

ผลของการใช้ยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไต
วายระยะเริ่มแรก



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาอายุรศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CILOSTAZOL ADMINISTRATION ON INTIMAL HYPERPLASIA IN EARLY
STAGE OF POST-ISCHEMIC/ REPERFUSION CHRONIC KIDNEY DISEASE MICE
MODEL

Mr. Wiwat Chancharoenthana



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Medicine

Department of Medicine

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของการใช้ยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายระยะเริ่มแรก
โดย	นายวิวัฒน์ จันเจริญฐานะ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อัมภาศ ลีพหวนิชกุล

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์ ธนินทร์ อัศววิเชียรจินดา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สมชาย เอี่ยมอ่อง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายแพทย์ ขจร ตีรณธนากุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร. นายแพทย์ อัมภาศ ลีพหวนิชกุล)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ กัมมันต์ พันธุมจินดา)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิง สมนพร บุญยะรัตเวช สองเมือง)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(นายแพทย์ กำธร ลีลามะลิ)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูปภาพ	ญ
สารบัญแผนภูมิ.....	ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)	1
1.2 คำถามการวิจัย (Research questions)	2
1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives).....	2
1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)	3
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)	4
1.6 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	4
1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Considerations)	5
1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits and Application)	5
1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการศึกษาและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve the Problems)	6
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 กลไกการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา	7
2.2 ไมโคร-อาร์เอ็นเอที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา	10

2.3 สารไซโตคายน์และสารอื่นๆ ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา	11
2.4 การควบคุมและชะลอการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา	19
2.5 ผลของยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา	21
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	22
3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)	22
3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)	22
3.3 การดำเนินการวิจัย.....	23
3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)	37
3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)	37
บทที่ 4 ผลการวิจัย	38
4.1 ผลการศึกษาจากการศึกษาทดลองนำ (pilot study).....	38
4.2 ข้อมูลพื้นฐานของหนูทดลองที่ใช้ในการศึกษา.....	38
4.3 ผลการศึกษา	39
บทที่ 5 อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	48
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	48
5.2 อภิปรายผลการวิจัย	48
5.3 ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitation)	53
5.4 ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (implication for practice) และการนำไปใช้ เชิงวิจัยในอนาคต (implication for further research).....	54
รายการอ้างอิง.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	92

สารบัญตาราง

หน้า

.ตารางที่ 2.1 ยาและสารต่างๆ ที่มีการศึกษาถึงผลการชะลอการหนาตัวของหลอดเลือดชั้น อินทิมา.....	20
ตารางที่ 3.1 ระยะเวลาและขั้นตอนวิธีการศึกษา	26
ตารางที่ 3.2 แสดงเปรียบเทียบการเตรียม standard dilution	32
ตารางที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ VEGF และค่า O.D.	33
ตารางที่ 5.1 แสดงค่าพื้นฐานทางกายภาพ และค่าทางห้องปฏิบัติการของหนู mice สายพันธุ์ CD-1 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยวิธีต่างๆ	50

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย	4
รูปภาพที่ 2.1 กลไกและระยะเวลาของการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา	9
รูปภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ microRNA ในระหว่างการสังเคราะห์ messengerRNA ⁽³⁰⁾	11
รูปภาพที่ 3.1 แสดงระยะเวลาในการทำการวิจัย และขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังโมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy	25
รูปภาพที่ 3.2 การเจือจาง Calibrator Diluent	31
รูปภาพที่ 4.1 แสดงภาวะไตเรื้อรังของหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy พบลักษณะทางมหกายวิภาคของไตจะมีสีซีดและผิวไตไม่เรียบ (รูปซ้ายเล็ก) และมีลักษณะทางจุลกายวิภาคที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อส่วน interstitium เป็นหลัก โดยจะพบส่วนของท่อ tubule มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น ร่วมกับมีรูปร่างผิดปกติ (G= glomerulus, T= tubule).....	40
รูปภาพที่ 4.2 แสดงภาวะน้ำเกินในปอดของหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy พบลักษณะทางมหกายวิภาคของไตจะมีสีจืดสีขาวของน้ำแทรกในเนื้อเยื่อปอด (รูปเล็ก) และมีลักษณะทางจุลกายวิภาคที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อส่วนถุงลม (alveoli) ร่วมกับมีสารของเหลวสีชมพูแทรกอยู่ภายในช่องว่าง (A= alveoli)	41
รูปภาพที่ 4.3 แสดงเปรียบเทียบขนาดรูปร่างของหนูปกติ (บน) และหนูที่มีภาวะไตเรื้อรัง (ล่าง).....	41

รูปภาพที่ 4.4 แสดงพยาธิสภาพการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา (*) ในหนูทดลอง กลุ่มที่ได้รับยาหลอก (รูป ก) ซึ่งมีการหนาตัวของชั้นอินทิมามากกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับ ยาซิลอสตาซอล (รูป ข)	43
รูปภาพที่ 4.5 แสดงพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่ไม่พบว่ามีการแสดงออกของ angiotensin II receptor AT ₁ (AT ₁ R) ในการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry	47



สารบัญแผนภูมิ

หน้า

แผนภูมิที่ 4.1 จำนวนหนูทดลองที่ใช้ในการศึกษา.....	39
แผนภูมิที่ 4.2 แสดงเปรียบเทียบน้ำหนักของหนู mice ในกลุ่มที่มีภาวะไตเรื้อรังและได้รับยาซิลอสตาซอล (cilostazol, CZ) หรือได้รับยาหลอก (placebo, PB) กับกลุ่มที่มีการทำงานของไตปกติ (normal, NL) (* แสดง $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน, # แสดง $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน, ## แสดง $p < 0.0001$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน และ \$ แสดง $p < 0.001$)	42
แผนภูมิที่ 4.3 แสดงเปรียบเทียบพื้นที่ของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่หนาตัวเพิ่มขึ้นในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) กลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ) (รูป ก) และเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ชั้นอินทิมาต่อพื้นที่ชั้นมีเดีย (intima/media) ระหว่างสองกลุ่ม (รูป ข)	43
แผนภูมิที่ 4.4 แสดงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย average fold change ของระดับ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพหลอดเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ)	45
แผนภูมิที่ 4.5 แสดงเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารไซโตคายน์ ADMA (รูป ก), VEGF (รูป ข) และ PDGF (รูป ค) ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ)	46

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADAMTS	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
ADMA	Asymmetrical dimethylarginine
AIF-1	Allograft inflammatory factor-1
Ang II	Angiotensin II
AP-1	Activator protein-1
ATF	Amino-terminal fragment
AT ₁ R, AT-1R	Angiotensin II type 1 receptor AT ₁
CAD	Coronary artery disease
Cav1	Caveolin-1
CDH11	Cadherin 11
Chr/IR	Chronic ischemic reperfusion
CIC-2	Chloride channel 2
CKD	Chronic kidney disease
CK1alphaLS	Protein kinase CK1alphaLS
CTGF	Connective tissue growth factor
Cx43	Connexin-43
CZ	Cilostazol
ECM	Extracellular matrix
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase
ESRD	End stage renal disease
Galphaq	G-protein-coupled receptor alpha-q
HuR	Human antigen R

H&E	Hematoxylin & eosin staining
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IH	Intimal hyperplasia
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IP-10	Interferon-gamma-inducible protein-10
I/R	Ischemic reperfusion
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C kinase substrate
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
miRNA, miR	MicroRNA
MK	Midkine
MMP	matrix metalloproteinases
mRNA	Messenger ribonucleic acid
MT1-MMP	Membrane type 1 metalloproteinase
Na Channel Na (V)1.7	Voltage-gated Na(+) 1.7 channel currents (I(Na))
NF-kappaB	Nuclear factor kappaB
NOS	Nitric oxide synthase
Nox1	NADPH-oxidase 1
O.D.	Optic density
PAD	Peripheral artery disease
PB	Placebo
PDGF	Platelet-derived growth factor
PKCdelta	Protein kinase C delta type
pRB	Phosphorylated retinoblastoma
Ptc-1	Patched receptor-1

RAAS	Renin-angiotensin-aldosterone system
RNA	Ribonucleic acid
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
RS	Reactive species
Shh/Gli2	Sonic Hedgehog (Shh)/ GLI family zinc finger 2 (Gli2)
SVV	Survivin
TGF- β	Transforming growth factor- β
TLR4	Toll-like receptor 4
TNF	Tumor necrotic factor
TSP-2	Thrombospondin-2
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1
VSMC	Vascular smooth muscle cell

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and rationale)

ภาวะไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease; ESRD) เป็นสาเหตุหลักของการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา (intimal hyperplasia; IH) มีการศึกษาพบว่า การหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดนี้เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ผู้ป่วยมีภาวะไตเรื้อรัง (chronic kidney disease; CKD) ระยะเริ่มแรก โดยเฉพาะตั้งแต่ระยะที่สามขึ้นไป⁽¹⁻³⁾ ซึ่งเกิดจากปัจจัยหลายประการที่สัมพันธ์กับภาวะไตเรื้อรัง ได้แก่ ภาวะการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (oxidative stress) การเพิ่มและการสะสมของสารของเสียยูรีเมีย (uremic toxins) และความผิดปกติของเซลล์เยื่อหลอดเลือด (endothelial dysfunction)⁽³⁻⁶⁾ เป็นต้น

การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมานี้เป็นลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบได้บ่อยในโรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease; CAD) และโรคหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral artery disease; PAD) ดังนั้น จึงทำให้พบอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคหลอดเลือดส่วนปลายสูงขึ้นในผู้ป่วยไตเรื้อรังระยะสุดท้าย อย่างไรก็ตาม พบว่าการป้องกันภาวะต่างๆ เหล่านี้โดยการใช้ยา เช่น ยาต้านเกล็ดเลือด (antiplatelet) หรือยาละลายลิ่มเลือด (anticoagulant) ไม่สามารถยับยั้งการดำเนินของโรคได้ ยังพบการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาเป็นสัดส่วนแปรผันตามระยะของภาวะไตเรื้อรัง ทั้งนี้ ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะการใช้ยาในระยะที่สายเกินไป ภาวะไตเรื้อรังระยะสุดท้ายมักจะมีพยาธิสภาพของหลอดเลือดที่มีการเปลี่ยนแปลงไปมากแล้ว นอกจากนี้ กลไกการออกฤทธิ์ของยาทั้งสองชนิดดังกล่าวก็ไม่มีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ทำให้มีผลต่อหลอดเลือดน้อยมาก จึงนำไปสู่ที่มาของปัญหาการวิจัยเพื่อคิดหาวิธีการควบคุมหรือชะลอพยาธิสภาพของหลอดเลือด โดยเฉพาะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในภาวะไตวายเรื้อรัง ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาวิจัยผลของยาซิลอสตาซอล (cilostazol) ซึ่งเป็นสารต้านการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส-3 แบบเฉพาะเจาะจง (selective inhibitor of phosphodiesterase-3) ที่มีคุณสมบัติออก

ฤทธิ์เป็นสารต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasodilator)⁽⁷⁾ นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติชะลอและยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้⁽⁸⁾ โดยทำการศึกษาวิจัยในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายระยะเริ่มแรก เพื่อศึกษาผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะเริ่มแรก โดยจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานใช้พัฒนาเป็นการศึกษาวิจัยต่อยอดต่อไป

1.2 คำถามการวิจัย (Research questions)

คำถามการวิจัยหลัก (Primary research question)

การให้ยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก จะสามารถลดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้หรือไม่

คำถามการวิจัยรอง (Secondary research questions)

1. การให้ยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรกจะสามารถลดการแสดงออกของ miRNA-143, miRNA-145, และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้หรือไม่

2. การให้ยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก จะสามารถลดระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, asymmetrical dimethylarginine (ADMA), platelet-derived growth factor (PDGF) และ vascular endothelial growth factor (VEGF) ในเลือดได้หรือไม่

3. การให้ยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก มีผลต่อการแสดงออกของ angiotensin II receptor AT₁ (AT₁R) ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาอย่างไร

1.3 วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objectives)

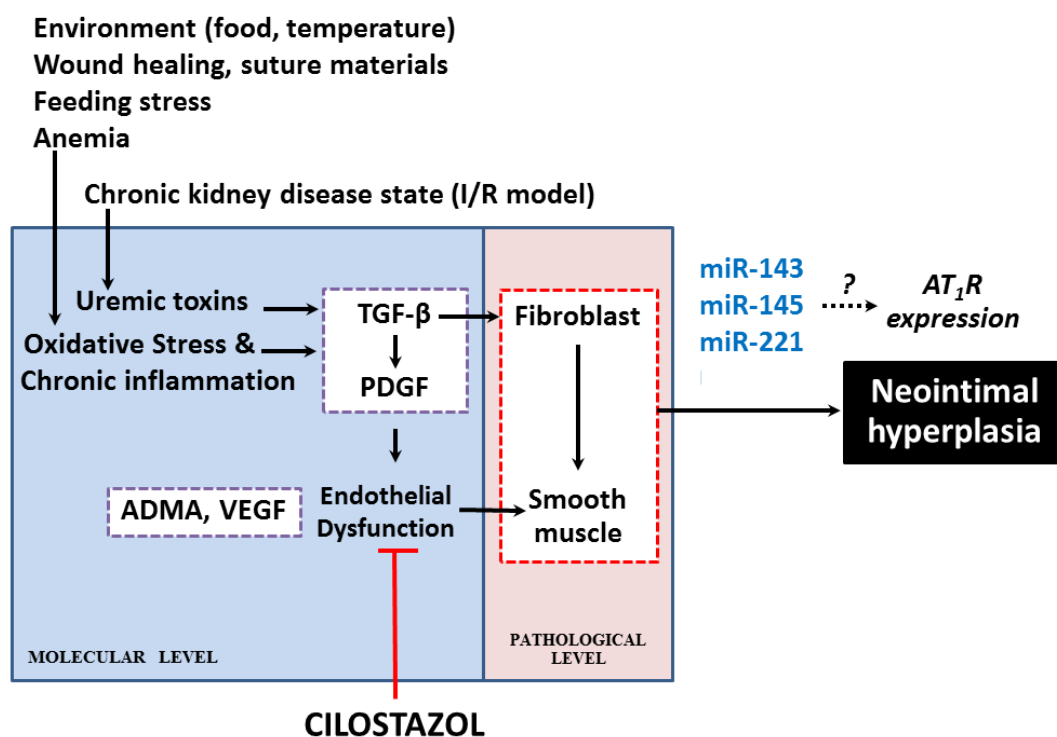
1. เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

2. เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงการ แสดงออกของ miRNA-143, miRNA-145, และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือด ชั้นอินทิมาในหลอดเลือดที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยา หลอก
3. เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, ADMA, PDGF และ VEGF ในเลือดในหลอดเลือดที่มี ภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก
4. เพื่อศึกษากลไกของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการหนาตัวของหลอดเลือด ชั้นอินทิมาผ่านระบบ เรนิน-แองจิโอเทนซิน-แอลโดสเตอโรน (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) โดยเปรียบเทียบการ แสดงออกของ AT₁R ในพยาธิสภาพของผนัง หลอดเลือดชั้นอินทิมาในหลอดเลือดที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่ม ควบคุมที่ได้รับยาหลอก

1.4 สมมติฐาน (Hypothesis)

การให้ยาซิลอสตาซอลในหลอดเลือดที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก สามารถลดการ หนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



คำย่อ: Angiotensin II receptor type 1, AT₁R; asymmetrical dimethylarginine, ADMA; miR, microRNA; platelet-derived growth factor, PDGF; transforming growth factor- β , TGF- β ; vascular endothelial growth factor, VEGF

รูปภาพที่ 1.1 กรอบแนวความคิดในการวิจัย

1.6 วิธีการดำเนินการวิจัย

เป็นการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง (experimental study in animal model) โดยใช้หนู (mice) สายพันธุ์ CD-1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) เพศผู้ ขนาดอายุ 6-8 สัปดาห์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายจากการขาดเลือด (ischemic/ reperfusion renal injury) จำนวน 24 ตัว จากนั้นสุ่มเลือกหนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนู CD-1 ที่มีภาวะไตเรื้อรัง และได้รับยาหลอกเป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ และ

กลุ่มที่ 2 หนู CD-1 ที่มีภาวะไตเรื้อรัง และได้รับยาซิลอสตาซอลเป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์

จากนั้นทำการสังเกตและวัดการเปลี่ยนแปลงการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา การเปลี่ยนแปลงการแสดงออก (expression) ของ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221

ในพยาธิสภาพของหลอดเลือดชั้นอินทิมา และการเปลี่ยนแปลงระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, ADMA, PDGF และ VEGF ในเลือด รวมถึงการศึกษาด้านการแสดงออกของ AT₁R ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ซึ่งจะทำการวัดและแปลผลโดยนักวิทยาศาสตร์ที่ ถูกปกปิดข้อมูลทางคลินิกของหนูทดลอง และประเภทของกลุ่มทดลอง

1.7 ข้อพิจารณาด้านจริยธรรม (Ethical Considerations)

คำนึงถึงการใช้ชีวิตของสัตว์ทดลองเป็นสิ่งสำคัญ โดยมีการศึกษาข้อมูลและเอกสารที่เกี่ยวข้องอย่างถี่ถ้วน และนำข้อมูลที่มีอยู่มาประกอบการศึกษาและทดลอง เพื่อให้มีการใช้ สัตว์ทดลองอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ใช้สัตว์ทดลองจำนวนน้อยที่สุด และตระหนักว่าสัตว์ทดลอง เป็นสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับมนุษย์ ในระหว่างทำการศึกษาทดลอง สัตว์ทดลองจะต้องอยู่ใน สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ไม่เกิดความเครียด และได้รับความทุกข์ทรมานน้อยที่สุด และเมื่อ สิ้นสุดการศึกษาต้องดำเนินการให้สัตว์ทดลองตายอย่างสงบ

การศึกษานี้จะต้องปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยทางวิทยาศาสตร์ และต้องได้รับความเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee, CU-ACUC)

1.8 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ (Expected Benefits and Application)

1. เข้าใจถึงกลไกระดับโมเลกุลของการเกิดภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่เกิดจากภาวะไตเรื้อรัง
2. ทราบถึงผลของยาซิลอสตาซอลที่มีต่อภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา
3. ทราบถึงผลของภาวะยูรีเมีย และภาวะอื่นๆ ที่เกิดจากโมเดลการเหนี่ยวนำการเกิดภาวะไตเรื้อรังในหนูทดลอง ซึ่งเป็นโมเดลที่คิดค้นขึ้นมาใหม่
4. เป็นการเพิ่มพูนทักษะการทำการทดลองในสัตว์ทดลองที่ถูกต้อง มีจริยธรรม และได้มาตรฐานการทดลองในสัตว์ทดลอง

5. หากได้ผลลัพธ์ที่ดีจะเป็นจุดเริ่มต้นของการประยุกต์ใช้ซิลอสตาซอลในการดูแลผู้ป่วยโรคไตวายเรื้อรัง เพื่อชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

6. สามารถนำผลการศึกษาไปประยุกต์ใช้ในการต่อยอดความรู้เกี่ยวกับภาวะหรือโรคของหลอดเลือดชนิดอื่นๆ เช่น การป้องกันการเกิดภาวะการไม่พร้อมใช้งานของหลอดเลือดฟอกเลือดด้วยการใช้ยา (pharmacological strategies) ในอนาคตได้

1.9 อุปสรรคที่อาจเกิดขึ้นระหว่างการวิจัยและมาตรการในการแก้ไข (Obstacles and Strategies to Solve the Problems)

1. ความไม่ชำนาญในการศึกษาในสัตว์ทดลอง แก้ไขโดยการเข้าอบรมการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง ซึ่งได้เรียนรู้วิธีการทำวิจัยอย่างถูกต้อง โดยเฉพาะการบริหารยา และหลักการทำวิจัยในสัตว์ทดลองที่ถูกต้องตามจริยธรรม

2. ความคลาดเคลื่อนจากการตรวจ และแปลผล miRNAs เนื่องจากขาดประสบการณ์ ทั้งนี้แก้ไขโดยทำการทดลองภายใต้การดูแลของผู้ที่มีประสบการณ์โดยตรง

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 กลไกการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมานี้เป็นกระบวนการอักเสบที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บของหลอดเลือด ซึ่งประกอบด้วย การหนาตัวของชั้นอินทิมา การเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (vascular smooth muscle cell, VSMC) และการสะสมของเมทริกซ์⁽⁹⁾ เมื่อมีการหนาตัวเกิดขึ้นก็จะทำให้เกิดการไหลเวียนเลือดน้อยลง จนทำให้มีภาวะหลอดเลือดอุดตัน จึงกล่าวได้ว่าภาวะพลศาสตร์ในหลอดเลือดที่เปลี่ยนแปลงไปในทางลดลงส่งผลให้เกิดหลอดเลือดอุดตันในที่สุด อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาในระดับโมเลกุลจะพบว่า กลไกเกิดผ่านกระบวนการ 4 กลุ่ม (รูปภาพที่ 2.1) ได้แก่

การเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเดทีฟสเตรส (oxidative stress)

เกิดจากการเสียสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) และสารก่ออนุมูลอิสระ (prooxidants) โดยสารก่ออนุมูลอิสระที่เกิดมากเกินไป ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ และการทำลายของสารชีวโมเลกุลอื่นๆ สารก่ออนุมูลอิสระนี้ คือ รีแอกทีฟสปีชีส์ (reactive species, RS) แบ่งเป็นรีแอกทีฟ ไนโตรเจนสปีชีส์ (reactive nitrogen species, RNS) และรีแอกทีฟ ออกซิเจนสปีชีส์ (reactive oxygen species, ROS)

สารพีรอกซีไนเตรท (peroxynitrate) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่าง ROS และไนตริกออกไซด์ (nitric oxide, NO) มีคุณสมบัติกระตุ้นสารเมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเอส (matrix metalloproteinases, MMPs) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักในการกระตุ้นการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และผ่านการย่อยโปรตีนที่อยู่นอกเซลล์ ได้แก่ คอลลาเจน และอีลาสติน เป็นต้น⁽¹⁰⁾

การศึกษาพบว่าสารต้านเมทริกซ์เมทาโลโปรตีนเอสสามารถลดการหนาตัวของชั้นอินทิมาในหลอดเลือดดำสฟีนัส (saphenous vein) และมีระดับสาร MMP-2 และ MMP-9 ในเลือดลดลงเช่นเดียวกัน⁽¹¹⁾ อย่างไรก็ตาม เป็นการศึกษาที่ค่อนข้างเฉพาะกลุ่ม คือเป็นกลุ่มผู้ป่วย

ไตวายเรื้อรังร่วมกับมีโรคหลอดเลือดหัวใจเท่านั้น ดังนั้น ผลการศึกษานี้จึงไม่สามารถใช้ได้กับประชากรทั่วไปกลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ ยังมีการศึกษาที่เกี่ยวกับกลไกการเกิดปัญหาหลอดเลือดอื่นๆ ในกลุ่มผู้ป่วยไตวายที่สำคัญ ได้แก่ การศึกษาระดับโมเลกุลของหลอดเลือดฟอกเลือดที่มีการอุดตันในผู้ป่วยไตเรื้อรัง พบว่าภาวะออกซิเดทีฟสเตรซเป็นตัวผลักดันให้เกิดการเพิ่มขึ้นของสาร MMPs ร่วมกับสารไซโตไคน์ (cytokine) ต่างๆ เช่น ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า (TGF- β) และเพลตเลทดีริฟไทโททแฟกเตอร์ (platelet-derived growth factor; PDGF) เป็นต้น⁽¹²⁾

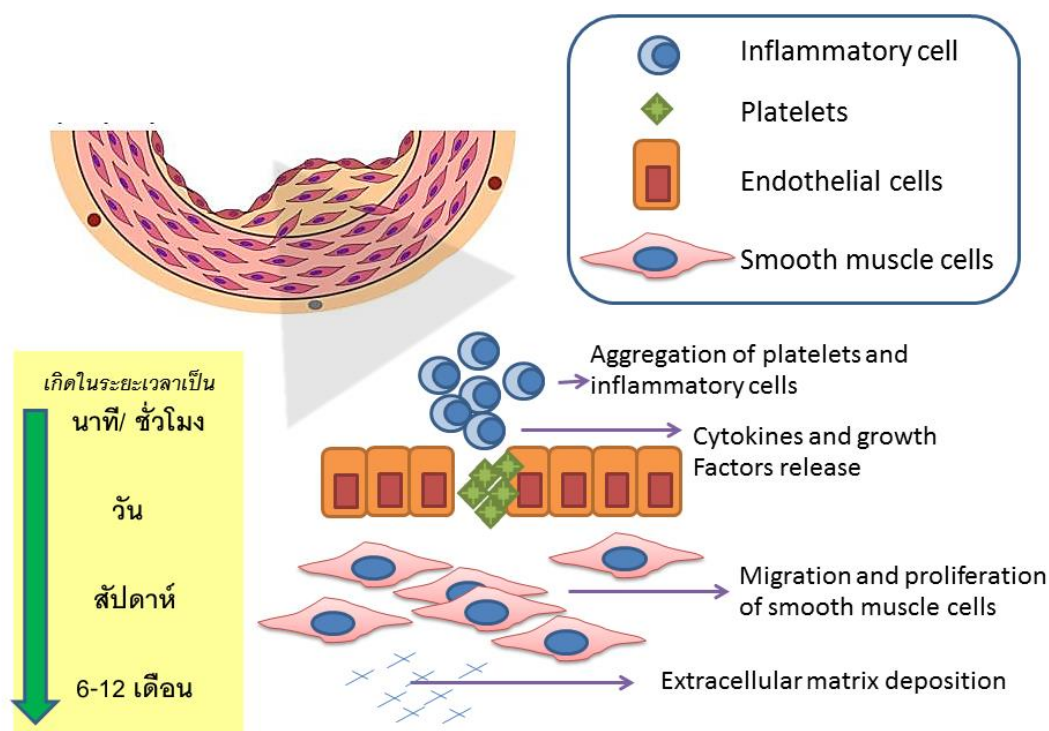
การอักเสบ (inflammation)

การอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) จะเหนี่ยวนำให้มีการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้จะเกาะติดกับผนังหลอดเลือดอย่างแน่นหนา โดยอาศัยโมเลกุลหลายชนิดเป็นสื่อกลาง ได้แก่ โมโนไซต์คีโมแทคติกโปรตีน-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)⁽¹³⁾ อินเฟลมมาตอรีเซลล์ แอดฮีชันโมเลกุล (inflammatory cell adhesion molecule, ICAM)⁽¹⁴⁾ แมค-1 (Mac-1, CD11b/CD18)⁽¹⁵⁾ และไกลโคโปรตีน วันบีแอลฟา (glycoprotein Ib α)⁽¹⁶⁾ เป็นต้น ทั้งนี้ พบว่าความรุนแรงของการรวมตัวกันของเซลล์เม็ดเลือดขาวสัมพันธ์กับระดับความหนาของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial dysfunction)

ภาวะยูรีเมียที่เกิดในผู้ป่วยไตเรื้อรัง เป็นสาเหตุหลักของความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือด โดยผ่านกลไกการเกิดอนุมูลอิสระจากออกซิเดทีฟสเตรซ และการอักเสบดังกล่าวข้างต้น มีการศึกษาในหนูทดลองโดยการศึกษาเปรียบเทียบการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดฟอกเลือด ระหว่างหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยการทำลายไต (renal ablation) และหนูที่ไม่มีภาวะไตเรื้อรัง พบว่าหนูที่มีภาวะไตวายมีการหนาตัวของชั้นอินทิมาของหลอดเลือดมากกว่าในหนูอีกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁶⁾ เช่นเดียวกับการศึกษาในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตวายเรื้อรังด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การตัดไตออกบางส่วน (subnephrectomy) เป็นต้น⁽¹⁷⁾ นอกจากนี้ ผลจากการศึกษายังพบสารอะซิมเมติคอล ไดเมทิลอาร์จินีน (asymmetrical dimethylarginine, ADMA) สะสมในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายเรื้อรัง (uremic milieu) ซึ่งมีคุณสมบัติยับยั้งการสร้าง NO และทำให้เกิดมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽¹⁷⁾

สำหรับในมนุษย์ พบว่าสาร ADMA เป็นปัจจัยสำคัญในการทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือด และพบว่าผู้ป่วยไตเรื้อรังจะมีการสะสมของสาร ADMA ในร่างกายในปริมาณที่สูงกว่าคนปกติถึงหกเท่า⁽¹⁸⁾



รูปภาพที่ 2.1 กลไกและระยะเวลาของการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

เซลล์นีโออินทิมาจากแหล่งอื่นๆ ในร่างกาย (*alternative origins for neointimal cells*)

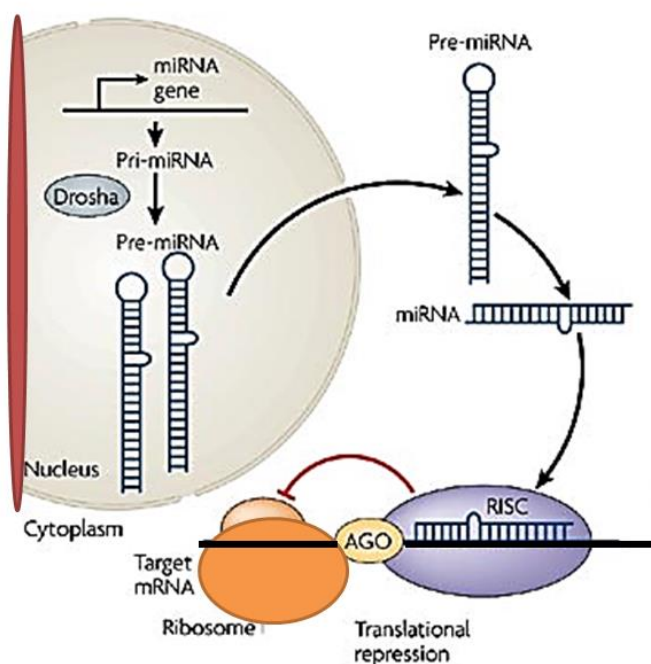
ข้อมูลการศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ พบว่า การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาอาจเกิดจากการเซลล์กล้ามเนื้อเรียบต่างกัน ซึ่งมีได้ 2 รูปแบบ คือการเคลื่อนที่ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบจากชั้นมีเดียเข้าสู่ชั้นอินทิมาของหลอดเลือด แล้วมาเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ (*dedifferentiation*) ของเซลล์ที่ตำแหน่งชั้นอินทิมานี้ จนได้เป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (*myofibroblasts*)⁽¹⁹⁾ และรูปแบบที่เซลล์ตัวอ่อนเคลื่อนที่มาจากไซกระดุก และมาเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ของเซลล์เป็นเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ณ ตำแหน่งที่มีการบาดเจ็บของหลอดเลือดซ้ำๆ โดยเฉพาะที่ชั้นอินทิมาของหลอดเลือด⁽²⁰⁾ หรือแม้แต่การเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดชั้นแอดเวนทิเชีย (*adventitia*) ที่ตอบสนองต่อการบาดเจ็บของหลอดเลือดมากเกินไปควบคุม จนนำไปสู่การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในที่สุด⁽²¹⁾ อย่างไรก็ตาม สมมติฐานทั้งหมดนี้เป็นการศึกษาหลอดเลือดในผู้ป่วยหลอดเลือดหัวใจมากกว่าหลอดเลือดพอกเลือดในผู้ป่วยไตเรื้อรัง

2.2 ไมโครอาร์เอ็นเอที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ไมโครอาร์เอ็นเอ (microRNAs หรือคำย่อ miRNAs, miRs) เป็นสายอาร์เอ็นเอไม่มีรหัส (non-coding RNAs) ที่มีขนาดเล็กประมาณ 22 นิวคลีโอไทด์ ทำหน้าที่ควบคุมเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNAs, mRNAs) ในขั้นตอนหลังจากผ่านกระบวนการทรานส์คริปชันแล้วด้วยการแยกสาย mRNAs (รูปภาพที่ 2.2) หน้าที่หลักที่สำคัญของ miRNAs คือ ควบคุมการทำงานในระหว่างการเจริญและพัฒนาการของสิ่งมีชีวิตในช่วงวัยผู้ใหญ่ ได้แก่ การขยายจำนวนของเซลล์ (cell proliferation) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cell differentiation) และการตายของเซลล์ (cell apoptosis) ในหลากหลายหน้าที่ ได้แก่ การเกิดพังผืด (fibrosis) ของเนื้อเยื่อ และการปรับเปลี่ยนรูปร่างของหลอดเลือด (vascular remodeling) เป็นต้น⁽²²⁾

จากการวิเคราะห์ไมโครอาร์เรย์ (microarray analysis) พบว่ามีการแสดงออกของ miRNA-21⁽²³⁾, miRNA-126⁽²⁴⁾, miRNA-143 และ miRNA-145⁽²⁵⁾ อย่างมากในผนังหลอดเลือดของหนู โดย miRNA-126 เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ในขณะที่ miRNA-143 และ miRNA-145 มีความสัมพันธ์กับจำนวน การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ⁽²⁶⁾ ทั้งนี้ การลดลงของการแสดงออกของ miRNA-143 และ miRNA-145 จะทำให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา นอกจากนี้ ยังพบว่าการแสดงออกของ miRNA-145 มีเป้าหมายในการควบคุมการแสดงออกของแองจิโอเทนซิน-ทู รีเซปเตอร์ ชนิดที่ 1 (angiotensin II receptor type 1, AT₁R) เพื่อกำหนดลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype)⁽²⁷⁾

นอกจากข้อมูลของ miRNA-143 และ miRNA-145 ที่กล่าวมา การศึกษาเมื่อเร็วๆ นี้ ยังพบว่า miRNA-221 และ miRNA-222 ก็มีผลต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาเช่นกัน แต่เป็นการควบคุมผ่านสารตัวกลาง PDGF เพื่อกำหนดลักษณะทางฟีโนไทป์ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ โดยการลดลงของการแสดงออกของ miRNA-221 จะทำให้เกิดสาร PDGF มากขึ้น ส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบเพิ่มจำนวน และเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง^(28, 29) ซึ่งทั้งหมดนี้ยังไม่มีการศึกษา miRNAs ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในกลุ่มประชากรที่มีภาวะไตเรื้อรัง



รูปภาพที่ 2.2 ขั้นตอนการสังเคราะห์ microRNA ในระหว่างการสังเคราะห์ messengerRNA⁽³⁰⁾

2.3 สารไซโตไคน์และสารอื่นๆ ที่สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

การแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา นั้นส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ ได้แก่ สารไซโตไคน์กลุ่มอินเตอร์ลิวคิน (interleukin หรือ IL) ทั้งประเภทที่เป็น pro-inflammatory และ anti-inflammatory ได้แก่ IL-2, IL-6, IL-8, IL-10 และทูเมอเนโครติค แฟคเตอร์-แอลฟา (tumor necrotic factor-alpha หรือ TNF- α) อย่างไรก็ตาม พบว่าสารไซโตไคน์เหล่านี้มีผลต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้ พบว่า สารไซโตไคน์ประเภทที่ส่งผลต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาอย่างมีนัยสำคัญคือ กลุ่มโกรทแฟคเตอร์ (growth factors) ซึ่งได้แก่ ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า (TGF- β), เพลตเลทดีไรฟ์โกทแฟคเตอร์ (platelet-derived growth factor; PDGF) และ วาสคิวลาร์เอนโดทีเลียล โททแฟคเตอร์ (vascular endothelial growth factor, VEGF) เป็นต้น

2.3.1 โกรทแฟคเตอร์ (growth factors)

TGF- β 1

Transforming growth factor-beta หรือ TGF- β 1 สัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดเลื้อยชั้นอินทิมา โดยเฉพาะในหลอดเลือดที่ได้รับบาดเจ็บ มีหน้าที่หลักเป็นตัวยับยั้งกระบวนการ proliferation อย่างไรก็ตาม ในโมเดลสัตว์ทดลองที่ได้รับการผ่าตัดตัดต่อ vein-to-carotid artery grafting พบว่า nanoparticle-mediated TGF- β 1 silencing จะลดการแสดงออกของ MMP-1 และเพิ่มการแสดงออกของ TIMP-1 ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽³¹⁾

นอกจากนี้ TGF- β ยังมีกลไกผ่านโปรตีน Smad3 ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ VSMC proliferation และผ่าน nuclear p27 export ซึ่งจะไปกระตุ้นให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽³²⁾ ยิ่งไปกว่านั้น TGF- β ยังสามารถกระตุ้นกลไก ERK-MAPK ใน VSMC ผ่านโปรตีน Smad3 ได้อีกทางหนึ่งด้วย โดยพิสูจน์จาก VSMC Smad3 silencing มีฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการ TGF- β induced ERK-MAPK phosphorylation ได้⁽³³⁾ และถ้าหาก Smad3 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นก็จะส่งผลให้มีการกระตุ้นกระบวนการ p38 phosphorylation เช่นกัน⁽³⁴⁾

CTGF

Connective tissue growth factor หรือ CTGF มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ fibroblast proliferation, การสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) และ extracellular matrix (ECM) synthesis สันนิษฐานว่า CTGF เป็นส่วนหนึ่งของกลไกใน TGF- β signaling⁽³⁵⁾ และพบว่า CTGF mRNA ใน VSMC จะเพิ่มขึ้นถ้าเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีระดับกลูโคสสูง และ CTGF silencing ใน VSMC จะมีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการ ECM deposition, proliferation และ migration ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของกลูโคส⁽³⁶⁾

ATF/ EGFR/ Nox1

มีรายงานการศึกษาว่าสาย Amino-terminal fragment หรือ ATF ของสาร urokinase สามารถกระตุ้นแฟคเตอร์ epidermal growth factor receptor (EGFR) ผ่านทาง A Disintegrin and Metalloproteinases Domains (ADAM) นอกจากนี้ สาย ATF ยังสามารถกระตุ้นการเกิด VSMC migration ผ่านทางกระบวนการ EGFR phosphorylation และ NADPH-oxidase 1

(Nox1) silencing สามารถป้องกันการเกิด ATF-mediated EGFR activation และ cell migration⁽³⁷⁾

Ang II/ Cx-43

Angiotensin II หรือ Ang II เป็น potent vasoconstrictor มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ vascular remodeling ในหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บ และยังพบว่า Ang II เป็น growth factor ที่มีคุณสมบัติ pleiotropic effects อีกด้วย และสามารถทำให้ VSMC เกิด hypertrophy และ hyperploidy ได้⁽³⁸⁾ การออกฤทธิ์ของ Ang II นั้นจะเกิดผ่าน Angiotensin II type 1 receptor (AT-1R) ทำให้โปรตีน gap junction ที่เรียกว่า Connexin-43 หรือ Cx-43 มีการแสดงออกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการสร้าง VSMC เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม Ang II จะถูกยับยั้งด้วย extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) และ p38 MAPK⁽³⁹⁾

IGF-1/ CIC-2

Insulin-like growth factor-1 หรือ IGF-1 มีความสัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาเกิดผ่านกลไก dysregulation ของ VSMC migration และ proliferation และ IGF-1 ยังสามารถกระตุ้น Chloride Channel 2 (CIC-2) ส่งผลให้เกิด VSMC proliferation ได้อีกกลไกหนึ่ง⁽⁴⁰⁾

MK

Midkine หรือ MK เป็น heparin-binding growth factor ทั้งนี้ พบว่าหนูที่มีภาวะพร่อง MK (MK deficiency) จะมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาลดลงหลังเกิดการบาดเจ็บของหลอดเลือด และยังพบว่าหากใช้ยาที่มีส่วนประกอบของ MK siRNA และ atelocollagen บริเวณรอยผ่าตัดต่อ vein-to-carotid graft ในหนูทดลอง จะมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบบริเวณนั้นลดลง ร่วมกับมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาลดลงถึงร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม⁽⁴¹⁾

2.3.2 ทรานส์คริปชัน แฟคเตอร์ (transcription factors)

E2F

E2F transcription factor สัมพันธ์กับกระบวนการ proliferation และ differentiation ของเซลล์ จากการศึกษาใน PREVENT III study พบว่า non-selective E2F silencing จะทำให้หลอดเลือดไม่สามารถป้องกันการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้⁽⁴²⁾

C-myc

C-myc เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญ (potent promotor) ของกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ทำให้เกิดกระบวนการ VSMC proliferation ตามมา จากการศึกษาพบว่าให้เหนี่ยวนำให้เกิด c-myc silencing ขึ้น จะทำให้กระบวนการ VSMC proliferation ลดลง และสามารถป้องกันการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้⁽⁴³⁾

Survivin

Survivin หรือ svv เป็นตัวกระตุ้นที่สำคัญของกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) เช่นเดียวกับกับ c-myc แต่มีคุณสมบัติเพิ่มที่สำคัญคือ ถ้าหากเป็นชนิด mitochondrial SVV จะมีฤทธิ์ cytoprotective function ด้วย นอกจากนี้ svv silencing จะป้องกันไม่ให้เกิดกระบวนการ VSMC proliferation และสัตว์ทดลองที่เป็น svv knockdown จะลดการเกิดกระบวนการ migration และการแสดงออก (expression) ของ PDGF-AB และ actin-phalloidin ส่งผลให้เซลล์มีรูปร่างเป็น polygonal shape จากการจัดเรียงตัวของเส้นใย actin filaments ที่ไม่เป็นระเบียบ⁽⁴⁴⁾

AP-1

Activator protein-1 หรือ AP-1 เป็นโมเลกุลที่จับกับ DNA อย่างเฉพาะเจาะจง มีคุณสมบัติกระตุ้นกระบวนการ VSMC proliferation, dedifferentiation และ migration อย่างไรก็ตาม AP-1 silencing จะเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน VSMC alpha-actin, ยับยั้งกระบวนการ proliferation, และลดการแสดงออกของ serum-induced MMP-2⁽⁴⁵⁾

Ptc-1

Patched receptor-1 หรือ Ptc-1 เป็น transmembrane receptor สำหรับกระบวนการ embryogenesis และ tumorigenesis มีการศึกษาพบว่า การตัดผูกหลอดเลือดจะทำให้มีการ

แสดงออกของ Ptc-1, การเจริญของ VSMC และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหลอดเลือด (vascular remodeling)⁽⁴⁶⁾

Shh/Gli2

Sonic Hedgehog (Shh)/ GLI family zinc finger 2 (Gli2) หรือ Shh/Gli2 จะเพิ่มกระบวนการ VSMC proliferation ขณะที่ Gli2 silencing จะยับยั้งการแบ่งตัวของ VSMC รวมทั้งลดระดับของ cyclin D1, cyclin E และ phosphorylated retinoblastoma (pRB)⁽⁴⁷⁾

2.3.3 สารสื่อกลางระบบภูมิคุ้มกัน (immune mediators)

TLR4

Toll-like receptor 4 หรือ TLR4 มีคุณสมบัติเป็น transmembrane receptor และ pleiotropic activator ของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายชนิด innate system มักพบร่วมกับ pro-inflammatory cytokines ชนิดอื่นๆ ในหลอดเลือดที่ได้รับบาดเจ็บหรือใน platelet-derived growth factor (PDGF)-incubated VSMC จากการศึกษาพบว่า TLR4 silencing มีความสามารถชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้ รวมทั้งลดกระบวนการ proliferation และ migration ของ PDGF activated VSMC ได้⁽⁴⁸⁾

AIF-1

Allograft inflammatory factor-1 หรือ AIF-1 เกิดจากการเหนี่ยวนำของ interferon และ cytokines อื่นๆ พบมากในหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บ เมื่อ AIF-1 ถูกกระตุ้นจะมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ VSMC proliferation จนเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาตามมา ทั้งนี้พบว่า AIF silencing ใน VSMC จะลดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ mitogen-activated protein kinase p38⁽⁴⁹⁾

IP-10

Interferon-gamma-inducible protein-10 หรือ IP-10 ถูกสร้างจากเซลล์ต่างๆ อาทิเช่น macrophages, epithelial cells, และ fibroblasts ผ่านการกระตุ้นจาก interferon gamma อีกที่หนึ่ง โดยทั่วไปพบ IP-10 มากในหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บ สันนิษฐานว่าอาจจะเป็นเพราะ

คุณสมบัติของ IP-10 เองที่เป็นทั้ง chemotactic และ antiangiogenic effects⁽⁵⁰⁾ อย่างไรก็ตาม บทบาทของ IP-10 ต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมายังไม่เป็นที่แน่ชัด

NF-kappaB

Nuclear factor kappaB หรือ NF-kappaB เป็นสารสำคัญที่ควบคุมปฏิกิริยาการอักเสบของหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บเกิดขึ้น โดยทั่วไปมีความสัมพันธ์โดยตรงต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽⁵¹⁾

2.3.4 เอนไซม์ โปรตีนเนส (proteinases)

MMP

Matrix metalloproteinases หรือ MMP เป็นเอนไซม์ที่มีส่วนสำคัญในการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยเฉพาะ MMP-2 และ MMP-9 จะมีคุณสมบัติเป็นตัวกระตุ้น smooth muscle cell invasion ที่ดี ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สำคัญของการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽⁵²⁾

MT1-MMP

Membrane type 1 metalloproteinase หรือ MT1-MMP เป็น transmembrane activator ของ MMP-2 จะถูกกระตุ้นการทำงานได้ง่ายด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน ในหนูชนิด MT1-MMP knockout จะมีการลดลงของระดับ MMP-2 แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบว่ามี VSMC invasion หรือ proliferation⁽⁵³⁾

ADAMTS

A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs หรือ ADAMTS จัดเป็นเอนไซม์สำคัญเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการ extracellular matrix (ECM) degradation โดยจะพบว่ามี ADAMTS-7 ปริมาณมากในหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บ ซึ่งจะทำหน้าที่ย่อย ECM cartilage oligomeric matrix protein (COMP)⁽⁵⁴⁾

LT

Leukotriene หรือ LT เป็นสารอนุพันธ์ของ arachidonic acid ที่มีคุณสมบัติเป็น pleiotropic inflammatory effects ในหลอดเลือดที่มีการบาดเจ็บจะมีการสร้าง leukotriene

ชนิด B4 (LT-B4) ขึ้น้อย่างมากมาย ซึ่งจะส่งผลให้มีการสร้างสาร MMP-2 และ MMP-9 ตามมา (55)

2.3.5 เอนไซม์ โปรตีนไคเนส (protein kinases)

CK1alphaLS

Protein kinase CK1alphaLS หรือ CK1alphaLS ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ และกระบวนการ differentiation พบว่า CK1alphaLS silencing จะลดการแบ่งตัวของ VSMC, การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา และการสะสมของโปรตีนโกลิแคน (proteoglycan) (56)

PKCdelta

Protein kinase C delta type หรือ PKCdelta มีความสัมพันธ์กับการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดย PKCdelta ทำหน้าที่ควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์และกระบวนการ apoptosis ทั้งนี้ พบว่าในหนู PKCdelta knockout จะเกิดกระบวนการ reendothelialization ตามหลังการบาดเจ็บต่อหลอดเลือดลดลง (57)

MARCK

Myristoylated alanine-rich C kinase substrate หรือ MARCKS เป็นสารตั้งต้นที่พบมากในบริเวณหลอดเลือดที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา พบว่า MARCKS silencing จะลด VSMC migration และ proliferation ผ่านกลไกการเพิ่มการแสดงออกของสาร cyclin-dependent kinase inhibitor p27(kip1) (58)

2.3.6 สารโมเลกุลพื้นผิวเซลล์ (cell surface molecules)

Caveolin-1

Caveolin-1 หรือ Cav1 เป็นส่วนประกอบของ plasma membrane caveolae และเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ของ cell signaling ได้แก่ clathrin-independent endocytosis, eNOS signaling, mechanotransduction เป็นต้น การเพิ่มขึ้นของ Cav1 จะทำให้มีการกระตุ้นกระบวนการ ERK1/2 phosphorylation และ VSMC proliferation (59)

Cadherin 11

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะมี Cadherin 11 ในหลอดเลือดสูงมาก โดยจะมีการรวมตัวเป็นโมเลกุลเชิงซ้อน cadherin11/osteoblast-cadherin (CDH11) เมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อของหลอดเลือด⁽⁶⁰⁾

2.3.7 สารอื่นๆ (miscellaneous)

Na Channel Na(V)1.7 – SCN9A

จากการศึกษาพบว่าโมเลกุล Voltage-gated Na(+) channel currents (I(Na)) มีอยู่ในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบมากมาย และยังพบอยู่ในผนังหลอดเลือดเออร์ตาที่ผ่านการทำอลลูนอีกด้วย โดยจะแตกต่างจากที่พบในหลอดเลือดเออร์ตาทั่วไป คือจะมีการแสดงออกของ SCN9A ร่วมด้วย⁽⁶¹⁾

TSP-2

Thrombospondin-2 (TSP-2) เป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติต่อต้านการสร้างหลอดเลือด (antiangiogenic matricellular protein) พบมากในผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่หนาตัวเพิ่มขึ้นหลังการบาดเจ็บของหลอดเลือด⁽⁶²⁾

Girdin

เป็น active-binding protein ที่พบมากในหลอดเลือดดำที่มีการบาดเจ็บ สัมพันธ์กับกระบวนการปรับรูปร่าง (remodeling) และการจัดเรียงตัวของสายแอกติน (actin filament)⁽⁶³⁾

G-protein-coupled receptor alpha-q (Galphaq)

Galphaq เป็นกลไกสำคัญของการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาโดยผ่านการกระตุ้นของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ปริมาณที่พบในผนังหลอดเลือดมีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับระยะเวลาของการเกิดการบาดเจ็บของหลอดเลือดที่นานมากขึ้น และมีความสัมพันธ์เชิงผกผันกับโปรตีน MMP-9⁽⁶⁴⁾

Rab5a

Rab5a เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับ Rab family ของอนไซม์ GTPases เป็นส่วนประกอบสำคัญของกระบวนการสร้าง clathrin endosome ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽⁶⁵⁾

Human antigen R (HuR)

HuR เป็น RNA-binding protein ของ HU/ELAV family ที่ทำหน้าที่ทำให้ mRNA มีความเสถียร ซึ่งประกอบด้วยโกรทแฟกเตอร์, cell cycle regulators และสารไซโตคายน์ โดยพบว่า HuR จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อของผนังหลอดเลือดที่มีการหดตัวของชั้นอินทิมา และมีความสัมพันธ์เชิงผกผันกับเพปไทด์โรไฟโบทแฟกเตอร์⁽⁶⁶⁾

2.4 การควบคุมและชะลอการหดตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา

การชะลอและการควบคุมการหดตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมานั้นมีการศึกษาอย่างกว้างขวางตามกลไกของการเกิดการหดตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา (ตารางที่ 2.1) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการสรุปถึงประสิทธิภาพของการใช้ยาหรือสารต่างๆ เหล่านี้ ว่าสามารถลดหรือชะลอการหดตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

.ตารางที่ 2.1 ยาและสารต่างๆ ที่มีการศึกษาถึงผลการชะลอการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา

กลุ่มของยาหรือสารต่างๆ	ตัวอย่าง
Antiplatelet agents	Aspirin, dipyridamole, thromboxane synthase inhibitors ^(67, 68)
Anti-inflammatory agents	Dexamethasone, methylprednisolone ⁽⁶⁹⁻⁷¹⁾
Immune modulators	Azathioprine, cyclosporine ⁽⁷²⁾
Angiotensin-converting enzyme inhibitors	Captopril, cilazapril ⁽⁷³⁾
Calcium-channel blockers	Verapamil, nifedipine, diltiazem ^(74, 75)
Receptor antagonists	Prazosin, Ketanserin, losartan ⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾
Anticoagulants	Heparin, hirudin, coumadin ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾
Anticellular agents	Antiplatelet antibodies ^(82, 83)
Adhesion molecules antibodies	Antibody to CD18 ⁽⁸³⁾
Matrix modulation	Collagen (I), antibodies to integrin $\alpha_V\beta_3$ ⁽⁸⁴⁾
Peptides	TGF- β , IFN- γ , somatostatin ⁽⁸⁵⁻⁸⁷⁾
Peptide antibodies	Antibodies to PDGF, basic fibroblast growth factor ^(88, 89)
Peptide-receptor antagonists	Trapidil (anti-platelet-derived growth factor) ⁽⁹⁰⁾
Cytotoxic therapy	Colchicine, vincristine, irradiation, photodynamics ^(91, 92)
Antisense oligonucleotides	Anti-c- <i>myb</i> , anti-proliferating cell nuclear antigen, anti-non-muscle myosin heavy chain β , Anti-c- <i>myc</i> ^(93, 94)
Endothelial cell modulation	L-arginine, prostacyclin analogues, vascular permeability factor, endothelial cell seeding ⁽⁹⁵⁾
Mechanical	Stenting

2.5 ผลของยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ซิลอสตาซอลเป็นยาที่ประกอบด้วยสารต้านการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส-3 แบบเฉพาะเจาะจง มีฤทธิ์เป็นสารต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เป็นยาที่ใช้รักษาภาวะหลอดเลือดส่วนปลายที่มีอาการปวดเป็นๆ หายๆ (intermittent claudication) จากภาวะเลือดไปหล่อเลี้ยงไม่เพียงพอ⁽⁹⁶⁾ นอกจากนี้ ยังเป็นยาที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาผลของยาที่มีต่อการตีบตันซ้ำภายในหลอดเลือดค้ำยัน (in-stent restenosis) ในกลุ่มผู้ป่วยที่ได้รับการทำหัตถการขยายหลอดเลือด ทั้งหลอดเลือดหัวใจ หลอดเลือดส่วนปลาย หรือหลอดเลือดแดงคาโรติด (carotid artery)⁽⁹⁷⁻¹⁰⁰⁾ การศึกษาในหลอดเลือดทดลองพบว่าซิลอสตาซอลสามารถป้องกันการตาย (apoptosis) ของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด^(101, 102) และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบได้⁽¹⁰³⁾ นอกจากนี้ ซิลอสตาซอลยังมีคุณสมบัติต้านการอักเสบ โดยยับยั้งการแสดงออกของวาสคิวลาร์ แอดฮีชันโมเลกุล-1 (vascular adhesion molecule-1, VCAM-1), ICAM-1 และ MCP-1 ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ไม่สามารถเกาะติดเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดได้⁽¹⁰⁴⁻¹¹⁰⁾

สำหรับการศึกษาผลของซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา มีเพียงการศึกษาเดี่ยวของ Takigawa และคณะ⁽⁸⁾ ซึ่งเป็นการศึกษาในหนูทดลอง พบว่าผนังหลอดเลือดของหนูกุ่มที่ได้รับซิลอสตาซอลมีพื้นที่ผิวของชั้นอินทิมา $101,900 \pm 16,150$ มม.² เปรียบเทียบกับผนังหลอดเลือดของหนูกุ่มที่ไม่ได้รับซิลอสตาซอลที่มีพื้นที่ผิวของชั้นอินทิมา $206,400 \pm 96,150$ มม.² ($p < 0.001$) และผลของยาซิลอสตาซอลที่มีต่อหลอดเลือด จากการวัดการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยใช้อัตราส่วนระหว่างหลอดเลือดชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดีย (intimal hyperplasia area/ media area, IHA/ MA) พบว่าหนูกุ่มที่ได้รับยาหลอกมีอัตราส่วนระหว่างหลอดเลือดชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดียมากกว่าหนูกุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (1.516 ± 0.7275 เปรียบเทียบกับ 0.0613 ± 0.116 ($p < 0.001$)) ทั้งนี้ อธิบายกลไกของซิลอสตาซอลต่อการยับยั้งการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาผ่านกลไกการลดจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่บริเวณเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 รูปแบบการวิจัย (Research design)

การวิจัยทดลองในสัตว์ทดลอง (experimental study in animal model)

3.2 ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

3.2.1 ประชากรที่ศึกษา

3.2.1.1 ประชากรเป้าหมาย (target population)

หนู (mice) สายพันธุ์ CD-1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) เพศผู้ ขนาดอายุ 6-8 สัปดาห์ที่มีภาวะไตวายจากการขาดเลือด (ischemic/ reperfusion renal injury population)

3.2.1.2 ประชากรที่ใช้ในการศึกษา (study population)

หนู (mice) ในกลุ่มประชากรเป้าหมายที่มีภาวะไตวายระยะเริ่มแรก (early chronic kidney disease population)

3.2.2 เทคนิคการสุ่มตัวอย่าง (sample technique)

การสุ่มเลือกพื้นฐาน (simple randomization)

3.2.3 การคำนวณขนาดตัวอย่าง (Sample size determination)

ใช้วิธีคำนวณขนาดตัวอย่างโดยสูตรสำหรับค่าตัวแปรต่อเนื่อง (continuous variables) ในการศึกษาในสัตว์ทดลอง⁽¹¹⁾ จากสมการ

$$N = 1 + 2C \left(\frac{S}{d} \right)^2$$

เมื่อกำหนดให้ S = ค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของกลุ่มประชากร (population standard deviation)

$d = |P_c - P_e|$ = ค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุม (positive quantity in control group, P_c) และกลุ่มทดลอง (positive quantity in experimental group, P_e) ที่ทดสอบ

C = ค่าคงที่ซึ่งแปรผันตามค่า α และ β ซึ่งกำหนดไว้ดังนี้⁽¹¹⁾

	α	0.05	0.01
$1 - \beta$	0.8	7.85	11.68
	0.9	10.51	14.88

นั่นคือ ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% $\alpha = 0.05$ และ $1 - \beta = 0.9$ (90% power)

จะได้ค่า $C = 10.51$ ดังนั้น $2C = 21.02$

อ้างอิงค่าจากการศึกษาของ Takigawa และคณะ⁽⁸⁾ พบว่า $S = 0.73$ และกำหนดให้ $d = 1$ จะได้ N ในแต่ละกลุ่มเป็น $= 11.3 \sim 12$ ตัว ดังนั้น จะต้องใช้ประชากรในการศึกษาทั้งหมด 24 ตัว

3.3 การดำเนินการวิจัย

3.3.1 วิธีการวิจัย

ก. เตรียมหนู (mice) สายพันธุ์ CD-1 จำนวน 24 ตัว แล้วทำการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรัง โดยการผูกและคลายหลอดเลือดแดงของไตด้านซ้าย (ischemic-reperfusion) ซึ่งต้องผูกไว้ นาน 50 นาที หลังจากนั้นอีก 1 สัปดาห์จึงทำการตัดไตขวา (right nephectomy) (รูปภาพที่ 3.1) ซึ่งจะพบว่าไตมีขนาดใหญ่กว่าปกติ จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างของหนูแบบ simple random เป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนู CD-1 ที่มีภาวะไตวายเรื้อรัง และได้รับยาหลอก

กลุ่มที่ 2 หนู CD-1 ที่มีภาวะไตวายเรื้อรัง และได้รับยาซิลอสตาซอล

ทั้งนี้ การทำ ischemic-reperfusion นั้น ผู้วิจัยได้มีการศึกษาเป็นการศึกษานำ (pilot study) โดยพบว่าหากทำการผูกนาน 40 และ 45 นาที หนูจะยังไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนในปัสสาวะที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์หลังจากตัดไตขวา แสดงให้เห็นถึงการเกิดภาวะไตเรื้อรังที่ช้ามาก

หรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย และถ้าหากทำการผูกนาน 55 นาที หนูจะเสียชีวิตภายในระยะเวลา 2-3 วัน หลังจากนั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นรูปแบบหรือโมเดลที่ไม่เหมาะสม มีความรุนแรงมากเกินไป หนูทดลองจะทนได้ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำเอาค่าที่ 50 นาทีเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมและใช้อ้างอิงในการศึกษา

ข. ให้ยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ทุกวันหรือยาหลอก เป็นระยะเวลา 20 สัปดาห์ ซึ่งทำโดยผู้วิจัยที่ถูกปกปิดประเภทของกลุ่มทดลอง

ขนาดของยาที่ใช้ 30 มก./กก./วัน อ้างอิงจากการศึกษาของ Akiyama H และคณะ⁽¹¹²⁾ ที่พบว่า ขนาดยาซิลอสตาซอลในหนูทดลอง 30 ไมโครโมลาร์ (หรือ ไมโครโมล/ ลิตร หรือย่อว่า μM) จะเท่ากับขนาดยา 200 มก./วันในคน และจากการคำนวณจะพบว่า 4-5 μM มีค่าประมาณ 1.4-1.8 mg

วิธีการคำนวณยาในการศึกษาทดลอง

จากสูตร การคำนวณหาปริมาณ (หน่วยเป็นกรัม)

$$m \text{ (ปริมาณ)} = n \text{ (จำนวนโมล)} \times M \text{ (ขนาดน้ำหนักโมเลกุล)}$$

ยาซิลอสตาซอลมีขนาด molecular weight 369.46 (นั่นคือมี molar mass = 369.46 กรัม/ โมล) และยาซิลอสตาซอลมีความหนาแน่น 1.34 กก./ ลิตร ดังนั้น เมื่อนำมาผสมในน้ำกลั่น 100 มล.

นั่นคือ ถ้าผสมในน้ำกลั่น 100 มล. และดูที่ใช้ 0.5 มล.

จะได้ mass = 0.5 มล. x (1.34 กก./ ลิตร) x (1 ลิตร/ 1000 มล) x (1000 กรัม/ 1 กก.) = 0.67 กรัม

จำนวนโมล (moles) ของยาซิลอสตาซอล = 0.67 กรัม x (1 โมล/ 369.46 กรัม) = 0.00181346 โมล

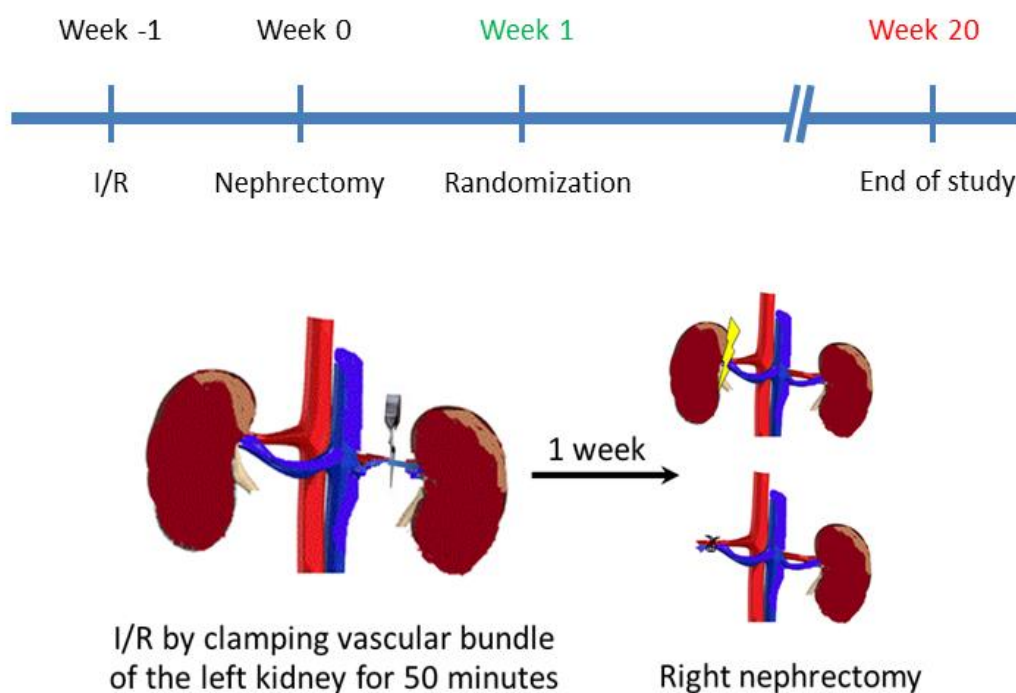
= 0.00181346 โมล x (1000000 ไมโครโมล/ 1 โมล) = 1813.46 ไมโครโมล

หรือถ้าหากต้องการเปลี่ยนแปลงหน่วยเป็นไมโครโมลาร์ จะได้ว่า จำนวนไมโครโมลาร์ของยาซิลอสตาซอลในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล. เท่ากับ

$$= 1813.46 \text{ ไมโครโมล} \times (1/100) \times (5/100)$$

$$= 0.9065 \text{ ไมโครโมล/ 100 มล} = 9.065 \text{ ไมโครโมล/ 1000 มล}$$

$$= 9.065 \text{ ไมโครโมลาร์}$$



รูปภาพที่ 3.1 แสดงระยะเวลาในการทำการวิจัย และขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรัง โมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy

ค. เก็บข้อมูลของหนูพร้อมกันทุกครั้งทั้ง 2 กลุ่ม ประกอบด้วยชั่งน้ำหนัก และวัดระดับโปรตีนต่อครีตินีนในปัสสาวะ (urine protein/creatinine ratio, UPCR) (มก./กรัม) ทุก 4 สัปดาห์ (ตารางที่ 3.1)

ง. หลังจากครบระยะเวลาการศึกษา เก็บข้อมูล และตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, ADMA, PDGF และ VEGF

จ. ทำการการุณฆาต (euthanasia) หนูทดลอง เพื่อเก็บตัวอย่างหลอดเลือดแดงใหญ่เอออร์ตา (aorta) เพื่อดูผลการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยการย้อมด้วยสีย้อมฮีมาโตซึลีนและอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H&E) เพื่อประเมินหาพื้นที่ผิว และ

ศึกษาการแสดงออก (expression) ของ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221 และการแสดงออกของ AT₁R ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ตารางที่ 3.1 ระยะเวลาและขั้นตอนวิธีการศึกษา

	Baseline	Right nephrectomy	Randomization	Treatment & follow-up period (weeks)					
Assessment	6-8 weeks, male, CD-1 mice	7 days after I/R of left kidney	≤ 7 days after nephrectomy (week 0)	1	4	8	12	16	20
				← 20 weeks of cilostazol or placebo administration →					
Weight	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Hct			X						X
Plasma creatinine			X						X
Urine protein			X	X	X	X	X	X	X
UPCR			X						X

คำย่อ: Hematocrit, Hct; ischemic-reperfusion, I/R; urine protein creatinine ratio, UPCR

3.3.2 การสังเกตและการวัด (observation and measurement)

3.3.2.1 ตัวแปรในงานวิจัย

ตัวแปรอิสระ คือ การเกิดภาวะไตวายเรื้อรัง และการได้รับยาซิลอสตาซอล

ตัวแปรตาม คือ การเปลี่ยนแปลงการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา การเปลี่ยนแปลงระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, ADMA, PDGF และ VEGF ในเลือด และการแสดงออกของ AT₁R ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

ตัวแปรควบคุม (confounding factors) คือ วิธีการให้ยาซิลอสตาซอล ความเครียดและความเจ็บปวดของหนูโดยติดตามคูพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของหนู และน้ำหนักตัวที่ลดลง ช่วงเวลากลางวัน-กลางคืน อาหารและน้ำ สภาพแวดล้อมการเลี้ยงดู และการปฏิบัติต่อหนู

3.3.2.2 การวัดผลการศึกษา (outcome measures)

การวัดผลหลัก (primary outcome measure)

ศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยใช้อัตราส่วนระหว่างหลอดเลือดชั้นอินทิมาต่อชั้นมีเดีย (IHA/ MA) โดยการย้อมด้วยสีย้อมฮีมาโตซันและอีโอซิน เพื่อประเมินหาพื้นที่ผิวโดยใช้ค่าเฉลี่ยของพื้นที่ผิว ณ ตำแหน่งห่างกันทุกๆ 0.5 ซม. ของหลอดเลือดที่จุดตั้งต้นรอยต่อตั้งแต่หัวใจห้องล่างซ้าย ตำแหน่งละ 0.2-0.3 ซม. จำนวน 3 ตำแหน่ง โดยตัดเป็นชิ้นบางๆ ขนาดความหนา 0.2 มม. การวิเคราะห์จะใช้ผ่านโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image-Pro® Premier 9.1 Software (Media Cybernetics Manufacturing, PA, USA) เพื่อวิเคราะห์หาความหนาของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในทุกตำแหน่งแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยเป็นตัวแทนค่าความหนาของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในตำแหน่งนั้นๆ

การวัดผลรอง (secondary outcome measures)

(1) การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNA ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ได้แก่ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221

(2) การเปลี่ยนแปลงระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, ADMA [mouse Asymmetrical dimethylarginine ELISA Kit (MyBiosource, USA)], PDGF [mouse PDGF-AB ELISA Kit (Bostrbio, USA)] และ VEGF [Mouse VEGF ELISA Kit (Abcam, USA)] ในเลือด

(3) การแสดงออกของ AT₁R ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา [Angiotensin II (Human, Rat, Mouse, Canine) Antibody for Immunohistochemistry (Phoenix Pharmaceuticals, USA)]

3.3.3 เครื่องมือและวิธีการวัดค่าระดับความเข้มข้น ADMA

3.3.3.1 เครื่องมือ

ตัวทดสอบ ADMA [mouse Asymmetrical Dimethylarginine ELISA Kit (MyBiosource, USA)]

3.3.5.2 การเตรียมสาร reagents

1. Wash solution

เจือจางสารละลาย wash concentrate 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น 900 มิลลิลิตร ซึ่งจะสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้นาน 2 สัปดาห์

2. Conjugate solution

เจือจางสาร peroxidase conjugated ADMA ด้วยสารละลาย conjugate diluent ในอัตราส่วน 1:101 โดยการผสมสาร peroxidase conjugated ADMA 10 ไมโครลิตร ในสารละลาย conjugate diluent 1,000 ไมโครลิตร

3. Standard solution

เตรียมจากสารละลาย assay diluent

3.3.5.3 การเตรียมสารตัวอย่าง (sample)

เจือจาง sample ด้วย assay diluent ในอัตราส่วน 1:5 โดยใช้ sample 50 ไมโครลิตร ผสมใน assay diluents 200 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำยา samples ที่เตรียมเรียบร้อยแล้ว พร้อม standard ใน polyvinyl plate 96 หลุม ตามลำดับ

3.3.5.4 การทดสอบ

1. การผสมสารตัวอย่าง (sample incubation)

1.1 ใช้ปิเปต multichannel ดูดน้ำยา sample 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม microwell ที่มี antibody เคลือบอยู่ด้านล่าง

1.2 Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 20-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

2. การล้าง (washing)

ดูดน้ำยาออก และล้าง microwell ซ้ำๆ รวม 4 ครั้งด้วย wash solution

3. การผสมสาร conjugate (conjugate incubation)

3.1 ใช้ปิเปต multichannel ดูดน้ำยา conjugate 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม

3.2 Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 20-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาที

4. การล้าง (washing)

ดูดน้ำยาออก และล้าง microplate ซ้ำๆ รวม 4 ครั้งด้วย wash solution

5. การผสมสาร substrate (substrate incubation)

5.1 ใช้ปิเปต multichannel ดูดน้ำยา substrate reagent 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม

5.2 Incubate ที่อุณหภูมิห้อง 20-25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

6. การสิ้นสุดปฏิกิริยา (stop reaction)

ใช้ปิเปต multichannel ดูดน้ำยา stop solution 100 ไมโครลิตร ใส่ในหลุม

7. อ่านผลด้วยเครื่อง optical densitometry (OD) ภายในระยะเวลา 30 นาที โดยใช้คลื่นแสงช่วง 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปกำหนดจุดตัดเพื่อสร้างกราฟ semi-log ที่กำหนดให้ แกน Y เป็นค่า absorbance และแกน X เป็นค่าความเข้มข้น (หน่วยเป็นพิโคกรัม/ มล.)

3.3.4 เครื่องมือและวิธีการวัดค่าระดับความเข้มข้น PDGF

3.3.4.1 เครื่องมือ

ตัวทดสอบ PDGF [mouse PDGF-AB ELISA Kit (Bostrbio, USA)]

3.3.4.2 การเตรียมสาร reagents

1. การเตรียมสารละลาย wash buffer

เจือจางสารละลายเข้มข้น wash buffer 20 มล. ในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้น้ำยา wash buffer 500 มล.

2. การเตรียมสารละลายตั้งต้น (substrate solution)

ผสมสารตั้งต้น A และ B ในปริมาตรที่เท่ากันเข้าด้วยกัน และใช้ภายใน 15 นาที

3. การเตรียมสารละลาย VEGF standard

ผสมสาร PDGF standard ใน Calibrator Diluent เพื่อเป็นสารละลายตั้งต้น ความเข้มข้น 10,000 พิโคกรัม/ มล. หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลาย 500 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง polypropylene เพื่อให้ได้สารละลายเจือจางในอัตราส่วนลดลงตามลำดับ โดยกำหนดให้สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุด (10,000 พิโคกรัม/มล.) เป็น high standard และกำหนดให้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำสุด (0 พิโคกรัม/มล.) เป็น zero standard

3.3.4.3 การทดสอบ

1. เตรียมสาร reagents และ standards
↓
2. เติม assay Diluent RD1W ลงในแต่ละหลุม
↓ เติมซีรัมตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร
3. เติมสารละลาย standard, control หรือ sample ลงในแต่ละหลุม
↓ เติมซีรัมตัวอย่าง 100 ไมโครลิตร
Incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
↓
4. ทำการดูดและล้าง 3 ครั้ง
↓
5. เติมสารละลาย conjugate 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
Incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง
↓
6. ทำการดูดและล้าง 3 ครั้ง
↓
7. เติมสารละลายตั้งต้น (substrate) 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม และห้ามถูกแสง
ซีรัมตัวอย่าง incubate ที่อุณหภูมิห้อง
↓ เป็นระยะเวลา 25 นาที
8. เติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยาลงในหลุมอ่านผล
โดยใช้คลื่นแสงช่วง 450 นาโนเมตร ภายในระยะเวลา 30 นาที
ที่ λ correction 540 หรือ 570 นาโนเมตร

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง optic density (OD) และระดับความเข้มข้นของ VEGF หน่วยเป็นพิโคกรัม/ มล.

3.3.4.4 ค่าอ้างอิงระดับความเข้มข้นของ mouse PDGF-AB ELISA Kit

พิสัย (range) = 31.2-10,000 พิโคกรัม/ มล.

ทั้งนี้ mouse PDGF-AB ELISA Kit มีค่าความไว (sensitivity) น้อยกว่า 3 พิโคกรัม/ มล.

3.3.5 เครื่องมือและวิธีการวัดค่าระดับความเข้มข้น VEGF

3.3.5.1 เครื่องมือ

ตัวทดสอบ VEGF [Mouse VEGF ELISA Kit (Abcam, USA)]

3.3.5.2 การเตรียมสาร reagents

1 การเตรียมสารละลาย wash buffer

เจือจางสารละลายเข้มข้น wash buffer 20 มล. ในน้ำกลั่นเพื่อให้ได้น้ำยา wash buffer 400 มล.

2 การเตรียมสารละลายตั้งต้น (substrate solution)

ผสมสารตั้งต้น A และ B ในปริมาณที่เท่ากันเข้าด้วยกัน และใช้ภายใน 15 นาที

3 การเตรียมสารละลาย VEGF standard

ผสมสาร VEGF standard ใน Calibrator Diluent เพื่อเป็นสารละลายตั้งต้น ความเข้มข้น 25,000 พิโคกรัม/ มล. หลังจากนั้นใช้ปิเปตดูดสารละลาย 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลอง polypropylene เพื่อให้ได้สารละลายเจือจางในอัตราส่วนลดลงตามลำดับ (รูปภาพที่ 3.3) (ตารางที่ 3.2) โดยกำหนดให้สารละลายที่มีความเข้มข้นสูงสุด (25,000 พิโคกรัม/ มล.) เป็น high standard และกำหนดให้สารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำสุด (0 พิโคกรัม/ มล.) เป็น zero standard



รูปภาพที่ 3.2 การเจือจาง Calibrator Diluent

ตารางที่ 3.2 แสดงเปรียบเทียบการเตรียม standard dilution

สาร standard #	ปริมาตรที่ใช้ละลาย (ไมโครลิตร)	ปริมาตร Diluent (ไมโครลิตร)	ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นตั้งต้น (พิโคกรัม/มล.)	ความเข้มข้นสุดท้าย (พิโคกรัม/มล.)
1	40	960	1,000	25,000	1,000
2	200	300	600	1,000	400
3	200	300	600	400	160
4	200	300	600	160	64
5	200	300	600	64	25.6
6	200	300	600	25.6	10.2
7	200	300	600	10.2	4.1
8	0	300	300	0	0

3.3.5.3 การทดสอบ

1. เตรียมสาร reagents และ standards



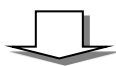
2. เติม assay Diluent RD1W ลงในแต่ละหลุม



3. เติมสารละลาย standard, control หรือ sample ลงในแต่ละหลุม



Incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

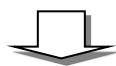


4. ทำการดูดและล้าง 3 ครั้ง

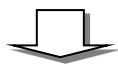


5. เติมสารละลาย conjugate 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม

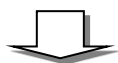
Incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง



6. ทำการดูดและล้าง 3 ครั้ง



7. เติมสารละลายตั้งต้น (substrate) 200 ไมโครลิตร ลงในแต่และหลุม และห้ามถูกแสง



ที่ร่มตัวอย่าง incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 25 นาที

8. เติมสารละลายเพื่อหยุดปฏิกิริยาลงในหลุมอ่านผล โดยใช้คลื่นแสงช่วง 450 นาโนเมตร ภายในระยะเวลา 30 นาที ที่ λ correction 540 หรือ 570 นาโนเมตร

นำค่าที่ได้สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง optic density (O.D.) และระดับความเข้มข้นของ VEGF หน่วยเป็นพิโคกรัม/ มล.(ตารางที่ 3.3) ซึ่งค่าระดับความเข้มข้นของ VEGF ที่อ่านได้จากกราฟต้องคูณด้วยค่า dilution factor ก่อนรายงานผล

ตารางที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของ VEGF และค่า O.D.

ความเข้มข้น (พิโคกรัม/ มล.)	O.D.	
	Assay Diluent A	Assay Diluent B
4.096	0.028	0.061
10.24	0.054	0.134
25.6	0.151	0.339
64	0.324	0.803
160	0.708	1.427
400	1.499	2.383
1000	2.834	3.090

3.3.6 เครื่องมือและวิธีการวัดค่าระดับการแสดงออก (tissue expression) ของ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221

3.3.6.1 เครื่องมือและสาร

Ethanol (Fisher)

Chloroform (Fisher)

Qiagen miRNeasy Mini Kit (Qiagen)

Qiagen RNeasy MinElute Kit (Qiagen)

Homogenizer (Kinematica Hand Held Polytron)

Spectrophotometer (Nanodrop)

Agilent Bioanalyzer และ Eukaryote Total RNA nano chip setup

Glycogen (Invitrogen)

3.3.6.2 การเตรียมชิ้นเนื้อและสารตัวอย่าง

- (1) หลังจากเก็บเลือดหรือสารคัดหลั่งแล้วให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที
- (2) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 1500 g เป็นเวลานาน 10 แล้วดูดเก็บสารละลายไว้ในหลอดทดลองใหม่ เก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80°C นาที
- (3) สำหรับชิ้นเนื้อให้แยกเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -80°C นาที ได้ทันที

3.3.6.3 ขั้นตอนการสกัด RNA (RNA extraction procedure)

- (1) นำเครื่องมือ motar, pestle, forceps และ spatulas เข้าผ่านกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อ
- (2) นำเอาตัวอย่างเนื้อเยื่อออกจากตู้เย็นอุณหภูมิ -80°C แล้วทำการละลาย และวางเนื้อเยื่อไว้บน motar
- (3) ใช้ใบมีดที่ปราศจากเชื้อ sterile razor blade ตัดเนื้อเยื่อที่ผ่านการละลายแล้ว
- (4) ใช้ spatula หั่นเนื้อเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วใส่ไว้ใน motar ผสมรวมกันแล้วนำชิ้นเนื้อทั้งหมดใส่ในหลอดขนาด 50 มล. ที่มีสารละลาย TRIzol ปริมาตรตั้งแต่ 3 มล. ขึ้นไป ขึ้นกับขนาดของชิ้นเนื้อ
- (5) ใช้เครื่อง homogenizer with heavy gauge generator (12 มม.) ตัดชิ้นเนื้อทั้งหมด
- (6) แบ่งชิ้นเนื้อทั้งหมดออกเป็น 2 ส่วน ใส่ลงใน eppendorf ขนาด 2 มล.
- (7) ใช้ electronic homogenizer บดผสมชิ้นเนื้อที่อยู่ใน TRIzol ให้มีขนาด 5-7 มม. ทำอย่างน้อย 3 ครั้งๆ ละ 1 นาที โดยต้องทำบนภาชนะที่มีอุณหภูมิต่ำหรือบนน้ำแข็งตลอดเวลา และต้องระวังการบดผสมที่นานเกินไปจะทำให้เกิดมีความร้อนเกิดขึ้นได้

(8) ตั้งตัวอย่างไว้นาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง สังเกตว่ามีตะกอนเนื้อเยื่อหรือสารแขวนลอยหรือไม่ ถ้าพบว่ามี การตกตะกอนของเศษซากเนื้อเยื่อบริเวณก้นหลอด หรือน้ำยา TRIzol เปลี่ยนจากสีชมพูเป็นสีน้ำตาลแดง ให้ทำขั้นตอนที่ (9) ต่อ แต่ถ้าหากไม่มีตะกอน หรือน้ำยา TRIzol ไม่เปลี่ยนสีให้ข้ามไปทำขั้นตอนที่ (11)

(9) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 g เป็นเวลานาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อแยกตะกอนเนื้อเยื่อหรือสารแขวนลอย

(10) ค่อยๆ ดูดน้ำส่วนที่ใสด้านบน (supernatant) ไว้ในหลอดขนาด 1.7 มล. ที่ปราศจาก RNase ทั้งนี้ต้องดูเอาชั้นไขมันด้านบนของ supernatant ออกก่อน

(11) เติม glycogen (invitogen) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (20 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ลงในแต่ละหลอด

(12) เติม chloroform ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วเขย่าอย่างแรงที่สุด นาน 30 วินาที

(13) ตั้งหลอดทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที ซึ่งควรสังเกตเห็นการแยกชั้นของสารในหลอด

(14) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 g เป็นเวลานาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C

(15) ดูดเอาสารละลายใสส่วนบนสุด (aqueous layer) ไปใส่ไว้ในหลอดขนาด 1.7 มล. ที่ปราศจาก RNase

(16) เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 volume ลงในแต่ละหลอด

(17) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

(18) ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด RNeasy Mini column

(19) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที

(20) แยกหลอด RNeasy Mini column ไว้ต่างหาก ออกจาก collection tube (เก็บไว้ใช้ต่อภายหลัง ส่วนประกอบนี้เป็น total RNA)

(21) นำสารส่วนที่เหลือจากขั้นตอนที่ (19) มาเติมด้วย 100% ethanol ปริมาตร 450 ไมโครลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

(22) ดูดสารตัวอย่างปริมาตร 700 ไมโครลิตร ใส่ในหลอด RNeasy MinElute column

(23) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที

(24) ทำขั้นตอนที่ 22 และ 23 ซ้ำอีกครั้ง

- (25) เติมสารบัฟเฟอร์ RWT ปริมาตร 700 ไมโครลิตร
- (26) ทำการผสมด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที
- (27) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- (28) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที
- (29) เติมสารละลาย 80% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- (30) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 2 นาที
- (31) ใส่ RNeasy MinElute column ลงใน collection tube แล้วทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 5 นาที เพื่อให้ column แห้ง
- (32) ใส่ RNeasy MinElute column ลงใน eppendorf tube แล้วเติม RNase free water ปริมาตร 1.5 มล.
- (33) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 1 นาที แล้วทำการรวบรวมตัวอย่างที่ได้จากทุก column ไว้ด้วยกันโดยต้องวางไว้บนน้ำแข็ง
- (34) ใช้ RNeasy Mini column จากขั้นตอนที่ (20) ใส่ลงใน collection tube ขนาด 2 มล. และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ RWT ปริมาตร 700 ไมโครลิตร
- (35) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที
- (36) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ RPE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร
- (37) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 15-30 วินาที
- (38) ทำขั้นตอนที่ (36) และ (37) ซ้ำอีกครั้ง
- (39) ใส่หลอด RNeasy Mini column ลงใน collection tube แล้วทำการผสมด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 2 นาที
- (40) ใส่หลอด RNeasy Mini column ลงใน eppendorf tube แล้วเติม RNase free water ปริมาตร 30 มล.
- (41) ทำการปั่นแยกด้วยวิธี centrifuge ที่ 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 1 นาที
- (42) รวบรวมตัวอย่างที่ได้จากทุก column ไว้ด้วยกันโดยต้องวางไว้บนน้ำแข็ง (ให้แยกวางตัวอย่าง miRNA และตัวอย่าง total RNA ไว้ห่างกัน)

(43) ทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง miRNA และตัวอย่าง total RNA ด้วย OD reading โดยใช้ Nanodrop

(44) วิเคราะห์ตัวอย่าง RNA ด้วย Bioanalyzing โดยใช้ 6000 RNA chip และ Small RNA chip (Agilent Bioanalyzer และ Eukaryote Total RNA nano chip)

3.3.6.4 ขั้นตอนกระบวนการ reverse transcription และ Real time PCR

(1) ใช้ miRNA 10 นาโนกรัมผสมใน reaction volume ปริมาตร 15 มล. เพื่อให้เกิดกระบวนการ reverse transcription

(2) หลังจากนั้น ใช้ Taqman Probes, TaqMan master mix, microRNA spike-in kit และ cellular microRNAs ในการทำกระบวนการ real-time PCR ด้วยเครื่อง ABI 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems)

3.4 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลทั้งหมดในระหว่างการศึกษาวิจัย และผลการตรวจเลือดต่างๆ จะได้รับการบันทึกลงในแบบเก็บข้อมูลดังกล่าวโดยผู้ช่วยวิจัยเป็นผู้รวบรวม

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

การสรุปข้อมูลทั่วไป ข้อมูลเชิงปริมาณ นำเสนอรูปค่าเฉลี่ย สัดส่วน ร้อยละ ค่าเฉลี่ยเลขคณิต ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน และแผนภูมิ

การทดสอบสมมติฐาน ใช้ paired-t-test หากข้อมูลเก็บได้เป็นลักษณะการกระจายข้อมูลปกติ (normal distribution) หรือใช้ Wilcoxon-Signed Ranks test ในกรณีที่ข้อมูลไม่เป็นลักษณะการกระจายข้อมูลปกติ กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และค่าระดับความเชื่อมั่นที่ ร้อยละ

95

สถิติคำนวณด้วยโปรแกรม SPSS version 17

บทที่ 4

ผลการวิจัย

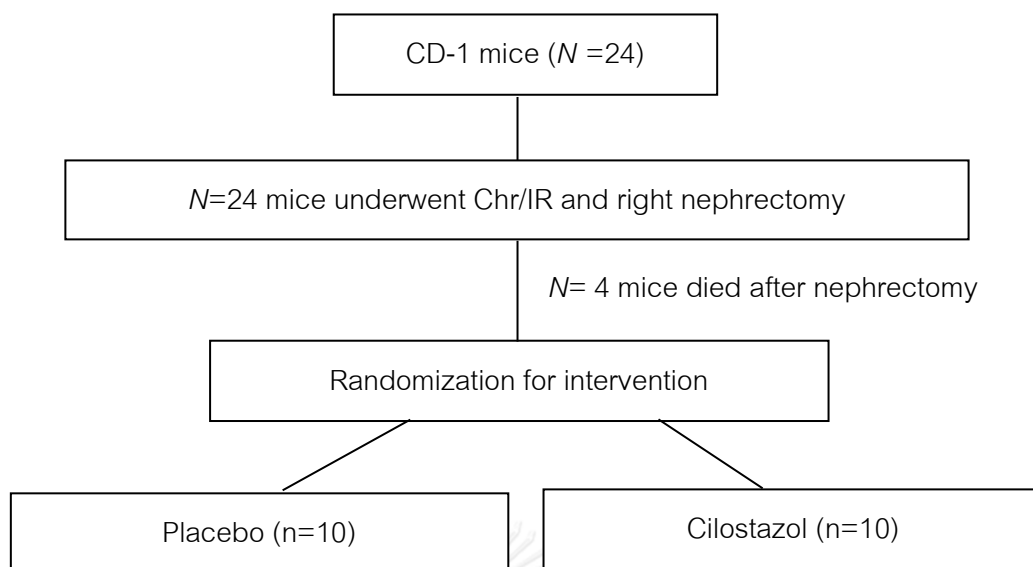
4.1 ผลการศึกษาจากการศึกษาทดลองนำ (pilot study)

เนื่องจากโมเดลการศึกษานี้เป็นโมเดลใหม่ในสัตว์ทดลอง จึงมีการทำการศึกษาดลองนำ (pilot study) ในหนู mice ทั้งหมด 8 ตัว เพื่อหารูปแบบการทำ ischemic-reperfusion ที่เหมาะสม ผลการศึกษาพบว่า ระยะเวลาในการผูกชั่วคราวหลอดเลือดของไตมีผลต่อการมีชีวิตรอดของหนูทดลอง และการเกิดภาวะไตเรื้อรังที่เหมาะสม โดยพบว่าหากทำการผูกนาน 40 นาที และ 45 นาที จะไม่มีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนในปัสสาวะที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์หลังจากตัดไตขวา แสดงให้เห็นถึงการเกิดภาวะไตเรื้อรังที่ช้ามาก หรืออาจไม่เกิดขึ้นเลย และถ้าหากทำการผูกนาน 55 นาที และ 60 นาที หนูจะเสียชีวิตภายในระยะเวลา 2-3 วันหลังจากนั้นทุกตัว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเป็นรูปแบบหรือโมเดลที่ไม่เหมาะสม มีความรุนแรงมากเกินไปกว่าหนู mice จะทนได้

สำหรับการเลือกข้างเพื่อทำ ischemic-reperfusion และ nephrectomy นั้น ไม่พบว่ามี ความแตกต่างกันในด้านความรุนแรงของภาวะไตเรื้อรัง และการมีชีวิตรอดของหนูทดลอง

4.2 ข้อมูลพื้นฐานของหนูทดลองที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้หนูทดลอง CD-1 ที่มีขนาดน้ำหนักตัวเฉลี่ย 33-35 กรัมทั้งหมด 24 ตัว แบ่ง หนูทดลองออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว พบว่ามีหนูที่ตายก่อนการสุ่มเลือก (randomization) จำนวนกลุ่มละ 2 ตัว ดังนั้น รวมเหลือจำนวนหนูทดลองในการศึกษาทั้งสิ้น 20 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มที่ ได้รับยาซิลอสตาซอลจำนวน 10 ตัว และได้รับยาหลอกจำนวน 10 ตัว (แผนภูมิรูปภาพที่ 4.1)



แผนภูมิที่ 4.1 จำนวนหนูทดลองที่ใช้ในการศึกษา

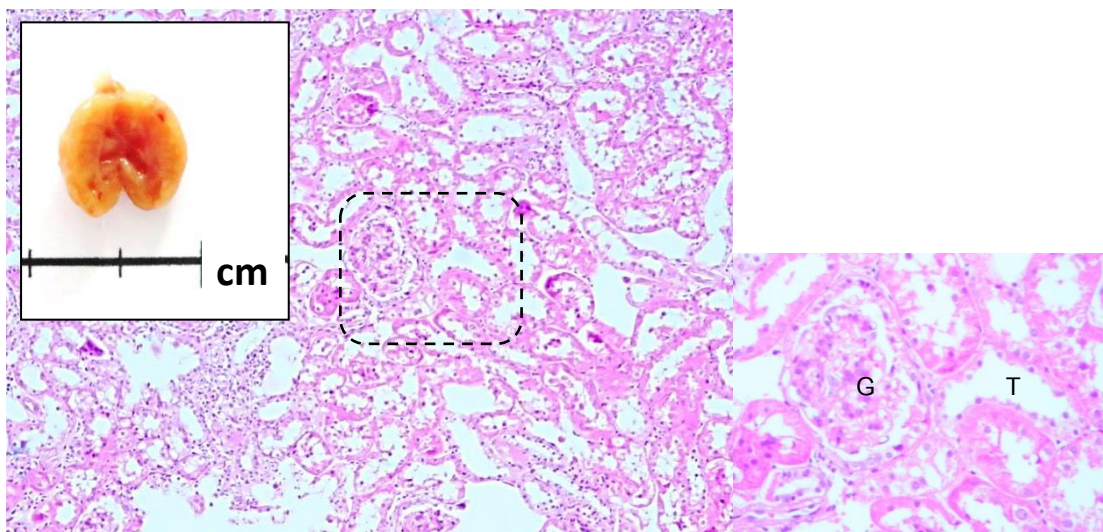
คำย่อ: chronic ischemic reperfusion

4.3 ผลการศึกษา

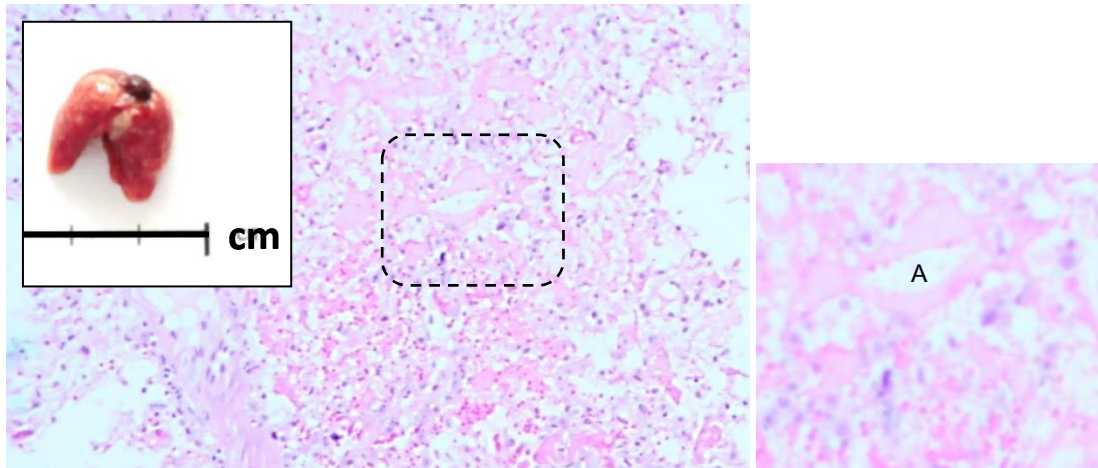
4.3.1 ผลของการใช้โมเดล ischemic reperfusion with right nephrectomy เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูทดลองเกิดภาวะไตเรื้อรัง

ผลการศึกษาพบว่าการใช้โมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy นี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งนี้ พบว่าหนูทดลองทั้งสองกลุ่มเกิดมีภาวะไตเรื้อรังที่ระยะเวลา 20 สัปดาห์ไม่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบจากอัตราส่วนระหว่างระดับโปรตีนและระดับสารครีตินินในปัสสาวะ (55.2 ± 10.2 มก./กรัม ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาหลอก และ 49.5 ± 9.4 มก./กรัม ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล) และระดับสารครีตินินในเลือด (0.58 ± 0.2 มก./ดล ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาหลอก และ 0.62 ± 0.3 มก./ดล ในหนูกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล) โดยพยาธิสภาพส่วนใหญ่ของการเกิดไตเรื้อรังจะเป็นการทำลายเนื้อเยื่อส่วน interstitium มากกว่าหน่วยกรองของไต (glomerulus) (รูปภาพที่ 4.1) นอกจากนี้ ยังทำให้เกิดมีภาวะน้ำเกินในปอด (pulmonary congestion) ได้อีกด้วย (รูปภาพที่ 4.2)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวที่เปลี่ยนแปลงไปของหนูที่มีภาวะไตเรื้อรัง และหนูที่มีการทำงานของไตเป็นปกติ พบว่าหนูที่มีภาวะไตเรื้อรังจะมีน้ำหนักลดชัดเจน ซึ่งแสดงถึงภาวะทโภชนาการและผลจากการเกิดไตเรื้อรัง (รูปภาพที่ 4.3) (แผนภูมิกราฟที่ 4.1)



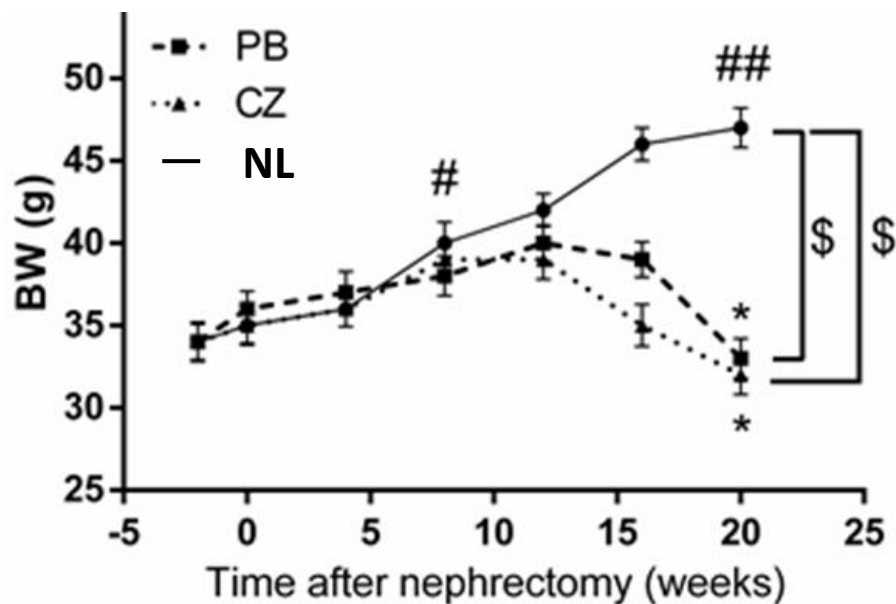
รูปภาพที่ 4.1 แสดงภาวะไตเรื้อรังของหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy พบลักษณะทางมหกายวิภาคของไต จะมีสีซีดและผิวไตไม่เรียบ (รูปซ้ายเล็ก) และมีลักษณะทางจุลกายวิภาคที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อส่วน interstitium เป็นหลัก โดยจะพบส่วนของท่อ tubule มีการขยายขนาดใหญ่ขึ้นร่วมกับมีรูปร่างผิดปกติ (G= glomerulus, T= tubule)



รูปภาพที่ 4.2 แสดงภาวะน้ำเกินในปอดของหนูที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยโมเดล chronic ischemic reperfusion with right nephrectomy พบลักษณะทางมหกายวิภาคของไตจะมีสีจุดสีขาวของน้ำแทรกในเนื้อเยื่อปอด (รูปเล็ก) และมีลักษณะทางจุลกายวิภาคที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อส่วนถุงลม (alveoli) ร่วมกับมีสารของเหลวสีชมพูแทรกอยู่ภายในช่องว่าง (A= alveoli)



รูปภาพที่ 4.3 แสดงเปรียบเทียบขนาดรูปร่างของหนูปกติ (บน) และหนูที่มีภาวะไตเรื้อรัง (ล่าง)

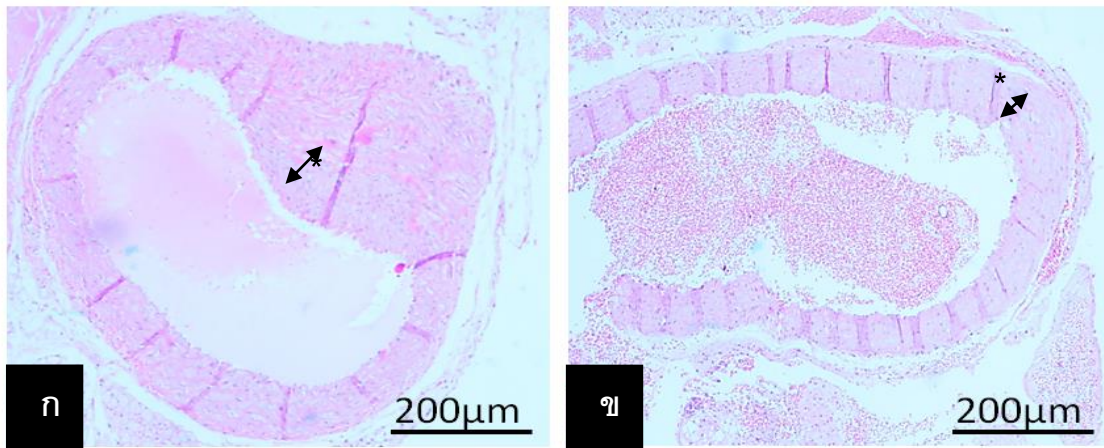


แผนภูมิที่ 4.2 แสดงเปรียบเทียบน้ำหนักของหนู mice ในกลุ่มที่มีภาวะไตเรื้อรังและได้รับยาซิลอสตาซอล (cilostazol, CZ) หรือได้รับยาหลอก (placebo, PB) กับกลุ่มที่มีการทำงานของไตปกติ (normal, NL) (* แสดง $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน, # แสดง $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน, ## แสดง $p < 0.0001$ เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาที่ week -1 ในกลุ่มเดียวกัน และ \$ แสดง $p < 0.001$)

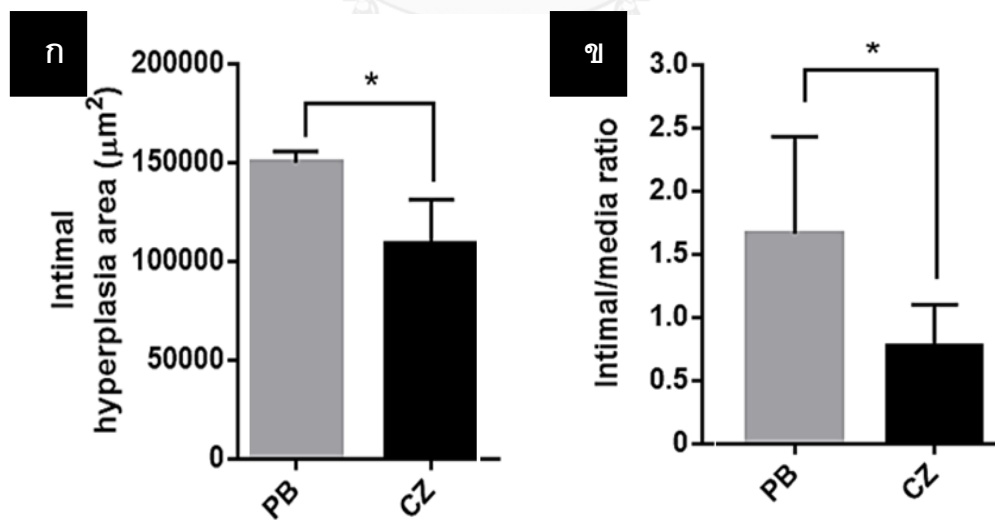
4.3.2 การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและยาซิลอสตาซอลที่ 20 สัปดาห์

ผลการศึกษาพบว่าพยาธิสภาพการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกจะมีการหนาตัวมากกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (รูปภาพที่ 4.4) โดยจากการคำนวณหาพื้นที่ของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่หนาตัวเพิ่มขึ้น พบว่าพื้นที่ของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่หนาตัวเพิ่มขึ้นในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกจะมีค่ามากกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($150,348 \pm 5,669$ เทียบกับ $109,020 \pm 22,380$ ตารางไมครอน, $p < 0.01$) เช่นเดียวกับค่าอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ชั้นอินทิมาต่อพื้นที่ชั้นมีเดีย (intima/media) ก็พบว่าหลอดเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกมีค่า

อัตราส่วนที่สูงกว่าหลอดเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (1.66 เทียบกับ 0.77, $p < 0.01$) (แผนภูมิกราฟที่ 4.2)



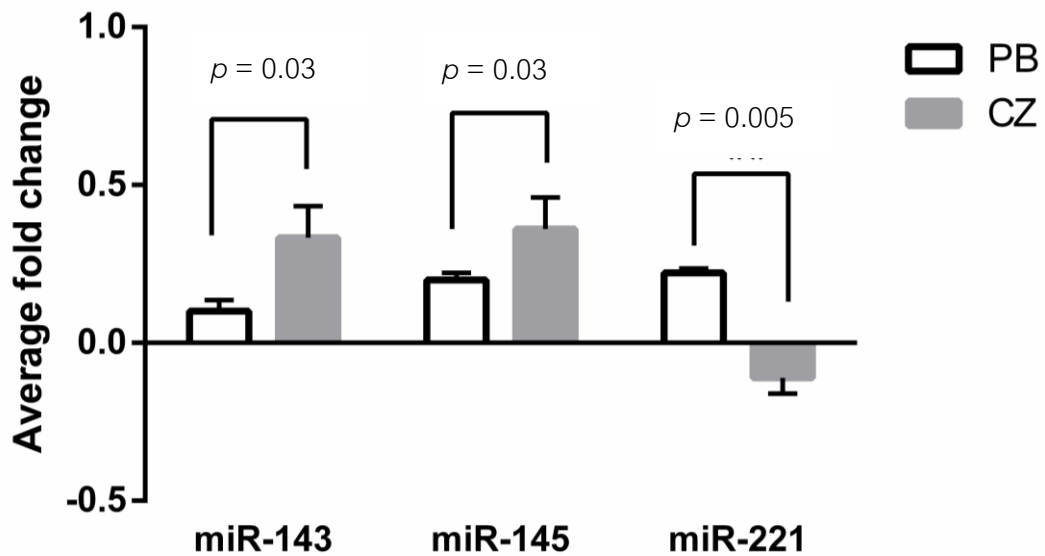
รูปภาพที่ 4.4 แสดงพยาธิสภาพการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา (*) ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (รูป ก) ซึ่งมีการหนาตัวของชั้นอินทิมามากกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (รูป ข)



แผนภูมิที่ 4.3 แสดงเปรียบเทียบพื้นที่ของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่หนาตัวเพิ่มขึ้นในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) กลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ) (รูป ก) และเปรียบเทียบอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ชั้นอินทิมาต่อพื้นที่ชั้นมีเดีย (intima/media) ระหว่างสองกลุ่ม (รูป ข)

4.3.3 การแสดงออกของ miRNA-143, miRNA-145, และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพหลอดเลือดของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและยาซิลอสตาซอลที่ 20 สัปดาห์

ผลการศึกษพบว่า การแสดงออก (expression) ของระดับ miRNA-143 และ miRNA-145 (average fold change) ในเนื้อเยื่อพยาธิสภาพหลอดเลือดของหนูทดลองมีค่าในทิศทางเดียวกัน กล่าวคือ miRNA-143 และ miRNA-145 ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ทั้งนี้ ค่าเฉลี่ยของระดับ average fold change ของ miRNA-143 ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลเท่ากับ 0.33 ± 0.1 เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของระดับ average fold change ของ miRNA-143 หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกเท่ากับ 0.10 ± 0.08 ($p = 0.025$) และค่าเฉลี่ยของระดับ average fold change ของ miRNA-145 ในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลเท่ากับ 0.36 ± 0.1 เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของระดับ average fold change ของ miRNA-145 หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกเท่ากับ 0.20 ± 0.05 ($p = 0.03$) ในขณะที่การแสดงออกของระดับ miRNA-221 จะมีค่าต่ำกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (ค่าเฉลี่ยของระดับ average fold change - 0.11 ± 0.05 เปรียบเทียบกับ 0.22 ± 0.03 , $p = 0.0048$) (แผนภูมิกราฟที่ 4.3)



แผนภูมิที่ 4.4 แสดงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย average fold change ของระดับ miRNA-143, miRNA-145 และ miRNA-221 ในพยาธิสภาพหลอดเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ)

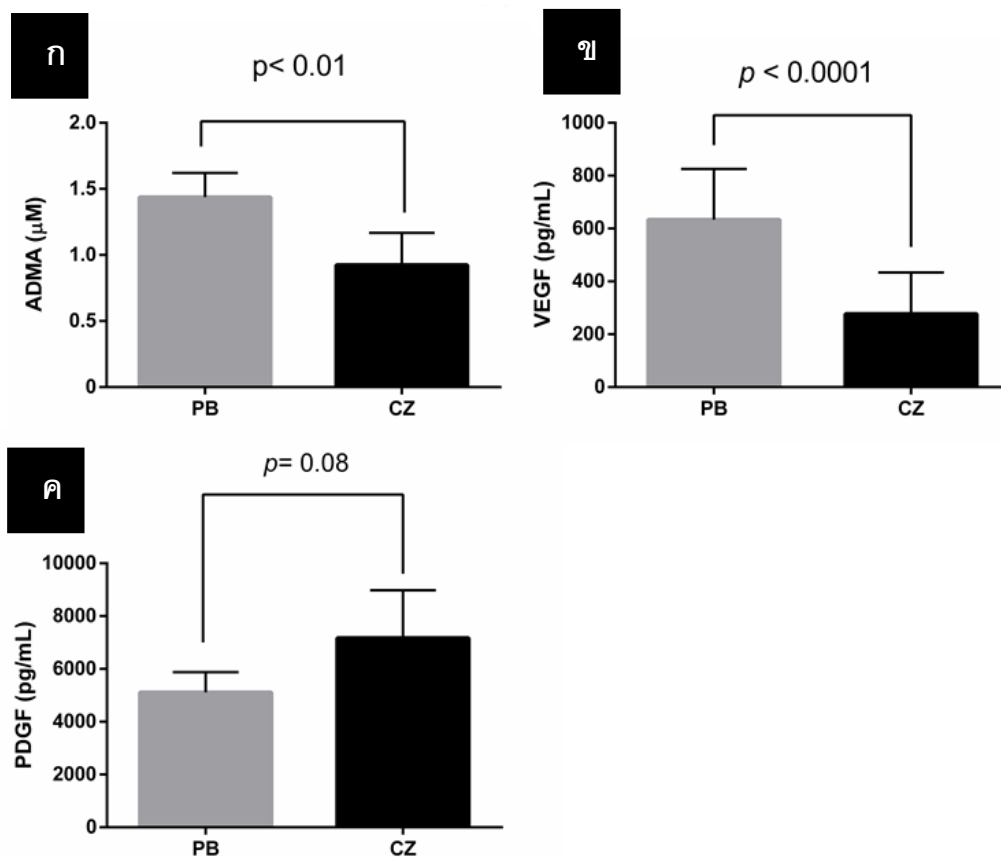
4.3.4 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของ miRNA-143, miRNA-145, และ miRNA-221 ในกระแสเลือดของหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและยาซิลอสตาซอลที่ 20 สัปดาห์

ไม่สามารถทำการตรวจวัดระดับระดับความเข้มข้นของ miRNA-143, miRNA-145, และ miRNA-221 จากการศึกษานี้ได้ เนื่องจากตัวอย่างเลือดที่ได้จากหนูทดลองไม่เพียงพอ

4.3.5 เปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารไซโตคายน์ ADMA, PDGF และ VEGF ในกระแสเลือดของหนูทดลองระหว่างกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและยาซิลอสตาซอลที่ 20 สัปดาห์

ผลการศึกษาพบว่า ระดับความเข้มข้นของสารไซโตคายน์ ADMA และ VEGF ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกมีค่าสูงกว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กล่าวคือ ค่าระดับความเข้มข้นของสารไซโตคายน์ ADMA ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกเท่ากับ $1.44 \pm 0.2 \mu\text{M}$ เปรียบเทียบกับค่าระดับความ

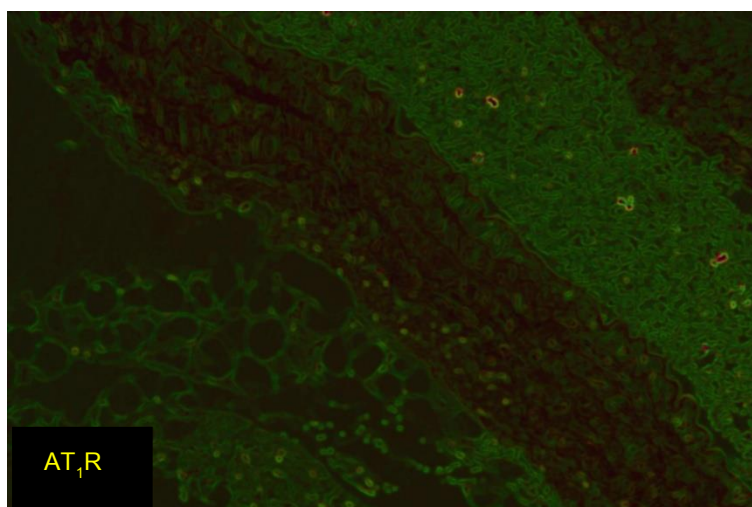
เข้มข้นของสารไฮโดรคาลซิน ADMA ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล เท่ากับ $0.82 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ($p < 0.01$) และค่าระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรคาลซิน VEGF ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอกเท่ากับ 634 ± 191.8 พิโคกรัม/ มล. เปรียบเทียบกับค่าระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรคาลซิน VEGF ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลเท่ากับ 277.1 ± 156.9 พิโคกรัม/ มล. ($p < 0.0001$) (แผนภูมิกราฟที่ 4.4) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรคาลซิน PDGF ในกระแสเลือดของหนูทดลองทั้งสองกลุ่มไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.08$)



แผนภูมิที่ 4.5 แสดงเปรียบเทียบระดับความเข้มข้นของสารไฮโดรคาลซิน ADMA (รูป ก), VEGF (รูป ข) และ PDGF (รูป ค) ในกระแสเลือดของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (PB) เปรียบเทียบกับหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (CZ)

4.3.6 การแสดงออกของ angiotensin II receptor AT₁ (AT₁R) ในพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา

จากการศึกษาไม่พบว่ามี การแสดงออก (expression) ของ AT₁R จากการย้อมพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาด้วยเทคนิค immunohistochemistry (รูปภาพที่ 4.5)



รูปภาพที่ 4.5 แสดงพยาธิสภาพของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่ไม่พบว่ามี การแสดงออกของ angiotensin II receptor AT₁ (AT₁R) ในการย้อมด้วยเทคนิค immunohistochemistry

บทที่ 5

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การใช้ยาซิลอสตาซอลมีผลต่อการชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยวิธี ischemic reperfusion injury with right nephrectomy ทั้งนี้ การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่ลดลงนี้ สัมพันธ์กับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้น (increase expression) ของ miRNA-143 และ miRNA-145 ในเนื้อเยื่อของหลอดเลือด และสัมพันธ์กับการแสดงออกที่ลดลง (decrease expression) ของ miRNA-221 ในเนื้อเยื่อของหลอดเลือด นอกจากนี้ การหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่ลดลงในหนูทดลองที่ได้รับยาซิลอสตาซอลนี้ยังสัมพันธ์กับการลดลงของระดับสารไซโตคายน์ชนิด asymmetric dimethylarginine (ADMA) และ vascular endothelial growth factor (VEGF)

5.2 อภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้ถือเป็นการศึกษาวิจัยแรกที่ศึกษาผลของการใช้ยาซิลอสตาซอลที่มีต่อการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่เกิดจากภาวะไตเรื้อรัง เนื่องจากการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษากการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่เกิดจากการกระตุ้นหลอดเลือดผ่านกระบวนการบาดเจ็บโดยตรง (direct injury) เท่านั้น อาทิเช่น การขยายหลอดเลือดด้วยวิธีการทำบอลลูน (balloon angioplasty) การเย็บซ่อมหลอดเลือด เป็นต้น ความแตกต่างของของทั้งสองโมเดลนี้ คือความรุนแรงในการเกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยพบว่าหากเป็นการบาดเจ็บโดยตรงต่อหลอดเลือดจะมีความรุนแรงของการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมามากกว่าที่เกิดจากภาวะไตเรื้อรัง อย่างไรก็ตาม กลไกทางพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นนั้นอาจมีความแตกต่างกันด้วยซึ่งเป็นประเด็นที่ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้ การศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นถึงผลสำเร็จของการใช้โมเดลใหม่เหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะไตเรื้อรังเรียกว่า โมเดล chronic ischemic reperfusion injury and right nephrectomy ที่เป็นตัวแทนภาวะไตเรื้อรังได้เป็นอย่างดี เมื่อเปรียบเทียบกับโมเดลอื่น อาทิเช่น

5/6 nephrectomy หรือ folic injection ที่จะมีการดำเนินโรคของภาวะไตเรื้อรังค่อนข้างเร็วจนอาจไม่เห็นผลการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดที่เด่นชัดได้ ทั้งนี้ พบว่ารูปแบบ 5/8 nephrectomy จะให้รูปแบบของภาวะไตเรื้อรังที่มีการรั่วของอัลบูมินในปัสสาวะ (urine albumin creatinine ratio) มากที่สุด เนื่องจากมีลักษณะทางพยาธิสภาพเป็น focal segmental glomerulosclerosis ในขณะที่รูปแบบ unilateral ureteric obstruction จะเป็นรูปแบบของภาวะไตเรื้อรังที่มีการรั่วของอัลบูมินในปัสสาวะ (urine albumin creatinine ratio) น้อยที่สุด เพราะมีลักษณะทางพยาธิสภาพเป็น chronic tubule-interstitial fibrosis

ยิ่งไปกว่านั้น หากพิจารณาจากน้ำหนักที่เปลี่ยนแปลงของหนูทดลองจะพบว่ารูปแบบ left ischemic reperfusion injury and right nephrectomy ที่ใช้ในการศึกษานี้จะพบว่ามีค่าเป็นลบ (negative balance in body weight) นั่นคือ หนูทดลองมีภาวะไตเรื้อรังที่มากพอทำให้เกิดภาวะทุพโภชนาการ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองจากรูปแบบอื่นๆ จะพบว่าหนูมีน้ำหนักที่หรือเพิ่มขึ้น

ภาวะโลหิตจางเป็นอีกหนึ่งองค์ประกอบที่ใช้ประเมินภาวะไตเรื้อรัง จากการศึกษาเปรียบเทียบพบว่า หนูทดลองที่มีภาวะไตเรื้อรังจากการเหนี่ยวนำด้วยรูปแบบ left ischemic reperfusion injury and right nephrectomy จะมีภาวะโลหิตจางที่ระยะเวลา 20 สัปดาห์ร่วมด้วย และมีความรุนแรงมากกว่าหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยรูปแบบอื่นๆ (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 5.1 แสดงค่าพื้นฐานทางกายภาพ และค่าทางห้องปฏิบัติการของหนู mice สายพันธุ์ CD-1 ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยวิธีต่างๆ

รูปแบบ	ระยะเวลา	Serum Creatinine (mg/dL)	ACR (μ g/mg)	Hct (%)	BW (g)
Unilateral ureteric obstruction ⁽¹¹³⁾	2 สัปดาห์	0.03±0.01	17±3	50±1	35±1
5/6 nephrectomy ⁽¹¹³⁾	2 สัปดาห์	0.49±0.1	1176±277	35±2	34±2
5/6 nephrectomy ⁽¹¹³⁾	4 สัปดาห์	0.48±0.06	2640±502	34±3	39±2
Folic acid injection ⁽¹¹³⁾	2 สัปดาห์	0.59±0.06	89±13	40±1	33±1
Folic acid injection ⁽¹¹³⁾	12 สัปดาห์	0.46±0.08	158±12	41±2	53±1
Left ischemic reperfusion injury and right nephrectomy (the present study)	2 สัปดาห์	0.51±0.08	130±18	47±2	34±1
Left ischemic reperfusion injury and right nephrectomy (the present study)	20 สัปดาห์	0.78±0.08	881±93	33±2	32±2

ซิลอสตาซอลเป็นยาที่ประกอบด้วยสารต้านการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส-3 แบบเฉพาะเจาะจง มีฤทธิ์เป็นสารต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ขยายหลอดเลือดในทางเวชปฏิบัติ ซิลอสตาซอลเป็นยาชนิดแรก (first-line drug) ที่ใช้รักษาภาวะหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral arterial disease) สำหรับการให้ยาซิลอสตาซอลเพื่อจุดประสงค์ในการยับยั้งหรือชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา นั้นมีเพียงการศึกษาในหลอดเลือดที่ได้รับการบาดเจ็บโดยตรง (direct mechanical injury) ทั้งการศึกษาที่ศึกษาในมนุษย์ และสัตว์ทดลอง และในหลากหลายภาวะ อาทิเช่น ในหลอดเลือดแดงหัวใจโคโรนารี (coronary artery) หลอดเลือดแดงคาโรติด (carotid artery) และหลอดเลือดเพื่อการฟอกเลือด (hemodialysis vascular access) เป็นต้น ซึ่งพบว่ายาซิลอสตาซอลมีผลในการยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้ดี อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อผลลัพธ์ระยะยาวทางคลินิก (long-term outcomes) กล่าวคือ ไม่ลดอัตราการเสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดสมองหรือโรคหลอดเลือดหัวใจ และไม่ลดอัตราการตีบตันซ้ำ (restenosis) ของทั้งหลอดเลือดแดงหัวใจโคโรนารี และหลอดเลือดแดงคาโรติด ยกเว้นในหลอดเลือดเพื่อการฟอกเลือดที่พบว่า การให้ยาซิลอสตาซอลสามารถยืดระยะเวลาการใช้งานได้ในระยะยาว (long-term patency rate) ได้อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งหากพิจารณาจากประเด็นการศึกษาทั้งหมดนี้ มีความเป็นไปได้ว่ายาซิลอสตาซอลมีการตอบสนองต่อหลอดเลือดที่มีตำแหน่งเป็นหลอดเลือดส่วนปลายมากกว่าระบบหลอดเลือดส่วนกลาง (central arterial system) อย่างไรก็ตาม ผลจากการศึกษาวิจัยนี้กลับพบว่า การให้ยาซิลอสตาซอลในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไตเรื้อรังด้วยวิธี ischemic reperfusion injury with right nephrectomy มีผลต่อการชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ซึ่งจากการศึกษานี้ใช้เป็นหลอดเลือดแดงเอออร์ตา ทั้งนี้ ข้อเสนอแนะพื้นฐานที่เป็นไปได้ประการหนึ่งคือ จากกลไกการเหนี่ยวนำให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาที่แตกต่างกัน

จากการศึกษานี้พบว่า ผลจากการให้ยาซิลอสตาซอลในหนูทดลอง พบว่าทำให้มีการยับยั้งการเกิดภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพมีความสัมพันธ์เชิงแปรผันตรงกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ miRNA-143 และ miRNA-145 และความสัมพันธ์เชิงแปรผกผันกับการเปลี่ยนแปลงของระดับ

miRNA-122 ในเนื้อเยื่อของหลอดเลือดทั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาโดย Ji และคณะ⁽²³⁾ ที่พบว่า การแสดงออกของระดับ miRNA-143 และ miRNA-145 จะลดลงในหลอดเลือดที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา และการศึกษาโดย Liu และคณะ⁽²⁸⁾ ที่พบว่า การแสดงออกของระดับ miRNA-221 จะเพิ่มมากกว่าปกติในหลอดเลือดที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาของหลอดเลือดที่ผ่านการขยายหลอดเลือดด้วยวิธีการทำบอลลูน (balloon angioplasty)

จากความสัมพันธ์ระหว่างระดับ miRNA และพยาธิสภาพของการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ร่วมกับคุณสมบัติของ miRNA เองที่เป็นสารโปรตีนที่มีความคงทน (stability) สูงในสภาวะนอกเซลล์ และเป็นสารควบคุมการทำงานของสารพันธุกรรม messengerRNA ทำให้ miRNA เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) ในอุดมคติ ซึ่งจะสามารถใช้เป็นเครื่องมือวินิจฉัย (diagnosis) ตรวจคัดกรอง (screening) และตรวจติดตาม (surveillance) ภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาของหลอดเลือดได้เป็นอย่างดี หากในอนาคตสามารถพัฒนาวิธีการตรวจหาระดับ miRNA ให้มีความแม่นยำ ถูกต้อง และรวดเร็ว

ถึงแม้ว่าความคงทนของสารไซโตไคน์จะน้อยกว่าเมื่อเทียบกับ miRNA และมีรูปแบบการประสานงานระหว่างไซโตไคน์ชนิด pro-inflammatory และ anti-inflammatory ที่ซับซ้อนตามระยะเวลาการดำเนินของโรค กลับพบว่าสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องสัมพันธ์กับ vascular smooth muscle cell (VSMC-related cytokines) จะมีรูปแบบตามสภาวะหลอดเลือดที่ค่อนข้างคงตัวและแน่นอน

สารไซโตไคน์ชนิด PDGF จัดเป็นสารไซโตไคน์ที่มีบทบาทสำคัญตัวหนึ่งในการควบคุมการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ที่ผ่านมามีการศึกษาแสดงถึงความสัมพันธ์โดยตรงระหว่างระดับ PDGF และระดับ miRNA-145 ในการควบคุมการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา⁽¹¹⁴⁾ อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาวิจัยนี้ ไม่พบว่ามี ความแตกต่างของระดับสารไซโตไคน์ PDGF ระหว่างหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอลและยาหลอก ทั้งนี้ ผู้วิจัยตั้งสมมติฐานว่า น่าจะเป็นผลจากจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นของระดับยาซิลอสตาซอลที่มากและนานเพียงพอในกระแสเลือด หรือจำเป็นต้องใช้รูปแบบการบริหารยาที่ออกฤทธิ์เฉพาะที่⁽¹¹⁵⁾

ผลจากการศึกษา ยังพบเพิ่มเติมว่าหนูทดลองที่ได้รับยาซิลอสตาซอลนั้นมีระดับสาร ADMA และสารไซโตไคน์ VEGF ที่ลดลง ทั้งนี้ เนื่องจากสาร ADMA เป็นสารที่มีคุณสมบัติบ่งบอกถึงภาวะการอักเสบ (inflammation) ได้ดี⁽¹¹⁶⁾ จึงเป็นไปได้ว่ากลไกการยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา น่าจะเกิดผ่านกลไกการลดภาวะอักเสบด้วยทางหนึ่ง ดังนั้น การส่งตรวจหาเครื่องหมายชี้วัดทางชีวภาพ (biomarkers) อื่นๆ อาทิเช่น high sensitivity C-reactive protein (hsCRP), interleukin-1, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-10 หรือ tumor necrosis factor- α (TNF- α) เป็นต้น จะช่วยสนับสนุนข้อสันนิษฐานดังกล่าวได้

5.3 ข้อจำกัดของงานวิจัย (Limitation)

1. ผลการศึกษาที่ได้จากการศึกษาวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเพื่อให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ทางวิทยาศาสตร์พื้นฐาน (basic science) ของภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา ยังไม่สามารถนำไปใช้อ้างอิงในสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นนอกเหนือจากหนูทดลองสายพันธุ์เดียวกับที่ใช้ในการทดลองนี้หรือในมนุษย์ได้ จำเป็นต้องอาศัยการศึกษาเปรียบเทียบในสัตว์ทดลองอื่นๆ ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับมนุษย์มากขึ้น
2. การเกิดภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาสามารถเกิดได้จากหลายสาเหตุ อาทิเช่น การบาดเจ็บโดยตรงต่อหลอดเลือดที่เกิดจากแรงจากการทำหัตถการใช้บอลลูนขยายหลอดเลือด หรือการฉีกขาดของหลอดเลือด เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาการเกิดภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาวิจัยนี้ที่เป็นผลจากการภาวะไตเรื้อรัง จึงอาจมีผลที่แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ได้
3. วิธีการตรวจและแปลผลเลือดในสัตว์ทดลอง เป็นสิ่งที่แตกต่างจากการตรวจในมนุษย์ จึงต้องอาศัยการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมเพื่อเลือกวิธีการทดสอบที่เหมาะสม และสามารถนำผลการศึกษามาอ้างอิงในมนุษย์ได้

5.4 ข้อเสนอแนะในการนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ (implication for practice) และการนำไปใช้เชิงวิจัยในอนาคต (implication for further research)

ผลที่ได้จากการวิจัยนี้ แสดงถึงความเป็นไปได้ในการใช้ยาซิลอสตาซอลเพื่อชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะที่มีไตเรื้อรังร่วมด้วย ทั้งนี้หากสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้มาประยุกต์ใช้ในทางคลินิกกับผู้ป่วยไตเรื้อรังได้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างมหาศาล เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดโรคหลอดเลือดที่มีกลไกจากการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาและภาวะไตเรื้อรังนั้นมีอุบัติการณ์ร่วมที่สูงมาก โดยมักเกิดจากการกระตุ้นผ่านภาวะยูรีเมียเป็นสำคัญ ถึงแม้ว่าที่ผ่านมาจะมีการศึกษาที่แสดงผลล้มเหลวในการใช้ยาซิลอสตาซอลเพื่อยับยั้งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในผู้ป่วยไตเรื้อรังที่เข้ารับการบำบัดทดแทนไตด้วยวิธีการฟอกเลือด (hemodialysis) โดยพบว่าการใช้ยาซิลอสตาซอลไม่สามารถยับยั้งหรือชะลอการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหลอดเลือดที่ใช้เพื่อการฟอกเลือด (arteriovenous fistula) ได้ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยมีความเห็นว่าผลล้มเหลวที่เกิดขึ้นส่วนหนึ่งน่าจะเป็นผลมาจากระยะเวลาที่เริ่มใช้ยาซิลอสตาซอลนั้นสายเกินกว่าที่จะยาส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงความหนาของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาได้ เพราะผู้ป่วยไตเรื้อรังที่จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไตนั้นมักผ่านระยะไตเรื้อรังมานานเป็นปี ซึ่งย่อมจะมีการเปลี่ยนแปลงของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาเกิดขึ้นเรียบร้อยแล้วตามที่แสดงในผลการศึกษานี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่า การศึกษาต่อไปในอนาคตควรสนใจศึกษาในประเด็นการใช้ยาซิลอสตาซอลเป็นการป้องกันขั้นปฐมภูมิ (primary prophylaxis) ในการเกิดภาวะการหนาตัวของผนังหลอดเลือดชั้นอินทิมาในผู้ป่วยไตเรื้อรังตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เพราะนอกจากจะได้ประโยชน์จากการเตรียมหลอดเลือดที่ดีเพื่อมีไว้ใช้ในการฟอกเลือดในอนาคต ยังสามารถศึกษาว่าการใช้ยาซิลอสตาซอลจะสามารถลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหลอดเลือดส่วนปลาย (peripheral vascular disease หรือ PAD) ได้หรือไม่ เนื่องจากเป็นโรคที่มีอุบัติการณ์ร่วมในภาวะไตเรื้อรังที่สูงมากเช่นกัน



รายการอ้างอิง

1. Lee T, Chauhan V, Krishnamoorthy M, Wang Y, Arend L, Mistry MJ, et al. Severe venous neointimal hyperplasia prior to dialysis access surgery. *Nephrol Dial Transplant*. 2011 Jul;26(7):2264-70.
2. Lee T, Safdar N, Mistry MJ, Wang Y, Chauhan V, Campos B, et al. Preexisting venous calcification prior to dialysis vascular access surgery. *Semin Dial*. 2012 Sep-Oct;25(5):592-5.
3. Wali MA, Eid RA, Dewan M, Al-Homrany MA. Pre-existing histopathological changes in the cephalic vein of renal failure patients before arterio-venous fistula (AVF) construction. *Ann Thorac Cardiovasc Surg*. 2006 Oct;12(5):341-8.
4. Wasse H, Huang R, Naqvi N, Smith E, Wang D, Husain A. Inflammation, oxidation and venous neointimal hyperplasia precede vascular injury from AVF creation in CKD patients. *J Vasc Access*. 2012 Apr-Jun;13(2):168-74.
5. Moody WE, Edwards NC, Madhani M, Chue CD, Steeds RP, Ferro CJ, et al. Endothelial dysfunction and cardiovascular disease in early-stage chronic kidney disease: cause or association? *Atherosclerosis*. 2012 Jul;223(1):86-94.
6. Kokubo T, Ishikawa N, Uchida H, Chasnoff SE, Xie X, Mathew S, et al. CKD accelerates development of neointimal hyperplasia in arteriovenous fistulas. *J Am Soc Nephrol*. 2009 Jun;20(6):1236-45.
7. Gresele P, Momi S, Falcinelli E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. *Br J Clin Pharmacol*. 2011 Oct;72(4):634-46.
8. Takigawa T, Tsurushima H, Suzuki K, Tsuruta W, Nakamura K, Matsumura A. Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-selectin in endothelial cells. *J Vasc Surg*. 2012 Feb;55(2):506-16.
9. Varty K, Porter K, Bell PR, London NJ. Vein morphology and bypass graft stenosis. *Br J Surg*. 1996 Oct;83(10):1375-9.

10. Castier Y, Lehoux S, Hu Y, Foteinos G, Tedgui A, Xu Q. Characterization of neointima lesions associated with arteriovenous fistulas in a mouse model. *Kidney Int.* 2006 Jul;70(2):315-20.
11. Porter KE, Loftus IM, Peterson M, Bell PR, London NJ, Thompson MM. Marimastat inhibits neointimal thickening in a model of human vein graft stenosis. *Br J Surg.* 1998 Oct;85(10):1373-7.
12. Weiss MF, Scivittaro V, Anderson JM. Oxidative stress and increased expression of growth factors in lesions of failed hemodialysis access. *Am J Kidney Dis.* 2001 May;37(5):970-80.
13. Schepers A, Eefting D, Bonta PI, Grimbergen JM, de Vries MR, van Weel V, et al. Anti-MCP-1 gene therapy inhibits vascular smooth muscle cells proliferation and attenuates vein graft thickening both in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006 Sep;26(9):2063-9.
14. Zou Y, Hu Y, Mayr M, Dietrich H, Wick G, Xu Q. Reduced neointima hyperplasia of vein bypass grafts in intercellular adhesion molecule-1-deficient mice. *Circ Res.* 2000 Mar 3;86(4):434-40.
15. Diacovo TG, Roth SJ, Buccola JM, Bainton DF, Springer TA. Neutrophil rolling, arrest, and transmigration across activated, surface-adherent platelets via sequential action of P-selectin and the beta 2-integrin CD11b/CD18. *Blood.* 1996 Jul 1;88(1):146-57.
16. Simon DI, Chen Z, Xu H, Li CQ, Dong J, McIntire LV, et al. Platelet glycoprotein Iba1 is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Exp Med.* 2000 Jul 17;192(2):193-204.
17. Croatt AJ, Grande JP, Hernandez MC, Ackerman AW, Katusic ZS, Nath KA. Characterization of a model of an arteriovenous fistula in the rat: the effect of L-NAME. *Am J Pathol.* 2010 May;176(5):2530-41.
18. Cooke JP. Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Sep;20(9):2032-7.

19. Shi Y, O'Brien JE, Jr., Mannion JD, Morrison RC, Chung W, Fard A, et al. Remodeling of autologous saphenous vein grafts. The role of perivascular myofibroblasts. *Circulation*. 1997 Jun 17;95(12):2684-93.
20. Diao Y, Guthrie S, Xia SL, Ouyang X, Zhang L, Xue J, et al. Long-term engraftment of bone marrow-derived cells in the intimal hyperplasia lesion of autologous vein grafts. *Am J Pathol*. 2008 Mar;172(3):839-48.
21. Takaoka M, Nagata D, Kihara S, Shimomura I, Kimura Y, Tabata Y, et al. Periadventitial adipose tissue plays a critical role in vascular remodeling. *Circ Res*. 2009 Oct 23;105(9):906-11.
22. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116(2):281-97.
23. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, et al. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007 Jun 8;100(11):1579-88.
24. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5;105(5):1516-21.
25. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, et al. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009 Aug 6;460(7256):705-10.
26. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Kruger M, Hein L, et al. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2634-47.
27. Parmacek MS. MicroRNA-modulated targeting of vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest*. 2009 Sep;119(9):2526-8.
28. Liu X, Cheng Y, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. A necessary role of miR-221 and miR-222 in vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia. *Circ Res*. 2009 Feb 27;104(4):476-87.

29. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Induction of microRNA-221 by platelet-derived growth factor signaling is critical for modulation of vascular smooth muscle phenotype. *J Biol Chem*. 2009 Feb 6;284(6):3728-38.
30. Kotaja N, Sassone-Corsi P. The chromatoid body: a germ-cell-specific RNA-processing centre. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Jan;8(1):85-90.
31. Sun DX, Liu Z, Tan XD, Cui DX, Wang BS, Dai XW. Nanoparticle-mediated local delivery of an antisense TGF-beta1 construct inhibits intimal hyperplasia in autogenous vein grafts in rats. *PLoS One*. 2012;7(7):e41857.
32. Tsai S, Hollenbeck ST, Ryer EJ, Edlin R, Yamanouchi D, Kundi R, et al. TGF-beta through Smad3 signaling stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 Aug;297(2):H540-9.
33. Suwanabol PA, Seedial SM, Shi X, Zhang F, Yamanouchi D, Roenneburg D, et al. Transforming growth factor-beta increases vascular smooth muscle cell proliferation through the Smad3 and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinases pathways. *J Vasc Surg*. 2012 Aug;56(2):446-54.
34. Suwanabol PA, Seedial SM, Zhang F, Shi X, Si Y, Liu B, et al. TGF-beta and Smad3 modulate PI3K/Akt signaling pathway in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Jun 1;302(11):H2211-9.
35. Kundi R, Hollenbeck ST, Yamanouchi D, Herman BC, Edlin R, Ryer EJ, et al. Arterial gene transfer of the TGF-beta signalling protein Smad3 induces adaptive remodelling following angioplasty: a role for CTGF. *Cardiovasc Res*. 2009 Nov 1;84(2):326-35.
36. Liu X, Luo F, Pan K, Wu W, Chen H. High glucose upregulates connective tissue growth factor expression in human vascular smooth muscle cells. *BMC Cell Biol*. 2007;8:1.
37. Duru EA, Fu Y, Davies MG. Urokinase requires NAD(P)H oxidase to transactivate the epidermal growth factor receptor. *Surgery*. 2012 Nov;152(5):879-85.
38. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK. Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res*. 1988 Apr;62(4):749-56.

39. Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK. Involvement of connexin 43 in angiotensin II-induced migration and proliferation of saphenous vein smooth muscle cells via the MAPK-AP-1 signaling pathway. *J Mol Cell Cardiol.* 2008 May;44(5):882-90.
40. Cheng G, Kim MJ, Jia G, Agrawal DK. Involvement of chloride channels in IGF-I-induced proliferation of porcine arterial smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2007 Jan 1;73(1):198-207.
41. Banno H, Takei Y, Muramatsu T, Komori K, Kadomatsu K. Controlled release of small interfering RNA targeting midkine attenuates intimal hyperplasia in vein grafts. *J Vasc Surg.* 2006 Sep;44(3):633-41.
42. Conte MS, Bandyk DF, Clowes AW, Moneta GL, Seely L, Lorenz TJ, et al. Results of PREVENT III: a multicenter, randomized trial of edifoligide for the prevention of vein graft failure in lower extremity bypass surgery. *J Vasc Surg.* 2006 Apr;43(4):742-51; discussion 51.
43. Wang J, Liu K, Shen L, Wu H, Jing H. Small interfering RNA to c-myc inhibits vein graft restenosis in a rat vein graft model. *J Surg Res.* 2011 Jul;169(1):e85-91.
44. Nabzdyk CS, Lancero H, Nguyen KP, Salek S, Conte MS. RNA interference-mediated survivin gene knockdown induces growth arrest and reduced migration of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011 Nov;301(5):H1841-9.
45. Zhang HW, Zhang T, Shen BZ, Liu M, Liu JR. Toxicological insight from AP-1 silencing study on proliferation, migration, and dedifferentiation of rat vascular smooth muscle cell. *Cardiovasc Toxicol.* 2012 Mar;12(1):25-38.
46. Redmond EM, Hamm K, Cullen JP, Hatch E, Cahill PA, Morrow D. Inhibition of patched-1 prevents injury-induced neointimal hyperplasia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Aug;33(8):1960-4.
47. Li F, Duman-Scheel M, Yang D, Du W, Zhang J, Zhao C, et al. Sonic hedgehog signaling induces vascular smooth muscle cell proliferation via induction of the G1 cyclin-retinoblastoma axis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Sep;30(9):1787-94.

48. Zhang LL, Gao CY, Fang CQ, Wang YJ, Gao D, Yao GE, et al. PPARgamma attenuates intimal hyperplasia by inhibiting TLR4-mediated inflammation in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2011 Dec 1;92(3):484-93.
49. Sommerville LJ, Xing C, Kelemen SE, Eguchi S, Autieri MV. Inhibition of allograft inflammatory factor-1 expression reduces development of neointimal hyperplasia and p38 kinase activity. *Cardiovasc Res*. 2009 Jan 1;81(1):206-15.
50. Zuojun H, Lingyu H, Wei H, Henghui Y, Chonggang Z, Jingsong W, et al. Interference of IP-10 expression inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and intimal hyperplasia in carotid artery: a new insight in the prevention of restenosis. *Cell Biochem Biophys*. 2012 Jan;62(1):125-35.
51. Meng XB, Bi XL, Zhao HL, Feng JB, Zhang JP, Song GM, et al. Small interfering RNA targeting nuclear factor kappa B to prevent vein graft stenosis in rat models. *Transplant Proc*. 2013 Jul-Aug;45(6):2553-8.
52. Turner NA, Hall KT, Ball SG, Porter KE. Selective gene silencing of either MMP-2 or MMP-9 inhibits invasion of human saphenous vein smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2007 Jul;193(1):36-43.
53. Mountain DJ, Kirkpatrick SS, Freeman MB, Stevens SL, Goldman MH, Grandas OH. Role of MT1-MMP in estrogen-mediated cellular processes of intimal hyperplasia. *J Surg Res*. 2012 Apr;173(2):224-31.
54. Wang L, Zheng J, Bai X, Liu B, Liu CJ, Xu Q, et al. ADAMTS-7 mediates vascular smooth muscle cell migration and neointima formation in balloon-injured rat arteries. *Circ Res*. 2009 Mar 13;104(5):688-98.
55. Hlawaty H, Jacob MP, Louedec L, Letourneur D, Brink C, Michel JB, et al. Leukotriene receptor antagonism and the prevention of extracellular matrix degradation during atherosclerosis and in-stent stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Apr;29(4):518-24.
56. Panchenko MP, Siddiquee Z, Dombkowski DM, Alekseyev YO, Lenburg ME, Walker JD, et al. Protein kinase CK1alphaLS promotes vascular cell proliferation and intimal hyperplasia. *Am J Pathol*. 2010 Sep;177(3):1562-72.

57. Bai X, Margariti A, Hu Y, Sato Y, Zeng L, Ivetic A, et al. Protein kinase C $\{\delta\}$ deficiency accelerates neointimal lesions of mouse injured artery involving delayed reendothelialization and vasohibin-1 accumulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010 Dec;30(12):2467-74.
58. Monahan TS, Andersen ND, Martin MC, Malek JY, Shrikhande GV, Pradhan L, et al. MARCKS silencing differentially affects human vascular smooth muscle and endothelial cell phenotypes to inhibit neointimal hyperplasia in saphenous vein. *FASEB J.* 2009 Feb;23(2):557-64.
59. Luo DX, Cheng J, Xiong Y, Li J, Xia C, Xu C, et al. Static pressure drives proliferation of vascular smooth muscle cells via caveolin-1/ERK1/2 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Jan 22;391(4):1693-7.
60. Monahan TS, Andersen ND, Panossian H, Kalish JA, Daniel S, Shrikhande GV, et al. A novel function for cadherin 11/osteoblast-cadherin in vascular smooth muscle cells: modulation of cell migration and proliferation. *J Vasc Surg.* 2007 Mar;45(3):581-9.
61. Meguro K, Iida H, Takano H, Morita T, Sata M, Nagai R, et al. Function and role of voltage-gated sodium channel NaV1.7 expressed in aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 Jan;296(1):H211-9.
62. Nabzdyk CS, Chun MC, Oliver-Allen HS, Pathan SG, Phaneuf MD, You JO, et al. Gene silencing in human aortic smooth muscle cells induced by PEI-siRNA complexes released from dip-coated electrospun poly(ethylene terephthalate) grafts. *Biomaterials.* 2014 Mar;35(9):3071-9.
63. Miyachi H, Mii S, Enomoto A, Murakumo Y, Kato T, Asai N, et al. Role of Girdin in intimal hyperplasia in vein grafts and efficacy of atelocollagen-mediated application of small interfering RNA for vein graft failure. *J Vasc Surg.* 2014 Aug;60(2):479-89 e5.
64. Zou Y, Fu Y, Davies MG. Galphaq G proteins modulate MMP-9 gelatinase during remodeling of the murine femoral artery. *J Surg Res.* 2013 May 1;181(1):32-40.
65. Ma Z, Wang H, Wu L, Zhui L, Shi W, Ma D, et al. RNAi-mediated Rab5a suppression inhibits proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Acta Cardiol.* 2010 Oct;65(5):507-14.

66. Pullmann R, Jr., Juhaszova M, Lopez de Silanes I, Kawai T, Mazan-Mamczarz K, Halushka MK, et al. Enhanced proliferation of cultured human vascular smooth muscle cells linked to increased function of RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22819-26.
67. Fuster V, Dyken ML, Vokonas PS, Hennekens C. Aspirin as a therapeutic agent in cardiovascular disease. Special Writing Group. *Circulation*. 1993 Feb;87(2):659-75.
68. Serruys PW, Rutsch W, Heyndrickx GR, Danchin N, Mast EG, Wijns W, et al. Prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty with thromboxane A₂-receptor blockade. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Coronary Artery Restenosis Prevention on Repeated Thromboxane-Antagonism Study (CARPORT). *Circulation*. 1991 Oct;84(4):1568-80.
69. Chervu A, Moore WS, Quinones-Baldrich WJ, Henderson T. Efficacy of corticosteroids in suppression of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg*. 1989 Aug;10(2):129-34.
70. Pepine CJ, Hirshfeld JW, Macdonald RG, Henderson MA, Bass TA, Goldberg S, et al. A controlled trial of corticosteroids to prevent restenosis after coronary angioplasty. M-HEART Group. *Circulation*. 1990 Jun;81(6):1753-61.
71. Villa AE, Guzman LA, Chen W, Golomb G, Levy RJ, Topol EJ. Local delivery of dexamethasone for prevention of neointimal proliferation in a rat model of balloon angioplasty. *J Clin Invest*. 1994 Mar;93(3):1243-9.
72. Jonasson L, Holm J, Hansson GK. Cyclosporin A inhibits smooth muscle proliferation in the vascular response to injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Apr;85(7):2303-6.
73. Does the new angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty? Results of the MERCATOR study: a multicenter, randomized, double-blind placebo-controlled trial. Multicenter European Research Trial with Cilazapril after Angioplasty to Prevent Transluminal Coronary Obstruction and Restenosis (MERCATOR) Study Group. *Circulation*. 1992 Jul;86(1):100-10.

74. Whitworth HB, Roubin GS, Hollman J, Meier B, Leimgruber PP, Douglas JS, Jr., et al. Effect of nifedipine on recurrent stenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1986 Dec;8(6):1271-6.
75. Corcos T, David PR, Val PG, Renkin J, Dangoisse V, Rapold HG, et al. Failure of diltiazem to prevent restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J*. 1985 May;109(5 Pt 1):926-31.
76. O'Malley MK, McDermott EW, Mehigan D, O'Higgins NJ. Role for prazosin in reducing the development of rabbit intimal hyperplasia after endothelial denudation. *Br J Surg*. 1989 Sep;76(9):936-8.
77. Serruys PW, Klein W, Tijssen JP, Rutsch W, Heyndrickx GR, Emanuelsson H, et al. Evaluation of ketanserin in the prevention of restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. A multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial. *Circulation*. 1993 Oct;88(4 Pt 1):1588-601.
78. Kauffman RF, Bean JS, Zimmerman KM, Brown RF, Steinberg MI. Losartan, a nonpeptide angiotensin II (Ang II) receptor antagonist, inhibits neointima formation following balloon injury to rat carotid arteries. *Life Sci*. 1991;49(25):PL223-8.
79. Urban P, Buller N, Fox K, Shapiro L, Bayliss J, Rickards A. Lack of effect of warfarin on the restenosis rate or on clinical outcome after balloon coronary angioplasty. *Br Heart J*. 1988 Dec;60(6):485-8.
80. Sarembock IJ, Gertz SD, Gimple LW, Owen RM, Powers ER, Roberts WC. Effectiveness of recombinant desulphatothirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. *Circulation*. 1991 Jul;84(1):232-43.
81. Clowes AW, Karnowsky MJ. Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries. *Nature*. 1977 Feb 17;265(5595):625-6.
82. Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cell proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(21):8412-6.

83. Kling D, Fingerle J, Harlan JM. Inhibition of leukocyte extravasation with a monoclonal antibody to CD18 during formation of experimental intimal thickening in rabbit carotid arteries. *Arterioscler Thromb*. 1992 Sep;12(9):997-1007.
84. Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, et al. Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking alpha V beta 3 integrin with a small peptide antagonist GpenGRGDSPCA. *J Vasc Surg*. 1994 Jan;19(1):125-34.
85. Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation*. 1992 Dec;86(6 Suppl):III43-6.
86. Hansson GK, Holm J. Interferon-gamma inhibits arterial stenosis after injury. *Circulation*. 1991 Sep;84(3):1266-72.
87. Lundergan C, Foegh ML, Vargas R, Eufemio M, Bormes GW, Kot PA, et al. Inhibition of myointimal proliferation of the rat carotid artery by the peptides, angiopeptin and BIM 23034. *Atherosclerosis*. 1989 Nov;80(1):49-55.
88. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991 Sep 6;253(5024):1129-32.
89. Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 May 1;88(9):3739-43.
90. Furube E, Mannari T, Morita S, Nishikawa K, Yoshida A, Itoh M, et al. VEGF-dependent and PDGF-dependent dynamic neurovascular reconstruction in the neurohypophysis of adult mice. *J Endocrinol*. 2014 Jul;222(1):161-79.
91. Ortu P, LaMuraglia GM, Roberts WG, Flotte TJ, Hasan T. Photodynamic therapy of arteries. A novel approach for treatment of experimental intimal hyperplasia. *Circulation*. 1992 Mar;85(3):1189-96.
92. Muller DW, Ellis SG, Topol EJ. Colchicine and antineoplastic therapy for the prevention of restenosis after percutaneous coronary interventions. *J Am Coll Cardiol*. 1991 May;17(6 Suppl B):126B-31B.

93. Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, Jagoe R, Newby AC, Evan GI. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligodeoxynucleotides. *J Clin Invest.* 1994 Feb;93(2):820-8.
94. Simons M, Leclerc G, Safian RD, Isner JM, Weir L, Baim DS. Relation between activated smooth-muscle cells in coronary-artery lesions and restenosis after atherectomy. *N Engl J Med.* 1993 Mar 4;328(9):608-13.
95. McNamara DB, Bedi B, Aurora H, Tena L, Ignarro LJ, Kadowitz PJ, et al. L-arginine inhibits balloon catheter-induced intimal hyperplasia. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 May 28;193(1):291-6.
96. Kimura Y, Tani T, Kanbe T, Watanabe K. Effect of cilostazol on platelet aggregation and experimental thrombosis. *Arzneimittelforschung.* 1985;35(7A):1144-9.
97. Takigawa T, Matsumaru Y, Hayakawa M, Nemoto S, Matsumura A. Cilostazol reduces restenosis after carotid artery stenting. *J Vasc Surg.* 2010 Jan;51(1):51-6.
98. Douglas JS, Jr., Holmes DR, Jr., Kereiakes DJ, Grines CL, Block E, Ghazzal ZM, et al. Coronary stent restenosis in patients treated with cilostazol. *Circulation.* 2005 Nov 1;112(18):2826-32.
99. Iida O, Nanto S, Uematsu M, Morozumi T, Kitakaze M, Nagata S. Cilostazol reduces restenosis after endovascular therapy in patients with femoropopliteal lesions. *J Vasc Surg.* 2008 Jul;48(1):144-9.
100. Ishii H, Kumada Y, Toriyama T, Aoyama T, Takahashi H, Yamada S, et al. Cilostazol improves long-term patency after percutaneous transluminal angioplasty in hemodialysis patients with peripheral artery disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Jul;3(4):1034-40.
101. Hong KW, Kim KY, Shin HK, Lee JH, Choi JM, Kwak YG, et al. Cilostazol prevents tumor necrosis factor-alpha-induced cell death by suppression of phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome 10 phosphorylation and activation of Akt/cyclic AMP response element-binding protein phosphorylation. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 Sep;306(3):1182-90.

102. Kim KY, Shin HK, Choi JM, Hong KW. Inhibition of lipopolysaccharide-induced apoptosis by cilostazol in human umbilical vein endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002 Feb;300(2):709-15.
103. Kim MJ, Park KG, Lee KM, Kim HS, Kim SY, Kim CS, et al. Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F. *Hypertension*. 2005 Apr;45(4):552-6.
104. Gao L, Wang F, Wang B, Gong B, Zhang J, Zhang X, et al. Cilostazol protects diabetic rats from vascular inflammation via nuclear factor-kappa B-dependent down-regulation of vascular cell adhesion molecule-1 expression. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Jul;318(1):53-8.
105. Wang F, Li M, Cheng L, Zhang T, Hu J, Cao M, et al. Intervention with cilostazol attenuates renal inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci*. 2008 Dec 19;83(25-26):828-35.
106. Hattori Y, Suzuki K, Tomizawa A, Hiramata N, Okayasu T, Hattori S, et al. Cilostazol inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappaB activation via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2009 Jan 1;81(1):133-9.
107. Omi H, Okayama N, Shimizu M, Fukutomi T, Nakamura A, Imaeda K, et al. Cilostazol inhibits high glucose-mediated endothelial-neutrophil adhesion by decreasing adhesion molecule expression via NO production. *Microvasc Res*. 2004 Sep;68(2):119-25.
108. Suzuki K, Uchida K, Nakanishi N, Hattori Y. Cilostazol activates AMP-activated protein kinase and restores endothelial function in diabetes. *Am J Hypertens*. 2008 Apr;21(4):451-7.
109. Park SY, Lee JH, Kim YK, Kim CD, Rhim BY, Lee WS, et al. Cilostazol prevents remnant lipoprotein particle-induced monocyte adhesion to endothelial cells by suppression of adhesion molecules and monocyte chemoattractant protein-1 expression via lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein receptor activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 Mar;312(3):1241-8.

110. Lee JH, Oh GT, Park SY, Choi JH, Park JG, Kim CD, et al. Cilostazol reduces atherosclerosis by inhibition of superoxide and tumor necrosis factor- α formation in low-density lipoprotein receptor-null mice fed high cholesterol. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005 May;313(2):502-9.
111. Dell RB, Holleran S, Ramakrishnan R. Sample size determination. *ILAR J*. 2002;43(4):207-13.
112. Akiyama H, Kudo S, Shimizu T. The metabolism of a new antithrombotic and vasodilating agent, cilostazol, in rat, dog and man. *Arzneimittelforschung*. 1985;35(7A):1133-40.
113. Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, et al. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney Int*. 2010 Dec;78(11):1136-53.
114. Cheng Y, Liu X, Yang J, Lin Y, Xu DZ, Lu Q, et al. MicroRNA-145, a novel smooth muscle cell phenotypic marker and modulator, controls vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2009 Jul 17;105(2):158-66.
115. Fishbein I, Waltenberger J, Banai S, Rabinovich L, Chorny M, Levitzki A, et al. Local delivery of platelet-derived growth factor receptor-specific tyrosine kinase inhibitor inhibits neointimal formation in rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Mar;20(3):667-76.
116. van der Zwan LP, Scheffer PG, Dekker JM, Stehouwer CD, Heine RJ, Teerlink T. Systemic inflammation is linked to low arginine and high ADMA plasma levels resulting in an unfavourable NOS substrate-to-inhibitor ratio: the Hoorn Study. *Clin Sci (Lond)*. 2011 Jul;121(2):71-8.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

CHULALONGKORN UNIVERSITY
ANIMAL CARE AND USE COMMITTEE (CU-ACUC)

Protocol Review No. 1330□□□

Protocol review numbers are composed of the last two digits of Christian Era, followed by two digits of faculty code number, and the last three digits run by faculty IACUC on queue.

ให้กรอกหมายเลข 2 ตัวแรกเป็นปี ค.ศ.ตามด้วยรหัสของคณะ 2 ตัว และ 3 ตัวท้ายเป็นลำดับการขออนุญาต

Animal Use Protocol Title:..... Effects of Cilostazol Administration on Intimal Hyperplasia in Early Stage of Post-Ischemic/Reperfusion Chronic Kidney Disease Mouse Model

โครงการใช้สัตว์เรื่อง:.....ผลของการใช้ยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก.....

Principal Investigator:.....Wiwat Chanchaeronthana, MD.....

Address:..ห้อง 103 ชั้น 1 ตึกกสิกรรม สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์ฯ Tel No. 02-256-4251...E-mail address...wivatmd@hotmail.com.....

Classification: X Research OTesting OBiomaterial production OTeaching

OBreeding OOthers, please specify.....

Anticipated Project Period: From...November 2013.....To...May 2014.....

Funding Source(s): ... ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์.....

Grant has been: X Submitted OApproved, If approved, duration of approval.....

Your signature, as P.I. on this application, verifies that the information herein is true and correct and that you will comply with standard of animal care and use established under ethical principles and guidelines for the use of animals for scientific purposes and policies of Chulalongkorn University.

Signature of P.I. / Instructor..... (.....20.../...December.../...2013....)

Signature of Attending veterinarian or Authorized person.....(...../...../.....)

Signature of Associate Dean / Deputy Director (Research).....(...../...../.....)

For official CU-ACUC

1. Protocol reviewed on...../...../.....

By CU-ACUC Faculty/Institute.....

2. Result □ Approved □ Approved with minor correction □ Not approved

Signature of Chairman.....

ภาคผนวก ข



CHULALONGKORN UNIVERSITY

RESEARCH PROTOCOL FORMAT
FOR A PERMISSION OF ANIMAL CARE AND USE

Faculty or Institute: Division of Nephrology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University

Animal Use Protocol Title:(Eng)... Effects of Cilostazol Administration on Intimal Hyperplasia in Early Stage of Post-Ischemic/Reperfusion Chronic Kidney Disease Mouse Model

(Thai)..ผลของการใช้ยาซิลอสตาซอลต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายระยะเริ่มแรก..

In this protocol, animal use protocol title will include following research titles

.....
.....

Principal Investigator:...นพ. วิวัฒน์ จันทร์เจริญฐานะ (Wiwat Chanchaoenthana, MD).....

Address:

...ห้อง 103 ชั้น 1 ตึกกสิกร สาขาวิชาโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย...Telephone no. 02-256-4251.

E-mail address..... wiwatmd@hotmail.com

Co-Investigator(s) and person(s) involving animal use:

Name / Surname	Address	Position	Phone	Fax / E- mail
----------------	---------	----------	-------	---------------

อ.ดร.นพ. อัษฎาศรี ลีพหว นิชกุล	ภาควิชาจุล ชีววิทยา คณะ แพทยศาสตร์	อาจารย์	081-714- 9750	a_leelahavanit@yahoo. com

1. **Non-technical summary:** (Should not exceed 250 words, explain the benefits of the research and the use of animals)

.....ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย เป็นสาเหตุหลักของการเกิดการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือด (intimal hyperplasia; IH) มีการศึกษาพบว่า การหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดนี้เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ผู้ป่วยมีภาวะไตวายเรื้อรังระยะเริ่มแรก ซึ่งเกิดจากปัจจัยหลายประการที่สัมพันธ์กับภาวะไตวายเรื้อรัง ได้แก่ ภาวะการอักเสบเรื้อรัง การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ การเพิ่มและสะสมของสารยูรีเมีย และความผิดปกติของเซลล์บุหลอดเลือด (endothelial dysfunction) เป็นต้น

การหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดนี้เป็นลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบได้บ่อยในภาวะโรคหลอดเลือดหัวใจ และโรคหลอดเลือดส่วนปลาย ดังนั้น จึงพบอุบัติการณ์ของภาวะเหล่านี้สูงในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ซึ่งการป้องกันภาวะต่างๆ เหล่านี้โดยการใช้ยาต้านเกล็ดเลือดหรือยาละลายลิ่มเลือด ซึ่งที่ผ่านมาไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะเป็นการศึกษาที่ล้นในผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย ที่พยาธิสภาพของหลอดเลือดมีการเปลี่ยนแปลงไปมากแล้วและกลไกการออกฤทธิ์ของยาที่ไม่มีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือด ทำให้มีผลต่อหลอดเลือดน้อยมาก จึงนำไปสู่แนวคิดหาวิธีการควบคุมหรือชะลอพยาธิสภาพของหลอดเลือดโดยเฉพาะการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดในผู้ป่วยไตวายเรื้อรัง ผู้วิจัยจึงสนใจทำการศึกษาวิจัยผลของยาซิลอสตาซอล (cilostazol) ซึ่งเป็นสารต้านการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไดเอสเทอเรส-3 แบบเฉพาะเจาะจง (selective inhibitor of phosphodiesterase-3) ที่มีคุณสมบัติออกฤทธิ์เป็นสารต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด และฤทธิ์ขยายหลอดเลือด (vasodilator) นอกจากนี้ ยังมีคุณสมบัติชะลอและยับยั้งการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือดได้ โดยทำการศึกษาวิจัย

ในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายระยะเริ่มแรก เพื่อศึกษาผลของยาต่อการเปลี่ยนแปลงการหนาตัวของชั้นอินทิมาของผนังหลอดเลือด ซึ่งเป็นตัวแทนของผู้ป่วยไตวายเรื้อรังระยะเริ่มแรก โดยจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานใช้พัฒนาเป็นการศึกษาวิจัยต่อยอดต่อไป.....

2. Objective:

..... 2.1 เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

2.2 เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221 และ miRNA-222 ในพยาธิสภาพของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

2.3 เพื่อศึกษาผลของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ miRNA-143, miRNA-145, miRNA-221, miRNA-222, ADMA, PDGF และ VEGF ในเลือดในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรก เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

2.4 เพื่อศึกษากลไกของยาซิลอสตาซอลขนาด 30 มก./กก./วัน ต่อการหนาตัวของหลอดเลือดชั้นอินทิมาผ่านระบบ เรนิน-แองจิโอเทนซิน-แอลโดสเตอโรน (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) โดยเปรียบเทียบการแสดงออกของ AT1R ในพยาธิสภาพของหลอดเลือดชั้นอินทิมาในหนูทดลองที่มีภาวะไตวายตั้งแต่ระยะเริ่มแรกเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับยาหลอก

3. Experimental design:

Tumor/disease models

Toxicity testing

Behavioral studies

Pain models

Others, please specify.....Animal research study...มีการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ได้รับยาซิลอสตาซอล (กลุ่มทดลอง) และกลุ่มที่ได้รับยาหลอก (กลุ่มควบคุม).....

4. Data analysis / Statistical method:

.....การทดสอบสมมติฐาน ใช้ Paired-t test หากข้อมูลเก็บได้เป็นลักษณะการกระจายข้อมูลปกติ (normal distribution) หรือใช้ Wilcoxon-Signed Ranks test ในกรณีที่ข้อมูลไม่เป็นลักษณะการกระจายข้อมูลปกติ กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 และค่าระดับความเชื่อมั่นที่ 95%.....

5. Description of animals

Common name	Breed / Strain/ Scientific name	Age	Weight	Sex	Number
Mouse	CD-1	1-2 months	30 gram	male	24

Special consideration (e.g. SPF-- please specify):...None.....

Source / Vendor (Name of source/vendor and location):.....Mahidol University.....

Conserved species X No Yes, the project has been approved by the Department of National Park, Wildlife and Plant Conservation on (D/M/Y) (please also attach the letter of approval).....

6. Animal care:

X Field Study, please specify the name of the location...Nephrology, Medicine, Chulalongkorn University.

X Use captive animals, please answer the 6.1 if the terrestrial animal will be used; the 6.2 if the aquatic animal will be used)

6.1 Husbandry consideration:

6.1.1 Housing Place: building...ตึกพยาธิวิทยา....Room.....303,304...

6.1.2 Experimental Place: building.....ตึกพยาธิวิทยา...Room...303,304.....

6.1.3 Housing System:

Conventional Strictly hygienic

conventional

Barrier

Containment

Others, please specify.....

6.1.4 Caging:

Solid bottom, open top

Static filtered top cages

Metabolic cages

Individual ventilated cage (IVC)

Environmental chamber

Isolator

Others, please specify.....

6.1.5 Caging materials:

Plastic

Stainless steel

Others, please specify.....

6.1.6 Cage size (W x L x H)... 19*28.5*13..cm.

6.1.7 Number of animals / cage.....2-5.....

6.1.8 Environmental requirements:

Temperature.....25-32°C

Humidity.....60-65%.....

Light: Standard fluorescent

Others, please specify.....

Light cycle: Standard 12:12

Others, please specify.....

6.1.9 Food:

Type of food: ... Standard diet

Source/Vendor.....

Feeding schedule:

Ad libitum

Others, please specify.....meal(s)/day

6.1.10 Water (if needed):

Type of water: Tap water Hyperchlorinated.....ppm Acidified, pH..... RO-UV Others, please specify.....

Water Provided:

 Ad libitum Others, please specify.....

6.1.11 Bedding/housing media:

 No Yes , please specify..... Sawdust...

6.2 Husbandry consideration for aquatic animals:

6.2.1 Housing Place: building.....Room.....

6.2.2 Experimental Place: building.....Room.....

6.2.3 Water system (Hatchery / Laboratory only)

 Closed water system Opened water system Re-circulating system Flow-through (flow rate:) Static non – renewal System Static renewal System

6.2.4 Water filtered system (Hatchery / Laboratory only)

 Bio filter Solid filter Non- filter Other (please specify:)

6.2.5 Air system

 Aeration Non-aeration

6.2.6 Caging

 Aquaria Cage Container Other (please specify:)

6.2.7 Caging material

- Glass Plastic
 Acrylic Other (please specify:)

6.2.8 Cage size (W x L x H (D))

.....

6.2.9 Density (number / cage)

6.2.10 Environment requirement

- Freshwater Brackish water (.....PSU)
 Seawater (.....PSU)

Temperature (°C)

.....

Light

- Natural
 Additional Light
 (Light cycle: Lighth / Darkh)
 Other.....

6.2.11 Water quality (pH / Do / inorganic ion)

- Determine (please specify :.....)
 Not determine

6.2.12 Food

- Food type Natural food Artificial food
 Live feed Moist pellet
 Dry pellet Other
 Food source Vender Other

.....

- Feeding frequency Time/day
 Ad libitum
 Other (...% / g body weight/ day)

6.3 Special veterinary care:

No Yes

If yes, describe the special veterinary care.

.....

.....

.....

7. Animal welfare:

7.1 Please Provide:

Keyword search...intimal hyperplasia and chronic kidney disease.

Database search.....Pubmed.....

Does the proposed research duplicate any previous work?

No

Yes (explain why it is scientifically necessary to duplicate the experiment)

.....

7.2 Briefly describe how you have considered each of the following regarding 3Rs or why they are not applicable:

7.2.1 Replacement of animals (e.g., with *in vitro* models, computer models or less sentient animals) and explain why the proposed species is / are the most appropriate.

.....มีข้อจำกัดเนื่องจากการตอบสนองที่ต้องการทดสอบมีความซับซ้อนมากกว่าที่จะใช้การทดลอง *in vitro* ได้ อย่างไรก็ตามการทดลอง *in vitro* จะเป็นส่วนเสริมในงานวิจัยนี้.....

7.2.2 Reduction in the number of animals (e.g., using appropriate statistical methods in the design analysis of the study; reduction in experimental variability by using animals of defined genetic or microbiological status; sharing tissue among investigators) and provide an explanation of how the numbers of animals to be used in each group or total were appropriate based on scientific and statistical requirement to achieve objectives.:

.....ปริมาณหนูที่กำหนดได้พยายามลดจำนวนจนเท่าที่จำเป็นแล้ว ยิ่งไปกว่านั้น การใช้ปริมาณหนู
 มากหรือน้อยเกินไปจะมีผลต่อความน่าเชื่อถือในการทดลองโดยต้องการหนูในแต่ละกลุ่มประมาณ
 7-20 ตัว สำหรับการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้คำนวณ sample size
 โดยอ้างอิงจากการศึกษา Takigawa T, Tsurushima H, Suzuki K, Tsuruta W, Nakamura K,
 Matsumura A. Cilostazol suppression of arterial intimal hyperplasia is associated with
 decreased expression of sialyl Lewis X homing receptors on mononuclear cells and E-
 selectin in endothelial cells. J Vasc Surg. 2012 Feb;55(2):506-16. พบว่าจะสามารถคำนวณ
 sample size ได้เท่ากับ 12 ตัวต่อกลุ่ม.....

.....

7.2.3 Refinement of experimental procedures to minimize pain or distress
 (e.g., early endpoint; use of analgesics, anesthetics or sedatives; techniques that reduce
 stress in the animal):

..... ใช้ Isoflurane analgesia ในนาสลบเพื่อการผ่าตัด และใช้ Buprenorphine เพื่อการ
 ลดความเจ็บปวดหลังการผ่าตัด.....

7.3 Potential animal pain and distress assessment:

7.3.1 Pain or Distress Classification (USDA Classifications)

- Classification B
- Classification C
- Classification D
- Classification E

7.3.2 During the study:

1. How often will the clinical condition of animals be monitored?
 Every 2 hours after procedure for 2 times and then at 12 and 24
 hours

2. Who will monitor the clinical condition of the animals?
 นพ. วิวัฒน์ จันเจริญฐานะ (Wiwat Chancharoenthana, MD.), The
 main investigator .

7.3.3 Are the animals expected to experience any specific study-induced
 related problems or any health problems?

No

Yes, please describe the expected problems.

.....

7.3.4 What criteria will be used to assess pain, distress, or discomfort?

Inactivity

Loss of appetite

Loss of weight: 5% 10% 15% 20% weight loss

Restlessness

Abnormal resting postures, somnolence or hunched posture

Licking, biting, scratching, or shaking a particular area

Failure to show normal patterns of inquisitiveness

Failure to groom, causing unkempt appearance

Guarding (protecting the painful area)

Loss of mobility

Red stain around the eyes of rats

Unresponsiveness

Labored breathing

Others, please

specify.....

7.4 Analgesics :

No

Yes, please answer the following questions:

7.4.1 Chemical method

Common name	Drug concentration	Dose	Route of administration
Buprenorphine	1mg/1ml	0.05 mg/kg	subcutaneous

7.4.2 Physical method, please specify.....

7.5 Anesthesia (Pre-anesthetic and anesthetic):

No

Yes, please answer the following questions:

7.5.1 Chemical method

Common name	Drug concentration	Dose	Route of administration
Isoflurane	vary	1-3%	inhalation

7.5.2 Physical method,

please specify.....

7.5.3 Who is responsible for maintaining anesthesia.....

..... นพ. วิวัฒน์ จันทร์เจริญฐานะ (Wiwat Chancharoenthana, MD.), The main investigator.....

7.5.4 Methods used to monitor anesthesia, frequency of monitoring.....

..... Clinical sign of mice such as movement and respiration, observed during the operation (very short operation less than 10 min)

7.5.5 What criteria will be used to assess level of anesthesia?

- Respiration rate
- Heart rate
- ECG
- Toe pinch
- Tail pinch
- Corneal reflex
- Color of mucous membrane
- Muscular relaxation
- Others (pulse oximeter, respirometer)
please, specify.....

7.5.6 Describe post-anesthetic treatment or intervention

.....Injection of bruprenorphine after operation

8. Surgery:

No Yes, please answer the following questions:

8.1 Surgical procedure is: Non-survival Survival

One time Multiple

8.2 Location / Room number for surgical procedure will be conducted.

..... ตึกพยาธิวิทยาชั้น 3 ห้อง303.....

8.3 Surgeon / Qualification:

..... Asada Leelahavanichkul MD., PhD/ Co-advisor, National Institute of Health (NIH) USA trained

..... Wiwat Chanchaoenthana MD./ Principle investigator

.....
.....

8.4 Procedure:

..... Ischemic/ reperfusion (I/R) of left kidney by clamping renal artery for 50 mins then right nephrectomy after 7 days apart from (I/R).....

8.5 Detail the provisions for both pre-and postoperative care

..... Mouse will be put to sleep by isoflurane anesthetic chamber. The clinical sign including movement and respiration will be observed for the deep sleep. Then the left kidney was exposed via left costal margin approach. Left renal artery was then identified with temporary clamping with surgical clip for 50 minutes. After the clamp removal, the clinical signs will be observed at 2, 4 and 12 hours after operation. Then, the right nephrectomy was done via right costal margin approach at 1 week later after 7 days apart. Again, the skin will be sutured layer by layer and then the clinical signs will be observed at 2, 4 and 12 hours after nephrectomy.

.....
.....
.....
.....
.....
.....

8.6 Describe long-term care of any chronic survival procedures:

..... After right nephrectomy operation, the clinical sign will be observed and the moribund mice (from respiration pattern and sluggish movement to touch) will be sacrificed

.....
.....
.....
.....
.....

8.7 Multiple survival surgery procedures: Please provide scientific justification
 Only single operative procedure but the tail vein administration will be
 conducted thereafter

 ...

8.8 Who will be responsible for post-surgical care and treatment?
 นพ. วิวัฒน์ จันเจริญฐานะ (Wiwat Chanchaoenthana, MD.), The main
 investigator

9. Blood or Body Fluid Withdrawal / Tissue Collection / Injections, Tail Clip, Gavaging:

X Injection

Anatomic Location.....subcutaneous.....
 Needle size/Catheter and length.....size No. 23.....
 Volume Administered.....0.5 mL.....
 Frequency (per day).....once post-operation time.....
 Chemical/Drug.....buprenorphine.....

X Gavaging

Needle size/Catheter and length..... size No.20.....
 Volume Administered.....0.8 mL.....
 Frequency.....daily for 4 months.....
 Chemical/Drugcilostazol or placebo.....

X Blood Withdrawal:

Anatomic Location..... tail-vein bloodletting
 Needle size/Catheter and length..... use capillary tube
 Volume Collected.....50-100 μ L
 Frequency once at time zero and at time of euthanasia

X Body Fluid Withdrawal:

Anatomic Location.....urine.....
 Needle size/Catheter and length... not use...(waiting for spontaneous

voiding)...

Volume Collected.....50-100 µL

Frequency monthly for 4 months

X Tissue Collection:

X Dead animal O Alive animal

Anatomic Location/organ(s)...aorta and vena cava, liver tissue, intestinal tissue

Needle size/Catheter and length.....

Biopsy size.....

Frequency Once at time of euthanasia

O Infusion:

Anatomic Location.....

Needle size/Catheter and length.....

Volume Administered.....

Frequency (per day).....

Chemical/Drug.....

O Others

(please specify).....

10. Restraint with Mechanical Devices (in conscious animals):

X No O Yes, please answer the following questions:

Describe device, duration of restraint, frequency of observation, condition procedures, and steps to assure comfort and well-being.

.....

.

If prolonged restraint is used, justification must be provided

.....

.

11. Projects Involving Food and Water Deprivation, or Dietary Manipulation:

No Yes, please answer the following questions:

Individual animal's weight is monitored every.....days.

Individual animal's weight is not monitored.

Item	Amount	Duration	Compound	Compound	Frequency
	Restricted/Added		Supplemented	Deleted	
Food Restriction					
Fluid Restriction					
Nutrient Alterations					

12. Euthanasia / Disposition of animals:

No Yes

12.1 Disposal of animals after completion of activity:

Euthanatized

Return to production / breeding unit / facility inventory

Transfer to another research project:

(please list Protocol No.and

Investigator).....

Others,

Please describe.....

12.2 Chemicals/Drugs used for euthanasia

Common name	Dose	Route of administration	Other (please describe)
Isoflurane and cervical bone disconnection	overdose	inhalation	

12.3 Physicals, please specify.....

13. Experimental endpoint: (State the projected study endpoint for the animals. Indicate whether recovery, euthanasia, or death is expected; and the specific plan for determining when the animal experimentation phase will be stopped).

Early Endpoint is used (the animals are humanely euthanized prior to the expected terminate study day): No Yes, please describe the early endpoint criteria:

1. The gasping respiratory pattern
 2. sluggish or none response to touch
 3. upside down posture
 4. dehiscent operative wound or other painful looking wound
-
-

List relevant occupational medical health provision

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Signature.....

(Principal Investigator)

Date.....December 20, 2013.....



ภาคผนวก ค

แบบเก็บข้อมูล (Case Record Form)

STUDY: Effects of Cilostazol Administration on Intimal Hyperplasia in Early Stage of Post-Ischemic/Reperfusion Chronic Kidney Disease Mice Model

Animal study No. _____ Study group code: A B

Parameter(s)	Baseline	Post right nephrectomy	Random	Wk 3	Wk 4	Wk 8	Wk 12	Wk 16	Wk 20
Body weight (g)									
Serum urea (mg/dl)									
Serum creatinine (mg/dl)									
Urine albumin creatinine ratio (mcg/mg)									
Note:									

คำย่อ: Ischemic-reperfusion, I/R; albumin creatinine ratio, ACR

