า systolic blood pressure เพิ่มขึ้น (Cheng et al., 2004) และการศึกษาการแสดงออกของยีน HO-1 ใน Pulmonary artery ของ SHR/KyoMlac พบว่า SHR/KyoMlac ที่อายุน้อยมีการแสดงออกของยีน HO-1 ที่น้อยลง แต่ใน SHR/KyoMlac ที่อายุมากมีการแสดงออกของยีน HO-1 ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นการแสดงออกเพื่อตอบสนองต่อความดันที่เพิ่มขึ้นจากการมีภาวะความดันโลหิตสูง (Ndisang and Wang, 2003) ทั้งนี้มีการศึกษาการแสดงออกของยีน HO-1 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน HO-1 ที่เพิ่มขึ้นใน SHR/KyoMlac ที่อายุ 20 สัปดาห์ขึ้นไปด้วย (Huang et al., 2006) จะเห็นได้ว่าภาวะความดันโลหิตสูงสามารถส่งผลต่อการแสดงออกของยีน HO-1 ได้



ภาพที่ 2-1 การควบคุมแสดงออกของยีน HO-1 โดย HIF-1 α ภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจน

2.5. หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง

หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (spontaneously hypertensive rat: SHR) เป็นหนูแรทที่มีภาวะความดันโลหิตสูงจากกรรมพันธุ์ (primary hypertension) มีการพัฒนาขึ้นโดยศาสตราจารย์โอกาโมโต มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1959 (Okamoto & Aoki,

1963) โดยเริ่มต้นผสมพันธุ์ระหว่างหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ที่เกิด spontaneous hypertension มีค่าความดันโลหิต 150–175 mmHg กับเพศเมียที่มีระดับความดันโลหิตอยู่ในช่วง 130–140 mmHg ทำการสืบสายพันธุ์ และคัดเลือกสายพันธุ์ในลักษณะการผสมแบบ Brother and sister mating system นาน 3 รุ่น จนกระทั่งได้สัตว์ทดลองเลือดชิด (Inbred animal) ที่แสดงคุณลักษณะของความดันโลหิตสูง 100% ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ในปัจจุบัน SHR มี Subline diverge หลายชนิด เช่น SHR/NHsd, SHR-stroke prone และ hypercholesterolemia เพื่อเป็น animal models สำหรับใช้ประโยชน์ในการศึกษาของโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด ทั้งนี้ยังมีการรายงานถึงการนำ SHR ศึกษา hypertensive brain damage (Li et al., 2016) เนื่องด้วย SHR/Kyo มีลักษณะของการเป็นความดันโลหิตสูงที่คล้ายคลึงกับโรคความดันโลหิตสูงในมนุษย์ ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (National Laboratory Animal Center, Mahidol University) จึงได้มีการนำ SHR/Kyo มาสืบสายพันธุ์ และเพาะขยายพันธุ์เป็น SHR/KyoMlac เพื่อให้บริการแก่นักวิจัย และนักวิทยาศาสตร์ภายในประเทศ (Chantip et al., 2012)

SHR/KyoMlac ซึ่งเป็นตัวแทนของหนูที่มีความดันโลหิตสูงจากกรรมพันธุ์ จะเริ่มมีความดันที่สูงขึ้นเมื่ออายุ 6–7 สัปดาห์ และสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนเสถียรที่อายุ 17–19 สัปดาห์ (Reckelhoff et al., 2018) จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความดันโลหิตที่เพิ่มขึ้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดประสิทธิภาพในการ synapse กันของเซลล์ประสาทและยังลดการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ synapse ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งสามารถส่งผลกระทบต่อการเรียนรู้และการสร้างความทรงจำ (Tucsak et al., 2017) อย่างไรก็ตามปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อสมองของ SHR/KyoMlac ไม่ได้มีเพียงความดันโลหิตที่สูงขึ้น แต่อาจเกิดจากการมีอายุที่มากขึ้นได้ด้วย โดยอายุที่มากขึ้นมีผลให้จำนวนเซลล์ประสาทลดลง ลดความยืดหยุ่นของเซลล์ และเพิ่มการใช้ออกซิเจนมากขึ้น (Tayebati et al., 2012) จากการศึกษาใน SHR/KyoMlac ที่อายุ 4, 8, 16 และ 24 สัปดาห์ พบว่ามีน้ำหนักสมองและปริมาณ grey matter ลดลง ซึ่งการลดลงในช่วงแรกคาดว่าเกิดจากกรรมพันธุ์และอาจเกิดจากความดันโลหิตสูงในช่วงต่อมา (Mignini et al., 2004) และการศึกษาใน SHR/KyoMlac ที่อายุ 32 และ 64 สัปดาห์ พบว่ามีการตายของเซลล์ประสาทและมีภาวะ oxidative stress เกิดขึ้น เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระและการต้านของสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งเกิดขึ้นได้เมื่อมีอายุมากขึ้น (Li et al., 2016)

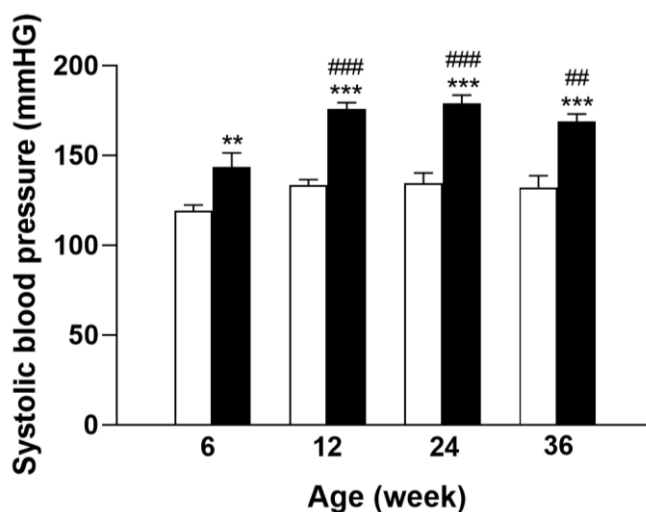
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

3.1. การสอบสวนเอกสารและการค้นคว้าข้อมูล

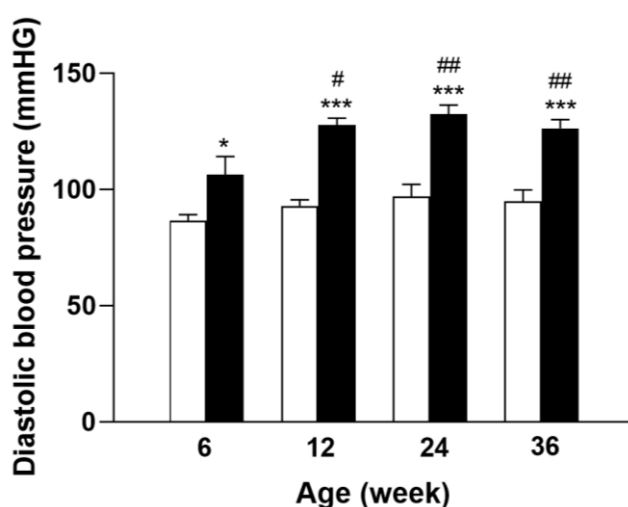
ค้นคว้างานวิจัยเกี่ยวกับการเกิดภาวะพร่องออกซิเจนในสมองที่เกิดจากภาวะความดันโลหิตสูง เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานและเพื่อหาแนวทางการศึกษาวิจัยที่เหมาะสม

3.2. การทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

ในการทดลองนี้จะทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เทกซ์ของหนูแรทเพศผู้ที่มีความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง spontaneous hypertensive rat (สายพันธุ์ SHR/KyoMlac) และหนูกลุ่มควบคุมที่มีความดันปกติ (สายพันธุ์ WMN/NrsMlac) ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ (จำนวน 10 ตัว/กลุ่ม) หนูเหล่านี้ถูกเลี้ยงและขยายพันธุ์ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยอยู่ภายใต้การร่วมมือทำวิจัยระหว่างหน่วยแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เมื่อหนูมีอายุถึง 2 สัปดาห์ก่อนการใช้จะถูกส่งมาเลี้ยงต่อที่หน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งทั้งศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ และหน่วยสัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์นั้นได้รับการรับรองมาตรฐานการเลี้ยงและดูแลสัตว์ทั้งในระดับประเทศและระดับสากล เมื่อหนูเหล่านี้เดินทางมาที่คณะวิทยาศาสตร์จะถูกกักตัว 7 วัน เพื่อตรวจสอบสุขภาพและให้ปรับตัวได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ 21 ± 1 °C มีความชื้นสัมพัทธ์ 50–60% โดยกำหนดให้ช่วงเวลากลางวันต่อกลางคืนเป็น 12 ชั่วโมงเท่ากัน หนูที่เลี้ยงได้รับน้ำและอาหารตามที่ต้องการตลอดเวลาการเลี้ยง การศึกษานี้เป็นการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลองร่วมกับโครงการวิจัยหลักเรื่อง “การศึกษาเพื่อหาแนวทางการรักษาโรคกระดูกพรุนแบบใหม่โดยมุ่งไปที่การรักษาภาวะชราก่อนวัยอันควรควบคู่ไปกับการควบคุมความดันในหนูทดลองที่เกิดความดันโลหิตสูงได้เอง” ซึ่งผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงสัตว์ทดลองและการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ เป็นที่เรียบร้อยแล้วภายใต้โครงการเลขที่ MUSC61-0050-452 ซึ่งในการทดลองนี้ได้อาศัยข้อมูลค่าความดันโลหิตของหนูแรทจากงานวิจัยเรื่อง “เครื่องหมายชีวภาพของความชราระดับเซลล์ที่สัมพันธ์กับความดันโลหิตสูงและการสูญเสียมวลกระดูกในหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง” โดยนายรัฐพล สมสุระ ภายใต้โครงการเลขที่ MUSC59-006-339 ได้ผลดังภาพที่ 3-1 และ 3-2



ภาพที่ 3-1 ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัวของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีดำ) **, *** แสดง $P < 0.01, 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่อายุเท่ากัน และ #, ### แสดง $P < 0.01, 0.0001$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มเดียวกันที่อายุต่างกัน



ภาพที่ 3-2 ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัวของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีดำ) *, *** แสดง $P < 0.05, 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่อายุเท่ากัน และ #, ## แสดง $P < 0.05, 0.01$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มเดียวกันที่อายุต่างกัน

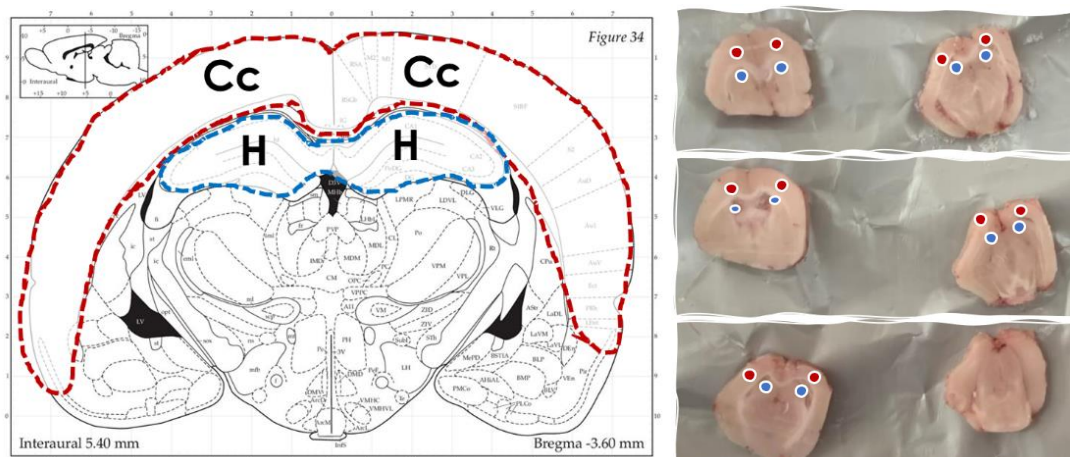
จากผลการทดลองดังภาพ 3-1 พบว่าค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจบีบตัวในกลุ่ม WMN/NrsMlac ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละอายุ ขณะที่ค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจบีบตัวในกลุ่ม SHR/KyoMlac มีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น ($P < 0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าระหว่าง

กลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่า ในกลุ่ม SHR/KyoMlac มีค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจบีบตัวสูงกว่า WMN/NrsMlac ในทุกอายุ ($P < 0.01$)

จากผลการทดลองดังภาพ 3-2 พบว่าค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจคลายตัวในกลุ่ม WMN/NrsMlac ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละอายุ ขณะที่ค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจคลายตัวในกลุ่ม SHR/KyoMlac มีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น ($P < 0.05, 0.01$) และเมื่อเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่า ในกลุ่ม SHR/KyoMlac มีค่าเฉลี่ยความดันขณะหัวใจคลายตัวสูงกว่า WMN/NrsMlac ในทุกอายุ ($P < 0.05, 0.001$)

3.3. การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท

ทำการเปิดกะโหลกของหนูแรทและนำสมองออกมาให้เร็วที่สุด จากนั้นนำมาตัด sections ด้วย brain cutting block ซึ่งจะทำบนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นแยกเอาเฉพาะสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ออกมาดังภาพที่ 3-3 จากนั้นทำตัวอย่างสมองที่ได้ไปเก็บรักษาไว้ในตู้ -80°C



ภาพที่ 3-3 Brain sections สมองของหนูแรทแสดงบริเวณฮิปโปแคมปัส (สีน้ำเงิน) และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (สีแดง) แหล่งที่มา: <http://labs.gaidi.ca/rat-brain-atlas/?ml=2.5&ap=-3.5&dv=1.6>

[2021, May 25]

3.4. การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

3.4.1. การสกัด RNA

นำสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทมาชั่งน้ำหนักให้ได้ 50–100 mg เติม TRIzol[®] reagent 500 μl และทำการบดให้เซลล์แตกโดยใช้ homogenizer จากนั้นเติม TRIzol[®] reagent อีก 300 μl เพื่อให้ได้ปริมาตรที่ต้องการแล้วจึงนำไป vortex และทิ้งไว้ 5 นาทีที่

อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติม chloroform 200 μ l และเขย่าแรง ๆ 15 วินาที ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารตัวอย่างที่แบ่งออกเป็น 3 ชั้น โดยชั้นล่างจะเป็นสีชมพูซึ่งเป็นส่วนของโปรตีน ชั้นกลางเป็นสีขาวขุ่นเป็นส่วนของ DNA และชั้นบนจะไม่มีสีเป็นชั้นของ RNA ให้ปิเปตต์ดูดชั้นบนใส่หลอดใหม่อย่างระมัดระวัง จากนั้นเติม isopropanol 500 μ l และเขย่าเบา ๆ ทิ้งไว้ 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง นำไป centrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 15 นาที จะได้สารตัวอย่างใสและมี RNA pellet เป็นตะกอนสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด ให้เทส่วนใสทิ้งอย่างระมัดระวัง จากนั้นเติม 75% ethanol 1 ml เพื่อล้างเกลือส่วนเกินออก และเก็บรักษาไว้ในตู้ -20 $^{\circ}$ C

3.4.2. การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA

นำ RNA ที่เก็บไว้มา spin down ที่ความเร็ว 1,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นปิเปตต์ 75% ethanol ออกให้มากที่สุดอย่างระมัดระวัง โดยทำใน laminar flow และทำ air dry โดยเปิดฝาหลอดทิ้งไว้ 30 นาทีเพื่อให้ ethanol ระเหยจนหมด RNA pellet จะมีลักษณะเหมือนเจลใส ๆ ที่ก้นหลอด จากนั้นละลาย RNA ด้วย diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water แล้วปิเปตต์ขึ้นลงเบา ๆ เพื่อให้เข้ากันและนำไป spin down อีกครั้ง จากนั้นนำไปวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ด้วยเครื่อง Thermo Scientific™ NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer หากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm อยู่ระหว่าง 1.9 ถึง 2.1 จะถือว่า RNA มีความบริสุทธิ์เพียงพอที่จะนำไปสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

3.4.3. การสังเคราะห์ cDNA

นำค่า RNA concentration ที่ได้จากขั้นตอน 3.4.2. มาคำนวณหาปริมาณ RNA (μ l) ที่ต้องใช้เพื่อให้ได้ความเข้มข้น 5 μ g/ μ l RNA ดังสมการ

$$\text{RNA volume } (\mu\text{l}) = \frac{5,000}{\text{RNA concentraion (ng}/\mu\text{l})}$$

จากนั้นเติม DEPC-treated water เพื่อให้ได้ปริมาตรรวม 10 μ l ในการสังเคราะห์ cDNA จะใช้ Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, UK) โดยใน 1 reaction ประกอบด้วย

Chemical reagent	Volume (μ l)
5x RT Buffer	4
Oligos primer	1

Chemical reagent	Volume (μ l)
Random hexamer primer	1
10mM dNTP mix	1
RNase Inhibitor	1
Tetro Reverse Transcriptase	1
DEPC-treated water	1
Total	10

จากนั้นนำไปผสมกับ RNA ที่ปริมาตร 10 μ l ทำให้ได้ปริมาตรทั้งหมดเป็น 20 μ l จากนั้นนำมาเข้าเครื่อง BioRad T100™ Thermal Cycler เพื่อเริ่มการสังเคราะห์ โดยเริ่มบ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 10 นาที และ 45 °C เป็นเวลา 30 นาทีตามลำดับ จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วยการบ่มที่อุณหภูมิ 85 °C เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C และเก็บรักษาไว้ในตู้ -20 °C

3.5. การออกแบบและทดสอบประสิทธิภาพของ primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR

3.5.1. การออกแบบ primer

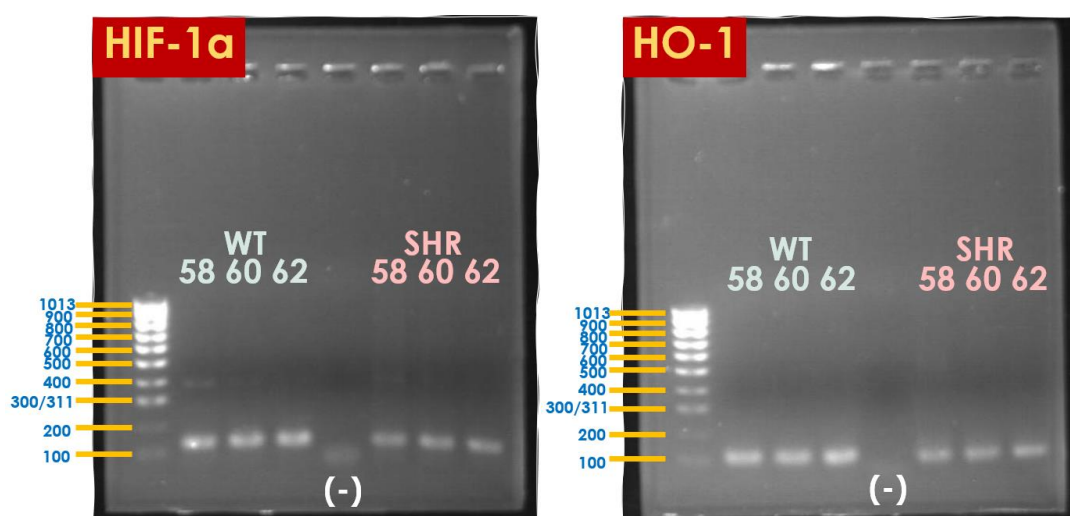
ค้นคว้างานวิจัยที่ใช้ real-time PCR ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต้องการ ได้แก่ *HIF-1 α* และ *HO-1* เพื่อหาลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีนเหล่านี้ในหนูแรท ทั้งนี้เพื่อเป็นการลดผลที่อาจเกิดจากปัจจัยอื่น จึงทำการศึกษาการแสดงออกใน housekeeping gene ด้วยซึ่งเป็นยีนที่จะไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกภายใต้สภาวะต่าง ๆ ที่เกิดจากการทดลอง โดยในการทดลองนี้คือ ribosomal protein S28 gene (S28) ซึ่งได้ลำดับดังตารางที่ 3-1 จากนั้นนำลำดับของ primer มาทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ Primer-BLAST ร่วมกับ Primer3 version 0.4.0 ดังตารางที่ 3-2 ก่อนจะสั่งซื้อ primer ที่มีลำดับตามที่ต้องการจากบริษัท Macrogen Korea

ตารางที่ 3-1 ลำดับ primer ของยีน *HIF-1 α* , *HO-1* และ *S28* ใน *Rattus norvegicus*

Gene	Primer		Product length (bp)	Reference
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
<i>HIF-1α</i>	AGAGTCAAGCCCAGAG TCAC	TGGGACTGTTAGGCTC AGGT	116	Wu et al., 2020

Chemical reagent	Volume (μ l)
Forward primer	0.5
Reverse primer	0.5
MyTaq HS Red Mix, 2x	12.5
DEPC-treated water	6.5
cDNA template	5.0
Total	25

กำหนด annealing temperature (T_a) ที่ต้องการทดสอบไว้อย่างน้อย 3 ระดับ ได้แก่ 58 °C 60 °C และ 62 °C จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทดสอบด้วย gel electrophoresis โดยนำ agarose 3 g มาละลายด้วย Tris-acetate-EDTA (TAE) 200 ml เพื่อให้ได้ 1.5% agarose gel จากนั้นนำไปอุ่นด้วยไมโครเวฟ 500 W เป็นเวลา 1 นาทีและเขย่าเบา ๆ จนสารละลายเข้ากัน ตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิลดลงประมาณ 50–60 °C เติม 1x safe DNA gel stain 20 μ l เขย่าเล็กน้อยและเทลง block ที่เตรียมไว้ รอให้เจลแข็งตัว จากนั้นนำเจลลงมาวางในถาดสำหรับ run เจล เท TAE ให้ท่วมเจลขึ้นมาเล็กน้อย ผสม PCR product กับ tracking dye ที่หยดไว้บนพาราฟิล์มให้เข้ากัน หยอด hyperladder 3 μ l และ PCR product ดังกล่าวอย่างละ 10 μ l ลงแต่ละหลุมในเจลตามที่กำหนด ปิดฝาถาดและเริ่ม run โดยตั้งค่าศักย์ไฟฟ้า 135 V เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำเจลมาส่องดู PCR product โดยใช้เครื่อง FluoroBox และปรับความคมชัดของภาพโดยใช้โปรแกรม NEOimage for FluoroBox ได้ผลดังภาพที่ 3-4 จากผลพบว่า primer ของทั้งยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ให้ 1 PCR product เท่านั้น ไม่เกิด non-specific band และขนาดที่ได้มีความใกล้เคียงกับ product length ที่ควรจะได้เมื่อเทียบกับ hyperladder โดยที่อุณหภูมิ 60 °C ให้แถบของ product ชัดเจนที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับผลที่ 58 °C และ 62 °C ดังนั้น T_a ที่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR ในครั้งนี้คือ 60 °C



ภาพที่ 3-4 ผลการทดสอบ PCR product ของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ที่อุณหภูมิ 58 °C 60 °C และ 62 °C ด้วยวิธี gel agarose electrophoresis

3.6. การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR

นำ cDNA มาเจือจางด้วย DEPC-treated water 80 μ l ซึ่งการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR จะใช้ SensiFAST SYBR Hi-ROX mix (Bioline, UK) ซึ่งใน 1 reaction ประกอบด้วย

Chemical reagent	Volume (μ l)
10 μ M Forward primer	0.8
10 μ M Reverse primer	0.8
2x SensiFAST SYBR Hi-ROX mix, 2x	10
DEPC-treated water	3.4
Total	20

นำ cDNA 5 μ l มาผสมกับ reaction mixture 15 μ l ใน 96-well reaction plate โดยทำเช่นเดียวกันทั้งยีน *HIF-1 α* , *HO-1* และ *S28* จากนั้นปิดด้วย optical adhesive cover นำไป spin down ที่ความเร็ว 1,600 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำมาเข้าปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ Step One™ Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystem, USA) ใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาทีในขั้น polymerase activation ใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 วินาทีในขั้น denaturation ใช้ T_a 60 °C เป็นเวลา 10 วินาทีสำหรับขั้น annealing/extension และเวียนขั้น denaturation และ annealing/extension ทั้งหมด 40 รอบ เมื่อเสร็จสิ้นจะได้ค่า cycle threshold

(Ct) ของแต่ละตัวอย่าง จากนั้นจึงนำค่า Ct มาคำนวณการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี $2^{-\Delta Ct}$ ดังสมการ

$$\text{Relative gene expression} = 2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct \text{ gene of interest} - Ct \text{ housekeeping gene})}$$

จากนั้นนำค่าเฉลี่ยมาหา fold change และหา SE fold change

3.7. การวิเคราะห์ทางสถิติ

เมื่อพิจารณาการกระจายของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk Test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 พบว่ากลุ่มข้อมูลส่วนใหญ่มีการกระจายตัวแบบปกติ ส่วนข้อมูลที่เป็น outlier จะถูกตัดออก ข้อมูลที่แสดงการกระจายตัวแบบปกติและมีความเหมือนกันของความแปรปรวน จะถูกวิเคราะห์โดยใช้ One-way ANOVA และทดสอบ Tukey's HSD เพื่อกำหนดความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ของผลของอายุต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac และใช้ Independent samples *t* test ในการวิเคราะห์ผลของการแสดงออกของยีนดังกล่าวระหว่าง WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac ที่อายุเท่ากัน การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* แสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย \pm ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean: SEM) ยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P \leq 0.05$)

บทที่ 4
ผลการศึกษา

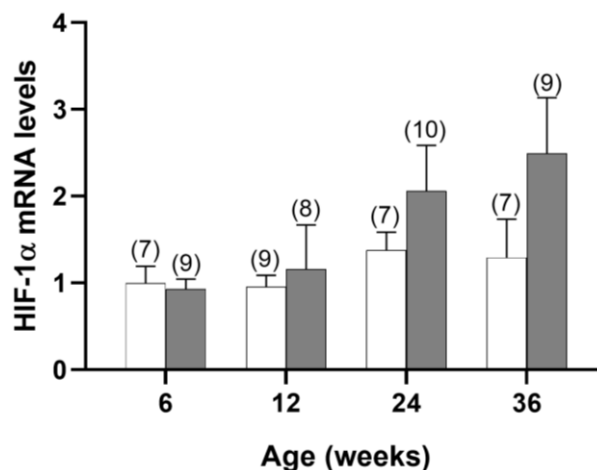
4.1. การเปลี่ยนแปลงของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac

4.1.1. การแสดงออกของยีน *HIF-1 α*

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ของกลุ่ม WMN/NrsMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-1

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac ($P > 0.05$) แต่มีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุ 36 สัปดาห์ ($P = 0.133$) ดังภาพที่ 4-1

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac ไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-1



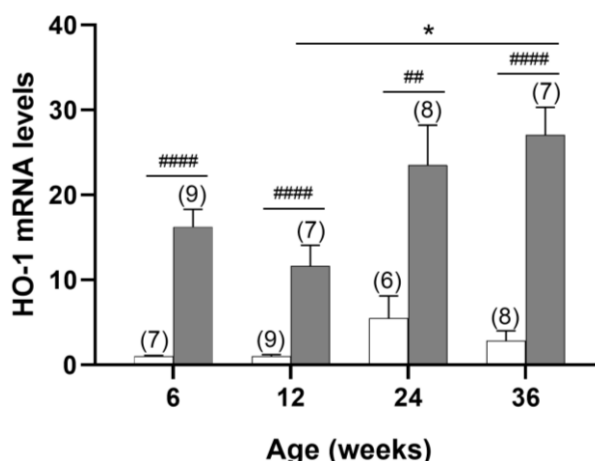
ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีเทา) (ตัวเลขในวงเล็บบ่งบอกจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม)

4.1.2. การแสดงออกของยีน *HO-1*

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HO-1* ของกลุ่ม WMN/NrsMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-2

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HO-1* ของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าที่อายุ 36 สัปดาห์มีการแสดงออกของยีน *HO-1* เพิ่มขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอายุ 12 สัปดาห์ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากอายุ 6 และ 24 สัปดาห์ ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-2

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HO-1* ระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของกลุ่ม SHR/KyoMlac สูงกว่า กลุ่ม WMN/NrsMlac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ($P < 0.01$) ดังภาพที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 การแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีเทา) * แสดง $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มเดียวกันที่อายุต่างกัน และ #, ###, #### แสดง $P < 0.01, 0.001, 0.0001$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่อายุเท่ากัน (ตัวเลขในวงเล็บบ่งบอกจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม)

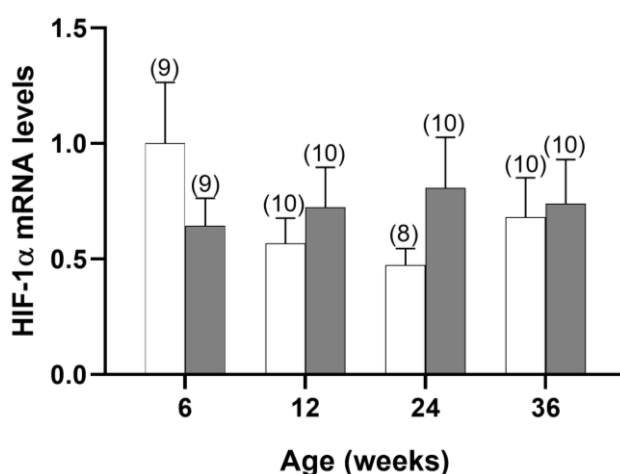
4.2. การเปลี่ยนแปลงของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac

4.2.1. การแสดงออกของยีน *HIF-1 α*

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ของกลุ่ม WMN/NrsMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-3

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ SHR/KyoMlac ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-3

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac ไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-3



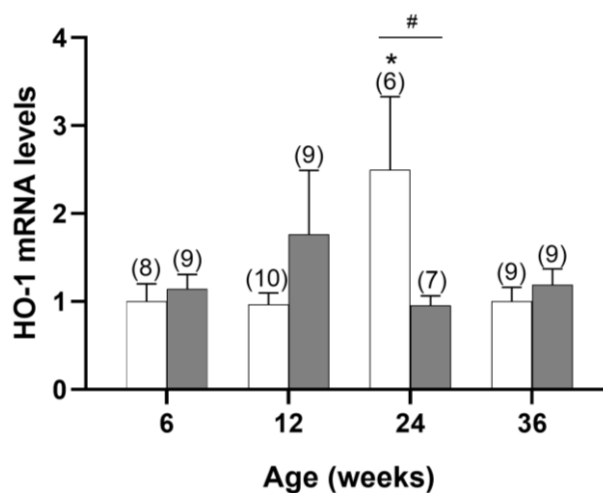
ภาพที่ 4-3 การแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีเทา) (ตัวเลขในวงเล็บบ่งบอกจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม)

4.2.2. การแสดงออกของยีน *HO-1*

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HO-1* ของกลุ่ม WMN/NrsMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าที่อายุ 24 สัปดาห์มีผลการแสดงออกของยีน *HO-1* มากขึ้นในสมองซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอายุ 6, 24 และ 36 สัปดาห์ ดังภาพที่ 4-4

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของยีน *HO-1* ของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ SHR/KyoMlac ($P > 0.05$) ดังภาพที่ 4-4

จากการเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HO-1* ระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของกลุ่ม WMN/NrsMlac สูงกว่ากลุ่ม SHR/KyoMlac อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อายุ 24 สัปดาห์ ($P < 0.05$) ดังภาพที่ 4-4



ภาพที่ 4-4 การแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของ WMN/NrsMlac (สีขาว) และ SHR/KyoMlac (สีเทา) * แสดง $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มเดียวกันที่อายุต่างกัน และ # แสดง $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่อายุเท่ากัน (ตัวเลขในวงเล็บบ่งบอกจำนวนสัตว์ทดลองในแต่ละกลุ่ม)

บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

การศึกษานี้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนคือ ยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ โดยยีน *HIF-1 α* จะมีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนและไปเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีนอื่น หนึ่งในนั้นคือยีน *HO-1* ซึ่งทำหน้าที่ในการสร้างเอนไซม์ไปสลาย heme เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นสารที่สามารถต้านอนุมูลอิสระได้

จากผลการศึกษาพบว่า การแสดงออกของยีน *HO-1* สูงขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac ที่อายุ 6, 12, 24, และ 36 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับ WMN/NrsMlac ที่อายุเท่ากัน ในขณะที่กลุ่ม WMN/NrsMlac ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนนี้ในทุกอายุ แสดงว่าอายุอาจจะไม่ใช่ปัจจัยที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนนี้ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เมื่อพิจารณาที่ค่าความดันโลหิตพบว่า SHR/KyoMlac มีภาวะความดันโลหิตสูงตั้งแต่อายุ 6 สัปดาห์เมื่อเทียบกับกลุ่ม WMN/NrsMlac ซึ่งสอดคล้องกับการแสดงออกของ ยีน *HO-1* ที่พบการแสดงออกตั้งแต่อายุ 6 สัปดาห์เช่นกันในกลุ่ม SHR/KyoMlac ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าปัจจัยที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *HO-1* น่าจะเป็นความดันโลหิตที่สูงขึ้น จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าความดันโลหิตสูงจะส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น reactive oxygen species (ROS) ที่สามารถก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของการสร้างอนุมูลอิสระและการต้านของสารต้านอนุมูลอิสระ (Reckelhoff et al., 2018) โดย ROS สามารถเกิด oxidation กับโมเลกุลภายในเซลล์ประสาทหรือเซลล์เกลียจนทำให้เซลล์เกิด apoptosis หรือ necrosis ได้ (Loh et al., 2006) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* ที่มีมากขึ้นเป็นการตอบสนองต่อภาวะ oxidative stress เพื่อป้องกันการตายของเซลล์ประสาท

อย่างไรก็ตามในกลุ่ม WMN/NrsMlac พบการแสดงออกของยีน *HO-1* ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นที่อายุ 24 สัปดาห์ ขณะที่กลุ่ม SHR/KyoMlac ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนนี้ในทุกอายุ แสดงว่าอายุอาจจะจะเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนนี้ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้มีการสร้าง ROS ที่มากขึ้นได้ด้วย (Stefanatos and Sanz, 2017) ซึ่งปริมาณ ROS ระดับปกติจะมีส่วนช่วยในการเจริญและการทำงานของเซลล์ประสาท แต่ถ้ามีปริมาณของ ROS ที่มากเกินไปจะสามารถทำให้เกิดภาวะ oxidative stress (Salim, 2016) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* ที่เพิ่มขึ้นในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ น่าจะเป็นการตอบสนองต่อภาวะ oxidative stress เพื่อป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเช่นกัน แต่ที่การแสดงออกของยีนนี้พบได้ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม

SHR/KyoMlac ได้เร็วกว่าในหนูกลุ่ม WMN/NrsMlac น่าจะเป็นเพราะเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีความไวต่อภาวะ oxidative stress มาก หากเกิด oxidative stress ขึ้น ฮิปโปแคมปัสจะเป็นส่วนที่มีการทำงานลดลงก่อนสมองส่วนอื่น (Salim, 2016)

จากผลการศึกษาไม่พบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* เมื่ออายุมากขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ทั้งใน WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac แต่มีแนวโน้มว่าจะมีการแสดงออกที่มากขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 36 สัปดาห์ จึงอาจจะเป็นไปได้ว่าภาวะพร่องออกซิเจนอาจเกิดได้หลังจากเกิดภาวะความดันโลหิตสูงเป็นเวลานาน ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงที่พบได้ในฮิปโปแคมปัสแต่ไม่พบในซีรีบรัลคอร์เท็กซ์อาจเป็นเพราะเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะมีความไวต่อภาวะพร่องออกซิเจนมากกว่า และภาวะพร่องออกซิเจนอาจยังไม่ก่อความเสียหายจนลุกลามไปถึงสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (Turetz and Crystal, 2007) และจากที่ได้กล่าวไปในเบื้องต้นว่ายีน *HIF-1 α* จะมีบทบาทในการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนและไปเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของยีน *HO-1* แต่ผลกลับพบว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* เพิ่มขึ้นที่สัมพันธ์กับค่าความดันโลหิตที่สูงขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ซึ่งจากงานวิจัย senior project เรื่อง “การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท ความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง” ของนางสาวเกต พรถวัลค์ศักดิ์ พบว่ามีการแสดงออกของยีน *S100 Calcium Binding Protein B (S100 β)* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของกลุ่ม SHR/KyoMlac ที่อายุ 6 สัปดาห์ ซึ่ง *S100 β* เป็นยีนที่จะมีการแสดงออกเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของ blood brain barrier (BBB) permeability นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าระดับ *S100 β* ที่เพิ่มขึ้นในสมองมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการสูญเสียการเชื่อมต่อของเส้นประสาทในโรคทางระบบประสาท (Kawata et al., 2016; Sheng et al., 1994) จากที่กล่าวมาทั้งหมดจึงมีความเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *HO-1* ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่ได้เกิดจาก *HIF-1 α* pathway แต่อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของ BBB permeability และเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

บทที่ 6

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1. สรุปผลการศึกษา

อายุที่มากขึ้นไม่ได้ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *HIF-1 α* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของทั้ง WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac และเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีน *HO-1* ระหว่างกลุ่ม WMN/NrsMlac และ SHR/KyoMlac พบว่ามีการแสดงออกของยีน *HO-1* มากขึ้นในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของ SHR/KyoMlac ซึ่งสัมพันธ์กับความดันโลหิตที่สูงขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของยีนดังกล่าวในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ และในกลุ่ม WMN/NrsMlac พบว่ามีการแสดงออกของยีน *HO-1* มากขึ้นที่อายุ 24 สัปดาห์เท่านั้น สรุปได้ว่าความดันโลหิตสูงส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งสามารถตรวจพบได้ตั้งแต่ช่วงแรกของการเกิดความดันโลหิตสูง จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความทรงจำมีความไวต่อภาวะความดันโลหิตสูงมากกว่าสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้และประมวลผลได้

6.2. ข้อเสนอแนะ

6.2.1. ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เองในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพียงการแสดงออกของยีนเท่านั้น ควรจะมีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มเติมด้วย เนื่องจากยีน *HIF-1 α* จะพบการแสดงออกได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติและออกซิเจนต่ำ ขณะที่ *HIF-1 α* protein จะถูกย่อยสลายไปอย่างรวดเร็วในสภาวะออกซิเจนปกติ จึงทำให้พบการแสดงออกได้น้อย แต่ในภาวะพร่องออกซิเจน *HIF-1 α* protein จะมีความเสถียร จึงทำให้พบการแสดงออกได้มากกว่า (Azimi, 2018) และจากสถานการณ์การระบาดของเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 ทำให้ไม่สามารถตรวจสอบความจำเพาะของ primer ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ได้ จึงยังไม่สามารถยืนยันได้แน่นอนว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ PCR product ที่ได้ตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ต้องการหรือไม่

6.2.2. ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

ความสัมพันธ์ของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงของยีน *HIF-1 α* และ *HO-1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง สามารถนำไปใช้เป็น

ฐานข้อมูลในการศึกษาการเกิดภาวะพร่องออกซิเจนและการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในสมองของผู้ที่มีภาวะ primary hypertension รวมถึงเป็นฐานข้อมูลในการพัฒนาการรักษาโรคทางระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

- Anishchenko, A.M., Aliev, O.I., Sidekhmenova, A.V., Shamanaev, A.Y. and Plotnikov, M.B. 2015. Dynamics of blood pressure elevation and endothelial dysfunction in SHR rats during the development of arterial hypertension. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 159: 591–593. doi: 10.1007/s10517-015-3020-8
- Azimi, I. 2018. The interplay between HIF-1 and calcium signalling in cancer. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 97: 73–77. doi: 10.1016/j.biocel.2018.02.001
- Boss, V., Sola, A., Wen, T.C. and Decker, M.J. 2005. Mild intermittent hypoxia does not induce stress responses in the neonatal rat brain. *Biology of Neonate*. 88: 313–320. doi: 10.1159/000087629
- Britannica, ed. 2020. Hypoxia[online]. Available from: <https://www.britannica.com/science/hypoxia>[2021, April 13]
- Chantip, S., Laosantisuk, A., Chomanee, P., Keawmanee, W., Ampawong, S., Maung Zaw, K. and Kaengkhum, K. 2012. Proceedings of 50th Kasetsart university annual conference: animals, veterinary medicine, fisheries. Bangkok: Kasetsart university.
- Chen, J. 2014. Heme oxygenase in neuroprotection: from mechanisms to therapeutic implications. *Reviews in the Neurosciences*. 25: 269–80. doi: 0.1515/revneuro-2013-0046
- Cheng, P.Y., Chen, J.J. and Yen, M.H. 2004. The expression of heme oxygenase-1 and inducible nitric oxide synthase in aorta during the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Hypertension*. 17:1127–1134. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.07.018
- Chiang, S.K., Chen, S.E. and Chang, L.C. 2018. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 20: 39. doi: 10.3390/ijms20010039
- Colli, L.G., Belardin, L.B., Echem, C., Akamine, E.H., Antoniassi, M.P., Andretta, R.R., Mathias, L.S., Paula Rodrigues, S.F., Bertolla, R.P. and Carvalho, M.H.C. 2019. Systemic arterial hypertension leads to decreased semen quality and

- alterations in the testicular microcirculation in rats. *Scientific Reports*. 9: 11047. doi: 10.1038/s41598-019-47157-w
- D'Amico, G., Lam, F., Hagen, T. and Moncada, S. 2006. Inhibition of cellular respiration by endogenously produced carbon monoxide. *Journal of Cell Science*. 119: 2291–2298. doi: 10.1242/jcs.02914
- Dengler, V.L., Galbraith, M. and Espinosa, J.M. 2014. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Critical Reviews Biochemistry and Molecular Biology*. 49: 1–15. doi: 10.3109/10409238.2013.838205
- Eckman, M. and Share, D. editor. 2012. *Pathophysiology made incredibly easy*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Fainanta, T., Jaroenporn, S., Wititsuwankul, P. and Malaivijitnond, S. 2019. Chronological molecular changes in neuronal communication in androgen-deficient rats. *Journal of Molecular Neuroscience*. 69: 83–93. doi: 10.1007/s12031-019-01335-7
- Ferdinand, P. and Roffe, C. 2016. Hypoxia after stroke: a review of experimental and clinical evidence. *Experimental & Translational Stroke Medicine*. 8: 9. doi: 10.1186/s13231-016-0023-0
- Haddad, G.G. and Yu, S.P. 2009. *Brain hypoxia and ischemia with special emphasis on development*. 1st ed. New Jersey: Humana Press.
- Helton, R., Cui, J., Scheel, J.R., Ellison, J.A., Ames, C., Gibson, C., Blouw, B., Ouyang, L., Dragatsis, I., Zeitlin, S., Johnson, R.S., Lipton, S.A. and Barlow, C. 2005. Brain-specific knock-out of hypoxia-inducible factor-1 α reduces rather than increases hypoxic-ischemic damage. *Journal of Neuroscience*. 25: 4099–4107. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4555-04.2005
- Huang, Y., Wu, L., Xu, C., Yang, B. and Wang, R. 2006. Increased HO-1 Expression and decreased iNOS expression in the hippocampus from adult spontaneously hypertensive rats. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 46: 35–42. doi: 10.1385/CBB:46:1:35
- Kawata, K., Liu, C.Y., Merkel, S.F., Ramirez, S.H., Tierney, R.T. and Langford, D. 2016. Blood biomarkers for brain injury: what are we measuring?. *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 68: 460–473. doi: 10.1016/j.neubiorev.2016.05.009

- Li, Y., Liu, J., Gao, D., Wei, J., Yuan, H., Niu, X., and Zhang, Q. 2016. Age-related changes in hypertensive brain damage in the hippocampi of spontaneously hypertensive rats. *Molecular Medicine Reports*. 13: 2552–2560. doi: 10.3892/mmr.2016.4853
- Loh, K.P., Huang, S.H., Silva, R.D., Tan, B.K.H. and Zhu, Y.Z. 2006. Oxidative stress: apoptosis in neuronal injury. *Current Alzheimer Research*. 3: 327–337. doi: 10.2174/156720506778249515
- Manninen, P.H. and Unger, Z.M. 2016. Hypoxia. In Prabhakar, H. (ed.), *Complications in Neuroanesthesia*, pp. 169–180. Massachusetts: Academic Press.
- McCance, K.L. and Huether, S.E. 2019. *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. 8th ed. St. Louis: Mosby.
- Mignini, F., Vitaioli, L., Sabbatini, M., Tomassoni, D. and Amenta, F. 2004. The cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats: a quantitative microanatomical study. *Clinical and Experimental Hypertension*. 26: 287–303. doi: 10.1081/ceh-120034135
- Ndisang, J.F. and Wang, R. 2003. Alterations in heme oxygenase/carbon monoxide system in pulmonary arteries in hypertension. *Experimental Biology and Medicine*. 228: 557–63. doi: 10.1177/15353702-0322805-27
- Nalivaeva, N.N. and Rybnikova, E.A. 2019. Editorial: brain hypoxia and ischemia: new insights into neurodegeneration and neuroprotection. *Frontiers in Neuroscience*. 13: 770. doi: 10.3389/fnins.2019.00770
- Reckelhoff, J.F., Yanes Cardozo, L.L. and Alarcon Fortepiani, M.L. 2018. Models of hypertension in aging. In: Ram, J.L. and Conn, P.M. (Ed.), *Conn's Handbook of Models for Human Aging*, pp. 703–720. Massachusetts: Academic Press.
- Ritz, M.F., Fluri, F., Engelter, S.T., Schaeren-Wiemers, N. and Lyrer, P.A. 2009. Putamen age-related changes in the microvessel density and astrocyte deficiency in spontaneously hypertensive and stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Current Neurovascular Research*. 6: 279–287. doi: 10.2174/156720209789630311
- Rosenberg, G.A. 2015. Metalloproteinases and neurodegenerative diseases: pathophysiological and therapeutic perspectives. *Metalloproteinases in Medicine*. 2: 39–50. doi: 10.2147/MNM.

- Rosto, E. editor. 2008. Pathophysiology made incredibly easy. 4th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Salim, S. 2016. Oxidative stress and the central nervous system. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 360: 201–205. doi: 10.1124/jpet.116.237503
- Sharp, F.R., Bergeron, M. and Bernaudin, M. 2001. Hypoxia-inducible factor in brain. In Roach, R.C., Wagner, P.D. and Hackett, P.H. (eds.), *Hypoxia: from genes to the bedside*, pp. 273–291. Massachusetts: Springer.
- Sheng, J.G., Mrak, R.E. and Griffin, W.S. 1994. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *Journal of neuroscience research*. 39: 398–404. doi: 10.1002/jnr.490390406
- Stefanatos, R. and Sanz, A. 2017. The role of mitochondrial ROS in the aging brain. *FEBS Letters*. 592: 743–758. doi:10.1002/1873-3468.12902
- Stone, B.L. 2007. Hypoxemia. In Zaoutis, L.B. and Chiang, V.W. (eds.), *Comprehensive Pediatric Hospital Medicine*, pp. 181-189. St. Louis: Mosby.
- Tayebati, S.K., Tomassoni, D. and Amenta, F. 2012. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: microanatomy, neurochemistry and behavior. *Journal of the Neurological Sciences*. 322: 241–249. doi: 10.1016/j.jns.2012.05.047
- Tian, X., Zhou, N., Yuan, J., Lu, L., Zhang, Q., Wei, M., Zou, Y. and Yuan, L. 2019. Heat shock transcription factor 1 regulates exercise-induced myocardial angiogenesis after pressure overload via HIF-1 α /VEGF pathway. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 24: 2178–2188. doi: 10.1111/jcmm.14872
- Tucsak, Z., Valcarcel-Ares, M.N., Tarantini, S., Yabluchanskiy, A., Fülöp, G., Gautam, T., Orock, A., Csiszar, A., Deak, F. and Ungvari, Z. 2017. Hypertension-induced synapse loss and impairment in synaptic plasticity in the mouse hippocampus mimics the aging phenotype: implications for the pathogenesis of vascular cognitive impairment. *GeroScience*. 39: 385–406. doi: 10.1007/s11357-017-9981-y
- Turetz, M.L. and Crystal, R.G. 2007. Mechanisms and consequences of central nervous system hypoxia. In: Gilman, S. (Ed.), *Neurobiology of Disease*, pp. 681–688.

Wu, X., Wang, C., Wang, J., Zhu, M., Yao, Y. and Liu, J. 2020. Hypoxia preconditioning protects neuronal cells against traumatic brain injury through stimulation of glucose transport mediated by HIF-1 α /GLUTs signaling pathway in rat. *Neurosurgical Review*. 2: 1–2. doi: 10.1007/s10143-019-01228-8