บทคัดย่อ

T165686

โรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular diseases) ยังคงเป็นสาเหตุที่สำคัญในการเสียชีวิตของคนทั่วโลก โรคที่พบมากคือ โรคหลอดเลือดตีบแข็ง (atherosclerosis) โรคนี้มีสาเหตุซับซ้อนหลายประการ ซึ่งยังไม่ทราบกลไกการเกิดโรคอย่างสมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงปริมาณของ nitric oxide (NO) ในเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell; EC) เป็นสาเหตุที่สำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดตีบแข็ง

NO เป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่ส่งสัญญาณภายในเซลล์ต่างๆ (signaling molecule) ของร่างกายคนและสัตว์ ให้มีการทำงานของระบบต่างๆ NO เป็นโมเลกุลที่สร้างโดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) NOS isoform III หรือ endothelial NOS (eNOS) ที่สร้างจาก EC มีบทบาทสำคัญต่อระบบหลอดเลือดเป็นอย่างมาก NO ที่สร้างจาก eNOS ในสภาวะปกติในปริมาณต่ำๆ นี้จะทำให้หลอดเลือดคลายตัว เพื่อให้สมดุลย์กับการหดตัวของหลอดเลือดเนื่องจากการทำงานของระบบประสาทอัตโนมัติ sympathetic ร่วมกับ renin และ angiotensin

นอกจากนี้ NO จาก eNOS ยังมีคุณสมบัติในการป้องกันหลอดเลือด (vasoprotective) ไม่ให้มีการเกาะของเกร็ดเลือด (platelet aggregation) และการเกาะของเม็ดเลือดขาว บน EC (ผนังด้านในของหลอดเลือด) และยับยั้ง การเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด ถ้า NO จาก ลดลงเนื่องจาก eNOS ลดลง หรือ EC ทำหน้าที่ไม่ได้ตามปกติจะทำให้เกิดการเสื่อมของหลอดเลือด ซึ่งมีลักษณะตีบแข็ง (atherosclerosis) โดยเป็นผลจากการสะสมของเกร็ดเลือด เม็ดเลือดขาวและการเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบที่เป็นผนังหลอดเลือด ทำให้ไม่สามารถควบคุมการไหลเวียนเลือดของเลือดได้เท่าปกติ

NO จาก eNOS ยังควบคุมการแสดง (expression) ของ gene ที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนผนังหลอดเลือด เช่น chemotractant protein (MCP-1) surface adhesion molecule (CD11/18) vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) intercellualar adhesion molecule I (ICAM-1) และ E-selectin โมเลกุลเหล่านี้มีบทบาทในการเกิดการอักเสบ NO จึงทำหน้าที่ยับยั้งไม่ให้เม็ดเลือดขาวต่างๆ มาเกาะและเคลื่อนเข้าไปในผนังหลอดเลือด เป็นการป้องกันการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวในระยะแรก

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ในการสร้างแบบจำลองของเส้นเลือดที่มีวิการสำคัญของ atherosclerosis โดยเลี้ยง EC และ smooth muscle cell (SMC) ในห้องปฏิบัติการโดยเลียนแบบลักษณะสำคัญของผนังหลอดเลือด เพื่อศึกษาบทบาทของ NO ต่อ การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ

ของ EC ในแบบจำลอง และนำแบบจำลองไปประยุกต์ใช้เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของยาหรือสารเคมีที่นำมาใช้ป้องกันและรักษาหลอดเลือดแข็งตัว

การสร้างแบบจำลองของเส้นเลือดที่มีวิการสำคัญของ atherosclerosis ทำได้โดยเลี้ยง EC ในสภาวะที่มี tumor necrosis factor-α (TNF- α) (10 ng/ml) นาน 12 ชั่วโมงเพื่อทำให้ EC ลดการสร้าง eNOS ซึ่งจะมีผลทำให้ HUVEC มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่สำคัญของโรคหลอดเลือดตีบแข็ง ได้แก่ การเกาะติดของเกร็ดเลือดบน EC เพิ่มขึ้น การเพิ่มโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนผนังหลอดเลือดที่สำคัญได้แก่ VCAM-1) ICAM-1และ E-selectin และมีการ เปลี่ยนแปลง ultrastructure ที่สำคัญคือ เสีย tight junction หลังจากนั้นจึงเลี้ยง EC ที่เสียสภาพนี้ต่อในสภาวะที่มี 17-β estradiol (100 pg/ml) เพื่อทำการแก้ไขให้ EC ที่มีวิการดังกล่าวให้กลับสู่สภาพปกติ ซึ่ง 17-β estradiol สามารถแก้ไข EC ให้กลับสู่สภาพปกติในช่วงเวลา 6-12 ชั่วโมงและสมบูรณ์ที่สุดใน 12 ชั่วโมง หลังจากได้แบบจำลองแล้วผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำแบบจำลองมาประยุกต์ใช้ประเมินประสิทธิภาพของยาตัวอย่างในการเป็น nitric oxide related antiatherosclerotic agent คือ Acetylsalicylic acid (ASA) หรือ aspirin เปรียบเทียบกับ 17-β estradiol โดยสรุปผู้วิจัยมีความเห็นว่าแบบจำลองหลอดเลือดตีบแข็งมีข้อจำกัดในการใช้งาน คือ ไม่ควรทำการศึกษานานเกิน 24 ชั่วโมง ซึ่งเหมาะกับการติดตามการเปลี่ยนแปลงในระยะ early change ด้วยกล้องจุลทัศน์อิเล็คตรอน แม้ว่าการศึกษานี้ไม่สามารถสร้างแบบจำลองที่สามารถดูการเปลี่ยนแปลงทั้ง vascular wall แต่สามารถมุ่งเน้นดูการเปลี่ยนแปลงที่ endothelial cell layer (เทียบเท่ากับผนังด้านในของหลอดเลือด; tunica intema) ซึ่งจะนำไปพัฒนาสู่การศึกษา *ex vivo* โดยนำส่วนของเส้นเลือดเช่น human saphenous vein มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ (tissue culture versus *ex vivo* continuous perfusion of saphenous vein)

ABSTRACT

TE165686

Atherosclerosis is one of the most common cardiovascular diseases in human. This is still an important public health problem in worldwide. In normal vascular endothelial cell (EC), a small amount of nitric oxide (NO) synthesized by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) maintains normal vascular physiological function controls. Dysfunction of EC to produce eNOS by tumor necrosis factor-α (TNF-α) causes critical features of vascular inflammation associated with several disease states (eg, atherosclerosis including increased platelet aggregation and adhesion on EC, elevated adhesion molecules and enhanced inflammatory cells binding to EC, and smooth muscle cell (SMC) proliferation and migration).

The present study was designed to construct an *in vitro* model of vascular wall with lesions compatible to atherosclerotic criterias. This model will be the advantage for pathological and pharmacological studies in atherosclerosis.

Endothelial cells grown in transwells were cocultured with SMC in a 24-well plate to mimic the major components of the vascular wall. The model was incubated with TNF-α (10 ng/ml) for 12 hours, prior exposed to 17-β estradiol (100 pg/ml) for 6-12 hours. The result indicated that recovered morphology with good tight junction and decreased platelet adhesion was noted in defective EC after 17-β estradiol treatment for 12 hours.

We then evaluated the feasibility of the *in vitro* atherosclerotic model by using acetylsalicylic acid (ASA) or aspirin as nitric oxide related antiatherosclerotic agent. The capacity of ASA to improve the TNF-α treated EC was compared with17-β estradiol.

We found that TNF-α and 17-β estradiol are the suitable agents for our model. Although, our finding could focus only early change of EC layer investigated by electron microscopy, this would be the basis for our future studies to develop ex vivo continuous perfusion of human vessel segments for a further atheroslerosis study.