สำนักหอสมุด

สัญญาเลขที่ R2560C138

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38MAPK ต่อหัวใจของหนูภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

The combinatorial effect of metformin and p38 MAPK inhibitor in pre-diabetic rat heart with myocardial ischemia

คณะผู้วิจัยและคณะ

1. ผศ.ดร.ทนพ.สราวุธ คำปวน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 5 ธ.ค. 2561
เลขทะเบียน 1039930
เลขเรียกหนังสือ ๒ QP
801
.M39
ส355ร
2560

สนับสนุนโดย

งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร ปีงบประมาณ 2560

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้วิจัย และผู้ช่วยวิจัยและการให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีของหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนนเรศวร

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2559 สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สราวุธ คำปวน

เมษายน 2562

บทคัดย่อ

โรคเบาหวาน (Diabetic mellitus) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามสุขภาพคนทั่วโลก ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ซึ่งพบว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในโรคเบาหวานที่เป็นอันตรายถึงชีวิตได้แก่ ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด จากการศึกษาพบว่าภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ลง ดังนั้น การยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมีประโยชน์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้าพบว่า ยา metformin ซึ่งเป็นยาต้านเบาหวานนั้นมีผลดีต่อหัวใจในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด แต่ผลของการได้รับยา metformin ร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK ยังไม่มีการศึกษา ในการศึกษานี้ทำการศึกษาผลของภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองในหนูแรทขาวชนิด Wistar rat และ Goto-Kakizaki (GK) Rat ทั้งในภาวะที่ได้รับยา metformin ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 และการได้รับยา metformin ร่วมกับ SB203580 ผลการทดลองพบว่า การได้รับยา metformin ร่วมกับ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง โดยมีผลในการลดการกระตุ้น p38 MAPK Bax/Bcl-2 ratio และ มีแนวโน้มที่จะเพิ่มการกระตุ้น Akt เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง จากผลการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการได้รับยา metformin ร่วมกับ SB203580 สามารถช่วยลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจในหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานได้

คำสำคัญ โรคหัวใจขาดเลือด; โรคเบาหวาน; ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; p38MAPK; ตัวยับยั้งp38 MAPK

ABSTRACT

Type 2 diabetes is a non-communicable disease, which cause of mortality and morbidity worldwide. The long term of type 2 diabetes leading to diabetic complications, especially myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury. One of the major causes of aggravate cardiac cell death on diabetic cardiomyopathy is an increasing of in basal p38 MAP Kinase (p38 MAPK) activation in cardiac cell. So, inhibition of p38 MAPK activation could be a beneficial therapeutic for diabetic cardiomyopathy. In addition, the metformin that is anti-diabetic drugs has been shown cardioprotective effect in I/R injury. Therefore, in this study, we investigated the effect of the combination between metformin and p38 MAPK inhibitor (SB203580) in pre-diabetic rat. The Wistar rat (Control rat) and GK rat (pre-diabetic rat) were diagnosed diabetic condition, and then they were treated with drugs for 4 weeks. After that, the rats were induced ischemia/reperfusion injury by Langendorff perfusion system. The hearts were subjected to 30 min stabilization, 30 min ischemia, and 90 min reperfusion. The infarct size and the signalling transduction were assessed by triphenyl tetrazolium chloride (TTC) staining and Western blotting, respectively. We found that, treatment with combine drugs in GK rats could significantly decrease the percentages of infarct size as well as significantly inhibit p38 MAPK activation (p <0.05) and Bax/Bcl-2 ratio but not sufficient to activate Akt phosphorylation. In conclusion, treatment with combination of metformin and SB203580 provides the cardioprotective effects on hyperglycaemia subjected to I/R injury by, lowering infarct size and inhibited p38 MAPK.

Keywords Ischemic heart disease; Diabetes; Hyperglycemia; p38 MAPK; p38 MAPK Inhibitor

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ 1
บทคัดย่อ 2
ABSTRACT 3
สารบัญเรื่อง (Table of Contents) 4
บทที่ 1: บทนำ 5
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 8
ขอบเขตของโครงการวิจัย 7
ทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 8
บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย 13
บทที่ 3: ผลการทดลอง 19
1. การตรวจสอบภาวะก่อนเบาหวานในหนูแรทขาวชนิด Wistar rat และ GK rat 19
2. การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในภาวะก่อนเบาหวาน 22
3. การได้รับยา metformin และ SB203580 และ metformin ร่วมกับ SB203580 ลดการกระตุ้น p38 MAPK phosphorylation และการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis 23
บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง 28
เอกสารอ้างอิง 31

บทที่ 1: บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลก โดยมีรายงานว่า มีผู้ป่วยประมาณ 285 ล้านคนทั่วโลก และมีการคาดการณ์ว่าผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 438 ล้านคน ในอีก 15 ข้างหน้า นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มากกว่าผู้ที่ไม่มีภาวะของโรคเบาหวาน 2-4 เท่า จากการศึกษาใน pre-clinical และ clinical ก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) และภาวะโรคเบาหวานมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานที่ผิดปกติของระบบหัวใจ (cardiac dysfunction) ซึ่งทั้งสองภาวะนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายกับระบบหัวใจในหลายๆด้าน เช่น ทำให้การเผาผลาญน้ำตาลในระบบหัวใจเปลี่ยนแปลงไป, cardiac electrophysiology แย่ลง, การทำงานของอินซูลินในด้านการป้องกันหัวใจลดลง ทำให้ภาวะ ischemia-induced myocardial injury ที่เกิดขึ้นแย่ลง การรักษาเบาหวาน ในปัจจุบันโดยยาเมทฟอร์มิน ซึ่งรักษาระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ไม่เพียงแต่จะมีผลดีในด้านการควบคุมประมาณน้ำตาลในกระแสเลือดเท่านั้น แต่กลับพบว่ามีผลดีต่อการทำงานของหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเกิดจากการมีเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอต่อความต้องการของหัวใจในขณะนั้น โดยมีสาเหตุจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery) ที่ไปเลี้ยงหัวใจมีพยาธิสภาพตีบแคบ ส่งผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดสารอาหารและออกซิเจนสำหรับกระบวนการเมตาบอลิสม หากเกิดการขาดเลือดและออกซิเจน (Ischemia) เป็นเวลานานจะนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial Infarction) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต การบาดเจ็บจากการขาดเลือดดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หากการอุดตันหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery) ได้รับการรักษา เช่น การให้ยาละลายลิ่มเลือด การขยายหลอดเลือดหัวใจด้วยบอลลูน (Balloon Angioplasty) หรือใส่ขดลวด (Coronary Stent) ทำให้เลือดสามารถไหลเวียนไปสู่กล้ามเนื้อของหัวใจได้อีกครั้ง (Reperfusion) ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวถึงแม้จะจำกัดความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจที่มากขึ้น แต่จะก่อให้เกิดการบาดเจ็บที่เกิดจากเลือดมากลับเลี้ยงอีกครั้งหลังการขาดเลือด (Ischemic-Reperfusion, I/R) ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า p38 MAPK เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการภายในเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนต่าง ๆอย่างจำเพาะเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งแวดล้อม ภาวะเครียด การตอบสนองต่อการอักเสบ รวมถึงการพัฒนาการของเซลล์ การเจริญเติบโต การตายของเซลล์ และอื่น ๆ สำหรับผลจากการกระตุ้น p38 MAPK จะทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial ischemia) โดยพบว่ามีการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งผลจากการกระตุ้นนี้ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีการตายเพิ่มมากขึ้น และนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลว(Heart failure) ทำให้มีความพยายามในการศึกษาวิธีการยับยั้งการกระตุ้นและการทำงานของ p38 MAPK โดยใช้ตัวยับยั้ง (p38 MAPK inhibitor) เพื่อหวังจะใช้ตัวยับยั้งนี้ในการลดการบาดเจ็บและการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า ในภาวะดื้อต่ออินซูลิน และภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ลง ดังนั้น การยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมีประโยชน์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ และจากที่กล่าวไปข้างต้น ถึงผลดีของยาเมทฟอร์มิน ต่อหัวใจของผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นการให้ตัวยับยั้ง p38 MAPK ร่วมกับยาเมทฟอร์มิน อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ของผู้ป่วยเบาหวานที่ประสบภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้ ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของหัวใจของผู้ป่วยดีขึ้น และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในระยะยาว (Reperfusion) ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวถึงแม้จะจำกัดความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจที่มากขึ้น แต่จะก่อให้เกิดการบาดเจ็บที่เกิดจากเลือดมากลับเลี้ยงอีกครั้งหลังการขาดเลือด (Ischemic-Reperfusion, I/R) ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า p38 MAPK เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการภายในเซลล์ ซึ่งทำหน้าที่ในการขนส่งหมู่ฟอสเฟตให้โปรตีนต่างๆอย่างจำเพาะเมื่อถูกกระตุ้นโดยสิ่งแวดล้อม ภาวะเครียด การตอบสนองต่อการอักเสบ รวมถึงการพัฒนาการของเซลล์ การเจริญเติบโต การตายของเซลล์ และอื่นๆ สำหรับผลจากการกระตุ้น p38 MAPK จะทำให้เกิดการตอบสนองของเซลล์ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial ischemia) โดยพบว่ามีการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งผลจากการกระตุ้นนี้ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีการตายเพิ่มมากขึ้น และนำไปสู่ภาวะหัวใจล้มเหลว(Heart failure) ทำให้มีความพยายามในการศึกษาวิธีการยับยั้งการกระตุ้นและการทำงานของ p38 MAPK โดยใช้ตัวยับยั้ง (p38 MAPK inhibitor) เพื่อหวังจะใช้ตัวยับยั้งนี้ในการลดการบาดเจ็บและการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า ในภาวะดื้อต่ออินซูลิน และภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ลง ดังนั้น การยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมีประโยชน์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือ ภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ และจากที่กล่าวไปข้างต้น ถึงผลดีของยาเมทฟอร์มิน ต่อหัวใจของผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นการให้ตัวยับยั้ง p38 MAPK ร่วมกับยาเมทฟอร์มิน อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ของผู้ป่วยเบาหวานที่ประสบภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้ ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของหัวใจของผู้ป่วยดีขึ้น และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในระยะยาว

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ต่อการตายของหัวใจจากหนูที่มีภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง
2. เพื่อศึกษากลไกเชิงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องการผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ต่อการบาดเจ็บและการตายของการตายของหัวใจจากหนูที่มีภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็นการศึกษาในส่วน *in vivo* study ของยาเมทฟอร์มิน ชนิด Glucophage® ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ในหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะหัวใจขาดเลือดจำลอง หนูที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นหนูแรทขาวชนิด Wistar rat และ GK rat โดยจะทำการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Ischemia/Reperfusion injury) และศึกษาการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (Infarct size) รวมทั้งกลไกการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis

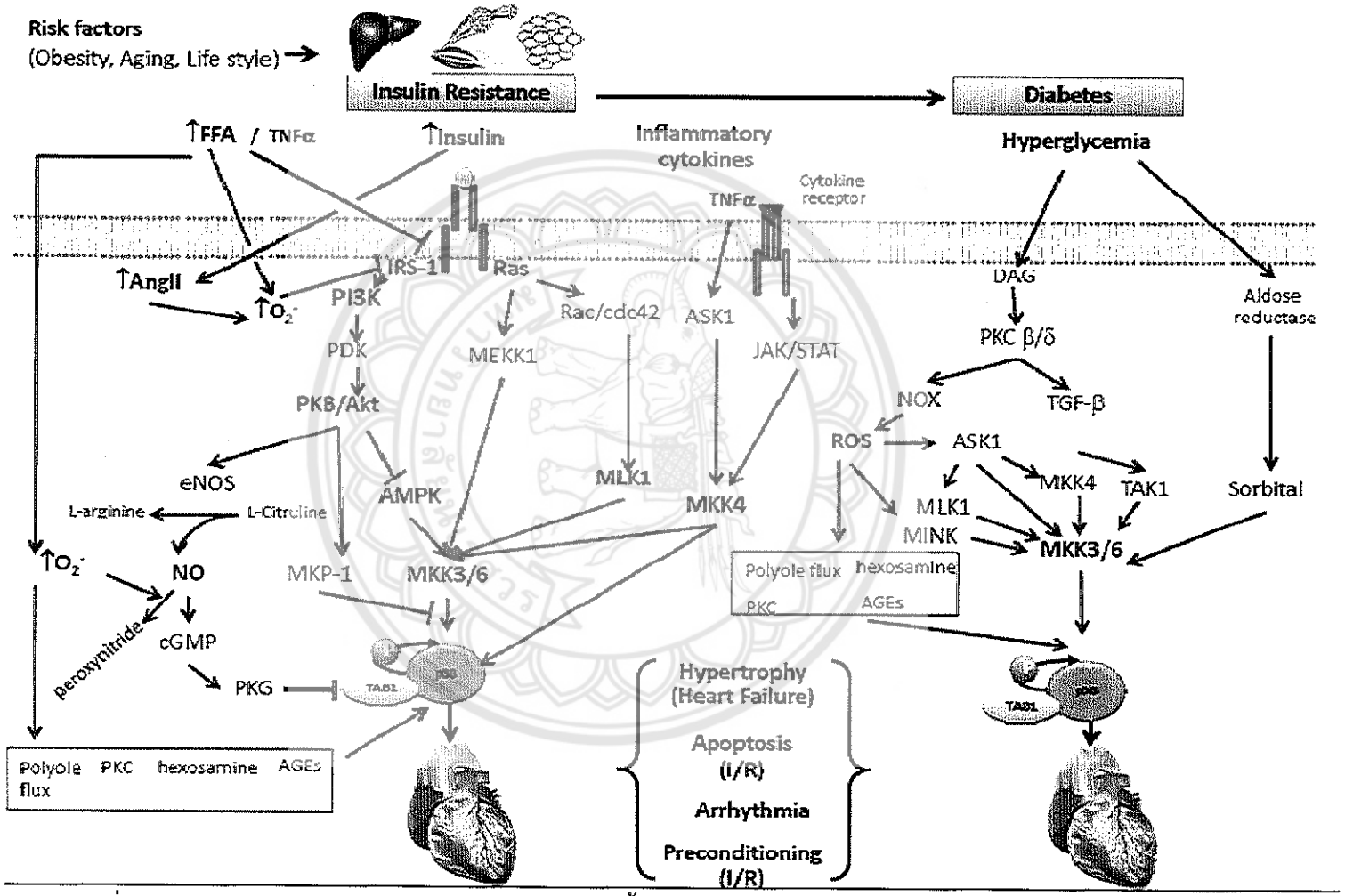
ทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลก โดยมีรายงานว่า มีผู้ป่วยประมาณ 285 ล้านคนทั่วโลก และมีการคาดการณ์ว่าผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 438 ล้านคน ในอีก 15 ข้างหน้า (1) นอกจากนี้ได้มีรายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มากกว่าผู้ที่ไม่มีภาวะของโรคเบาหวาน 2-4 เท่า (2) ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) เป็นภาวะที่เรียกว่า prediabetic ที่ซึ่งเป็นภาวะที่ตัวรับอินซูลิน (Insulin receptor) มีความบกพร่องในการตอบสนองต่อการจับกับตัวอินซูลินในอวัยวะต่างๆในร่างกาย (3) ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลที่มีอยู่ในกระแสเลือดเข้าไปในเซลล์เพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานได้ สุดท้ายก่อให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes) โดยภาวะนี้ร่างกายจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าระดับปกติที่มีการอ้างอิงไว้ จากการศึกษาใน pre-clinical และ clinical ก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) และภาวะโรคเบาหวานมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานที่ผิดปกติของระบบหัวใจ (cardiac dysfunction) (4-8) ซึ่งทั้งสองภาวะนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายกับระบบหัวใจในหลายๆด้าน เช่น ทำให้การเผาผลาญน้ำตาลในระบบหัวใจเปลี่ยนแปลงไป (9), cardiac electrophysiology แย่ลง, การทำงานของอินซูลินในด้านการป้องกันหัวใจลดลงทำให้ภาวะ ischemia-induced myocardial injury ที่เกิดขึ้นแย่ลง (10-12), การบีบและคลายตัวของหัวใจเปลี่ยนไป (13), เกิดการขยายตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricular (LV)) (14), เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจชนิดห้องหัวใจขยายใหญ่ผิดปกติ (Dilated cardiomyopathy) และ เกิด cardiac fibrosis เป็นต้น (15) ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยเบาหวานทำได้โดยการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้ยา ซึ่งยาที่นิยมให้กับผู้ป่วยเบาหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบาหวานประเภท 2 ได้แก่ยา เมทฟอร์มิน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ยาเมทฟอร์มินไม่เพียงแต่จะมีผลดีในด้านการควบคุมประมาณน้ำตาลในกระแสเลือดเท่านั้น แต่กลับพบว่ามีผลดีต่อการทำงานของหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ตารางที่ 1)

p38-Mitogen Activate Protein Kinase (MAPK) เป็น serine/threonine kinase ที่ถูกกระตุ้นให้มีการตอบสนองต่อความเครียดในระดับเซลล์ได้หลากหลาย (16-18) มีรายงานจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการกระตุ้น p38 MAPK ระหว่างภาวะ myocardial ischemia/reperfusion จะเพิ่มการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมากขึ้น และเมื่อทำการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK โดยตัวยับยั้ง (inhibitor) สามารถลดการบาดเจ็บและการตาย (infarction) ของกล้ามเนื้อหัวใจอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมายังพบความสัมพันธ์ของการกระตุ้น p38 MAPK ในหัวใจกับภาวะ ดื้อต่ออินซูลินและภาวะเบาหวาน ที่ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากหลากหลายปัจจัยเสี่ยง เช่น ความอ้วน (obesity) การมีอายุที่สูงขึ้น (aging) การขาดการออกกำลังกาย การมีอาการบาดเจ็บอักเสบเรื้อรัง การมีระดับอินซูลินในเลือดที่สูงขึ้น และมีระดับของไขมันอิสระ (free fatty acid) ที่สูงขึ้น เป็นต้น กระบวนการเหล่านี้สามารถกระตุ้นระดับ Basal level ของ p38 MAPK ในหัวใจได้ (19) (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาของยาเมทฟอร์มินต่อหัวใจ (19)

Drugs	Dosage	Study model	Outcome	References
Biguanides (Metformin)	3 mM Metformin 30 min prior to ischemia	*In vitro:* Neonatal rat ventricular myocytes subjected to 3hrs simulate ischemia	Metformin stimulate Bax translocation in response to p38-MAPK MAPK	Capano M, et al. Biochem J 2006 1;395(1):57-64.
Metformin	1 mM Metformin 12 hrs	*In vitro:* Adult mice cardiac fibroblast treated with AICAR or Metformin	Metformin dose-dependently increased IL-6 production	Du JHet al. Biochem Biophys Res Commun 2005 2;337(4):1139-44.
Metformin	2 mM Metformin	*In vitro:* Rat cardiac myoblast cell line (H9c2) treatment with metformin in buffer containing insulin for 8 hrs *Ex vivo:* Isolated male Sprague-Dawley heart perfused with metformin	*In vitro:* Metformin accelerate glycolysis *Ex vivo:* Metformin enhanced cardiac output, heart rate, and hydraulic work	Saeedi R, et alAm J Physiol Heart Circ Physiol 2008 ;294(6):H2497-H2506.
Metformin	300, 600 mg/kg/d in drinking water for 2 wks	*In vivo:* Adult male Sprague-Dawley rats treated with Metformin for 2 wks *Ex vivo:* The hearts were isolated and perfused with AMPK activator (0.5 mM AICAR)	Both AMPK agonist AICAR and Metformin increased AMPK activity, and increased cardiac endothelial lipoprotein lipase translocation, increased triacylglycerol (TAG) accumulation in cardiomyocytes	Hauton D. et al. Metabolism 2011 Jan;60(1):32-42.



รูปที่ 1. การส่งสัญญาณของการกระตุ้น p38 MAPK ในภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) และภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (19)

การกระตุ้น p38 MAPK ใน myocardial ischemia นั้นทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (20) โดยพบว่า p38 MAPK จะทำการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ αB-Crystallin ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย p38 MAPK แล้ว โปรตีนทั้งสองชนิดจะมีการเคลื่อนที่สู่ mitochondria และทำให้ mitochondria เสียสภาพ (21) และมีการศึกษาพบว่าการกระตุ้น p38 MAPK ยังทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ apoptosis เช่น caspase-3 ส่งผลให้เกิดการเสียสภาพของ mitochondrial transmembrane potential (22) และการกระตุ้น p38 MAPK ยังมีความสำคัญต่อการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรตีน Bax ไปสู่ mitochondria และเมื่อเกิดการรวมตัวกับโปรตีน Bax จะทำให้เกิดรูโหว่บนผนังห่อหุ้ม mitochondria ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome cจาก mitochondria และนำไปสู่การตายของเซลล์ (22,23) นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่ชี้ชัดว่า การกระตุ้น p38 MAPK นั้นเป็นกระบวนการสำคัญให้เกิดอันตรายต่อหัวใจ เมื่อเกิดภาวะ myocardial ischemia โดยจากการศึกษาเมื่อได้ทำการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ด้วยการใช้สารยับยั้ง (inhibitors) (20;24-49) หรือการศึกษาด้วยการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาโมเลกุลของยีน (50,51) ส่งผลให้เกิดการชะลอและลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แม้ว่าการศึกษาที่กล่าวมานั้นจะเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ต่อมามีการศึกษาในมนุษย์ก็ทำให้ทราบว่ากระบวนการการกระตุ้น p38 MAPK และผลกระทบต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจน่าจะมีกลไกที่คล้ายคลึงกัน (52,53) โดยที่ p38 MAPK จะถูกกระตุ้นเมื่อหัวใจอยู่ในสภาวะขาดเลือด (18,24,26,27,32,36,40-42,44,49,54) ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่า อย่างน้อยที่สุดตามหลักทฤษฎีแล้ว การยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK มีศักยภาพเชิงการรักษาในโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (55)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาทำให้ทราบว่า ในภาวะดื้อต่ออินซูลิน และภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ลง ดังนั้นการยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมีประโยชน์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ และจากที่กล่าวไปข้างต้น ถึงผลดีของยาเมทฟอร์มิน ต่อหัวใจของผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นการให้ตัวยับยั้ง p38 MAPK ร่วมกับยาเมทฟอร์มิน อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ของผู้ป่วยเบาหวานที่ประสบภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้ ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของหัวใจของผู้ป่วยดีขึ้น และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในระยะยาว

บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย

ในการศึกษานี้จะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับ การเหนี่ยวนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวาน (Pre-diabetes) โดยในการศึกษานี้จะใช้หนูแรทขาว (Wistar Rat) และหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวาน (Goto-Kakizaki (GK) Rat) เพศผู้ (ที่มีน้ำหนักประมาณ 180-250 กรัม) สั่งซื้อมาจากบริษัทโนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จากัด โดยนำมาพักที่สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรเป็นเวลาอย่างน้อย 5 วันโดยสัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงตามสภาวะแวดล้อมตามมาตรฐานที่สถานสัตว์ทดลองกำหนด

โดยในการตรวจสอบภาวะก่อนเบาหวานในหนูแรท (Rats) นั้นจะขออธิบายเป็นขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การแบ่งกลุ่มการทดลอง

หลังจากทำการพักหนู หนูจะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มควบคุม normal diet (ND Group) หนูกลุ่มนี้จะใช้หนูแรทขาว (Wistar Rat) และรับอาหารเม็ดธรรมดาจากศูนย์สัตว์ทดลอง (C.P. 082) ดังแสดงในตารางที่ 2 และได้รับน้ำดื่มธรรมดา

2) กลุ่มทดลอง หนูกลุ่มนี้จะใช้หนูที่มีภาวะก่อนเบาหวาน (GK rat) และรับอาหารเม็ดธรรมดาจากศูนย์สัตว์ทดลอง (C.P. 082) ดังแสดงในตารางที่ 2 และได้รับน้ำดื่มธรรมดา โดยกลุ่มทดลองดังกล่าวจะแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มทดลอง ดังนี้

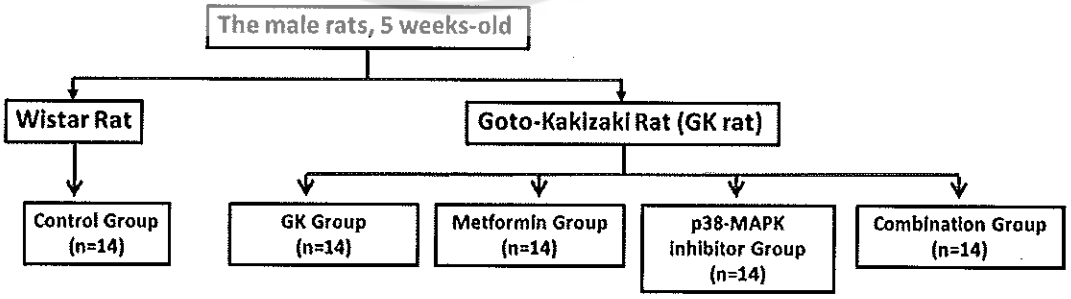
2.1 หนูที่ที่มีภาวะก่อนเบาหวาน (Diabetic group)

2.2 หนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานและได้รับยา Metformin (Metformin Group)

2.3) หนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานและได้รับ p38-MAPK inhibitor (p38-MAPK inhibitor Group)

2.4) หนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานได้รับยา Metformin ร่วมกับได้รับ p38-MAPK inhibitor (Combination Group)

โดยจากการคำนวณหาขนาดกลุ่มตัวอย่างจากโปรแกรม R พบว่าจะต้องใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว และทำการเพิ่มสัตว์ทดลองในกรณีที่ไม่ได้ผลตามเกณฑ์อีก 10% ของแต่ละกลุ่ม ดังนั้นจะใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 7 ตัวต่อชุดการทดลอง และทำการทดลอง 2 ชุด ดังนั้นจะใช้หนู 14 ตัวต่อกลุ่ม



ภาพที่ 2 แสดงแผนภาพกลุ่มตัวอย่างในการทดลอง

ตารางที่ 2. แสดงส่วนประกอบของอาหารธรรมดา (Normal diet)

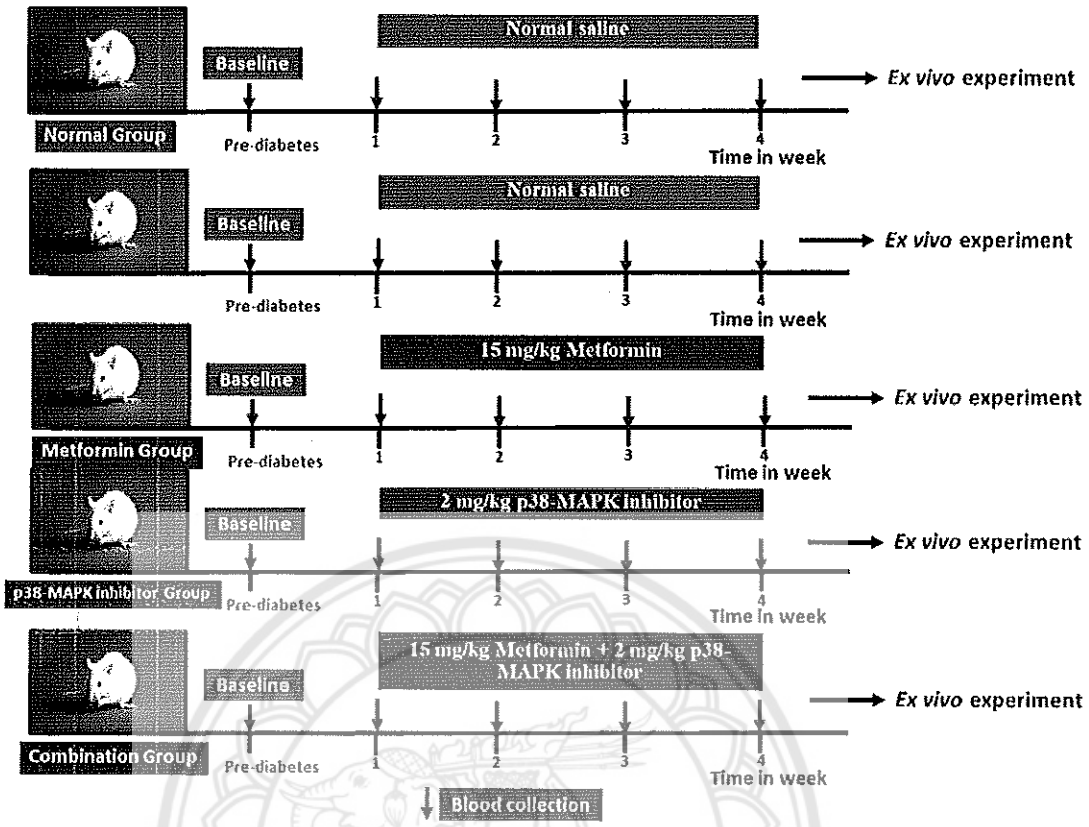
Composition	Normal diet (C.P. 082)		
	G	Kcal	%E
Carbohydrate	495.30	1981.20	51.99
Fat	83.70	753.30	19.77
Protein	269.00	1076.00	28.24
Vitamin	65.40	-	-
Fiber	34.30	-	-
Total	947.70	3810.50	100

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการพักหนูเป็นระยะเวลา 5-7 วัน และทำการตรวจสอบภาวะก่อนเบาหวานในหนูก่อน โดยจะใช้เกณฑ์การประเมินเดียวกับที่ใช้ในการตรวจสอบภาวะเบาหวานในมนุษย์ ซึ่งจะทำการตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

1. ระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากอดอาหาร 12-15 ชั่วโมง (Fasting plasma glucose)
2. ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังจากกินสารละลายกลูโคสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Oral Glucose Tolerance Test (OGTT))
3. ระดับน้ำตาลเฉลี่ยสะสมในเลือด (HbA_{1c} test)

เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากอดอาหาร ระดับ OGTT และ HbA_{1c} ของหนูกลุ่มศึกษามีค่าอยู่ในช่วง ≥ 126 mg/dL, 200 mg/dL และ ≥ 6.5 % ตามลำดับ จะถือว่าหนูทดลองดังกล่าวมีภาวะก่อนเบาหวานและนำไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

หลังจากหนูมีภาวะก่อนเบาหวาน หนูจะถูกนำมาศึกษาผลของการได้รับ p38-MAPK inhibitor และยา Metformin โดยการป้อนทางปาก (Gavage) และฉีดเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal Injection; IP) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปภาพที่ 3 หลังจากครบระยะเวลาในการป้อนสาร หนูจะถูกนำไปทำการศึกษาในส่วน *Ex vivo* ต่อไป



ภาพที่ 3 แสดงแผนภาพกลุ่มและระยะเวลาในการป้อนสาร

2. *Ex vivo* induction of Ischemia/Reperfusion

การศึกษาในส่วนนี้จะเป็นการศึกษาผลของยาต่อภาวะก่อนเบาหวาน (pre-diabetes) ร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Myocardial ischemia/reperfusion injury) ด้วยวิธี Langendorff perfusion โดยในการศึกษานี้แบ่งออกเป็น 2 การศึกษาย่อยดังนี้

2.1. การศึกษาการทำงานของหัวใจและพื้นที่การตายจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

ในการศึกษานี้แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม

กลุ่ม	รายละเอียดกลุ่ม	จำนวน
1	ND Group	7
2	Diabetic Group	7
3	Metformin Group	7
4	p38-MAPK inhibitor Group	7
5	Combination Group	7

หนูจะได้รับการฉีดยาสลบชนิด sodium pentobarbital ด้วยขนาดยา 50 mg/kg ทาง Intraperitoneal ประมาณ 10-15 นาที เมื่อหนูสงบลง ทำการตรวจสอบว่าหมดความรู้สึกโดยการนำคีมจับเนื้อเยื่อ (Forceps) หนีบตรงบริเวณระหว่างนิ้วเท้า เพื่อตรวจสอบระดับการรับรู้ความเจ็บปวด หากสัตว์ทดลองยังสามารถดึงเท้ากลับได้ แสดงว่าสัตว์ยังมีความรู้สึกเจ็บปวด ให้สังเกตอาการต่ออีกสักระยะก่อนทำการตรวจสอบอีกครั้ง หากพบว่าสัตว์ทดลองไม่ดึงเท้ากลับแล้ว แสดงว่าสัตว์ทดลองอยู่ในภาวะสลบลึก ทำการผ่าตัดเปิดช่องอก และทำการฉีด heparin (150 units) บริเวณหัวใจห้องล่างซ้าย เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดในหัวใจ หลังจากนั้นจึงทำการตัดหัวใจ โดยหัวใจที่ตัดออกมาจะมาทำการสวนหัวใจ (retrograde perfusion) ด้วยวิธี Langendorff perfusion system (อ้างอิงจาก Kumphune S, Bassi R, Jacquet S, Sicard P, Clark JE, Verma S, et al. A chemical genetic approach reveals that p38alpha MAPK activation by diphosphorylation aggravates myocardial infarction and is prevented by the direct binding of SB203580. *J Biol Chem* 2010 Jan 29;285(5):2968-75) หัวใจจะถูก perfuse ด้วย สารละลาย Modified Krebs's buffer (KHB) ด้วยระบบ Langendorff perfusion system เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิของระบบที่ 37 องศาเซลเซียส และควบคุมคุณภาพของหัวใจที่นำมาศึกษาก่อนเหนี่ยวนำสภาวะ Myocardial ischaemia โดยพิจารณา hemodynamic parameter ได้แก่ ตรวจวัดระดับ Left Ventricular Developed Pressure (LVDP), Left Ventricular End Diastolic Pressure (LVEDP), Coronary Flow (CF) และจำนวนการเต้นของหัวใจ ซึ่งจะทำการควบคุมให้อยู่ในระดับดังนี้คือ LVDP มีค่ามากกว่า 50 mmHg , LVEDP มีค่าไม่สูงเกิน 8 mmHg, อัตราการเต้นของหัวใจในขณะที่ไม่มีการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า มากกว่า 300 ครั้งต่อนาที และมีค่า Coronary flow มากกว่า 1 mL/min แต่ไม่สูงเกิน 5 ml/min. หลังจากทำการสวนหัวใจนาน 30 นาที จากนั้นทำการหยุดการไหลของสารละลายทั้งหมดที่ไหลผ่านหัวใจ (Lethal Ischaemia) เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบ 30 นาที จึงปล่อยให้สารละลายไหล

ผ่านหัวใจตามเดิมจนครบ 90 นาที (Reperfusion) จากนั้นทำการฉีดสารละลาย 1% TTC เพื่อย้อมสี TTC จะติดสีแดงในกล้ามเนื้อหัวใจที่มีชีวิตอยู่ ส่วนบริเวณที่มีการตาย หรือ infarct zone จะไม่ติดสีและปรากฏเป็นบริเวณสีขาว นำหัวใจที่ผ่านการย้อมสี TTC มาตัดเอาเฉพาะส่วนหัวใจห้องล่าง และนำมาฝังลงใน agarose gel ที่อุ่น รอให้แข็งตัว แล้วนำไปเฉือนบางโดยมีความหนาที่ 750 ไมโครเมตร และนำชิ้นเนื้อที่หั่นบางทั้งหมด มาสแกนภาพหน้าตัดของชิ้นเนื้อ นำภาพที่ได้ทั้งหมดส่งต่อให้กับนักวิทยาศาสตร์โดยปิดบังข้อมูล เพื่อทำการ Blind analysis โดยจะวิเคราะห์หา ปริมาตรของบริเวณที่มีกล้ามเนื้อหัวใจตาย เทียบกับปริมาตรหัวใจห้องล่างทั้งหมด และแสดงผลเป็น % infarct volume นำค่า % infarct volume มาวิเคราะห์เปรียบเทียบ และหาความมีนัยสำคัญทางสถิติ วิเคราะห์เปรียบเทียบ % infarct volumeโดย คำนวณค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ One-way ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.2. การเก็บเนื้อเยื่อหัวใจเพื่อทำการวิเคราะห์ Western Blotting

ในการศึกษานี้แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งเป็นกลุ่มทดลองคนละชุดจากข้อ 1

กลุ่ม	รายละเอียดกลุ่ม	จำนวน
1	ND Group	7
2	Diabetic Group	7
3	Metformin Group	7
4	p38-MAPK inhibitor Group	7
5	Combination Group	7

หนูจะถูกเตรียมการเช่นเดียวกับการทดสอบที่ 1 โดยหลังจากทำการสวนหัวใจนาน 30 นาที แล้วทำการหยุดการไหลของสารละลายทั้งหมดที่ไหลผ่านหัวใจ (Lethal Ischaemia) เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเก็บหัวใจจาก Langendorff perfusion system และแช่เนื้อเยื่อหัวใจในไนโตรเจนเหลว

3. การศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการตายของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวาน ร่วมกับกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

นำตัวอย่างหัวใจในแต่ละกลุ่มจะถูกทำการชั่งน้ำหนักและถูกบดให้ละเอียด (Homogenates) ด้วยสารละลาย homogenization จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 rpm 4 °C เป็นเวลานาน 10 min และทำการเติมสาร 2X SDS-PAGE sample buffer ที่มีส่วนผสมของ 10% (v/v) 2-mercaptoethanol และ bromophenol blue dye ลงไปในปริมาตรที่เท่ากันแล้วนำตัวอย่างโปรตีนไปทำการต้มในน้ำเดือดประมาณ 10 นาที เพื่อให้ได้โปรตีนออกมา หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี Western blotting โดยใช้แอนติบอดี้ที่จำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เช่น phosphorylated p38, total-p38,

phosphorylated-Akt, total-Akt, Bax และ Bcl-2 และทำการวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนในแต่ละกลุ่มด้วยวิธี ImageJ

4. สถิติและการวิเคราะห์

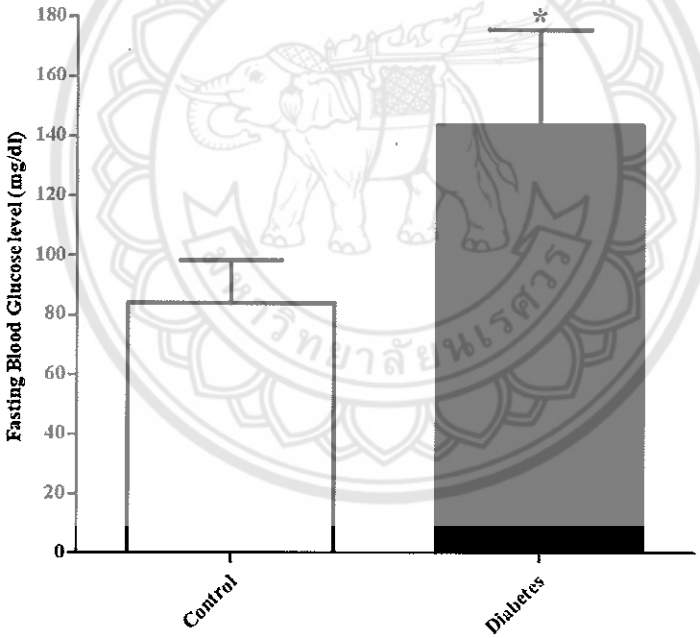
ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงอยู่ในรูป mean ± SD และการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มจะใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) (Tukey-Kramer test) เป็นตัวสถิติวิเคราะห์ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของพารามิเตอร์ที่มากกว่า 1 กลุ่มขึ้นไปจะใช้การวิเคราะห์แบบ two-way analysis of variance (ANOVA) โดยค่าจะได้รับการพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะต้องมีค่า $p < 0.05$

บทที่ 3: ผลการทดลอง

1. การตรวจสอบภาวะก่อนเบาหวานในหนูแรทขาวชนิด Wistar rat และ GK rat

1.1 ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดขณะอดอาหาร (Fasting plasma glucose)

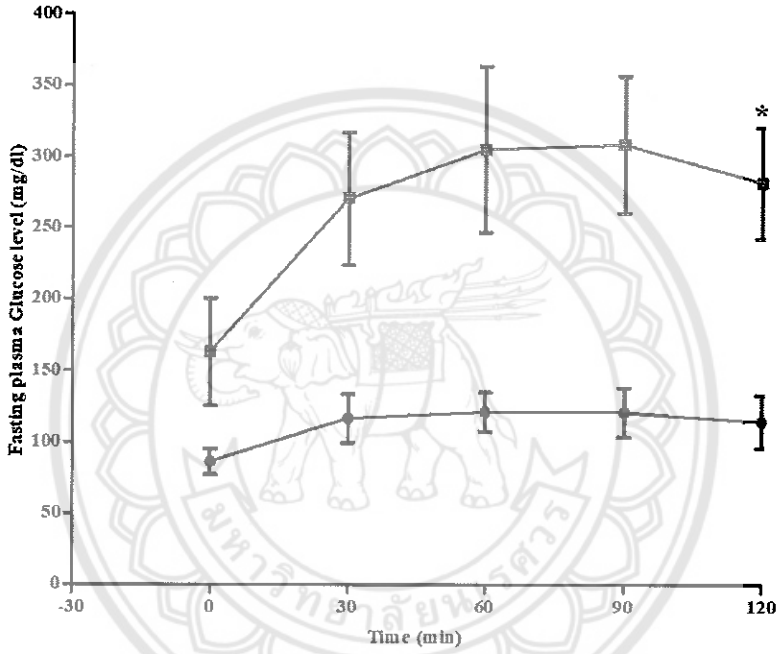
หลังจากอดอาหารเป็นเวลานาน 12-14 ชั่วโมง และทำการเจาะเลือดเพื่อตรวจระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ผลการศึกษาพบว่า ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังอดอาหารในหนูกลุ่มควบคุม (Wistar rat) อยู่ในช่วง 84.00 ± 14.25 mg/dl และในหนูกลุ่มทดสอบ (GK rat) มีค่าอยู่ในช่วง 143.6 ± 32.00 mg/dl ซึ่งค่าระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนู GK มีค่าสูงกว่าหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าอยู่ในช่วงของเกณฑ์ที่ใช้ในการวินิจฉัยว่ามีภาวะเบาหวานในมนุษย์ของ The American diabetes association (ADA) (รูปภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงระดับน้ำตาลในกระแสเลือดขณะอดอาหารในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

1.2 ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดหลังจากกินสารละลายกลูโคสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Oral Glucose Tolerance Test (OGTT))

การวิเคราะห์ระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากรับประทานสารละลายกลูโคสไปแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในหนูกลุ่มควบคุม (Wistar rat) และกลุ่มทดสอบ (GK rat) พบว่ามีค่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยเท่ากับ 111.7 ± 14.53 mg/dl และ 265.6 ± 59.45 mg/dl ตามลำดับ จากผลการวิเคราะห์พบว่าค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากรับประทานสารละลายกลูโคสไปแล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ของหนูกลุ่มทดสอบมีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และมีค่าเฉลี่ยสูงกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/dL ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ของการมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและมีภาวะเบาหวาน ดังแสดงผลในภาพที่ 5

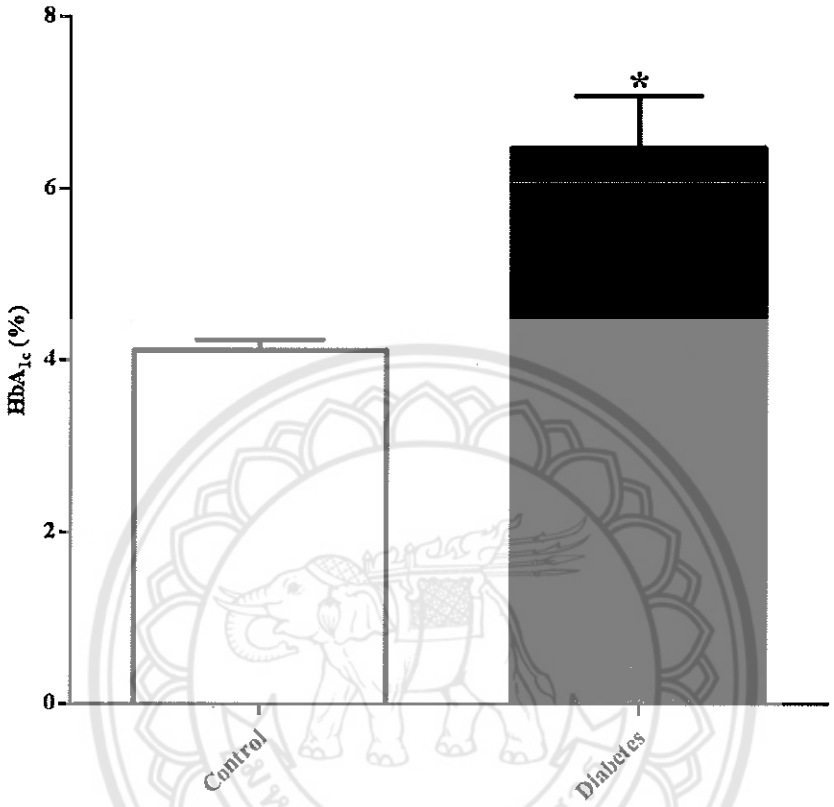


ภาพที่ 5 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT) ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

1.3 ระดับน้ำตาลเฉลี่ยสะสมในเลือด (HbA_{1c} test)

ผลการวิเคราะห์ร้อยละ HbA_{1c} ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ พบว่ามีค่าร้อยละ HbA_{1c} เฉลี่ยเท่ากับ 4.12 ± 0.12 % และ 6.53 ± 0.56 % ตามลำดับ โดยค่าร้อยละ HbA_{1c} ในหนูกลุ่มทดสอบมีค่าสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และค่าร้อยละ HbA_{1c} ในหนูกลุ่มทดสอบมี

ค่าเฉลี่ยสูงกว่าหรือเท่ากับ 6.5 % ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ของการมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและมีภาวะเบาหวาน ดังแสดงผลในภาพที่ 6

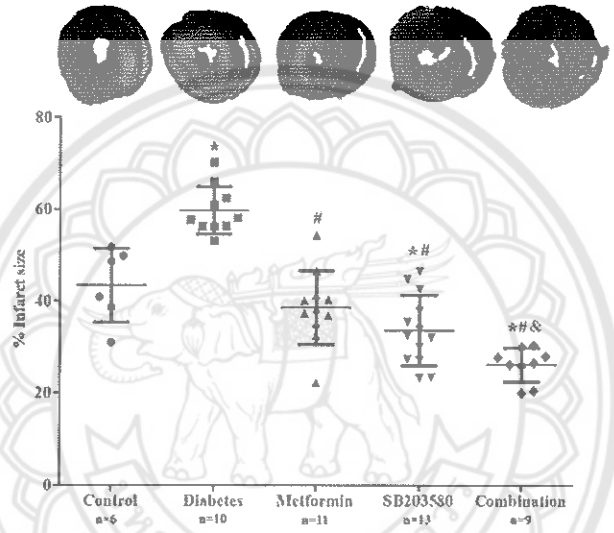


ภาพที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละ HbA_{1c} ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ

เมื่อทราบแล้วว่าหนูในกลุ่มทดสอบมีภาวะก่อนเบาหวานแล้ว ในการศึกษาขั้นต่อไปจะทำการศึกษาผลของการได้รับยา metformin ร่วมกับ p38-MAPK inhibitor ต่อภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

2. **การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดในภาวะก่อนเบาหวาน**

ในการศึกษานี้หนูจะถูกนำมาแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม และได้รับยา metformin หรือ SB203580 หรือ metformin ร่วมกับ SB203580 เป็นเวลานาน 4 สัปดาห์ จากนั้นหนูทั้งหมดจะถูกนำมาเหนี่ยวนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และทำการวิเคราะห์การตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (Infarct size) ผลการศึกษาพบว่า หลังจากเหนี่ยวนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง หนูในกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวานมีร้อยละการตายของกล้ามเนื้อหัวใจมากกว่าหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (59.73 ± 1.645 % vs 43.41 ± 3.266 %, p <0.05) ในส่วนของหนูในกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวานที่ได้รับยา metformin หรือ SB203580 หรือ metformin ร่วมกับ SB203580 พบว่าสามารถลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (38.59 ± 2.421 %, 33.63 ± 2.117 %, 26.15 ± 1.228 %, p <0.05, ตามลำดับ) ดังแสดงในภาพที่ 7



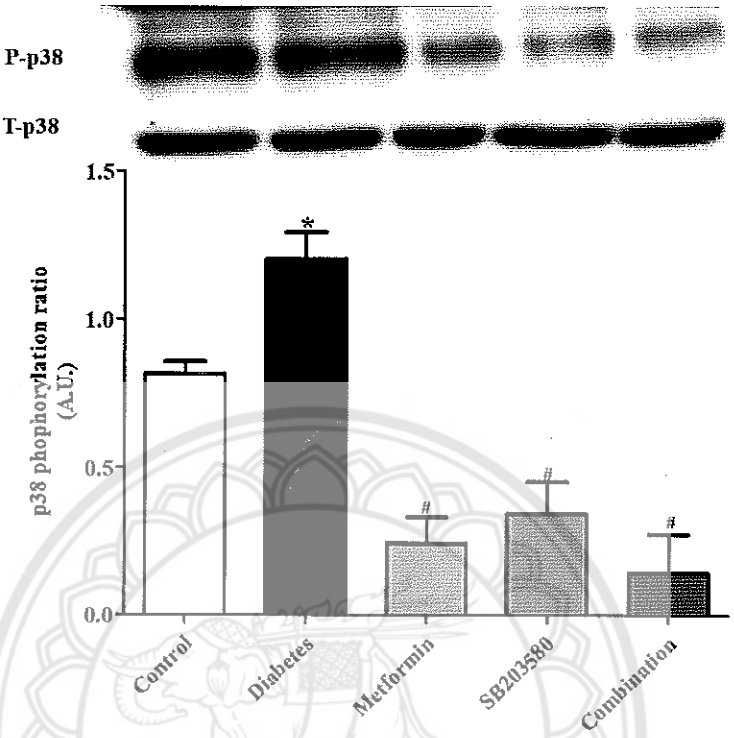
ภาพที่ 7 แสดงผลของร้อยละการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (Infarct size) ในหนู**กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบ**

3. **การได้รับยา** metformin และ SB203580 และ metformin ร่วมกับ **SB203580 ลดการกระตุ้น** p38 MAPK phosphorylation **และการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ** apoptosis

3.1 p38 MAPK phosphorylation

ทำการศึกษาการกระตุ้นโปรตีน p38 MAPK โดยศึกษาระดับของ p38 MAPK phosphorylation และผลของการได้รับยา metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า หนูในกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง สามารถกระตุ้น p38 MAPK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้รับ metformin,

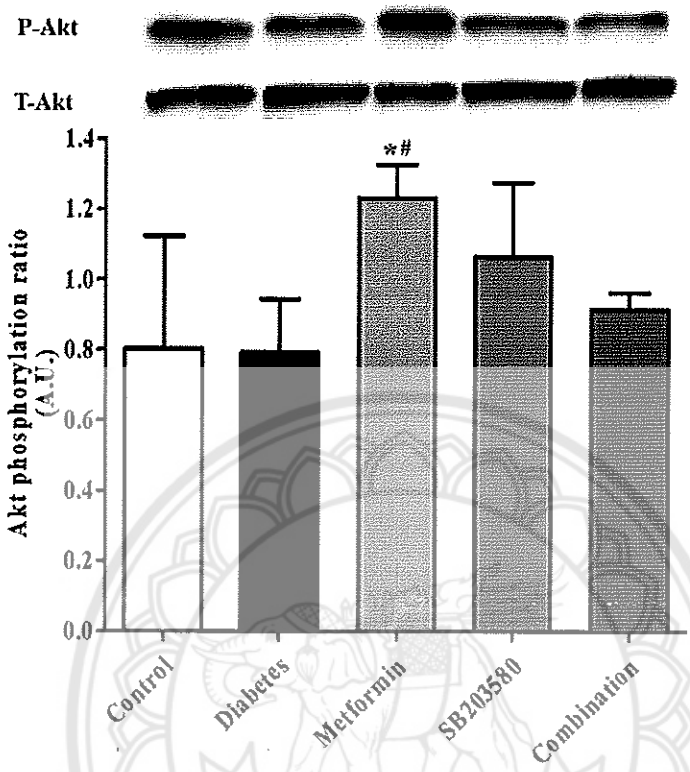
SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 สามารถลดระดับการกระตุ้น p38 MAPK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 แสดงการกระตุ้น p38 MAPK ในภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และผลของการได้รับยา metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580

3.2 Akt phosphorylation

ทำการศึกษาการกระตุ้นโปรตีน Phosphokinase B หรือ Akt โดยศึกษาระดับของ Akt MAPK phosphorylation และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า หนูในกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวานไม่มีการเปลี่ยนแปลงการกระตุ้นโปรตีน Akt เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การได้รับ metformin สามารถเพิ่มระดับการกระตุ้นโปรตีน Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวาน นอกจากนี้การได้รับยา SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 มีแนวโน้มในการเพิ่มระดับการกระตุ้นโปรตีน Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 แสดงการกระตุ้น Akt ในภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และผลของการได้รับยา metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580

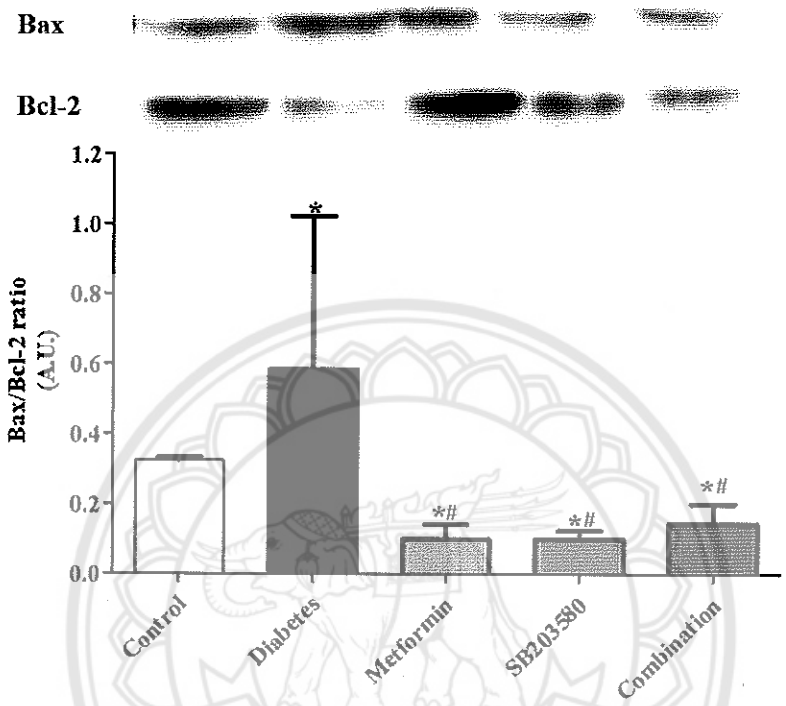
3.3 Bax/Bcl-2 ratio

ทำการศึกษาการกระตุ้นโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis โดยศึกษาระดับการแสดงออกของ Bax และ Bcl-2 แล้วรายงานผลในเชิงของอัตราส่วนระหว่าง Bax/Bcl-2 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ภาวะก่อนเบาหวานจะมีการแสดงออกของ Bax/Bcl-2 ratio ที่สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้รับMetformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ

จ QP
901
.M39
ก3556
1039130

15 ก.ย. 2564

SB203580 สามารถลดระดับการแสดงออกของ Bax/Bcl-2 ratio ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในภาพที่ 10

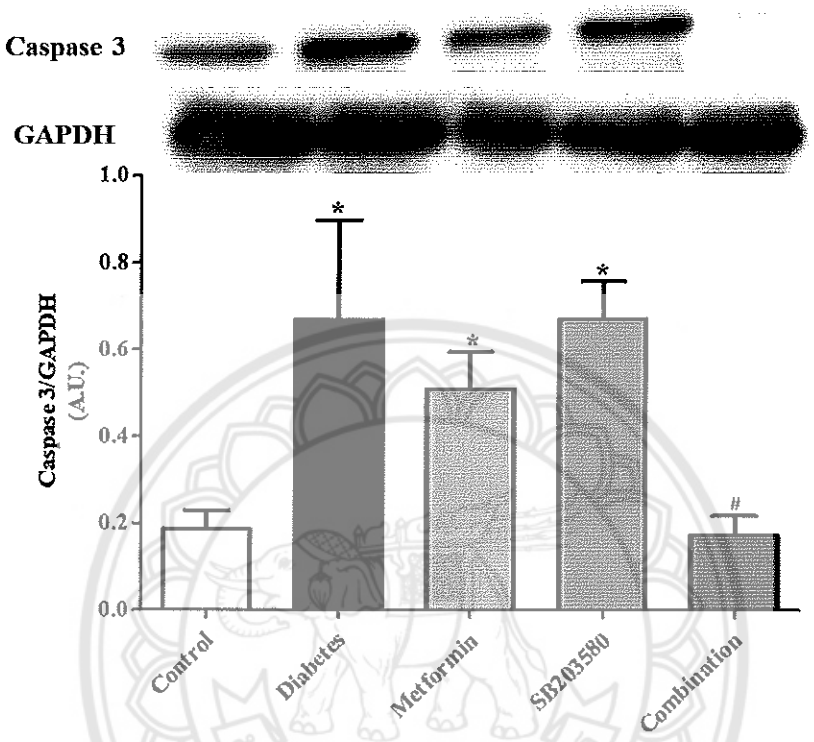


ภาพที่ 10 แสดงผลของ Bax/Bcl-2 ratio ในภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะก**ล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง** และผลของการได้รับยา metformin, SB203580 และการได้รับร่**วมกันระหว่างยา** metformin และ SB203580

3.4 Caspase 3 activation

ทำการศึกษาการกระตุ้นโปรตีน caspase 3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis โดยศึกษาระดับของ caspase 3 และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ภาวะก่อนเบาหวานจะมีการแสดงออกของ caspase 3 ที่สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้รับ Metformin มีแนวโน้มในการลดการกระตุ้นโปรตีน caspase 3 การได้รับ SB203580 ไม่มีผลในการเปลี่ยนแปลงการกระตุ้นโปรตีน caspase 3 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา

metformin และ SB203580 สามารถลดระดับการแสดงออกของ caspase 3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 แสดงผลของการกระตุ้น caspase 3 ในภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และผลของการได้รับยา metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580

บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาถึงผลทาง cardioprotective ของยา metformin ร่วมกับ p38 MAPK ต่อหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

จากการศึกษาได้ใช้หนูที่มีภาวะปกติและหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวาน มาทำการจำลองภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และทำการวัดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน พบว่า หนูในกลุ่มที่มีภาวะก่อนเบาหวานจะมีการตายของกล้ามเนื้อหัวใจที่สูงกว่าหนูในกลุ่มควบคุม (59.73 ± 1.645 % vs 43.41 ± 3.266 %, p <0.05) การตายของกล้ามเนื้อหัวใจในหนูที่มีภาวะก่อนเบาหวานที่เพิ่มมากขึ้นหลังจากเหนี่ยวนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง อาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p38 MAPK ในระดับเซลล์ที่มักจะเกิดขึ้นในภาวะเบาหวาน นอกจากนี้การเพิ่มระดับของโปรตีน p38 MAPK ในภาวะเบาหวานยังสามารถที่จะเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (ROS) ผ่านทาง advanced glycation end products (AGEs) (19) นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน p38 MAPK ยังสามารถเพิ่มได้จากการเกิดภาวะอักเสบ (56) ซึ่งกระบวนการต่าง ๆที่กล่าวมาข้างต้นทั้งการสร้างอนุมูลอิสระและการเกิดการอักเสบในระดับเซลล์ อาจจะส่งผลต่อการทำลายสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ มากขึ้น และส่งผลให้ในภาวะเบาหวานมีการตายของเซลล์กล้ามเนื้อที่เพิ่มมากขึ้น จะเห็นได้ว่าตัวการสำคัญในกระบวนการนี้คือ การเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน p38 MAPK ซึ่งเกิดได้จากการที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในกระแสเลือดได้หรือเกิดจากภาวะเบาหวาน ดังนั้นในการศึกษาก่อนหน้าจึงได้พยายามที่จะใช้ยาต้านเบาหวานหรือตัวยับยั้งการสร้างโปรตีน p38 MAPK (SB203580) ในการช่วยควบคุมระดับน้ำตาลและระดับโปรตีน p38 MAPK ยกตัวอย่างเช่น ในการศึกษาก่อนหน้าได้แสดงถึงผลทางด้านการป้องกันการบาดเจ็บของหัวใจ (cardioprotective effect) ของยาต้านเบาหวานชนิดเมทฟอร์มิน (metformin) ต่อภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองในภาะเบาหวานจำลองทั้งในส่วนของเซลล์และสัตว์ทดลอง โดยพบว่า ยาเมทฟอร์มินสามารถที่จะช่วยให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น ช่วยลดการตายของเซลล์หัวใจ และช่วยลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ ทั้งยังช่วยส่งเสริมการบีบตัวของหัวใจให้ดีขึ้น (19, 57, 58) ในสวนของตัวยับยั้ง p38 MAPK นั้นได้มีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าการใช้ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 ในหนูที่มีภาวะเบาหวานและภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง สามารถที่จะช่วยให้การบีบตัวของหัวใจที่ดีขึ้น (20, 19) อย่างไรก็ตามในการศึกษาก่อนหน้านั้นมุ่งศึกษาในผลของยาแต่ละตัวต่อภาวะเบาหวาน ในส่วนของการใช้ยาทั้งสองตัวร่วมกันในภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองยังไม่มีการศึกษามาก่อน ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาผลของยาทั้งสอง

ชนิดต่อภาวะก่อนเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง ในการศึกษานี้พบว่าหลังจากให้ยาเมทฟอร์มิน หรือ ตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK หรือการให้ยาร่วมระหว่างเมทฟอร์มินและตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK ในหนูที่มีภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองการตายของกล้ามเนื้อหัวใจลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p\text{-value} < 0.05$) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่กล่าวข้างต้น ว่าการใช้ยาเมทฟอร์มินหรือตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK สามารถแสดงผลในการป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจในภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด และนอกจากนี้การใช้ยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK ไม่มีผลกระทบต่อการลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจแต่ช่วยเสริมฤทธิ์ในการลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ

นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทำการศึกษาผลของยาในส่วนของการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นในภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองทั้งในส่วนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (Survival pathway) เช่น โปรตีน Akt เป็นต้น และในส่วนของการตาย (Apoptosis pathway) เช่น Bax Bcl-2 และ caspase 3 เป็นต้น ผลการศึกษาพบว่า การเหนี่ยวนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองในหนูที่มีภาวะเบาหวานสามารถที่จะเพิ่มการตายของกล้ามเนื้อหัวใจผ่านทางการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p38 MAPK อัตราส่วนของโปรตีน Bax/Bcl-2 และระดับของโปรตีน caspase 3 แต่ไม่มีผลกระทบต่อระดับโปรตีน Akt ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าที่รายงานว่า ภาวะเบาหวานหรือภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์หัวใจผ่านทางการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีน p38 MAPK อัตราส่วนของโปรตีน Bax/Bcl-2 และระดับของโปรตีน caspase 3 (59, 60, 61) นอกจากนี้ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการให้ยาเมทฟอร์มิน (62, 63) หรือตัวยับยั้ง p38 MAPK (64, 65, 66) สามารถที่จะป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจผ่านทางการยับยั้งการสร้างโปรตีน p38 MAPK การลดลงของอัตราส่วนระหว่างโปรตีน Bax/Bcl-2 และการลดระดับโปรตีน caspase 3 จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าเป็นผลจากการใช้ยาเมทฟอร์มินหรือตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK อย่างเดียว ในส่วนของการใช้ยาร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินละตัวยับยั้ง p38 MAPK นั้นยังไม่มีการศึกษา ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการศึกษาผลของการให้ยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK การศึกษาพบว่า การใช้ยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK สามารถลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจโดยการยับยั้งการสร้างโปรตีน p38 MAPK การลดลงของอัตราส่วนระหว่างโปรตีน Bax/Bcl-2 และการลดระดับโปรตีน caspase 3 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาดังกล่าวอ้างข้างต้น ดังนั้นจากการศึกษานี้จึงอาจสรุปได้ว่าการใช้ยาเมทฟอร์มิ

นร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK มีคุณสมบัติเป็นตัวป้องกันการตายของหัวใจในภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาพื้นฐานในการวิเคราะห์ผลทางด้านป้องกันการตายของกล้ามเนื้อหัวใจในสัตว์ทดลองของการใช้ยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้งโปรตีน p38 MAPK แต่สามารถนำผลของการศึกษานี้ไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงของการศึกษาต่อยอดทางคลินิกในอนาคตในรักษาภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีศึกษาระดับความเข้มข้นของการให้ยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK เพื่อที่จะเปรียบเทียบและดูแนวโน้มของระดับความเข้มข้นของการให้ยาที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการรักษาภาวะเบาหวานร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

เอกสารอ้างอิง

(1) Hu FB. Globalization of diabetes: the role of diet, lifestyle, and genes. Diabetes Care 2011 Jun;34(6):1249-57.

(2) Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. Diabetologia 2001 Sep;44 Suppl 2:S14-S21.

(3) Matthaei S, Stumvoll M, Kellerer M, Haring HU. Pathophysiology and pharmacological treatment of insulin resistance. Endocr Rev 2000 Dec;21(6):585-618.

(4) Peterson LR. Obesity and insulin resistance: effects on cardiac structure, function, and substrate metabolism. Curr Hypertens Rep 2006 Dec;8(6):451-6.

(5) Ouwens DM, Boer C, Fodor M, de GP, Heine RJ, Maassen JA, et al. Cardiac dysfunction induced by high-fat diet is associated with altered myocardial insulin signalling in rats. Diabetologia 2005 Jun;48(6):1229-37.

(6) Hintz KK, Aberle NS, Ren J. Insulin resistance induces hyperleptinemia, cardiac contractile dysfunction but not cardiac leptin resistance in ventricular myocytes. Int J Obes Relat Metab Disord 2003 Oct;27(10):1196-203.

(7) Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. Endocrinology 2012 Aug;153(8):3878-85.

(8) Abel ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005 Jun;5(2):219-26.
(9) Taegtmeyer H, Passmore JM. Defective energy metabolism of the heart in diabetes. Lancet 1985 Jan 19;1(8421):139-41.
(10) Greer JJ, Ware DP, Lefer DJ. Myocardial infarction and heart failure in the db/db diabetic mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006 Jan;290(1):H146-H153.
(11) McGaffin KR, Sun CK, Rager JJ, Romano LC, Zou B, Mathier MA, et al. Leptin signalling reduces the severity of cardiac dysfunction and remodelling after chronic ischaemic injury. Cardiovasc Res 2008 Jan;77(1):54-63.
(12) Thakker GD, Frangogiannis NG, Bujak M, Zymek P, Gaubatz JW, Reddy AK, et al. Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006 Nov;291(5):H2504-H2514.
(13) Bell DS. Heart failure: the frequent, forgotten, and often fatal complication of diabetes. Diabetes Care 2003 Aug;26(8):2433-41.
(14) Abel ED. Myocardial insulin resistance and cardiac complications of diabetes. Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord 2005 Jun;5(2):219-26.
(15) Eguchi K, Boden-Albala B, Jin Z, Rundek T, Sacco RL, Homma S, et al. Association between diabetes mellitus and left ventricular hypertrophy in a multiethnic population. Am J Cardiol 2008 Jun 15;101(12):1787-91.
(16) Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis JM, Force T. The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. J Biol Chem 1994 Oct 21;269(42):26546-51.
(17) Aleshin A, Sawa Y, Ono M, Funatsu T, Miyagawa S, Matsuda H. Myocardial protective effect of FR167653; a novel cytokine inhibitor in ischemic-reperfused rat heart. Eur J Cardiothorac Surg 2004 Nov;26(5):974-80.
(18) Gao F, Yue TL, Shi DW, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, et al. p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation. Cardiovasc Res 2002 Feb 1;53(2):414-22.
(19) Kumphune S., Chattipakorn S, Chattipakorn N. Roles of p38-MAPK in insulin resistant heart: evidence from bench for future bedside application. Current Pharmaceutical Design 2013 19(32):5742-54
(20) Kumphune S., Chattipakorn S, Chattipakorn N. Role of p38 inhibition in cardiac ischemia/reperfusion injury. Eur J Clin Pharmacol. 2012 May;68(5):513-24.
Pombo CM, Bonventre JV, Avruch J, Woodgett JR, Kyriakis JM, Force T. The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. J Biol Chem 1994 Oct 21;269(42):26546-51.

(22) Aleshin A, Sawa Y, Ono M, Funatsu T, Miyagawa S, Matsuda H. Myocardial protective effect of FR167653; a novel cytokine inhibitor in ischemic-reperfused rat heart. Eur J Cardiothorac Surg 2004 Nov;26(5):974-80.
(23) Gao F, Yue TL, Shi DW, Christopher TA, Lopez BL, Ohlstein EH, et al. p38 MAPK inhibition reduces myocardial reperfusion injury via inhibition of endothelial adhesion molecule expression and blockade of PMN accumulation. Cardiovasc Res 2002 Feb 1;53(2):414-22.
(24) Whittaker R, Glassy MS, Gude N, Sussman MA, Gottlieb RA, Glembotski CC. Kinetics of the translocation and phosphorylation of alphaB-crystallin in mouse heart mitochondria during ex vivo ischemia. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2009 May;296(5):H1633-H1642.
(25) Zhuang S, Demirs JT, Kochevar IE. p38 mitogen-activated protein kinase mediates bid cleavage, mitochondrial dysfunction, and caspase-3 activation during apoptosis induced by singlet oxygen but not by hydrogen peroxide. J Biol Chem 2000 Aug 25;275(34):25939-48.
(26) Borutaite V. AMPK, MAPK and Bax in the heart: some questions answered. Biochem J 2008 Jun 1;412(2):e15-e16.
(27) Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. J Cardiovasc Pharmacol 2000 Mar;35(3):474-83.
(28) Capano M, Crompton M. Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. Biochem J 2006 Apr 1;395(1):57-64.
(29) Clanachan AS, Jaswal JS, Gandhi M, Bottorff DA, Coughlin J, Finegan BA, et al. Effects of inhibition of myocardial extracellular-responsive kinase and P38 mitogen-activated protein kinase on mechanical function of rat hearts after prolonged hypothermic ischemia. Transplantation 2003 Jan 27;75(2):173-80.
(30) Gorog DA, Tanno M, Cao X, Bellahcene M, Bassi R, Kabir AM, et al. Inhibition of p38 MAPK activity fails to attenuate contractile dysfunction in a mouse model of low-flow ischemia. Cardiovasc Res 2004 Jan 1;61(1):123-31.
(31) Gysembergh A, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. p38 MAPK activity is not increased early during sustained coronary artery occlusion in preconditioned versus control rabbit heart. J Mol Cell Cardiol 2001 Apr;33(4):681-90.
(32) Khan M, Varadharaj S, Ganesan LP, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, et al. C-phycocyanin protects against ischemia-reperfusion injury of heart through involvement of p38 MAPK and ERK signaling. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006 May;290(5):H2136-H2145.
(33) Kim JK, Pedram A, Razandi M, Levin ER. Estrogen prevents cardiomyocyte apoptosis through inhibition of reactive oxygen species and differential regulation of p38 kinase isoforms. J Biol Chem 2006 Mar 10;281(10):6760-7.

(34) Koike N, Takeyoshi I, Ohki S, Tokumine M, Matsumoto K, Morishita Y. Effects of adding P38 mitogen-activated protein-kinase inhibitor to celsior solution in canine heart transplantation from non-heart-beating donors. Transplantation 2004 Jan 27;77(2):286-92.
(35) Ma XL, Kumar S, Gao F, Louden CS, Lopez BL, Christopher TA, et al. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. Circulation 1999 Apr 6;99(13):1685-91.
(36) Mackay K, Mochly-Rosen D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. J Biol Chem 1999 Mar 5;274(10):6272-9.
(37) Mackay K, Mochly-Rosen D. Involvement of a p38 mitogen-activated protein kinase phosphatase in protecting neonatal rat cardiac myocytes from ischemia. J Mol Cell Cardiol 2000 Aug;32(8):1585-8.
(38) Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A. Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. J Mol Cell Cardiol 2001 Apr;33(4):769-78.
(39) Meldrum DR, Dinarello CA, Cleveland JC, Jr., Cain BS, Shames BD, Meng X, et al. Hydrogen peroxide induces tumor necrosis factor alpha-mediated cardiac injury by a P38 mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. Surgery 1998 Aug;124(2):291-6.
(40) Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. J Mol Cell Cardiol 1998 Aug;30(8):1651-64.
(41) Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Hatanaka K, Asanuma H, Aki T, et al. Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. Circ Res 2001 Feb 2;88(2):175-80.
(42) Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001 Feb;280(2):H499-H508.
(43) Sharov VG, Todor A, Suzuki G, Morita H, Tanhehco EJ, Sabbah HN. Hypoxia, angiotensin-II, and norepinephrine mediated apoptosis is stimulus specific in canine failed cardiomyocytes: a role for p38 MAPK, Fas-L and cyclin D1. Eur J Heart Fail 2003 Mar;5(2):121-9.
(44) Tanno M, Bassi R, Gorog DA, Saurin AT, Jiang J, Heads RJ, et al. Diverse mechanisms of myocardial p38 mitogen-activated protein kinase activation: evidence for MKK-independent activation by a TAB1-associated mechanism contributing to injury during myocardial ischemia. Circ Res 2003 Aug 8;93(3):254-61.
(45) Wang M, Tsai BM, Turrentine MW, Mahomed Y, Brown JW, Meldrum DR. p38 mitogen activated protein kinase mediates both death signaling and functional depression in the heart. Ann Thorac Surg 2005 Dec;80(6):2235-41.

(46) Wang M, Tsai BM, Reiger KM, Brown JW, Meldrum DR. 17-beta-Estradiol decreases p38 MAPK-mediated myocardial inflammation and dysfunction following acute ischemia. J Mol Cell Cardiol 2006 Feb;40(2):205-12.
(47) Xing H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ. 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. EMBO J 2000 Feb 1;19(3):349-58.
(48) Yada M, Shimamoto A, Hampton CR, Chong AJ, Takayama H, Rothnie CL, et al. FR167653 diminishes infarct size in a murine model of myocardial ischemia-reperfusion injury. J Thorac Cardiovasc Surg 2004 Oct;128(4):588-94.
(49) Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, et al. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. Circ Res 2000 Mar 31;86(6):692-9.
(50) Kaiser RA, Bueno OF, Lips DJ, Doevendans PA, Jones F, Kimball TF, et al. Targeted inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase antagonizes cardiac injury and cell death following ischemia-reperfusion in vivo. J Biol Chem 2004 Apr 9;279(15):15524-30.
(51) Otsu K, Yamashita N, Nishida K, Hirotani S, Yamaguchi O, Watanabe T, et al. Disruption of a single copy of the p38alpha MAP kinase gene leads to cardioprotection against ischemia-reperfusion. Biochem Biophys Res Commun 2003 Feb 28;302(1):56-60.
(52) Cook SA, Sugden PH, Clerk A. Activation of c-Jun N-terminal kinases and p38-mitogen-activated protein kinases in human heart failure secondary to ischaemic heart disease. J Mol Cell Cardiol 1999 Aug;31(8):1429-34.
(53) Corbucci GG, Perrino C, Donato G, Ricchi A, Lettieri B, Troncone G, et al. Transient and reversible deoxyribonucleic acid damage in human left ventricle under controlled ischemia and reperfusion. J Am Coll Cardiol 2004 Jun 2;43(11):1992-9.
(54) Cahill MA, Peter ME, Kischkel FC, Chinnaiyan AM, Dixit VM, Krammer PH, et al. CD95 (APO-1/Fas) induces activation of SAP kinases downstream of ICE-like proteases. Oncogene 1996 Nov 21;13(10):2087-96.
(55) Force T, Kuida K, Namchuk M, Parang K, Kyriakis JM. Inhibitors of protein kinase signaling pathways: emerging therapies for cardiovascular disease. Circulation 2004 Mar 16;109(10):1196-205.
(56) Wang S, Ding L, Ji H, Xu Z, Liu Q, Zheng Y. The Role of p38 MAPK in the Development of Diabetic Cardiomyopathy. International journal of molecular sciences. 2016;17(7).
(57) Apaijai N, Pintana H, Chattipakorn SC, Chattipakorn N. Cardioprotective effects of metformin and vildagliptin in adult rats with insulin resistance induced by a high-fat diet. Endocrinology. 2012;153(8):3878-85.

(58) Calvert JW, Gundewar S, Jha S, Greer JJ, Bestermann WH, Tian R, et al. Acute metformin therapy confers cardioprotection against myocardial infarction via AMPK-eNOS-mediated signaling. Diabetes. 2008;57(3):696-705.

(59) He Y, Zhou L, Fan Z, Liu S, Fang W. Palmitic acid, but not high-glucose, induced myocardial apoptosis is alleviated by Nacetylcysteine due to attenuated mitochondrial-derived ROS accumulation-induced endoplasmic reticulum stress. Cell Death Dis. 2018;9(5):568.

(60) Jafari Anarkooli I, Sankian M, Ahmadpour S, Varasteh AR, Haghir H. Evaluation of Bcl-2 family gene expression and Caspase-3 activity in hippocampus STZ-induced diabetic rats. Experimental diabetes research. 2008;2008:638467.

(61) Sharifi AM, Mousavi SH, Farhadi M, Larijani B. Study of high glucose-induced apoptosis in PC12 cells: role of bax protein. J Pharmacol Sci. 2007;104(3):258-62.

(62) Kolivand S, Motevaseli E, Cheki M, Mahmoudzadeh A, Shirazi A, Fait V. The Anti-apoptotic Mechanism of Metformin Against Apoptosis Induced by Ionizing Radiation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. Klin Onkol. 2017;30(5):372-9.

(63) Wang X, Yang L, Kang L, Li J, Yang L, Zhang J, et al. Metformin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via up-regulation of antioxidant enzymes. PloS one. 2017;12(8):e0182777.

(64) Huang H, Wu K, You Q, Huang R, Li S, Wu K. Naringin inhibits high glucose-induced cardiomyocyte apoptosis by attenuating mitochondrial dysfunction and modulating the activation of the p38 signaling pathway. International journal of molecular medicine. 2013;32(2):396-402.

(65) Chen P, Yuan Y, Zhang T, Xu B, Gao Q, Guan T. Pentosan polysulfate ameliorates apoptosis and inflammation by suppressing activation of the p38 MAPK pathway in high glucosetreated HK2 cells. International journal of molecular medicine. 2018;41(2):908-14.

(66) Wang Y, Zhang J, Zhang L, Gao P, Wu X. Adiponectin attenuates high glucose-induced apoptosis through the AMPK/p38 MAPK signaling pathway in NRK-52E cells. PloS one. 2017;12(5):e0178215.