



# โครงการ การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือด  
ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดัน  
โลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง

**ชื่อนิสิต** นางสาวเกด พรถวัลย์ศักดิ์ รหัสประจำตัว 6032010223

**ภาควิชา** ชีววิทยา  
**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



โครงการ  
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

**ชื่อโครงการ** การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง

Changes of vascular dysfunction-related genes in the hippocampus and cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats

**ชื่อนิสิต** นางสาวเกด พรณวัลย์ศักดิ์

**เลขประจำตัว** 6032010223

**ภาควิชา** ชีววิทยา

**ปีการศึกษา** 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส  
และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง  
Changes of vascular dysfunction-related genes in the hippocampus and  
cerebral cortex of spontaneously  
hypertensive rats

นางสาวเกต พรถวัลย์ศักดิ์

อาจารย์ที่ปรึกษา

อาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ตริยะสัจกุลโกวิท

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร

โครงการวิทยาสตรระดับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2563

โครงการวิทยาสตรระดับนี้ได้รับการสนับสนุนจาก

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ	: การเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง
นิสิตผู้ดำเนินโครงการ	: นางสาวเกด พรถวัลย์ศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษา	: อาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ตริยะสัจกุลโกวิท
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร
ภาควิชา	: ชีววิทยา

### บทคัดย่อ

โรคความดันโลหิตสูงเป็นหนึ่งในโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขหลักของโลก ผู้ป่วยโรคความดันโลหิตสูงอาจพบความผิดปกติของหัวใจและหลอดเลือดรวมทั้งหลอดเลือดที่สมองด้วย จากการรายงานพบว่าความดันเลือดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างของหลอดเลือดขนาดเล็กที่สมอง ส่งผลให้ปริมาณเลือดที่ไปที่สมองลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดสมองขาดเลือดและสมองถูกทำลายได้ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลาในการเกิดโรคความดันโลหิตสูงและกลไกที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองโดยเฉพาะในซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสยังมีข้อมูลที่ไม่น่าเชื่อถือ ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสในหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (spontaneously hypertensive rat; SHR) นำหนู SHR และหนูความดันปกติ (WT) เพศผู้ที่มีอายุเท่ากัน ได้แก่ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ทำการการุณยฆาตและเก็บสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสมาทำการตรวจสอบการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เป็นเครื่องหมายของความผิดปกติของหลอดเลือดสมอง ได้แก่ endothelial growth factor (VEGF) และ S100 $\beta$  โดยเทคนิค quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนูกลุ่ม WT และ SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในหนูทั้งสองกลุ่ม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบระหว่าง WT และ SHR ในแต่ละช่วงอายุพบว่า ที่อายุ 6 สัปดาห์การแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่สมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนู SHR มากกว่าหนูกลุ่ม WT อย่างมีนัยสำคัญแต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่ 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของการแสดงออกของ VEGF ที่บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส ของหนูทั้งสองกลุ่มในทุกช่วงอายุ แสดงให้เห็นว่าความดันโลหิตที่สูงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดสมองและพบได้ตั้งแต่วัยแรกของการเกิดความดันโลหิตสูง

**คำสำคัญ:** ความดันโลหิตสูง, การแสดงออกของยีน, S100 $\beta$ , VEGF, ความผิดปกติของหลอดเลือด



Research Title : Changes of vascular dysfunction-related genes in the hippocampus and cerebral cortex of spontaneously hypertensive rats

Student name : Miss Gade Porntawansak

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

Co-Advisor : Assistant Professor Sukanya Jaroenporn, Ph.D.

Department of : Biology

---

### Abstract

Hypertension is one of the major healthcare problems worldwide. Hypertensive patients exhibited cardiovascular symptoms as well as damaged blood vessels in the brain. There are reports demonstrating that high blood pressure impacts on the changes of vascular structure of small vessel in cerebrum, reduces cerebral blood supply, and increases the susceptibility of the brain to ischemic resulting in brain damage. However, the relationship between the period of hypertension and the mechanisms underlying hypertension-related vascular dysfunction in brain, especially in cerebral cortex and hippocampus are poorly understood and need to be elucidated. Therefore, this study is aimed to determine changes of vascular dysfunction-related genes in cerebral cortex and hippocampus of spontaneously hypertensive rat (SHR), the animal model of essential hypertension in humans. Male SHR with age-matched normotensive control rats (WT) at the age of 6, 12, 24 and 36 weeks were used to address this relationship. Animals were euthanized, cerebral cortex and hippocampus were collected to determine the mRNA expression of vascular dysfunction marker genes including vascular endothelial growth factor (VEGF) and S100 $\beta$  by quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) techniques. The results showed an advancing age did not affect mRNA expression of S100 $\beta$  and VEGF in cerebral cortex and hippocampus of both WT and SHR. When compare between WT and SHR with age-matched group, the result demonstrated that at the age of 6 weeks, the expression of S100 $\beta$  and VEGF in cerebral cortex and hippocampus were significantly increased in SHR. However, these changes did not show at the age of 12, 24 and 36 weeks. In addition, the expression of VEGF in cerebral cortex and hippocampus did not change in both WT and SHR. These results suggesting that hypertension affects the changes of vascular dysfunction-related genes in cerebral cortex and hippocampus which could be detected at the onset of hypertension.

**Keywords:** hypertension, gene expression, S100 $\beta$ , VEGF, vascular dysfunction

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ สพ.ญ.ดร.วัชรภรณ์ ดิยะสัตย์กุลโกวิท อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมโครงการ ที่ให้ความกรุณาในการให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ข้อติชมต่างๆ รวมไปถึงความช่วยเหลือตั้งแต่เริ่มทำการศึกษา ทำการวิเคราะห์ข้อมูล ตลอดจนตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล ทำให้โครงการนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า, อาจารย์ ดร. มารุต เฟื่องอาวรรณ และอาจารย์ ดร.เกรียง กาญจนวดี อาจารย์ผู้ประสานงานรายวิชา โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาคการศึกษาปลาย ปีการศึกษา 2563 ที่ให้คำแนะนำในองค์ประกอบของเอกสารที่เกี่ยวข้องกับโครงการ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนจากโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความกรุณาสนับสนุนสำหรับโครงการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยด้านแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล สำหรับการสนับสนุนตัวอย่างสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยไพรเมทแห่งชาติ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ คุณรัฐพล สมสุระ และ คุณสุทธิโรจน์ มีสวัสดิ์ ที่ให้ความกรุณาในการให้ความรู้ในห้องปฏิบัติการและการวิเคราะห์ข้อมูล รวมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ นางสาวนาภรณ์ บุปผาราม สำหรับการเป็นแบบอย่างที่ดีในการตั้งใจทำงาน ทั้งให้คำแนะนำและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งก่อนการทำวิจัย ตลอดจนการทำวิจัยในครั้งนี้เสร็จสิ้น ขอขอบคุณ นางสาวโสพิณญา พรถวัลย์ศักดิ์ ที่ช่วยมารับ-ส่งตลอดการทำกรวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายคณาวุฒิ ไตรพิพัฒน์พงษ์ สำหรับการเป็นแรงบันดาลใจ เป็นคนมอบรอยยิ้ม ความสุข และกำลังใจในการทำงาน

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณ นางสาวเกด พรถวัลย์ศักดิ์ เพื่อนๆ ภาควิชาชีววิทยา รุ่น 84 รวมไปถึงพี่ๆ น้องๆ ภาคชีววิทยา ท่านอื่นๆ ที่คอยให้กำลังใจกันมาตลอดการทำโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ในครั้งนี้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ .....	ก
ABSTRACT .....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญตาราง .....	ฉ
สารบัญภาพ .....	ช
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ .....	2
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	3
2.1 ความดันโลหิตสูง.....	3
2.1.1 <u>ความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ</u> .....	3
2.1.2 <u>ความดันโลหิตสูงทุติยภูมิ</u> .....	4
2.2 Vascular dysfunction.....	4
2.3 ความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองและกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับยีนที่เกี่ยวข้อง .....	5
2.3.1 <u>S100 Calcium Binding Protein B (S100<math>\beta</math>)</u> .....	6
2.3.2 <u>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</u> .....	7
2.4 หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง.....	8
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน .....	10
3.1 การทำวิจัยในสัตว์ทดลอง.....	10
3.2 การออกแบบการทดลอง .....	10
3.3 การเก็บเนื้อเยื่อสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส .....	11
3.4 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA.....	12
3.4.1 <u>การสกัด RNA</u> .....	12
3.4.2 <u>การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA</u> .....	13
3.4.3 <u>การสังเคราะห์ cDNA</u> .....	14
3.5 การออกแบบและทดสอบประสิทธิภาพของ primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR .....	15
3.5.1 <u>การออกแบบ primer</u> .....	15

3.5.2 การหา annealing temperature ที่เหมาะสม.....	16
3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR.....	18
3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ .....	19
บทที่ 4 ผลการศึกษา.....	20
4.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ และ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex .....	20
4.1.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ .....	20
4.1.2 การแสดงออกของยีน VEGF.....	21
4.2 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ และ VEGF ในสมองส่วน hippocampus .....	22
4.2.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ .....	22
4.2.2 การแสดงออกของยีน VEGF.....	24
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา .....	25
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ .....	28
6.1 สรุปผลการศึกษา .....	28
6.2 ข้อเสนอแนะ .....	28
6.2.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์ .....	28
6.2.2 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต.....	28
เอกสารอ้างอิง .....	30

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2-1 หมวดหมู่ความดันโลหิต.....	4
ตารางที่ 3-1 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction ในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, UK).....	14
ตารางที่ 3-2 ลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีนและขนาดของ primer.....	15
ตารางที่ 3-3 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction ในการเตรียม real-time PCR reaction mixture .....	16

## สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2-1 แผนภาพของเซลล์ที่ได้รับความเสียหายส่งผลให้มีการแสดงออกของ S100 $\beta$ ที่เพิ่มขึ้น.....	6
ภาพที่ 2-2 แผนภาพกลไกที่เชื่อมโยงการอักเสบของเส้นประสาท, oxidative stress ที่ส่งผลต่อการเกิด neurovascular dysfunction, blood–brain barrier hyperpermeability และการเพิ่มขึ้นของ VEGF .....	8
ภาพที่ 3-1 แผนภาพการออกแบบการทดลอง.....	11
ภาพที่ 3-2 แผนภาพของบล็อกการตัดสมองแสดงให้เห็นถึงการวางแผนของสมองและตำแหน่งของไบโอมัดโคนที่จะได้รับ.....	12
ภาพที่ 3-3 ภาพของเนื้อเยื่อสมองที่ถูกตัดด้วย brain cutting block.....	12
ภาพที่ 3-4 NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (ThermoScientific, US).....	14
ภาพที่ 3-5 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ NCBI Primer-BLAST ของ S100 $\beta$ primer.....	16
ภาพที่ 3-6 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ NCBI Primer-BLAST ของ VEGF primer .....	16
ภาพที่ 3-7 ผลการทดสอบไพรเมอร์ S100 $\beta$ (ซ้าย)และ VEGF(ขวา)ด้วยวิธี conventional PCR....	17
ภาพที่ 3-8 ผลการทดสอบไพรเมอร์ VEGF จากการทำ conventional PCR (ซ้าย) และ qRT-PCR (ขวา).....	18
ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของS100 $\beta$ ในสมองส่วน cerebral cortex .....	20
ภาพที่ 4-2 การแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex.....	21
ภาพที่ 4-3 การแสดงออกของS100 $\beta$ ในสมองส่วน hippocampus .....	22
ภาพที่ 4-4 การแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน hippocampus .....	24

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจในการเสนอโครงการ

โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) เป็นหนึ่งในโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable diseases ;NCDs) ที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาสาธารณสุขของทุกประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีแนวโน้มของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง องค์การอนามัยโลก (World Health Organization ;WHO) สมาคมความดันโลหิตสูงนานาชาติ (International Society of Hypertension ;ISH) และ The American college of cardiology (ACC) ได้ให้นิยามของโรคความดันโลหิตสูงว่าเป็นภาวะที่ค่าความดันโลหิตที่มีค่าสูงเกินกว่าปกติ โดยมีค่าความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (systolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 130 มิลลิเมตรปรอท และ/หรือ มีค่าความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว (diastolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 80 มิลลิเมตรปรอท (ACC, 2017) สำหรับสถานการณ์ความดันโลหิตสูงในประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่าอัตราการตายของคนเป็นโรคความดันโลหิตสูงต่อประชากร 100,000 คน ในปี พ.ศ. 2558-2562 มีค่าเท่ากับ 12.1, 12.2, 13.1, 13.1 และ 14.2 ตามลำดับ (กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2563) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีแนวโน้มอัตราการตายของคนเป็นโรคความดันโลหิตสูงที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง

โรคความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาได้ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) และ โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) เป็นต้น (Singh et al., 2017) ทั้งนี้ความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองและ blood brain barrier (BBB) จะส่งผลให้เกิดความเสียหายของสมองและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆตามมา เช่น โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease) ได้อีกด้วย BBB มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมสถานะสมดุลของระบบประสาทส่วนกลาง โครงสร้างของ BBB ประกอบด้วยหลอดเลือดสมองและเซลล์ astrocyte ที่หุ้มหลอดเลือด ทำหน้าที่เป็นตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง ช่วยกั้นมิให้สารต่างๆในกระแสเลือดเข้าไปทำอันตรายระบบประสาทได้ (Abbott et al., 2010) ดังนั้นเมื่อเกิดความเสียหายกับหลอดเลือดหรือ BBB ก็ส่งผลให้เกิดความเสียหายของสมองตามมาได้ จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *S100β* ซึ่งพบมากที่เซลล์ astrocyte ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารบริเวณ BBB พบว่าในผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บของสมอง จะพบการแสดงออกของยีน *S100β* เพิ่มขึ้น (Donato et al., 2009; Uden et al., 2015) นอกจากนี้จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ vascular endothelial growth factors

(VEGFs) ซึ่งเป็นยีนสำคัญที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การซ่อมแซมและความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด พบว่าในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคสมองเสื่อมจะมีการแสดงออกของ VEGF ในเลือด สมอง และน้ำไขสันหลัง ที่เพิ่มมากขึ้น (Mahoney et al., 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับ VEGF เพิ่มสูงขึ้นในสมองของผู้ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ มีความเกี่ยวข้องกับระดับการซึมผ่านที่มากขึ้นของสารต่างๆบริเวณ BBB อีกด้วย (Miners et al., 2018)

ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่พบผลของโรคความดันโลหิตสูงต่อความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองแต่อย่างไรก็ตาม การอธิบายกลไกการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เทกซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เองและผลของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังมีข้อมูลที่ไม่ว่างชัดและไม่เพียงพอ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดสมองทำงานผิดปกติในภาวะความดันโลหิตสูง โดยจะทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เทกซ์ ได้แก่ *S100B* และ VEGF ในหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (spontaneous hypertensive rat ;SHR) ซึ่งเป็นหนูแรทที่มีภาวะความดันโลหิตสูงจากพันธุกรรม นิยมใช้เป็น animal models ในการศึกษาโรคความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เองและโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือดเนื่องจากมีลักษณะการเกิดโรคที่คล้ายคลึงกับการเกิดโรคในมนุษย์ (Okamoto and Aoki, 1963)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดสมองทำงานผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เทกซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง



## บทที่ 2

### ทบทวนวรรณกรรม

#### 2.1 ความดันโลหิตสูง

โรคความดันโลหิตสูง (Hypertension) คือ หนึ่งในโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-communicable diseases ;NCDs) ที่มีความสำคัญและเป็นปัญหาสาธารณสุขของทุกประเทศทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทย ซึ่งมีแนวโน้มของผู้ป่วยเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง องค์การอนามัยโลก (World Health Organization ;WHO) สมาคมความดันโลหิตสูงนานาชาติ (International Society of Hypertension ;ISH) และ The American college of cardiology (ACC) ได้ให้นิยามของโรคความดันโลหิตสูงว่าเป็นภาวะที่มีการเปลี่ยนแปลงความดันในหลอดเลือด โดยจะมีค่าความดันโลหิตที่มีสูงเกินกว่าปกติ ค่าความดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว (systolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 130 มิลลิเมตรปรอท หรือ มีค่าความดันโลหิตขณะที่หัวใจคลายตัว (diastolic blood pressure) มากกว่าหรือเท่ากับ 80 มิลลิเมตรปรอท (ACC, 2017) ในขณะที่ความดันโลหิตในภาวะปกติจะมีค่าความดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว น้อยกว่า 120 มิลลิเมตรปรอท และ ความดันโลหิตขณะที่หัวใจคลายตัว น้อยกว่า 80 มิลลิเมตรปรอท ดังแสดงในตารางที่ 2-1 สำหรับสถานการณ์ความดันโลหิตสูงในประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุข พบว่าอัตราการตายของคนเป็นโรคความดันโลหิตสูงต่อประชากร 100,000 คน ในปี พ.ศ. 2558-2562 มีค่าเท่ากับ 12.1, 12.2, 13.1, 13.1 และ 14.2 ตามลำดับ (กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข, 2563) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีแนวโน้มอัตราการตายของคนเป็นโรคความดันโลหิตสูงที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยความดันโลหิตสูงสามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามสาเหตุการเกิด ได้แก่

##### 2.1.1 ความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ

โรคความดันโลหิตสูงปฐมภูมิ (Primary hypertension) หรือโรคความดันโลหิตสูงที่ไม่ทราบสาเหตุ (Essential hypertension) ซึ่งเป็นส่วนใหญ่ของผู้ป่วยความดันโลหิตสูง โดยพบกว่า 95% (Carretero and Oparil, 2000) ไม่ทราบสาเหตุการเกิดที่ชัดเจนแต่พบว่ามีปัจจัยต่างๆ ที่ชักนำให้เกิดโรค เช่น ผลมาจากปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมรวมทั้งอาหาร ได้แก่ การมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น, การกินอาหารโซเดียมสูง, การออกกำลังกายน้อยลง, การบริโภคแอลกอฮอล์มากเกินไป (ACC, 2017) รวมไปถึงปัจจัยทางพันธุกรรมและปฏิสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยเหล่านี้ เป็นต้น (Kokubo et al., 2015)

### 2.1.2 ความดันโลหิตสูงทุติยภูมิ

โรคความดันโลหิตสูงทุติยภูมิ (Secondary hypertension) เป็นชนิดของโรคความดันโลหิตสูงที่มีสาเหตุโน้มนำ โดยเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด, โรคไต, ปัญหาเกี่ยวกับต่อมไทรอยด์ เป็นต้น (Kokubo et al., 2015) ผู้ป่วยที่เป็นโรคความดันโลหิตสูงทุติยภูมิจะมีอาการของโรคแตกต่างกันในแต่ละบุคคล ควรทำการตรวจวินิจฉัยที่เหมาะสม (Jacovic et al., 2016)

ตารางที่ 2-1 หมวดหมู่ความดันโลหิต (ACC, 2017)

หมวดหมู่ความดันโลหิต	ความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว (มิลลิเมตรปรอท)		ความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว (มิลลิเมตรปรอท)
ภาวะปกติ	<120	และ	<80
ภาวะความดันเริ่มสูง	120-129	และ	<80
ภาวะความดันโลหิตสูง			
ความดันโลหิตสูง ระดับ 1	130-139	หรือ	80-89
ความดันโลหิตสูง ระดับ 2	≥140	หรือ	≥90

โรคความดันโลหิตสูงเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาได้ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) และ โรคหลอดเลือดหัวใจ (coronary artery disease) เป็นต้น (Singh et al., 2017)

## 2.2 Vascular dysfunction

Vascular dysfunction คือ การเกิดความผิดปกติของหลอดเลือด โดยมีลักษณะเฉพาะคือจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือหน้าที่ของหลอดเลือด การขยายของหลอดเลือด (vasodilation) ที่ลดลง มีการอักเสบ (inflammatory) โดย vascular dysfunction มักจะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดในที่ต่างๆ ตามมา (Rajendran et al., 2013) vascular dysfunction เกิดได้เนื่องจากหลายๆปัจจัย อาทิเช่น อายุที่มากขึ้นและภาวะความดันโลหิตสูง (Kannel and Gordon, 1974) มีรายงานในผู้สูงอายุพบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและหน้าที่ของหลอดเลือดมีความเกี่ยวข้องกับกลไกต่างๆ ได้แก่ oxidatve stress, การเสื่อมสภาพของเซลล์ และการอักเสบ (inflammation) (Folkow and Svanborg, 1993) นอกจากนี้ ความดันโลหิตสูงยังมีส่วนในการเร่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดและทำให้มีความผิดปกติ

ของหลอดเลือด ซึ่งสามารถพบได้ที่หลอดเลือดต่างๆทั่วร่างกายรวมทั้งหลอดเลือดสมอง (Higashi et al., 1997)

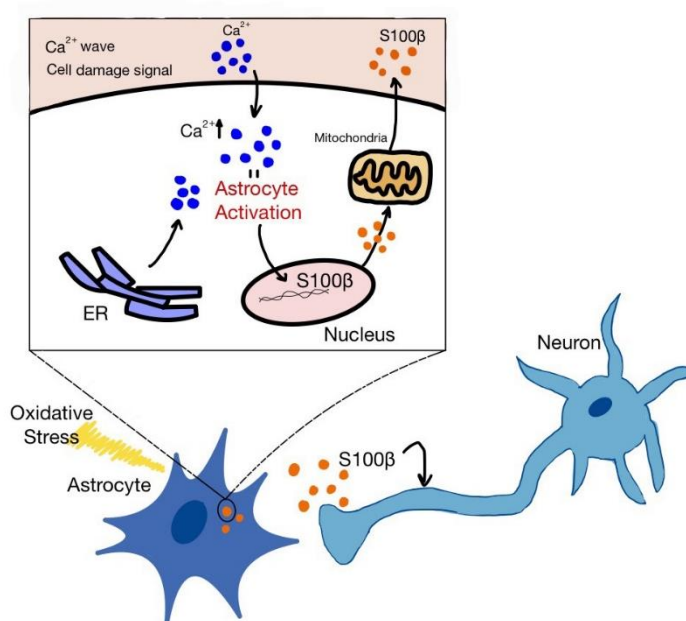
บริเวณหลอดเลือดสมอง จะมี blood-brain barrier เป็นโครงสร้างที่ป้องกันสารอันตรายและโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ให้เข้าสู่สมอง โครงสร้างเซลล์บุผนังหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular endothelial cells; CECs) เป็นองค์ประกอบหลักของ BBB ที่มีคุณสมบัติเฉพาะบางอย่าง (Claudio et al., 1989; Iadecola, 2004) ความยาวรวมของเส้นเลือดฝอยในสมองของมนุษย์ประมาณ 400 ไมล์ โดยมีพื้นผิวประมาณ 20 ตร.ม (Begley and Brightman, 2003) ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดสมองเป็นโครงสร้างที่สำคัญในระบบขนส่งเฉพาะและ chemical barrier ทั้งนี้ความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองและ blood brain barrier (BBB) จะส่งผลให้เกิดความเสียหายของสมองและเป็นสาเหตุของโรคต่างๆตามมา เช่น โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease), ภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด (Vascular dementia) ได้อีกด้วย ความเสียหายของ BBB เป็นพยาธิสภาพพื้นฐานที่ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด (Napoli and Shah, 2011) เคยมีการศึกษาว่าระดับความเสียหายของ BBB ในฮิปโปแคมปัสสามารถทำนายระดับความบกพร่องทางสติปัญญาในผู้ป่วยสูงอายุได้ (Montagne et al., 2015) BBB มีความสำคัญอย่างมากในการควบคุมสถานะสมดุลของระบบประสาทส่วนกลาง โครงสร้างของ BBB ประกอบด้วยหลอดเลือดสมองและเซลล์ astrocyte ที่หุ้มหลอดเลือด ทำหน้าที่เป็นตัวกรองกั้นระหว่างเลือดและสมอง ช่วยกั้นมิให้สารต่างๆในกระแสเลือดเข้าไปทำอันตรายระบบประสาทได้ (Abbott et al., 2010) ดังนั้นเมื่อเกิดความเสียหายกับหลอดเลือดหรือ BBB ก็จะมีผลให้เกิดความเสียหายของสมองตามมาได้

### 2.3 ความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองและกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับยีนที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาการแสดงออกของยีน *S100B* ซึ่งพบมากที่เซลล์ astrocyte ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารบริเวณ BBB พบว่าในผู้ป่วยที่มีการบาดเจ็บของสมอง จะพบการแสดงออกของยีน *S100B* เพิ่มมากขึ้น (Dano et al., 2009; Uden et al., 2015) นอกจากนั้นจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ vascular endothelial growth factors (VEGFs) ซึ่งเป็นยีนสำคัญที่สร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การซ่อมแซมและความยืดหยุ่นของผนังหลอดเลือด พบว่าในผู้ป่วยที่มีภาวะโรคสมองเสื่อมจะมีการแสดงออกของ VEGF ในเลือด สมอง และน้ำไขสันหลัง ที่เพิ่มมากขึ้น (Mahoney et al., 2019) นอกจากนั้นยังพบว่าระดับ VEGF เพิ่มสูงขึ้นในสมองของผู้ป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์ มีความเกี่ยวข้องกับระดับการซึมผ่านที่มากขึ้นของสารต่างๆบริเวณ BBB อีกด้วย (Miners et al., 2018)

### 2.3.1 S100 Calcium Binding Protein B (*S100β*)

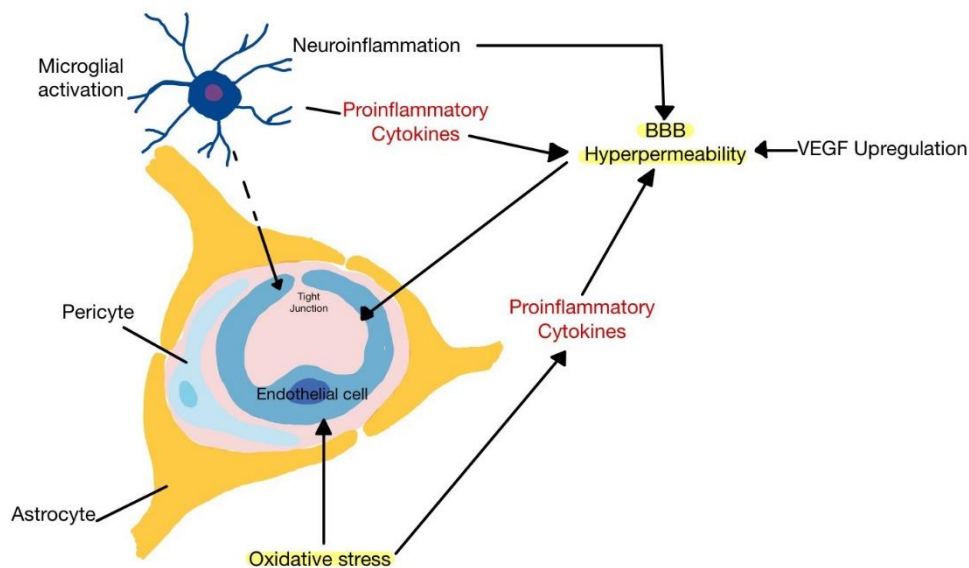
*S100β* เป็นหนึ่งในดัชนีชี้วัดความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวางที่สุดสำหรับอาการบาดเจ็บที่สมอง (Traumatic brain injury) โดยจะควบคุมระดับแคลเซียมภายในเซลล์ โปรตีน *S100β* ที่เป็นโฮโมไดเมอร์ประกอบด้วย  $\beta$  2 หน่วยย่อย และจะแสดงออกมากที่สุดที่ astrocytes (Jeter et al., 2013) และในระดับที่น้อยกว่าใน neuron, microglia และ oligodendrocytes (Richter-Landsberg and Heinrich, 1995; Steiner et al., 2008) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าระดับ *S100β* ที่เพิ่มขึ้นในสมองมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการสูญเสียการเชื่อมต่อของเส้นประสาทในโรคทางระบบประสาท (Sheng et al., 1994) อาการบาดเจ็บที่สมองจะไปกระตุ้นการอักเสบของระบบประสาท, กระตุ้น astrocyte เพิ่มการผลิต *S100β* รวมถึงไปกระตุ้นความเสียหายและความเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางอีกด้วย ดังที่เห็นในภาพที่ 2-1 ซึ่งแสดงถึงภาพรวมจากการเกิดความเสียหายของเซลล์ไปกระตุ้นการส่งสัญญาณ  $Ca^{2+}$  เพิ่มระดับ  $Ca^{2+}$  ภายในเซลล์ที่สอดคล้องกับ astrogliosis การกระตุ้น astrocytes ทำให้เกิดการถอดรหัสของ *S100β* ที่เพิ่มมากขึ้น (Kawata et al., 2016)



ภาพที่ 2-1 แผนภาพของเซลล์ที่ได้รับ ความเสียหายส่งผลให้มีการแสดงออกของ *S100β* ที่เพิ่มมากขึ้น

### 2.3.2 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

VEGF มีบทบาทสำคัญทางสรีรวิทยาคือเป็น regulator ที่จำเป็นสำหรับการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการซึมผ่านของหลอดเลือด (vascular permeability) (Takahashi and Shibuya, 2005) แต่ VEGF ไม่ได้มีบทบาทเพียงแต่ในด้านสรีรวิทยาเท่านั้น แต่ยังมีบทบาทสำคัญในทางพยาธิวิทยา คือ การสร้างเส้นเลือดใหม่ โดย VEGF นั้นอยู่ใน Platelet-derived growth factor (PDGF) supergene family โดย VEGF-A ควบคุมการสร้างเส้นเลือดใหม่และการซึมผ่านของหลอดเลือดด้วยการกระตุ้นตัวรับ 2 ตัว ได้แก่ VEGFR-1 (Flt-1) และ VEGFR-2 (Shibuya, 2011) VEGF ควบคุมการสร้างเส้นเลือดใหม่และการซึมผ่านของ BBB (Pillai et al., 2016) มีการทดลองกระตุ้น VEGF ใน animal models ที่มีภาวะขาดเลือดขาดเลือดซึ่งส่งเสริมการทำลาย BBB ผ่านทาง endothelial endocytosis (Förstermann and Münzel, 2006) งานวิจัยก่อนหน้านี้บ่งชี้ว่าระดับของ VEGF ที่เพิ่มขึ้น อาจส่งผลต่อความสามารถในการซึมผ่านของ BBB และภาวะขาดออกซิเจนในสมองในผู้ป่วยโรคจิตเภท และจากงานวิจัยเพิ่มเติมสำหรับการถูกทำลายของ BBB จากการศึกษาโครงสร้างพื้นฐานที่แสดงให้เห็นความเสื่อมของหลอดเลือดของเซลล์บุผนังหลอดเลือดในระบบประสาท และปลายเท้า astroglial ความไม่สม่ำเสมอของ basal lamina ในเยื่อหุ้มสมองส่วนหน้า จากการชันสูตรพลิกศพผู้ป่วยจิตเภท (Uranova et al., 2010) กลไกตั้งแต่การอักเสบของเส้นประสาท, oxidative stress ที่ส่งผลต่อการเกิดความผิดปกติของ neurovascular, การซึมผ่านของ blood-brain barrier และการเพิ่มขึ้นของ VEGF ถูกแสดงไว้ในภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 แผนภาพกลไกที่เชื่อมโยงการอักเสบของเส้นประสาท, oxidative stress ที่ส่งผลต่อการเกิด neurovascular dysfunction, blood–brain barrier hyperpermeability และการเพิ่มขึ้นของ VEGF

## 2.4 หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง

หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง (Spontaneously hypertensive rat; SHR) เป็นหนูแรทที่มีภาวะความดันโลหิตสูงจากพันธุกรรม ซึ่งได้รับการพัฒนาขึ้นโดยศาสตราจารย์โอกาโมโต มหาวิทยาลัยเกียวโต ประเทศญี่ปุ่น โดยเริ่มต้นผสมพันธุ์ระหว่างหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ที่มีค่าความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว 150-175 มิลลิเมตรปรอท กับเพศเมียที่มีค่าความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัว 130-140 มิลลิเมตรปรอท ได้ทำการชั่งน้ำหนักและวัดความดันด้วยวิธี tail-water plethysmographic โดยเริ่มวัดตั้งแต่อายุ 4 สัปดาห์ ทำการสืบสายพันธุ์กว่า 3 รุ่น จึงได้สัตว์ทดลองที่แสดงลักษณะของความดันโลหิตสูง 100% ภายใน 15 สัปดาห์ และเพิ่มขึ้นจากรุ่นสู่รุ่น (Okamoto and Aoki, 1963) SHR นิยมใช้เป็น animal models ในการศึกษาโรคความดันโลหิตสูงและโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด เนื่องจากมีลักษณะการเกิดโรคที่คล้ายคลึงกับการเกิดโรคในมนุษย์ ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาของ Tayebati, S. K. และคณะในปี 2012 ที่ทำการศึกษานูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เองกับความผิดปกติของหลอดเลือดสมอง โดยพบว่า SHR ที่มีความดันโลหิตสูงขึ้นมีผลทำให้สมองลีบฝ่อ สูญเสียเซลล์ประสาทและปฏิกิริยาตอบสนองของ glia cells นอกจากนี้ยังมีการศึกษาสารสื่อประสาท พบว่าหนู SHR มีการเปลี่ยนแปลงของระบบสารสื่อประสาทเฉพาะบางอย่างที่อาจมีความเกี่ยวข้องในการทำงานและพฤติกรรม สารสื่อประสาท cholinergic ที่บกพร่องมี

ลักษณะเฉพาะของ SHR และ SHR ที่มีแนวโน้มเป็นโรคหลอดเลือดสมอง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้คล้ายกับที่เคยมีการรายงานในผู้ป่วยที่ได้รับผลกระทบจากภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด ดังนั้นจากการศึกษาการเกิดโรคในหนู SHR เทียบกับมนุษย์แล้วนั้น SHR จึงเป็นแบบจำลองที่สมเหตุสมผลในการศึกษาการบาดเจ็บของหลอดเลือดในสมองและยังคงมีแนวโน้มนำไปใช้ในด้านเภสัชบำบัดได้อีกด้วย

### บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน

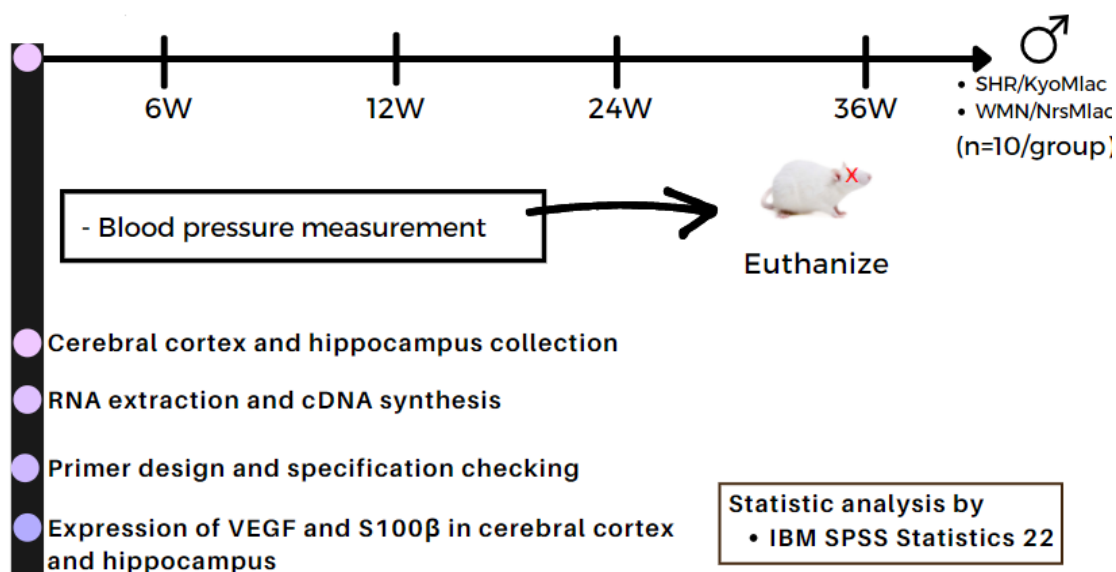
#### 3.1 การทำวิจัยในสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูแรทเพศผู้ที่มีความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง Spontaneously Hypertensive Rat (SHR/KyoMlac) และ หนูกลุ่มควบคุมที่มีความดันปกติ (WMN/NrsMlac) ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ หนูแรทเหล่านี้ถูกเลี้ยงและขยายพันธุ์ที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยอยู่ภายใต้การร่วมมือทำวิจัยระหว่างหน่วยแคลเซียมและกระดูก คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยมหิดล กับศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ เมื่อหนูมีอายุถึง 4 สัปดาห์จะถูกส่งมาเลี้ยงต่อที่หน่วยสัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งทั้งศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ และหน่วยสัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์นั้นได้รับการรับรองมาตรฐานการเลี้ยงและดูแลสัตว์ทั้งในระดับประเทศและระดับสากล เมื่อหนูเหล่านี้เดินทางมาที่คณะวิทยาศาสตร์ จะทำการตรวจสุขภาพและเลี้ยงเพื่อปรับตัวได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ (acclimatization) เป็นเวลา 7 วัน โดยเลี้ยงในห้องที่มีอุณหภูมิ  $21 \pm 1$  °C มีความชื้นสัมพัทธ์ 50 - 60% กำหนดช่วงเวลาให้แสงสว่างช่วงกลางวันต่อกลางคืนเป็น 12 ชั่วโมงเท่ากัน หนูที่เลี้ยงได้รับน้ำและอาหารตามที่ต้องการตลอดเวลาการเลี้ยง การศึกษานี้เป็นการเก็บตัวอย่างในสัตว์ทดลองร่วมกับโครงการวิจัยหลักเรื่อง “การศึกษาเพื่อหาแนวทางการรักษาโรคกระดูกพรุนแบบใหม่โดยมุ่งไปที่การรักษาภาวะชราก่อนวัยอันควรควบคู่ไปกับการควบคุมความดันในหนูทดลองที่เกิดความดันโลหิตสูงได้เอง” ซึ่งผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงสัตว์ทดลองและการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ของคณะวิทยาศาสตร์ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว ภายใต้อำนาจโครงการเลขที่ MUSC61-0050-452

#### 3.2 การออกแบบการทดลอง

ในงานวิจัยนี้จะทำการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน VEGF และ *S100B* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) และ ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (cerebral cortex) ของหนูที่มีความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง Spontaneously Hypertensive Rat (SHR/KyoMlac) และ หนูกลุ่มควบคุมที่มีความดันปกติ (WMN/NrsMlac) เพศผู้ ที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ (จำนวน 10 ตัว/กลุ่ม) หนูทุกตัวจะได้รับการตรวจวัดค่าความดันโลหิต 1 สัปดาห์ก่อนครบอายุที่ต้องการศึกษา แผนภาพการออกแบบการทดลองแสดงดังแผนภาพ 3-1





ภาพที่ 3-1 แผนภาพการออกแบบการทดลอง

### 3.3 การเก็บเนื้อเยื่อสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส

ทำการเก็บเนื้อเยื่อสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัส โดยการนำสมองของหนูแรทมาใส่ brain cutting block และใช้มีดโกนในการตัดตามวิธีของ Heffner และคณะ (1980) (แสดงดังแผนภาพที่ 3-2 และ 3-3) จากภาพที่ 3-2 แสดงถึงตำแหน่งที่สมองวางตัว เมื่อทำการตัดที่ตำแหน่ง 2-8 จะได้สมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ เมื่อทำการตัดตำแหน่งที่ 7 และ 8 จะได้สมองส่วนฮิปโปแคมปัส เมื่อทำการตัดแล้วจะได้เนื้อเยื่อสมองดังภาพที่ 3-3 จากนั้นทำการตัดแยกเนื้อเยื่อและเก็บรักษาเนื้อเยื่อที่  $-80^{\circ}\text{C}$



ภาพที่ 3-2 แผนภาพของบล็อกการตัดสมองแสดงให้เห็นถึงการวางแนวของสมองและตำแหน่งของใบมีดโกนที่จะได้รับ



ภาพที่ 3-3 ภาพของเนื้อเยื่อสมองที่ถูกตัดด้วย brain cutting block

### 3.4 การสกัด RNA และการสังเคราะห์ cDNA

#### 3.4.1 การสกัด RNA

นำเนื้อเยื่อสมองมาชั่งน้ำหนัก 50-100mg จากนั้นจะทำการสกัด RNA ด้วย TRIzol® reagent ร่วมกับ phenolchloroform method โดยเริ่มจากเติมสาร TRIzol® reagent 500µl ลงในเนื้อเยื่อสมองที่ชั่งน้ำหนักไว้ จากนั้นใช้ homogenizer บดจนเป็นเนื้อเดียวกัน และเติม TRIzol® reagent เพิ่มอีก 300µl นำไป vortex และพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที

จากนั้นเติม chloroform 200 $\mu$ l เขย่าเบาๆ พักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 4°C 15 นาที สารจะแยกเป็น 3 ชั้น บนสุดเป็นชั้นใส เป็นที่อยู่ของ RNA ชั้นที่ 2 มีสีขาวขุ่นบางๆ เป็นที่อยู่ของ DNA และชั้นที่ 3 เป็นชั้นสีชมพูม่วง เป็นที่อยู่ของโปรตีน นำส่วนใสที่อยู่ชั้นบนสุดแยกมาใส่ในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นเติมสาร isopropanol 500 $\mu$ l เขย่าเบาๆ แล้วพักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที นำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm 4°C 15 นาที จะเห็น RNA pellet เทสารส่วนใสที่อยู่ด้านบนทิ้งไป จากนั้นทำการ RNA wash โดยใส่ 75% Ethanol 1 ml แล้วเก็บใน -20°C เพื่อรอดำเนินการในการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA และการสังเคราะห์ cDNA ต่อไป

### 3.4.2 การวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA

นำ RNA ที่เก็บไว้ที่ -20°C ออกมา spin down ที่ 1,000 rpm 3 นาที จากนั้นนำเข้าไปทำต่อใน hood จากนั้นนำ ethanol ออก แล้วทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 30 นาทีหรือจนกว่า RNA pellet จะใสจนมีลักษณะคล้ายเจล จากนั้นละลาย RNA pellet ด้วย DEPC treated water 45 $\mu$ l แล้วปิเปตขึ้นลงเบาๆ spin down อีกครั้ง ทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ RNA ด้วยเครื่อง NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, US) โดยเครื่องจะปรากฏค่า 3 ค่า ดังภาพที่ 3-4 หากอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 280 nm อยู่ระหว่าง 1.9 ถึง 2.1 จะถือว่า RNA มีความบริสุทธิ์เพียงพอ ส่วนอัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 nm ต่อ 230 nm จะบอกค่าปนเปื้อน ซึ่งควรมีค่า 2.0-2.2 และค่าปริมาณของ RNA จะบอกอยู่ในหน่วย ng/ $\mu$ l ซึ่ง 1,000-3,000 ng/ $\mu$ l คือค่าที่ยอมรับได้ และจะทำการกำหนด blank โดยใช้ DEPC-treated water



ภาพที่ 3-4 NanoDrop™ One Microvolume UV-Vis Spectrophotometer  
(Thermo Scientific, US)

### 3.4.3 การสังเคราะห์ cDNA

นำ RNA ที่ความเข้มข้นเท่ากับ  $5\mu\text{g}/\mu\text{L}$  มาทำการสังเคราะห์ cDNA โดยคำนวณหาปริมาณ ( $\mu\text{L}$ ) โดยใช้ Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, UK) โดยใน 1 reaction ประกอบไปด้วยสารเคมีและปริมาณที่ใช้ ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction ในการสังเคราะห์ cDNA โดยใช้ Tetro cDNA Synthesis Kit (Bioline, UK)

Chemical reagent	Volume( $\mu\text{L}$ )
5x RT buffer	4
Oligos primer	1
10mM dNTP mix	1
RNase inhibitor	1
Reverse transcriptase	1
DEPC-treated water	1
Hexamer	1
<b>Total</b>	<b>10</b>

ภายหลังจากการเตรียมสารดังตารางที่ 3-1 นำไปป้อนโดยใช้เครื่อง T100™ Thermal Cycler (Bio-rad, US) ที่อุณหภูมิ  $25^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที,  $45^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 30 นาที,  $85^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 5 นาที และรักษาอุณหภูมิไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$  จากนั้นนำ cDNA ที่ได้ออกจากเครื่องไปเก็บรักษาไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$

### 3.5 การออกแบบและทดสอบประสิทธิภาพของ primer สำหรับการวิเคราะห์ด้วย real-time PCR

#### 3.5.1 การออกแบบ primer

Primer ที่ใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีนที่ต้องการ ได้แก่ VEGF และ *S100 $\beta$*  เพื่อหาลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีนเหล่านี้ในหนูแรท ได้นำลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีน VEGF มาจากงานวิจัยของ Bateman และคณะในปี 2017 และลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีน *S100 $\beta$*  มาจากงานวิจัยของ Wen และคณะในปี 2020 (แสดงดังตารางที่ 3-2) ทำการทดสอบความจำเพาะของ primer โดยนำลำดับของ primer มาทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ NCBI Primer-BLAST ร่วมกับ Primer3 version 4.1.0 (แสดงดังภาพ 3-5 และ 3-6) และทำการสั่งซื้อ primer ที่มีลำดับตามที่ต้องการจากบริษัท MacroGen Korea

ตารางที่ 3-2 ลำดับของ primer ที่จำเพาะต่อยีนและขนาดของ primer

Gene	Primer		Product length	Reference
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')		
<i>VEGF</i>	GCAATGATGAAGCCCTGGAG	GGTGAGGTTTGATCCGCATG	78	Bateman et al., 2007
<i>S100<math>\beta</math></i>	GGGTGACAAGCACAAGCTGAA	AGCGTCTCCATCACTTTGTCCA	117	Wen et al., 2020

\*VEGF: Vascular endothelial growth factor; *S100 $\beta$* : S100 calcium binding protein B

Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GGGTGACAAGCACAAAGCTGAA	21	61.36	52.38	4.00	0.00
Reverse primer	AGCGTCTCCATCACTTTGTCCA	22	61.93	50.00	2.00	2.00
Products on target templates						
> <a href="#">NM_013191.2</a> Rattus norvegicus S100 calcium binding protein B (S100b), mRNA						
product length = 117						
Forward primer	1 GGGTGACAAGCACAAAGCTGAA	21				
Template	186 .....	206				
Reverse primer	1 AGCGTCTCCATCACTTTGTCCA	22				
Template	302 .....	281				

ภาพที่ 3-5 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ NCBI Primer-BLAST ของ S100 $\beta$  primer

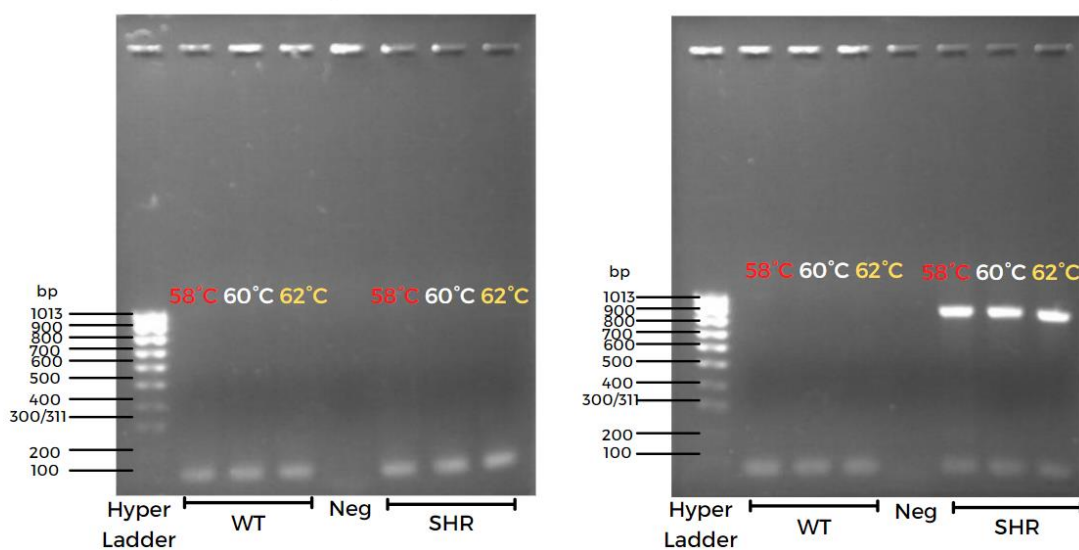
Detailed primer reports						
Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCAATGATGAAGCCCTGGAG	20	58.97	55.00	3.00	2.00
Reverse primer	GGTGAGGTTTGATCCGCATG	20	59.27	55.00	4.00	4.00
Products on target templates						
> <a href="#">NM_001287114.1</a> Rattus norvegicus vascular endothelial growth factor A (Vegfa), transcript variant 8, mRNA						
product length = 78						
Forward primer	1 GCAATGATGAAGCCCTGGAG	20				
Template	1222 .....	1241				
Reverse primer	1 GGTGAGGTTTGATCCGCATG	20				
Template	1299 .....	1280				

ภาพที่ 3-6 แสดงผลการทดสอบความจำเพาะเบื้องต้นโดยใช้ซอฟต์แวร์ NCBI Primer-BLAST ของ VEGF primer

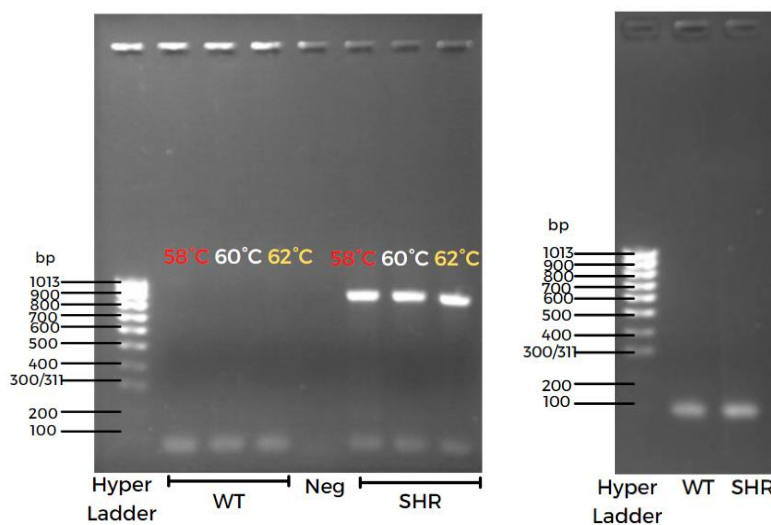
### 3.5.2 การหา annealing temperature ที่เหมาะสม

นำ primer ที่ได้มาละลายด้วย TE buffer เพื่อทำเป็น stock primer ความเข้มข้น 100 pmol/ $\mu$ l (10 $\times$ ) แล้วนำมาเจือจางด้วย DEPC-treated water ให้ได้เป็น working primer ความเข้มข้น 10 pmol/ $\mu$ l (1 $\times$ ) จากนั้นนำ working primer มาทดสอบกับ cDNA จากอิปโปแคมปัสหรือซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทเพศผู้ ด้วยวิธี conventional PCR โดยใช้ MyTaq<sup>TM</sup> Red Mix (Bioline, UK) กำหนด annealing temperature ( $T_a$ ) ที่ต้องการ

ทดสอบไว้ 3 ระดับ ได้แก่ 58 °C, 60 °C และ 62 °C จากนั้นนำ PCR product ที่ได้มาทดสอบด้วย 1.5% Agarose gel electrophoresis โดยใช้ QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Netherland) 135V 30 นาที ร่วมกับโปรแกรม Fluoro block Neo Image ในการถ่ายภาพ คัดเลือก  $T_a$  ที่ให้ yield สูงที่สุดและไม่เกิด non-specific band ซึ่งคือ 60°C ดังแสดงในภาพที่ 3-7 โดยในการทดลองครั้งนี้พบปัญหาที่ไพรเมอร์ของ VEGF (ขวา) (ขวา) โดยพบว่าเกิด non-specific band ขึ้นที่ประมาณ 800-900bp และจากการศึกษาเพิ่มเติมใน genome ของหนู SHR พบว่าเกิดจาก alternative splicing ซึ่งทำให้เกิด isoform อีกแบบของ VEGF ขึ้นมา ซึ่งไพรเมอร์ที่ใช้อยู่ระหว่าง exon 3 และ 4 ที่ intron ไม่ได้ถูกตัดออกไปซึ่งมีขนาด 857bp ดังที่เห็นในภาพที่ 3-7 (ขวา) หลังจากนั้นได้ทำการทดสอบไพรเมอร์ VEGF อีกครั้ง ผลแสดงดังภาพ 3-8 ซึ่งพบว่าจากเดิมจากการทดสอบแบบ conventional PCR (ภาพที่ 3-8 (ซ้าย)) มี non-specific band แต่ในภาพที่ 3-8 (ขวา) ซึ่งเป็นผลที่ได้จากการทำ qRT-PCR ผลคือไม่มี alternative splicing แล้ว จึงสามารถใช้ไพรเมอร์นี้ได้



ภาพที่ 3-7 ผลการทดสอบไพรเมอร์ S100 $\beta$  (ซ้าย) และ VEGF (ขวา) ด้วยวิธี conventional PCR



ภาพที่ 3-8 ผลการทดสอบไพรเมอร์ VEGF จากการทำ conventional PCR (ซ้าย) และ qRT-PCR (ขวา)

### 3.6 การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย real-time PCR

เตรียม real-time PCR reaction mixture ที่มี 2x SensiFAST SYBR Hi-ROX mix (Bioline, UK), cDNA ที่สกัดได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของหนูแรททุกกลุ่ม และ primer แต่ละคู่ โดยใน 1 reaction จะประกอบไปด้วยสารเคมีและปริมาณที่ใช้ ดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 สารเคมีและปริมาณที่ใช้ต่อ 1 reaction ในการเตรียม real-time PCR reaction mixture

Chemical reagent	Volume( $\mu$ l)
Forward primer(1x)	0.8
Reverse primer(1x)	0.8
2x SensiFAST SYBR Hi-ROX mix	10
DEPC	3.4
<b>Total</b>	<b>15</b>



นำ real-time PCR reaction mixture 15 $\mu$ l กับ cDNA 5  $\mu$ l รวมเป็น 20 $\mu$ l จากนั้นแล้วนำ reaction mixture ที่ได้มาเข้าปฏิกิริยา real-time PCR โดยใช้ Step One™ Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystem, USA) ใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 2 นาทีในขั้น polymerase activation ใช้อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 วินาทีในขั้น denaturation ใช้  $T_a$  ที่เหมาะสมเป็นเวลา 10 วินาทีสำหรับขั้น annealing/extension และเวียนขั้น denaturation และ annealing/extension ทั้งหมด 40 รอบ จากนั้นจึงนำค่า Ct ที่ได้มาคำนวณการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มด้วย  $\Delta$ Ct method และ  $2^{-\Delta Ct}$  จากนั้นนำไปหาค่าเฉลี่ย ทำ fold change และหา SE fold change

### 3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์การแสดงออกของยีน S100 $\beta$  และ VEGF โดยจะแสดงผลเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ความเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of mean: SEM) ข้อมูลมีการกระจายแบบปกติจะใช้สถิติสำหรับ Parametric Test แบบ One-way ANOVA และ Unpaired T-Test โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ในการวิเคราะห์

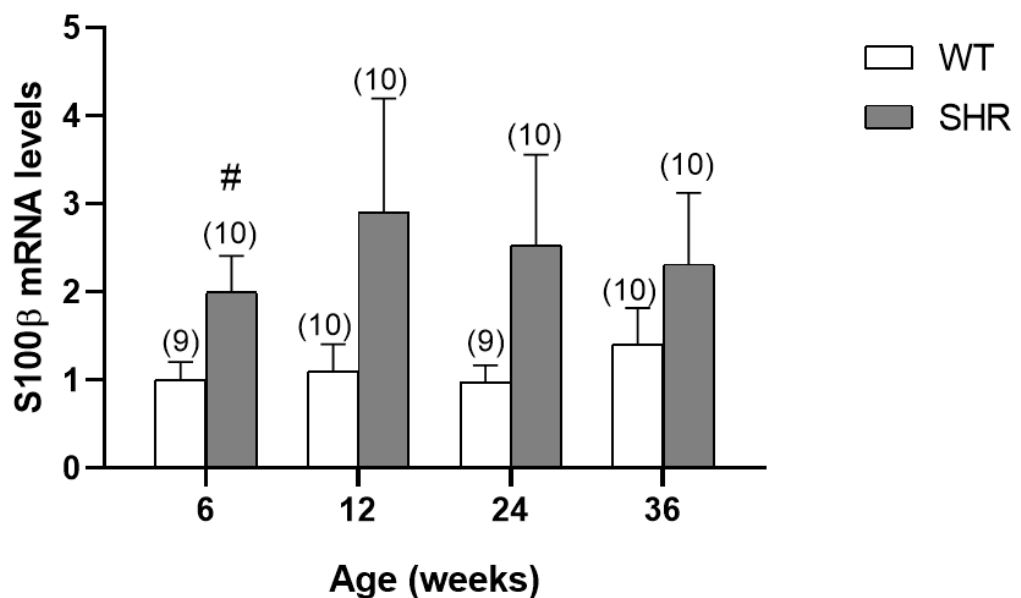
## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดสมองทำงานผิดปกติในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เองที่อายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์ แบ่งออกเป็น 2 หัวข้อหลัก ดังนี้

#### 4.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ และ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex

##### 4.1.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$



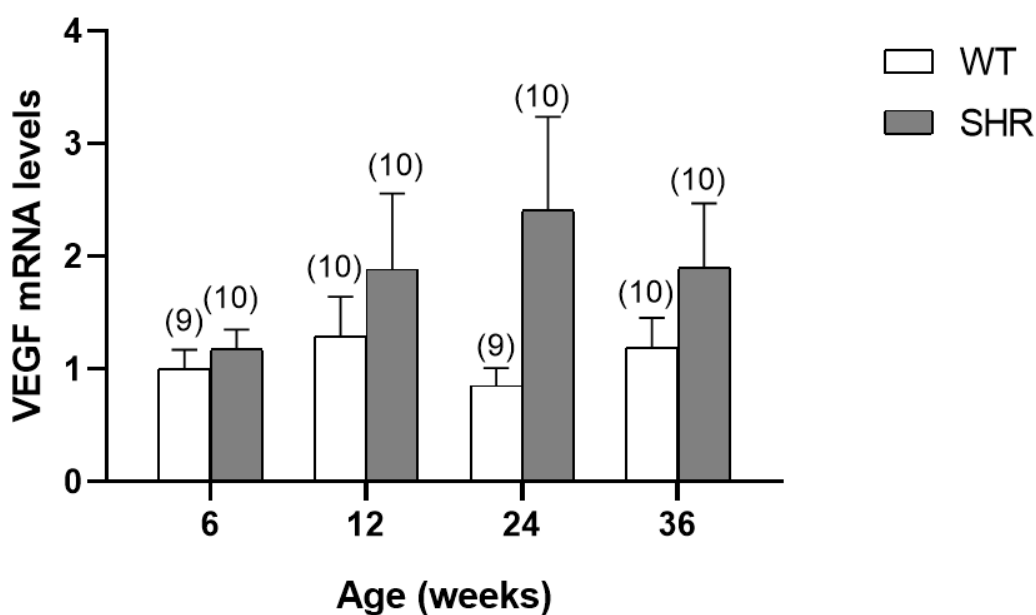
# represent  $p < 0.05$  compared between same age at different group

ภาพที่ 4-1 การแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน cerebral cortex (SHR คือ หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง, WT คือ หนูความดันปกติ และ # แสดงถึง การแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ที่ความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ))

จากภาพที่ 4-1 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน S100 $\beta$  ในสมองส่วน cerebral cortex ในหนูกลุ่มที่มีความดันปกติ (WT) และกลุ่มความดันโลหิตสูง (SHR) โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA พบว่า ในกลุ่ม WT อายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน cerebral cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) ในหนูกลุ่ม SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน cerebral cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Unpaired T-Test พบว่าหนู SHR อายุ 6 สัปดาห์มีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่มากกว่าหนูกลุ่ม WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Unpaired T-Test,  $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูอายุ 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ก็มีแนวโน้มที่หนูกลุ่ม SHR จะมีระดับของการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่เพิ่มมากขึ้นและมากกว่าหนูในกลุ่ม WT

#### 4.1.2 การแสดงออกของยีน VEGF



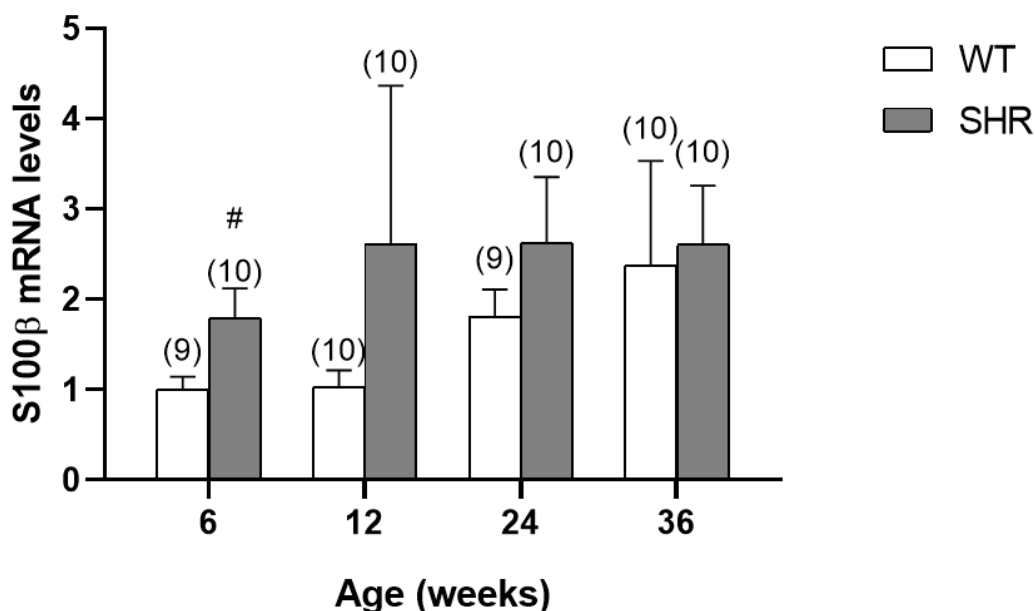
ภาพที่ 4-2 การแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex (SHR คือ หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง และ WT คือ หนูความดันปกติ)

จากภาพที่ 4-2 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex ในหนูกลุ่ม WT และ SHR โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ในหนูกลุ่ม WT พบว่า อายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) ในหนูกลุ่ม SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Unpaired T-Test พบว่าหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกันมีการแสดงออกของ VEGF ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Unpaired T-Test,  $p < 0.05$ )

#### 4.2 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$ และ VEGF ในสมองส่วน hippocampus

##### 4.2.1 การแสดงออกของยีน S100 $\beta$



# represent  $p < 0.05$  compared between same age at different group

##### ภาพที่ 4-3 การแสดงออกของ S100 $\beta$ ในสมองส่วน hippocampus

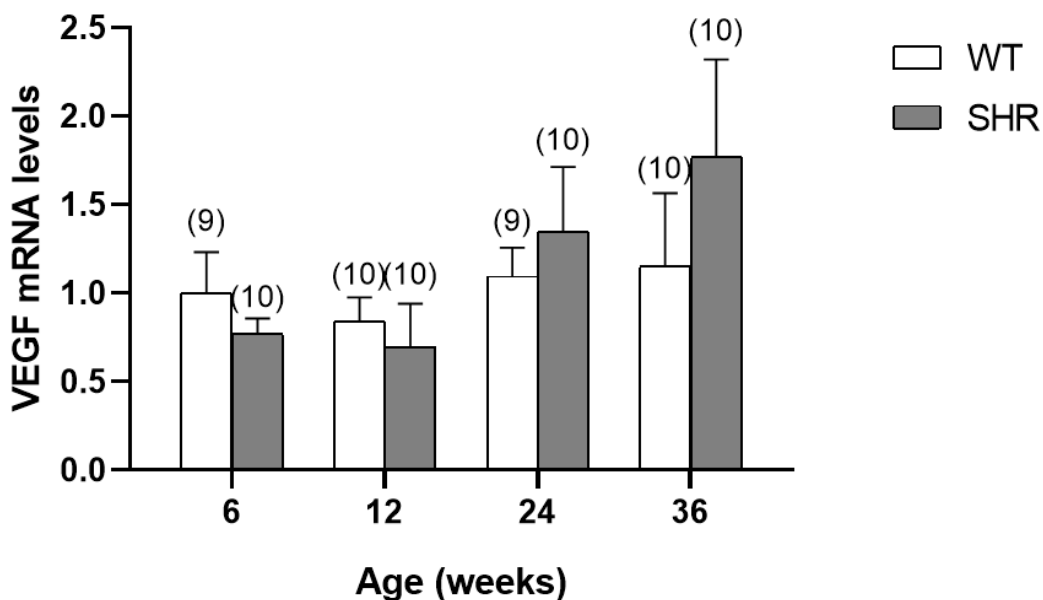
(SHR คือ หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง, WT คือ หนูความดันปกติ และ

# แสดงถึง การแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ )

จากภาพที่ 4-3 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน S100 $\beta$  ในสมองส่วน hippocampus ในหนูกลุ่ม WT และ SHR โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ในหนูกลุ่ม WT พบว่า อายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) แต่ก็มีแนวโน้มที่ค่อยๆสูงขึ้นเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น และในการหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนูกลุ่ม SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Unpaired T-Test พบว่าหนู SHR อายุ 6 สัปดาห์มีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่มากกว่าหนูกลุ่ม WT อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Unpaired T-Test,  $p < 0.05$ ) ในขณะที่หนูอายุ 12, 24 และ 36 สัปดาห์ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ก็มีแนวโน้มที่หนูกลุ่ม SHR จะมีระดับของการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่เพิ่มมากขึ้นและมากกว่าหนูในกลุ่ม WT

#### 4.2.2 การแสดงออกของยีน VEGF



ภาพที่ 4-4 การแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน hippocampus (SHR คือ หนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง และ WT คือ หนูความดันปกติ)

จากภาพที่ 4-4 เมื่อทำการเปรียบเทียบผลของอายุที่เพิ่มขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน VEGF ในสมองส่วน hippocampus ในหนูกลุ่ม WT และ SHR โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One-Way ANOVA ในหนูกลุ่ม WT พบว่า อายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) ในหนูกลุ่ม SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน hippocampus อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (One-Way ANOVA,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกัน

เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน โดยทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Unpaired T-Test พบว่าหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกันมีการแสดงออกของ VEGF ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% (Unpaired T-Test,  $p < 0.05$ )

## บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา

ภาวะความดันโลหิตสูงเป็นหนึ่งในปัจจัยที่เร่งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด และทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือด ซึ่งสามารถพบได้ที่หลอดเลือดต่างๆทั่วร่างกาย รวมทั้งหลอดเลือดสมอง โดยบริเวณหลอดเลือดสมอง จะมี blood brain barrier (BBB) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ป้องกันสารอันตรายและโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่ให้เข้าสู่สมอง ทั้งนี้ความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองและ BBB จะส่งผลให้เกิดความเสียหายของสมอง เป็นสาเหตุโน้มนำทำให้เกิดสมองขาดเลือดและการบาดเจ็บของสมอง และเป็นสาเหตุของโรคต่างๆตามมา เช่น โรคสมองเสื่อม (Alzheimer's disease), ภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด (Vascular dementia) ได้อีกด้วย

จากผลการศึกษาเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR พบว่าอายุที่เพิ่มขึ้นทั้งในหนูกลุ่ม WT และ SHR ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus และในส่วนของผลการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกันพบว่า มีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนู SHR มากกว่าหนูกลุ่ม WT ที่อายุ 6 สัปดาห์ ในขณะที่หนู SHR และ WT อายุ 12, 24 และ 36 สัปดาห์นั้นมีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ก็มีแนวโน้มที่หนูกลุ่ม SHR จะมีระดับของการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่เพิ่มมากขึ้นและมากกว่าหนูในกลุ่ม WT โดยมีผลเหมือนกันทั้งใน cerebral cortex และ hippocampus ในขณะที่การแสดงออกของ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน พบว่ามีการแสดงออกของ VEGF ที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีผลเหมือนกันทั้งใน cerebral cortex และ hippocampus เช่นกัน แต่พบว่าระดับการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน hippocampus นั้นค่อนข้างต่ำกว่าใน cerebral cortex

เนื่องจากความดันโลหิตที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดอาการบาดเจ็บที่สมอง ซึ่งจะไปกระตุ้นการอักเสบของระบบประสาทและกระตุ้น astrocyte ให้มีการเพิ่มการผลิต S100 $\beta$  (Kawata et al., 2016) ซึ่งมีโอกาสที่จะทำให้หนูกลุ่ม SHR ที่มีความดันโลหิตที่สูงกว่า มีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ที่มากกว่าหนูกลุ่ม WT โดยสามารถตรวจวัดได้ตั้งแต่อายุ 6 สัปดาห์ ทั้งในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus ในขณะที่หนู SHR และ WT อายุ 12, 24 และ 36 สัปดาห์นั้นมีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในกรณีนี้อาจเป็นเพราะร่างกายมีการตอบสนองอย่างทันท่วงทีกับความผิดปกติของหลอดเลือดที่เกิดขึ้น ทำให้ระดับการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนู SHR อายุ 12, 24 และ 36 สัปดาห์นั้นมีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ไม่ต่างจากหนูกลุ่ม WT ที่ช่วงอายุเดียวกัน จากการศึกษาของ Modi และ Kanungo ในปี 2010 พบว่าการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในสมองส่วน cerebral cortex ในผู้ใหญ่ต่ำกว่าในเด็กอย่างมาก ดังนั้นการแสดงออกของ S100 $\beta$  จึงสูงกว่าในหนูอายุ 45 วัน (ประมาณ 6 สัปดาห์) เมื่อเทียบกับหนูที่โตเต็มวัย อาจเป็นเพราะปัจจัยต่างๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น transacting factors บางอย่างที่มาจับกับ promotor หรือ การเกิด promotor methylation ซึ่งนำไปสู่การลดระดับลงของการ transcription เป็นต้น (Shanti and Kanungo, 2004; Singh and Prasad, 2008)

ในส่วนของการแสดงออกของ VEGF พบว่าไม่ต่างกันในกลุ่ม WT และ SHR ในช่วงอายุเดียวกันทั้งในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus แต่ก็มีแนวโน้มที่หนูกลุ่ม SHR จะมีระดับของการแสดงออกของ VEGF ที่มากกว่าหนูในกลุ่ม WT ซึ่งในส่วนของการแสดงออกของ VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex นั้นมี p value ที่ใกล้เคียงกับ  $p < 0.05$  ที่เป็นระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ใช้วัดการแสดงออกของ VEGF ในขณะที่ในสมองส่วน hippocampus มีการแสดงออกของ VEGF ที่น้อยกว่า ซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาของ Jun Yong Hyun และคณะในปี 2020 ซึ่งได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของ VEGF ที่สมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus ซึ่งจากการศึกษาพบเซลล์ที่มี VEGF ในสมองส่วน cerebral cortex มากกว่าสมองส่วน hippocampus ที่มีปริมาณ VEGF ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากรูปแบบการแสดงออกของ VEGF ที่จะแตกต่างกันระหว่างโซน neurogenesis ในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus

การเกิดความผิดปกติของหลอดเลือด มักจะทำให้เกิดโรคเกี่ยวกับหลอดเลือดในวัยต่างๆในร่างกายตามมา โดยอาจมีปัจจัยอื่นมาสนับสนุน เช่น อายุที่เพิ่มขึ้น ความดันโลหิตสูง เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบสำคัญของหลอดเลือด 3 อย่างจะได้รับผลกระทบจากความดันโลหิตสูง ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหลอดเลือด การเปลี่ยนไปเป็นเชิงกลไกของหลอดเลือด และการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหลอดเลือด (Intengan and Schiffrin, 2000) นอกจากการเกิดความผิดปกติที่ blood brain barrier ในหลอดเลือดที่สมองแล้วอีกหนึ่งในหลอดเลือดที่มักเกิดความผิดปกติหากมีความดันโลหิตที่สูงขึ้นคือ หลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular) ส่งผลให้เกิดโรคต่างๆตามมามาอันได้แก่ โรคหลอดเลือดหัวใจ (cardiovascular disease) เป็นต้น ความผิดปกติอีกชนิดที่พบได้บ่อยคือความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial dysfunction) ซึ่งสามารถเกิดได้กับหลอดเลือดทั่วร่างกาย



จากการศึกษาทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดสมองทำงานผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง ที่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษากลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องของการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพที่สมองในภาวะความดันโลหิตสูงต่อไปได้

## บทที่ 6

### สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

#### 6.1 สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอายุที่เพิ่มขึ้นและการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF พบว่าอายุไม่มีผลต่อการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ทั้งในหนูกลุ่ม WT และ SHR ในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus และจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการแสดงออกของ S100 $\beta$  และ VEGF ในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน พบว่ามีผลเหมือนกันทั้งใน cerebral cortex และ hippocampus คือ มีการแสดงออกของ S100 $\beta$  ในหนู SHR มากกว่าหนูกลุ่ม WT ที่อายุ 6 สัปดาห์ ในขณะที่การแสดงออกของ VEGF ทั้งในหนูกลุ่ม WT และ SHR ที่ช่วงอายุเดียวกัน พบว่ามีการแสดงออกของ VEGF ที่ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าความดันโลหิตสูงส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของหลอดเลือดสมองซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้สามารถพบได้ตั้งแต่วัยแรกของการเกิดความดันโลหิตสูง

#### 6.2 ข้อเสนอแนะ

##### 6.2.1 ข้อเสนอแนะสำหรับการนำไปใช้ประโยชน์

ในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะหลอดเลือดสมองทำงานผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรทความดันโลหิตสูงชนิดเกิดขึ้นได้เอง ที่สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษากลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องของการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพที่สมองในภาวะความดันโลหิตสูง รวมถึงยังสามารถเป็นฐานข้อมูลในการหาทางป้องกันและรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับหัวใจและหลอดเลือด และโรคทางระบบประสาทที่เกิดจากภาวะความดันโลหิตสูงต่อไปได้

##### 6.2.2 ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาในอนาคต

เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาหนูในช่วงอายุ 6, 12, 24 และ 36 สัปดาห์เท่านั้น ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ มีความเป็นไปได้ที่จะมีการแสดงออกของยีนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อหนูมีอายุเพิ่มขึ้น ในอนาคตอาจขยายช่วงอายุในการศึกษาให้กว้างมากขึ้น รวมไปถึงการศึกษาส่วนอื่นๆ ของสมองเพิ่มเติมซึ่งอาจมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา ในการศึกษาครั้งนี้มีแต่ในเพศผู้ เพื่อข้อมูลที่มากขึ้นควรมีการศึกษาในหนูเพศเมียเพิ่มเติมด้วย และ การศึกษานี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับ mRNA เท่านั้น ดังนั้นควรมีการ

ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มเติมด้วยจะทำให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์มากขึ้น สำหรับ  
แนวทางในการศึกษาในอนาคต การใช้ทั้งวิธี qRT-PCR นั้นยังมีความเหมาะสมกับการศึกษา  
การแสดงออกของยีน

### เอกสารอ้างอิง

- กองยุทธศาสตร์และแผนงาน สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข. 2563. หนังสือสถิติสาธารณสุข พ.ศ.2562. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงสาธารณสุข.
- Abbott, NJ., Patabendige, AA., Dolman, DE., Yusof, SR. and Begley, DJ. 2010. Structure and function of the blood–brain barrier. *Neurobiology of disease*. 37:13–25.
- Bateman, RM., Tokunaga, C., Kareco, T., Dorscheid, DR. and Walley, KR. 2007. Myocardial hypoxia-inducible HIF-1, VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. *The American journal of physiology-heart and circulatory physiology*. 293:448–456.
- Begley, DJ., and Brightman, MW. 2003. Structural and functional aspects of the blood-brain barrier. *Progress in drug research*. 61:39–78.
- Carretero, OA. and Oparil, S. 2000. Clinical Cardiology: New Frontiers Essential Hypertension Part I: Definition and Etiology. *Circulation*. 101:329-335.
- Claudio, L., Kress, Y., Norton, WT., and Brosnan, CF. 1989. Increased vesicular transport and decreased mitochondrial content in blood-brain barrier endothelial cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *The American journal of pathology*. 135:1157–1168.
- Donato, R., Sorci, G., Riuzzi, F., Arcuri, C., Bianchi, R., Brozzi, F., Tubaro, C. and Giambanco, I. 2009. S100B's double life: intracellular regulator and extracellular signal. *Biochimica et biophysica acta*. 1793:1008–1022.
- Folkow, B. and Svanborg, A. Physiology of cardiovascular aging. 1993. *Physiological Reviews - American journal of physiology*. 73: 725–764.
- Förstermann, U., and Münzel, T. 2006. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. *Circulation*. 113:1708–1714.
- Heffner, TG., Hartman, JA. and Seiden, LS. 1980. A Rapid Method for the Regional Dissection of the Rat Brain. *Pharmacology biochemistry and behavior*. 13:453–456.

- Higashi, Y., Kihara, Y. and Noma, K. 1997. Endothelial dysfunction and hypertension in aging. *Hypertension Research- The Japanese society of hypertension*. 35:1039–1047.
- Iadecola, C. 2004. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews neuroscience*. 5:347–360.
- Intengan, HD. and Schiffrin, EL. 2000. Structure and mechanical properties of resistance arteries in hypertension: role of adhesion molecules and extracellular matrix determinants. *Hypertension*. 36(3):312–318.
- Jacovic, S., Zivkovic-Radojevic, M. and Petrovic, D. 2016. Secondary Hypertension: Differential Diagnosis and Basic Principles of Treatment. *Serbian journal of experimental and clinical research*. 17(4):349-356.
- Jeter, CB., Hergenroeder, GW., Hylin, MJ., Redell, JB., Moore, AN. and Dash, PK. 2013. Biomarkers for the diagnosis and prognosis of mild traumatic brain injury/concussion. *Journal of neurotrauma*. 30:657–670.
- Jun, YH., Ju, GS., Chung, YY., Shin, H., Kim, D., Choi, MS., KIM, ST. and Son, KM. 2020. Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Cortex and Hippocampus upon Cerebral Hypoperfusion. *In vivo*. 34:191-197.
- Kannel, WB. and Gordon, T. The Framingham study : an epidemiological investigation of cardiovascular disease. 1974. *United States, Department of health, education, and welfare publication*. p.74-599.
- Kawata, K., Liu, CY., Merkel, SF., Ramirez, SH., Tierney, RT. and Langford, D. 2016. Blood biomarkers for brain injury: What are we measuring? *Neuroscience and biobehavioral reviews*. 68: 460–473.
- Kokubo, Y., Iwashima, Y. and Kamide, K. 2015. Hypertension: Introduction, Types, Causes, and Complications. *Pathophysiology and pharmacotherapy of cardiovascular disease*. 30:635-653.

- Mahoney, ER., Dumitrescu, L., Moore, AM., Cambronero, FE., Jager, PL., Koran, MI., Petyuk, VA., Robinson, AS., Goyal, S., Schneider, JA., Bennett, DA., Jefferson, AL. and Hohman, TJ. 2019. Brain expression of the vascular endothelial growth factor gene family in cognitive aging and alzheimer's disease. *Molecular psychiatry*.
- Miners, JH., Schulz, I. and Love S. Differing associations between A $\beta$  accumulation, hypertension, blood-brain barrier dysfunction, and loss of PDGFRB pericyte marker in the precuneus and parietal white matter in Alzheimer's disease. 2018. *Journal of cerebral blood flow and metabolism*. 38:103-15.
- Modi, PK. and Kanungo, MS. 2010. Age-dependent Expression of S100b in the Brain of Mice. *Cellular and molecular neurobiology*. 30:709–716.
- Montagne, A., Barnes, SR., Sweeney, MD., Halliday, MR., Sagare, AP., Zhao, Z., Toga, AW., Jacobs, RE., Liu, CY., Amezcua, L., Harrington, MG., Chui, HC., Law, M. and Zlokovic, BV. 2015. Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus. *Neuron*. 85:296–302.
- Najjar, S., Pahlajani, S., Sanctis, VD., Stern, JNH., Najjar, A. and Chong D. 2017. Neurovascular Unit Dysfunction and Blood–Brain Barrier Hyperpermeability Contribute to Schizophrenia Neurobiology: A Theoretical Integration of Clinical and Experimental Evidence. *Frontiers in psychiatry*. 8:83.
- Napoli, MD., and Shah, IM. 2011. Neuroinflammation and cerebrovascular disease in old age: a translational medicine perspective. *Journal of aging research*. 2011:857484.
- Okamoto, K. and Aoki, K. 1963. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal*. 27:282-293.
- Pillai, A., Howell, KR., Ahmed, AO., Weinberg, D., Allen, KM., Bruggemann, J., Lenroot, R., Liu, D., Galletly, C., Weickert, CS. and Weickert, TW. 2015. Association of serum VEGF levels with prefrontal cortex volume in schizophrenia. *Molecular psychiatry*. 2015:1–7.

- Rajendran, P., Rengarajan, T., Thangavel, J., Nishigaki, Y., Sakthisekaran, D., Sethi, G. and Nishigaki, I. 2013. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *International journal of biological sciences*. 9(10):1057-1069.
- Richter-Landsberg, C. and Heinrich, M. 1995. S-100 immunoreactivity in rat brain glial cultures is associated with both astrocytes and oligodendrocytes. *Journal of neuroscience research*. 42:657–665.
- Shanti, K. and Kanungo, M. S. 2004. Expression of muscle creatine kinase gene of mice and interaction of nuclear proteins with MEF-2, E boxes and A/T-rich elements during aging. *Molecular biology reports*. 31(1):43–50.
- Sheng, JG., Mrak, RE. and Griffin, WS. 1994. S100 beta protein expression in Alzheimer disease: potential role in the pathogenesis of neuritic plaques. *Journal of neuroscience research*. 39:398–404.
- Shibuya, M. 2011. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes and cancer*. 2(12):1097 –1105.
- Singh, K. and Prasad, S. 2008. Differential expression of Fmr-1 mRNA and FMRP in female mice brain during aging. *Molecular biology reports*. 35(4):677–684.
- Singh, S., Shankar, R. and Singh GP. 2017. Prevalence and Associated Risk Factors of Hypertension: A Cross-Sectional Study in Urban Varanasi. *International journal of hypertension*. 2017: 5491838.
- Steiner, J., Bernstein, HG., Bogerts, B., Gos, T., Richter-Landsberg, C., Wunderlich, MT. and Keilhoff, G. 2008. S100B is expressed in, and released from, OLN-93 oligodendrocytes: influence of serum and glucose deprivation. *Neuroscience*. 154:496–503.
- Takahashi, H. and Shibuya, M. 2005. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/ VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical science*. 109:227–241.
- Tayebati, SK., Tomassoni, D. and Amenta, F. 2012. Spontaneously hypertensive rat as a model of vascular brain disorder: Microanatomy, neurochemistry and behavior. *Journal of the neurological sciences*. 322:241–249.

- The American college of cardiology. 2017. 2017  
ACC/AHA/AAPA/ABC/ACPM/AGS/APhA/ASH/ ASPC/NMA/PCNA Guideline  
for the prevention, detection, evaluation, and management of high blood  
pressure in adults. *Journal of the American college of cardiology*.  
71(19):127-248.
- Undén, L., Calcagnile, O., Undén, J., Reinstrup, P. and Bazarian, J. 2015. Validation  
of the Scandinavian guidelines for initial management of minimal, mild  
and moderate traumatic brain injury in adults. *Biomed central medicine*.  
13:292.
- Uranova, NA., Zimina, IS., Vikhрева, OV., Krukov, NO., Rachmanova, VI. and  
Orlovskaya, DD. 2010. Ultrastructural damage of capillaries in the  
neocortex in schizophrenia. *The world journal of biological psychiatry*.  
11:567–78.
- Wen, L., Sun, J., Chen, X. and Du, R. 2020. miR-135b-dependent downregulation  
of S100B promotes neural stem cell differentiation in a hypoxia/ischemia-  
induced cerebral palsy rat model. *American journal of physiology-cell  
physiology*. 319:955–966.