



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่และภาวะ
เครียดออกซิเดชันในสมองของหนูในช่วงสูงวัย

Effect of exercise training on angiogenic capacity and oxidative stress in
aged-rat brain

โดย

ดร.ชีพสุมน วิบูลย์วรกุล

สนับสนุนโดย

สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต

2563

ชื่อเรื่อง: ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่และภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองของหนูในช่วงสูงวัย

ผู้วิจัย: ชีพสุมน วิบูลย์วรกุล

สถาบัน: มหาวิทยาลัยรังสิต

ปีที่พิมพ์: 2566

สถานที่พิมพ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

แหล่งที่เก็บรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

จำนวนหน้างานวิจัย: 53 หน้า

คำสำคัญ: การฝึกออกกำลังกาย, กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่, ภาวะเครียดออกซิเดชัน, วิถีจีเอฟ, เอ็นอาร์เอฟทู, หลอดเลือดจุลภาคสมอง, ช่วงสูงวัย

ลิขสิทธิ์: มหาวิทยาลัยรังสิต

ความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคสมองลดลงช่วงสูงวัยเป็นปัจจัยสำคัญให้สมองได้รับเลือดไม่เพียงพอและเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะสมองขาดเลือดได้ โดยการกำซาบของสมองที่ลดลงช่วงสูงวัยมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่และภาวะเครียดออกซิเดชัน การฝึกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และลดภาวะเครียดออกซิเดชันในเนื้อเยื่อต่าง ๆ อย่างไรก็ตามกลไกของการฝึกออกกำลังกายต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่และภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองช่วงสูงวัยยังไม่ทราบแน่ชัด งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการฝึกออกกำลังกายต่อการป้องกันการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนวิถีจีเอฟ (VEGF) เอ็นอาร์เอฟทู (Nrf2) และเฮซโอวัน (HO-1) ในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย วิธีวิจัยใช้หนูแรท 3 กลุ่ม คือ กลุ่มอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้ออกกำลังกาย (SY), กลุ่มอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้ออกกำลังกาย (SA) และกลุ่มอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA) โดยสมองของหนูทั้ง 3 กลุ่มถูกนำไป 1) ตรวจสอบความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค และปริมาณโปรตีน VEGF และ Nrf2 และ 2) แยกสกัดหลอดเลือดจุลภาค เพื่อนำไปตรวจสอบปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ผลการวิจัยพบว่าสมองของกลุ่ม SA มีความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค ปริมาณโปรตีน VEGF และปริมาณโปรตีน Nrf2 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม SY ส่วนหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองของกลุ่ม SA มีปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม SY เช่นกัน อย่างไรก็ตาม ความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค ปริมาณโปรตีน VEGF และปริมาณโปรตีน Nrf2 เพิ่มขึ้นในสมองของกลุ่ม EA เมื่อเทียบกับกลุ่ม SA ส่วนหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองของกลุ่ม EA มีปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่ม SA เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค ปริมาณโปรตีน VEGF และปริมาณโปรตีน Nrf2 ในสมองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าการฝึกออกกำลังกายสามารถป้องกันการลดลงของความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่และภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองช่วงสูงวัย ซึ่งส่วนหนึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน VEGF Nrf2 และ HO-1

Title: Effect of exercise training on angiogenic capacity and oxidative stress in aged-rat brain

Researcher: Sheepsumon Viboolvorakul

Affiliation: Rangsit University

Year of Publication: 2023

Publisher: Rangsit University

Source: Rangsit University

No. of pages: 53 pages

Keywords: exercise training, angiogenesis, oxidative stress, VEGF, Nrf2, cerebral microvessel, aging

Copyrights: Rangsit University

A major contributor to impaired cerebral tissue perfusion and the risk of cerebrovascular disease is the gradual decline of brain microvascular density with age. Changes in angiogenic capacity and oxidative stress are associated with age-related decreases in cerebral tissue perfusion. Exercise training could promote angiogenesis while reducing oxidative stress in various tissues. However, the mechanisms of exercise training on angiogenic capacity and oxidative stress in the aged brain remain unknown. This study aimed to investigate the effect of exercise training on preventing microvascular density decline and changes in VEGF, Nrf2, and HO-1 proteins in aged brains. Male rats were divided into three groups: 16-week-old sedentary (SY), 52-week-old sedentary (SA), and 52-week-old exercise (EA). The brains of three groups were collected; 1) to determine microvascular density and protein expressions of VEGF and Nrf2, 2) to isolate microvessel fractions, and then taken to evaluate Nrf2 and HO-1 protein levels. The results showed that microvascular density and protein expressions of brain VEGF and Nrf2, as well as isolated brain microvessel protein levels of Nrf2 and HO-1, significantly decreased in SA when compared to those in SY. However, when compared to SA, brain microvascular density and protein expressions of VEGF and Nrf2, as well as isolated brain microvessel protein levels of Nrf2 and HO-1, were significantly higher in EA. Furthermore, a statistically significant positive correlation was shown between microvascular density, VEGF protein expression, and Nrf2 protein expression in the brain. These findings suggest that exercise training could prevent the loss of angiogenic capacity and oxidative stress in the aged brain, which is partly related to VEGF, Nrf2, and HO-1 signaling pathways.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัย เรื่อง ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ และภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองของหนูในช่วงสูงวัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี เพราะได้รับคำแนะนำและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการทำวิจัยจาก ศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช มาโดยตลอด ผู้วิจัยขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณ ผศ.ดร.เดชา บุรณจิตรภิรมย์ ที่ให้ความช่วยเหลือพิจารณาและตรวจสอบความถูกต้องของรายงานการวิจัยเล่มนี้ และขอขอบคุณหมวดวิชาสรีรวิทยา และหมวดวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ ที่สนับสนุนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณ อาจารย์ชัยชาญ ศรีโพธิ์ ผู้ช่วยอาจารย์ หมวดวิชาสรีรวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณ คุณนพดล สัมฤทธิ์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ หมวดวิชาชีวเคมี ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องทำให้เซลล์แตกโดยใช้คลื่นเสียงความถี่สูง และขอขอบคุณ อาจารย์ทองใบ จันสีชา ผู้ช่วยอาจารย์ หมวดวิชาพยาธิชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมเนื้อเยื่อสมองในขั้นตอนการฝังในบล็อกพาราฟิน

ขอขอบคุณ สถาบันวิจัย มหาวิทยาลัยรังสิต ที่ได้สนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ ส่งผลให้การวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จได้ตามวัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้ด้วยดี

มหาวิทยาลัยรังสิต Rangsit University

ชีพสมน วิบูลย์วรกุล
นักวิจัยหลัก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย	3
1.4 ขอบเขตการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 การไหลเวียนเลือดจุลภาค	5
2.2 กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่	6
2.3 บทบาทของหลอดเลือดจุลภาคในสมอง	7
2.4 การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองในช่วงสูงวัย	9
2.5 วีจีเอฟ (VEGF)	10
2.6 เอ็นอาร์เอฟ 2 (Nrf2)	11
2.7 บทบาทของการฟீกออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด	14
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย	
3.1 สัตว์ทดลอง	16
3.2 วิธีดำเนินการทดลอง	16
3.3 โปรแกรมการออกกำลังกาย	17
3.4 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางอิมมูโนพยาธิวิทยา	18
3.5 การย้อมขึ้นเนื้อเยื่อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี	18
3.6 การเก็บตัวอย่างภาพ	19
3.7 การวิเคราะห์ภาพเชิงปริมาณ	19

3.8	การแยกสกัดหลอดเลือดจลุมภาคสมอง	19
3.9	การวัดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ	20
3.10	การวิเคราะห์ผลทางสถิติ	21
บทที่ 4	ผลการทดลอง และอภิปรายผล	
4.1	ผลการทดลอง	
4.1.1	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อการปรับตัวทางสรีรวิทยาในหนูช่วงสูงวัย	22
4.1.1.1	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อน้ำหนักตัว	22
4.1.1.2	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความดันเลือดแดงเฉลี่ย	23
4.1.2	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจลุมภาคในสมองของหนูช่วงสูงวัย	23
4.1.2.1	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมอง	24
4.1.2.2	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ในสมอง	25
4.1.2.3	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อปริมาณโปรตีน VEGF ในสมอง	27
4.1.2.4	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2, เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมอง	27
4.1.3	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจลุมภาคแยกสกัดจากสมองของหนูช่วงสูงวัย	28
4.2	อภิปรายผล	
4.2.1	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อการปรับตัวทางสรีรวิทยาในหนูแรทช่วงสูงวัย	30
4.2.2	ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจลุมภาคในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย	31
บทที่ 5	สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	
5.1	สรุป	36
5.2	วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ	36
	เอกสารอ้างอิง	37
	ประวัติผู้วิจัย	49

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 น้ำหนักตัว (body weight) และความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial pressure) ของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA)	22
4.2 เพอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31, เพอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA)	24
4.3 ปริมาณโปรตีน Nrf2 และปริมาณโปรตีน HO-1 ในหลอดเลือดจุกภาคแยก สกัดจากสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA)	29

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	7
2.2	8
2.3	11
2.4	12
2.5	14
4.1	23
4.2	25
4.3	25

2.1 ขั้นตอนของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่
 2.2 เซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบเป็น blood brain barrier
 2.3 วิธีการถ่ายทอดสัญญาณของ VEGF/VEGFR2 (VEGF/VEGFR2 signaling pathways) ในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่
 2.4 วิธี Keap1/Nrf2/ARE ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่ได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียดต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะเครียดออกซิเดชัน เป็นต้น
 2.5 บทบาทของแรงเฉือนต่อวิธี Keap1/Nrf2 ของเซลล์เอนโดทีเลียล
 4.1 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อค่าน้ำหนักตัว (body weight; ซ้ำย) และค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP; ขวา) ของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย *****,****** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.001$, $P < 0.0001$) และ **###** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$, $P < 0.01$)
 4.2 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อการแสดงออกของ CD31 ในชั้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียของ **A:** หนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), **B:** หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และ **C:** หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA)
 4.3 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย ******มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ **#**มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

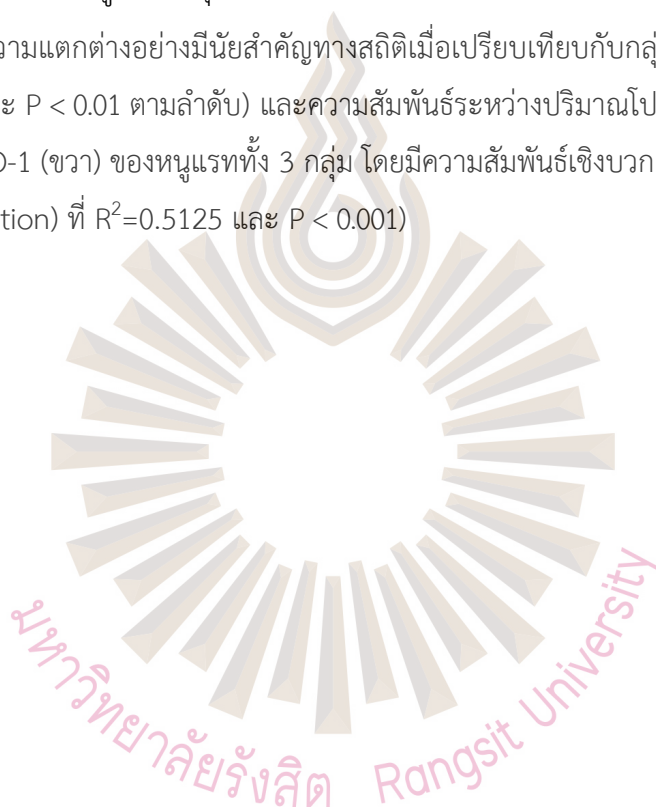
สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.4 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อการแสดงออกของ Nrf2 ในชิ้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีของ A: หนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), B: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และ C: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA)	26
4.5 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ #มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)	26
4.6 ปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ #มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)	27
4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ที่ $R^2 = 0.7821$, $P < 0.001$ (ชาย), $R^2 = 0.61$, $P < 0.001$ (กลาง) และ $R^2 = 0.5225$, $P = 0.0002$ (ขวา) ตามลำดับ	28

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8	30

ผลของฝีกออกกำลังกายต่อการปริมาณโปรตีน Nrf2 (ซ้าย) และ HO-1 (กลาง) ในหลอดเลือดจุกภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **,*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 (ขวา) ของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ที่ $R^2=0.5125$ และ $P < 0.001$)



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประเทศไทยและทั่วโลกกำลังเข้าสู่ภาวะการมีจำนวนประชากรผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้น และจากรายงานขององค์การสหประชาชาติ พบว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 1950 ประชากรผู้สูงอายุของโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเพิ่มขึ้นจาก 205 ล้านคน ในปี ค.ศ. 1950 เป็น 962 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2017 และคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 1,450 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2030 นอกจากนี้สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติได้รายงานถึงการเพิ่มขึ้นของประชากรผู้สูงอายุไทยว่ามีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นกัน โดยจำนวนประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยเพิ่มขึ้นด้วยอัตราที่รวดเร็วในระหว่างปี ค.ศ. 2000 ถึง ค.ศ. 2030 และคาดว่าจำนวนประชากรผู้สูงอายุที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปจะมีจำนวนมากถึงหนึ่งในสี่ของจำนวนประชากรทั้งหมดในประเทศไทยในปี ค.ศ. 2030

ความผิดปกติของหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุสำคัญที่นำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) และโรคที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative diseases) ซึ่งรวมถึงโรคสมองเสื่อม (dementia) ในประชากรผู้สูงอายุได้ (Grammas, Martinez et al. 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าโรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของประชากรผู้สูงอายุไทยและทั่วโลก โดยกระทรวงสาธารณสุขไทยรายงานอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดสมองในประชากรผู้สูงอายุไทยเพิ่มขึ้นจาก 54.9 คนต่อประชากร 100,000 คน ในปี ค.ศ. 1996 เป็น 110.9 คนต่อประชากร 100,000 คน ในปี ค.ศ. 2006

การศึกษาวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและหน้าที่ของหลอดเลือดสมองในช่วงสูงวัย ซึ่งสามารถนำไปสู่การเกิดพยาธิสภาพต่าง ๆ ที่สมอง ได้แก่ โรคหลอดเลือดสมอง หรือโรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมอง (เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease เป็นต้น) (Yang, Sun et al. 2017) โดยการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองที่เกิดขึ้นในช่วงสูงวัย ได้แก่ การลดลงของอัตราการไหลของเลือดที่สมองในขณะพัก (resting cerebral blood flow) (Leoni, Oliveira et al. 2017), การสูญเสียหน้าที่ในการควบคุมอัตราการไหลของเลือดแบบเฉพาะที่สมอง (autoregulation) (Popa-Wagner, Buga et al. 2012), การสูญเสียหน้าที่ของเซลล์เอ็นโดทีเลียล (endothelial cell dysfunction) (Popa-Wagner, Buga et al. 2012) และการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค (microvascular density) (Murugesan, Demarest et al. 2012) ซึ่ง

การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ทำให้ปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงสมองลดลง และส่งผลให้สมองได้รับเลือดไม่เพียงพอหรือเกิดภาวะสมองขาดเลือดได้ (Yang, Sun et al. 2017)

ความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคของสมองมีความสำคัญต่อการทำงานของสมอง เนื่องจากหลอดเลือดจุลภาคของสมองมีบทบาทในการควบคุมอัตราการไหลของเลือดไปยังส่วนต่าง ๆ ของสมอง (Murugesan, Demarest et al. 2012) อย่างไรก็ตามมีการรายงานถึงการลดลงของหลอดเลือดจุลภาคของสมองในช่วงสูงวัย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดลงของปริมาณเลือดที่เลี้ยงสมองด้วย (Izzo, Carrizzo et al. 2018) โดยการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคในช่วงสูงวัยพบว่าเกิดจากความบกพร่องของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในการรักษาความคงอยู่ของหลอดเลือดที่สมอง (Izzo, Carrizzo et al. 2018)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) พบมากในช่วงสูงวัย ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีอนุมูลอิสระในวัยชรา (free radical theory of aging) นั่นคือช่วงสูงวัยเซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น และความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระลดลง โดยมีรายงานว่าภาวะเครียดออกซิเดชันในช่วงสูงวัยมีบทบาทยับยั้งกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ที่สมอง ซึ่งการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระและการลดลงของเอนไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระในสมอง (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในภาวะปกติ (physiological angiogenesis) และในภาวะที่มีพยาธิสภาพ (pathological angiogenesis) โดยส่วนใหญ่ VEGF ออกฤทธิ์ผ่านตัวรับ VEGF receptor ชนิดที่ 2 (VEGFR2) ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียล (endothelial cell) ให้มีการเพิ่มจำนวน (proliferation) อพยพเคลื่อนย้าย (migration) และเปลี่ยนสภาพ (differentiation) (Shibuya 2006) นอกจากนี้มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างความบกพร่องของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และการลดลงของ VEGF ในหลาย ๆ อวัยวะช่วงสูงวัย (Rivard, Fabre et al. 1999, Sadoun and Reed 2003, Wagatsuma 2006, Hoenig, Bianchi et al. 2008) ทั้งนี้รวมถึงสมองด้วย (Hoehn, Harik et al. 2002, Villar-Cheda, Sousa-Ribeiro et al. 2009)

Nuclear factor erythroid 2-related factors (Nrf2) มีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ ซึ่ง Nrf2 ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระของเซลล์ผ่านวิถี Keap1/Nrf2/ARE (Keap1/Nrf2/ARE pathway) (Loboda, Damulewicz et al. 2016) โดยมีรายงานถึงการเปลี่ยนแปลงของ Nrf2 ในสมองของหนูแก่ (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011, Csiszar, Gautam et al. 2014) ได้แก่ การลดลงของปริมาณของ Nrf2, ความบกพร่องของ Nrf2 ในการกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ และการลดลงของการเติมหมู่ฟอสเฟตของ Nrf2 โดยเอนไซม์ไคเนส ซึ่ง

การเปลี่ยนแปลงของ Nrf2 ของสมองในช่วงสูงวัยนี้มีความสัมพันธ์กับความคงอยู่และหน้าที่ของเซลล์ เอ็นโดทีเลียลในหลอดเลือดจุลภาคของสมอง (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011, Csiszar, Gautam et al. 2014)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าการฝีกออกกำลังกายส่งผลดีต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยมีการศึกษาวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงผลของการฝีกออกกำลังกายต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ (Olver, Ferguson et al. 2015) เช่น หัวใจ, สมอง, กล้ามเนื้อโครงร่าง ซึ่งส่วนหนึ่งเกิดจากการกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในอวัยวะนั้น ๆ (Viboolvorakul and Patumraj 2014, Morland, Andersson et al. 2017) และการฝีกออกกำลังกายยังเพิ่มความสามารถของกระบวนการต้านอนุมูลอิสระของสมองผ่านการกระตุ้นวิถี Keap1/Nrf2/ARE (Muthusamy, Kannan et al. 2012, Wang, Li et al. 2016) นอกจากนี้มีรายงานของ Gounder SS และคณะ (Gounder, Kannan et al. 2012) ถึงผลของฝีกออกกำลังกายในความหนักระดับปานกลางต่อการลดภาวะเครียดออกซิเดชันร่วมกับการลดความบกพร่องของความสามารถของ Nrf2 ต่อการกระตุ้นการแสดงออกของยีนในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระในหัวใจของหนูแก่

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าการไหลเวียนเลือดของสมองในช่วงสูงวัยลดลง โดยเกี่ยวข้องกับการบกพร่องของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และกระบวนการต้านอนุมูลอิสระผ่านการทำงานของ Nrf2 นอกจากนี้พบว่าการฝีกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ และกระบวนการต้านอนุมูลอิสระผ่านการทำงานของ Nrf2 ได้ จึงทำให้สนใจที่จะทำการศึกษาผลของการฝีกออกกำลังกายต่อการป้องกันการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและการลดลงของ Nrf2 ในสมองของหนูแก่

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาผลของการฝีกออกกำลังกายต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ และการลดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองของหนูในช่วงสูงวัย
- 2) เพื่อศึกษาผลของฝีกออกกำลังกายต่อบทบาทของ VEGF ในการส่งสัญญาณการเกิดหลอดเลือดใหม่ และบทบาทของ Nrf2 ต่อการลดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองของหนูในช่วงสูงวัย

1.3 สมมติฐานการวิจัย

การฝีกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ผ่าน VEGF และลดภาวะเครียดออกซิเดชันผ่าน Nrf2 ในสมองของหนูช่วงสูงวัยได้หรือไม่

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยนี้ใช้หนูแรทเป็นสัตว์ทดลองเพื่อประเมินผลของการออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำในระดับความหนักปานกลางต่อการป้องกันการลดลงของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของหลอดเลือดจลุมภาคสมอง และการแสดงออกของโปรตีน VEGF Nrf2 และ HO-1 ในสมองช่วงสูงวัย โดยสมองของสัตว์ทดลองถูกนำมาศึกษาทางอิมมูโนพยาธิวิทยาด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และการวิเคราะห์ปฏิกิริยาอิมมูโนแอสเสย์

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้องค์ความรู้ใหม่เกี่ยวกับกลไกของการฝึกร่างกายต่อการป้องกันการลดลงของหลอดเลือดจลุมภาคและการลดความเครียดออกเดชั่นของสมองในช่วงสูงวัย
- 2) ใช้เป็นข้อมูลสนับสนุนการส่งเสริมสุขภาพประชากรผู้สูงอายุด้วยการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันพยาธิสภาพที่นำไปสู่โรคหลอดเลือดสมองหรือโรคที่มีการทำลายของเซลล์ประสาทในสมองได้



บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การไหลเวียนเลือดจุลภาค

การไหลเวียนเลือดจุลภาค เป็นส่วนหนึ่งของระบบไหลเวียนโลหิตของร่างกาย ซึ่งประกอบด้วย หลอดเลือดขนาดเล็ก แตกแขนงเชื่อมโยงกัน โดยการไหลเวียนเลือดจุลภาคมีหน้าที่สำคัญในการขนส่ง สารอาหาร, ก๊าซออกซิเจน, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ฮอรโมน และของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมระหว่างเลือดและเนื้อเยื่อ ภายใต้การควบคุมอัตราการไหลของเลือดแบบเฉพาะที่เนื้อเยื่อ ดังนั้น การไหลเวียนเลือดจุลภาคจึงเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมปริมาณเลือดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่าง ๆ (tissue perfusion)

การไหลเวียนเลือดจุลภาคประกอบด้วยโครงสร้างหลัก ๆ คือ หลอดเลือดแดงฝอย (arteriole), หลอดเลือดฝอย (capillary) และ หลอดเลือดดำฝอย (venule) โดยมีหูรูดก่อนหลอดเลือดฝอย (pre-capillary sphincter) ซึ่งอยู่ระหว่างหลอดเลือดแดงฝอยและหลอดเลือดฝอย ทำหน้าที่ควบคุมการไหลของเลือดไปยังส่วนจำเพาะของการไหลเวียนจุลภาค

หลอดเลือดแดงฝอย เป็นหลอดเลือดขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 10-100 ไมโครเมตร) ซึ่งรับเลือดจากเส้นเลือดแดง (artery) โดยผนังของหลอดเลือดแดงฝอยประกอบด้วยเซลล์เอ็นโดทีเลีย (endothelia cell), เส้นใยอีลาสติก (elastic fiber), เส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) และ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) ทำให้หลอดเลือดแดงฝอยมีหน้าที่ควบคุมความดันโลหิตและอัตราการไหลของเลือดไปยังเนื้อเยื่อ หลอดเลือดแดงฝอยมีการแตกแขนงหลายครั้ง และแต่ละปลายของหลอดเลือดแดงฝอยจะแตกแขนงเป็นหลอดเลือดฝอย

หลอดเลือดฝอย มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-10 ไมโครเมตร และมีองค์ประกอบหลัก คือ เซลล์เอ็นโดทีเลีย (ไม่มีกล้ามเนื้อเรียบ) ซึ่งรอบ ๆ เซลล์เอ็นโดทีเลียจะพบเซลล์เพอร์ริไซต์ (pericyte) โดยการยึดติดกันของเซลล์เอ็นโดทีเลีย (interendothelial junction) ในหลอดเลือดฝอยมีลักษณะไม่แน่นอน เกิดเป็นช่องว่าง จึงแบ่งหลอดเลือดฝอยได้ 3 ชนิด ตามลักษณะการยึดติดกันของเซลล์เอ็นโดทีเลีย

- Continuous capillary เป็นหลอดเลือดฝอยที่พบมากที่สุดในร่างกาย โดยเซลล์เอ็นโดทีเลียมีการยึดติดกันอย่างต่อเนื่อง พบว่าช่องว่างของการยึดติดกันของเซลล์เอ็นโดทีเลียแคบ มีความกว้างเพียง 10-15 นาโนเมตร จึงทำให้มีความสามารถในการซึมผ่านต่ำ (low permeability)
- Fenestrated capillary เป็นหลอดเลือดฝอยที่พบที่บางอวัยวะ เช่น ลำไส้เล็ก, ไต, ต่อมมีท่อ (exocrine gland) เป็นต้น โดยพบว่าช่องว่างของการยึดติดกันของเซลล์เอ็นโดทีเลียกว้าง

และเห็นเป็นรู (fenestra) ทำให้หลอดเลือดฝอยประเภทนี้มีความสามารถในการซึมผ่านสูง (high permeability)

- Discontinuous capillary เป็นหลอดเลือดฝอยที่พบได้ที่ตับ, ม้าม และไขกระดูก โดยพบว่าเซลล์เอ็นโดทีเลียลไม่ยึดติดกันอย่างต่อเนื่อง ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างเซลล์เอ็นโดทีเลียลใหญ่มาก (large gap) ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านสูงที่สุด (extremely high permeability)

หลอดเลือดฝอยมีพื้นที่ผิวมาก (large surface area) และมีความสามารถในการซึมผ่านของเหลวและสารโมเลกุลใหญ่ (macromolecules) ได้ดี จึงทำให้หลอดเลือดฝอยมีหน้าที่สำคัญในแลกเปลี่ยนของเหลว, อิเล็กโทรไลต์, ก๊าซ และสารโมเลกุลใหญ่ระหว่างเลือดกับเซลล์

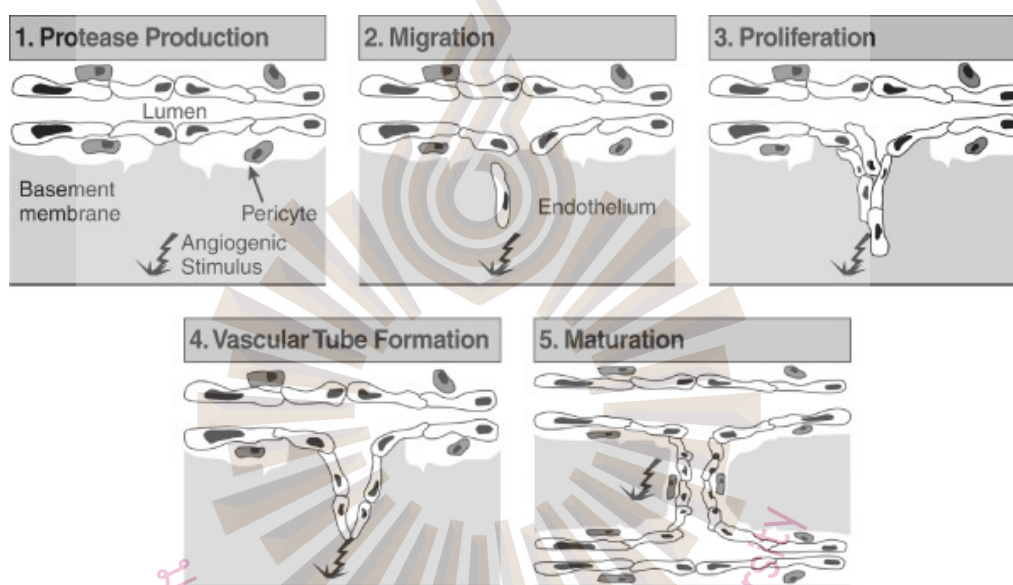
หลอดเลือดดำฝอย รับเลือดต่อจากหลอดเลือดฝอย โดยประกอบด้วยเซลล์เอ็นโดทีเลียล (ส่วนใหญ่), เซลล์เพอริไซต์ และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-100 ไมโครเมตร หลอดเลือดดำฝอยเป็นตำแหน่งสำคัญของการเกิดกระบวนการอักเสบ เช่น การยึดเกาะ (adhesion) และการเคลื่อนตัวผ่านของผนังหลอดเลือด (transmigration) ของเซลล์เม็ดเลือดขาว เป็นต้น

2.2 กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่

กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) คือ กระบวนการสร้างหลอดเลือดฝอยใหม่จากหลอดเลือดฝอยที่มีอยู่ก่อนแล้ว กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นกระบวนการที่สำคัญที่เกิดขึ้นตลอดชีวิต โดยกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่พบได้ในภาวะปกติ ได้แก่ การหายของแผล (wound healing), การเปลี่ยนแปลงของมดลูกช่วงมีประจำเดือน, การฝีกออกกำลังกาย เป็นต้น นอกจากนี้กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ยังเกี่ยวข้องกับภาวะที่ร่างกายมีพยาธิสภาพด้วย ได้แก่ มะเร็ง, ภาวะเบาหวานขึ้นจอตา (diabetic Retinopathy), โรคจอประสาทตาเสื่อมจากอายุ (age-related macular degeneration) เป็นต้น อย่างไรก็ตามการมีจำนวนของหลอดเลือดในระดับเนื้อเยื่อไม่เพียงพอสามารถส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพได้เช่นกัน ได้แก่ โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด, โรคหลอดเลือดสมองชนิดสมองขาดเลือด (ischemic stroke) เป็นต้น เนื่องจากจำนวนหลอดเลือดที่ลดลงส่งผลให้การไหลเวียนเลือดที่เนื้อเยื่อผิดปกติได้

การเริ่มต้นของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่เกิดจากการที่เซลล์เอ็นโดทีเลียลถูกกระตุ้น (endothelial activation) โดยโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) จับกับตัวรับรู้อันจำเพาะ (specific receptor) บนเซลล์เอ็นโดทีเลียล ซึ่งกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วยหลายขั้นตอน (Koch and Distler 2007) ดังนี้

- 1) การย่อยสลายเยื่อรองรับฐาน (basement membrane) โดยเอนไซม์ที่สร้างมาจากเซลล์เอ็นโดทีเลีย
- 2) การเคลื่อนที่ของเซลล์เอ็นโดทีเลียออกจากที่เดิม (endothelial cell migration)
- 3) การเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นโดทีเลีย (endothelial proliferation)
- 4) การสร้างท่อหลอดเลือด (tube formation) โดยเซลล์เอ็นโดทีเลียมาต่อกัน
- 5) การสร้างความแข็งแรงให้กับหลอดเลือดที่สร้างขึ้นมา (maturation) โดยการรวมตัวของเซลล์เพอริไซต์

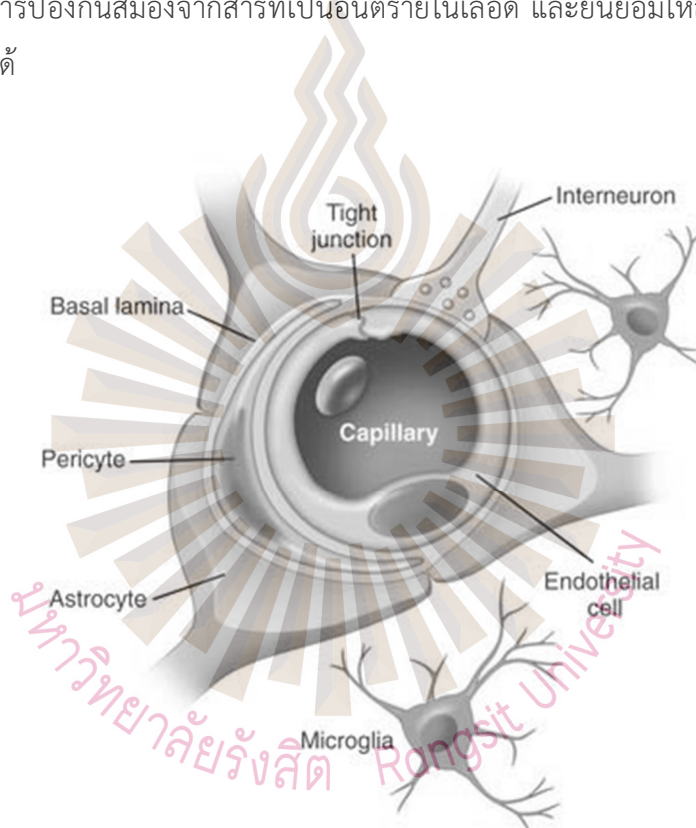


รูปที่ 2.1 ขั้นตอนของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Koch and Distler 2007)

2.3 บทบาทของหลอดเลือดจุลภาคในสมอง

สมองเป็นอวัยวะที่ใช้พลังงานมากกว่าอวัยวะอื่น ๆ และอัตราการไหลของเลือดในสมอง (cerebral blood flow) ถูกควบคุมให้เหมาะสมกับความต้องการใช้พลังงานของสมองในแต่ละส่วน นั่นคือ การเพิ่มขึ้นของการทำงานของเซลล์ประสาท (neuronal activity) สามารถส่งผลให้มีการเพิ่มอัตราการไหลของเลือดไปยังบริเวณสมองที่มีการทำงานเพิ่มขึ้นได้ โดยอาศัยการทำงานที่เรียกว่า neurovascular coupling ซึ่งเป็นกลไกการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ประสาทและหลอดเลือด กล่าวคือ สารที่ได้จากเมตาบอลิซึม (metabolic end-product) ของเซลล์ประสาทที่ทำงานเพิ่มขึ้น ได้แก่ adenosine, lactate เป็นต้น สารเหล่านี้ทำให้หลอดเลือดในบริเวณดังกล่าวเกิดการขยายตัว (vasodilation) ได้ ซึ่งมีผลให้อัตราการไหลของเลือดที่มายังบริเวณนี้เพิ่มขึ้น

ลักษณะจำเพาะอีกประการหนึ่งของการไหลเวียนเลือดในสมองคือ blood brain barrier (BBB) โดย BBB ประกอบด้วย เซลล์เอ็นโดทีเลียที่อยู่ชิดกันมาก, เซลล์เพอริไซต์ และเซลล์แอสโตรไซต์ (astrocyte) ที่อยู่รอบเซลล์เอ็นโดทีเลีย (รูปที่ 2.2) ซึ่งโครงสร้างของ BBB กั้นไม่ให้สารบางอย่างผ่าน ซึ่งส่วนมากเป็นสารโมเลกุลขนาดใหญ่ แต่ยอมให้สารบางอย่างผ่านได้ โดยเฉพาะสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ ก๊าซออกซิเจน, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์, ฮอรโมนบางชนิดที่สามารถละลายชั้นไขมันได้ เป็นต้น โดยสารบางอย่างที่จำเป็นต่อเซลล์สมองแต่ไม่สามารถผ่าน BBB ได้โดยตรง เช่น น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและกรดอะมิโน ต้องอาศัยตัวขนส่ง (transporters) ในการขนส่งผ่าน BBB ดังนั้น BBB จึงทำหน้าที่สำคัญในการป้องกันสมองจากสารที่เป็นอันตรายในเลือด และยินยอมให้สารที่จำเป็นต่อเซลล์สมองผ่านเข้าไปได้



รูปที่ 2.2 เซลล์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งประกอบเป็น blood brain barrier (Grammas, Martinez et al. 2011)

การเสียหายของหลอดเลือดในระบบไหลเวียนระดับจุลภาคในสมองจากภาวะต่าง ๆ เช่น ischemia/reperfusion, stroke เป็นต้น ทำให้ BBB ไม่สามารถทำงานได้ปกติ (BBB dysfunction) และหลอดเลือดจุลภาคเกิดอุดตัน (microvascular clogging) ได้ ซึ่งจะส่งผลให้สมองได้รับอันตรายหรือเกิดพยาธิสภาพตามมาได้

2.4 การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองในช่วงสูงวัย

การเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องของประชากรผู้สูงอายุพบว่ามีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอัตราการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคหลอดเลือดสมองในผู้สูงอายุ โดยจากการรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) ในปี 2014 พบว่าโรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของผู้สูงอายุทั่วโลก และพบว่าอัตราการเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดสมองในประชากรผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นจาก 54.5 ล้านคนในปี 1990 เป็น 66.4 ล้านคนในปี 2010 สถานะการณ์โรคหลอดเลือดสมองในประเทศไทยก็มีแนวโน้มเดียวกับทั่วโลก (Poungvarin 2007) กล่าวคือโรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ในประชากรผู้สูงอายุไทยทั้งเพศชายและเพศหญิง

การควบคุมการไหลเวียนของเลือดในสมองมีลักษณะจำเพาะที่เรียกว่า cerebral autoregulation ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อรักษาปริมาณเลือดที่ไหลเข้าสู่สมองได้อย่างเพียงพอและคงที่ นอกจากนี้สมองยังมีความไวในการปรับตัวเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงปริมาตรเลือดไหลเวียนในสมองโดยผ่านกลไก autoregulation นี้ (Brown and Frackowiak 1991) อย่างไรก็ตามในช่วงวัยสูงอายุพบที่มีความบกพร่องของ cerebral autoregulation โดยการตอบสนองของสมองต่อการเปลี่ยนแปลงของก๊าซออกซิเจน, ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และขบวนการเมตาบอลิซึมนั้นลดลง ทั้งนี้ความบกพร่องของ cerebral autoregulation ในช่วงสูงวัยมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจุลภาคที่สมอง (Brown and Frackowiak 1991)

BBB เป็นโครงสร้างที่มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันอันตรายให้สมอง โดย BBB ทำหน้าที่เป็นตัวกรองสิ่งที่มีกับเลือดก่อนผ่านเข้าสู่สมอง ในช่วงสูงวัยพบว่าความสามารถของ BBB ในการคัดกรองสารต่าง ๆ ในเลือดลดลง ร่วมกับการเปลี่ยนแปลงของผนังของหลอดเลือด ได้แก่ ความหนาของผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้น, ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดลดลง, เซลล์เอ็นโดทีเลียลเกิด apoptosis เป็นต้น (Elahy, Jackaman et al. 2015) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้อาจเป็นส่วนสำคัญในการทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ BBB ซึ่งอาจนำไปสู่ภาวะความผิดปกติของสมองต่อไปได้

ปกติอัตราการไหลของเลือดในสมอง (cerebral blood flow; CBF) คงที่อาศัยกลไกการควบคุมแบบ autoregulation ของหลอดเลือดสมอง แต่ในช่วงสูงวัยพบว่าอัตราการไหลของเลือดที่สมองลดลง (Leoni, Oliveira et al. 2017) โดยการลดลงของ CBF ของสมองส่วน grey matter มากกว่า white matter นอกจากนี้มีรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการลดลงของ CBF ในช่วงวัยและอัตราการเกิดโรคสมองเสื่อม (dementia) และโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) (Deary, Corley et al. 2009)

การควบคุมการทำงานของหลอดเลือดแบบ autoregulation ขึ้นอยู่กับความคงอยู่เซลล์เอ็นโดทีเลียลของหลอดเลือด มีรายงานว่าในช่วงสูงวัยพบการควบคุมการทำงานของหลอดเลือดแบบ autoregulation ลดลง เนื่องจากผลของความเสื่อมของผนังหลอดเลือด และการสะสมของกรดแล

คติจากกระบวนการเมตาบอลิซึมแบบแอนาโรบิก (Hossmann 2012) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึง การเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคของสมองที่ลดลงในช่วงสูงวัย (Murugesan, Demarest et al. 2012, Tang, Wang et al. 2016)

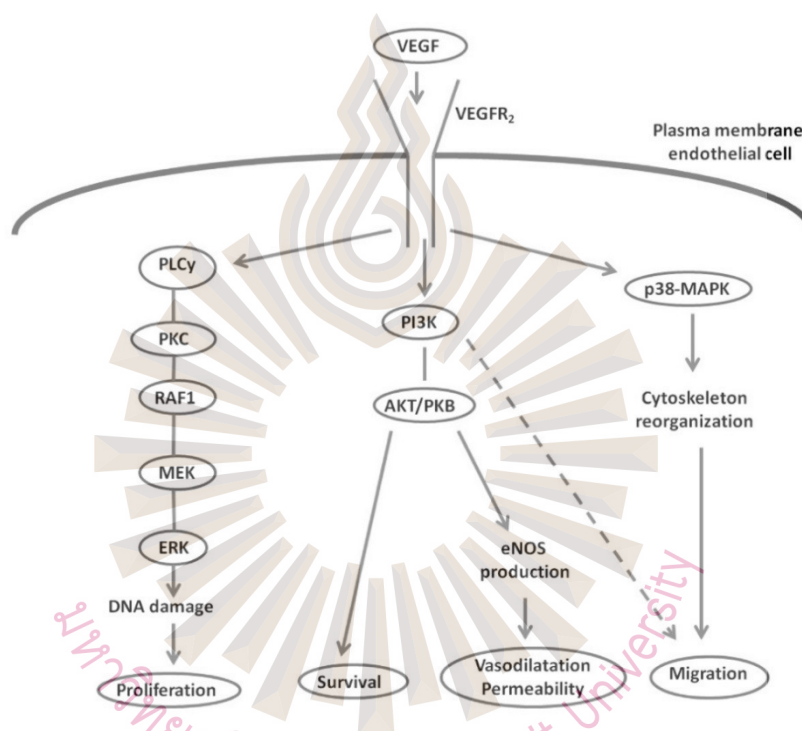
ปัจจุบันมีการรายงานถึงความเกี่ยวข้องของภาวะออกซิเดชันต่อการเปลี่ยนแปลงของ หลอดเลือดในช่วงสูงวัย (Hoenig, Bianchi et al. 2008) และโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะสูงวัย ได้แก่ โรค สมองเสื่อม (dementia), โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) เป็นต้น โดยเซลล์เอ็นโดทีเลียซึ่งเป็นเป้าหมาย หลักในการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน จึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดพยาธิสรีรวิทยาของหลอดเลือด ในช่วงสูงวัย (Cahill-Smith and Li 2014) ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide; NO) สร้างจากเซลล์เอ็นโดทีเลียมีบทบาทสำคัญในการควบคุมอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง โดยพบว่า NO มีการทำงาน บกพร่องในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระในระดับสูง และทำให้เกิดการบกพร่องในการควบคุมอัตราการ ไหลเวียนเลือดที่สมอง (Ungvari, Parrado-Fernandez et al. 2008) อีกทั้ง Park และคณะ (Park, Anrather et al. 2007) พบว่ามีการสร้างสารอนุมูลอิสระ superoxide เพิ่มขึ้นในหลอดเลือด สมองของทั้งส่วน penetrating vessels และ parenchymal vessels ของหนูแก่ นอกจากนี้ Tripathy และคณะ (Tripathy, Yin et al. 2010) รายงานว่ามีภาวะเครียดออกซิเดชันจากปฏิกิริยา ออกเดชันของโปรตีนเพิ่มขึ้น และการแสดงของของเอนไซม์ superoxide dismutase ในไมโทคอนเดรีย (MnSOD) ลดลงในหลอดเลือดสมองของหนูแก่

2.5 วิธีจีเอฟ (VEGF)

Vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ที่มี บทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ โดย VEGF กระตุ้นเซลล์เอ็นโดทีเลียให้มีการเพิ่ม จำนวนและเคลื่อนที่ย้ายมารวมกันเป็นหลอดเลือดอันใหม่ ซึ่ง VEGF ออกฤทธิ์ผ่านการจับกับตัวรับ รู้ (receptor) ประเภท tyrosine kinase receptor โดย VEGF receptor (VEGFR) มี 3 ชนิด คือ VEGFR1, VEGFR2 และ VEGFR3 (Yamazaki and Morita 2006) โดยจากหลักฐานที่พบในปัจจุบัน VEGFR2 เป็นตัวรับรู้ที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ทั้งในภาวะปกติและในภาวะที่มี พยาธิสภาพ (Melincovici, Boşca et al. 2018) เมื่อ VEGF จับกับ VEGFR2 จะกระตุ้นให้เกิดการ เต็มหมู่ฟอสเฟตของ VEGFR ในส่วนที่ยื่นเข้าไปในเซลล์ (intracellular domain) (รูปที่ 2.3) จากนั้น จะมีการกระตุ้นการถ่ายทอดสัญญาณ (signaling transduction) ในหลากหลายวิถีการถ่ายทอด สัญญาณ (signaling pathway) (Neufeld, Cohen et al. 1999)

มีการรายงานถึงความสัมพันธ์ระหว่างการบกพร่องของกระบวนการเกิดหลอดเลือดใหม่และ การลดลงของปริมาณ VEGF ในหลาย ๆ อวัยวะ ได้แก่ การศึกษาของ Wagatsuma พบว่ากล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูทดลองอายุ 22 เดือน มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอย (capillary

density) ลดลง ร่วมกับการลดลงของระดับ messenger RNA (mRNA) ของ VEGF, VEGFR1 และ VEGFR2 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองอายุ 2.5 และ 6 เดือน (Wagatsuma 2006) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Villar-Cheda และคณะ พบว่าหนูทดลองอายุ 24 เดือน มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยลดลงที่สมองบริเวณ substantia nigra เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองอายุ 4 เดือน โดยการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับความลดลงของระดับ VEGF mRNA (Villar-Cheda, Sousa-Ribeiro et al. 2009)

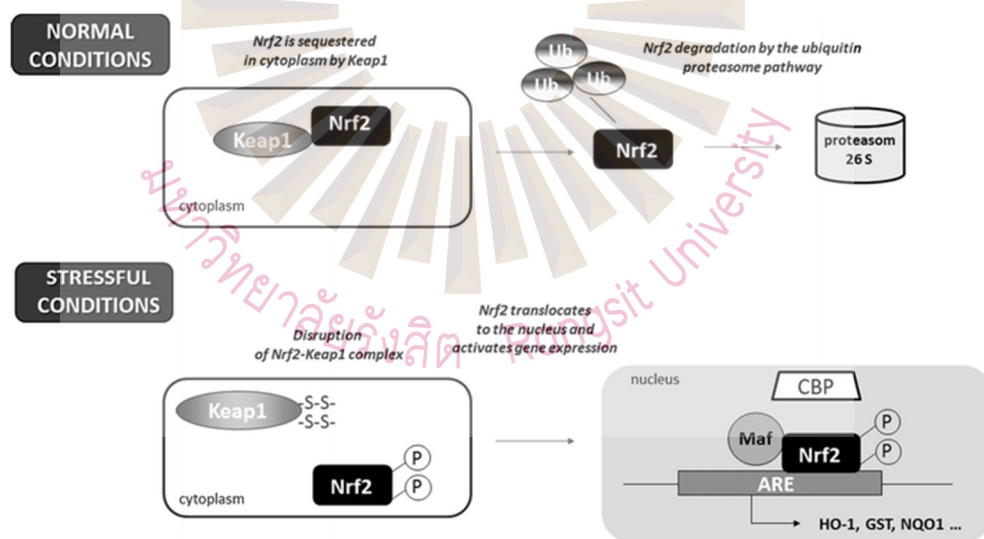


รูปที่ 2.3 วิธีการถ่ายทอดสัญญาณของ VEGF/VEGFR2 (VEGF/VEGFR2 signaling pathways) ในการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Melincovici, Boşca et al. 2018)

2.6 เอ็นอาร์เอฟ 2 (Nrf2)

Nuclear factor erythroid 2-related factors 2 (Nrf2) คือ ทรานสคริปชันแฟคเตอร์ (transcription factor) มีหน้าที่สำคัญต่อการควบคุมสมดุลรีดอกซ์ (redox homeostasis) การสร้างสารต้านอนุมูลอิสระ และกระบวนการ phase II detoxification ภายใต้ภาวะความเครียดของเซลล์ ดังนั้นเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยความเครียด Nrf2 จะทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของเอนไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant defenses) และเอนไซม์ในกระบวนการ phase II detoxification (Loboda, Damulewicz et al. 2016) ในสภาวะปกติ Nrf2

จับอยู่กับโปรตีนที่อยู่ในไซโตพลาสซึมซึ่งมีชื่อว่า Kelch-like erythroid cell-derived protein with cap 'n' collar homology associated protein 1 (Keap1) ในรูปแบบของ Nrf2-Keap1 complex โดย Keap1 กระตุ้นการย่อยสลาย Nrf2 ทำให้พบ Nrf2 ไม่มากและคงอยู่เฉพาะภายในไซโตพลาสซึม แต่เมื่อเซลล์อยู่ภายใต้ภาวะเครียดออกซิเดชันจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง (conformational change) ของ Keap1 ทำให้ Nrf2 หลุดจาก Keap1 และ Nrf2 ไม่ถูกย่อยสลาย จากนั้น Nrf2 จึงเคลื่อนตัวเข้าสู่นิวเคลียสและเข้าจับกับดีเอ็นเอส่วนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant response element; ARE) (รูปที่ 2.4) มีผลให้เกิดการแสดงออกของเอนไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระ โดยการแสดงออกของเอนไซม์ภายใต้การควบคุมของ Nrf2 ที่สำคัญ คือ NAD(P)H quinone oxidoreductase-1 (NQO1), heme oxygenase 1 (HO-1) และ glutathione S-transferase (GST) (Loboda, Damulewicz et al. 2016) นอกจากนี้ยังพบว่าการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Nrf2 โดยเอนไซม์ไคเนส เช่น phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K), protein kinase C (PKC), mitogen activated protein kinase (MAPK) เป็นต้น สามารถทำให้ Nrf2 หลุดเป็นอิสระจาก Keap1 ได้เช่นกัน (Buendia, Michalska et al. 2016)

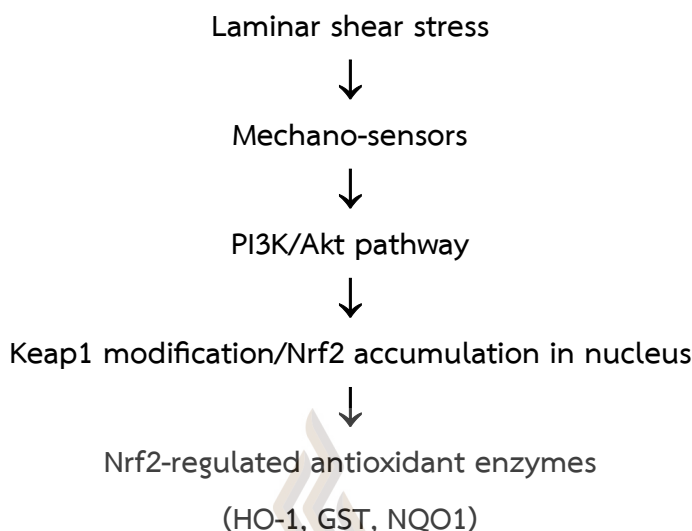


รูปที่ 2.4 วิธี Keap1/Nrf2/ARE ภายใต้ภาวะปกติและภาวะที่ได้รับการกระตุ้นจากภาวะเครียดต่าง ๆ ได้แก่ ภาวะเครียดออกซิเดชัน เป็นต้น (Loboda, Damulewicz et al. 2016)

ความเครียดออกซิเดชันจากการเสียสมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระพบได้ในภาวะสูงวัยซึ่งเป็นไปตามทฤษฎี free radical theory of aging (Harman 1956) นั่นคือ

ในช่วงสูงวัยเซลล์มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระลดลง กลไกสำคัญของการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในช่วงสูงวัย คือความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระของเซลล์ลดลง ได้แก่ การลดลงของระดับสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์, การบกพร่องในการตอบสนองของสารต้านอนุมูลอิสระต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน เป็นต้น โดยปกติภายในเซลล์มีกลไกกำจัดสารอนุมูลอิสระเพื่อไม่ให้สารอนุมูลอิสระทำลายโครงสร้างและการทำงานของเซลล์นั้น ๆ ได้ ซึ่งกลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระของเซลล์มี 2 แบบ คือ แบบใช้เอนไซม์ (enzymatic antioxidant) และแบบไม่ใช้เอนไซม์ (non-enzymatic antioxidant) โดยพบว่ากลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระแบบใช้เอนไซม์สำคัญ ๆ ถูกควบคุมโดย Nrf2 ได้แก่ superoxide dismutase, catalase, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), peroxiredoxin (Prdx), glutathione peroxidase (GPx), glutathione s-transferase, sulfiredoxin และ thioredoxin reductase (Zhang, Davies, & Forman, 2015) เป็นต้น อย่างไรก็ตามในช่วงสูงวัยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของ Nrf2 คือการลดลงของระดับ Nrf2 ในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ตับของหนูแก่ (Suh, Shenvi et al. 2004) การลดลงของระดับ Nrf2 ในนิวเคลียสร่วมกับการลดลงของเอนไซม์ NQO-1 และ HO-1 ในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูแก่ (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011) การทำงานของ Nrf2 ในการควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ลดลงในตับ ปอด และสมองของหนูแก่ (Zhang, Liu et al. 2012) หลอดเลือดแดงใหญ่ และหลอดเลือดแดง carotid ในลิงแก่ (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011) เป็นต้น

การทำงานของ Nrf2 เกี่ยวข้องกับการควบคุมความสามารถของเซลล์เอ็นโดทีเลียลในกระบวนการเกิดหลอดเลือดใหม่ โดยพบว่าการขัดขวางการทำงานของ Nrf2 ทำให้เกิดการบกพร่องของการกระตุ้นขบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย VEGF และ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ในขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นโดทีเลียล และการสร้างท่อหลอดเลือดใน human coronary arterial endothelial cells (HCAECs) (Valcarcel-Ares, Gautam et al. 2012) ปัจจุบันพบว่าปัจจัยสำคัญในการกระตุ้น Nrf2 ของเซลล์เอ็นโดทีเลียลคือ แรงเฉือน (shear stress) ที่กระทำต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียลผ่านวิถี PI3K/Akt (รูปที่ 2.5) ในช่วงสูงวัยพบการลดลงของอัตราการไหลของเลือดซึ่งเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการสูญเสียการทำงานของ Nrf2 ของเซลล์เอ็นโดทีเลียลผ่านการกลไกการเปลี่ยนแปลงแรงเฉือนที่กระทำต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียล (Dai, Vaughn et al. 2007) นอกจากนี้งานวิจัยเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในช่วงสูงวัยรายงานความสัมพันธ์ระหว่างภาวะเครียดออกซิเดชันของหลอดเลือดและการลดลงของการแสดงออกและหน้าที่ของ Nrf2 ของหลอดเลือดแดงใหญ่ (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011) อย่างไรก็ตามยังไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและบทบาทของ Nrf2 ในสมองในช่วงสูงวัย



รูปที่ 2.5 บทบาทของแรงเฉือนต่อวิถี Keap1/Nrf2 ของเซลล์เอ็นโดทีเลียส (Noguchi and Jo 2011)

2.7 บทบาทของการฝึกออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกายได้ ซึ่งส่งผลดีต่อการทำงานของร่างกาย โดยเฉพาะผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด ได้แก่ อัตราการเต้นของหัวใจขณะพักลดลง, การเพิ่มขึ้นของความสามารถของหัวใจในขบวนการสร้างพลังงานแบบใช้ออกซิเจน, การเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ เป็นต้น (Kojda and Hambrecht 2005) นอกจากนี้การฝึกออกกำลังกายยังกระตุ้นการทำงานของขบวนการต้านอนุมูลอิสระภายในหลอดเลือด, กระตุ้นกระบวนการเกิดหลอดเลือดใหม่ และช่วยเพิ่มปริมาณเลือดไปเลี้ยงสมองมากขึ้น (Churchill, Galvez et al. 2002)

ในช่วงสูงวัยพบว่าการฝึกออกกำลังกายสามารถเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดไปยังสมอง โดยเฉพาะสมองส่วนที่เกี่ยวข้องการเรียนรู้และความจำ (Colcombe, Kramer et al. 2004) โดยการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดไปยังสมองนั้น พบว่าสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของก๊าซไนตริกออกไซด์ ซึ่งสร้างจากเซลล์เอ็นโดทีเลียส ซึ่งก๊าซไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (Uchida, Suzuki et al. 2006) นอกจากนี้พบว่าการฝึกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสของเซลล์เอ็นโดทีเลียส (endothelial nitric oxide synthase; eNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดที่สมอง (Kojda and Hambrecht 2005)

การฝึกออกกำลังกายทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด ได้แก่ การเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดจุลภาค (กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่) และการเพิ่มขนาดของหลอดเลือด (arteriogenesis) (Prior, Yang et al. 2004) โดยการสร้างหลอดเลือดใหม่จากการฝึกออกกำลังกาย

ทำให้ช่วยเพิ่มปริมาณเลือดไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มขึ้น เช่น หัวใจ, กล้ามเนื้อโครงร่าง และสมอง เป็นต้น ซึ่งการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดจุลภาคในอวัยวะต่าง ๆ ส่วนหนึ่งเกิดจากการเพิ่มขึ้นของวาสคูลาร์โกรทแฟคเตอร์ (VEGF) ซึ่งเป็นสารหลักในการกระตุ้นขบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Hoier and Hellsten 2014) ทั้งนี้มีรายงานว่าการศึกษาการฝึกออกกำลังกายเป็นเวลา 3 สัปดาห์สามารถเพิ่มความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในส่วน frontoparietal cortex และ dorsolateral striatum และโปรตีน VEGF และ VEGF mRNA ในสมองของหนูทดลองอายุ 22 เดือน (Ding, Li et al. 2006) นอกจากนี้การศึกษาของ Popov และคณะ พบว่าการฝึกออกกำลังกายเป็นเวลา 14 วัน มีผลให้กล้ามเนื้อน่อง (gastrocnemius muscle) ของหนูทดลองอายุ 9 สัปดาห์มีความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (Popov, Lysenko et al. 2018) โดยปัจจุบันกลไกที่อธิบายผลของการฝึกออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีความเชื่อว่ามี mốiเกี่ยวข้องกันระหว่างการเพิ่มขึ้นของแรงเฉือนกระทำต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียลกับการฝึกออกกำลังกาย (Kojda and Hambrecht 2005) ซึ่งพบว่าแรงเฉือนเป็นตัวกระตุ้นสำคัญของเซลล์เอ็นโดทีเลียลต่อการเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่และกระตุ้นการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ที่สมอง (Padilla, Simmons et al. 2011)

ถึงแม้ว่าขณะออกกำลังกายในแต่ละครั้ง (acute exercise) ทำให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น แต่การฝึกออกกำลังกาย (exercise training) สามารถกระตุ้นขบวนการต้านอนุมูลอิสระและป้องกันการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ได้ (Walther, Gielen et al. 2004) ซึ่งผลของการฝึกออกกำลังกายนี้เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์เอ็นโดทีเลียล ซึ่งพบว่าขณะการออกกำลังกายมีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นนั้น ร่างกายตอบสนองการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลโดยการกระตุ้นการทำงานของขบวนการต้านอนุมูลอิสระของเซลล์เอ็นโดทีเลียล (Kojda and Hambrecht 2005) ดังนั้นการออกกำลังกายซ้ำ ๆ ส่งผลดีต่อร่างกายในการเพิ่มศักยภาพของขบวนการต้านอนุมูลอิสระได้

ในช่วงสูงวัยพบว่าการฝึกออกกำลังกายสามารถเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดไปยังสมอง โดยเฉพาะสมองส่วนที่เกี่ยวข้องการเรียนรู้และความจำ (Colcombe, Kramer et al. 2004) โดยการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดไปยังสมองนั้นพบว่าสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของก๊าซไนตริกออกไซด์ซึ่งสร้างจากเซลล์เอ็นโดทีเลียล ซึ่งก๊าซไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญต่อการกำจัดสารอนุมูลอิสระ (Uchida, Suzuki et al. 2006) นอกจากนี้พบว่าการฝึกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสของเซลล์เอ็นโดทีเลียล (endothelial nitric oxide synthase; eNOS) ซึ่งเป็นเอนไซม์กระตุ้นการสร้างก๊าซไนตริกออกไซด์ในหลอดเลือดที่สมอง (Kojda and Hambrecht 2005)

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ทุกขั้นตอนในการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองของโครงการวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลและการใช้สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ และดำเนินการตามคำแนะนำของสถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สำนักงานการวิจัยแห่งชาติ โดยงานวิจัยนี้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 16 สัปดาห์ และ 52 สัปดาห์ จากบริษัทเอ็ม-เคลีย ไบโอรี่ ซอร์ส และนำมาเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งสัตว์ทดลองถูกเลี้ยงในกรงพลาสติกกึ่งใสทรงสี่เหลี่ยมผืนผ้าสำหรับหนูแรทจำนวน 2 ตัวต่อกรง ภายใต้การควบคุมระยะเวลาการให้แสงสว่างและความมืด (12 ชั่วโมง: 12 ชั่วโมง), อุณหภูมิ (22 ± 1 องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ (30-70%) โดยสัตว์ทดลองสามารถกินอาหารและน้ำได้อย่างเพียงพอตามความต้องการในแต่ละวัน ทั้งนี้โครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการรับรองจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยรังสิตด้วย

3.2 วิธีดำเนินการทดลอง

ในงานวิจัยนี้แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (sedentary-young) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมอายุ (age-control group) โดยถูกนำไปยังห้องออกกำลังกาย แต่อยู่เพียงภายในกรงไม่ได้ออกกำลังกาย

กลุ่มที่ 2 หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (sedentary-aged) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมกิจกรรม (sham-control group) โดยถูกนำไปยังห้องออกกำลังกาย และถูกนำไปแช่ในถังบรรจุน้ำที่มีความสูง 5 เซนติเมตร นาน 30 นาทีต่อวัน, 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (exercise-aged) โดยถูกนำไปยังห้องออกกำลังกาย และถูกนำไปว่ายน้ำในถังบรรจุน้ำที่มีความสูง 50 เซนติเมตร นาน 60 นาทีต่อวัน, 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 8 สัปดาห์

สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับการชั่งน้ำหนักในวันแรกของแต่ละสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อถึงกำหนดวันทำการทดลอง สัตว์ทดลองได้รับยาสลบ sodium pentobarbital (60 mg/kg body weight) เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection) จากนั้นสัตว์ทดลองถูกสอดท่อช่วยหายใจ

(tracheostomy) แล้วทำการสอดท่อเข้าทางหลอดเลือด femoral artery ข้างขวา เพื่อวัดความดันโลหิตด้วยระบบ PowerLab หลังจากการวัดความดันโลหิตเรียบร้อยแล้ว สัตว์ทดลองถูกทำการ perfusion หลอดเลือดทั่วทั้งตัวของสัตว์ทดลอง โดยการฉีดสารละลาย phosphate-buffered saline (PBS) ที่มีส่วนผสมของ heparin (25 UI/ml) ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เข้าทางหัวใจห้องล่างซ้าย จากนั้นทำการเก็บสมองส่วน cerebral cortex ออกมาล้างด้วยสารละลาย PBS แล้วตัดแบ่งชิ้นเนื้อสมองบริเวณ frontoparietal cortex ออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 มีความหนา 2 มิลลิเมตร นำไปแช่ในสารละลาย 4% paraformaldehyde เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ทางอิมมูโนพยาธิวิทยา และส่วนที่ 2 ตัดชิ้นน้ำหนักและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการแยกสกัดหลอดเลือดจุลภาคสมอง (isolation of brain microvessel) และตรวจวิเคราะห์ปฏิกิริยาอิมมูโนแอสเสย์ (immunoassay) ต่อไป

3.3 โปรแกรมการออกกำลังกาย

การฝึกออกกำลังกายสำหรับสัตว์ทดลองในโครงการวิจัยนี้ เป็นการออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำในระดับความหนักปานกลาง โดยอ้างอิงจาก Viboolvorakul และคณะ (Viboolvorakul and Patumraj 2014) และ Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocol, American Physiological Society (Kregel, Allen et al. 2006) สำหรับแต่ละวันในการออกกำลังกาย สัตว์ทดลองถูกนำไปยังห้องสำหรับการฝึกออกกำลังกายและว่ายน้ำในถังพลาสติกที่มีลักษณะกึ่งใส (เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร, สูง 65 เซนติเมตร) ซึ่งบรรจุน้ำสูง 50-55 เซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิ (33-37 องศาเซลเซียส) เพื่อไม่ให้สัตว์ทดลองเกิดความเครียดในขณะที่ว่ายน้ำ โดยสัตว์ทดลองออกกำลังกาย 1 ครั้งต่อวัน, 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 8 สัปดาห์ ในสัปดาห์แรกซึ่งเป็นสัปดาห์ของการปรับตัวของสัตว์ทดลองต่อการออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำ สัตว์ทดลองจึงเริ่มว่ายน้ำ 15 นาทีในวันแรก แล้วค่อย ๆ เพิ่มระยะเวลาในการออกกำลังกายจนกระทั่งครบ 60 นาทีภายในสัปดาห์แรก หลังจากนั้นสัตว์ทดลองใช้เวลาในการว่ายน้ำคือ 60 นาที ตลอด 7 สัปดาห์ที่เหลือ เมื่อสิ้นสุดการว่ายน้ำในแต่ละครั้ง สัตว์ทดลองถูกนำมาทำให้แห้งด้วยการเช็ดตัวด้วยผ้าขนหนูและเป่าด้วยเครื่องเป่าผม

สำหรับสัตว์ทดลองในกลุ่มอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (sedentary-aged) ถูกนำมายังห้องสำหรับฝึกออกกำลังกาย และถูกนำไปแช่อยู่ในถังพลาสติกที่มีลักษณะกึ่งใส (เส้นผ่าศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร, สูง 65 เซนติเมตร) บรรจุน้ำสูง 5 เซนติเมตร และควบคุมอุณหภูมิ (33-37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ใน 2 วันแรก และเพิ่มเป็น 20-30 นาที ในวันที่ 3-5 ตามลำดับ ส่วนในอีก 7 สัปดาห์ที่เหลือ สัตว์ทดลองกลุ่ม sedentary-aged ถูกนำไปแช่เป็นเวลา 30 นาทีต่อวัน, 5 วันต่อสัปดาห์ นาน 8 สัปดาห์ โดยเมื่อสิ้นสุดการแช่น้ำในแต่ละครั้ง สัตว์ทดลองถูกนำมาทำให้แห้งด้วยการเช็ดตัวด้วยผ้าขนหนูและเป่าด้วยเครื่องเป่าผม

3.4 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางอิมมูโนพยาธิวิทยา

นำชิ้นเนื้อสมองที่แช่ในสารละลาย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ใน ethanol ความเข้มข้น 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% ตามลำดับ จากนั้นนำชิ้นเนื้อแช่ใน xylene และ paraffin เหลวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำชิ้นเนื้อฝังใน paraffin ด้วยเครื่อง embedding และทำการตัดชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 2 ไมโครเมตร (section) จากนั้นนำ section ไปลอยในอ่างน้ำผสมเจลาตินที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เพื่อให้ paraffin หลอมเหลว แล้วใช้สไลด์แก้วซ้อนเก็บ section นั้น จากนั้นนำสไลด์ฝังให้แห้งและนำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

3.5 การย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (Immunohistochemistry; IHC)

ทำการ deparaffinization และ re-hydration section ด้วยการแช่ section ใน xylene และ ethanol ที่ความเข้มข้น 100%, 95% และ 90% ตามลำดับ จากนั้นนำ section แช่ในสารละลาย antigen retrieval buffer (Dako, Denmark) นาน 30 นาที เพื่อเป็นการคืนสภาพ antigen หรือทำให้ antibody สามารถจับกับ antigen ได้ จากนั้นนำ section แช่ในสารละลาย 3% H₂O₂ นาน 30 นาที เพื่อยับยั้ง endogenous enzymes ไม่ให้รบกวนการจับระหว่าง antigen และ antibody จากนั้นแช่ section ในสารละลาย nonspecific protein blocking reagent (Dako, Denmark) นาน 30 นาที เพื่อยับยั้งการจับอย่างไม่จำเพาะต่อปฏิกิริยาระหว่าง antigen และ antibody จากนั้นนำ section ไปแช่ในสารละลาย rabbit polyclonal primary antibody ต่อ Nrf2 (1:100 dilution, Abcam, UK) หรือ CD31 (1:100 dilution, Thermo Fisher Scientific, USA) ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน หลังจากนั้นนำ section ไปแช่ในสารละลาย peroxidase-labeled polymer-HRP conjugated to goat anti-rabbit immunoglobulins (EnVision Detection System Kit, Dako, Denmark) นาน 30 นาที จากนั้นแช่ section ด้วยสารละลาย diaminobenzidine chromogen (DAB) (DAB เป็นส่วนหนึ่งของ EnVision Detection System Kit) นาน 5 นาที นำ section ไป counterstain ด้วยสารละลาย hematoxylin นาน 1 นาที จากนั้นนำ section ที่ย้อมเสร็จแล้วแช่ใน ethanol ที่ความเข้มข้น 95% และ 100% และ xylene ตามลำดับ หยดน้ำยา permount ปิดสไลด์ด้วย cover slip นำสไลด์ไปดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่าน (Nikon, Japan)

3.6 การเก็บตัวอย่างภาพ (Image acquisition)

การเก็บตัวอย่างภาพที่ถูกบันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบแสงส่องผ่านที่มีอุปกรณ์ถ่ายภาพดิจิทัล (Nikon, Japan) กำลังขยายที่ 40X โดยแต่ละ section ถูกแบ่งย่อยเป็น 8 ส่วน และในแต่ละส่วน (area) ทำการบันทึกภาพจำนวน 5 ภาพ ซึ่งตำแหน่งของการบันทึกภาพในแต่ละ area เหมือนกันทุกครั้ง ดังนั้นภาพย้อม IHC ของแต่ละ section มีทั้งหมด 40 ภาพ และเนื่องจากการย้อม IHC ทำแบบ duplication จึงทำให้ภาพย้อม IHC ที่ได้จากสัตว์ทดลองแต่ละตัวมีจำนวน 80 ภาพ

3.7 การวิเคราะห์ภาพเชิงปริมาณ (Quantitative image analysis)

วิธีการวิเคราะห์ภาพย้อม IHC เชิงปริมาณปรับปรุงจาก Li และคณะ (Li, Suwanwela et al. 2017) โดยใช้โปรแกรม Image pro plus 6.0 (Media Cybernetics, USA) ซึ่ง pixel ของภาพที่ติดสีน้ำตาล (DAB-positive intensity) และ pixel ของภาพที่ไม่ติดสีน้ำตาล (DAB-negative intensity) ถูกคำนวณเป็นค่า % intensity ของ antibody ติดสีย้อม IHC ดังสมการ

$$\% \text{ positive Intensity} = (\text{positive intensity} / \text{total intensity}) \times 100$$

3.8 การแยกสกัดหลอดเลือดจุลภาคสมอง (Isolation of brain microvessels)

สำหรับขั้นตอนการแยกสกัดหลอดเลือดจุลภาคสมอง (Brzica, Abdullahi et al. 2018) เนื้อเยื่อสมอง (cortical brain tissue) ถูกนำมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ในสารละลาย brain microvessel buffer (BMB) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มี protease inhibitor cocktail หลังจากนั้นเติมสารละลาย 26% dextran ปริมาตร 8 มิลลิลิตร ลงในเนื้อสมองที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว (brain tissue homogenate) และทำการหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็ว 5,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ที่ทิ้ง และนำส่วนของตะกอน (pellet) ไปสู่ขั้นตอนการทำให้เป็นเนื้อเดียวกันและหมุนเหวี่ยงซ้ำทั้งหมดอีก 3 รอบ (ทำซ้ำเช่นเดียวกันกับขั้นตอนที่กล่าวไปข้างต้น) โดยทำการดูดส่วนของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง ซึ่งในรอบสุดท้ายได้ตะกอนของหลอดเลือดจุลภาคสมอง (brain microvessel pellet) จากนั้นนำส่วนของตะกอนของหลอดเลือดจุลภาคมาทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในสารละลาย BMB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดในส่วนของเหลวเหนือตะกอนทิ้ง และเก็บส่วนของหลอดเลือดจุลภาคสมอง (brain microvessels fraction) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปทำการวัดปฏิกิริยาอินมูโนแอสเสย์ (immunoassay) ต่อไป

3.9 การวัดปฏิกิริยาอิมมูโนแอสเสย์ (immunoassay)

1) การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน VEGF ในสมอง

เริ่มจากการนำเนื้อสมองบริเวณ frontoparietal cortex มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ในสารละลาย RIPA lysis buffer (4°C) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มี protease inhibitors จากนั้นเนื้อสมองที่เป็นเนื้อเดียวกัน (brain tissue homogenate) ถูกนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โดยส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) ถูกนำไปวัดหาปริมาณโปรตีนรวม (total protein) ด้วยชุดตรวจ bicinchoninic acid (BCA) assay kit (23252, Pierce, USA) และปริมาณโปรตีน VEGF ด้วยชุดตรวจ VEGF ELISA Kit (MMV00, R&D Systems, USA)

2) การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมอง

ชุด nuclear extraction kit (Abcam, ab113474) ถูกใช้ในการสกัดส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic fraction) และส่วนของนิวเคลียส (nuclear fraction) ของหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมอง (isolated brain microvessel) โดยเริ่มจากนำหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมอง มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenization) ในสารละลาย pre-extract buffer อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ที่มี protease inhibitor cocktail จากนั้นหลอดเลือดจุลภาคสมองที่เป็นเนื้อเดียวกันแล้ว (brain microvessel homogenate) ถูกนำไปหมุนเหวี่ยง (centrifugation) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยส่วนของเหลวเหนือตะกอน (supernatant) คือ ส่วนของไซโตพลาสซึม (cytoplasmic fraction) ซึ่งถูกนำไปวัดหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยชุดตรวจ BCA assay kit และวัดหาปริมาณโปรตีน HO-1 ด้วยชุดตรวจ HO-1 ELISA Kit (ab213968, Abcam, UK)

ส่วนของตะกอน (pellet) นำไปทำการสกัดส่วนของนิวเคลียส (nuclear fraction) เพื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน Nrf2 โดยทำการเติม extraction buffer อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และทำการเขย่าสารด้วยความเร็ว 3,200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 วินาที/ครั้ง ทุก ๆ 3 นาที เป็นเวลารวมทั้งหมด 15 นาที จากนั้นนำไปทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่องส่งคลื่นเสียงความถี่สูง (sonicator) และตามด้วยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยส่วนของเหลวเหนือตะกอนคือส่วนของ nuclear fraction ซึ่งถูกนำไปวัดหาปริมาณโปรตีนรวมด้วยชุดตรวจ BCA assay kit และวัดหาปริมาณโปรตีน Nrf2 ด้วยชุดตรวจ Nrf2 ELISA Kit (ab207223, Abcam, UK)

3.10 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองแสดงผลเป็นค่าเฉลี่ย (mean)±ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean; SEM) ซึ่งการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลที่ได้จากกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ใช้สถิติ One-way ANOVA และการเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มเป็นคู่ ๆ ใช้ Fisher's LDS test (GraphPad Prism 7.0) โดยแสดงความแตกต่างของข้อมูลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$) ส่วนการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรใช้สถิติสหสัมพันธ์แบบเพียร์สัน (Pearson correlation) ในการกำหนดค่า R-squared (coefficient of determination; R^2)



บทที่ 4
ผลการทดลอง และอภิปรายผล

4.1 ผลการทดลอง

4.1.1 ผลของการฝึกรอกกำลังกายต่อการปรับตัวทางสรีรวิทยาในหนูช่วงสูงวัย

น้ำหนักตัว (body weight) และความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial pressure; MAP) ของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (EA) แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 น้ำหนักตัว (body weight) และความดันเลือดแดงเฉลี่ย (mean arterial pressure) ของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกรอกกำลังกาย (EA)

	SY	SA	EA
Body weight (g)	567.13±8.15	758.36±21.18****	676.60±16.76**##
MAP (mmHg)	95.00±2.06	125.69±4.49***	110.28±1.88*#

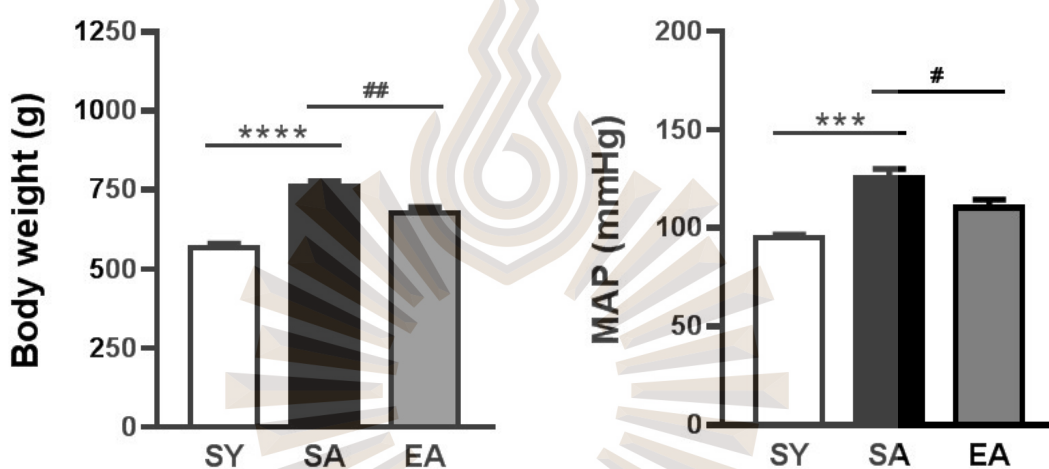
ค่าผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean) โดย ****,***, **, * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (P < 0.0001, P < 0.001, P < 0.001 และ P < 0.05 ตามลำดับ) และ ##, # มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA (P < 0.01 และ P < 0.05 ตามลำดับ)

4.1.1.1 ผลของฝึกรอกกำลังกายต่อน้ำหนักตัว

รูปที่ 4.1 (ซ้าย) แสดงน้ำหนักตัวของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (758.36±21.18 g) และกลุ่ม EA (676.60±16.74 g) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (567.13±8.15 g, P < 0.0001 และ P < 0.01 ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามน้ำหนักตัวของกลุ่ม EA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA (P < 0.01)

4.1.1.2 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อความดันเลือดแดงเฉลี่ย

รูปที่ 4.1 (ขวา) แสดงค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (125.69 ± 4.49 mmHg) และกลุ่ม EA (110.28 ± 1.88 mmHg) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (95.00 ± 2.06 mmHg, $P < 0.001$ และ $P < 0.5$ ตามลำดับ) อย่างไรก็ตามค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ยของกลุ่ม EA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.1 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อค่าน้ำหนักตัว (body weight; ซ้าย) และค่าความดันเลือดแดงเฉลี่ย (MAP; ขวา) ของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย ***,**** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.001$, $P < 0.0001$) และ #,## มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$, $P < 0.01$)

4.1.2 ผลของการฝีกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองของหนูช่วงสูงวัย

เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31, เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) แสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31, เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA)

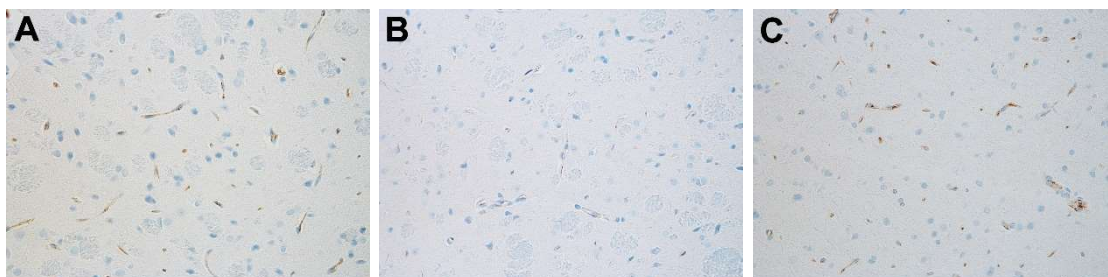
	SY	SA	EA
CD31 (%positive intensity)	0.079±0.014	0.026±0.005**	0.062±0.009 [#]
Nrf2 (%positive intensity)	54.39±4.49	25.79±1.03**	47.18±7.04 [#]
VEGF (pg/mg protein)	22.47±2.33	13.07±0.86**	16.66±1.29 [#]

ค่าผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (P < 0.01) และ [#]มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA (P < 0.05)

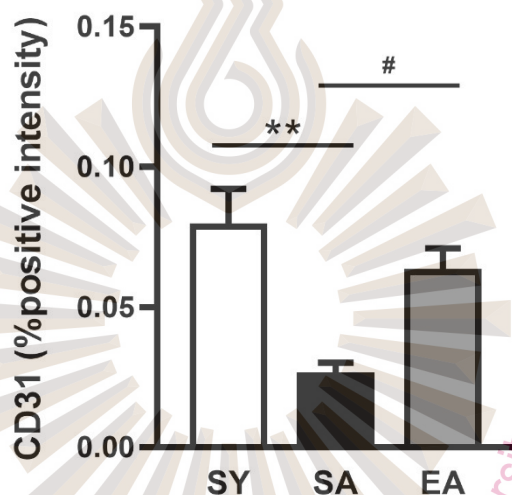
4.1.2.1 ผลของฝึกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมอง

รูปที่ 4.2 แสดงภาพของการแสดงออกของ CD31 ในชิ้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี มีสทธิของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยการแสดงออกของ CD31 ใช้เป็นดัชนีของความหนาแน่นของหลอดเลือดเลือดหลอดเลือดภาค ซึ่งพบว่าการแสดงออกของ CD31 ของกลุ่ม SY เป็นสีน้ำตาลกระจายไปทั่วทั้งชิ้นเนื้อสมอง ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA พบว่าการแสดงออกของ CD31 น้อยกว่าของกลุ่ม SY อย่างไรก็ตามการแสดงออกของ CD31 ของกลุ่ม EA มากกว่าของกลุ่ม SA

รูปที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (0.026±0.005) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (0.079±0.014, P < 0.01) นอกจากนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม EA (0.062±0.009) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA (P < 0.05)



รูปที่ 4.2 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อการแสดงออกของ CD31 ในชั้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรียของ A: หนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), B: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และ C: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA)



รูปที่ 4.3 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ #มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

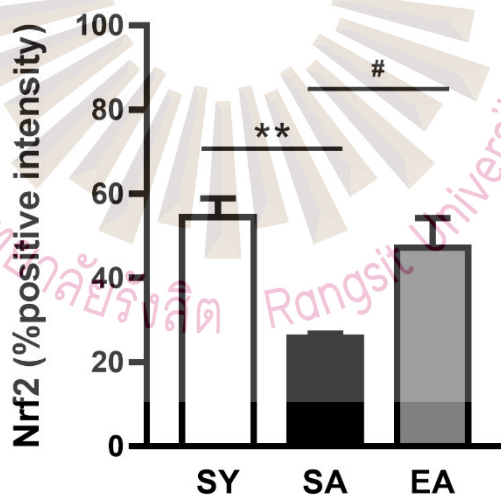
4.1.2.2 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ในสมอง

รูปที่ 4.4 แสดงภาพของการแสดงออกของ Nrf2 ในชั้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรียของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม ซึ่งพบว่า การแสดงออกของ Nrf2 ของกลุ่ม SY เป็นสีน้ำตาลกระจายไปทั่วทั้งชั้นเนื้อสมอง ในขณะที่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA พบว่าการแสดงออกของ Nrf2 น้อยกว่าของกลุ่ม SY อย่างไรก็ตาม การแสดงออกของ Nrf2 ของกลุ่ม EA มากกว่าของกลุ่ม SA

รูปที่ 4.5 แสดงเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (25.79 ± 1.03) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (54.39 ± 4.49 , $P < 0.01$) นอกจากนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม EA (47.18 ± 7.04) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)



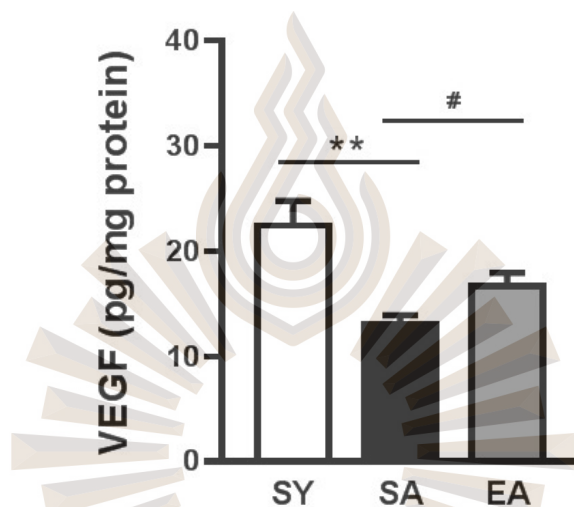
รูปที่ 4.4 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อการแสดงออกของ Nrf2 ในชิ้นเนื้อสมองด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรียของ A: หนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), B: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และ C: หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA)



รูปที่ 4.5 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ #มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

4.1.2.3 ผลของฝีกออกกำลังกายต่อปริมาณโปรตีน VEGF ในสมอง

รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าปริมาณโปรตีน VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (13.07 ± 0.86 pg/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (22.47 ± 2.33 pg/mg protein, $P < 0.01$) นอกจากนี้พบว่าปริมาณโปรตีน VEGF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม EA (16.66 ± 1.29 pg/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)



รูปที่ 4.6 ปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝีกออกกำลังกาย (EA) โดย **มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.01$) และ #มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

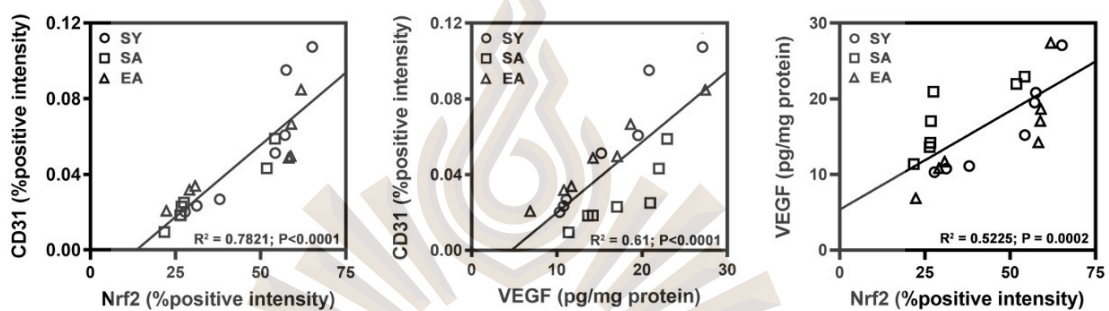
4.1.2.4 ผลของการฝีกออกกำลังกายต่อความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2, เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมอง

รูป 4.7 ซ้าย แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 = 0.7821$, $P < 0.0001$)

รูป 4.7 กลาง แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF และเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive

correlation) ระหว่างปริมาณโปรตีน VEGF และเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 = 0.61$, $P < 0.0001$)

รูป 4.7 ขวา แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 และปริมาณโปรตีน VEGF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2 = 0.5225$, $P = 0.0002$)



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ Nrf2 เปอร์เซ็นต์ positive intensity ของ CD31 และปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA) โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ที่ $R^2 = 0.7821$, $P < 0.001$ (ซ้าย), $R^2 = 0.61$, $P < 0.001$ (กลาง) และ $R^2 = 0.5225$, $P = 0.0002$ (ขวา) ตามลำดับ

4.1.3 ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูช่วงสูงวัย

ปริมาณโปรตีน Nrf2 และปริมาณโปรตีน HO-1 ในหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA) แสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ปริมาณโปรตีน Nrf2 และปริมาณโปรตีน HO-1 ในหลอดเลือดจูลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ไม่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ที่ได้รับการฝึกออกกำลังกาย (EA)

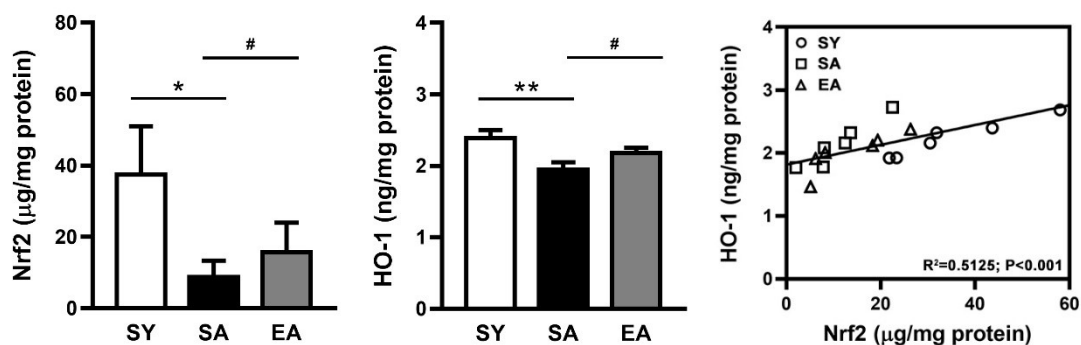
	SY	SA	EA
Nrf2 ($\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)	37.46 \pm 6.08	8.78 \pm 2.05***	15.68 \pm 3.73**
HO-1 (ng/mg protein)	2.39 \pm 0.11	1.95 \pm 0.10*	2.18 \pm 0.08*

ค่าผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean) โดย *,**,*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ)

รูปที่ 4.8 ซ้าย แสดงปริมาณโปรตีน Nrf2 ในหลอดเลือดจูลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าปริมาณโปรตีน Nrf2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (8.78 \pm 2.05 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) และกลุ่ม EA (15.68 \pm 3.73 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (37.46 \pm 6.08 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein), $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่าปริมาณ Nrf2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม EA (15.68 \pm 3.73 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

รูปที่ 4.8 กลาง แสดงปริมาณโปรตีน HO-1 ในหลอดเลือดจูลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม พบว่าปริมาณโปรตีน HO-1 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม SA (2.22 \pm 0.04 ng/mg protein) และกลุ่ม EA (2.35 \pm 0.08 ng/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (2.82 \pm 0.19 ng/mg protein, $P < 0.01$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ) นอกจากนี้พบว่าปริมาณ HO-1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม EA (2.35 \pm 0.08 ng/mg protein) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA ($P < 0.05$)

รูป 4.8 ขวา แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ของในหลอดเลือดจูลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูช่วงสูงวัยของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยพบว่ามีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ระหว่างปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R^2=0.5125$, $P < 0.001$)



รูปที่ 4.8 ผลของฝึกร่างกายต่อการปริมาณโปรตีน Nrf2 (ซ้าย) และ HO-1 (กลาง) ในหลอดเลือดจลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูแรทอายุ 16 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกร่างกาย (SY), หนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ไม่ได้รับการฝึกร่างกาย (SA) และหนูแรทอายุ 52 สัปดาห์ได้รับการฝึกร่างกาย (EA) โดย * , ** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 (ขวา) ของหนูแรททั้ง 3 กลุ่ม โดยมีความสัมพันธ์เชิงบวก (positive correlation) ที่ $R^2=0.5125$ และ $P < 0.001$

4.2 อภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาในสัตว์ทดลองคือหนูแรท ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของการฝึกร่างกายต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจลภาคในสมองช่วงสูงวัย โดยพบว่าการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจลภาค การแสดงออกของโปรตีน VEGF และ Nrf2 ในสมองช่วงสูงวัย สามารถถูกป้องกันได้ด้วยการฝึกร่างกายด้วยการว่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน VEGF ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ และการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Nrf2 ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความสามารถในการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน มีความสัมพันธ์กับผลของการฝึกร่างกายในการช่วยเพิ่มการเพิ่มความหนาแน่นของหลอดเลือดจลภาคของสมองช่วงสูงวัย

4.2.1 ผลของการฝึกร่างกายต่อการปรับตัวทางสรีรวิทยาในหนูแรทช่วงสูงวัย

การวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ามีมีการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย คือ น้ำหนักตัวและความดันเลือดแดงเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.1) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถป้องกันโดยการได้รับการฝึกร่างกายด้วยการว่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ดังนั้นผลของการปรับตัวทางสรีรวิทยาดังกล่าวสามารถยืนยันโปรแกรมการฝึกร่างกายที่ใช้ในการวิจัยนี้

จากผลการทดลองพบว่าหนูแรทกลุ่ม SA มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูแรทกลุ่ม SY อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวของหนูแรทกลุ่ม SA มีสาเหตุสำคัญจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณไขมันในร่างกายและการกระจายตัวสะสมของไขมันในร่างกาย ซึ่งเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของไขมันในร่างกายในช่วงสูงวัย (Liao, Hsieh et al. 2015) ที่เกิดจากการทำงานที่บกพร่องของไมโทคอนเดรีย (Barton 2010) อย่างไรก็ตามการฝึกออกกำลังกายสามารถช่วยลดน้ำหนักตัวช่วงสูงวัยได้ โดยการฝึกออกกำลังกายกระตุ้นการเผาผลาญไขมันในร่างกายผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันและช่วยควบคุมไขมันในเลือด (Shinoda, Latour et al. 2002) ซึ่งงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงการลดลงของน้ำหนักตัวในหนูกลุ่ม EA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน

ปัจจุบันเป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะความดันโลหิตสูงพบได้ในช่วงสูงวัย โดยพบว่าผนังหลอดเลือดแดงมีความยืดหยุ่นน้อยลง ซึ่งเกิดจากมีการสะสมของไขมันและเส้นใยคอลลาเจนที่ผนังหลอดเลือดมากขึ้น แต่ในขณะเดียวกันกลับมีจำนวนของเส้นใยอีลาสตินลดลง (Pugh and Wei 2001) ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นว่าภาวะความดันโลหิตสูงพบได้ในหนูแรทกลุ่ม SA เช่นกัน (ตารางที่ 4.1, รูปที่ 4.1 ขวา) นอกจากนี้พบว่าความดันโลหิตขณะหัวใจบีบตัวมีการเพิ่มขึ้นมากกว่าความดันโลหิตขณะหัวใจคลายตัว เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดส่วนใหญ่มักจะเกิดขึ้นที่หลอดเลือดแดงใหญ่ (Yung, Laher et al. 2009) ซึ่งกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะความดันโลหิตสูงในช่วงสูงวัย ได้แก่ การสูญเสียการควบคุม vasomotor tone จากการทำงานของเซลล์เอ็นโดทีเลีย, การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน, การเกิดภาวะอักเสบที่หลอดเลือด, การเกิด cell apoptosis และการสร้างสาร active metabolite ที่มีผลทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัว (Mateos-Cáceres, Zamorano-León et al. 2012) อย่างไรก็ตามมีการรายงานว่าการฝึกออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอสามารถช่วยลดความดันโลหิตในช่วงสูงวัยได้ ซึ่งผลของการฝึกออกกำลังกายมีความสัมพันธ์กับปรับสมดุลระหว่างสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและสารที่ทำให้หลอดเลือดหดตัว และทำให้เซลล์เอ็นโดทีเลียทำงานปกติ (Eksakulkla, Suksom et al. 2009) โดยงานวิจัยนี้ได้ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้น นั่นคือหนูแรทกลุ่ม EA มีความดันเลือดแดงเฉลี่ยต่ำกว่าของหนูแรทกลุ่ม SA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.1, รูปที่ 4.1 ขวา)

4.2.2 ผลของการฝึกออกกำลังกายต่อความเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าผลของการฝึกออกกำลังกายช่วยป้องกันการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ Nrf2 ในสมองของหนูช่วงสูงวัย โดยการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ Nrf2 ในสมองเกิดขึ้นได้ในช่วงสูงวัย อย่างไรก็ตามการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอสามารถช่วยป้องกันการ

เปลี่ยนแปลงดังกล่าว โดยส่วนหนึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการกระตุ้นขบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ผ่านโปรตีน VEGF และกลไกต้านภาวะเครียดออกซิเดชันผ่านโปรตีน Nrf2 (ตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.2-4.6)

ปัจจุบันมีรายงานถึงการลดลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองช่วงสูงวัย ซึ่งศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ (Villena, Vidal et al. 2003, Brown, Moody et al. 2007, Murugesan, Demarest et al. 2012) โดยการลดลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองมีความสัมพันธ์กับการลดลงของอัตราการไหลของเลือดในสมองช่วงสูงวัย และการบกพร่องของขบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Stoquart-ElSankari, Balédent et al. 2007) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกี่ยวข้องกับการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์เอ็นโดทีเลียล (de la Torre, Pappas et al. 2003) ส่งผลให้สมองรับปริมาณเลือดมาเลี้ยงได้น้อยลง และอาจนำไปสู่โรคหลอดเลือดสมองได้ ในงานวิจัยนี้พบว่าหนูแรทกลุ่ม SA มีการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคในสมองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทกลุ่ม SY (รูปที่ 4.3) ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ผลการวิจัยสอดคล้องกับงานวิจัยข้างต้นซึ่งพบว่าการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคเกิดขึ้นในช่วงสูงวัย

การลดลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองช่วงสูงวัยเป็นปัจจัยหนึ่งที่น่าไปสู่ภาวะสมองได้รับเลือดไม่เพียงพอได้ ซึ่งกลไกการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดจุลภาคในสมองช่วงสูงวัยมีความสัมพันธ์กับการลดลงของโกรทแฟคเตอร์ (growth factor) ที่มีผลในการกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Dore-Duffy and LaManna 2007) และพบว่า VEGF เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในช่วงสูงวัย (Rivard, Berthou-Soulie et al. 2000) โดยงานวิจัยนี้พบว่าปริมาณของโปรตีน VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองหนูแรทกลุ่ม SA เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทกลุ่ม SY (รูปที่ 4.6)

การลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคในสมองช่วงสูงวัยพบว่าเกี่ยวข้องของภาวะออกซิเดชัน (Izzo, Carrizzo et al. 2018) และเซลล์เอ็นโดทีเลียลเป็นเป้าหมายหลักในการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยพบว่ามี การสร้างสารอนุมูลอิสระ superoxide เพิ่มขึ้นในหลอดเลือดสมองของหนูแก่ (Park, Anrather et al. 2007) และยังพบภาวะเครียดออกซิเดชันจากปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนเพิ่มขึ้นและการแสดงของของเอนไซม์ superoxide dismutase ในไมโทคอนเดรียลดลงในหลอดเลือดสมองของหนูแก่ (Tripathy, Yin et al. 2010)

Nrf2 เป็น transcription factor สำคัญในการควบคุมสมดุลรีดอกซ์ (redox balance) และการกำจัดสารแปลกปลอม (xenobiotic metabolism) ของเซลล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Kensler, Wakabayashi et al. 2007) และ HO-1 ซึ่งเป็นหนึ่งในบรรดาเอ็นไซม์ที่เกิดจากการควบคุมโดย Nrf2 ที่มีความสามารถสูงสุดในการลดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และมีบทบาทสำคัญในการป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกิดจากความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (Ndisang 2017, Zhang, Liu et al. 2021) ซึ่งโดยปกติกลไกการกำจัดสารอนุมูลอิสระแบบใช้เอนไซม์

ถูกควบคุมโดย Nrf2 อย่างไรก็ตามในช่วงสูงวัยพบว่ามีการแสดงออกของ Nrf2 ในสมอง (Zhang, Liu et al. 2012) ในงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าหนูแรทกลุ่ม SA มีการลดลงของการแสดงออกของ Nrf2 ในสมอง รวมถึงปริมาณของ Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SY (รูปที่ 4.5 และ 4.8) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในช่วงสูงวัยพบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันของหลอดเลือดและการลดลงของการแสดงออกและหน้าที่ของ Nrf2 ของหลอดเลือดแดงใหญ่ (Ungvari, Bailey-Downs et al. 2011)

การวิจัยทั้งในคนและในสัตว์ทดลองได้รายงานผลของการฝึกออกกำลังกายต่อการลดอุบัติการณ์การเกิดภาวะความผิดปกติของหลอดเลือดสมอง (Cotman, Berchtold et al. 2007) โดยการฝึกออกกำลังกายทำให้มีอัตราการไหลเวียนเลือดในสมองเพิ่มขึ้น (Gertz, Priller et al. 2006) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) รวมถึงพบได้ในช่วงวัยชราด้วย (Ainslie, Cotter et al. 2008) นอกจากนี้การฝึกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมอง (Swain, Harris et al. 2003) โดยผลของการฝึกออกกำลังกายสามารถป้องกันการลดลงของหลอดเลือดจุลภาคและการลดลงของการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมองช่วงสูงวัย (Ding, Li et al. 2006) ซึ่งงานวิจัยนี้พบว่าการฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์สามารถป้องกันการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรทกลุ่ม EA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม SA (รูปที่ 4.3 และ 4.6) แสดงให้เห็นว่าการฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์สามารถป้องกันการลดลงของความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัยได้ และงานวิจัยนี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาคและปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูแรททั้งสามกลุ่ม (รูปที่ 4.7) ซึ่งชี้ให้เห็นถึงบทบาทของโปรตีน VEGF ต่อการกระตุ้นกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมองช่วงกลางวัยด้วยการฝึกออกกำลังกาย อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ทราบกลไกของการฝึกออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในสมองอย่างแน่ชัด ทั้งนี้ส่วนหนึ่งเชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลของเลือดและแรงเฉือน (shear stress) ต่อส่วนต่าง ๆ ของสมองขณะออกกำลังกายมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมอง (Latimer, Searcy et al. 2011) โดยมีการรายงานถึงการฝึกออกกำลังกายสามารถเพิ่มการขยายตัวของหลอดเลือดจากการกระตุ้นของอัตราการไหลของเลือดที่เพิ่มขึ้น (flow-induced vasodilation) (Spier, Delp et al. 2007) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงการเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลของเลือดของสมองในขณะที่มีการออกกำลังกาย (Secher, Seifert et al. 2008) ทั้งนี้มีงานวิจัยทั้ง *in vivo* (Green, Carter et al. 2010) และ *in vitro* (Davies 2009) พบว่าการเพิ่มอัตราการไหลของเลือดหรือของเหลวทำให้เกิดแรงเฉือนกระทำต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียล และส่งผลกระตุ้นกระบวนการทำงานของเซลล์เอ็นโดทีเลียลได้ นอกจากนี้ยังพบว่าการ

เกิดแรงเตือนต่อเซลล์เอ็นโดทีเลียทำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ VEGFR2 (de la Paz, Walshe et al. 2012) รวมถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นโดทีเลีย (endothelial proliferation) และการสร้างท่อหลอดเลือด (tube formation) โดยเซลล์เอ็นโดทีเลียมาต่อกัน (Song and Munn 2011) ของขบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่

ขณะออกกำลังกายร่างกายมีความต้องการออกซิเจนเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อัตราการไหลเวียนเลือดไปยังอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยการออกกำลังกายแบบเฉียบพลัน (acute exercise) ส่งผลให้มีการผลิตอนุมูลอิสระ (free radical) เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นผลมาจากการกระตุ้นกระบวนการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) อย่างไรก็ตามการสร้างอนุมูลอิสระที่เกิดจากการออกกำลังกายกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) เพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งนำไปสู่การต้านทานภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ (cellular oxidative stress) ได้ ดังนั้นการออกกำลังกายซ้ำ ๆ (repetitive exercise) จะสามารถช่วยบรรเทาผลเสียที่เกิดจากอนุมูลอิสระ และลดความเสี่ยงของการเสียชีวิตจากโรคเรื้อรัง และการเสียชีวิตก่อนวัยอันควรในผู้สูงอายุได้ (Simioni, Zauli et al. 2018) Nrf2 เป็น transcription factor สำคัญที่เกี่ยวข้องกับผลของการออกกำลังกายต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันของเซลล์ โดยพบว่าปริมาณ reactive oxygen species (ROS) ที่ถูกผลิตออกมาขณะออกกำลังกายจะกระตุ้นการทำงานของ Nrf2 ซึ่งเป็น transcription factor ที่ควบคุมกระบวนการ transcription ยีนของ antioxidants มากกว่า 200 ยีน (Fasipe, Li et al. 2021) และการฝึกออกกำลังกายสามารถกระตุ้นการผลิตไมโทคอนเดรีย (mitochondrial biogenesis) ผ่านกลไกการส่งสัญญาณของ Nrf2 (Merry and Ristow 2016) นอกจากนี้มีรายงานถึงผลของการออกกำลังกายต่อการกระตุ้นการทำงานของ Nrf2 ผ่านการลดกระบวนการ DNA methylation ของ Nrf2 (Chen, Zhu et al. 2021)

มีการศึกษาผลของการออกกำลังกายต่อการตอบสนองของ Nrf2 ในช่วงสูงวัยทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ สำหรับการศึกษาในหนูทดลองช่วงสูงวัยพบว่าการฝึกออกกำลังกายระดับปานกลาง (moderate exercise) สามารถเพิ่มระดับ Nrf2 mRNA ในกล้ามเนื้อโครงร่าง ร่วมกับการป้องกันการฝ่อของกล้ามเนื้อ (Yan, Shen et al. 2022) และสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีน Nrf2 ในหัวใจ ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนภายใต้การควบคุมของ Nrf2 คือ heme oxygenase-1 (HO-1), superoxide dismutase (SOD) และ glutathione (Pei, Yang et al. 2021) สำหรับการศึกษาในมนุษย์ช่วงสูงวัยพบว่าการฝึกออกกำลังกายระดับปานกลางสามารถฟื้นฟูการทำงานของ Nrf2 (Nrf2 activation) รวมถึงการส่งสัญญาณของ Nrf2 (Nrf2 signaling) ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวเคลียสเดี่ยว (peripheral blood mononuclear cells; PBMCs) (Ostrom and Traustadóttir 2020) นอกจากนี้มีการรายงานถึงผลของฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ในสมองส่วน cerebral cortex ของหนูทดลองช่วงสูงวัย (Lin, Ho et al. 2021) ซึ่ง

ในงานวิจัยนี้ได้แสดงผลสอดคล้องกับงานวิจัยดังกล่าวข้างต้น กล่าวคือหนูแรทกลุ่ม EA มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน Nrf2 ในสมอง รวมถึงปริมาณของ Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือด จุลภาคแยกสกัดจากสมองอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SA (รูปที่ 4.5 และ 4.8) ทั้งนี้ผลการออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจุลภาคแยกสกัดจากสมองของหนูช่วงสูงวัยในงานวิจัยนี้เป็นการค้นพบเป็นครั้งแรก

งานวิจัยนี้สนับสนุนบทบาทของ Nrf2 ต่อกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมอง โดยพบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดจุลภาค ปริมาณโปรตีน VEGF และการแสดงออกของโปรตีน Nrf2 ในสมองของหนูแรททั้งสามกลุ่มมีความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ (รูป 4.7) การศึกษาก่อนหน้านี้จำนวนมากได้แสดงให้เห็นถึงบทบาทเชิงบวกของ Nrf2 ในการส่งเสริมความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือด ตัวอย่างเช่นการศึกษาของ Li L และคณะ พบว่าการยับยั้งการแสดงออกของยีน Nrf2 ป้องกันกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของเซลล์บุผนังหลอดเลือดสมอง (brain microvascular endothelial cells) ร่วมกับการลดลงของปริมาณโปรตีน VEGF ในสมองของหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็น intracranial hypertension (Li, Pan et al. 2016) หรือการศึกษาของ Zhao R และคณะ พบว่าการรบกวนการทำงานของ Nrf2 ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหลอดเลือดทดลองของเซลล์ต้นกำเนิดบุผนังหลอดเลือดที่ได้มาจากไขกระดูก (bone-marrow-derived endothelial progenitor cells: BMEPCs) หลังจากเซลล์ BMEPCs สัมผัสกับสภาวะขาดออกซิเจน (Zhao, Feng et al. 2016) นอกจากนี้เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะที่ร่างกายได้รับอนุมูลอิสระในระดับต่ำและชั่วคราว เช่น ขณะออกกำลังกาย สามารถกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้ แต่ในทางกลับกันหากร่างกายมีภาวะเครียดออกซิเดชันที่มากเกินไปจะยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ในเนื้อเยื่อที่มีการไหลเวียนเลือดไม่เพียงพอ เช่น ช่วงสูงวัย (Kim and Byzova 2014)

บทที่ 5

สรุป วิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป

งานวิจัยนี้สามารถสรุปผลได้ดังนี้

- 1) การฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้เพิ่มความสามารถทางแอโรบิก (aerobic performance) ในหนูแรทช่วงสูงวัย โดยแสดงให้เห็นถึงการมีน้ำหนักตัวและความดันโลหิตที่ลดลง
- 2) การฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ป้องกันการลดลงของความสามารถในการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย
- 3) การฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ป้องกันการลดลงของปริมาณโปรตีน VEGF และ Nrf2 ในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย
- 4) การฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ป้องกันการลดลงของปริมาณโปรตีน Nrf2 และ HO-1 ในหลอดเลือดจลภาคสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย
- 5) การฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ มีผลต่อความสัมพันธ์เชิงบวกระหว่างกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ ปริมาณโปรตีน VEGF และปริมาณโปรตีน Nrf2 ในสมองของหนูแรทช่วงสูงวัย

5.2 วิจัย และข้อเสนอแนะ

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการฝึกออกกำลังกายด้วยการว่ายน้ำสามารถป้องกันการลดลงของความสามารถของกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ในช่วงสูงวัย ซึ่งเป็นช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการได้รับเลือดของสมองไม่เพียงพอ และเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดสมองและภาวะสมองขาดเลือด โดยบทบาทของการฝึกออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของการสร้างหลอดเลือดใหม่ในสมองช่วงสูงวัยมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน VEGF, Nrf2 และ HO-1 ในสมองและในหลอดเลือดจลภาคสมองอย่างมีนัยสำคัญ

ข้อมูลจากผลการวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการส่งเสริมสุขภาพของประชาชนในช่วงสูงวัย โดยสนับสนุนความสำคัญของการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ เพื่อป้องกันการเกิดพยาธิสภาพที่สมอง ซึ่งอาจนำไปสู่โรคหลอดเลือดสมองหรือภาวะสมองขาดเลือดในวัยสูงอายุได้

เอกสารอ้างอิง

- Ainslie, P. N., Cotter, J. D., George, K. P., Lucas, S., Murrell, C., Shave, R., . . . Atkinson, G. (2008). Elevation in cerebral blood flow velocity with aerobic fitness throughout healthy human ageing. *J Physiol*, *586*(16), 4005-4010.
- Barton, M. (2010). Obesity and aging: determinants of endothelial cell dysfunction and atherosclerosis. *Pflugers Arch*, *460*(5), 825-837. doi:10.1007/s00424-010-0860-y
- Brown, W. D., & Frackowiak, R. S. (1991). Cerebral blood flow and metabolism studies in multi-infarct dementia. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, *5*(2), 131-143. doi:10.1097/00002093-199100520-00010
- Brown, W. R., Moody, D. M., Thore, C. R., Challa, V. R., & Anstrom, J. A. (2007). Vascular dementia in leukoaraiosis may be a consequence of capillary loss not only in the lesions, but in normal-appearing white matter and cortex as well. *J Neurol Sci*, *257*(1-2), 62-66.
- Brzica, H., Abdullahi, W., Reilly, B. G., & Ronaldson, P. T. (2018). A Simple and Reproducible Method to Prepare Membrane Samples from Freshly Isolated Rat Brain Microvessels. *J Vis Exp*(135).
- Buendia, I., Michalska, P., Navarro, E., Gameiro, I., Egea, J., & León, R. (2016). Nrf2-ARE pathway: An emerging target against oxidative stress and neuroinflammation in neurodegenerative diseases. *Pharmacol Ther*, *157*, 84-104. doi:10.1016/j.pharmthera.2015.11.003
- Cahill-Smith, S., & Li, J. M. (2014). Oxidative stress, redox signalling and endothelial dysfunction in ageing-related neurodegenerative diseases: a role of NADPH oxidase 2. *Br J Clin Pharmacol*, *78*(3), 441-453.
- Chen, X., Zhu, X., Wei, A., Chen, F., Gao, Q., Lu, K., . . . Cao, W. (2021). Nrf2 epigenetic derepression induced by running exercise protects against osteoporosis. *Bone Res*, *9*(1), 15.

- Churchill, J. D., Galvez, R., Colcombe, S., Swain, R. A., Kramer, A. F., & Greenough, W. T. (2002). Exercise, experience and the aging brain. *Neurobiol Aging*, *23*(5), 941-955. doi:10.1016/s0197-4580(02)00028-3
- Colcombe, S. J., Kramer, A. F., Erickson, K. I., Scalf, P., McAuley, E., Cohen, N. J., . . . Elavsky, S. (2004). Cardiovascular fitness, cortical plasticity, and aging. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(9), 3316-3321.
- Cotman, C. W., Berchtold, N. C., & Christie, L. A. (2007). Exercise builds brain health: key roles of growth factor cascades and inflammation. *Trends Neurosci*, *30*(9), 464-472. doi:10.1016/j.tins.2007.06.011
- Csiszar, A., Gautam, T., Sosnowska, D., Tarantini, S., Banki, E., Tucsek, Z., . . . Ungvari, Z. (2014). Caloric restriction confers persistent anti-oxidative, pro-angiogenic, and anti-inflammatory effects and promotes anti-aging miRNA expression profile in cerebrovascular endothelial cells of aged rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *307*(3), H292-306.
- Dai, G., Vaughn, S., Zhang, Y., Wang, E. T., Garcia-Cardena, G., & Gimbrone, M. A., Jr. (2007). Biomechanical forces in atherosclerosis-resistant vascular regions regulate endothelial redox balance via phosphoinositol 3-kinase/Akt-dependent activation of Nrf2. *Circ Res*, *101*(7), 723-733. doi:10.1161/circresaha.107.152942
- Davies, P. F. (2009). Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, *6*(1), 16-26.
- de la Torre, J. C., Pappas, B. A., Prevot, V., Emmerling, M. R., Mantione, K., Fortin, T., . . . Stefano, G. B. (2003). Hippocampal nitric oxide upregulation precedes memory loss and A beta 1-40 accumulation after chronic brain hypoperfusion in rats. *Neurol Res*, *25*(6), 635-641. doi:10.1179/016164103101201931
- Deary, I. J., Corley, J., Gow, A. J., Harris, S. E., Houlihan, L. M., Marioni, R. E., . . . Starr, J. M. (2009). Age-associated cognitive decline. *Br Med Bull*, *92*, 135-152. doi:10.1093/bmb/ldp033

- de la Paz, N. G., Walshe, T. E., Leach, L. L., Saint-Geniez, M., & D'Amore, P. A. (2012). Role of shear-stress-induced VEGF expression in endothelial cell survival. *J Cell Sci*, 125(Pt 4), 831-843.
- Ding, Y. H., Li, J., Zhou, Y., Rafols, J. A., Clark, J. C., & Ding, Y. (2006). Cerebral angiogenesis and expression of angiogenic factors in aging rats after exercise. *Curr Neurovasc Res*, 3(1), 15-23. doi:10.2174/156720206775541787
- Dore-Duffy, P., & LaManna, J. C. (2007). Physiologic angiodynamics in the brain. *Antioxid Redox Signal*, 9(9), 1363-1371. doi:10.1089/ars.2007.1713
- Eksakulka, S., Suksom, D., Siriviriyakul, P., & Patumraj, S. (2009). Increased NO bioavailability in aging male rats by genistein and exercise training: using 4, 5-diaminofluorescein diacetate. *Reprod Biol Endocrinol*, 7, 93.
- Elahy, M., Jackaman, C., Mamo, J. C., Lam, V., Dhaliwal, S. S., Giles, C., . . . Takechi, R. (2015). Blood-brain barrier dysfunction developed during normal aging is associated with inflammation and loss of tight junctions but not with leukocyte recruitment. *Immun Ageing*, 12, 2.
- Fasipe, B., Li, S., & Laher, I. (2021). Harnessing the cardiovascular benefits of exercise: Are Nrf2 activators useful? *Sports Med Health Sci*, 3(2), 70-79.
- Gertz, K., Priller, J., Kronenberg, G., Fink, K. B., Winter, B., Schröck, H., . . . Endres, M. (2006). Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow. *Circ Res*, 99(10), 1132-1140. doi:10.1161/01.res.0000250175.14861.77
- Gounder, S. S., Kannan, S., Devadoss, D., Miller, C. J., Whitehead, K. J., Odelberg, S. J., . . . Rajasekaran, N. S. (2012). Impaired transcriptional activity of Nrf2 in age-related myocardial oxidative stress is reversible by moderate exercise training. *PLoS One*, 7(9), e45697.

- Grammas, P., Martinez, J., & Miller, B. (2011). Cerebral microvascular endothelium and the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Expert Rev Mol Med*, *13*, e19. doi:10.1017/s1462399411001918
- Green, D. J., Carter, H. H., Fitzsimons, M. G., Cable, N. T., Thijssen, D. H., & Naylor, L. H. (2010). Obligatory role of hyperaemia and shear stress in microvascular adaptation to repeated heating in humans. *J Physiol*, *588*(Pt 9), 1571-1577.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol*, *11*(3), 298-300. doi:10.1093/geronj/11.3.298
- Hoehn, B. D., Harik, S. I., & Hudetz, A. G. (2002). VEGF mRNA expressed in microvessels of neonatal and adult rat cerebral cortex. *Brain Res Mol Brain Res*, *101*(1-2), 103-108. doi:10.1016/s0169-328x(02)00175-4
- Hoening, M. R., Bianchi, C., Rosenzweig, A., & Sellke, F. W. (2008). Decreased vascular repair and neovascularization with ageing: mechanisms and clinical relevance with an emphasis on hypoxia-inducible factor-1. *Curr Mol Med*, *8*(8), 754-767. doi:10.2174/156652408786733685
- Hoier, B., & Hellsten, Y. (2014). Exercise-induced capillary growth in human skeletal muscle and the dynamics of VEGF. *Microcirculation*, *21*(4), 301-314. doi:10.1111/micc.12117
- Hossmann, K. A. (2012). The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab*, *32*(7), 1310-1316.
- Izzo, C., Carrizzo, A., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Calabrese, M., . . . Vecchione, C. (2018). The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases. *Int J Mol Sci*, *19*(2).
- Kensler, T. W., Wakabayashi, N., & Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *47*, 89-116. doi:10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046

- Kim, Y. W., & Byzova, T. V. (2014). Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*, *123*(5), 625-631.
- Koch, A. E., & Distler, O. (2007). Vasculopathy and disordered angiogenesis in selected rheumatic diseases: rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Arthritis Res Ther*, *9 Suppl 2*(Suppl 2), S3.
- Kojda, G., & Hambrecht, R. (2005). Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy? *Cardiovasc Res*, *67*(2), 187-197. doi:10.1016/j.cardiores.2005.04.032
- Kregel, K. C., Allen, D. L., Booth, F. W., Fleshner, M. R., Henriksen, E. J., Musch, T. I., . . . Toth, L. A. (2006). *Resource Book for the Design of Animal Exercise Protocols*. Bethesda: MD: American Physiological Society.
- Latimer, C. S., Searcy, J. L., Bridges, M. T., Brewer, L. D., Popović, J., Blalock, E. M., . . . Porter, N. M. (2011). Reversal of glial and neurovascular markers of unhealthy brain aging by exercise in middle-aged female mice. *PLoS One*, *6*(10), e26812.
- Leoni, R. F., Oliveira, I. A., Pontes-Neto, O. M., Santos, A. C., & Leite, J. P. (2017). Cerebral blood flow and vasoreactivity in aging: an arterial spin labeling study. *Braz J Med Biol Res*, *50*(4), e5670.
- Li, L., Pan, H., Wang, H., Li, X., Bu, X., Wang, Q., . . . Liu, Z. (2016). Interplay between VEGF and Nrf2 regulates angiogenesis due to intracranial venous hypertension. *Sci Rep*, *6*, 37338.
- Li, W., Suwanwela, N. C., & Patumraj, S. (2017). Curcumin prevents reperfusion injury following ischemic stroke in rats via inhibition of NF- κ B, ICAM-1, MMP-9 and caspase-3 expression. *Mol Med Rep*, *16*(4), 4710-4720.
- Liao, P. H., Hsieh, D. J., Kuo, C. H., Day, C. H., Shen, C. Y., Lai, C. H., . . . Huang, C. Y. (2015). Moderate exercise training attenuates aging-induced cardiac inflammation, hypertrophy and fibrosis injuries of rat hearts. *Oncotarget*, *6*(34), 35383-35394.

- Lin, J. Y., Ho, T. J., Tsai, B. C., Chiang, C. Y., Kao, H. C., Kuo, W. W., . . . Huang, C. Y. (2021). Exercise renovates H(2)S and Nrf2-related antioxidant pathways to suppress apoptosis in the natural ageing process of male rat cortex. *Biogerontology*, *22*(5), 495-506. doi:10.1007/s10522-021-09929-8
- Loboda, A., Damulewicz, M., Pyza, E., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2016). Role of Nrf2/HO-1 system in development, oxidative stress response and diseases: an evolutionarily conserved mechanism. *Cell Mol Life Sci*, *73*(17), 3221-3247.
- Mateos-Cáceres, P. J., Zamorano-León, J. J., Rodríguez-Sierra, P., Macaya, C., & López-Farré, A. J. (2012). New and old mechanisms associated with hypertension in the elderly. *Int J Hypertens*, *2012*, 150107.
- Melincovici, C. S., Boşca, A. B., Şuşman, S., Mărginean, M., Mişu, C., Istrate, M., . . . Mişu, C. M. (2018). Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol*, *59*(2), 455-467.
- Merry, T. L., & Ristow, M. (2016). Nuclear factor erythroid-derived 2-like 2 (NFE2L2, Nrf2) mediates exercise-induced mitochondrial biogenesis and the anti-oxidant response in mice. *J Physiol*, *594*(18), 5195-5207.
- Morland, C., Andersson, K. A., Haugen Ø, P., Hadzic, A., Kleppa, L., Gille, A., . . . Bergersen, L. H. (2017). Exercise induces cerebral VEGF and angiogenesis via the lactate receptor HCAR1. *Nat Commun*, *8*, 15557.
- Murugesan, N., Demarest, T. G., Madri, J. A., & Pachter, J. S. (2012). Brain regional angiogenic potential at the neurovascular unit during normal aging. *Neurobiol Aging*, *33*(5), 1004 e1001-1016.
- Muthusamy, V. R., Kannan, S., Sadhaasivam, K., Gounder, S. S., Davidson, C. J., Boehme, C., . . . Rajasekaran, N. S. (2012). Acute exercise stress activates Nrf2/ARE signaling and promotes antioxidant mechanisms in the myocardium. *Free Radic Biol Med*, *52*(2), 366-376.

- Ndisang, J. F. (2017). Synergistic Interaction Between Heme Oxygenase (HO) and Nuclear-Factor E2- Related Factor-2 (Nrf2) against Oxidative Stress in Cardiovascular Related Diseases. *Curr Pharm Des*, 23(10), 1465-1470. doi:10.2174/1381612823666170113153818
- Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., & Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J*, 13(1), 9-22.
- Noguchi, N., & Jo, H. (2011). Redox going with vascular shear stress. *Antioxid Redox Signal*, 15(5), 1367-1368.
- Olver, T. D., Ferguson, B. S., & Laughlin, M. H. (2015). Molecular Mechanisms for Exercise Training-Induced Changes in Vascular Structure and Function: Skeletal Muscle, Cardiac Muscle, and the Brain. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 135, 227-257. doi:10.1016/bs.pmbts.2015.07.017
- Ostrom, E. L., & Traustadóttir, T. (2020). Aerobic exercise training partially reverses the impairment of Nrf2 activation in older humans. *Free Radic Biol Med*, 160, 418-432.
- Padilla, J., Simmons, G. H., Bender, S. B., Arce-Esquivel, A. A., Whyte, J. J., & Laughlin, M. H. (2011). Vascular effects of exercise: endothelial adaptations beyond active muscle beds. *Physiology (Bethesda)*, 26(3), 132-145.
- Park, L., Anrather, J., Girouard, H., Zhou, P., & Iadecola, C. (2007). Nox2-derived reactive oxygen species mediate neurovascular dysregulation in the aging mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27(12), 1908-1918. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600491
- Pei, Z., Yang, C., Guo, Y., Dong, M., & Wang, F. (2021). Effect of different exercise training intensities on age-related cardiac damage in male mice. *Aging (Albany NY)*, 13(17), 21700-21711.
- Popa-Wagner, A., Buga, A. M., Turner, R. C., Rosen, C. L., & Toescu, E. (2012). Cerebrovascular disorders: role of aging. *J Aging Res*, 2012, 128146.

- Popov, D. V., Lysenko, E. A., Bokov, R. O., Volodina, M. A., Kurochkina, N. S., Makhnovskii, P. A., . . . Vinogradova, O. L. (2018). Effect of aerobic training on baseline expression of signaling and respiratory proteins in human skeletal muscle. *Physiol Rep*, *6*(17), e13868.
- Poungvarin, N. (2007). Burden of stroke in Thailand. *Int J Stroke*, *2*(2), 127-128. doi:10.1111/j.1747-4949.2007.00104.x
- Prior, B. M., Yang, H. T., & Terjung, R. L. (2004). What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol* (1985), *97*(3), 1119-1128. doi:10.1152/jappphysiol.00035.2004
- Pugh, K. G., & Wei, J. Y. (2001). Clinical implications of physiological changes in the aging heart. *Drugs Aging*, *18*(4), 263-276. doi:10.2165/00002512-200118040-00004
- Rivard, A., Berthou-Soulie, L., Principe, N., Kearney, M., Curry, C., Branellec, D., . . . Isner, J. M. (2000). Age-dependent defect in vascular endothelial growth factor expression is associated with reduced hypoxia-inducible factor 1 activity. *J Biol Chem*, *275*(38), 29643-29647. doi:10.1074/jbc.M001029200
- Rivard, A., Fabre, J. E., Silver, M., Chen, D., Murohara, T., Kearney, M., . . . Isner, J. M. (1999). Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, *99*(1), 111-120. doi:10.1161/01.cir.99.1.111
- Sadoun, E., & Reed, M. J. (2003). Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression. *J Histochem Cytochem*, *51*(9), 1119-1130. doi:10.1177/002215540305100902
- Secher, N. H., Seifert, T., & Van Lieshout, J. J. (2008). Cerebral blood flow and metabolism during exercise: implications for fatigue. *J Appl Physiol* (1985), *104*(1), 306-314. doi:10.1152/jappphysiol.00853.2007
- Shibuya, M. (2006). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-Receptor2: its biological functions, major signaling pathway, and specific ligand VEGF-E. *Endothelium*, *13*(2), 63-69. doi:10.1080/10623320600697955

- Shinoda, M., Latour, M. G., & Lavoie, J. M. (2002). Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord*, *26*(3), 335-343. doi:10.1038/sj.ijo.0801900
- Simioni, C., Zauli, G., Martelli, A. M., Vitale, M., Sacchetti, G., Gonelli, A., & Neri, L. M. (2018). Oxidative stress: role of physical exercise and antioxidant nutraceuticals in adulthood and aging. *Oncotarget*, *9*(24), 17181-17198.
- Song, J. W., & Munn, L. L. (2011). Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(37), 15342-15347.
- Spier, S. A., Delp, M. D., Stallone, J. N., Dominguez, J. M., 2nd, & Muller-Delp, J. M. (2007). Exercise training enhances flow-induced vasodilation in skeletal muscle resistance arteries of aged rats: role of PGI₂ and nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *292*(6), H3119-3127. doi:10.1152/ajpheart.00588.2006
- Stoquart-ElSankari, S., Balédent, O., Gondry-Jouet, C., Makki, M., Godefroy, O., & Meyer, M. E. (2007). Aging effects on cerebral blood and cerebrospinal fluid flows. *J Cereb Blood Flow Metab*, *27*(9), 1563-1572. doi:10.1038/sj.jcbfm.9600462
- Suh, J. H., Shenvi, S. V., Dixon, B. M., Liu, H., Jaiswal, A. K., Liu, R. M., & Hagen, T. M. (2004). Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(10), 3381-3386.
- Swain, R. A., Harris, A. B., Wiener, E. C., Dutka, M. V., Morris, H. D., Theien, B. E., . . . Greenough, W. T. (2003). Prolonged exercise induces angiogenesis and increases cerebral blood volume in primary motor cortex of the rat. *Neuroscience*, *117*(4), 1037-1046. doi:10.1016/s0306-4522(02)00664-4
- Tang, Y., Wang, L., Wang, J., Lin, X., Wang, Y., Jin, K., & Yang, G. Y. (2016). Ischemia-induced Angiogenesis is Attenuated in Aged Rats. *Aging Dis*, *7*(4), 326-335.
- Tripathy, D., Yin, X., Sanchez, A., Luo, J., Martinez, J., & Grammas, P. (2010). Cerebrovascular expression of proteins related to inflammation, oxidative stress and neurotoxicity is altered with aging. *J Neuroinflammation*, *7*, 63.

- Uchida, S., Suzuki, A., Kagitani, F., & Hotta, H. (2006). Responses of acetylcholine release and regional blood flow in the hippocampus during walking in aged rats. *J Physiol Sci*, *56*(3), 253-257. doi:10.2170/physiolsci.SC001706
- Ungvari, Z., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., Gautam, T., Koncz, P., Losonczy, G., . . . Csiszar, A. (2011). Vascular oxidative stress in aging: a homeostatic failure due to dysregulation of NRF2-mediated antioxidant response. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, *301*(2), H363-372.
- Ungvari, Z., Parrado-Fernandez, C., Csiszar, A., & de Cabo, R. (2008). Mechanisms underlying caloric restriction and lifespan regulation: implications for vascular aging. *Circ Res*, *102*(5), 519-528.
- Valcarcel-Ares, M. N., Gautam, T., Warrington, J. P., Bailey-Downs, L., Sosnowska, D., de Cabo, R., . . . Csiszar, A. (2012). Disruption of Nrf2 signaling impairs angiogenic capacity of endothelial cells: implications for microvascular aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, *67*(8), 821-829.
- Viboolvorakul, S., & Patumraj, S. (2014). Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *Biomed Res Int*, *2014*, 230791.
- Villar-Cheda, B., Sousa-Ribeiro, D., Rodriguez-Pallares, J., Rodriguez-Perez, A. I., Guerra, M. J., & Labandeira-Garcia, J. L. (2009). Aging and sedentarism decrease vascularization and VEGF levels in the rat substantia nigra. Implications for Parkinson's disease. *J Cereb Blood Flow Metab*, *29*(2), 230-234. doi:10.1038/jcbfm.2008.127
- Villena, A., Vidal, L., Diaz, F., & Pérez De Vargas, I. (2003). Stereological changes in the capillary network of the aging dorsal lateral geniculate nucleus. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, *274*(1), 857-861. doi:10.1002/ar.a.10100
- Wagatsuma, A. (2006). Effect of aging on expression of angiogenesis-related factors in mouse skeletal muscle. *Exp Gerontol*, *41*(1), 49-54. doi:10.1016/j.exger.2005.10.003

- Walther, C., Gielen, S., & Hambrecht, R. (2004). The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans. *Exerc Sport Sci Rev*, 32(4), 129-134. doi:10.1097/00003677-200410000-00002
- Wang, P., Li, C. G., Qi, Z., Cui, D., & Ding, S. (2016). Acute exercise stress promotes Ref1/Nrf2 signalling and increases mitochondrial antioxidant activity in skeletal muscle. *Exp Physiol*, 101(3), 410-420. doi:10.1113/ep085493
- Yamazaki, Y., & Morita, T. (2006). Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors. *Mol Divers*, 10(4), 515-527. doi:10.1007/s11030-006-9027-3
- Yan, X., Shen, Z., Yu, D., Zhao, C., Zou, H., Ma, B., . . . Yu, Z. (2022). Nrf2 contributes to the benefits of exercise interventions on age-related skeletal muscle disorder via regulating Drp1 stability and mitochondrial fission. *Free Radic Biol Med*, 178, 59-75. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2021.11.030
- Yang, T., Sun, Y., Lu, Z., Leak, R. K., & Zhang, F. (2017). The impact of cerebrovascular aging on vascular cognitive impairment and dementia. *Ageing Res Rev*, 34, 15-29.
- Yung, L. M., Laher, I., Yao, X., Chen, Z. Y., Huang, Y., & Leung, F. P. (2009). Exercise, vascular wall and cardiovascular diseases: an update (part 2). *Sports Med*, 39(1), 45-63. doi:10.2165/00007256-200939010-00004
- Zhang, H., Liu, H., Davies, K. J., Sioutas, C., Finch, C. E., Morgan, T. E., & Forman, H. J. (2012). Nrf2-regulated phase II enzymes are induced by chronic ambient nanoparticle exposure in young mice with age-related impairments. *Free Radic Biol Med*, 52(9), 2038-2046.
- Zhang, Q., Liu, J., Duan, H., Li, R., Peng, W., & Wu, C. (2021). Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J Adv Res*, 34, 43-63.

Zhao, R., Feng, J., & He, G. (2016). Hypoxia increases Nrf2-induced HO-1 expression via the PI3K/Akt pathway. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 21(2), 385-396. doi:10.2741/4395



ประวัติผู้วิจัย



คำนำหน้า นาย นาง นางสาว
 ตำแหน่งทางวิชาการ ศ. รศ. ผศ. อื่น ๆ...อาจารย์...
 ชื่อผู้วิจัย ชีพสุมน
 นามสกุลผู้วิจัย วิบูลย์วรกุล
 ชื่อภาษาอังกฤษ Sheepsumon
 นามสกุลภาษาอังกฤษ Viboolvorakul
 วัน/เดือน/ปี เกิด 16/01/2519
 ที่อยู่ (บ้าน) 17 บรมราชชนนี 30 ต.ตลิ่งชัน อ.ตลิ่งชัน
 จังหวัด (บ้าน) กรุงเทพมหานคร
 รหัสไปรษณีย์ (บ้าน) 10170
 โทรศัพท์ (บ้าน) -
 แฟกซ์ (บ้าน) -
 ที่อยู่ (ที่ทำงาน) มหาวิทยาลัยรังสิต 52/347 หมู่บ้านเมืองเอก ต.หลักหก อ.เมือง
 จังหวัด (ที่ทำงาน) ปทุมธานี
 รหัสไปรษณีย์ (ที่ทำงาน) 12000
 โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-997-2000 ต่อ 1475
 แฟกซ์ (ที่ทำงาน) -
 อีเมล sheepsumon.v@rsu.ac.th

ปริญญาตรี

สาขา วท.บ. (กายภาพบำบัด)
 ปีที่จบ พ.ศ. 2541
 สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
 ประเทศ ไทย

ปริญญาโท

สาขา วท.ม. (สรีรวิทยาของการออกกำลังกาย)
 ปีที่จบ พ.ศ. 2546
 สถาบัน มหาวิทยาลัยมหิดล
 ประเทศ ไทย

ปริญญาเอก

สาขา วท.ด. (สรีรวิทยา)
 ปีที่จบ พ.ศ. 2555
 สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ประเทศ ไทย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

1. Chanpakdee C, Viboolvorakul S and Patumraj S. Exercise training improves age-related changes in cerebral capillary vascularity through the upregulation of PI3K/Akt signaling. *Chulalongkorn Medical Journal*. 2019;63(4):229-238.
2. Sakhakorn M, Viboolvorakul S, Israsena N and Patumraj S. Reduced neovascularization in aged rats: a study using lipopolysaccharide-induced inflammation. *Journal of Physiological and Biomedical Sciences*. 2013; 26(1): 9-12.

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

1. Mekrungruangwong T, Kasetsuwan P, Viboolvorakul S and Patumraj S. Protective Effects of Exercise Training Against Aged-Induced the Reduction of Cardiac Angiogenic Capacity in Middle-Aged Rats. *Cardiology and Cardiovascular Medicine*. 2020;4(1):058-065.
2. Viboolvorakul S, Patumraj S. Exercise training could improve age-related changes in cerebral blood flow and capillary vascularity through the upregulation of VEGF and eNOS. *BioMed Research International*. 2014;2014:230791.
3. Viboolvorakul S, Eksakulkla S, Wongeak-in N, Niimi H and Patumraj S. Exercise training could reduce age-induced microvascular impairment related to its anti-oxidant potential. *British Journal of Medicine & Medical Research*. 2011;385-396.

4. Viboolvorakul S, Niimi H, Wongeak-in N, Eksakulkla S and Patumraj S. Increased capillary vascularity in the femur of aged rats by exercise training. *Microvascular Research*. 2009;78(3):459-63.

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ

1. การนำเสนอแบบบรรยาย (oral presentation)

- 1.1 Viboolvorakul S., Patumraj S. Effect of exercise training on muscle VEGF level and bone microvascular density in aging rats. ในการประชุมวิชาการสมาคมหลอดเลือดจลภาคไทยประจำปี 2551 วันที่ 26 ธันวาคม 2551 ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 1.2 Viboolvorakul S., Patumraj S. Exercise training attenuates age-related microvascular deterioration in rat brain. ในการประชุมวิชาการสมาคมหลอดเลือดจลภาคไทยประจำปี 2556 วันที่ 20 ธันวาคม 2556 ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 1.3 Viboolvorakul S., Sakhakorn M., Patumraj S. Exercise training ameliorates brain, bone and skin microvascular deterioration in aged rats. ในการประชุมวิชาการแห่งชาติด้านผู้สูงอายุและผู้สูงอายุ ครั้งที่ 3 : อาเซียนสูงอายุอย่างทรงพลัง ปี 2558 วันที่ 24 พฤษภาคม 2558 ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย

2. การนำเสนอด้วยโปสเตอร์ (poster presentation)

- 2.1 Viboolvorakul S., Niimi H., Wongeakin N., Eksakulkla S., Patumraj S. Exercise training attenuates age-induced bone and muscle microvascular suppression. ในการประชุมวิชาการแห่งชาติด้านผู้สูงอายุและผู้สูงอายุ ครั้งที่ 2 ระหว่างวันที่ 9-12 กุมภาพันธ์ 2553 ณ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย
- 2.2 Viboolvorakul S., Eksakulkla S., Wongeakin N., Niimi H., Patumraj S. Exercise training improves age-induced microvascular rarefaction: relationship between oxidative stress and capillary vascularity. ในการประชุมวิชาการสมาคมหลอดเลือดจลภาคไทยประจำปี 2553 วันที่ 22 พฤศจิกายน 2553 ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- 2.3 Viboolvorakul S., Patumraj S. Age-related brain microvascular rarefaction could prevent by exercise training: in situ investigation in rats. การประชุม

วิชาการสมาคมหลอดเลือดจลภาคไทยประจำปี 2555 วันที่ 21 ธันวาคม 2555 ณ คณะ
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลงานวิจัยที่ได้นำเสนอในการประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ

1. การนำเสนอแบบบรรยาย (oral presentation)

- 1.1 Viboolvorakul S., Niimi H., Patumraj S. Effect of exercise training ameliorates age-induced capillary rarefaction in the brain associated with VEGF and eNOS expressions. ในการประชุม The 8th Asian Congress for Microcirculation ระหว่างวันที่ 26-28 ตุลาคม 2554 ณ Centara Grand and Bangkok Convention Centre ประเทศไทย
- 1.2 Viboolvorakul S., Sakhakorn M., Patumraj S. Exercise training ameliorates microvascular deterioration and VEGF signaling downregulation in aging rat brain. ในการประชุม The 10th World Congress for Microcirculation (Young Investigator Award Symposium) ระหว่างวันที่ 25-27 กันยายน 2558 ณ Kyoto International Conference Center ประเทศญี่ปุ่น
- 1.3 Viboolvorakul S., Patumraj S. Exercise training ameliorates age-induced cerebral microvascular deterioration and VEGF angiogenic signaling in rats. ในการประชุม The First Chinese Microcirculation Week ระหว่างวันที่ 28-30 ตุลาคม 2559 ณ Peking University Health Science Center ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

2. การนำเสนอด้วยโปสเตอร์ (poster presentation)

- 2.1 Viboolvorakul S., Lewchalemwongse B. Effect of exercise training and vitamin E supplementation on AFB1-induced hepatotoxicity in rats. ในการประชุม the 4th ICHPER-SD (International Council for Health, Physical Education, Recreation, Sport and Dance) Asia Congress ระหว่างวันที่ 20-23 มีนาคม 2546 ณ โรงแรมแอมบาสซาเดอร์ ประเทศไทย
- 2.2 Viboolvorakul S., Eksakulkla S., Wongeakin N., Niimi H., Patumraj S. Effects of exercise training on muscle vegf level and bone microvascular density in aging rats. ในการประชุม The 7th Asian Congress for Microcirculation ระหว่างวันที่ 17-19 ตุลาคม 2551 ณ Ramada Plaza Taian Hotel ประเทศจีน
- 2.3 Viboolvorakul S., Eksakulkla S., Wongeakin N., Niimi H., Patumraj S. Exercise training could reduce age-induced microvascular impairment related to its

anti-oxidant potential. ในการประชุม The 9th World Congress for Microcirculation ระหว่างวันที่ 26-28 กันยายน 2553 ณ Maison de la Chimie ประเทศฝรั่งเศส

2.4 Viboolvorakul S., Sakhakorn M., Patumraj S. Exercise training ameliorates microvascular deterioration and VEGF signaling downregulation in aging rat brain. ในการประชุม The 10th World Congress for Microcirculation (Young Investigator Award Symposium) ระหว่างวันที่ 25-27 กันยายน 2558 ณ Kyoto International Conference Center ประเทศญี่ปุ่น

2.4 Viboolvorakul S., Patumraj S. Age-related microvascular rarefaction could be prevented by exercise training: in situ investigation of brain, bone and skin microvascular networks in rats. ในการประชุม The 2nd Joint Meeting of the European Society for Microcirculation and European Vascular Biology Organization ระหว่างวันที่ 29 พฤษภาคม – 1 มิถุนายน 2560 ณ The International Conference Centre Geneva ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ผลงานวิจัยที่ได้รับรางวัล

- พ.ศ. 2558 Young investigator award และ Travel award จากการประชุมวิชาการนานาชาติ the 10th World Congress for Microcirculation ประเทศญี่ปุ่น
- พ.ศ. 2554 Young investigator award จากการประชุมวิชาการนานาชาติ the 8th Asian Congress for Microcirculation ประเทศไทย
- พ.ศ. 2551 Travel award จากการประชุมวิชาการนานาชาติ the 7th Asian Congress for Microcirculation 2008 ประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน

สาขาวิชาที่นักวิจัยเชี่ยวชาญ

- 1) Microcirculation
- 2) Exercise Physiology