

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของสารยับยั้งตัวรับชนิดที่ 1 ของ แองจิโอเทนซินทู
ต่อการทำงานของหลอดเลือดสมองในหนูเบาหวาน

Role of angiotensin II type 1 receptor blocker
on cerebral endothelial function in diabetic rats

โดย

ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

616.81
อ555บ
ร.2

กรกฎาคม 2555

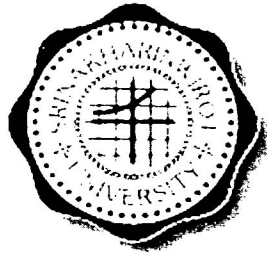
ทุนอุดหนุนการวิจัย ศูนย์การแพทย์ฯ
ประจำปีงบประมาณ 2553

1201/มส.

616.81

๖ ๕๕๕๗

๖.๒



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของสารยับยั้งตัวรับชนิดที่ 1 ของ แองจิโอเทนซินทู
ต่อการทำงานของหลอดเลือดสมองในหนูเบาหวาน

Role of angiotensin II type 1 receptor blocker
on cerebral endothelial function in diabetic rats

โดย

ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กรกฎาคม ๒๕๕๕

ทุนอุดหนุนการวิจัย ศูนย์การแพทย์ฯ

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๓

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

ผู้วิจัยขอแสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2553 และขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อ ภาควิชา สรีรวิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนในทุก ๆ ด้านจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยดี เพื่อเป็นการส่งเสริมและสนับสนุนงานวิจัย และเปิดโอกาสให้ผู้วิจัยได้ใช้ความรู้ความสามารถในการคิดและสร้างงานวิจัยในสาขา Cardiovascular Physiology (Microcirculation) และเป็นช่องทางให้ผู้วิจัยพัฒนาความคิด ความรู้ทางวิชาการ และสามารถนำผลงานวิจัยมาพัฒนาการเรียนการสอน

ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ชื่อโครงการ บทบาทของสารยับยั้งตัวรับชนิดที่ 1 ของ แองจิโอเทนซินทูต่อการทำงานของหลอดเลือดสมองในหนูเบาหวาน

ชื่อผู้วิจัย อัมพร จาริยะพงศ์สกุล ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ระยะเวลาการทำวิจัย ตุลาคม พ.ศ.2553 – เดือน พฤษภาคม พ.ศ.2555

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ศึกษาบทบาทของการใช้ สารยับยั้งการจับกันระหว่าง แองจิโอเทนซินทู และตัวรับชนิดที่ 1 ต่อ อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองและการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองของหนูที่เป็นเบาหวานโดยศึกษาในหนูวิสตาเรพคัส น้ำหนัก 200-250 กรัม ชักน้ำหนักให้เป็นเบาหวานโดยวิธีฉีดสารสเตรบิโตโซโตซินเข้าทางหลอดเลือดดำขนาดความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว แบ่งสัตว์ทดลองแบบสุ่มเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มเบาหวาน (STZ) และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสาร losartan ขนาด 50 มก/นต ตัว 1กก. (STZ- losartan) ป้อน losartan ให้หนูเบาหวานกินวันละ 1 ครั้ง ทำการทดลองหลังจากสัตว์ทดลองได้รับการฉีดสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์หรือสเตรบิโตโซโตซินไปแล้ว 8 สัปดาห์ พาราเมเตอร์ที่ใช้ศึกษาได้แก่ ระดับน้ำตาลในเลือด ไกลโคซิลเลทเต็ดฮีโมโกลบิน พลาสมาคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวที่เอนโดทีเลียมภายในหลอดเลือดดำขนาดเล็ก และการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร endothelium dependent vasodilator (ACh) และ endothelium independent vasodilator (NTG) และวัดระดับ lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมอง จากผลการทดลองพบว่าในหนูกลุ่มเบาหวาน มี ระดับน้ำตาลในเลือด ไกลโคซิลเลทเต็ดฮีโมโกลบิน พลาสมาคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ ในหนูเบาหวานที่ได้รับสาร losartan มีระดับระดับน้ำตาลในเลือด ไกลโคซิลเลทเต็ดฮีโมโกลบิน ต่ำกว่ากลุ่มเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองมีค่าต่ำ ขณะที่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีจำนวนสูงในหนูกลุ่มเบาหวาน ในหนูเบาหวานที่ได้รับสาร losartan อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน ขณะที่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีจำนวนต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน ในหนูเบาหวานมีความบกพร่องในการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อสาร ACh และในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับ losartan พบว่า losartan สามารถป้องกันความบกพร่องในการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อสาร ACh นอกจากนั้นระดับสารอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมองของหนูเบาหวานมีระดับที่ต่ำลงเมื่อได้รับสาร losartan โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในภาวะเบาหวาน ความผิดปกติที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้เป็นผลจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดที่สูงผิดปกติเป็นระยะเวลานานก่อให้เกิดการความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมมีผลทำให้ปริมาณการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีค่าเพิ่มขึ้น อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองลดลง และมีความบกพร่องในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilator เป็นที่น่าสนใจว่าจากการทดลองครั้งนี้จากกล่าวได้ว่าไม่เพียงแต่การให้สาร losartan ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสามารถป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียมที่เกิดจากภาวะเบาหวานแต่ยังอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้ในการป้องกันการเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองโดยเฉพาะการขาดเลือดในผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานเรื้อรังได้

คำหลัก โลซาทาน หนูเบาหวาน เซลล์เอนโดทีเลียม การไหลเวียนเลือดที่สมอง

Abstract

Project Title : Role of angiotensin 2 type 1 receptor blocker on cerebral endothelial function in diabetic rats

Investigator : Assist.Dr. Amporn Jariyapongskul, Department of Physiology, Faculty of Medicine,
Srinakharinvirot University

Project Period : October 2010 – May 2012

Abstract

The effects of long-term supplementation of losartan, an angiotensin II type1 receptor blocker on the cerebral endothelial dysfunction was investigated in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. Diabetes was induced in male Wistar Furth by intravenous injection of streptozotocin (55 mg/kg b.w.). The rats were divided into three groups: control (CON), streptozotocin (STZ) rats and streptozotocin rats supplemented with losartan (STZ- losartan). Losartan was supplemented by gavage feeding with 50 mg/kg BW.

The experiments were performed at 8 weeks after injection of STZ. The metabolic parameters (blood glucose (BG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), plasma cholesterol and triglycerine and cortex tissue superoxide anion) were measured. To examine the endothelial function, leukocyte adhesion to the venular endothelium was evaluated by counting leukocytes labeled with rhodamine 6G. In addition, functional responses of cerebral arterioles to endothelium-dependent (acetylcholine;ACh) and -independent (nitroglycerin;NTG) agonists were measured in control non-diabetic and diabetic rats with or without LOSARTAN supplementation. Moreover, the cerebral blood flow perfusion was evaluated using a laser Doppler flowmeter.

The results showed that STZ-diabetic rats induced hyperglycemia with increase in the HbA1c, increase in the plasma cholesterol and triglycerine and cortex tissue superoxide anion. All of these abnormal metabolic parameters could be improved by supplementing losartan in STZ rats. The number density of adherent leukocytes was increased significantly in STZ-diabetic rats, but it was decreased in the cerebral blood flow perfusion, compared with control rats during different periods (8, and 24 weeks). In the STZ-losartan rats, the cerebral blood flow perfusion was significantly increased but the leukocyte adhesion was decreased, as compared to STZ group. Furthermore, the magnitude of vasodilation to ACh was significantly less in STZ-rats. Supplementation with losartan significantly improved vasodilation in STZ rats. Response of pial arterioles to nitroglycerin was similar in control, STZ and STZ-losartan rats.

In conclusion, long-term supplementation of losartan could prevent the endothelial dysfunction induced by diabetes through decrease in leukocyte adhesion, improved endothelium dependent vasodilation and increase in cerebral blood flow perfusion. It was suggested that the angiotensin II type1 receptor blocker might be a great therapeutic agent for preventing diabetic cerebrovascular disease.

Keywords: losartan, cerebral blood flow, endothelial dysfunction, diabetic rats, intravital fluorescence microscopy

สารบัญเรื่อง
(Table of contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ (ไทย)	II
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	III
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูปภาพ	VI
บทที่1: บทนำ	1
บทที่2: เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่3: วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่4: ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	12
บทที่5: สรุปและอภิปรายผล	24
เอกสารอ้างอิง	27

สารบัญตาราง

(List of tables)

ตารางที่		หน้า
1	ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ของหนูกลุ่มปกติ หนู เบาหวาน (STZ) และ หนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	14
2	การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษา ใน หนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสาร Losartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	15
3	ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	16
4	ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และ หนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	17
5	ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ของหนูกลุ่มปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวานที่ ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	18
6	ค่าเฉลี่ยอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง ของหนูกลุ่มปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวานที่ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	19
7	จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-40 μm) ของหนูกลุ่มปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวานที่ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	20
8	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อ สาร Acetylcholine 10^{-6} Mol/L ของหนูกลุ่มปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวาน ที่ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	21
9	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อ สาร Nitroglycerine 10^{-5} Mol/L ของหนูกลุ่มปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวานที่ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	22
10	ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ของหนูกลุ่ม ปกติ หนูเบาหวาน และหนู เบาหวานที่ได้รับ losartan ป้อนทางปาก	23

สารบัญรูป
(List of illustrations)

รูปที่	หน้า
1 แสดงกลไกการสร้าง angiotensin	4
2 ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และ หนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	16
3 ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	17
4 ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	18
5 ค่าเฉลี่ยอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็น เวลา 8 สัปดาห์	19
6 จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-40 μm)ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็น เวลา 8 สัปดาห์	20
7 ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	21
8 ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerine 10^{-5} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	22
9 ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ- Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ป้อนทางปาก	23

บทที่ 1

บทนำ

การเกิดโรคเบาหวานอย่างเรื้อรังทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่ออวัยวะต่างๆ จนทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่การทำงานของอวัยวะนั้นๆ เช่นที่ หัวใจ (coronary artery disease), ไต (nephropathy) ตา (retinopathy) และสมองซึ่งจะเกิดความผิดปกติทั้งระบบประสาท (neuropathy) และระบบหลอดเลือด (cerebral macro- and microangiopathy) โดยเฉพาะการขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (stroke) (1-3) การศึกษามากมายนำมาซึ่งข้อมูลความรู้ที่พอสรุปได้ถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด (vascular complication) ในภาวะเบาหวานได้แก่ ภาวะ hyperglycemia และ ภาวะ dyslipidemia ปัจจัยทั้ง 2 มีบทบาทสำคัญทำให้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมสูญเสียหน้าที่ในการทำงานที่เรียกว่า endothelial dysfunction ปัจจัยที่เชื่อบ่งชี้ว่าเกิด endothelial dysfunction ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ 1. การเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators 2. มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมมากขึ้นผิดปกติ (4) ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของการเกิด endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวานที่สำคัญ คือ การมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระในร่างกาย การที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงและเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้น นอกเหนือจากนั้นความผิดปกติใน metabolism ของไขมัน (dyslipidemia) จากภาวะเบาหวานก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไปถึงบทบาทของการยับยั้งระบบ rennin-angiotensin ในการป้องกันโรคแทรกซ้อนของหลอดเลือดขนาดเล็กโดยเฉพาะที่ไต และที่ตา ในผู้ป่วยเบาหวาน ปัจจุบันมีหลักฐานการวิจัยยืนยันว่า angiotensin II (A II) เป็นตัวหลักในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อหลอดเลือด ดังนั้นการค้นพบ angiotensin II type 1 receptor blocker (ARB) ทำให้เป็นทางเลือกหนึ่งในการนำยามาใช้ป้องกันและรักษาโรคแทรกซ้อนของเบาหวานทั้งที่ตา ไต หัวใจ รวมไปถึงโรคหลอดเลือดสมอง การศึกษาในปัจจุบันพบว่าการใช้ ARB มีผลยับยั้งการสร้างอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อต่างๆ สามารถลดภาวะบาดเจ็บของเนื้อเยื่อจากการขาดเลือดได้ (5) รวมไปถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบของหลอดเลือด

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยดังกล่าวข้างต้น ยังไม่พบมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของ ARB ต่อการป้องกันความบกพร่องในการทำงานของหลอดเลือดสมองขนาดเล็กในภาวะเบาหวาน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการทำงานของ ARB ในการป้องกันและฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดสมองในภาวะเบาหวาน โดยศึกษาการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม และอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นโรคที่มีระดับน้ำตาลสูงในเลือด สาเหตุมาจากระดับฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ในร่างกายมีไม่เพียงพอซึ่งอาจเกิดขึ้นเพราะอินซูลินมีน้อยกว่าปกติไม่พอใช้หรือเกือบไม่มีเลย หรือจากการมีอินซูลินในเลือดสูงกว่าปกติแต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เพียงพอเนื่องจากตัวรับ (receptor) ของอินซูลินไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

ในปัจจุบันการจำแนกโรคเบาหวานตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (6) ได้แก่เบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM, type1) และชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM, type2) สำหรับสาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิด IDDM นั้นเกี่ยวข้องกับ HLA ในโครโมโซมที่ทำให้เกิดการติดเชื้อง่าย ส่วนใน NIDDM เกี่ยวข้องกับกรรมพันธุ์เป็นส่วนใหญ่สำหรับความเครียด สิ่งแวดล้อมมีส่วนทำให้โรคเบาหวานแสดงออกหรือมีอาการรุนแรงขึ้น

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีระดับอินซูลินไม่เพียงพอหรือออกฤทธิ์ไม่ได้นั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน metabolism ของคาร์โบไฮเดรตทำให้ระดับกลูโคสออกมากในกระแสเลือด และร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นพลังงานได้ จึงทำให้มีน้ำตาลสูงในกระแสเลือด หรือในกรณีที่ตัวรับอินซูลิน (receptor) บนผนังเซลล์มีจำนวนน้อยแม้จะมีอินซูลินมากพอ อินซูลินก็ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงใน metabolism ของไขมันในภาวะเบาหวานด้วย ทำให้ระดับ cholesterol และ triglyceride สูงขึ้น สาเหตุต่างๆดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อหลอดเลือดทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นยิ่งนานก็ยิ่งมีอาการรุนแรงมากขึ้น ถ้าการควบคุมระดับน้ำตาลไม่ดีพอภาวะแทรกซ้อนนี้จะเกิดเร็วขึ้น

Endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวาน

ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า ในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานและใน model ของสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานอย่างเรื้อรัง โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่ได้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด จะเกิดพยาธิสภาพต่อหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญของร่างกายซึ่งนำไปสู่อัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน สูญเสียความสามารถในการทำงานของอวัยวะนั้นๆตลอดจนถึงเพิ่มอัตราการตายในเบาหวานทั้งชนิด IDDM และ NIDDM (21) จากการศึกษามากมายนำมาซึ่งข้อมูลความรู้ที่พอสรุปได้คือปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด (vascular complication) ในภาวะเบาหวานได้แก่

1. ภาวะ hyperglycemia
2. ภาวะ dyslipidemia

ปัจจัยทั้ง 2 มีบทบาทสำคัญทำให้การทำงานของเอนโดทีเลียมเซลล์เปลี่ยนแปลงไปที่เรียกว่า endothelial dysfunction (7-8)

ในสภาวะปกติเอนโดทีเลียมมีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของหลอดเลือด โดยอาศัยสมดุลงของสาร mediators ต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์ ซึ่งได้แก่ สาร nitric oxide (endothelium derived relaxing factor), endothelin-1, prostaglandin เป็นต้น nitric oxide เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ป้องกันการเกาะติดของเกร็ดเลือด เป็นต้น ขณะที่ endothelin-1 มีฤทธิ์ในการทำให้หลอดเลือดหดตัว ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเสียสมดุลของ mediator ต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์ ที่พบในภาวะเบาหวานคือ มีการสร้างและหลั่ง nitric oxide ลดลง รวมทั้งการทำงานของ nitric oxide ผิดปกติไป ปัจจัยที่ใช้บ่งชี้ว่าเกิด endothelial dysfunction ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ 1) การเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators 2) มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมมากขึ้นผิดปกติ (9-10)

ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของการเกิด endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวานที่สำคัญ คือ การมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระในร่างกาย การที่ระดับน้ำตาลสูงในเลือดจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงและเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายกระบวนการ อันได้แก่ การเกิด glucose autooxidation จากกระบวนการทาง polyol pathway (11), และ protein glycation (12) เป็นต้น นอกเหนือจากนั้นความผิดปกติใน metabolism ของไขมัน (dyslipidemia) (13) จากภาวะเบาหวานก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้

กระบวนการเพิ่มอนุมูลอิสระในภาวะเบาหวาน

1. Polyol pathway

มีเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด ในกระบวนการทาง Polyol ได้แก่ aldose reductase, และ sorbital dehydrogenase ในภาวะเบาหวาน น้ำตาลในเลือดที่สูง คือ glucose glucose ที่สูงขึ้นจะถูกเปลี่ยนให้เป็น sorbital โดยเอนไซม์ aldose reductase (14) และเปลี่ยนต่อไปเป็น fructose โดย sorbital dehydrogenase การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องอาศัยอินซูลินในการนำ glucose เข้าเซลล์ ได้แก่ เลนซ์ เอนโดทีเลียมเซลล์ ในภาวะที่ระดับน้ำตาลสูงในเลือดจะมีผลเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระโดยผ่านทางการทำงานของเอนไซม์ aldose reductase มีการตั้งสมมติฐานกับการเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ อันเนื่องมาจากระดับน้ำตาลในเลือดสูง โดยเชื่อว่าเป็นผลมาจากการการทำงานของ aldose reductase เพิ่มขึ้น เนื่องจากการทำงานของ aldose reductase จะอาศัย NADPH (nicotine-adenine dinucleotide phosphate) เป็น co-factor ในขณะเดียวกันกระบวนการผลิต reduced glutathione (GSH) (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่ง) และการผลิต nitric oxide จาก L-

arginine จำเป็นต้องใช้ NADPH เป็น co-factor เช่นกัน (15) ดังนั้นในภาวะ เบาหวานที่มีระดับน้ำตาลสูงในเลือดจะมีระดับ NADPH ลดต่ำลง รวมทั้ง ระดับ GSH และ nitric oxide จะมีปริมาณลดลงไปด้วยในที่สุดระดับอนุมูลอิสระจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเนื่องจากเสียสมดุลระหว่าง ระบบต้านอนุมูลอิสระและปริมาณอนุมูลอิสระ

มีการศึกษาที่ยืนยันสมมติฐานดังกล่าวซึ่งทำการศึกษาในหลอดทดลอง โดยนำเอนโดทีเลียมเซลล์ เลี้ยงไว้ใน media ที่มีปริมาณน้ำตาลสูง (33 mmol/l) จะพบว่าปริมาณ NADPH ลดลงถึง 42% จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า การเพิ่มการทำงานของ aldose reductase ในกระบวนการทาง polyol ในภาวะเบาหวานเป็นสาเหตุหนึ่งของการเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ และทำให้เอนโดทีเลียมเซลล์ทำงานผิดปกติไป

2. Non-enzymatic glycosylation

ปริมาณน้ำตาลที่สูงเกินในภาวะเบาหวานจะทำให้เกิดปฏิกิริยา non-enzymatic glycosylation โดยจับกับโปรตีน เกิดเป็น Schiff base และ Amadori product ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์ 2 ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible product) แต่ในที่สุดถ้าระดับน้ำตาลในเลือดยังคงสูงอยู่ จะกลายเป็น advanced glycosylation product (AGE) ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนกลับได้ (irreversible product) AGE จะสะสมอยู่ในหลอดเลือด ทำให้ basement membrane ของหลอดเลือดหนาตัวขึ้น เมื่อ AGE เข้าสู่กระแสเลือดจะทำให้การทำงานของเอนโดทีเลียมเปลี่ยนแปลงไป ถ้า AGE ไปรวมตัวกับ macrophages จะเป็นผลให้มีปฏิกิริยาตอบสนอง โดยมีการหลั่งสารหลายชนิด เช่น tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้มีการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด ยิ่งไปกว่านั้นจะมีตัวรับ (receptor) ของ AGE ซึ่งอยู่บนเม็ดเลือดขาว macrophages, endothelial cells และ mesangial เซลล์ของไต (16-17) เมื่อ AGE จับกับตัวรับบนเอนโดทีเลียมเซลล์จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะย้อนมาทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมเซลล์อีกครั้ง

การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวาน พบว่า AGE จากภาวะน้ำตาลสูงในเลือดจะทำให้ การทำงานหรือฤทธิ์ของ nitric oxide รวมทั้งปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

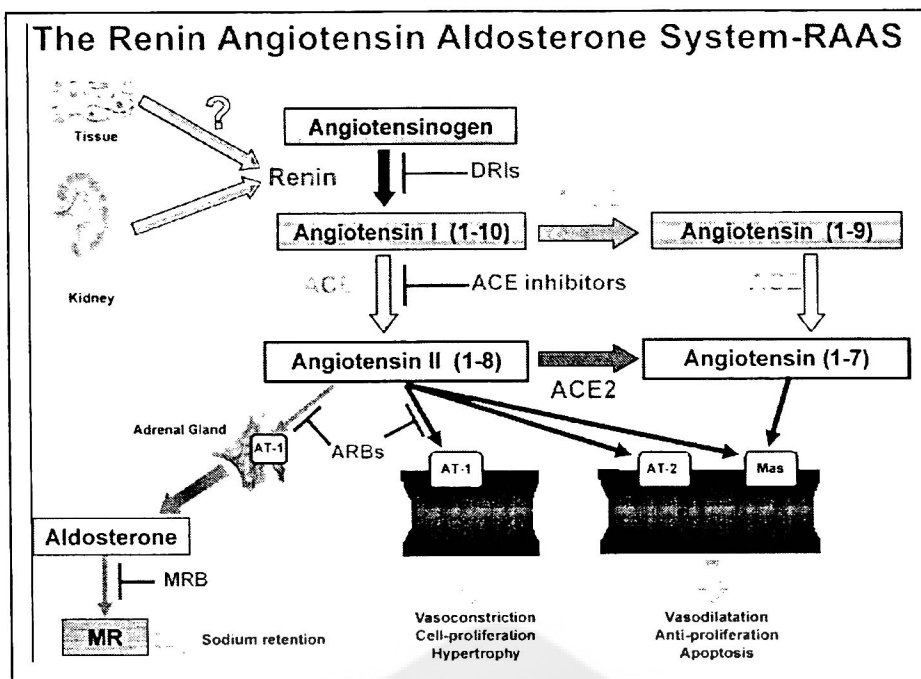
3. Dyslipidemia in diabetes

แม้ว่าระดับน้ำตาลสูงในเลือดจะเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการก่อให้เกิด endothelial dysfunction แต่ในเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ดีพอพบว่าจะมีความผิดปกติใน metabolism ของไขมันเกิดขึ้น ซึ่งได้แก่การมีระดับ cholesterol และ triglyceride สูงในเลือด และระดับ high density lipoprotein (HDL) จะต่ำลง เป็นที่ทราบกันดีว่า cholesterol ในพลาสมา ร้อยละ 60-70 จะถูกขนส่งโดย low-density lipoprotein (LDL) เมื่อระดับ cholesterol ในเลือดสูงขึ้น ก็จะมีปริมาณ LDL-cholesterol สูงขึ้นตามไปด้วย LDL-cholesterol จะถูก modified ไปในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน โอกาสที่ LDL จะเกิด oxidation ได้เป็น oxidized LDL (OxLDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการศึกษามากมายที่พบว่าในผู้ป่วยหรือ

สัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานจะมีระดับ OxLDL สูง และ OxLDL จะมีผลไปทำลายเอนโดทีเลียมเซลล์ด้วย ในขณะที่เกิด oxidation ของ LDL จะเกิด superoxide anion (O_2^-) ออกมาด้วย (18) ซึ่ง O_2^- จะมีผลไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมได้ Hein K และคณะ (19) ได้แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่มีระดับคลอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะเป็นดัชนีบ่งชี้การมี LDL-cholesterol สะสมในผนังหลอดเลือดและมีผลทำให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในภาวะเบาหวานนั้น ทั้งระดับน้ำตาลที่สูงอยู่เป็นระยะเวลานาน ร่วมกับปริมาณไขมันทั้งคลอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ที่สูงขึ้นในเลือด จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทั้งด้านโครงสร้างและการทำงาน

Renin-angiotensin system (RAS)

ระบบ RAS มีส่วนสำคัญต่อร่างกายโดยการออกฤทธิ์ endocrine, paracrine, autocrine ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกายในภาวะปกติรวมถึงการปรับเปลี่ยนการทำงานของร่างกายในขณะที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้น RAS ทำหน้าที่ควบคุมความดันโลหิต ควบคุมสมดุลน้ำ แลเกลือแร่ในร่างกาย กระตุ้นการเจริญและremodeling ของเนื้อเยื่อโดยเฉพาะที่ไต หัวใจและหลอดเลือด (20) RAS ประกอบด้วย 1) สารตั้งต้น angiotensinogen 2) เอนไซม์ rennin ทำหน้าที่ย่อย angiotensinogen ให้เป็น angiotensin I (A I) 3) angiotensin converting enzyme เปลี่ยน A I ให้เป็น angiotensin II (A II) , A II เป็นสารหลักที่ออกฤทธิ์ ทั้งในภาวะปกติ และเมื่อเกิดพยาธิสภาพโดยการจับกับreceptor ซึ่งมี 2 ชนิด ; angiotensin II type 1-receptor (AT1-R) และ angiotensin II type 2-receptor (AT2-R) (21)



รูปที่ 1 แสดงกลไกการสร้าง angiotensin

ACE: angiotensin converting enzyme, ACE2: angiotensin converting enzyme-2, ARBs: angiotensin receptor blockers. AT-1, angiotensin receptor type-1, AT-2, angiotensin receptor type-2, AT-4, angiotensin (3–8) receptor type-4, MR: mineralocorticoid receptor, MRB: mineralocorticoid receptor blockers. Modified from Staessen et al. [21]

เป็นที่ทราบว่แต่ละอวัยวะของร่างกายสามารถสร้าง A II ขึ้นได้เอง เช่น vascular endothelial cells สมอง ต่อมหมวกไต ไต และหัวใจ A II มีบทบาทสำคัญในการเป็นตัวก่อให้เกิดพยาธิสภาพของอวัยวะสำคัญ เช่น หัวใจ สมอง ไต และตา โดยเฉพาะในภาวะเบาหวานจะทำให้เกิดภาวะหัวใจโต ความดันโลหิตสูง แรงภาวะเสื่อมของไต เป็นต้น การออกฤทธิ์ของ A II ต้องอาศัยการจับที่ AT receptor ดังได้กล่าวแล้วว่า มี 2 ชนิด AT1-R และ AT2-R อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานของร่างกายส่วนใหญ่จะผ่านทาง AT1-R

นอกจากมีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดหดตัวแล้ว A II ยังมีฤทธิ์ทำให้เกิด 1) การหนาตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ และกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (myocyte and vascular smooth muscle cell hypertrophy) (22) โดยออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นการหลั่ง growth factor เช่น TGF- β 1, และ IGF 2) มีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการอักเสบผ่านการแสดงออกของ IL-6, TNF- α , และ adhesion molecules เช่น ICAM-1, VCAM เป็นต้น (23) 3) ฤทธิ์เพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ เช่น superoxide ผ่านทาง NADH/NADPH oxidase (24) 4) มีฤทธิ์ส่งเสริมการเกิด thrombosis โดยออกฤทธิ์ผ่านการเพิ่ม plasminogen activator inhibitor 1 และเพิ่มการเกาะติดของเกล็ดเลือดบนผนังหลอดเลือด (25)

โรคเบาหวานและ Renin angiotensin system

ดังได้กล่าวไว้แล้วว่าโรคเบาหวานมีผลกระทบต่อการทำงานของหลอดเลือดทั้งหลอดเลือดขนาดเล็กและหลอดเลือดขนาดใหญ่อันนำไปสู่ความบกพร่องในการทำงานของอวัยวะต่างๆเมื่อเป็นเบาหวานนานขึ้น ปัจจัยหนึ่งที่เป็นสาเหตุของความผิดปกติในการทำงานของอวัยวะต่างๆในภาวะเบาหวานได้แก่การทำงานของระบบ RAS มีการทำงานเพิ่มมากขึ้น เป็นสาเหตุให้มีความดันโลหิตสูงในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานเรื้อรัง เป็นโรคหัวใจและหลอดเลือดโดยเฉพาะหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจตีบตัน เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยา angiotensin II type1-receptor bloker (ARB) มาใช้ในการป้องกันความดันโลหิตสูง หรือปรับให้ความดันโลหิตที่สูงอยู่ให้ลงมาใกล้เคียงปกติ ARB ยับยั้ง biological effects ของ angiotensin II ทั้งในหลอดเลือดและในสัตว์ทดลอง Miller และคณะ ทำการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 พบว่า ARB สามารถทำให้ mean arterial pressure ที่สูงกว่าปกติในหมู่เบาหวานมีค่าลดลงหลังได้รับการรักษาด้วย ARB (26) จากฤทธิ์ของ A II ต่อการกระตุ้นและควบคุมการเจริญเติบโตของ vascular smooth muscle cell นำไปสู่การก่อให้เกิดโรค diabetic retinopathy การทำงานของ RAS ในตามีบทบาทต่อการเกิด proliferative diabetic retinopathy โดย A II มีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ (neovascularization) แต่หลอดเลือดที่เกิดใหม่นี้เป็นหลอดเลือดที่เปราะแตกง่าย และไม่สามารถทำงานได้ตามปกติเมื่อให้การรักษาด้วย ARB พบว่า สามารถชะลอการเกิด diabetic retinopathy ได้(27)

จากการทบทวนงานวิจัยต่างๆจึงเป็นจุดสนใจให้คณะผู้วิจัยทำการศึกษาฤทธิ์ของ ARB ทางด้านการป้องกันหรือช่วยลดความบกพร่องในการทำงานของหลอดเลือดขนาดเล็กในสมองของหนูขาวที่ถูกทำให้เป็นเบาหวาน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ขั้นตอนและวิธีการเก็บข้อมูล

1. การวิจัยครั้งนี้ใช้หนูขาว (Wistar Furth) เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตำบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำมาเลี้ยงรวมกัน 3 ตัวต่อกรง ในอุณหภูมิห้อง 20 ± 2 องศาเซลเซียส และแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ โดยแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

A) กลุ่มควบคุม ได้แก่หนู ที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือปกติ (0.9% normal saline solution) เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง (CON-rats)

B) กลุ่มเบาหวาน ได้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ด้วยการฉีดสาร streptozotocin (STZ) ขนาด 55 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำ ที่หาง (STZ-rats) กลุ่มนี้ให้ดื่มน้ำธรรมดาทุกวันจนถึงวันที่ทำการทดลอง

C) กลุ่มเบาหวานและได้รับการเสริมด้วยสาร Losartan (angiotensin II type1-R blocker (ARB)) หนูกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสาร STZ เช่นเดียวกับ STZ-rats และได้รับการเสริมด้วย losartan ขนาด 2.5 มก ต่อ กก น้ำหนักตัว ผสมน้ำโดยป้อนให้กินทางปากทุกวัน จนถึงวันที่ทำการทดลอง (STZ-losartan- rats) ได้แก่ 8 สัปดาห์หลังฉีด STZ

2 การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวานและเกณฑ์ตัดสินภาวะเบาหวาน

โดยการฉีดสาร streptozotocin (สารนี้จะไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน) ขนาด 55 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง หลังจากอดอาหารแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดสาร streptozotocin แล้ว 72 ชั่วโมง ทำการตรวจหาระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูทดลองทุกกลุ่มและทุกตัว โดยใช้เครื่องวัด Glucometer (Advantage, Boehringer Mannheim, Germany) สัตว์ทดลองที่มีระดับน้ำตาลในกระแสเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ร่วมกับมีอาการกินน้ำมาก กินอาหารจุ บัสสาวะบ่อย น้ำหนักไม่เพิ่มขึ้น (หรือลดลง) จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวาน

หนูทั้ง 3 กลุ่ม จะถูกนำมาศึกษาหาอัตราการใช้กลูโคสของสมองและศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม ที่ 8 สัปดาห์ หลังการฉีดน้ำเกลือปกติและการฉีด STZ และหลังจากป้อนสาร ARB ไปแล้ว 8 สัปดาห์

3. การผ่าตัดและการบันทึกภาพ intravital fluorescent microscopy ของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมอง (cerebral microvessels)

ในวันทำการทดลองสลบหนูด้วยการฉีดเพนโทบาร์บิทัล (sodium pentobarbital) ขนาด 50 mg/kg bw เข้าทางช่องท้อง อาจเสริมขนาดของยาสลบในขณะที่ทำการทดลองเพื่อคงไว้ในภาวะสลบ ตรวจระดับน้ำตาลในเลือดจากหลอดเลือดดำที่หาง โดยเครื่อง Glucometer

ทำการเจาะคอและสอดท่อเข้าทางหลอดลม ต่อเข้ากับเครื่องช่วยหายใจชนิด small animal respirator (Harvard apparatus rodent respirator 681)

สอดท่อ polyethylene (PE10) เข้าหลอดเลือดแดง femoral ข้างขวา หล่อด้วยสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและต่อท่อเข้ากับ pressure transducer (Nihon TP 300 -T) ของเครื่อง polygraph (Nihon RM600) สำหรับบันทึกความดันเลือดแดง (arterial pressure) และสำหรับดูดเลือด นำไปวิเคราะห์ค่า arterial blood gas เพื่อปรับและควบคุมความดัน O_2 ในเลือดแดง (PaO_2) ให้มีระดับอยู่ระหว่าง 100-120 mmHg และค่าความดัน CO_2 ในเลือดแดง ($PaCO_2$) ที่ 35-45 mmHg ตลอดการทดลอง (โดยการปรับอัตราการหายใจ, tidal volume และปริมาณ O_2 จากเครื่องช่วยหายใจ)

สอดท่อ polyethylene (PE10) เข้าหลอดเลือดดำ femoral ข้างขวาเช่นกัน สำหรับเป็นทางให้ยาและสารต่าง ๆ ควบคุมอุณหภูมิของร่างกายหนู ประมาณ $37^{\circ}C$ โดยการให้หนูนอนบน heating mat จากนั้นทำการผ่าและเลาะกระดูกศีรษะ (craniotomy) บริเวณ anterior surface ของกระดูกศีรษะ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 mm. บริเวณที่ใช้ electrical drill เลื่อยเอากระดูกศีรษะออก ต้องหยดน้ำเกลือเป็นระยะ ๆ ตลอดการเลื่อยเพื่อป้องกันอันตรายจากความร้อนของการเลื่อย ต่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดของสมอง เมื่อกระดูกศีรษะส่วน anterior surface ถูกเลื่อยและดึงออก จะทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura โดยใช้ forcep ปลายแหลมดึงและเข็มขนาดเล็กเบอร์ 27 ตัดเยื่อ dura ออกให้หมด หล่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดสมองส่วนผิว (pial cerebral vessels) ด้วยน้ำสมองเทียม (artificial cerebro spinal fluid; Artificial CSF) ตลอดเวลาที่ทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura จากนั้นครอบ cranial window ซึ่งทำด้วยวงแหวน stainless ปิดด้วยกระจกบางพิเศษ เหนือบริเวณที่เจาะกระดูกศีรษะและยึดติดด้วย temporary cement (Ker-Temp-Bound) ผสมกับ Acryl dental รोजनแห้ง จากนั้น infuse artificial CSF เข้าไปภายในบริเวณที่ครอบด้วย cranial window ซึ่งมีรูเปิด 3 รู เพื่อ infused Artificial CSF และ สารต่าง ๆ เข้าไป และเปิดให้สารต่าง ๆ ไหลออกสู่ภายนอกสมอง โดยใช้ peristaltic pump pump ให้สารเข้าสู่เนื้อเยื่อสมอง ด้วยอัตราการไหลของสารละลาย 1.5 ml/min หลังจากเตรียมหนูเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมอง (pial cerebral microvessels) แล้วให้นำหนูขึ้นวางบนแท่นของกล้อง fluorescent microscope ใช้เลนส์วัตถุขนาด X20 ที่ต่อเข้ากับกล้องวิดีโอชนิด SIT (Hamamatsu Photonics) สัญญาณจากกล้องวิดีโอต่อเข้ากับ video printer (Sony) เพื่อพิมพ์ภาพที่ต้องการในขณะที่ทำการทดลองและต่อเข้ากับ video recorder (Sony) เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ cerebral microcirculation ตลอดเวลาที่ทำการทดลองและสุดท้ายภาพการไหลเวียนของเลือด การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของหลอดเลือดในขณะที่ทำการทดลองจะปรากฏบน video monitor (real time)

4. การศึกษาตามวัตถุประสงค์

4.1 ศึกษาผลของ สาร ARB ต่อความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือดขนาดเล็กในสมองของหนูที่มีภาวะ เบาหวาน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ขั้นตอนที่ 1 วัดอัตราการไหลเวียนเลือดในเนื้อเยื่อสมองโดยใช้เครื่อง laser Doppler flowmeter ก่อนและเยื่อหุ้ม dura ออก วัดอัตราการไหลเวียนเลือดบริเวณเนื้อเยื่อสมองที่ทำการเจาะกะโหลกออก วัด 4 ตำแหน่ง นำมาหาค่าเฉลี่ย

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมเซลล์ของผนังหลอดเลือดดำ postcapillary (ตามวัตถุประสงค์ข้อที่ 1.1) โดยการฉีดสาร Rhodamine 6-G (R 6-G Sigma) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่เข้าไป labeled ที่เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวที่ถูก labeled จะมีคุณสมบัติในการเรืองแสงเมื่อถูกผ่านกล้อง fluorescent ถ้ามีการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนผนังหลอดเลือด จะเห็นได้อย่างชัดเจน บันทึกการเปลี่ยนแปลงลงใน video tape ทั้งก่อนและหลังฉีด R 6-G เป็นเวลา 20 นาที ความเข้มข้นของ RGG คือ 0.03 gm ผสมใน 0.9% normal saline solution 100 ml ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ femoral 0.2-0.3 ml ครั้งเดียว

ขั้นตอนที่ 3 บันทึกการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดแดง arterioles ต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilator และ endothelium independent vasodilator 5 นาทีหลังจากที่บันทึกภาพการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดแดง จะทำการศึกษการตอบสนองของหลอดเลือดแดง arteriole ขนาด 20-30 μm

1) infused สาร acetylcholine (ACh) 10^{-6} M (เป็นสารชนิด endothelium dependent vasodilator) เข้าไปในสมองที่ครอบด้วย cranial window โดยใช้ peristaltic pump เป็นเวลา 5 นาที ล้าง ACh ออกด้วย artificial CSF เป็นเวลา 5 นาที บันทึกภาพการเปลี่ยนแปลงขนาดของหลอดเลือดตลอดการทดลอง

2) ศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดแดง arteriole ต่อสาร nitroglycerine (NTG; 10^{-6} M) (เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวชนิด endothelium independent vasodilator)

ขั้นตอนในการบันทึกภาพและการล้างสาร NTG ออก ทำเช่นเดียวกับข้อ 1 การศึกษการตอบสนองของหลอดเลือดเริ่มจาก สาร ACh ตามด้วย NTG

ขั้นตอนที่ 4

4.1 การศึกษาการเกิด Lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมอง เป็นการตรวจวัดระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex (malondialdehyde เป็นผลิตภัณฑ์จากการเกิด lipid peroxidation) โดยใช้วิธีการวัด thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในการศึกษาครั้งนี้วัดโดยใช้ TBARS assay kit (Cayman chemical com)

4.2 ศึกษาผลของ ARB ต่อการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทั้งทางด้าน metabolic ของหนูเบาหวาน
เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ปัจจัยทางด้าน metabolic ที่ศึกษาได้แก่

: blood glucose

: plasma cholesterol, triglyceride

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำเสนอเป็นค่า mean $\pm$ standard error of mean (SEM)

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบ โดยใช้ one-way ANOVA และตามด้วย Tukey's analysis

โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็น (P value) ที่ $P \leq 0.05$



บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ของสาร Losartan ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม Angiotensin II type I receptor ต่อการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน แบ่ง การศึกษา ออกเป็น 2 ส่วนได้แก่

1. ศึกษาผลของสาร Losartan ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง metabolic และ hemodynamics
 - 1.1 พารามิเตอร์การเปลี่ยนแปลงทาง metabolics คือ blood glucose, plasma cholesterol, plasma triglyceride, plasma HbA1C และน้ำหนักตัว
 - 1.2 พารามิเตอร์การเปลี่ยนแปลงทาง hemodynamics ได้แก่ regional cerebral blood flow
2. ศึกษาฤทธิ์ของสาร Losartan ต่อการทำงานของเอนโดทีเลียม
 - 2.1 ศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary venule
 - 2.2 ศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดแดงเล็กที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilators
3. ศึกษาฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระของสาร Losartan

การเปลี่ยนแปลงทาง Metabolic

หลังจากที่หนูได้รับการฉีด STZ ไปแล้ว 48 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ≥ 300 mg/dL และมีอาการแสดงร่วมคือกินน้ำมาก (polydipsia) กินอาหารมาก (polyphagia) และปัสสาวะมาก (polyuria) และมีน้ำหนักลดลง โดยระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงขึ้นและอาการแสดงดังกล่าวจะคงอยู่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง หลังจากหนูทดลองได้รับการฉีด streptozotocin (SZT) แล้ว 8 สัปดาห์ ระดับไกลโคไซด์เออีโมโกลบิน(HbA1C) ในเลือดซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน มีค่าที่สูงในหนูกลุ่มเบาหวานเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม การเปลี่ยนแปลงระดับ blood glucose (BG) ในหนูเบาหวานที่ได้รับ Losartan เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ระดับBG ลดลงเป็นลำดับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ถึง สัปดาห์ที่ 8 คิดร้อยละของระดับ BG ที่ลดลงเป็น 15 % ขณะที่ในกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับการป้อนด้วย Losartan จะมีระดับ BG สูงคงที่ตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ หลังจากได้รับการฉีด streptozotocin โดยค่า HbA1C สามารถยืนยันได้ถึงการมีระดับน้ำตาลที่ลดลงในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับLosartan ดังแสดงในตารางที่ 2 สำหรับระดับ cholesterol และtriglycerideในเลือดของหนูเบาหวานมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูควบคุม ในหนู

เบาหวานที่ได้รับ Losartan ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับ cholesterol และ triglyceride ในเลือดเมื่อเทียบกับหนูเบาหวาน ดังแสดงในตาราง 4-5

การเปลี่ยนแปลงทาง Hemodynamics

หนูกลุ่มเบาหวานมีค่าเฉลี่ยอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง (regional cerebral blood flow; rCBF) ต่ำกว่าในหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและที่น้ำหนักยังได้แก่การให้ Losartan ในหนูเบาหวานสามารถป้องกันการลดลงของ อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองได้ (rCBF ; control-rat = 219.35 ± 3.66 , STZ-rat = 184.25 ± 3.98 , STZ-Losartan rat = 231.16 ± 3.91)

ผลของ Losartan ต่อการทำงานของเอนโดทีเลียม

ดัชนีบ่งชี้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมได้แก่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาว และการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation

1.ศึกษาผลของ Losartan ต่อการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion; LA) บนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง $20-40 \mu\text{m}$ การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวในกลุ่มเบาหวานมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุม และในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับ Losartan พบว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับ Losartan (LA ; control-rat = 0.53 ± 0.19 , STZ-rat = 4.40 ± 0.23 , STZ- Losartan rat = 1.47 ± 0.16)

2.การตอบสนองของหลอดเลือดที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation สารที่ใช้เป็น endothelium dependent ในการศึกษาค้นคว้านี้ได้แก่ acetylcholine (ACh) ขนาดความเข้มข้น 10^{-6} M จากผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือดแดง arterioles (เส้นผ่าศูนย์กลาง $20-50 \mu\text{m}$) ในหนูเบาหวานมีการขยายตัวเมื่อได้รับสาร ACh น้อยกว่าหนูควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 2 ช่วงอายุแสดงว่ามีความบกพร่องในการขยายตัวเมื่อได้รับสาร endothelium dependent และในกลุ่มที่ได้รับ Losartan พบว่าสามารถลดความบกพร่องในการขยายตัวเมื่อได้รับสาร endothelium dependent ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่เป็น endothelium independent (nitroglycerine; NTG) พบว่าไม่มีความแตกต่างในการตอบสนองต่อสาร NTG ในหนูทุกกลุ่ม

จากการศึกษาในส่วนการทดสอบการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม พบว่าหนูเบาหวานมีความผิดปกติอยู่ที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียมและการให้ Losartan เป็นระยะเวลานานสามารถป้องกันและลดความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ระดับ lipid peroxidation

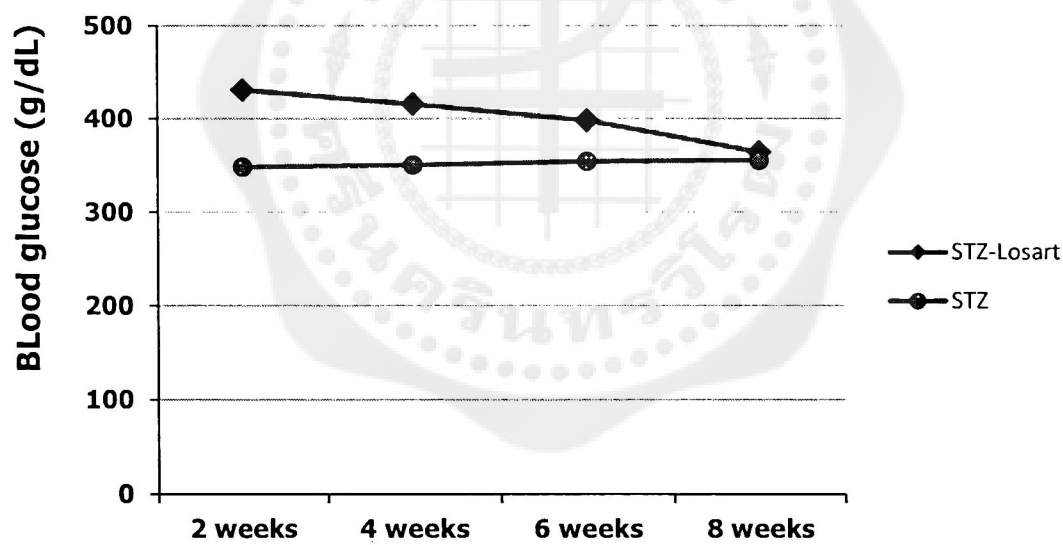
หนูที่เป็นเบาหวานพบระดับ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex มีระดับที่สูงกว่าในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการบำบัดด้วย Losartan จะมีระดับ malondialdehyde ลดต่ำลงเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับ Losartan ตาราง 10

ตาราง1. ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว ของหนูกลุ่มปกติ หนู เบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวานที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) บำบัดทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Percent change of body weight from base line (%)		
Control	STZ	STZ-Losartan
104.59±8.47	-2.00±4.18	3.69±1.56

ตาราง 2. การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษา ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

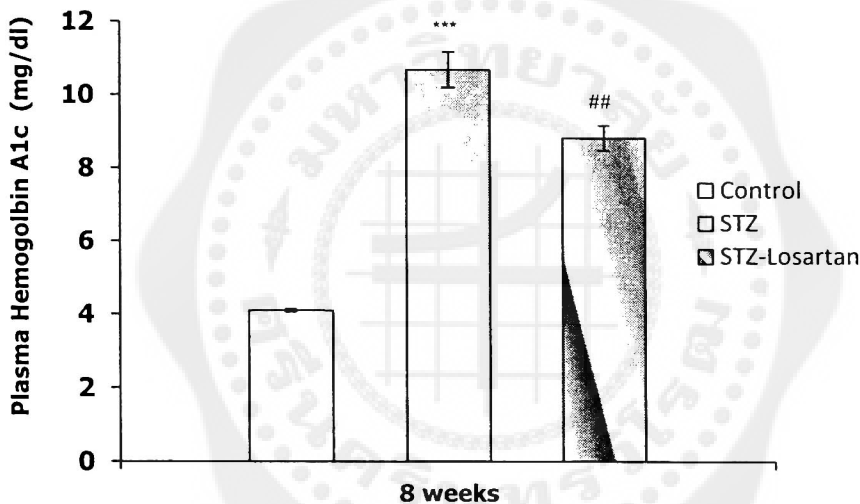
	สัปดาห์ที่ 2 หลัง ป้อน Losartan	สัปดาห์ที่ 4 หลัง ป้อน Losartan	สัปดาห์ที่ 6 หลัง ป้อน Losartan	สัปดาห์ที่ 8 หลังป้อน Losartan
Blood glucose	430.71	415.57	397.86	363.86
	สัปดาห์ที่ 2 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 4 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 6 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 8 หลังฉีด STZ
Blood glucose	348.14	350.14	354.00	355.00



ตาราง 3. ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Plasma hemoglobin A1C (mg/dL)		
Control	STZ	STZ-Losartan
4.10±0.44	10.68±0.49 ^{***}	8.81±0.34 ^{##}

รูป 2. ระดับฮีโมโกลบินเอวันซีในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

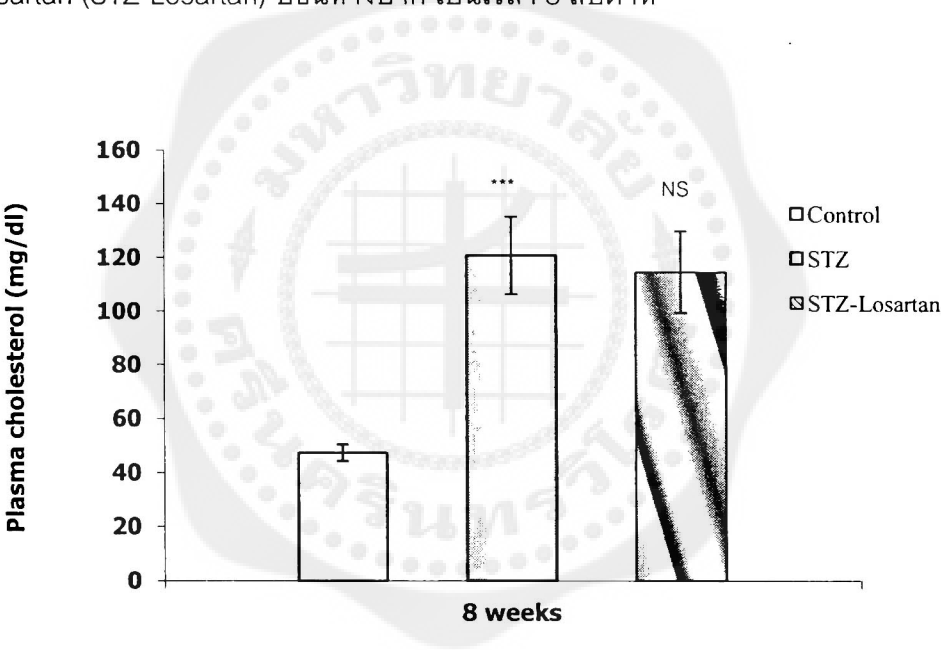
*** p< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

p< 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 4. ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Plasma cholesterol (mg/dL)		
Control	STZ	STZ-Losartan
47.33±3.09	120.70±14.42 ^{***}	114.57±15.14 ^{NS}

รูป 3. ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

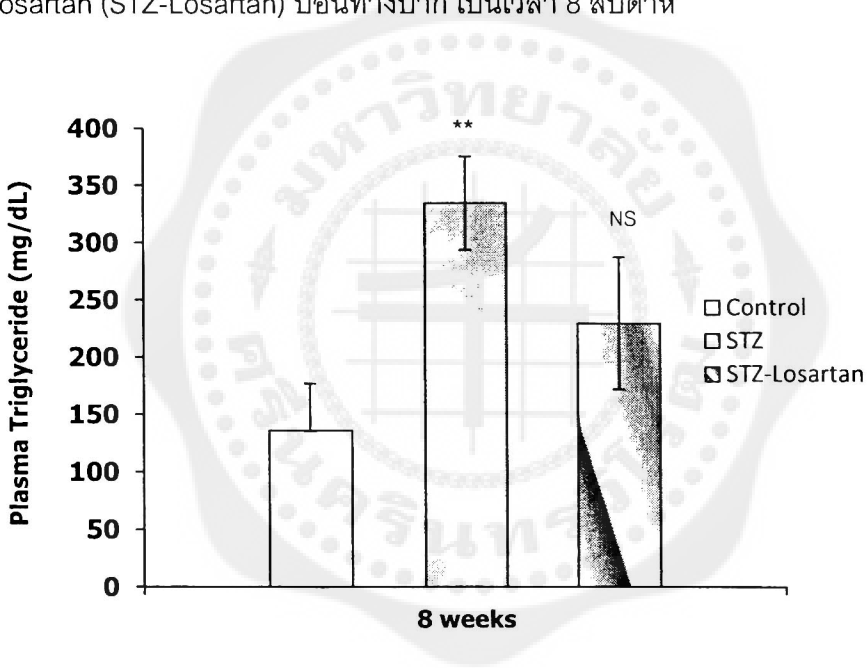
*** p< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

NS ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 5. ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Plasma triglyceride (mg/dL)		
Control	STZ	STZ-Losartan
136.0±7.90	334.50±40.77 ^{**}	299.43±57.86 ^{NS}

รูป 4. ระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

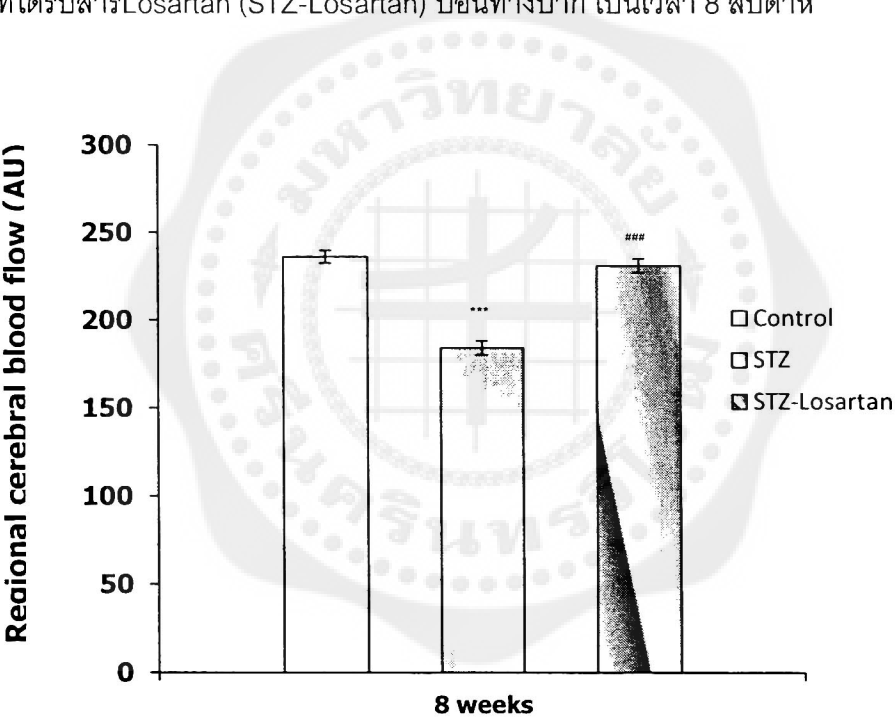
*** p< 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

NS ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 6. ค่าเฉลี่ยอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Regional cerebral blood flow (arbitrary unit)		
Control	STZ	STZ-Losartan
236.12±3.66	184.25±3.98 ***	231.16±3.91 ####

รูป 5. ค่าเฉลี่ยอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losa

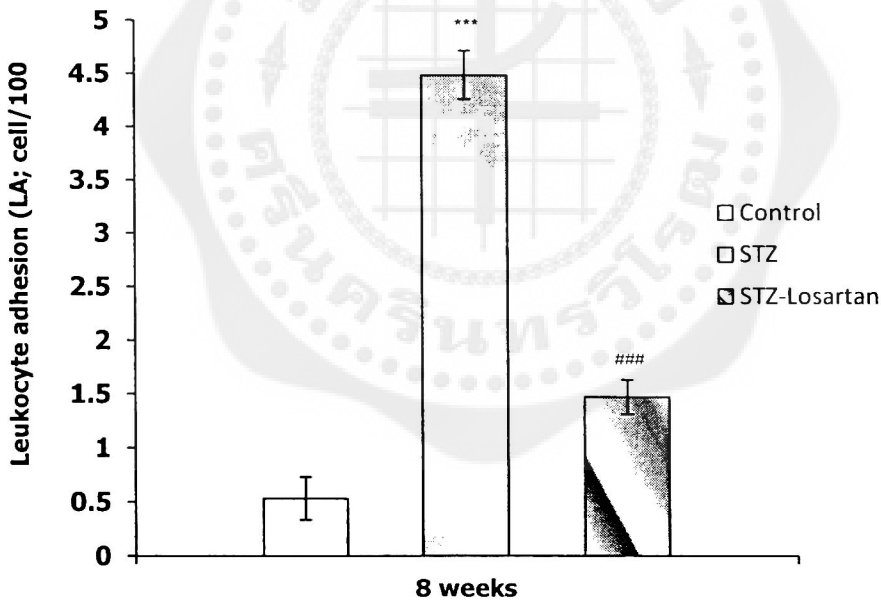
*** p< 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

p< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 7. จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-40 μm) ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Leukocyte adhesion (cell/100 μm)		
Control	STZ	STZ-Losartan
236.12 $\pm$ 3.66	184.25 $\pm$ 3.98 ***	231.16 $\pm$ 3.91 ###

รูป 6. จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25-40 μm) ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

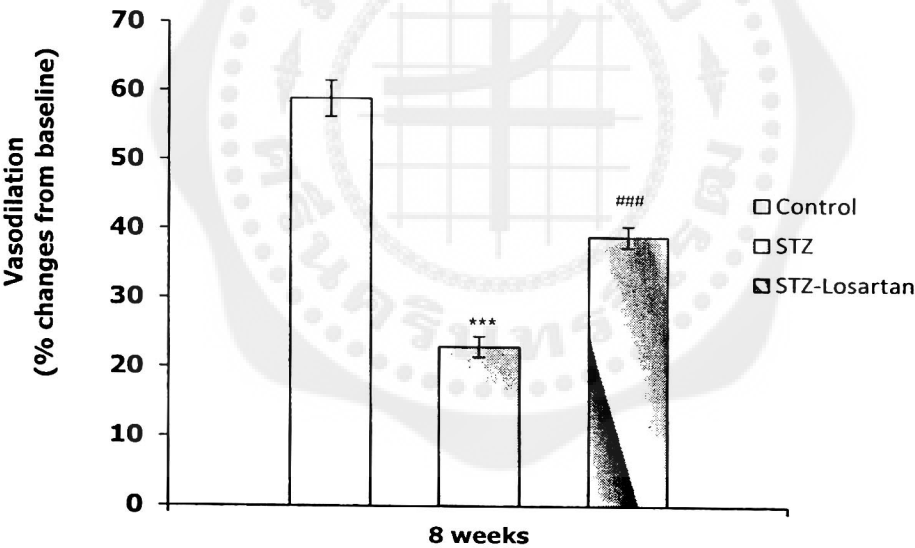
*** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 8. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสาร Losartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Vasodilation (% changes from baseline)		
Control	STZ	STZ-Losartan
236.12±3.66	184.25±3.98 ***	231.16±3.91 ###

รูป 7. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

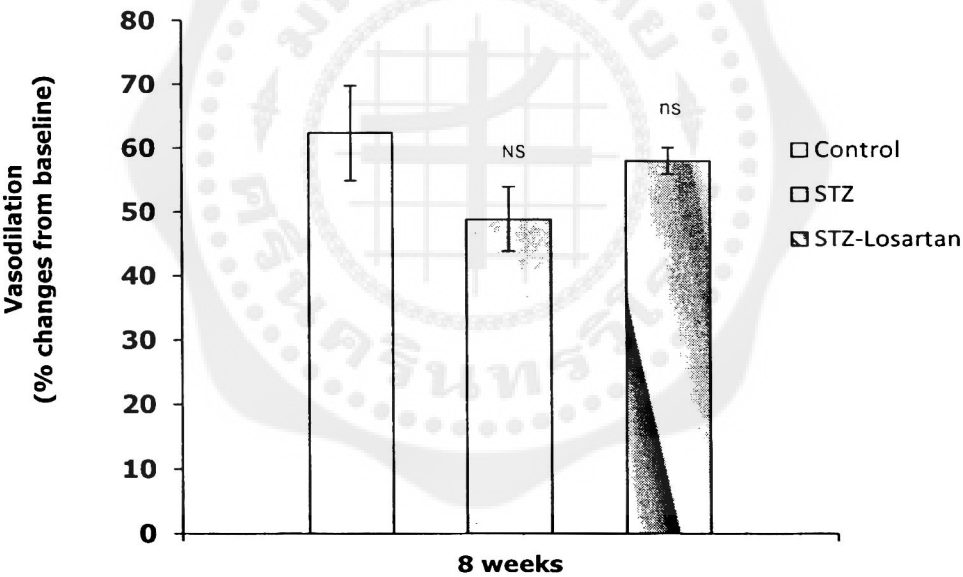
*** p< 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

p< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 9. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerine 10^{-5} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสาร Losartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Vasodilation (% changes from baseline)		
Control	STZ	STZ-Losartan
62.34 $\pm$ 7.44	48.88 $\pm$ 5.08 ^{NS}	57.98 $\pm$ 2.07 ^{ns}

รูป 8. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerine 10^{-5} Mol/L ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SD

Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน

STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan

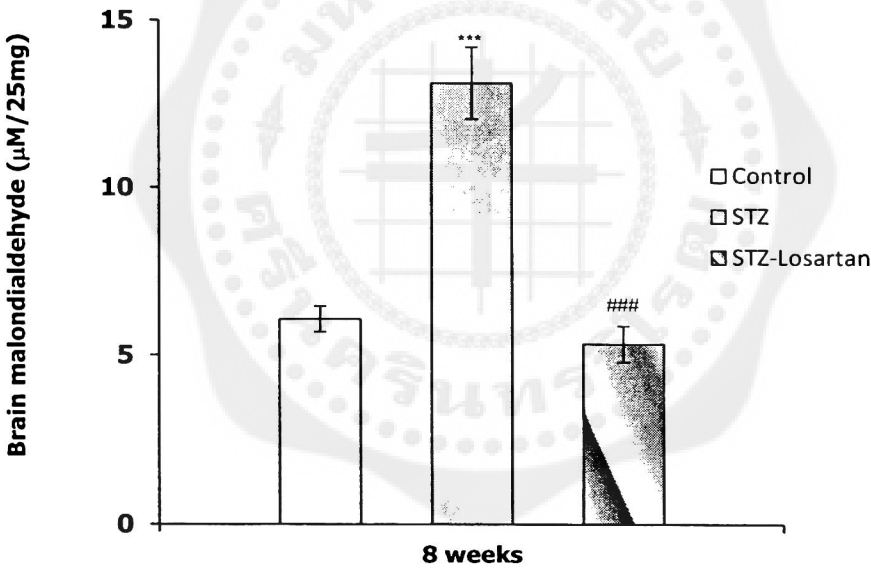
ns ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติ

NS ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวาน

ตาราง 10. ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Malondialdehyde (μM/25 mg brain tissue)		
Control	STZ	STZ-Losartan
6.07±0.39	13.11±1.07 ***	5.33±0.54 ###

รูป 9. ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูปกติ (CONTROL) หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับสารLosartan (STZ-Losartan) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าที่แสดงในตารางและรูปภาพแสดงเป็นค่า mean ± SD
Control หนูปกติ STZ หนูเบาหวาน
STZ-Losartan หนูเบาหวานที่ได้รับสาร Losartan
*** p< 0.001เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ, ### p< 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษานี้ได้ผลการศึกษาลำคัญได้แก่การให้ Losartan ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง angiotensin II type1 receptor ป้อนทางปากเป็นระยะ 8 สัปดาห์ สามารถลดความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองของหนูที่เป็นเบาหวาน เป็นผลให้ลดการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม และทำให้เพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง นอกจากนั้นการศึกษานี้ในปัจจุบันยังแสดงให้เห็นว่าการยับยั้งการออกฤทธิ์ของ angiotensin II (A II) ในหนูเบาหวานจะไปลดระดับ blood glucose และสารอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมองด้วย

ผลของ Losartan ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง metabolic

การศึกษานี้ในปัจจุบันทำการศึกษานี้ในหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร streptozotocin (STZ) เข้าทางหลอดเลือดดำซึ่งสาร STZ จะไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้การผลิต insulin ลดลง เป็นผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งการใช้ model ของหนูเบาหวานโดยการฉีด STZ เป็นที่ยอมรับในระดับสากล (28) ผลการศึกษพบว่าหนูที่ได้รับ STZ มีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงเป็นระยะเวลานานโดยยืนยันได้จากระดับ glycosylated hemoglobin (HbA1C) ที่สูงขึ้นแสดงให้เห็นความรุนแรงของโรคที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เป็นเบาหวาน กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนสาร losartan เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงเป็นลำดับตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 8 หลังป้อนสาร ซึ่งการศึกษานี้ให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาโดย Murali B และคณะ (29) ซึ่งเชื่อว่า A II มีฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระดับน้ำตาลในเลือด จากการศึกษาของ Velloso LA และคณะ (1996) และ Folli F และคณะ (1997) ได้รายงานการศึกษาไว้ว่าการยับยั้ง angiotensin II receptor signaling โดยใช้ ACE-I และ angiotensin II receptor blocker จะมีผลไปเพิ่ม insulin signaling cascade โดยไปส่งเสริมการทำงานของ insulin receptor substrate 1 (IRS-1) และเพิ่มการทำงานของ phosphatidylinositol มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของ GLUT-4 ไปที่ cell membrane ทำให้สามารถนำ glucose เข้าเซลล์ได้มากขึ้น ดังนั้นในหนูเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานพบว่าจะมีการทำงานของระบบ rennin angiotensin เพิ่มมากขึ้น ระดับ A II ก็สูงขึ้นตาม (Velloso LA และคณะ (1996) และ Folli F และคณะ (1997)) ดังนั้นในหนูเบาหวานเมื่อได้รับ losartan จึงให้ผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยไปเพิ่ม insulin sensitivity แม้ว่าการศึกษานี้ในปัจจุบันทำการศึกษานี้ในหนูเบาหวานชนิดที่ 1 ที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร STZ เพื่อไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (30-31) แต่ขนาดของ STZ ที่ใช้ได้แก่ 55 mg/kg BW ฉีดเข้าหลอดเลือดดำนั้นพบว่าทำลายเซลล์ของตับอ่อนได้ประมาณร้อยละ 80-90 ยังคงมีเบต้าเซลล์ของตับอ่อนที่ไม่ถูกทำลายเหลืออยู่ (28) ซึ่งเมื่อได้รับสาร losartan ป้อนให้กินเป็นระยะเวลานานสามารถ

ฟื้นฟูสภาพของเบต้าเซลล์ที่ไม่ถูกทำลายโดยสาร STZ ให้สามารถหลั่งอินซูลินเพื่อนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ได้ ระดับน้ำตาลในเลือดในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับ losartan จึงลดลง

ผลของ Losartan ต่อการลดระดับสารอนุมูลอิสระ

ระดับน้ำตาลในเลือดสูงร่วมกับภาวะไขมันในเลือดสูง อันได้แก่ คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ ทั้ง 3 ปัจจัยนี้ เป็นตัวก่อให้เกิดระดับอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นมากในภาวะเบาหวาน โดยยืนยันได้จากผลการศึกษาในปัจจุบันที่พบว่าระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cortex ของหนูเบาหวานมีระดับสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการให้สาร losartan พบว่าระดับ malondialdehyde ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของ Losartan ต่อการป้องกันความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม

การศึกษาจำนวนมากทั้งในปัจจุบันและที่ผ่านมานำมาซึ่งข้อมูลความรู้ที่พอสรุปได้ถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด (vascular complication) ในภาวะเบาหวานได้แก่ ภาวะ hyperglycemia และ ภาวะ hyperlipidemia ปัจจัยทั้ง 2 มีบทบาทสำคัญทำให้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมสูญเสียหน้าที่ในการทำงานที่เรียกว่า endothelial dysfunction ปัจจัยที่ชี้แจงชี้ว่าเกิด endothelial dysfunction ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ 1. การเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators 2. มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมมากขึ้นผิดปกติ (9-11) ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของการเกิด endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวานที่สำคัญ คือ การมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระในร่างกาย การที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงและเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายกระบวนการ อันได้แก่ การเกิด glucose autooxidation จากกระบวนการทาง polyol pathway และ protein glycation เป็นต้น นอกเหนือจากนั้นความผิดปกติใน metabolism ของไขมัน (dyslipidemia) จากภาวะเบาหวานก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้

แม้ว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงกว่าปกติจะเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการก่อให้เกิด endothelial dysfunction แต่ในเบาหวานที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ดีพอพบว่าจะมีความผิดปกติใน metabolism ของไขมันเกิดขึ้น ซึ่งได้แก่การมีระดับ cholesterol และ triglyceride สูงในเลือด และระดับ high density lipoprotein (HDL) จะต่ำลง เป็นที่ทราบกันดีว่า cholesterol ในพลาสมา ร้อยละ 60-70 จะถูกขนส่งโดย low-density lipoprotein (LDL) เมื่อระดับ cholesterol ในเลือดสูงขึ้น ก็จะมีปริมาณ LDL-cholesterol สูงขึ้นตามไปด้วย LDL-cholesterol จะถูก modified ไปในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน โอกาสที่ LDL จะเกิด oxidation ได้เป็น oxidized LDL (OxLDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการศึกษามากมายที่

พบว่าในผู้ป่วยหรือสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานจะมีระดับ OxLDL สูง และ OxLDL จะมีผลไปทำลาย เอนโดทีเลียมเซลล์ด้วย ในขณะที่เกิด oxidation ของ LDL จะเกิด superoxide anion (O_2^-) ออกมาด้วย ซึ่ง O_2^- จะมีผลไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมได้(27) Hein K และคณะ (28) ได้แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่มีระดับคลอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะเป็นดัชนีบ่งชี้การมี LDL-cholesterol สะสมในผนังหลอดเลือด และมีผลทำให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators

จากการศึกษาในปัจจุบันของผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมโดยทดสอบ การเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม และการทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือด เล็กที่สมอง (cerebral arterioles) ต่อสารที่เป็น endothelium dependent ได้แก่ สาร acetylcholine (ACh) และ endothelium independent ได้แก่ สาร nitroglycerine (NTG)

ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงร่วมกับการมีระดับคลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงเป็น ระยะเวลาอันยาวนานมีผลทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดเล็กที่สมอง (cerebral arterioles) ต่อสาร ACh ลดลงในหลอดเลือดของหนูเบาหวานทั้ง 8 และ 24 สัปดาห์ และไม่มีผลการเปลี่ยนแปลงขนาดหลอดเลือดเมื่อให้สาร NTG ซึ่งผลนี้แสดงว่าความผิดปกติในการตอบสนองโดยการขยายตัวของหลอดเลือด ดังกล่าวเป็นความผิดปกติในการทำงานที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell) มิใช่ที่เซลล์ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (vascular smooth muscle cell) นอกจากนั้นผลการเกาะติดของเซลล์ เม็ดเลือดขาวที่หลอดเลือดดำที่สมองเป็นดัชนีหนึ่งที่ยืนยันความผิดปกติหรือความบกพร่องในการทำงาน ที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียม กลไกหลักที่ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมมา จากการมีระดับสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นจากการที่มีระดับน้ำตาลคลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ใน เลือดสูง ความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมทำให้สาร nitric oxide ซึ่งเป็นสารที่หลั่งมา จากเอนโดทีเลียมเซลล์และทำให้หลอดเลือดขยายตัว มีปริมาณลดลง และทำให้ nitric oxide สูญเสีย การทำงานไปได้ เมื่อสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวลดลง กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ cell adhesion molecule ก่อให้เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม และที่สำคัญได้แก่ปริมาณเลือด ไปเลี้ยงที่สมองลดลง

ผลของการให้ Losartan พบว่าสามารถป้องกันความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมและทำให้ เพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง กลไกของ Losartan ในการป้องกันการความผิดปกติของเซลล์เอนโดที เลียมในหลอดเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานเชื่อว่าเกิดจากการป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ

การศึกษาในปัจจุบันทำให้ผู้วิจัยได้เสนอ กลไกที่ Losartan สามารถป้องกันความผิดปกติของเอน ดोटีเลียมเซลล์ในภาวะเบาหวานนั้น ได้แก่การลดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในภาวะเบาหวาน โดยเฉพาะ superoxide anion (O_2^-) ดังนั้นอันตรายที่จะเกิดขึ้นต่อเอนโดทีเลียมเซลล์อันเป็นผลโดยตรง ของอนุมูลอิสระก็ลดลง ยิ่งไปกว่านั้น เมื่ออนุมูลอิสระโดยเฉพาะ O_2^- ลดลง โอกาสที่ O_2^- จะทำปฏิกิริยา

กับ LDL-Cholesterol ได้เป็น Oxidize LDL และมีผลทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมเซลล์ก็ลดลงตามไปด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Barnett AH. Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. *Am J Med* 1991;90(Suppl 6a):6-67.
2. Saydah SH, Miret M, Sung J, Varas C, Gause D, Brancati FL. "Postchallenge hyperglycemia and mortality in a national sample of U.S. adults". *Diabetes Care* 2001;24 (8): 1397-402.
3. Bell DSH. Stroke in diabetic patient. *Diabetic Care* 1994;17:213-219.
4. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. *Diabetes Care* 1995;18:269-271.
5. Ishikawa M, Sekizuka E, Yamaguchi N, Nakadate H, Terao S, Granger D. N I, and Minamitani H. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to platelet-leukocyte endothelial cell interactions in the cerebral microvasculature.. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007;292:H2306-H2315
6. Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H. Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030". *Diabetes Care* 2004 ;27 (5): 1047-53
7. Ulrich H, Huige Li, Hanke M, Mathias O, Edi M, Hartmann M, Skatchkov M, Friedrich T, Rolf A. K. Stahl, Ascan W, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG., Forstermann U, Munzel. Mechanisms Underlying Endothelial Dysfunction in Diabetes Mellitus .*Circulation Research* 2001;88:e14.
8. Lüscher TF, Creager MA. Review: Clinical Cardiology: New Frontiers :Diabetes and Vascular Disease: Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part II *Circulation* 2003;108:1655.
9. Jariyapongskul A ,Patumraj S, Niimi H. Cerebral endothelial dysfunction in diabetes: intravital microscopic analysis using streptozotocin-induced diabetic rats. *Clinical Hemorrhheological and Microcirculation* 2003;29(3-4):331-5.

10. Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N , Patumraj S, Seki J, Niimi H. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. *Microvascular Research* 2007;74:32-38
11. Gonzales AM, Sochor, Hothersall JS, McLean P. Effect of aldose reductase inhibitor (sorbitol) on integration of polyol pathway, pentose phosphate pathway, and glycolytic rate in diabetic rat lens. *Diabetes* 1986;35:1200-1205.
12. Stephen MS, Campbell RK, and Cahoon C. Biochemical pathways for microvascular complication of diabetes mellitus. *The Annals of Pharmacotherapy* 2003;37:1858-1866
13. Davidson M. A review of the current status of the management of mixed dyslipidemia associated with diabetes mellitus and metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 2008 Dec 22;102(12A):19L-27L.
14. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1994;331:1428-1436
15. Satish K. Srivastava, Kota V. Ramana, and Aruni Bhatnagar. Role of aldose reductase and oxidative damage in diabetes and the consequent potential for therapeutic options. *Endocr. Rev* 2005; 26: 380 - 392.
16. Alison Goldin, Joshua A. Beckman, Ann Marie Schmidt, and Mark A. Creager. Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation* 2006; 114: 597 - 605.
17. Brown WV. Microvascular complications of diabetes mellitus: renal protection accompanies cardiovascular protection. *Am J Cardiol.* 2008 Dec 22;102(12A):10L-13L.
18. Anitra C. Carr, Mark R. McCall, and Balz Frei .Oxidation of LDL by Myeloperoxidase and Reactive Nitrogen Species : Reaction Pathways and Antioxidant Protection .*Arterioscler Thromb Vasc Biol*, Jul 2000; 20: 1716 - 1723.
19. Hein K, Thomas FG, Ramwell PW. Superoxide production in the isolated rabbit aorta and the effect of alloxan, indomethacin and nitrovasodilators. *J pharmacol Exp Ther* 1991;256:537-541.
20. Cooper SA, Whaley-Connell A, Habibi J, Wei Y, Lastra G, Manrique C, Stas S, Sowers JR. Renin-angiotensin aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. *Am J Physiol* 2007;293:H2009-H2023.
21. Staessen JA, Li Y, Richart T. Oral renin inhibitors. *Lancet* 2006;368:1449-56.

22. Manrique C, Lastra G, Gardner M, Sowers JR. The renin angiotensin aldosterone system in hypertension: roles of insulin resistance and oxidative stress. *Med Clin North Am* 2009 May;93(3):569-82.
23. Marchesi C, Paradis P, Schiffrin EL Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* 2008 Jul;29(7):367-374.
24. U. Landmesser and H. Drexler. Oxidative stress, the renin-angiotensin system, and atherosclerosis. *Eur. Heart J* 2003; 5: A3 - A7.
25. Douglas S. Jacoby and Daniel J. Rader .Renin-Angiotensin System and Atherothrombotic Disease: From Genes to Treatment..*Arch Intern Med* 2003; 163: 1155 - 1164.
26. MILLER J A. Impact of Hyperglycemia on the Renin Angiotensin System in Early Human Type 1 Diabetes Mellitus.*J. Am. Soc. Nephrol* 1999; 10: 1778 - 1785.
27. Nagai N, Oike Y, Izumi-Nagai K, Urano T, Kubota Y, Noda K, Ozawa Y, et al. Angiotensin II type 1 receptor-mediated inflammation is required for choroidal neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 2252 – 2259.
28. Schnedl WJ, Ferber S, Johnson JH, Newgard CB. 1994, STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells *Diabetes*.Nov;43(11):1326-33.
- 29.Murali B, Dhananjay N, Umrani and Ramesh K. Effectof chronic treatment with losatan on streptozotocin-induced renal dysfunction. *Mol and cellular Miochem* 2003; 249: 85-90.
- 30.Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR.Crss-talk between the insulin and ngiotensin signaling ystems. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:12490-5.
- 31.Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells in multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest* 1997;100:2158-69.

Biography

Assist.Prof.Dr. Amporn Jariyapongskul

Office Address: Dept. of Physiology Faculty of Medicine

Srinakharinvirot University

Bangkok ,Thailand. 10110

e-mail : amporma@swu.ac.th

: ampornj@yahoo.com

Education

1. Ph.D., Chulalongkorn university

Department of physiology, Faculty of Medicine, Thailand, 2000

2. M.Sc., Chulalongkorn university

Department of physiology, Faculty of Medicine, Thailand, 1997

3. B.Sc., Thai Red Cross Nursing College ,1987

Research training,

1. 2005 and 2007; Nebraska Medical Center, Department of Cellular and Integrative Physiology, Omaha, NE, USA

2. 2002; Visiting Research Fellow in Immunohistochemistry and Microcirculation at National Cardiovascular Research Institute, Osaka , JAPAN, Deapartment of Vascular Physiology (Microcirculation group)

3. 1995-1996; Training course in the field of "Laboratory for Comprehensive ExperimenStudies: Microcirculation Technique" at National Cardiovascular Research Institute, Osaka , JAPAN, Deapartment of Vascular Physiology (Microcirculation group)

Research interest

Cerebral microcirculation in health and diseases (diabetes mellitus)

Intravital microscopic study in cerebral microcirculation

Biological effect of herbal medicine on organ microcirculation

Teaching Experience: Lecturer

Medical course: Cardiovascular Physiology (Lecture)

: Physiology of skin

: Hemostasis and coagulation

Postgraduate course:

: Cardiovascular physiology

: Ageing physiology

: Postgraduate seminar course

Honors and Scholarships

- Young Investigator award, 3rd Asian Congress for Microcirculation Award , Beijing, China, 1997

- Outstanding Presentation, 7th Asian Congress for Microcirculation Award , Tian, China, 2008

Publication

1. Jariyapongskul A , Niimi H , Patumraj S. Cerebral microcirculation response to hemorrhagic hypotension in spontaneously diabetic rats: an intravital fluorescence microscopic analysis. Proc The Sixth World Congress for Microcirculation, Monduzzi Editores S.p.A 1996:977-982.

2. Niimi H ,Jariyapongskul A ,and Minamino N. Vasodilatory response of Adrenomedullin on rat cerebral arterioles: an intravital microscopic analysis. Proc The Sixth World Congress for Microcirculation, Monduzzi Editores S.p.A 1996:709-712.

3. Jariyapongskul A , Niimi H , Kasantikul V, Maneesri S, Patumraj S. Morphological changes of cerebral microcirculation in streptozotocin-induced diabetic rats; pilot studies of in vivo fluorescence and electron microscopy. Proc The Third Asian Congress for Microcirculation, Monduzzi Editores S.p.A Bologna (Italy) 1997:239-245.

4. Kasantikul V, Jariyapongskul A , Patumraj S. Computer-assisted image analysis of microvasculature in benign and malignant gliomas: Proc The Third Asian Congress for Microcirculation, Monduzzi Editores S.p.A Bologna (Italy) 1997:61-66.

5. Somboonwong J, Thanamitramanee S, Jariyapongskul A , Patumraj S. Therapeutic effects of *Aloe vera* on cutaneous microcirculation and Wound healing in second burn model in Rats. J Med Assoc Thai 2000;83:417--425.
6. Patumraj S, Tewit S, Amatayakul S, Maneesri S, Jariyapongskul A, Kasantikul V, Shepro D. Comparative effects of Garlic and Aspirin on diabetic Cardiovascular complication. Drug Delivery 2000;7:1-6.
7. Jariyapongskul A ,Patumraj S, Yamaguchi S, Niimi H. The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ-induced diabetic rats. Clinical Hemorrhheological and Microcirculation 2002;27(1):67-76.
8. Jariyapongskul A ,Nakano a, Yamaguchi S, Nageswari K, Niimi H. Maturity of pericytes in cerebral neocapillaries induced by growth factors:fluorescence immuno-histochemical analysis using confocal laser microscopy. Clinical Hemorrhheological and Microcirculation 2003;29 (3-4):417-21.
9. Jariyapongskul A ,Patumraj S, Niimi H. Cerebral endothelial dysfunction in diabetes:intravital microscopic analysis using streptozotocin-induced diabetic rats. Clinical Hemorrhheological and Microcirculation 2003;29(3-4):331-5.
10. Jariyapongskul A, Pathumraj S, and Niimi H. Effects of Yahom on the regional cerebral blood flow in rat using fluorescence videomicroscopy. Clinical Hemorrhheological and Microcirculation 2006;34 :139-144
11. Jariyapongskul A , Rungjaroen T, Kasetsuwan N, Pathumraj S, and Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin-induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. Clinical Hemorrhheological and Microcirculation 2006;34 :283-293
12. Jariyapongskul A, Rungjaroen T, Kasetsuwan N , Patumraj S, Seki J, Niimi H. Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. Microvascular Research 2007;74:32-38
13. Jariyapongskul A, Yamaguchi S, Patumraj S. Long-term effects of oral vitamin C administration improves cerebral microvascular vasodilatory impairment in diabetes: in vivo evidence using diabetic rats. Asian Biomed. 2007;1:159-166
14. Jariyapongskul A, Patumraj S, Suksumrarn A. Long-term effect of tetrahydrocurcumin supplementation on cerebral blood flow and endothelial cells in streptozotocin-induced diabetic rats. Asian Biomed. 2008;2:151-5.