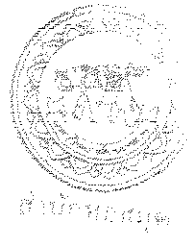


วิทยาลัยพยาบาล



สัญญาเลขที่ R2559A017

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38MAPK ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ใน
ภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

The combinatorial effect of metformin and p38 MAPK inhibitor in
cardiac cells with hyperglycemic conditions and simulated ischemia

คณะผู้วิจัยและคณะ

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

สนับสนุนโดย

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2559

สำนักวิจัยและพัฒนา	มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันที่รับเรื่อง	15 ธ.ค. 2558
เลขที่รับเรื่อง	10 39462
เลขที่รับหนังสือ	จ ๑๒ 801

.1139
ลช555
2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความร่วมมือเป็นอย่างดีของผู้วิจัย และผู้ช่วยวิจัยและการให้การสนับสนุนเป็นอย่างดีของหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือ ครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ปีงบประมาณ 2559 สำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้



สรารุช คำปวน

มกราคม 2562

บทคัดย่อ

โรคเบาหวาน (Diabetic mellitus) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่คุกคามสุขภาพคนทั่วโลก ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นทุกปี ซึ่งพบว่าโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญในโรคเบาหวานที่เป็นอันตรายถึงชีวิตได้แก่ ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด จากการศึกษาค้นพบว่าภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ลง ดังนั้น การยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมียุทธศาสตร์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะดื้อต่ออินซูลิน หรือภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้าพบว่า ยา metformin ซึ่งเป็นยาด้านเบาหวานนั้นมีผลต่อหัวใจในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด แต่ผลของการได้รับยา metformin ร่วมกับตัวยับยั้ง p38 MAPK ยังไม่มีการศึกษา ในการศึกษานี้ทำการศึกษาค้นคว้าผลของภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจชนิด H9c2 ทั้งในภาวะที่ได้รับยา metformin ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 และการได้รับยา metformin ร่วมกับ SB203580 ผลการทดลองพบว่า การได้รับยา metformin ร่วมกับ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง โดยมีผลในการลดการสร้าง reactive oxygen species และลดการกระตุ้น p38 MAPK นอกจากนี้ในการศึกษานี้ยังได้ทำการศึกษาในสัตว์ทดลอง ชนิด Goto-kakizaki rat ผลการทดลองพบว่าการ ได้รับยา metformin ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และลดภาวะเครียดออกซิเดชันในหลอดเลือดแดงใหญ่ โดยลดระดับ protein carbonyl การได้รับยา metformin สามารถลดการอักเสบของหลอดเลือด โดยลดระดับ IL-1 β ได้

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 rat cardiac myoblast cells line (H9c2 cell). The H9c2 cell was induced hyperglycaemic condition by using 33 mM of high-glucose solution. The hyperglycaemic cardiac cells were treated with metformin, SB203580 or the combination between metformin and SB203580. In addition, cells in the presence and absence of drugs treatment were subjected to simulated ischemia/reperfusion injury. The incubation of high-glucose solution in H9c2 cell significantly increased ROS production. In addition, the hyperglycaemic cells subjected to sI/R significantly decreased cell viability. Treatment with the combination between metformin and SB203580 could reduce high-glucose-induced ROS generation and hyperglycaemia subjected to sI/R-induced cell death. In addition, combine drug treatment could inhibit p38 MAPK activation and increase activate Akt phosphorylation.

The Goto-Kakizaki (GK) rat as T2DM model were divided into three groups including T2DM, T2DM treated with 15 mg/kg.BW metformin, and T2DM treated with 2 mg/kg.BW SB203580 for 4 weeks. The Aorta were isolated and protein carbonyl (PC) content was measured by spectrophotometric DNPH assay and aortic IL-1 β level was determined by ELISA. The results showed that aortic protein carbonyl content in T2DM group was significantly higher than non-diabetic rat. Treatment with metformin or SB203580 significantly reduced PC content. Moreover, only metformin significantly reduced IL-1 β

level. In conclusion, this study showed that metformin reduced ROS production and inflammation in diabetic vessel, which could reduce vascular complications in non-obese T2DM.

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).....	5
บทที่ 1: บทนำ	6
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	6
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	7
ขอบเขตของโครงการวิจัย	8
บททวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	9
บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย	13
บทที่ 3: ผลการทดลอง.....	23
1. ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงส่งเสริมการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะขาดเลือดจำลอง	23
2. การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกับระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด.....	26
3. การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกับระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการกระตุ้น p38 MAPK phosphorylation แต่ไม่มีผลต่อ Akt phosphorylation.....	27
4. หนูเบาหวานสายพันธุ์ Goto-kakizaki แสดงลักษณะของเบาหวานแบบไม่อ้วน	29
5. การได้รับ Metformin, SB203580 ลดระดับน้ำตาลในเลือด ระดับการอักเสบ และระดับโปรตีนคาร์บอนิล	30
บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง.....	32
เอกสารอ้างอิง	35

บทที่ 1: บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลก โดยมีรายงานว่า มีผู้ป่วยประมาณ 285 ล้านคนทั่วโลก และมีการคาดการณ์ว่าผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 438 ล้านคน ในอีก 15 ข้างหน้า นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มากกว่าผู้ที่ไม่มีความผิดปกติของโรคเบาหวาน 2-4 เท่า จากการศึกษาใน pre-clinical และ clinical ก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าภาวะดื้อต่ออินซูลิน (Insulin resistance) และภาวะโรคเบาหวานมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานที่ผิดปกติของระบบหัวใจ (cardiac dysfunction) ซึ่งทั้งสองภาวะนี้จะก่อให้เกิดความเสียหายกับระบบหัวใจในหลายๆด้าน เช่น ทำให้การเผาผลาญน้ำตาลในระบบหัวใจเปลี่ยนแปลงไป, cardiac electrophysiology แย่ลง, การทำงานของอินซูลินในด้านการป้องกันหัวใจลดลงทำให้ภาวะ ischemia-induced myocardial injury ที่เกิดขึ้นแย่ลง การรักษาเบาหวาน ในปัจจุบัน โดยยา เมทฟอร์มิน ซึ่งรักษาระดับน้ำตาลในกระแสเลือด ไม่เพียงแต่จะมีผลดีในด้านการควบคุมประมาณ น้ำตาลในกระแสเลือดเท่านั้น แต่กลับพบว่ายังมีผลดีต่อการทำงานของหัวใจในผู้ป่วยเบาหวานอีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเกิดจากการมีเลือดไปเลี้ยงหัวใจไม่เพียงพอต่อความต้องการของหัวใจ ในขณะนั้น โดยมีสาเหตุจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery) ที่ไปเลี้ยงหัวใจมีพยาธิสภาพตีบแคบ ส่งผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดสารอาหารและออกซิเจนสำหรับกระบวนการเมตาบอลิซึม หากเกิดการขาดเลือดและออกซิเจน (Ischemia) เป็นเวลานานจะนำไปสู่ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial Infarction) ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิต การบาดเจ็บจากการขาดเลือดดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ หากการอุดตันหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary Artery) ได้รับการรักษา เช่น การให้ยาละลายลิ่มเลือด การขยายหลอดเลือดหัวใจด้วยบอลูน (Balloon Angioplasty) หรือ ใส่ขดลวด (Coronary Stent) ทำให้เลือดสามารถไหลเวียนไปสู่กล้ามเนื้อของหัวใจได้อีกครั้ง (Reperfusion) ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวถึงแม้จะจำกัดความเสียหายของกล้ามเนื้อหัวใจที่มากขึ้น แต่จะก่อให้เกิดการบาดเจ็บที่เกิดจากเลือดมากกลับเลี้ยงอีกครั้งหลังการขาดเลือด (Ischemic-Reperfusion, I/R) ส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

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

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

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง
2. เพื่อศึกษากลไกเชิงโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการนี้เป็นการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro study) ของยาเมทฟอร์มิน ชนิด Glucophage® ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ชนิด SB203580 ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ในภาวะหัวใจขาดเลือดจำลอง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ใช้ศึกษาในการศึกษานี้เป็นเซลล์สายพันธุ์ ชนิด H9c2(2-1)ATCC®CRL-1446™ และทำการศึกษาการบาดเจ็บและการตายในหลอดทดลองจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) ร่วมกับภาวะที่มีน้ำตาลสูง (hyperglycemia) และศึกษากลไกการส่งสัญญาณระดับเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis



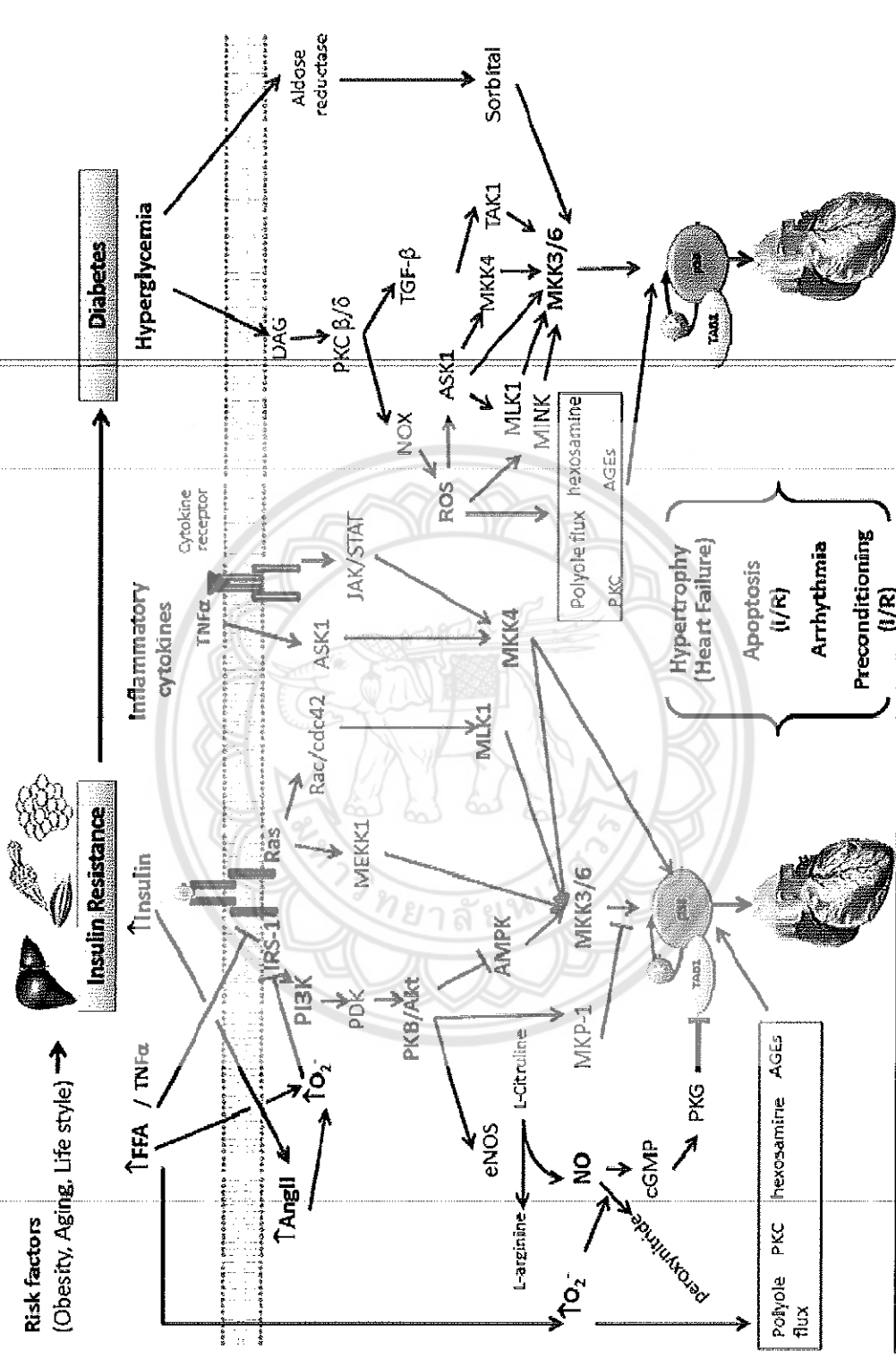
ทบทวนวรรณกรรม ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นโรคไม่ติดต่อที่มีอุบัติการณ์สูงที่สุดในโลก โดยมีรายงานว่า มีผู้ป่วยประมาณ 285 ล้านคนทั่วโลก และมีการคาดการณ์ว่าผู้ป่วยเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็นประมาณ 438 ล้านคน ในอีก 15 ข้างหน้า (1) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีโอกาสเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มากกว่าผู้ที่ไม่มีความผิดปกติของโรคเบาหวาน 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), การบีบและคลายตัวของหัวใจเปลี่ยนแปลง (13), เกิดการขยายตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricular (LV)) (14), เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจชนิดห้องหัวใจขยายใหญ่ผิดปกติ (Dilated cardiomyopathy) และ เกิด cardiac fibrosis เป็นต้น (15) ในปัจจุบันการรักษาผู้ป่วยเบาหวานทำได้โดยการรักษาระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้ยา ซึ่งยานี้นิยมให้กับผู้ป่วยเบาหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งเบาหวานประเภท 2 ได้แก่ยา เมทฟอร์มิน ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ยาเมทฟอร์มินไม่เพียงแต่จะมีผลดีในด้านการควบคุมปริมาณน้ำตาลในกระแสเลือดเท่านั้น 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 นอกจากนี้การศึกษามากมายยังพบความสัมพันธ์ของการกระตุ้น p38 MAPK ในหัวใจกับภาวะ ดื้อต่ออินซูลินและภาวะเบาหวาน ที่ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากหลากหลายปัจจัยเสี่ยง เช่น ความอ้วน (obesity) การมีอายุที่สูงขึ้น (aging) การขาดการออกกำลังกาย การมีอาหารบาดเจ็บอักเสบเรื้อรัง การมีระดับอินซูลินในเลือดที่สูงขึ้น และมีระดับของไขมันอิสระ (free fatty acid) ที่สูงขึ้น เป็นต้น กระบวนการเหล่านี้สามารถกระตุ้นระดับ Basal level ของ p38 MAPK ในหัวใจได้ (19) (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษายาเมทฟอร์มินต่อหัวใจ (19)

Drugs	Dosage	Study model	Outcome	References
Biguanides (Metformin)	3 mM Metformin 30 min prior to ischemia	<i>In vitro:</i> 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	<i>In vitro:</i> 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	<i>In vitro:</i> Rat cardiac myoblast cell line (H9c2) treatment with metformin in buffer containing insulin for 8 hrs	<i>In vitro:</i> Metformin accelerate glycolysis	Saeedi R, et alAm J Physiol Heart Circ Physiol 2008 ;294(6):H2497-H2506.
		<i>Ex vivo:</i> Isolated male Sprague-Dawley heart perfused with metformin	<i>Ex vivo:</i> Metformin enhanced cardiac output, heart rate, and hydraulic work	
Metformin	300, 600 mg/kg/d in drinking water for 2 wks	<i>In vivo:</i> Adult male Sprague-Dawley rats treated with Metformin for 2 wks <i>Ex vivo:</i> 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.



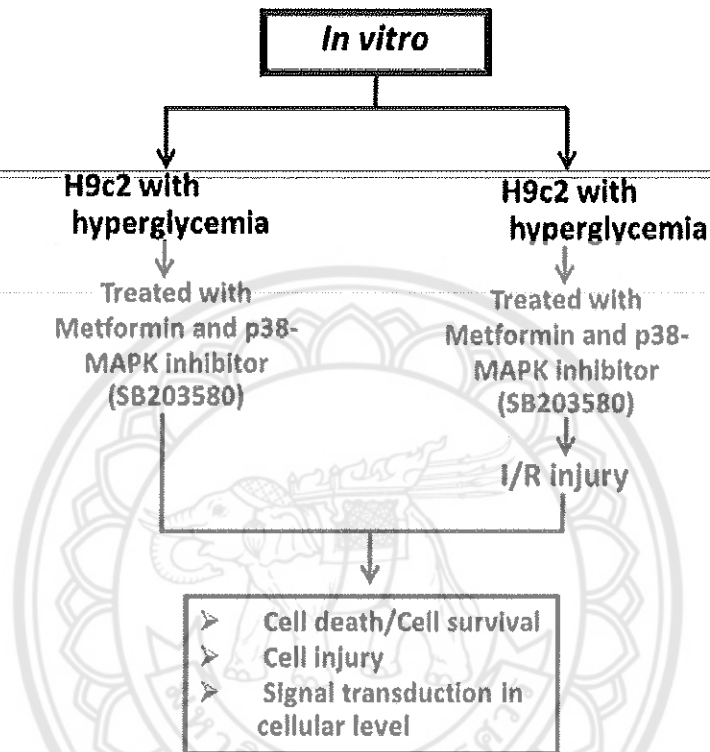
รูปที่ 1. การส่งสัญญาณของการกระตุ้น p38 MAPK ในภาวะต่ออินซูลิน (insulin resistance) และภาวะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (19)

การกระตุ้น p38 MAPK ใน myocardial ischemia นั้นทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis (20) โดยพบว่า p38 MAPK จะทำการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ α B-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 จะทำให้เกิดรูโหว่บนผนังท่อหุ้ม mitochondria ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria และนำไปสู่การตายของเซลล์ (22;23) นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่ชี้ชัดว่า การกระตุ้น p38 MAPK นั้นเป็นกระบวนการสำคัญให้เกิดอันตรายต่อหัวใจ เมื่อเกิดภาวะ myocardial ischemia โดยจากการศึกษาเมื่อได้ทำการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ด้วยการให้สารยับยั้ง (inhibitors) (20;24-49) หรือการศึกษาด้วยการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาโมเลกุลของยีน (50;51) ส่งผลให้เกิดการชะลอและลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แม้ว่าการศึกษาที่กล่าวมานั้นจะเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ต่อมาเมื่อมีการศึกษาในมนุษย์ก็ทำให้ทราบว่ากระบวนการการกระตุ้น 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 ในภาวะต่ออินซูลิน และภาวะโรคเบาหวานประเภท 2 นั้น มีระดับของการกระตุ้นการทำงานของ p38-MAPK ในภาวะพื้นฐาน สูงขึ้น (Basal p38 MAPK activation level) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับภาวะแทรกซ้อนในหัวใจ ที่ทำให้เกิดการพยากรณ์โรคที่แย่ง ดังนั้นการยับยั้งการกระตุ้น p38-MAPK ด้วยตัวยับยั้งอาจจะมีความประโยชน์ต่อหัวใจผู้ป่วยภาวะต่ออินซูลิน หรือภาวะเบาหวานประเภท 2 ได้ และจากที่กล่าวไปข้างต้น ถึงผลดีของยาเมทฟอร์มิน ต่อหัวใจของผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นการให้ตัวยับยั้ง p38 MAPK ร่วมกับยาเมทฟอร์มิน อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพในการลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ของผู้ป่วยเบาหวานที่ประสบภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้ ซึ่งจะส่งผลให้การทำงานของหัวใจของผู้ป่วยดีขึ้น และเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของผู้ป่วยและคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยในระยะยาว

บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย

แผนการดำเนินงานวิจัยในโครงการนี้ แบ่งออกเป็นการศึกษาผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ในภาวะน้ำตาลสูง และ ผลของการให้ยาเมทฟอร์มิน ร่วมกับ ตัวยับยั้ง p38 MAPK ต่อการบาดเจ็บและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด จำลอง ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 แสดงแผนภูมิแผนการศึกษาวิจัยในโครงการ

1. การเพาะเลี้ยงเซลล์ Rat cardiac myoblast (H9c2)

เซลล์ H9c2 ชื้อมาจาก American Type Cell Culture (ATCC-CRL1446) โดยเซลล์ H9c2 จะถูกทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco®) ที่มีการเติมสารละลายผสมระหว่างเพนิซิลินและสเตรปโตมัยซิน ในความเข้มข้น 5000 units/ml และ 10% Fetal Bovine Serum (FBS) โดยเซลล์จะทำการเลี้ยงในสภาวะ 37°C 5% carbon dioxide (CO₂) และ 95% oxygen (O₂) ตลอดการศึกษา เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ประมาณ 70-80% เซลล์จะถูกทำการย้าย (subculture) ลงใน flask ใหม่ ซึ่งการย้ายเซลล์นี้ทำได้โดยการเติม phosphate buffer saline (PBS) ที่ทำการอุ่นแล้วประมาณ 5 ml 2 ครั้ง เพื่อเป็นการล้างเซลล์ จากนั้นเซลล์จะถูทำให้แยกออกจาก flask ด้วยการเติมสารละลาย trypsin-EDTA ที่อุ่น ปริมาตร 1 ml และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 2 นาที (หรือทำการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ว่าเซลล์หลุดออกจาก flask แล้ว) หลังจากนั้นทำการหยุดปฏิกิริยาของ Trypsin-EDTA ด้วยการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่อุ่นแล้วลงไป ปริมาตร 5-10 ml. และทำการ

ย้ายเซลล์ไปในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อ แล้วทำการปั่นตกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1,800 รอบ ต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากทำการปั่นเสร็จแล้ว ส่วนใสข้างบน (Supernatant) จะถูกดูดทิ้งไป และทำการละลายตะกอน (Pellet) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 1 ml. จากนั้นเซลล์จะถูกดูดย้ายไปยัง flask ใหม่และทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยปริมาตรตามความเข้มข้นที่ต้องการ

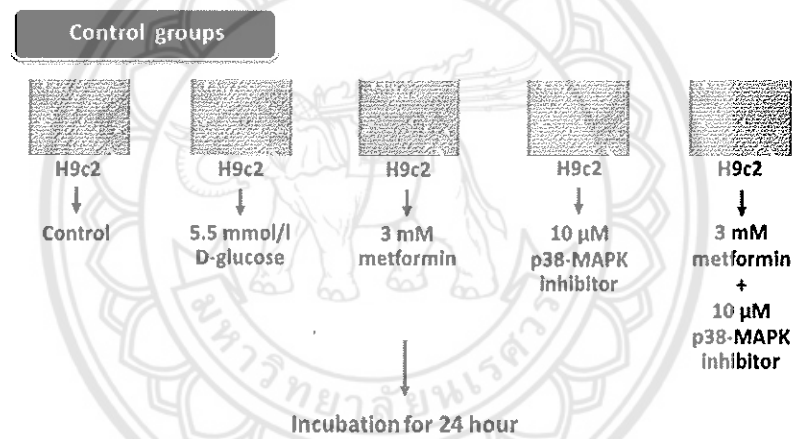
2. การศึกษาผลของการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูงในระดับหลอดทดลอง (in vitro study)

ในการทดลองนี้เซลล์ H9c2 จะถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง ด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีการกล่าวไว้ข้างต้นใน 96-well plate โดยที่แต่ละหลุมจะต้องมีความเข้มข้นของเซลล์ที่ประมาณ 1×10^5 cell/ml และทำการเลี้ยงเซลล์จนมีการเจริญเติบโตเป็น 60-80% ของหลุม จากนั้นเซลล์ จะถูกทำการเปลี่ยนจากอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดาไปเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของสารละลายน้ำตาล D-glucose ที่ความเข้มข้นต่างกันดังนี้ 5.5 mmol/l (กลุ่มควบคุม:Control group) 7.5 10 20 30 และ 35 mmol/l (กลุ่มเหนี่ยวนำน้ำตาลสูง:Hyperglycemic group) และทำการเลี้ยงต่อในสภาวะ 37°C, 5% carbon dioxide (CO₂) และ 95% oxygen (O₂) เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ทั้งหมดจะได้รับการตรวจสอบการบาดเจ็บและการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT และ LDH activity ตามลำดับ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้ทำการเลี้ยงเซลล์ H9c2 ในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลาย D-mannitol ที่ความเข้มข้นเดียวกับสารละลาย D-glucose และทำการตรวจสอบการบาดเจ็บและการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT และ LDH activity ตามลำดับ เพื่อทำการตรวจสอบผลของออสโมลาริตีในเซลล์

3. การศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินกับตัวยับยั้ง p38-MAPK (SB203580) ต่อเซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูง (Hyperglycemic condition)

เซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูงจากการทดลองก่อนหน้าจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้คือ

1. กลุ่มควบคุม (รูปที่ 3) ในกลุ่มนี้จะทำการแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ
 - 1.1) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+10%FBS
 - 1.2) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลาย D-glucose ที่ความเข้มข้น 5.5 mmol/L
 - 1.3) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายยาเมทฟอร์มิน ที่ความเข้มข้น 3 mM
 - 1.4) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายของตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 10 μ M
 - 1.5) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีสารละลายของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 3 mM และ 10 μ M ตามลำดับ



รูปที่ 3 แสดงแผนภูมิแผนการศึกษาการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินกับตัวยับยั้ง p38-MAPK (SB203580) ต่อเซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูง (กลุ่มควบคุม)

2. กลุ่มที่มีภาวะน้ำตาลสูง(รูปที่ 4) ในกลุ่มนี้จะทำการแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ
 - 2.1) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง
 - 2.2) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายยาเมทฟอร์มินที่ความเข้มข้น 3 mM
 - 2.3) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 10 μ M
 - 2.4) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 3 mM และ 10 μ M ตามลำดับ

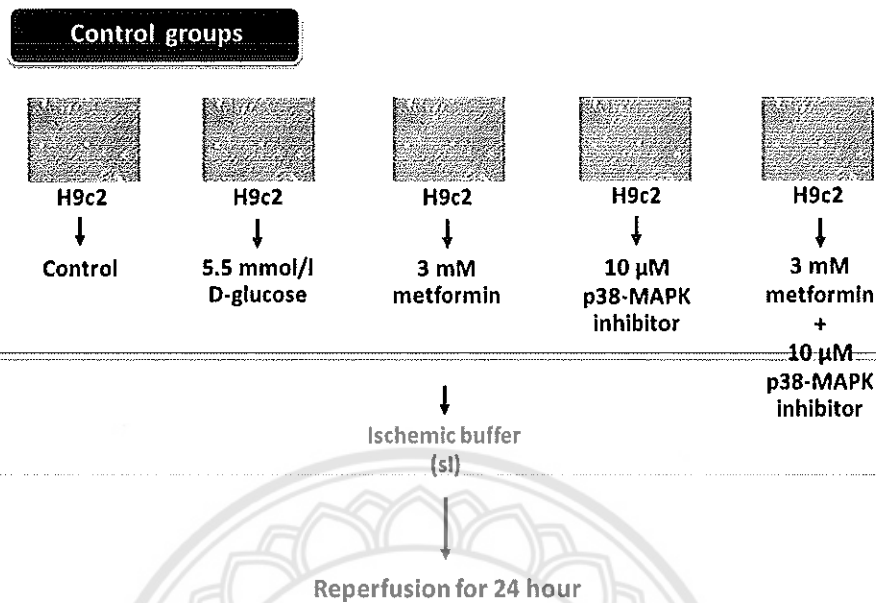
4.2 การศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินกับตัวยับยั้ง p38-MAPK (SB203580) ต่อเซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะขาดเลือดจำลอง

เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในสภาวะเดียวกับที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น จากนั้นเซลล์จะถูกทำการแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

- 1). กลุ่มควบคุม (รูปที่ 5) ในกลุ่มนี้จะทำการแบ่งออกเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ
 - 1.1) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM+10%FBS
 - 1.2) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลาย D-glucose ที่ความเข้มข้น 5.5 mmol/l
 - 1.3) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายยาเมทฟอร์มิน ที่ความเข้มข้น 3 mM (6)
 - 1.4) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายของตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 10 μ M
 - 1.5) เซลล์ H9c2 จะถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 3 mM และ 10 μ M ตามลำดับ

จากนั้นเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะขาดเลือดจำลอง (simulated ischemia) ตามด้วย reperfusion ด้วยอาหาร DMEM+10%FBS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่มแล้วเซลล์ทุกกลุ่มจะถูกตรวจสอบการบาดเจ็บและการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT viability และ LDH activity ตามลำดับ





รูปที่ 5 แสดงแผนภูมิแผนการศึกษาการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินกับตัวยับยั้ง p38-MAPK (SB203580) ต่อเซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูง และภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (กลุ่มควบคุม)

2). กลุ่มที่มีภาวะน้ำตาลสูง(รูปที่ 6) ในกลุ่มนี้จะทำการแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

2.1) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง

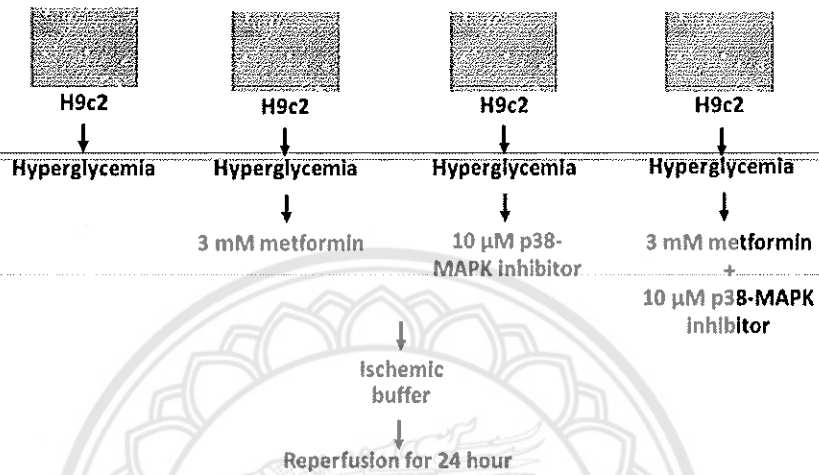
2.2) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่ส่วนผสมของสารละลายยาเมทฟอร์มินที่ความเข้มข้น 3 mM จากนั้นเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำภาวะขาดออกซิเจน และถูก reperfusion ด้วยอาหาร DMEM+10%FBS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.3) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่ส่วนผสมของสารละลายตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 10 μ M จากนั้นเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำภาวะขาดออกซิเจน และถูก reperfusion ด้วยอาหารธรรมดาเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง

2.4) เซลล์ H9c2 ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะน้ำตาลสูง และถูกเลี้ยงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายของยาเมทฟอร์มินร่วมกับตัวยับยั้ง p38-MAPK ที่ความเข้มข้น 3 mM และ 10 μ M ตามลำดับ

จากนั้นเซลล์จะถูกเหนี่ยวนำให้มีภาวะขาดเลือดจำลอง (simulated ischemia) ตามด้วย reperfusion ด้วยอาหาร DMEM+10%FBS เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาในการบ่มแล้วเซลล์ทุกกลุ่มจะถูกตรวจสอบการบาดเจ็บและการรอดชีวิตด้วยวิธี MTT viability และ LDH activity ตามลำดับ

Hyperglycemic subjected to ischemia/reperfusion groups



รูปที่ 6 แสดงแผนภูมิแผนการศึกษาการศึกษาผลของการทำงานร่วมกันระหว่างยาเมทฟอร์มินกับตัวยับยั้ง p38-MAPK (SB203580) ต่อเซลล์ H9c2 ที่ได้รับการเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูง และภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (กลุ่มที่มีภาวะน้ำตาลสูง)

5. วิธีประเมินอัตราการรอดชีวิตของเซลล์

การรอดชีวิต (Cell viability) จะถูกประเมินโดยใช้วิธี MTT viability ซึ่งสามารถทำได้ด้วยการนำเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำหรือทดสอบด้วยสารละลายต่างๆตามที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น (เมื่อครบเวลาแล้ว) มาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/ml แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วสารละลาย MTT จะถูกดูดทิ้งไปและเซลล์จะถูกเติมด้วยสารละลาย Dimethyl Sulfoxide (DMSO) หลังจากนั้นนำไปวัดค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 490 nm โดยใช้ DMSO เป็น blank จากนั้นนำค่าที่ได้มาทำการคำนวณเทียบกับระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูง หรือกลุ่มเหนี่ยวนำภาวะน้ำตาลสูงร่วมกับภาวะขาดออกซิเจน และแสดงค่าออกมาเป็นร้อยละ

7. การประเมินผลในระดับเซลล์ (Cellular signaling) โดยวิธี Western blotting

เซลล์จากแต่ละกลุ่มการทดสอบจะถูกทำให้เซลล์แตกโดยใช้ lysis buffer (200 μ l of 2x SDS-sample buffer: containing 2% SDS 2% β -mercaptoethanol และ 10% glycerol ใน 300 mM Tris-HCl, pH 6.8.) จากนั้นเซลล์ที่ถูกทำให้แตกจะได้รับการเก็บโปรตีนใส่ลงในหลอดใหม่ที่ทำการแช่เย็นไว้ (Microcentrifuge tube) เมื่อทำการเก็บโปรตีนเสร็จแล้ว โปรตีนจะถูกต้มในน้ำเดือดเป็นเวลานาน 10 นาที และทำการเก็บไว้ที่ -80°C จนกว่าจะถูกนำมาวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์โปรตีนจะทำได้โดยวิธี Western blotting คือ โปรตีนจะถูกทำการแยกบน 12 % SDS-polyacrylamide gels electrophoresis ด้วยกระแสไฟ 120 โวลต์ จากนั้นโปรตีนจะถูกย้ายไปยัง Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Hybond-P, GE Health Care) ด้วยการ ใช้ semi-dry transfer (Biorad) ที่กระแสไฟเท่ากับ 15 โวลต์ เป็นเวลานาน 60 นาที จากนั้นแผ่น PVDF membrane ที่มีโปรตีนอยู่จะถูกทำการบ่มใน 5% nonfat milk [ที่มีส่วนผสมของ 1% BSA in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100 (TBST)] เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (เพื่อกำจัด nonspecific binding) และทำการตรวจสอบด้วย primary antibodies ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่สนใจ เช่น phosphorylated-PI3 K total-PI3 K phosphorylated-Akt total-Akt phosphorylated p38 total-p38 Bax Bcl-2 cytochrome c และ caspase 3 ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานานข้ามคืน เมื่อครบเวลาแล้ว PVDF membrane จะถูกตรวจสอบด้วย horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น PVDF membrane จะถูกเติมด้วย chemiluminescence substrate (Amersham, England) และทำการตรวจสอบความเข้มของแถบโปรตีนที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง ChemidocTM XRS (BIORAD) จากนั้นทำการเปรียบเทียบความเข้มของแถบโปรตีนระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Image J

8. สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ได้รับตัวอย่างจากโครงการ NU-AE581023 ดังมีรายละเอียดดังนี้

ในการศึกษานี้ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 7 ตัว และหนูขาวสายพันธุ์ Goto-Kakizaki เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ จำนวน 14 ตัว สั่งจากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด เลขที่ 208-214 ซอยสมเด็จพระเจ้าตากสิน 29 ถนนสมเด็จพระเจ้าตากสิน แขวงบुकโคล เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร

โครงการวิจัยนี้ได้รับการรับรองด้านจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการกำกับดูแล
เลี้ยงสัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่โครงการ NU-AE581023 เลขที่เอกสารรับรอง 59 01 001

หนูทดลองถูกเลี้ยงในสถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร จนอายุ 14 สัปดาห์
หลังจากนั้นหนูทดลองจะถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 7 ตัว
หนูขาวสายพันธุ์ GK เป็นกลุ่มเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน จำนวน 7 ตัว และหนูขาวสายพันธุ์ GK เป็น
กลุ่มเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน 15 mg/BW เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จำนวน 7
ตัว สัตว์ทดลองทุกกลุ่มถูกเลี้ยงจนมีอายุ 20 สัปดาห์ จึงทำการเก็บตัวอย่างหลอดเลือด โดยการให้ยาเพนโท
บาร์บิทอล ขนาด 100 mg/ml จากนั้นผ่าบริเวณส่วนอก และทำการตัดหัวใจหนูอย่างรวดเร็ว แล้วทำการ
แยกหลอดเลือดออกและเก็บหลอดเลือดไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนนำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้

9. การวัดระดับ protein carbonyl concentration ในสารสกัดโปรตีน

นำสารสกัดโปรตีนปริมาณ 200 μl จากทั้ง 3 กลุ่ม เติมนลงในหลอดทดลอง 3 หลอด (หลอดที่ 1
สำหรับกลุ่มควบคุม หลอดที่ 2 สำหรับกลุ่มเบาหวานชนิดที่ 2 หลอดที่ 3 สำหรับกลุ่มเบาหวานชนิดที่ 2 ที่
ได้รับเมทฟอร์มิน) โดยหลอดที่ 1, 2, และ 3 เติม 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) ใน 2.5 M HCl
ปริมาณ 800 μl จากนั้นนำไปวางในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยนำออกมา vertex ทุกๆ
15 นาที เมื่อครบกำหนดเติม 20% Trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 1 ml แซ่หลอดทดลองไว้ใน
น้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifugation) ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา
10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C แล้วแยกส่วนที่เป็นน้ำ (supernatant)ทิ้ง จะเหลือแต่ตะกอน (pellet) ที่ก้นหลอด
ทดลอง จากนั้นเติม 10% TCA ปริมาตร 10 ml นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา
10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างตะกอนด้วย ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 1 ml นำไปปั่นเหวี่ยงที่
ความเร็วรอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเติม 6 M
Guanidine hydrochloride ปริมาตร 500 μl นำไปผสมให้เข้ากันด้วย vertex นำไปปั่นเหวี่ยงความเร็ว
รอบ 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำเติมใน cuvette ปริมาตร 400 μl ไป
วิเคราะห์ปริมาณ ด้วย UV spectrophotometer (รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ SHIMADZU) วัดค่าความดูดกลืน
แสงที่ 375 nm โดยนำค่าที่ได้มาคำนวณตามสูตรเพื่อหา Protein carbonyl content

การคำนวณที่เกี่ยวข้อง

1. ค่า Protein carbonyl concentration (nmol/ml)
ได้จากการวัดการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความคลื่น 375 nm

$$\text{Concentration (nmol/ml)} = \text{OD}_{375 \text{ nm}} \times 45.45$$

2. ค่า Protein carbonyl content (nmol/mg)

การคำนวณค่า Protein carbonyl content (nmol/mg) เป็นค่าของ carbonyl ที่ถูกต้องต่อ
ปริมาณโปรตีนที่มีอยู่ในปฏิกิริยาวิเคราะห์ (corrected protein) โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Protein carbonyl content (nmol/mg)} = \frac{\text{Protein carbonyl concentration (nmol/ml)}}{\text{Corrected protein concentration (mg/ml)}}$$

10. สถิติและการวิเคราะห์

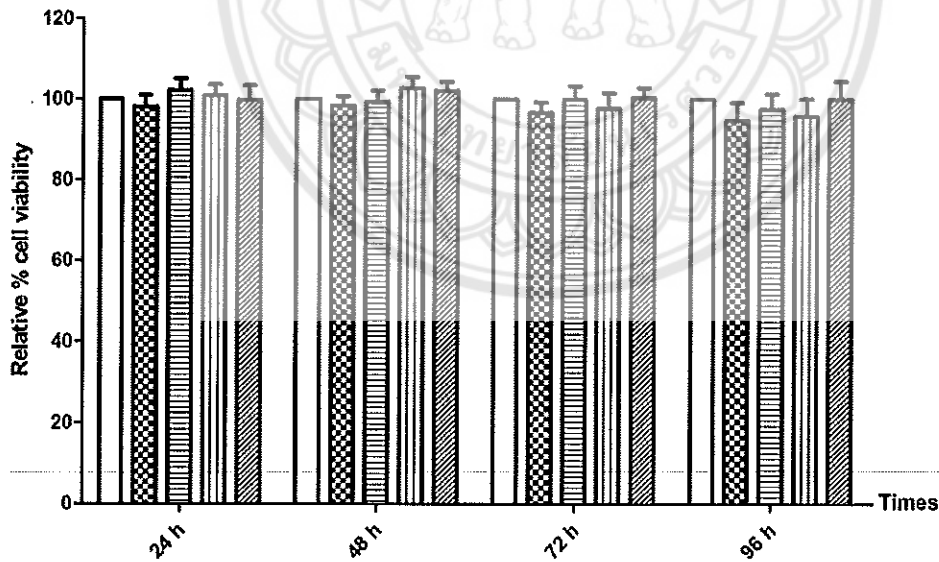
ข้อมูลทั้งหมดจะแสดงอยู่ในรูป mean \pm SD และการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มจะใช้ one-way analysis of variance (ANOVA) (Tukey-Kramer test) เป็นตัวสถิติวิเคราะห์ นอกจากนี้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของพารามิเตอร์ที่มากกว่า 1 กลุ่มขึ้นไปจะใช้การวิเคราะห์แบบ two-way analysis of variance (ANOVA) โดยค่าจะได้รับการพิจารณาว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะต้องมีค่า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



บทที่ 3: ผลการทดลอง

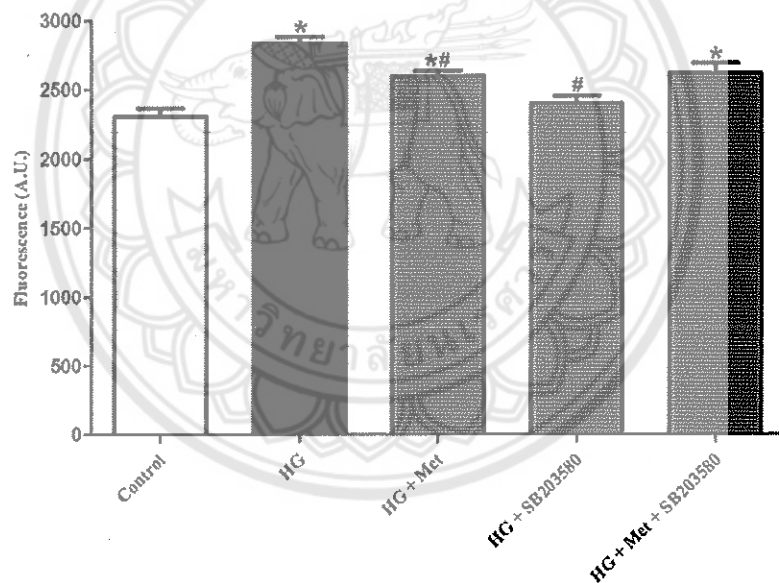
1. ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงส่งเสริมการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะขาดเลือดจำลอง

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ H9c2 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM medium ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล D-glucose ความเข้มข้น 11 mM, 22 mM, 33 mM, 60 mM เป็นเวลา 24 48 72 96 ชั่วโมง และทำการวัดการมีชีวิตของเซลล์ ผลการทดลองพบว่า ทุกความเข้มข้น และทุกเวลา น้ำตาลกลูโคสไม่สามารถลดการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ โดยมีร้อยละของเซลล์รอดชีวิต $100 \pm 0.00\%$ vs $101.4 \pm 2.29\%$, $101.8 \pm 2.26\%$, $99.74 \pm 2.10\%$, $93.40 \pm 2.04\%$, ที่เวลา 24 ชั่วโมง $100 \pm 0.00\%$ vs $98.03 \pm 1.85\%$, $96.28 \pm 2.94\%$, $95.00 \pm 3.27\%$, $93.13 \pm 2.07\%$, ที่เวลา 48 ชั่วโมง $100 \pm 0.00\%$ vs $94.72 \pm 1.29\%$, $93.63 \pm 1.30\%$, $91.54 \pm 1.83\%$, $87.28 \pm 1.78\%$ ที่เวลา 72 ชั่วโมง และ $100 \pm 0.00\%$ vs $95.25 \pm 1.83\%$, $98.88 \pm 1.68\%$, $95.32 \pm 1.52\%$, $91.07 \pm 1.51\%$ เวลา 96 ชั่วโมง จากผลการศึกษาที่ผ่านมาในการศึกษาการจำลองภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในเซลล์ พบว่า การศึกษาส่วนใหญ่ทำการศึกษาในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 33 mM ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงนำภาวะการเหนี่ยวนำดังกล่าวมาศึกษาต่อไป



ภาพที่ แสดงร้อยละของเซลล์มีชีวิตของ H9c2 cell line ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของน้ำตาล D-glucose ความเข้มข้น 11-60 mM เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยสร้างอนุมูลอิสระ (Reactive oxygen species, ROS) ภายในเซลล์ มากขึ้น และเป็นสาเหตุทำให้เซลล์เกิดการตาย ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 33 mM เวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า ภาวะดังกล่าวทำให้เกิดการสร้าง ROS ภายในเซลล์สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2832 ± 51.96 A.U.) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (2305 ± 61.26 A.U.) และการได้รับยา metformin, SB203580 สามารถลดระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ 2598 ± 36.18 A.U. และ 2615 ± 71.57 A.U. แต่การได้รับ metformin ร่วมกับ SB203580 นั้นถึงแม้จะมีแนวโน้มที่ลดระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์ได้ แต่กลับพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลสูง



ภาพที่ แสดงระดับการสร้าง ROS ภายในเซลล์

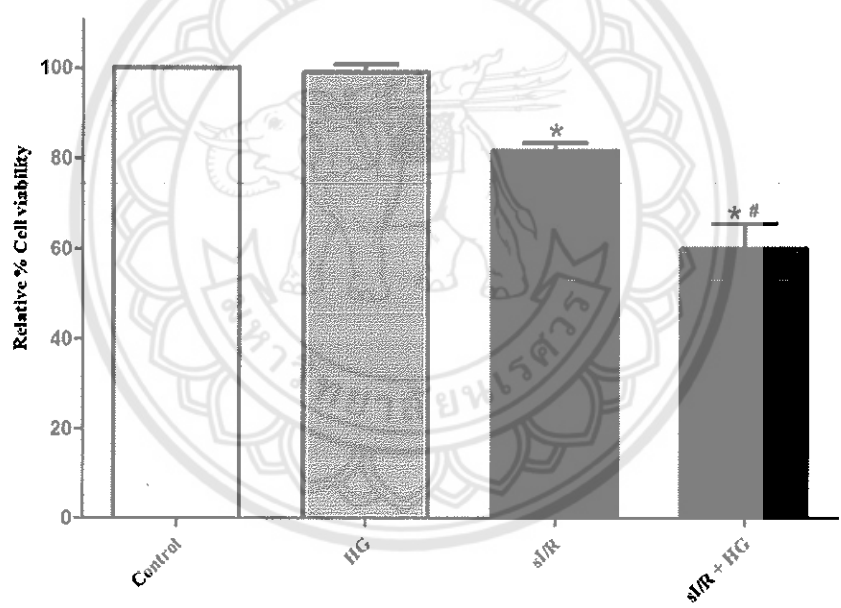
๑ ๑๒
๕๐1
1039462 ๒๕๕๙
๒๕๕๙



เมื่อทราบแล้วว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่ออยู่ในภาวะน้ำตาลในเลือดสูงแล้วจะชักนำให้เกิดการสร้าง ROS เพิ่มสูงขึ้นและเป็นปัจจัยในการส่งเสริมให้มีการตายเพิ่มมากขึ้นจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทำการเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลสูง และชักนำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (simulated ischemia/reperfusion injury) จากนั้นทำการวัดการรอดชีวิตของเซลล์

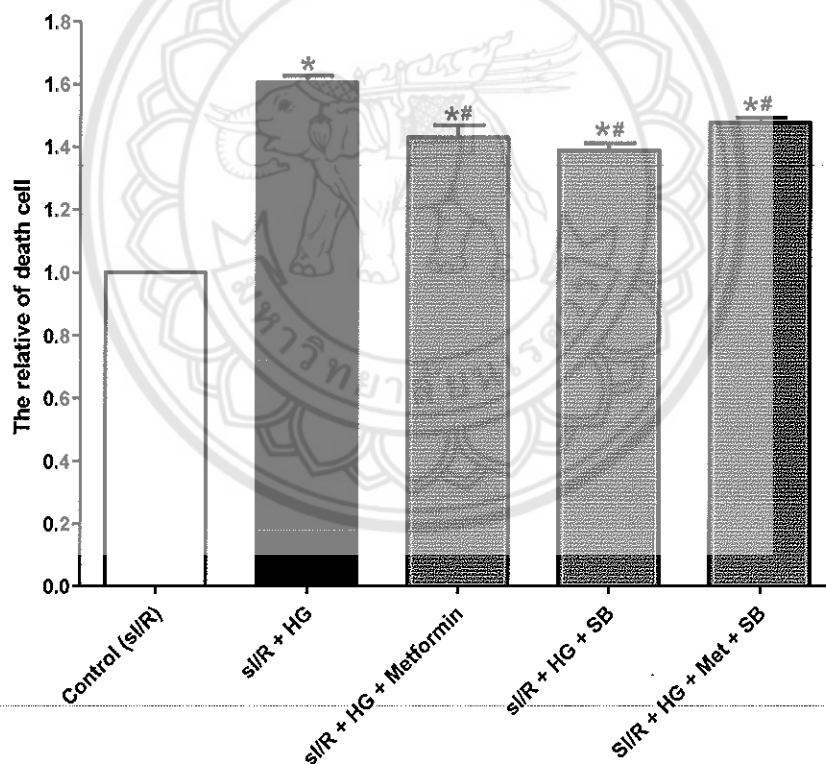
ผลการทดลองพบว่า เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและอยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองจะมีอัตราการตายเพิ่มมากขึ้นกว่าเซลล์ที่ไม่ได้อยู่ในภาวะน้ำตาลสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $81.50 \pm 1.77 \%$, vs $59.92 \pm 5.51 \%$



ภาพที่ แสดงร้อยละของ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและอยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

2. การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

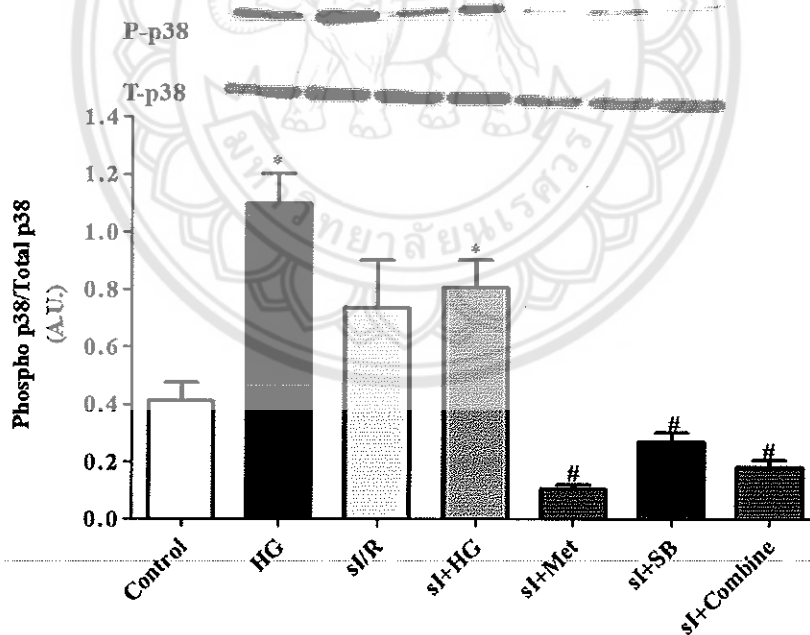
จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและอยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง ดังนั้นจึงทำการศึกษาศักยภาพของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ผลการทดลองพบว่า การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 สามารถลดจำนวนเซลล์ที่ตายจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1.00 ± 0.00 vs 1.61 ± 0.02 (sI/R + High-Glucose (HG)), 1.43 ± 0.04 (sI/R + HG + Met), 1.39 ± 0.02 (sI/R + HG + SB) and 1.48 ± 0.02 (sI/R + HG + Met + SB), $p < 0.05$; ANOVA)



ภาพที่ แสดงจำนวนเท่าของการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและอยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

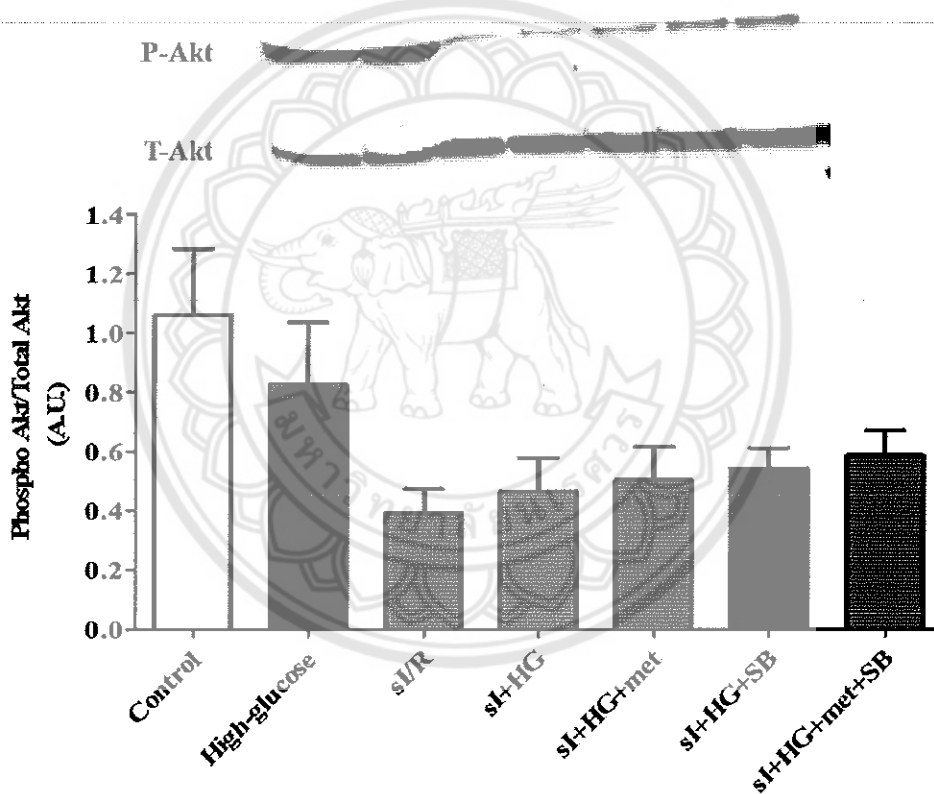
3. การได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ลดการกระตุ้น p38 MAPK phosphorylation แต่ไม่มีผลต่อ Akt phosphorylation

ทำการศึกษาระดับโปรตีน p38 MAPK โดยศึกษาระดับของ p38 MAPK phosphorylation และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง สามารถกระตุ้น p38 MAPK ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลในเลือดสูงรวมกับการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองมีการกระตุ้น p38 MAPK มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้อยู่ในภาวะน้ำตาลสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้รับ Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 สามารถลดระดับการกระตุ้น p38 MAPK phosphorylation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ แสดงการกระตุ้น p38 MAPK ในภาวะน้ำตาลสูง และร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580

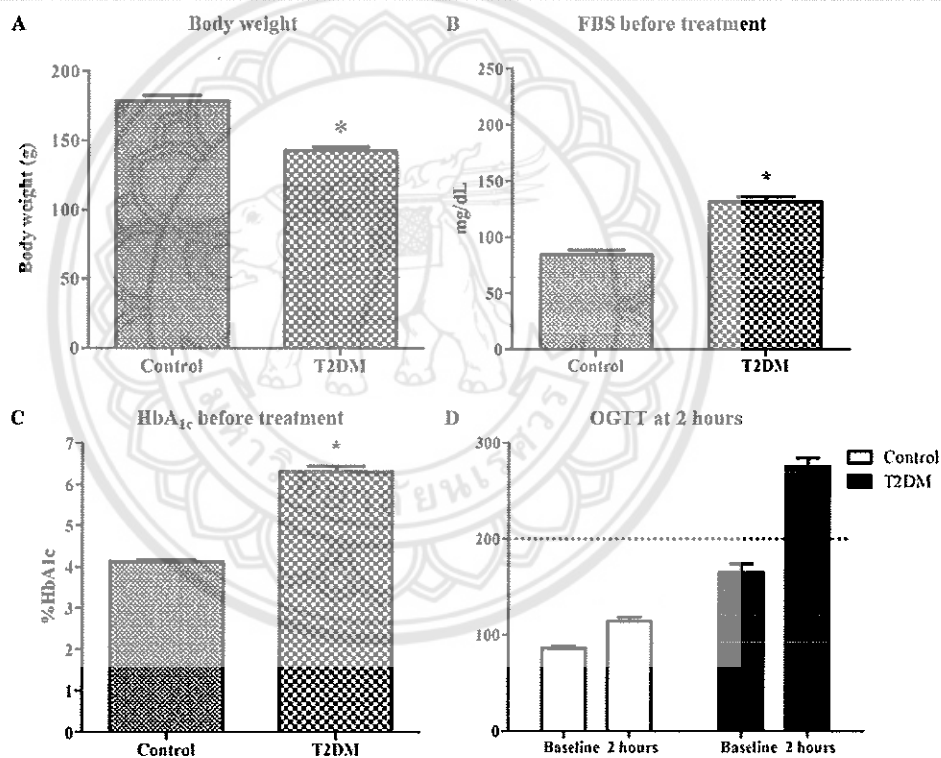
ทำการศึกษาการกระตุ้นโปรตีน Phosphokinase B หรือ Akt โดยศึกษาระดับของ Akt MAPK phosphorylation และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 ผลการทดลองพบว่า ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง สามารถกระตุ้น Akt ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ เซลล์ที่เลี้ยงในภาวะน้ำตาลในเลือดสูงร่วมกับการเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองมีการลดการกระตุ้น Akt อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การได้รับ Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580 มีแนวโน้มในการกระตุ้น Akt phosphorylation แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ แสดงการกระตุ้น Akt ในภาวะน้ำตาลสูง และร่วมกับภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และผลของการได้รับยา Metformin, SB203580 และการได้รับร่วมกันระหว่างยา metformin และ SB203580

4. หนูเบาหวานสายพันธุ์ Goto-kakizaki แสดงลักษณะของเบาหวานแบบไม่อ้วน

ผลการศึกษาในหนูทดลองสายพันธุ์ Goto-kakizaki (GK) พบว่า หนูGK มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูควบคุม (Wistar rat) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (142.5 ± 2.622 g vs 178.2 ± 4.048 g , p-value < 0.05) และพบว่า มีค่าระดับน้ำตาลในเลือด (131.5 ± 4.507 mg/dL vs. 84.00 ± 4.507 mg/dL, p-value < 0.05) ค่า HbA1c ($6.310 \pm 0.1251\%$ vs. $4.120 \pm 0.03887\%$, p-value < 0.05) ที่สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุม และให้ผล impaired glucose tolerance ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่า หนู GK rat เป็นหนูที่มีลักษณะทางพยาธิสภาพเหมือนโรคเบาหวานแบบไม่อ้วน



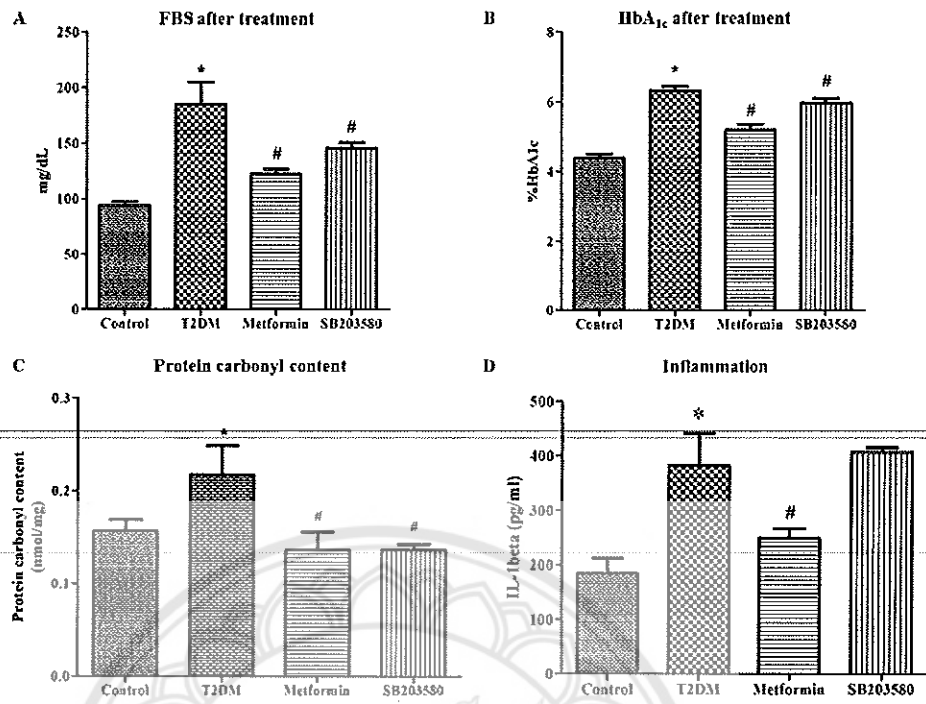
ภาพที่ แสดงน้ำหนักตัว และค่าระดับน้ำตาลในเลือด HbA1c และผลการทดสอบ glucose tolerance test ในหนูควบคุม Wistar rat และ หนู GK rat

5. การได้รับ Metformin, SB203580 ลดระดับน้ำตาลในเลือด ระดับการอักเสบ และระดับโปรตีนคาร์บอนิล

ผลการทดลองพบว่า การได้รับ Metformin และ SB203580 สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด (122.3 ± 4.412 mg/dL and 145.5 ± 5.106 mg/dL vs. 185.1 ± 19.92 mg/dL, p-value < 0.05, respectively) และ HbA1c ($5.189 \pm 0.1620\%$ and $5.957 \pm 0.1378\%$ vs. $6.310 \pm 0.1251\%$, p-value < 0.05, respectively) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาถึงระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH assay พบว่า ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดหนูกลุ่มควบคุม โดยใช้หนูสายพันธุ์ Wistar มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.1568 ± 0.012 nmol/mg ในส่วนหลอดเลือดหนูกลุ่มโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน โดยใช้หนูสายพันธุ์ Goto-kakizaki มีระดับโปรตีนคาร์บอนิล 0.2174 ± 0.031 nmol/mg และหลอดเลือดหนูกลุ่มโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน 15 mg/BW เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลที่ 0.1364 ± 0.019 nmol/mg และหลอดเลือดหนูกลุ่มโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนที่ได้รับยา SB203580 เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ มีระดับโปรตีนคาร์บอนิลที่ 0.1364 ± 0.006114 nmol/mg

ผลการศึกษาระดับสารบ่งชี้การอักเสบชนิด IL-1 β พบว่าหนูสายพันธุ์ Goto-kakizaki มีระดับ IL-1 β สูงกว่า หนูควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (381.1 ± 59.56 pg/ml vs. 183.8 ± 28.20 pg/ml, p-value < 0.05) การได้รับยา metformin สามารถลดระดับ IL-1 β ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบผลของลด IL-1 β ในหนูที่ได้รับ SB203580



ภาพที่ แสดงระดับน้ำตาลในเลือด และ HbA_{1c} ระดับ protein carbonyl และ สารบ่งชี้การอักเสบชนิด IL-1 β ในหนูควบคุม Wistar rat และ หนู GK rat ที่ได้รับยา metformin และ SB203580

บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research) มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาถึงระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน และศึกษาผลของยาเมทฟอร์มินต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน

จากการศึกษาได้นำหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน และหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูกลุ่มควบคุม มาวัดระดับโปรตีนคาร์บอนิล โดยนำทั้ง 2 กลุ่มตัวอย่างมาเปรียบเทียบกัน พบว่า ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน (0.2174 ± 0.031 nmol/mg) มีค่าสูงกว่าในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูกลุ่มควบคุม (0.1568 ± 0.012 nmol/mg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูเบาหวานที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง อาจเกิดจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นกว่าภาวะปกติ เช่น จากกระบวนการ Glucose autooxidation ที่เกิดขึ้นเองโดยมีปัจจัยภายนอกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (58) น้ำตาลในเลือดที่มีปริมาณสูงส่งผลต่อกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย โดยเกิดอนุมูลอิสระในขั้นตอนของ Oxidative phosphorylation (59) NAD(P)H oxidation และ Xanthine oxidation เป็นต้น (60, 61) ซึ่งกระบวนการต่างๆที่กล่าวมาข้างต้นเป็นการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระทั้งทางตรงและทางอ้อม รวมทั้งอาจส่งผลต่อการทำลายสารชีวโมเลกุลต่างๆมากขึ้น โดยเฉพาะโปรตีน เนื่องจากเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จึงถูกออกซิไดส์ได้ง่าย และโปรตีนบางตัวยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการ Transition metal หรือแม้แต่กระทั่งกรดอะมิโนบางชนิดสามารถถูกทำลายได้ โปรตีนที่ถูกสารอนุมูลอิสระทำลายจะเสื่อมสภาพและไม่สามารถทำหน้าที่ได้ โดยผลการศึกษาในงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Aparna A. Sagare และคณะ (47) ในปี 2012 ได้ศึกษาถึงระดับโปรตีนคาร์บอนิลในซีรัมในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า โปรตีนคาร์บอนิลในพลาสมาของผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ E Bigagli และคณะ (17) ได้ศึกษาถึงผลิตภัณฑ์จากกระบวนการออกซิเดชันในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ทั้งหมด 72 ราย จำแนกผู้ป่วยเป็น 4 กลุ่ม โดยแบ่งตามการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด พบว่า เมื่อผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือดมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของ Malondialdehyde (MDA) และระดับของ

โปรตีนคาร์บอนิล โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะแทรกซ้อนทั้ง macrovascular และ microvascular จะพบว่าโปรตีนคาร์บอนิลมีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ควบคุมน้ำตาลในเลือดได้ และในกลุ่มที่ไม่มีภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด และการศึกษาในปี 2018 ของ Rajarshi Kayal และคณะ (62) ได้ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับโปรตีนคาร์บอนิลกับโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ผู้ป่วยในช่วงอายุ 18-26 ปี, 27-35 ปี และ 36-45 ปี ทั้งเพศชายและหญิงใน อินเดีย โดยทำการศึกษาในซีรัม เปรียบเทียบระหว่างผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 กับผู้มีสุขภาพดี พบว่า ในผู้ป่วยโรคเบาหวานมีระดับโปรตีนคาร์บอนิลที่สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$) จากการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในซีรัม ซึ่งจากการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดโดยตรง

การศึกษานี้ที่ได้รับความอนุเคราะห์หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูจากโครงการ-NU AE581023 ซึ่งพบว่ามีค่า FPG, HbA1c และ OGTT ก่อนได้รับยาเมทฟอร์มินในกลุ่มหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และกลุ่มหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับยาเมทฟอร์มินมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (63) จากการศึกษาเปรียบเทียบระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนและหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน พบว่า ระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน (0.2174 ± 0.031 nmol/mg) มีค่า สูงกว่าหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน (0.1364 ± 0.019 nmol/mg) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p\text{-value} < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Umar Zayyanu Usman และคณะ (2016) ที่ศึกษาระดับโปรตีนคาร์บอนิลในพลาสมาหนูที่ถูกเหนี่ยวนำโรคเบาหวานโดย Streptozotocin พบว่าหนูที่ได้รับยาเมทฟอร์มินมีระดับโปรตีนคาร์บอนิลต่ำกว่ากลุ่มหนูโรคเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ (64) เนื่องจากยาเมทฟอร์มินสามารถลด Reactive Oxygen Species (ROS) (65) ซึ่ง ROS ที่สูงขึ้นส่งผลทำให้เกิดโปรตีนคาร์บอนิล จากระดับโปรตีนคาร์บอนิลที่ลดลงในหลอดเลือดหนูที่ได้รับยาเมทฟอร์มินคาดได้ว่าอาจเกิดจากการลดลงของ ROS นอกจากนี้ ยาเมทฟอร์มินยังสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดจากกลไกต่างๆ เช่น ยับยั้งการสร้างน้ำตาลที่ตับ (Hepatic gluconeogenesis) ลดการดูดซึมน้ำตาลที่บริเวณลำไส้เล็ก (Intestinal glucose absorption) และเพิ่มการใช้น้ำตาลมากขึ้น (glucose utilization) (64) ดังนั้นยาเมทฟอร์มินนับว่าเป็นยาที่มีความสำคัญ ในการลดการเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชัน ในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน

นอกจากงานวิจัยที่ศึกษาระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แล้ว ได้มีการศึกษาการเกิด Protein carbonylation ในสมองของหนูที่ได้รับบาดเจ็บ (Traumatic brain injury) พบว่าบริเวณเนื้อสมอง หลังจากที่ได้รับบาดเจ็บมีโปรตีนคาร์บอนิลเพิ่มขึ้นใน (66) Bogna Gryszczyńska และคณะ (67) ได้ศึกษา ในผู้ป่วยโรค Abdominal aortic aneurysms (AAA), Aortoiliac occlusive disease (AIOD), และ Chronic kidney disease (CKD) จาก blood sampling ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH พบว่า หลอดเลือดทั้ง AAA, AIOD และ CKD มีการสร้างผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ Protein carbonylation เพิ่มมากขึ้น และปี 2013 ประเทศไทยมีการศึกษาระดับของ Protein carbonyl content ในซีรัมของผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว เรื้อรังเปรียบเทียบกับผู้ที่มีสุขภาพดี ด้วยวิธี Spectrophotometric DNPH ผลการศึกษาพบว่า ระดับของ Protein carbonyl content ในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังมีค่าสูงกว่าผู้ที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) (68) จะเห็นได้ว่าการใช้โปรตีนคาร์บอนิลในการประเมิน ภาวะความเครียดออกซิเดชัน ในหลากหลายอวัยวะและหลายพยาธิสภาพ ซึ่งการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาระดับโปรตีนคาร์บอนิลใน หลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน ตลอดจนการศึกษาผลของยาเมทฟอร์มินต่อระดับ โปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วน

การศึกษานี้เป็นการศึกษาพื้นฐานในการวิเคราะห์ระดับ Protein carbonyl content ในหลอดเลือด โดยตรงถึงแม้ว่าจะทำการวิเคราะห์ในสัตว์ทดลอง แต่สามารถนำผลของการศึกษานี้ไปใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงของ การศึกษาต่อยอดทางคลินิกในอนาคตในการประเมินระดับโปรตีนคาร์บอนิลในหลอดเลือดเพื่อพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ ที่มีความจำเพาะของหลอดเลือด เพื่อใช้ประเมินภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือดในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือ ติดตามการรักษาของยาเมทฟอร์มินต่อภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดต่อไป

ข้อเสนอแนะ

ควรมีศึกษาระดับโปรตีนคาร์บอนิลในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ในสัตว์ทดลองสายพันธุ์ Spontaneously diabetic torii (SDT) ซึ่งเป็นหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แบบไม่อ้วนจากการผสมของหนูสายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) ที่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง เพื่อที่จะเปรียบเทียบและดูแนวโน้มของระดับโปรตีนคาร์บอนิลว่ามีความ แตกต่างกันหรือไม่อย่างไร

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, Kellner 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, Loudon 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.

- (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, Loudon 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.

