



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้ฤษณาต่อ
เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง

An *in vitro* effect of *Aquilaria spp.* crude extract on isolated Adult Rat Ventricular

Myocytes (ARVMs) subjected to simulate ischemia

โดย อ.ดร.ทนพ.สรารุช คำปวน และคณะ

ตำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน... 14 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน... 1.616951X
เลขเรียกหนังสือ... ๑ RC

มิถุนายน 2555

685

๐๓๑

๘๗๕๕

๒๕๕๕



สัญญาเลขที่ R2555B042

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อ
เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง

An in vitro effect of *Aquilaria* spp. crude extract on isolated Adult Rat Ventricular
Myocytes (ARVMs) subjected to simulate ischemia

คณะผู้วิจัยและคณะ

1. อ.ดร.ทนพ.สรารุช คำปวน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. อ.ฐิติภรณ์ เมฆรุ่งเรืองวงศ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชูศักดิ์ เรืองรัตนภูมิ เจ้าของต้นกฤษณา ที่เอื้อเฟื้อมอบลำต้นกฤษณา

เพื่อให้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ อ.ดร.ภานุมาศ ทองอยู่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการสกัดสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา

ขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้
เครื่องมือ ครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สรารุช คำปวน

มี.ย. 2555

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่แยกได้จากหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่ได้รับบาดเจ็บ หรือ ได้รับอันตรายจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง และศึกษาถึงกลไกของสารสกัดที่เกี่ยวข้องกับ p38 MAPK

วิธีการ ทำการแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจส่วน Ventricle (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) จากหัวใจหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม ชักนำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และในภาวะที่มีการเติมสารสกัด หรือ ไม่มีการเติมสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ทำการวิเคราะห์การบาดเจ็บของเซลล์ด้วยการตรวจวัดระดับแอกติวิตีของเอนไซม์ Lactate dehydrogenase และวัดร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย MTT cell viability assay ทำการศึกษาการกระตุ้น p38 MAPK ด้วยเทคนิค western blot analysis ในภาวะที่เติมสารสกัดเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองนาน 40 นาที หรือ ในขณะที่เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

ผลการทดลอง ผลการทดลองพบว่า ระยะเวลาการชักนำภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง 3 ชั่วโมงเป็นระยะเวลาที่เลือกใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด โดยพบว่าที่ความเข้มข้นที่ 5 mg/ml มีผลในการลดการตาย และการบาดเจ็บของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา มีฤทธิ์ในการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK เนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

สรุปผลการศึกษา สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ที่ความเข้มข้น 5 mg/ml สามารถลดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์หัวใจเนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลองด้วยการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK และรักษาโครงสร้างภายในเซลล์

ABSTRACT

To investigate the effect of ethyl acetate of *Aquilaria crassana* crude extract on simulated ischemia-induced cardiac cell injury, mechanism on p38 MAPK activation, in isolated Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVMs), so as to provide some evidence for its traditional use.

The ARVMs were isolated from 6-8 weeks male Wistar rat by collagenase-based enzymatic digestion and maintained in cell culture system. ARVMs were subjected to 3 hrs simulated ischemia/reperfusion, in the presence and absence of various concentrations of the extract. The cellular injury and viability were determined.

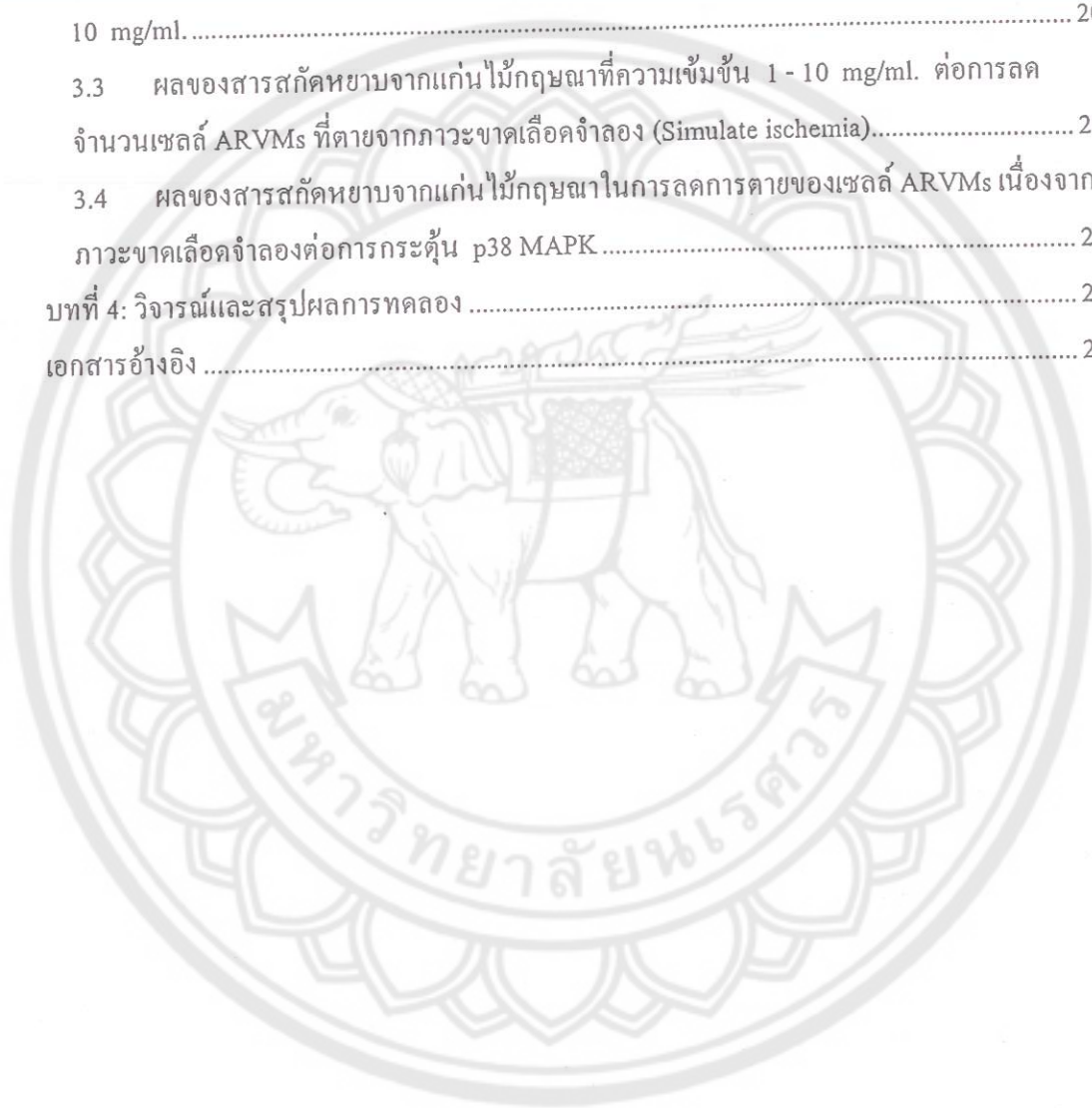
Cells were pre-treated with 5 mg/ml of *Aquilaria* extract for 1 hour before, or at the beginning of 40 minutes simulated ischemia. Activation of p38 MAPK was measured by Western blot analysis. The results showed that 3 hr of simulated ischemia was significantly produced cellular injury and cell death, which was significantly inhibited when treated with 5 mg/ml ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* ($p < 0.05$). Treatment 5 mg/ml of *Aquilaria* extract significantly reduced ischemia-induced p38 MAPK phosphorylation ($p < 0.05$). The results suggested the cardioprotective effect of *Aquilaria crassna* extract against myocardial ischemia/reperfusion injury.

KEYWORDS: *Aquilaria crassna*; Myocardial Ischemia; Actin cytoskeleton; p38 MAPK

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ	1
บทคัดย่อ	2
ABSTRACT	3
สารบัญเรื่อง (Table of Contents)	4
บทที่ 1: บทนำ.....	6
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	6
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	9
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย.....	9
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย.....	10
บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย	11
2.1 สัตว์ทดลอง	11
2.2 ตัวอย่างแก่นไม้กฤษณาและการพิสูจน์สายพันธุ์.....	12
2.3 สารสกัดจากแก่นไม้กฤษณา.....	12
2.4 การแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท และ การเพาะเลี้ยงเซลล์ และทดสอบ ความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์.....	12
2.5 สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง	13
2.6 การทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตายและเซลล์รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay 13	
2.7 การทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH activity)	14
2.8 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่ เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา	14
2.9 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จากภาวะขาดเลือดจำลอง.....	14
2.10 การวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธี SDS – PAGE และ western blot.....	15
2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล	16
บทที่ 3: ผลการทดลอง.....	17

3.1 การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) ในสภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)	17
3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในช่วงความเข้มข้นที่ 1 – 10 mg/ml.....	20
3.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. ต่อการลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia).....	21
3.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์ ARVMs เนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลองต่อการกระตุ้น p38 MAPK.....	24
บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	28



บทที่ 1: บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นโรคไม่ติดต่อที่ได้รับการจัดอันดับโดยองค์การอนามัยโลก ให้เป็นสองอันดับแรกของโรคไม่ติดต่อที่เป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลก และยิ่งไปกว่านั้น องค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์สาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั้งโลกในอนาคต โดยคาดการณ์ว่า ในปี 2030 โรคไม่ติดต่อจะเป็นสาเหตุการตายสูงสุด มากกว่าโรคทางโภชนาการ และโรคติดต่อร้ายแรงเช่น โรคเอดส์ โรควัณโรค มาลาเรีย(1-4)ยิ่งไปกว่านั้น ในกลุ่มโรคไม่ติดต่อที่จะเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรทั่วโลกนั้น โรคภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเฉียบพลัน (Acute Myocardial infarction, AMI) และ โรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular disease) จัดเป็นสองอันดับแรกในปี 2004 และยังคงเป็นสองอันดับต้นๆที่จะเป็นสาเหตุการเสียชีวิตของประชากรโลกในปี 2030 ซึ่งชี้ให้เห็นถึงความรุนแรง และความสำคัญของโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคหัวใจขาดเลือด(1)และถึงแม้ว่าอุบัติการณ์การเสียชีวิตในแต่ละปีจะมีการลดลงในกลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว(5)แต่กลับพบว่าอัตราการเสียชีวิตในประเทศกำลังพัฒนามีอัตราสูงขึ้นมาก(6)รายงานอัตราการตายของประชากรไทย พบว่าโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอยู่ใน 4 อันดับแรก (7-10)โดยโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดมีสาเหตุมาจากหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary artery) ที่ไปเลี้ยงหัวใจตีบตันส่งผลทำให้กล้ามเนื้อหัวใจขาดออกซิเจน ขาดความสมดุลในการทำหน้าที่ อาจเกิดจากหลายสาเหตุ โดยสาเหตุหลักมาจากการแตกหรือฉีกขาดของ atherosclerotic plaques ทำให้มีการกระตุ้นเกร็ดเลือด (Platelet) ปัจจัยการแข็งตัวของเลือด (Coagulation factor) และส่งผลให้เกิดลิ่มเลือด (Thrombus) มาอุดกั้นหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Coronary artery) นำไปสู่การตายของกล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากมีการขาดเลือดและออกซิเจนเป็นเวลานาน ทำให้เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตาย (Myocardial infarction) ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ (11) ในปัจจุบันวิธีการรักษาที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่สามารถลดอัตราการตายคือการทำให้เลือดสามารถไหลเวียนไปสู่กล้ามเนื้อของหัวใจได้อีกครั้ง (Reperfusion) โดยการทำลายก้อนไขมันที่อุดตันในหลอดเลือด ไม่ว่าจะโดยวิธีการใช้ยาเพื่อสลายลิ่มเลือด หรือการทำให้ก้อนไขมันที่อุดตันในหลอดเลือดแตกตัวโดยวิธีทางกายภาพ นอกจากนี้การเสียชีวิตของผู้ป่วยจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจตายแบบเฉียบพลันมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่กู้คืนได้ภายหลังจากการทำให้เลือดไหลเวียนไปหล่อเลี้ยงกล้ามเนื้อหัวใจได้อีกครั้ง (Reperfusion)(12)

เนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดนั้น ทำให้เซลล์ของหัวใจเกิดการขาดออกซิเจน และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเมตาบอลิซึมของเซลล์ มีการศึกษาที่บ่งชี้ว่า reactive oxygen species (ROS) อาจจะมีบทบาทสำคัญในกลไกการเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายได้ โดยในขณะที่เกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (Ischemia) นั้น การขาดออกซิเจน จะทำให้กระบวนการ Oxidative Phosphorylation ถูกยับยั้ง ทำให้เกิดการสูญเสีย adenine nucleotide และ cytochrome c เกิดการกั่งสะสมของ free phosphate, fatty acids and lactic acid เกิดการเพิ่มสูงขึ้นของแคลเซียมในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และเกิดภาวะความเป็นกรดในเซลล์ นอกจากนี้ ในภาวะ reperfusion ก็ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากกระบวนการ Oxidative stress ได้เช่นกัน โดยโมเลกุลของออกซิเจน จะจับตัวผลผลิตที่เกิดจากขบวนการโซ่หายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiratory chain) ที่ถูกทำลายลง และทำให้เกิดการสร้าง ROS ขึ้นมาเพิ่มอีก และทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้รับอันตรายมากขึ้น(13-15) มีความพยายามในการศึกษาเพื่อลดอันตรายที่เกิดจาก ROS ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยการศึกษาที่ใช้สารต้านกระบวนการ Oxidation (Anti-oxidant) หลายชนิดมีผลดีต่อหัวใจและลดอัตราการตายของหัวใจเมื่อเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เช่น การใช้อนุพันธ์ของ Trimetazidine (15) หรือ การใช้เมลาโทนิน (16) เป็นต้น ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่า สาร anti-oxidant เหล่านี้สามารถลดการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่เกิดจากกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้

มีหลักฐานการวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่า ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดนั้น มีการกระตุ้น signaling protein หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง p38MAPK ซึ่งเป็น โปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 38 kDa จัดอยู่ใน serine/threonine kinases ซึ่งพบว่ามีผลสำคัญในกระบวนการตอบสนองต่อภาวะเครียด รวมถึงการตอบสนองต่อการอักเสบ การพัฒนาการของเซลล์ การเจริญเติบโต และการตายของเซลล์จากรายงานการวิจัยพบว่ากระตุ้น p38 MAPK ที่เกิดขึ้นในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดนั้น ส่งเสริมให้เกิดการบาดเจ็บและทำลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (17) โดยอาจเกิดจากการกระตุ้นการสร้าง cytokine ชนิด TNF-alpha (18) และการกั่งของเม็ดเลือดขาวซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาของการอักเสบตามมา (19) นอกจากนี้ยังพบว่ากระตุ้น p38 MAPK ใน myocardial ischemia นั้นทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยพบว่า p38 MAPK จะทำการกระตุ้นการเติมหมู่ฟอสเฟตให้ α B-Crystallin ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย p38 MAPK แล้ว โปรตีนทั้งสองชนิดจะมีการเคลื่อนที่สู่ mitochondria และทำให้ mitochondria เสียสภาพ (20) และมีการศึกษาพบว่ากระตุ้น p38 MAPK ยังทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ apoptosis เช่น caspase-3 ส่งผลให้เกิดการเสียหายของ mitochondrial

transmembrane potential (21) และการกระตุ้น p38 MAPK ยังมีความสำคัญต่อการทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของโปรตีน Bax ไปสู่ mitochondria และเมื่อเกิดการรวมตัวกับโปรตีน Bak จะทำให้เกิดรูโหว่บนผนังห่อหุ้ม mitochondria ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome c จาก mitochondria และนำไปสู่การตายของเซลล์ (21;22) นอกจากนี้มีหลายการศึกษาที่ชี้ชัดว่า การกระตุ้น p38 MAPK นั้นเป็นกระบวนการสำคัญให้เกิดอันตรายต่อหัวใจ เมื่อเกิดภาวะ myocardial ischemia โดยจากการศึกษาเมื่อได้ทำการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ด้วยการใช้สารยับยั้ง (inhibitors) (18;23-48) หรือการศึกษาด้วยการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาโมเลกุลของจีน (49;50) ส่งผลให้เกิดการชะลอและลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ แม้ว่าการศึกษาที่กล่าวมานั้นจะเป็นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลอง ต่อมามีการศึกษาในมนุษย์ก็ทำให้ทราบว่ากระบวนการกระตุ้น p38 MAPK และผลกระทบต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจน่าจะมีกลไกที่คล้ายคลึงกัน (51;52) โดยที่ p38 MAPK จะถูกกระตุ้นเมื่อหัวใจอยู่ในสภาวะ ischemia (17;23;25;26;31;35;39-41;43;48;53) ข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นถึงประโยชน์ของการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่า อย่างน้อยที่สุดตามหลักทฤษฎีแล้ว การยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK มีศักยภาพเชิงการรักษาในโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (54)

กฤษณา เป็นไม้ยืนต้นในสกุล เอควิลาเรีย (*Aquilaria*) วงศ์ ไทเมลีสีชีอี (*Thymelaeaceae*) มีชื่อเรียกอื่นๆคือ Aglia, Akyaw, Aloe-wood, Calambac, Eagle wood, Lignum-aloe ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ เป็นไม้ยืนต้น ลำต้นตรง เปลือกเรียบสีเทา เนื้อไม้อ่อนสีขาว ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปวงรีแกมขอบขนาน ผิวเป็นมัน ดอกช่อออกเป็นช่อเล็กๆ ที่ซอกใบและปลายกิ่ง ดอกย่อยขนาดเล็ก กลีบดอกสีขาวแกมเขียว ผลเป็นผลแห้งรูปวงรี เปลือกแข็ง มีขนเทาเมื่อแก่จะแตก กลีบเลี้ยงจะเจริญติดกับผล (55) ต้นกฤษณาได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ตั้งแต่สมัยโบราณ โดยนำมาใช้ประกอบการรักษา การอักเสบ, ข้ออักเสบ, การอาเจียน, รักษาอาการ ไอ อาการชาปลายมือปลายเท้า โรคผิวหนังชนิด Courap, โรคหืด, อาการปวดท้อง(56) นอกจากนี้พบว่า สารสกัดจากกฤษณาที่สกัดด้วยเบนซีน มีฤทธิ์กระบบประสาทส่วนกลาง(57) สารสกัดที่ได้จากใบของกฤษณายังมีฤทธิ์ต้านจุลชีพหลายชนิด(58) และยังพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านมะเร็งอีกด้วย(59) มีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของการบรรเทาปวดและลดอักเสบของสารสกัดจากต้นกฤษณามากมาย เช่น พบว่าสารสกัดจากใบกฤษณา มีฤทธิ์ในการบรรเทาปวดและลดการอักเสบในหนูทดลองที่ถูกกระตุ้นการอักเสบ บวมโดยสาร xylene และ carrageenan(60) และยังพบว่า สารสกัดจากแก่นกฤษณา สามารถยับยั้งอาการแพ้อย่างเฉียบพลันที่แสดงออกทางผิวหนังในหนูทดลอง โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งสารหลังสาร histamine จาก mast cell(56) สารสกัดจากแก่นกฤษณาที่สกัดโดยใช้ Ethyl acetate เป็นตัวทำละลาย

มีฤทธิ์ลดการอักเสบในหนูทดลองที่กระตุ้นการอักเสบของอุ้งเท้าที่ฉีด Carrageenan และการเกิด granuloma ที่กระตุ้นโดยใช้ cotton pellets(61) และที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งคือ มีการกล่าวอ้างในตำรับยาสมุนไพรของไทย ฤๅษณามีฤทธิ์ในการบำรุงโรคหัวใจ(62) โดยมีการใช้ฤๅษณาเป็นส่วนผสมในตำรับยาหอม ซึ่งมีการปรุงและใช้กันมาเป็นเวลานาน จากอดีตถึงปัจจุบัน และอ้างว่าฤๅษณามีฤทธิ์ในการบำรุงหัวใจ(63-65) และลดความดันโลหิต(66) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการที่แท้จริง หรือกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นฤๅษณาต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดนั้นยังไม่มีการศึกษาอย่างแน่ชัด มีเพียงรายงานบางฉบับที่ชี้ให้เห็นถึงคุณสมบัติของสารสกัดจากสมุนไพรชนิดนี้ในการยับยั้งกระบวนการ Oxidation ของฮีโมโกลบินของมนุษย์ที่ถูกชักนำโดยสารประกอบ nitrite (67) และจากการศึกษาเบื้องต้นของผู้วิจัย (ผลการวิจัยรอการตีพิมพ์เผยแพร่) นั้น ทำให้ทราบกระบวนการที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยลดการสร้างไซโตไคน์ชนิด Tumor Necrosis Factor- alpha (TNF- α) ในเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นโดย Lipopolysaccharide ของแบคทีเรีย ซึ่งจากผลการศึกษาข้างต้นที่กล่าวมา ทั้งฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา Oxidation และลดการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- α นั้น ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า สารสกัดจากแก่นไม้ฤๅษณา สามารถลดความบาดเจ็บเสียหายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในสภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้ฤๅษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ของสารสกัดจากต้นฤๅษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้ ศึกษาความสามารถและกลไกของสารสกัดจากแก่นไม้ฤๅษณา ในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่าง ที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท สายพันธุ์ Wistar โดยสารสกัดหยาบจากแก่นไม้ฤๅษณา สกัดจากต้นฤๅษณาที่มีการเพาะปลูกในประเทศไทย โดยทำการศึกษาในหลอดทดลอง เกี่ยวกับผลของสารสกัดในการลดการตายของเซลล์เนื้อหัวใจเนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) และศึกษากลไก

ที่เกี่ยวข้องผ่านทางกลไกการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มีกรอบแนวคิดเพื่อตอบคำถามวิจัย และสมมุติฐานดังต่อไปนี้

คำถามวิจัยที่ 1: สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาสามารถป้องกันการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท ที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้หรือไม่

สมมุติฐาน 1: สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาไม่เป็นพิษต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท

สมมุติฐาน 2: สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาลดจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้

คำถามวิจัยที่ 2: สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาสามารถลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท ที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ด้วยการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK

สมมุติฐาน 1: สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณายับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ที่ถูกกระตุ้นจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

บทที่ 2: วิธีดำเนินงานวิจัย และผลการวิจัย

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม โดยสั่งซื้อจาก ศูนย์สัตว์ทดลอง แห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ. นครปฐม โดยทำการเลี้ยงที่ห้องเลี้ยง สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยควบคุมสิ่งแวดล้อมในห้องเลี้ยง ที่มีอุณหภูมิห้อง $25 \pm 1^\circ\text{C}$ อัตราส่วนแสงสว่างกลางวันกับกลางคืน 12:12 โดยมีการจัด สิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมทั้งอาหาร และน้ำ อย่างบริบูรณ์ โดยมีจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง ดังแสดง ในตารางที่ 1.

การใช้สัตว์ทดลองในงานวิจัยได้ขึ้นเสนอขอรับรองจริยธรรมในการใช้สัตว์ แบบเต็ม รูปแบบ ต่อคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตารางที่ 1. กลุ่มทดลอง และจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้

ลำดับ	กลุ่มการทดลอง / การศึกษา	จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้
1	ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบของแก่นไม้กฤษณาต่อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจส่วน Ventricle โดยทดลองความเข้มข้นของ สารสกัดหยาบ หลายความเข้มข้น	3
2	การทดสอบการตายของเซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนู แรทเมื่ออยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)	3
3	ทดสอบการเกิดกระบวนการ Apoptosis ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง	3
4	ทดสอบการยับยั้งการบวนการ Apoptosis ของสารสกัดจากแก่น ไม้กฤษณา ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทที่อยู่ใน ภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง	3
5	การวิเคราะห์ Signaling Proteins ที่ถูกกระตุ้น โดย western blot	3
6	สัตว์ทดลองสำรอง	5
รวมจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้		20

หมายเหตุ: เซลล์ที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรท 1 ตัวสามารถแยกได้เซลล์ประมาณ 4- 6 ชุดของ 6-well plate ที่ ความเข้มข้นของเซลล์ 4×10^5 - 1×10^6 cells/well

หมายเหตุ: ผู้วิจัยได้ตระหนักและเล็งเห็นถึงคุณค่าของสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทำวิจัย และได้พิจารณาอย่างรอบคอบแล้วว่าไม่มีวิธีการอื่นที่เหมาะสมเท่า โดยผู้วิจัยยึดหลักความประพฤตินั้นเหมาะสม โดยคำนึงถึงคุณธรรม และ จริยธรรมในการทำวิจัยที่ใช้สัตว์ทดลอง ตลอดจนได้ตระหนักถึงความสำคัญด้วยความน่าเชื่อถือและความเที่ยงตรงของข้อมูลจากผลการทดลอง และวิจัย โดยการเลือกชนิด สายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด และจำนวน สัตว์ทดลองที่น้อยที่สุด ที่ทำให้ผลการทดลองน่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ ผู้วิจัยตระหนักว่าสัตว์ทดลองเป็นสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับมนุษย์ และจักปฏิบัติต่อสัตว์ด้วยความระมัดระวังทุกขั้นตอน ผู้วิจัยได้บันทึกข้อมูลการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตามวิธีการที่เสนอในโครงการวิจัย ตลอดจนบันทึกไว้เป็นหลักฐานที่จะเปิดเผยหรือชี้แจงได้ทุกโอกาส

2.2 ตัวอย่างแก่นไม้กฤษณาและการพิสูจน์สายพันธุ์

กฤษณานำมาใช้ คือ สายพันธุ์ *Aquilaria crassna* Pierre Lecomte ได้รับจาก นายชูศักดิ์ เรืองรัตนภูมิ ปลูกในพื้นที่เขตอำเภอโป่งน้ำร้อน จังหวัดจันทบุรี ประเทศไทย ได้รับการพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ โดย อ.ดร.ปราณี นางงาม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร Specimen number 002540 ถูกเก็บไว้ที่หอพรรณไม้ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวร

2.3 สารสกัดจากแก่นไม้กฤษณา

ได้รับการอนุเคราะห์โดย อ.ดร.ภาณุมาศ ทองอยู่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ซึ่งมีวิธีการสกัดโดยย่อ คือทำการเก็บตัวอย่างจากลำต้นกฤษณา เลือกละเฉพาะส่วนแก่นไม้ นำมาสับให้เป็นชิ้นเล็กและนำมาทำให้แห้งในที่ร่ม เมื่อแห้งดีแล้ว นำมาบดเป็นผงละเอียด โดยครก ผงที่ได้จากการบดแก่นไม้กฤษณา ประมาณ 100 กรัม นำมาสกัดด้วยเอทิลอะซิเตท (EtOAc) ที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียส โดยใช้ชุดเครื่องมือ soxlet เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สารสกัดที่ได้จะนำมาทำให้เข้มข้นโดย vacuum และทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบฤทธิ์ต่อไป

2.4 การแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท และการเพาะเลี้ยงเซลล์ และ

ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์

ทำการแยกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจส่วน Ventricle จากหัวใจหนูแรทสายพันธุ์ Wistarเพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม (จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) ทำให้สลบด้วยการฉีดยาสลบชนิด pentobarbital (300 mg/kg) และ heparin (150 units) ทาง Intraperitoneal เมื่อหนูสลบดีและตรวจสอบว่าหมดความรู้สึกแล้ว ทำการผ่าตัดเปิดช่องอก และทำการตัดหัวใจ หัวใจที่ตัดออกมา

ทำการ perfused ด้วย Tyrode solution (130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.4 mM $MgCl_2$, 0.4 mM NaH_2PO_4 , 0.75 mM $CaCl_2$, 4.2 mM HEPES, 20 mM taurine, 10 mM creatine และ 10 mM glucose 9, ปรับ pH 7.3 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ทำการ perfused อีกครั้งด้วย calcium - free Tyrode solution + EGTA เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วย Solution 3 (Tyrode solution + 100 μ M $CaCl_2$ และ 1 mg/ml collagenase type II) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นตัดชิ้นเนื้อของกล้ามเนื้อหัวใจช่องล่างชิ้นเล็ก ๆ ทำการย่อยเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจช่องล่างด้วยเอนไซม์ 1 mg/ml collagenases type II ด้วยการไปเปิดขึ้นลง เพื่อให้เกิดการย่อยเซลล์ได้ละเอียดมากขึ้น ประมาณ 5-10 นาที จากนั้นทำการกรองเพื่อแยกเซลล์ด้วย nylon gauze นำ supernatant ที่เซลล์ที่แยกได้จะถูกระงับด้วย Solution 4 (Tyrode solution + 0.5 mM $CaCl_2$ และ 1% (w/v) Bovine serum albumin) ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเบาที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นดูดส่วน Solution 5 (Tyrode solution + 1 mM $CaCl_2$) จากนั้นทำการ ทำการ incubate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 5 นาที และปั่นเบาที่ความเร็วรอบ 500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ชนิด Modified M199 เพาะเลี้ยงที่ตู้บ่มเพาะเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 95% O_2 + 5% CO_2

2.5 สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง

สภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) ทำได้โดยใช้ ischemic buffer ที่มีส่วนประกอบของ 137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 0.49 mM $MgCl_2$, 0.9 mM $CaCl_2$, และ 4.0 mM HEPES ที่มี 10 mM 2-deoxyglucose, 20 mM sodium lactate, และ 1 mM sodium dithionite pH 6.5 ซึ่งจะจำลองสภาวะการขาดออกซิเจนและขาดแหล่งให้พลังงาน

2.6 การทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตายและเซลล์รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay

MTT Cell survival assay โดยมีหลักการคือ MTT จะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบสีม่วง formazan โดยเอนไซม์ mitochondrial succinate dehydrogenase ในไมโทคอนเดรียในเซลล์ที่มีชีวิต สารประกอบสีม่วงจะถูกละลายได้ใน isopropanol - HCl โดยการเติม MTT ที่ผสมกับ DMEM ลงไปใน 6-Well plate 2 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นดูด MTT ที่งแล้วเติม 0.04 M HCl ใน absolute isopropanol 1 ml ดูดสารละลายสีม่วง

โครทิว นำไปปั่นเพื่อตกตะกอนความเร็ว 1,300 rpm. 2 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปทำการตรวจวิเคราะห์การดูดกลืนแสงซึ่งค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 570 nm และ 650 nm

2.7 การทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH activity)

Lactate dehydrogenase (LDH activity) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนระหว่างแลคเตทและไพรูเวต มีในไซโทพลาสซึมของเซลล์ ซึ่งจะหลั่งออกมาจากเซลล์เมื่อเซลล์ได้รับบาดเจ็บและผนังเซลล์มีรูรั่วทำให้เอนไซม์หลั่งออกมาจากเซลล์ โดยการเติม Working LDH 1 ml. และ Sample 10 μ l. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อ่านผลที่ความยาวคลื่น 340 nm ทำการวัดค่าที่เวลา 0, 1, 2 และ 3 นาที

2.8 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา

ทำการทดสอบความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกกลุ่มทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: Control (ตัวทำละลาย DMSO) เป็น Negative control

กลุ่มที่ 2-11: เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ความเข้มข้น 1-10 mg/ml ใน Ischemic buffer

ทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay และทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.9 การทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จากภาวะขาดเลือดจำลอง

การทดสอบการตายของเซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรทเมื่ออยู่ในภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes, ARVMs) และศึกษาผลของสภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจำลอง (Simulate ischaemia) โดยใช้ ischaemic buffer ที่มีส่วนประกอบของ 137 mM NaCl, 3.8

mM KCl, 0.49 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, and 4.0mM HEPES ที่มี 10mM 2-deoxyglucose, 20mM sodium lactate, และ 1 mM sodium dithionite at pH 6.5 ซึ่งจะจำลองสภาวะการขาดออกซิเจนและขาดแหล่งให้พลังงาน ในสภาวะที่มี และไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา และทดสอบปริมาณ ความเข้มข้นสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในความเข้มข้นต่างๆ โดยแยกกลุ่มทดลองดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: Control

กลุ่มที่ 2: Control (ตัวทำละลาย DMSO) with Ischemic buffer

กลุ่มที่ 3-12: เซลล์ที่เพาะเลี้ยงด้วยสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ความเข้มข้น 1 -10 mg/ml ใน Ischemic buffer

ทดสอบหาอัตราส่วนจำนวนเซลล์ที่ตาย และเซลล์ที่รอดชีวิตด้วย MTT Cell survival assay และทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.10 การวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยวิธี SDS-PAGE และ western blot

สำหรับการวิเคราะห์การแสดงออกโปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ดูการแสดงออกในระดับโปรตีน โดยใช้หลักการของ gel electrophoresis เพาะเลี้ยงเซลล์ ARVMs บน 6-well plate ในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในความเข้มข้น 5 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที กระตุ้นภาวะขาดเลือดจำลอง (SI) 120 นาที หลังจากนั้นทำให้เซลล์เสียหายโดยการต้มเป็นเวลา 5 นาที ในสารละลาย 2xSDS sample buffer (0.25 M tris-HCl pH 6.8, 40% glycerol, 6% SDS, 0.08% bromophenol blue, 4% β-mercaptoethanol) จากนั้นนำโปรตีนมาแยกใน polyacrylamide gel 10% (การเตรียม 10% acrylamide เตรียมได้จาก 30% bis-acrylamide, 1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 10% ammonium persulfate, 0.04% TEMED ที่มี stacking gel -v' 4% acrylamide เตรียมได้จาก 30% bis-acrylamide, 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 10% ammonium persulfate, 0.1% TEMED) นำไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าด้วยความต่างศักย์ 90 volt 10 นาที และ 120 volt เป็นเวลา 60 นาที ใน SDS containing Tris-glycine buffer pH8.3 (25 mM Tris base, 192 mM glycine, 0.1% SDS) จากนั้นทำการถ่ายโอนโปรตีนจากเจลสู่ Polyvinylidene fluoride (PVDF) Transfer membrane

ด้วย electroblotting 20 volt เป็นเวลา 60 นาที ด้วย transfer buffer (25 mM Tris base pH 8.5, 200 mM glycine, 20% methanol) จากนั้นนำ PVDF ที่ทำการกระตุ้นโปรตีนแล้วมา block ด้วย 5% non-fat dry milk ใน TBS ที่มี 0.1% Tween-20 (TBST) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติม 1:1000 primary antibody (Total หรือ Phospho p38 MAPK antibody: Rabbit polyclonal IgG from Santa Cruz Biotechnology) incubate over night ที่ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดล้างด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และเติม 1:1000 Secondary Antibody หลังจากนั้น conjugated ด้วย anti goat-HRP incubate ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที จากนั้นล้างด้วย TBST 4 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วจึงทำปฏิกิริยา chemiluminescence กับ ECL Substrate 1 นาที (ECL: Amersham Pharmacia Biotech) ทำการประกบแผ่น PVDF บนแผ่นฟิล์ม (Hyperfilm) ในที่มืด วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวัดค่าความเข้มแสงของแถบ (Band Intensity) ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นฟิล์ม และนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบ และหาความมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments) โดยใช้โปรแกรม Image J ในการวิเคราะห์ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยสถิติ ANOVA หากค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (p value) มีค่าน้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2.11 การวิเคราะห์ข้อมูล

หาช่วงเวลาที่น้อยที่สุดที่เซลล์ตายจากภาวะขาดเลือดจำลองอย่างมีนัยสำคัญ ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดจำนวนเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง ทดสอบหาช่วงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ลดการตายของเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลองอย่างมีนัยสำคัญ หากความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ลดการตายของเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง และหาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อการตายของเซลล์หัวใจเนื่องจากภาวะหัวใจขาดเลือดจะมีความสามารถในการปรับปรุง/ซ่อมแซม รูปร่างและโครงสร้าง (Cytoskeletal) ของ F-actin ที่ถูกทำลายจากการกระตุ้นให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง โดยใช้สถิติ mean±S.E. Data, วิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA และ Tukey's Post Hoc, A value < 0.05 และโปรแกรม PRISM 5.0

บทที่ 3: ผลการทดลอง

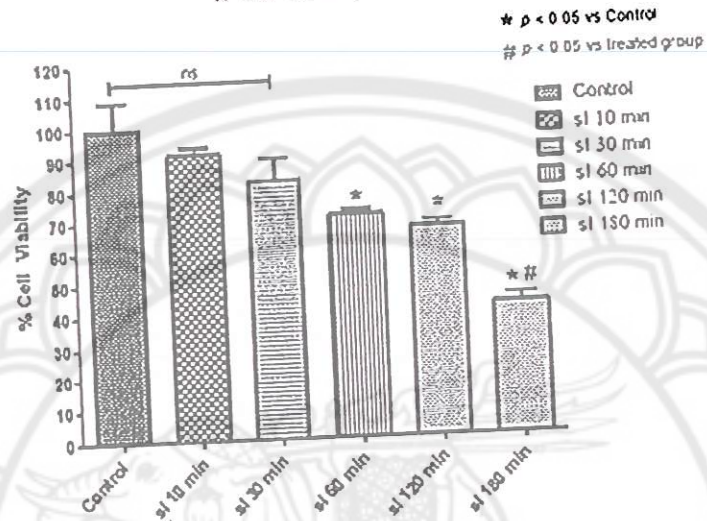
ผลการวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) และกลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารสกัดหายาจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)

3.1 การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) ในสภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

เมื่อทำให้เซลล์ ARVMs อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง โดยไม่มีสารสกัดหายาจากแก่นไม้กฤษณาที่เวลาต่าง ๆ กัน คือ 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 180 นาที พบว่าทุกเวลาที่ทดสอบมีการลดลงของ % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ดังแสดงในภาพที่ 1) และการทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) พบว่าค่า LDH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) (ดังแสดงในภาพที่ 2) และจากผลการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่มีการตายของเซลล์หัวใจ พบว่าที่เวลา 180 นาที มีค่า % cell viability ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพื่อให้อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

เมื่อทราบระยะเวลาที่เหมาะสมในการกระตุ้นเซลล์ ARVMs ให้อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ที่ 180 นาที จึงทำการทดลองเพื่อหาค่าช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดหายาจากแก่นไม้กฤษณาที่สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

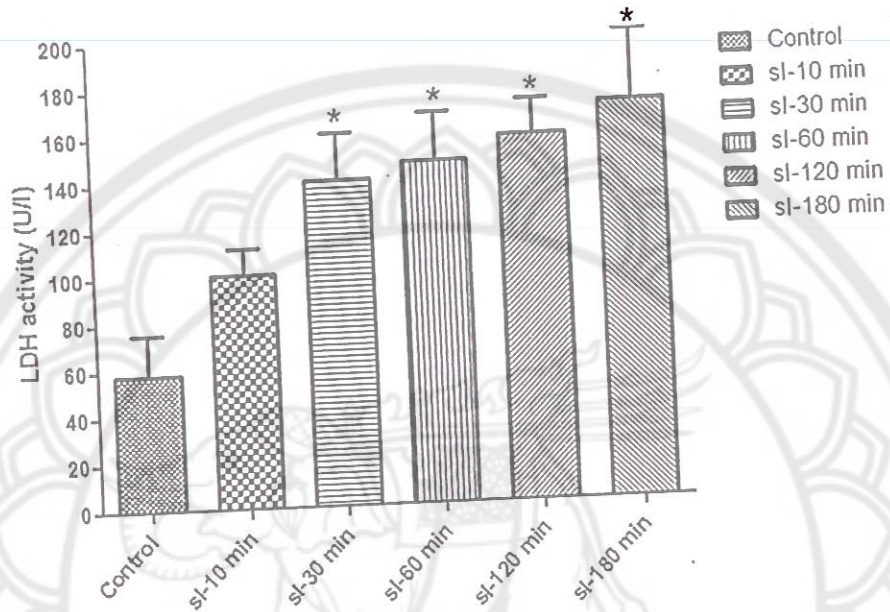
% Cell Viability



ภาพที่ 1 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต จากผลการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่มีการตายของเซลล์หัวใจมากที่สุดที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) โดยทดลองในช่วงเวลา 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 180 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทำ Simulate ischemia)

Released LDH activity

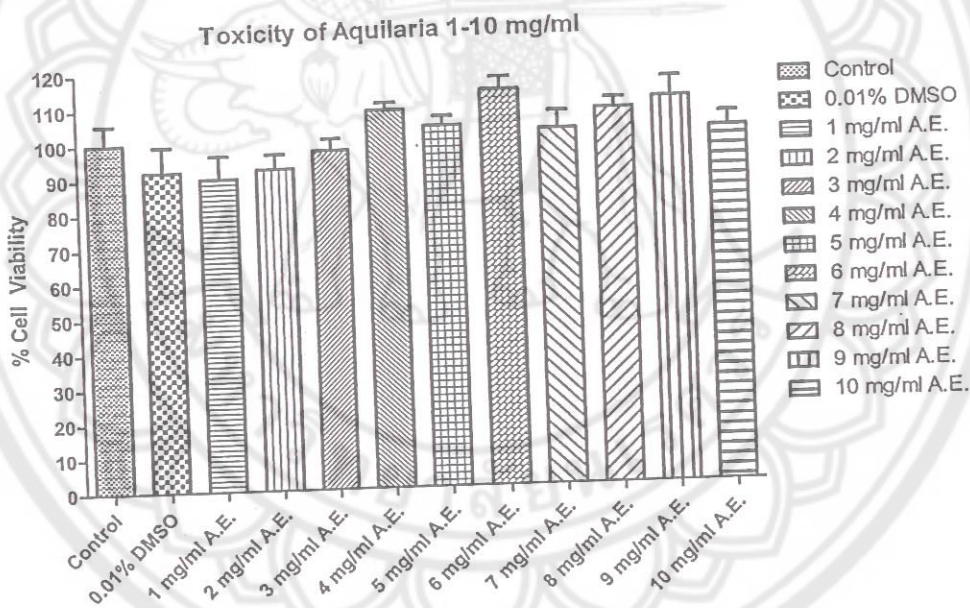
* $p < 0.05$ -vs Control



ภาพที่ 2 แสดงระดับการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) จากผลการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่มีการตายของเซลล์ ARVMs มากที่สุดที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) โดยทดลองในช่วงเวลา 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 180 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทำ Simulate ischemia)

3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้นที่ 1 – 10 mg/ml.

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ARVMs ร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ และเพาะเลี้ยงต่อข้ามคืน จากนั้นทำการวัดร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต พบว่าในกลุ่มเซลล์ ARVMs ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้นที่ 1 – 10 mg/ml. มีจำนวนเซลล์ที่รอด (% cell viability) ที่มากกว่า 90% ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs (ดังแสดงในภาพที่ 3)

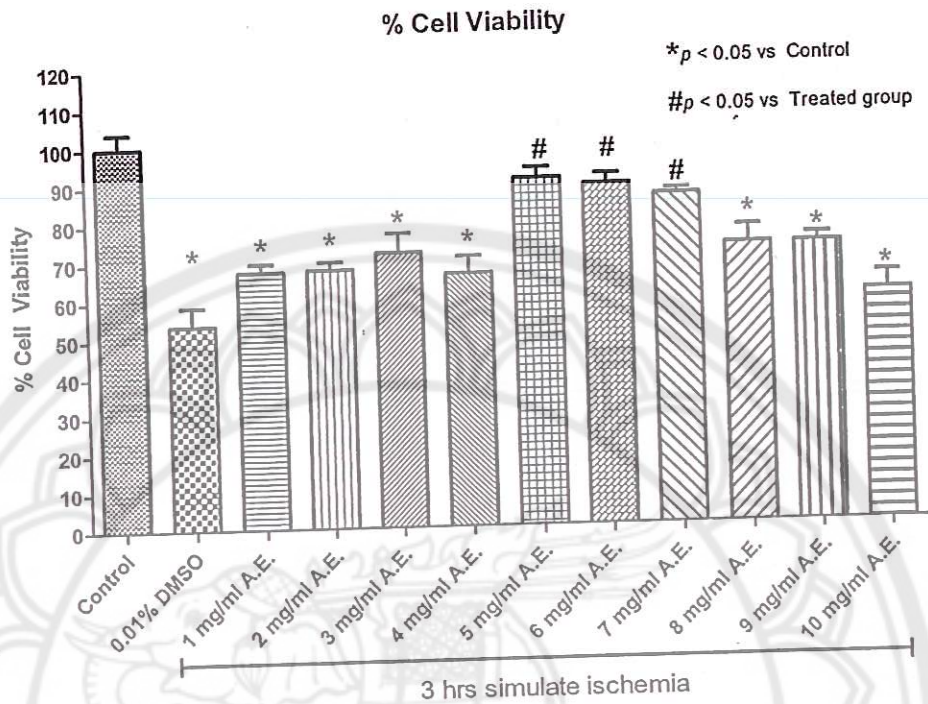


ภาพที่ 3 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ ARVMs มีชีวิตจากการทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs ทำการทดลอง 3 ครั้ง ($*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 – 10 mg/ml.)

จากผลการทดลองข้อ 3.2 พบว่า ที่ความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs เมื่อทราบข้อมูลขั้นต้นแล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาโดยใช้ความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. ที่สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

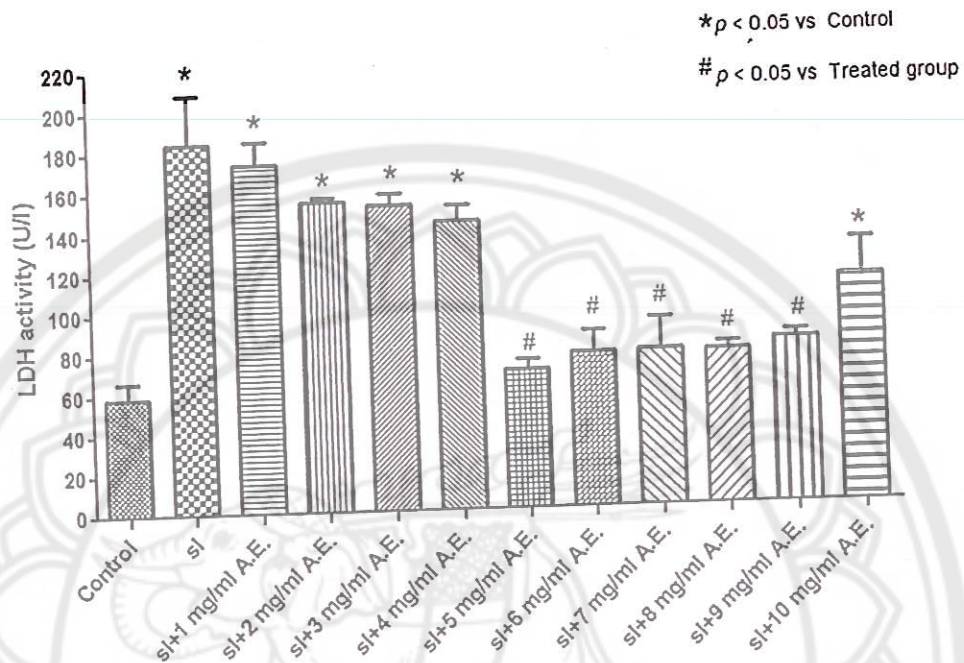
3.3 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. ต่อการลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ ARVMs ร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที ก่อนทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลองเป็นเวลา 180 นาที ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มที่ทำให้เซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) เพียงอย่างเดียวที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา มีจำนวนเซลล์ที่รอด (% cell viability) จากการตายของเซลล์หัวใจที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่กลุ่มที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา พบว่าที่ความเข้มข้น 5 mg/ml. มีจำนวนเซลล์ที่รอด (% cell viability) จากการตายของเซลล์หัวใจที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ดังแสดงในภาพที่ 4) และเมื่อทดสอบการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) พบว่าค่า LDH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในช่วงความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml (ดังแสดงในภาพที่ 5) เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองด้วยกันและกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ ARVMs ที่รอดชีวิต จากการทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในช่วงความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) โดยกระตุ้นเซลล์หัวใจให้เกิดภาวะขาดเลือดจำลอง ระยะเวลา 180 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. ร่วมกับทำ Simulate ischemia)

Released LDH activity



ภาพที่ 5 แสดงระดับการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) จากการทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาจากช่วงความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. ที่สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) โดยกระตุ้นเซลล์หัวใจให้เกิดภาวะขาดเลือดจำลอง ระยะเวลา 180 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง (* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, # $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. ร่วมกับทำ Simulate ischemia)

3.4 ผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์ ARVMs เนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลองต่อการกระตุ้น p38 MAPK

จากการศึกษาข้างต้น ผู้วิจัยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ 5 mg/ml. ทำการทดสอบโดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลองด้วยเทคนิคทางการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบปลอดเชื้อ ในสภาวะที่มีและไม่มีทำให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ ก่อนทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลองเป็นเวลา 180 นาที ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เดิม Aq. 60 นาที ก่อน ที่จะทำการกระตุ้นภาวะ SI 180 นาที

กลุ่มที่ 2 เดิม Aq. พร้อมกับกระตุ้นภาวะ SI 180 นาที

กลุ่มที่ 3 เดิม Aq. ก่อน 60 นาที จุด Aq. ทั้ง จากนั้นกระตุ้นให้เกิดภาวะ SI 180 นาที

การวิเคราะห์การกระตุ้น p38 MAPK ที่ถูกกระตุ้นโดย SDS PAGE และ Western blot วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวัดค่าความเข้มแสงของแถบ (Band Intensity) ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นฟิล์ม และนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบ และหาความมีนัยสำคัญทางสถิติทำการทดลอง 3 ครั้งที่ไม่ขึ้นต่อกัน (3 independent experiments)

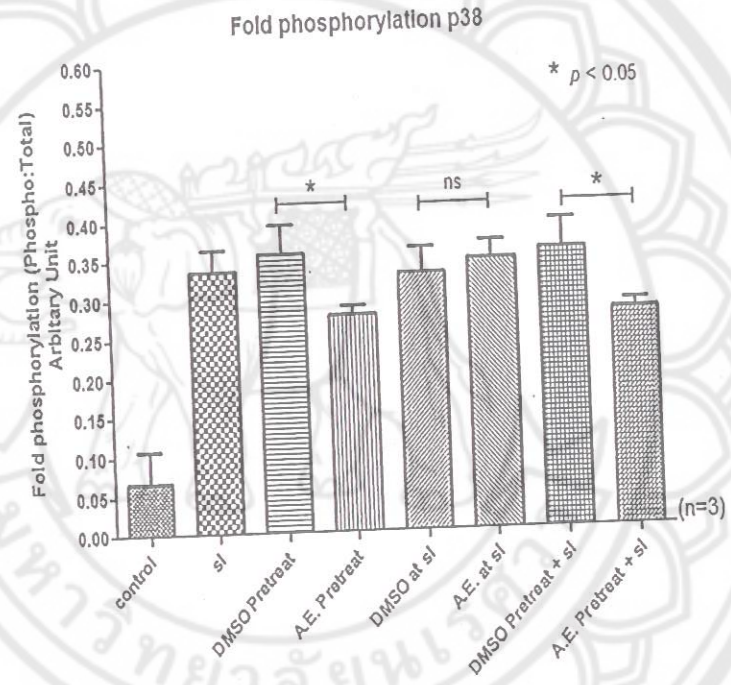
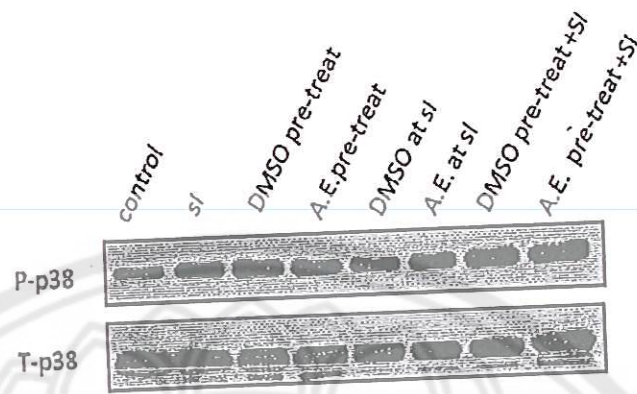
ผลการทดลองพบว่า การกระตุ้นโปรตีน p38 MAPK ถูกยับยั้ง โดยมีอัตราส่วนระหว่าง Phosphorylated - p38 MAPK ต่อ Total - p38 MAPK ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value < 0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่ม SI และกลุ่ม DMSO (ดังแสดงในภาพที่ 6)



สำนักหอสมุด

14 ส.ค. 2556

i. 616951X



ภาพที่ 6 แสดงแถบของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นในสถานะต่าง ๆ (DMSO pre-treat : DMSO 1 hr. ก่อน SI 180 min., AQ-pre-treat : AQ 1 hr. ก่อน SI 180 min., DMSO at SI : DMSO + SI 180 min., AQ at SI : AQ + SI 180 min., DMSO pre-treat + SI : DMSO 1 hr. ก่อน DMSO + SI 180 min., AQ pre-treat + SI : AQ 1 hr. ก่อน AQ + SI 180 min.) การแสดงอัตราส่วนระหว่าง Phosphorylated - p38 MAPK ต่อ Total - p38 MAPK ในภาวะกระตุ้น SI ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้ กฤษณา ($*p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่ม SI และกลุ่ม DMSO)

บทที่ 4: วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ ศึกษาความสามารถและกลไกของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) สารสกัดจากพืชสมุนไพรไทย “กฤษณา” จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัย พบว่ากฤษณามีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา Oxidation การลดการหลั่งไซโตไคน์ชนิด TNF- α และยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK ซึ่งการกระตุ้นของ p38 MAPK นั้นพบว่าสามารถทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจตายเนื่องจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด ทำให้มีความเป็นไปได้ว่า สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา สามารถลดความบาดเจ็บ หรือการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในสภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดได้หรือไม่

ผลการทดลองเพื่อหาช่วงเวลาให้น้อยที่สุดที่เซลล์ตายอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองในช่วงเวลา 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 180 นาที ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าที่ระยะเวลา 180 นาที เป็นช่วงเวลาให้น้อยที่สุดที่เซลล์ตายสูงสุดเมื่อเซลล์อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลองและได้นำมาใช้ในการทดลองในการกระตุ้นเซลล์ให้อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลองต่อไป (ดังแสดงในภาพ 1 และ 2)

ผลวิจัยจากการทดลองหาความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้จากช่วงความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้นที่ 5 mg/ml. มีค่า % cell viability เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value <0.05) และมีการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p value <0.05) ดังนั้นความเข้มข้นที่ 5 mg/ml. เป็นความเข้มข้นที่น้อยที่สุดซึ่งสามารถลดจำนวนเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้

จากการศึกษาที่ผ่านมา ทำให้ทราบกลไกของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่เกี่ยวข้องในการยับยั้งกระบวนการอักเสบ โดยลดการสร้างไซโตไคน์ชนิด tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ในเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นโดย lipopolysaccharide ของแบคทีเรียผ่านกระบวนการการยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK

ผลวิจัยการวิเคราะห์โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ western blot ของโปรตีน p38 MAPK (Phosphorylated - p38 MAPK) จากการทดลองในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่อยู่ในภาวะไม่มีการกระตุ้น SI พบว่าไม่มีการปรากฏแถบของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นของ Phosphorylated - p38 MAPK และเมื่อทำการทดลองในสภาวะที่มีและไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง ผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้ มีอัตราส่วนระหว่าง Phosphorylated - p38 MAPK ต่อ Total - p38 MAPK ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา ทั้งนี้ในกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาและไม่มีการทำให้เซลล์อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลองก็สามารถปรากฏแถบของ Phosphorylated - p38 MAPK ได้ เนื่องจากมีการกระตุ้น p38 MAPK อยู่ในระดับพื้นฐาน (Basal activation) ในขณะที่ไม่มีการกระตุ้นใดๆ ได้

จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่ากฤษณาสามารถลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลองโดยกลไกที่ไปยับยั้งการกระตุ้นของโปรตีน p38 MAPK ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ apoptosis

การวิจัยข้างต้นเป็นเพียงการวิจัยในเป้าหมายที่ 1 เพื่อศึกษาฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) จากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) พบว่า ความเข้มข้น 5 mg/ml. สามารถลดการตายของเซลล์ ARVMs ไม่เป็นพิษกับเซลล์ ARVMs ช่วยยับยั้งการกระตุ้น p38 MAPK และช่วย remodeling actin ที่ถูกทำลายของเซลล์ ARVMs ได้ และจากผลวิจัย ผู้วิจัยมีแผนจะดำเนินการวิจัยโดยใช้สภาวะการจำลองและความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ได้ใช้กับการวิจัยในการศึกษาฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของบริเวณกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างที่แยกได้จากหัวใจของหนูแรทจากภาวะขาดเลือดจำลอง (infarct size) โดยทำการวิจัยศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาภายในร่างกายสัตว์ทดลอง (*in vivo*) หรืออวัยวะของสัตว์ทดลองที่นำออกมาจากร่างกาย (*ex vivo*) เพื่อให้ได้ข้อมูลในเชิงลึกทางสรีรวิทยา และการทำงานของหัวใจมากขึ้น เพื่อประโยชน์ในการพัฒนาต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- (1) World Health Organization. World Health Statistics 2008. http://www.who.int/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf 2009 August 3 Available from: URL: http://www.who.int/entity/whosis/whostat/EN_WHS08_Full.pdf
- (2) Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* 1997 May 24;349(9064):1498-504.
- (3) Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: part I: general considerations, the epidemiologic transition, risk factors, and impact of urbanization. *Circulation* 2001 Nov 27;104(22):2746-53.
- (4) Ounpuu S, Anand S, Yusuf S. The impending global epidemic of cardiovascular diseases. *Eur Heart J* 2000 Jun;21(11):880-3.
- (5) Unal B, Critchley JA, Capewell S. Explaining the decline in coronary heart disease mortality in England and Wales between 1981 and 2000. *Circulation* 2004 Mar 9;109(9):1101-7.
- (6) Levy D, Thom TJ. Death rates from coronary disease--progress and a puzzling paradox. *N Engl J Med* 1998 Sep 24;339(13):915-7.
- (7) Porapakkham Y, Rao C, Pattaraarchachai J, Polprasert W, Vos T, Adair T, et al. Estimated causes of death in Thailand, 2005: implications for health policy. *Popul Health Metr* 2010 May 18;8(1):14.
- (8) Polprasert W, Rao C, Adair T, Pattaraarchachai J, Porapakkham Y, Lopez AD. Cause-of-death ascertainment for deaths that occur outside hospitals in Thailand: application of verbal autopsy methods. *Popul Health Metr* 2010 May 18;8(1):13.

- (9) Pattaraarchachai J, Rao C, Polprasert W, Porapaktham Y, Pao-In W, Singwerathum N, et al. Cause-specific mortality patterns among hospital deaths in Thailand: validating routine death certification. *Popul Health Metr* 2010 May 18;8(1):12.
- (10) Rao C, Porapaktham Y, Pattaraarchachai J, Polprasert W, Swampunyaalert N, Lopez AD. Verifying causes of death in Thailand: rationale and methods for empirical investigation. *Popul Health Metr* 2010 May 18;8(1):11.
- (11) Libby P. Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995 Jun 1;91(11):2844-50.
- (12) Braunwald E. Evolution of the management of acute myocardial infarction: a 20th century saga. *Lancet* 1998 Nov 28;352(9142):1771-4.
- (13) Maulik G, Cordis GA, Das DK. Oxidative damage to myocardial proteins and DNA during ischemia and reperfusion. *Ann N Y Acad Sci* 1996 Sep 30;793:431-6.
- (14) Chi NC, Karlner JS. Molecular determinants of responses to myocardial ischemia/reperfusion injury: focus on hypoxia-inducible and heat shock factors. *Cardiovasc Res* 2004 Feb 15;61(3):437-47.
- (15) Kutala VK, Khan M, Mandal R, Ganesan LP, Tridandapani S, Kalai T, et al. Attenuation of myocardial ischemia-reperfusion injury by trimetazidine derivatives functionalized with antioxidant properties. *J Pharmacol Exp Ther* 2006 Jun;317(3):921-8.
- (16) Sahna E, Parlakpınar H, Turkoz Y, Acet A. Protective effects of melatonin on myocardial ischemia/reperfusion induced infarct size and oxidative changes. *Physiol Res* 2005;54(5):491-5.

(17) 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.

(18) 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.

(19) 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.

(20) 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.

(21) 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.

(22) Borutaite V. AMPK, MAPK and Bax in the heart: some questions answered. *Biochem J* 2008 Jun 1;412(2):e15-e16.

(23) 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.

(24) 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.

(25) 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.

(26) 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.

(27) 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.

(28) Khan M, Varadharaj S, Ganesan LP, Shobha JC, Naidu MU, Parinandi NL, et al. C-phycoyanin 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.

(29) 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.

(30) 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.

(31) 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.

(32) 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.

(33) 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.

(34) 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.

(35) Martin JL, Avkiran M, Quinlan RA, Cohen P, Marber MS. Antiischemic effects of SB203580 are mediated through the inhibition of p38alpha mitogen-activated protein kinase: Evidence from ectopic expression of an inhibition-resistant kinase. *Circ Res* 2001 Oct 26;89(9):750-2.

(36) 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.

(37) Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol* 1998 Aug;30(8):1651-64.

(38) Rakhit RD, Kabir AN, Mockridge JW, Saurin A, Marber MS. Role of G proteins and modulation of p38 MAPK activation in the protection by nitric oxide against ischemia-reoxygenation injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Sep 7;286(5):995-1002.

(39) 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.

(40) Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, et al. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *FASEB J* 2000 Nov;14(14):2237-46.

(41) 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.

(42) 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.

(43) 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.

(44) 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.

(45) 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.

(46) 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.

(47) 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.

(48) 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.

(49) 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.

(50) Otsu K, Yamashita N, Nishida K, Hirotsu 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.

(51) 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.

(52) 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.

(53) 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.

(54) 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.

(55) เสริมศรี วินิจฉัยกุล. กฤษณา. In: นันทารรณ บุญยะประกฤษ, อรุณช โสภชัยเจริญพร, editors. สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน(1). กรุงเทพมหานคร: ประชาชน; 2541. p. 135-7.

(56) Kim YC, Lee EH, Lee YM, Kim HK, Song BK, Lee EJ, et al. Effect of the aqueous extract of *Aquilaria agallocha* stems on the immediate hypersensitivity reactions. *J Ethnopharmacol* 1997 Sep;58(1):31-8.

(57) Okugawa H, Ueda R, Matsumoto K, Kawanishi K, Kato A. Effects of agarwood extracts on the central nervous system in mice. *Planta Med* 1993 Feb;59(1):32-6.

(58) Manasi Dash, Jayanta Kumar Patra, Prasanna Priyadarshini Panda. Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb. *African Journal of Biotechnology* 2008 Oct 20;7(20):3531-4.

(59) Gunasekera SP, Kinghorn AD, Cordell GA, Farnsworth NR. Plant anticancer agents. XIX Constituents of *Aquilaria malaccensis*. *J Nat Prod* 1981 Sep;44(5):569-72.

(60) Zhou M, Wang H, Suolangjiba, Kou J, Yu B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aquilaria sinensis* (Lour.) Gilg. Leaves extract. *J Ethnopharmacol* 2008 May 8;117(2):345-50.

(61) Chitre T, Bhutada P, Nandakumar K, Somani R, Miniyar P, Mundhada Y, et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of heartwood of *Aquilaria agallocha* in laboratory animals. *Pharmacologyonline* 2007;1:288-98.

(62) Miniyar PB, Chitre TS, Karve SS, Deuskar HJ, Jain KS. Anti-oxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methemoglobin formation. *International Journal of Green Pharmacy* 2008 Mar;2(1):43-4.

(63) Suvitayavat W, Tunlert S, Thirawarapan SS, Kitpati C, Bunyaphatsara N. Actions of Ya-hom, a herbal drug combination, on isolated rat aortic ring and atrial contractions. *Phytomedicine* 2005 Aug;12(8):561-9.

(64) Suvitayavat W, Tunlert S, Thirawarapan SS, Bunyaphatsara N. Effects of Ya-hom on blood pressure in rats. *J Ethnopharmacol* 2005 Mar 21;97(3):503-8.

(65) Suvitayavat W, Kodchawongs J, Thirawarapan SS, Bunyaphatsara N. Effects of Ya-hom on the gastric secretion in rats. *J Ethnopharmacol* 2004 Oct;94(2-3):331-8.

(66) BENBASSAT J, SULMAN FG, ZAITSCHEK DV. The mechanism of the hypotensive effect of *Lignum aloes*. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1959 Jun 1;120(2):141-51.

(67) Miniyar P.B., Chitre T.S., Karve S.S., Deuskar H.J., Jain K.S. Anti-oxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methemoglobin formation. *International Journal of Green Pharmacy* 2008 Mar;2(1):43-4.

Title page

An *in vitro* anti-ischemic effect of *Aquilaria crassna* in isolated adult rat ventricular myocytes subjected to simulated ischemia

Short running title: An *in vitro* anti-ischemic effect of Agarwood

Sarawut Kumphune^{a,b*}, Panadda Jermstri^{a,b}, Nitchawat Paiyabhroma^{a,b},

^a Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences (BRUCS), Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

^b Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

Keywords: *Aquilaria crassna*; Myocardial Ischemia; Myocardial Infarct; p38 MAPK

* Corresponding author at: Biomedical Research Unit in Cardiovascular Sciences (BRUCS) and Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University, Phitsanulok, 65000, Thailand. Tel.: +66(0)83-960 6006; Fax: +66(0) 55 966 300
E-mail address: sarawutk@nu.ac.th

Abstract

To investigate the effect of ethyl acetate of *Aquilaria crassana* crude extract on simulated ischemia-induced cardiac cell injury, mechanism on p38 MAPK activation, in isolated Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVMs), so as to provide some evidence for its traditional use. The ARVMs were isolated from 6-8 weeks male Wistar rat by collagenase-based enzymatic digestion and maintained in cell culture system. ARVMs were subjected to 3 hrs simulated ischemia/reperfusion, in the presence and absence of various concentrations of the extract. The cellular injury and viability were determined. Cells were pre-treated with 5 mg/ml of *Aquilaria* extract for 1 hour before, or at the beginning of 40 minutes simulated ischemia. Activation of p38 MAPK was measured by Western blot analysis. The results showed that 3 hr of simulated ischemia was significantly produced cellular injury and cell death, which was significantly inhibited when treated with 5 mg/ml ethyl acetate extract of *Aquilaria crassana* ($p < 0.05$). Treatment 5 mg/ml of *Aquilaria* extract significantly reduced ischemia-induced p38 MAPK phosphorylation ($p < 0.05$). The results suggested the cardioprotective effect of *Aquilaria crassana* extract against myocardial ischemia/reperfusion injury.

Draft-Journal of Phytotherapy

1. Introduction

The pathophysiology of myocardial ischemia is happened when the coronary artery is occluded and lead to insufficiency of the oxygen supply to the heart, and finally progresses to cellular necrosis (Jennings and Reimer 1991). Currently, the most efficient way to reduce aggravation of the disease is to achieve rapid reperfusion (Clark et al. 2007). However, the reperfusion also known to aggravate cardiac cell injury and finally result in cardiomyocytes necro-apoptosis (Gottlieb et al. 1994). The cellular damage according to ischemia and reperfusion is referred to ischemia/reperfusion injury. Therefore, any way capable of slow down the rate of ischemia/reperfusion injury are likely to save many lives (Braunwald 1996). It has been known that myocardial ischemia/reperfusion injury is a strong stimulant of some key signaling pathway, particularly p38 MAPK (Barancik et al. 2000; Cuenda and Rousseau 2007; Gorog et al. 2004; Nagarkatti and Sha'afi 1998; Tanno et al. 2003). Evidences in preclinical investigation indicated that inhibition of p38 activation could reduce myocardial injury, suggesting the therapeutic potential of p38 inhibitors in ischemic heart disease (Kumphune et al. 2012)

Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte or agarwood is heartwood of tropical tree belongs to the family *Thymelaeaceae* and class *Magnoliosida* (Dash et al. 2008), which can be found in many Asian countries (Dash, Patra, & Panda 2008; Kim et al. 1997; Miniyar et al. 2008). This plant is known to be useful in traditional medical treatment for many inflammatory diseases and also found to be used in treatment of cardiac disorders (Miniyar, Chitre, Karve, Deuskar, & Jain 2008). Interestingly, in Thailand, *A. crassna* extract has been using as one of the major ingredients in Ya-hom, a traditional Thai herbal formulation for the treatment of fainting by increasing blood pressure (Suvitayavat et al. 2005), suggested the cardiovascular targeting effect of this plant. Recently, our previous experiments on the ethyl acetate extract of *A. crassna* suggested the potent anti-inflammatory effect inhibiting tumor necrosis factor alpha (TNF- α) expression by attenuating p38 MAPK activation (Kumphune et al. 11 A.D.). Recently, we reported that *A. crassna* extract could reduce cell death in cardiac myoblast cell line, H9c2, induced simulated ischemia by inhibiting p38 MAPK activation (Jermisri et al. 2012 Article In press) and also preserve actin

cytoskeleton organization (*Jermisri et.al. 2012 Article In press*). Therefore, in the present study, we aim to investigate the anti-ischemic effect of *A. crassna* crude extract in more relevant *in vitro* model of isolated Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVMs) in attempt to provide closer cardiac cell model.

2. Materials and methods

2.1 Plant Material and extraction

Aquilaria crassna Pierre ex Lecomte used in this experiment was obtained from Mr. Choosak Rerngrattanabhume. The plant was originally cultivated at the area in Pong Nam Ron district, Chantaburi province, Thailand and subsequently identified by Dr. Pranee Nangngam, department of biology, faculty of science, Naresuan University. The specimen voucher number 002540 was kept at department of biology herbarium, faculty of science, Naresuan University. The heartwood was sliced into small pieces. The dried plant (1Kg) was consecutively extracted with ethyl acetate (ethyl acetate) (800 ml reflux) for two days each. The resulting ethyl acetate solution was concentrated under reduced pressure to yield Ethyl acetate extract (950mg) (Kumphune, Prompun, Phaebuaw, Sriudwong, Pankla, & Thongyoo K.A.D.).

2.2 Chemicals and Reagents

All basic chemicals were purchased from Sigma (Sigma, St.Louis, MO, USA). M199 medium and Fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL, Life Technologies, Inc., New York, USA); 3-(4,5-dimethyl-2-thiazol)-2,5- diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT, Amersco, USA.); For SDS-PAGE and Western blot analysis, the 30% polyacrylamide gel was from Biorad, polyvinylidenedifluoride (PVDF) membrane was from GE Healthcare Life science.. The Antibodies recognizing the dual phospho-Thr180/Tyr182 form of p38 MAPK and total p38 MAPK were from Santa Cruz Biotech. Enhanced Chemiluminescence (ECL) and hyperfilm were from GE Healthcare Life science.

2.3 Isolation of Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVM) and culture

Ventricular myocytes were isolated from the hearts of adult male Wistar rats (200-250 g) by collagenase-based enzymatic digestion using an adaptation of the method (Kumphune et al. 2010). Hearts were excised and initially perfused for 5 min with modified Krebs solution (solution A) containing 130 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 1.4 mM MgCl₂, 0.4 mM NaH₂PO₄, 0.75 mM CaCl₂, 4.2 mM HEPES, 20 mM taurine, 10 mM creatine and 10 mM glucose, pH 7.3 at 37°C). Heart were then perfused with calcium-free solution containing 100 µM EGTA for 4 min, followed by perfusion with solution A containing 100 µM CaCl₂ and 1 mg/ml Worthington type II collagenase for 8 min. The ventricles were then cut into small pieces, which were incubated in 10 ml of collagenase solution gassed with 100% O₂ for a further 7 min at 37°C, with regular triturating. Isolated myocytes were separated from undigested ventricular tissue by filtering through cell strainer. Then isolated myocytes were allowed to settle into a loose pellet and the supernatant was removed and replaced with solution A containing 1% BSA and 500 µM CaCl₂. The isolated myocytes were then allowed to settle and the supernatant was removed and replaced with 10 ml of solution A containing 1 mM CaCl₂. The cell pellet was washed at room temperature with M199 culture medium containing 100 IU/ml penicillin/streptomycin. The myocytes were resuspended in modified M199 containing 2 mM creatine, 2 mM carnitine, and 5 mM taurine, and then seeded on pre-laminin coated 6-well plates (15 µg/ml laminin) and allowed to adhere for 1 hour in an incubator (37°C, 5% CO₂). The culture medium was replaced with fresh modified M199 medium, prior to further experiments.

2.4 Simulated Ischemia protocol

Simulated ischemia (SI) was induced by incubating H9c2 cell with specified modified Krebs-Henseleit buffer (137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 0.49 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, and 4.0 mM HEPES) with 20 mM 2-deoxyglucose, 20 mM sodium lactate, and 1 mM sodium dithionite at pH 6.5. Control buffer composed of Krebs-Henseleit buffer (137 mM NaCl, 3.8 mM KCl, 0.49 mM MgCl₂, 0.9 mM CaCl₂, and 4.0 mM HEPES), supplemented with 20 mM D-glucose, 1 mM sodium pyruvate. After simulate ischemia was achieved, the ischemic buffer or control buffer were removed and the cells were subjected to reperfusion by the addition of 2 ml complete medium before further incubating at 37°C, 5% CO₂ for 24 hours.

2.5 Determination of Cell Viability

The measurement of ARVMs viability was performed by the reduction of MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) by mitochondrial reductase. At the end of reperfusion period, the medium was collected for lactate dehydrogenase (LDH) activity. Cells were incubated with 0.01 g/ml MTT for 2 hours at 37°C. Then, 1 ml of 0.04 M HCl in isopropanol was added to each well. The converted dye was collected and the optical density was determined spectrophotometrically at λ 570 nm with background subtraction at λ 650 nm. Cell viability was calculated as a percentage of control.

2.6 Determination of cellular injury

The cellular injury of ARVMs was measured based on the extracellular release of lactate dehydrogenase (LDH), according to the loss of plasma membrane integrity. The enzyme-kinetic measurement of LDH activity [LDH liquiUV test (Human, Wiesbaden, Germany)] was performed in the supernatant of collected culture medium, after simulated ischemia/reperfusion, using a commercially available kit. Ten microliter of collected culture medium was added to 1 ml of reaction reagent, and incubated at 37°C for 1 minute. The absorbance was measured at 340 nm exactly after 1, 2, and 3 min. The mean absorbance change per minute ($\Delta A/\text{min}$) was used to calculate LDH activity.

2.7 Measurement of p38 MAPK activation by western blot analysis

Cells were washed twice in ice-cold PBS, before addition of 200 μl of 2x SDS-sample buffer, containing β -mercaptoethanol. Cells were scraped and the samples were taken and transferred to the new pre-cooled micro-centrifuge tubes. The samples were boiled for 10 min and stored at -80°C before analysis. The extract proteins were separated on 12% SDS-polyacrylamide gels; transferred to polyvinylidenedifluoride (PVDF) membranes, which were blocked for 1 h with 5% nonfat milk + 1% bovine serum albumin in Tris-buffered saline (pH 7.4) containing 0.1% Triton X-100; and probed overnight at 4 °C with the appropriate primary antibody as follows: total p38, diphospho-

p38, from Santa Cruz Biotechnology. After washing and exposure for 1 h at room temperature to horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody, antibody-antigen complexes were visualized by enhanced chemiluminescence. Bands corresponding to the detected protein of interest were developed by autoradiographic method. The films were scanned and all band densities were quantified and compared providing information on relative abundance of the protein of interest.

2.8 *Statistic analysis*

All values are expressed as Mean \pm S.D. All comparisons involving more than one group were assessed for significance using one-way analysis of variance (ANOVA), followed when appropriate by the Tukey post hoc. test. A statistical value of less than 0.05 was considered significant.



3. Results and discussion

3.1 Simulate ischemia induce cell death and injury

The isolated ARVMs were exposed to ischemic buffer from 10 min to 180 min. The percentages of cell viability and LDH release were measured to assess the optimal condition for simulated ischemia protocol. The results showed that incubation of ARVMs with ischemic buffer for first 30 min was not cause cell death, compared to control. Incubation with ischemic buffer for 60 min to 180 min significantly reduced cell viability. The results also showed that exposure to ischemic buffer for 180 min reduced cell viability greater than 50% (Figure 1a). The release LDH activity represented cellular injury according to simulate ischemia showed that the increasing in the period of simulated ischemia enhanced the released LDH activity (Figure 1b). The duration of simulated ischemia 30-180 min showed significantly increased in released LDH activity. Therefore, simulated ischemia for 180 min was an optimal condition used in all simulated ischemia experiments for determining cell viability.

3.2 The ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* extract reduced simulate ischemia induced cell injury and death in isolated Adult Rat Ventricular Myocytes.

The effect of ethyl acetate extract of *A. crassna* (A.E.; *Aquilaria* Extract) to reduce ischemia induced cardiac cell death was performed by pre-incubation of various concentrations, 1-10 mg/ml of the ethyl acetate extract of *A. crassna* prior to 180 min of simulated ischemia. Pre-treatment with vehicle (0.01% DMSO) for 1 hr did not increase the cell viability of the ARVMs. Pre-treatment with 1-4 mg/ml of the ethyl acetate extract of *A. crassna* prior to simulated ischemia slightly, but not significantly, increased cell viability. The ethyl acetate extract of *A. crassna* at 5-7 mg/ml significantly prevent ischemic induced cell death. The results showed that 5 mg/ml of the Ethyl acetate extract of *A. crassna* gave highest percentage of cell viability to 90.51 ± 6.056 %, while the extract at 6 mg/ml and 7 mg/ml gave the percentage of cell viability to 88.75 ± 5.709 % and 85.75 ± 2.918 %, respectively (Figure 2a). However, increasing in concentration of the extract 8-10 mg/ml failed to protect the ARVMs from cell death. Moreover, pre-treatment of H9c2 cell with 2-9 mg/ml of ethyl acetate extract of

A. crassna 1 hr prior to simulate ischemia significantly reduced released LDH activity (Figure 2b), However, the concentration of the extract greater at 5 mg/ml was the lowest concentration that gave the lowest released LDH activity. These results suggested that 5 mg/ml ethyl acetate extract of *A. crassna* was the optimal concentration to reduce cardiac cell injury and death.

We also tested whether the reduction of cell death and cell necrosis, when treated with the extracts, observed in our findings, was not due to the toxicity of the extract (Figure 3). In non simulate ischemic condition, pre-incubation of ARVMs with various concentrations, 1-10 mg/ml, of the *Aquilaria* extract did not significantly reduce cell viability, suggesting non toxic effect of the extract to the cells.



3.3 The ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* reduced Adult Rat Ventricular Myocytes cell injury and death by attenuating p38 MAPK activation

Myocardial ischemia is a potent stimulant of p38 MAPK activation, which accelerates injury. Therefore, we hypothesized that the reduction of cell death, according to simulated ischemia, by the ethyl acetate extract of *A. crassna*, possibly resulted from an attenuation of p38 MAPK activation. To facilitate this hypothesis, cells were subjected to simulated ischemia, in the presence and absence of 5 mg/ml of the ethyl acetate extract of *A. crassna*. The results showed that simulated ischemia significantly enhanced p38 MAPK phosphorylation. Treatment of 5 mg/ml of the ethyl acetate extract of *A. crassna*, either 1 hour pre-treatment prior to 40 min simulated ischemia and for the whole period of experiment (pre-treatment + during simulated ischemia), significantly inhibited p38 MAPK phosphorylation (Figure 4). These results suggested the effect of ethyl acetate extract of *A. crassna* could inhibit activation of p38 MAPK. Interestingly, treatment of the extract at the onset of simulated ischemia failed to reduced p38 MAPK phosphorylation.

Draft-Journal of Phytotherapy and Pharmacology

4. Discussion

The major findings of this manuscript demonstrate the *in vitro* anti-ischemic effect of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* in isolated Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVMs) subjected to simulated ischemia. According to *Aquilaria crassna* has been used in many traditional therapeutic purposes and found to be one of major composition in traditional Thai herbal formulation that targeting cardiovascular system. Recently, we demonstrated that the ethyl acetate extract of *A. crassna* seem to have dual-activities that found to be a major cause of cellular injury and death in response to myocardial ischemia/reperfusion, e.g. anti-inflammation, inhibition of p38 MAPK activation (Kumphune, Bassi, Jacquet, Sicard, Clark, Verma, Avkiran, O'Keefe, & Marber 2010). Therefore, we hypothesized that the ethyl acetate extract of *A. crassna* could possibly use as a drug for myocardial ischemia/reperfusion injury.

In the present study, we demonstrated that *in vitro* treatment of 5 mg/ml of the *Aquilaria* extract prior to ischemia could protect the ARVMs from ischemic injury. This result was consistent with our finding in other cardiac cell model of adult rat cardiac myoblast cell line, H9c2 (Jermisri *et al.* 2012 in press). In addition, with the similar concentration of the same extract also showed the cardiac protective effect in an *ex vivo* model of isolated murine heart perfused on Langendorff perfusion system (Suwannasing *et al.*, 2012 in press). The results from these studies were demonstrated the cardiac protective effect of *Aquilaria* extract in the similar mechanism, by which the *Aquilaria* extract, could inhibit myocardial ischemia-induced p38 MAPK phosphorylation. The inhibitory effect of the extract on p38 activation was clearly seen either prior to ischemia or both of pre-treat and during ischemia. However, the anti-ischemic effect of this plant extract on other MAPKs need to be further investigated, in attempt to avoid the non-specificity or so called "off-target" effect.

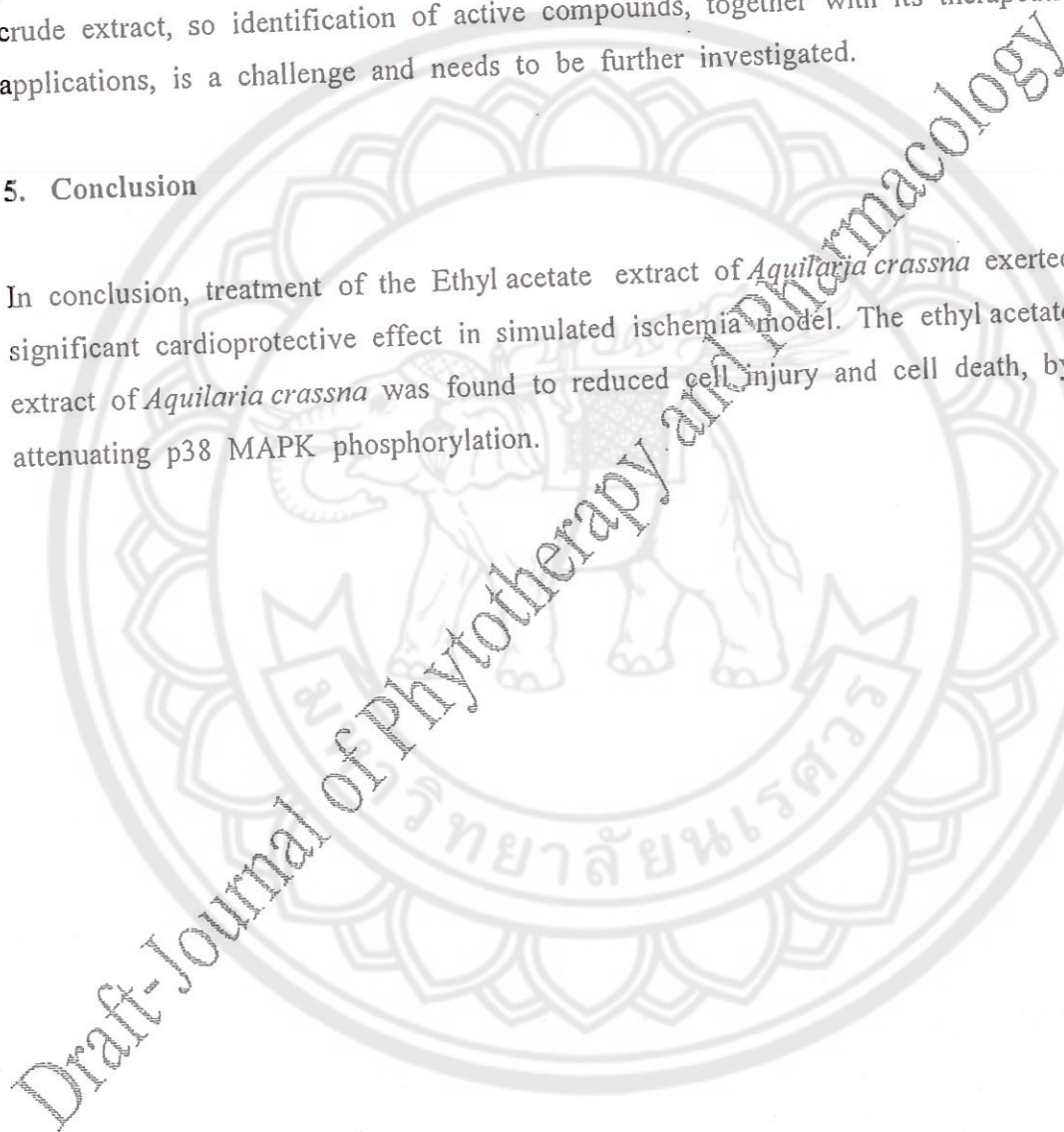
Interestingly, it seem that the plant extract itself could possibly used without causing adverse effects to the heart cells according to exposure of the extract with most effective concentration was not cause cellular toxicity. However, the sensitivity and toxicity of the extracts, in other different tissues or organs, need to be further investigated.

In our hands, this is the first evidence showing the anti-ischemic effect of this plant extract, which was demonstrated in an *in vitro* model of primary culture of

isolated murine cardiomyocytes. However, the our experiments still have some limitations and weak points, as it may not closely related to real physiological response to myocardial ischemia in the intact heart. Therefore, the more relevant models, of an *in vivo* experiment in animal model, will provide some functional data, which is close to the real physiological event in the heart and, could be lead to more reliable interpretation. Moreover, this report was performed using the crude extract, so identification of active compounds, together with its therapeutic applications, is a challenge and needs to be further investigated.

5. Conclusion

In conclusion, treatment of the Ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* exerted significant cardioprotective effect in simulated ischemia model. The ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* was found to reduced cell injury and cell death, by attenuating p38 MAPK phosphorylation.



Acknowledgements

This work was supported by National Research Council of Thailand and Naresuan University Research Fund R2555B042 (to S.K. and T.M.), and graduate student research scholarship, Faculty of Allied Health Sciences, Naresuan University (to P.J).



References

- BARANCIK, M., HTUN, P., STROHM, C., KILIAN, S. & SCHAPER, W. (2000) Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 35, (3) 474-483.
- BRAUNWALD, E. (1996) Acute myocardial infarction--the value of being prepared. *N.Engl.J.Med.*, 334, (1) 51-52.
- CLARK, J. E., SARAFRAZ, N. & MARBER, M. S. (2007) Potential of p38-MAPK inhibitors in the treatment of ischaemic heart disease. *Pharmacol.Ther.*, 116, (2) 192-206.
- CUENDA, A. & ROUSSEAU, S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim.Biophys.Acta*, 1773, (8) 1358-1375.
- DASH, M., PATRA, J. K. & PANDA, P. P. (2008) Phytochemical and antimicrobial screening of extracts of *Aquilaria agallocha* Roxb. *African Journal of Biotechnology*, 7, (20) 3531-3534.
- GOROG, D. A., TANNO, M., CAO, X., BELLAHCENE, M., BASSI, R., KABIR, A. M., DIGHE, K., QUINLAN, R. A. & MARBER, M. S. (2004) Inhibition of p38 MAPK activity fails to attenuate contractile dysfunction in a mouse model of low-flow ischemia. *Cardiovasc.Res.*, 61, (1) 123-131.
- GOTTLIEB, R. A., BURLESON, K. O., KLONER, R. A., BABIOR, B. M. & ENGLER, R. L. (1994) Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J.Clin.Invest*, 94, (4) 1621-1628.
- JENNINGS, R. B. & REIMER, K. A. (1991) The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu.Rev.Med.*, 42, 225-246.
- KIM, Y. C., LEE, E. H., LEE, Y. M., KIM, H. K., SONG, B. K., LEE, E. J. & KIM, H. M. (1997) Effect of the aqueous extract of *Aquilaria agallocha* stems on the immediate hypersensitivity reactions. *J.Ethnopharmacol.*, 58, (1) 31-38.
- KUMPHUNE, S., BASSI, R., JACQUET, S., SICARD, P., CLARK, J. E., VERMA, S., AVKIRAN, M., O'KEEFE, S. J. & MARBER, M. S. (2010) 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.*, 285, (5) 2968-2975.
- KUMPHUNE, S., CHATTIPAKORN, S. & CHATTIPAKORN, N. (2012) Role of p38 inhibition in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Eur.J Clin Pharmacol.*, 68, (5) 513-524.
- KUMPHUNE, S., PROMPUN, E., PHAEBUAW, K., SRIUDWONG, P., PANKLA, R. & THONGYOO, P. (11 A.D.) Anti-inflammatory effects of the ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna* inhibits LPS-induced tumour necrosis factor-alpha production by attenuating P38 MAPK activation. *International journal of green pharmacy*, 5, (1) 43-48.

MINIYAR, P. B., CHITRE, T. S., KARVE, S. S., DEUSKAR, H. J. & JAIN, K. S. (2008) Anti-oxidant activity of ethyl acetate extract of *Aquilaria agallocha* on nitrite-induced methemoglobin formation. *International Journal of Green Pharmacy*, 2, (1) 43-44.

NAGARKATTI, D. S. & SHA'AFI, R. I. (1998) Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J.Mol.Cell Cardiol.*; 30, (8) 1651-1664.

SUVITAYAVAT, W., TUNGLERT, S., THIRAWARAPAN, S. S. & BUNYAPRAPHATSARA, N. (2005) Effects of Ya-hom on blood pressure in rats. *J.Ethnopharmacol.*, 97, (3) 503-508.

TANNO, M., BASSI, R., GOROG, D. A., SAURIN, A. T., JIANG, J., HEADS, R. J., MARTIN, J. L., DAVIS, R. J., FLAVELL, R. A. & MARBER, M. S. (2003) 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.*, 93, (3) 254-261.



Figure legends

Figure 1. Optimization of simulated ischemia protocol. Cells were incubated with ischemic buffer for various periods of incubation times, e.g, 10 min, 30 min, 60 min, 120 min, and 180 min. (A) Percentage of cell viability by MTT assay. (B) The released lactate dehydrogenase activity (U/L). Each bar graph represents means \pm S.D. for 3 experiments. * $p < 0.05$ vs untreated group (ANOVA).

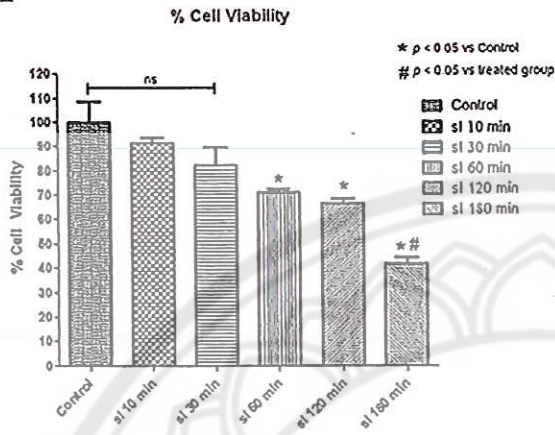
Figure 2. Effect of *Aquilaria* extract on cell viability and cell injury. Cells were subjected to 120 minutes simulated ischemia in the presence and absences of 1-10 mg/ml ethyl acetate extract of *Aquilaria crassna*, pre-treatment. (A) Percentage of cell viability by MTT assay. (B) The released lactate dehydrogenase activity (U/L). Each bar graph represents mean \pm S.D. for 3 experiments. * $p < 0.05$ vs simulated ischemic group (ANOVA), # $p < 0.05$ vs among treated groups (ANOVA).

Figure 3. Effect of *Aquilaria* extract on cell viability. Cells were cultured in the presence of 1-10 mg/ml ethyl acetate extract of *Aquilaria* for 24 hours. Each bar graph represents mean \pm S.D. of % viability by MTT assay.

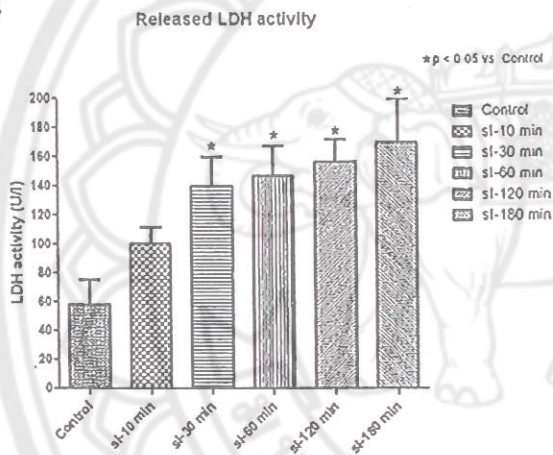
Figure 4. Effect of *Aquilaria* extract on ischemia-induced p38 MAPK activation. Western blot analysis of phosphorylated-p38 MAPK from Adult Rat Ventricular Myocytes (ARVMs) subjected to 40 minutes simulated ischemia, in the presence and absence of 5 mg/ml *Aquilaria* extract. Each bar graph represents fold phosphorylation of p38 MAPK. * $p < 0.05$ vs vehicle control of each group (ANOVA, n=3).

Figure 1.

A

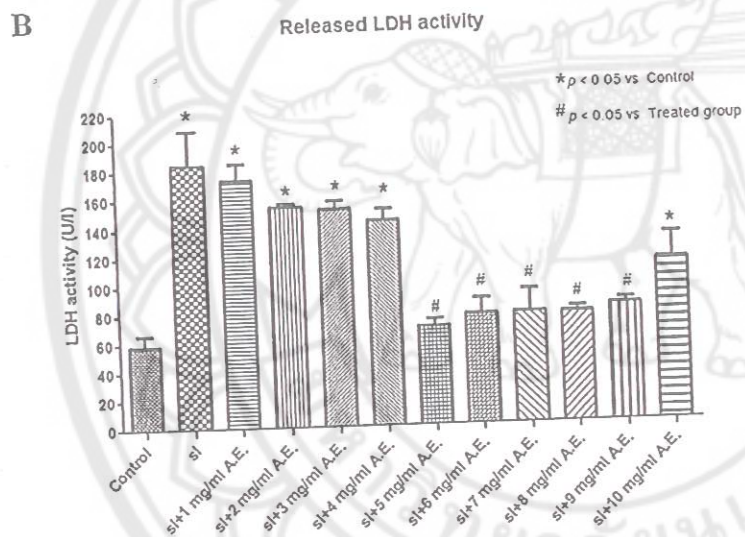
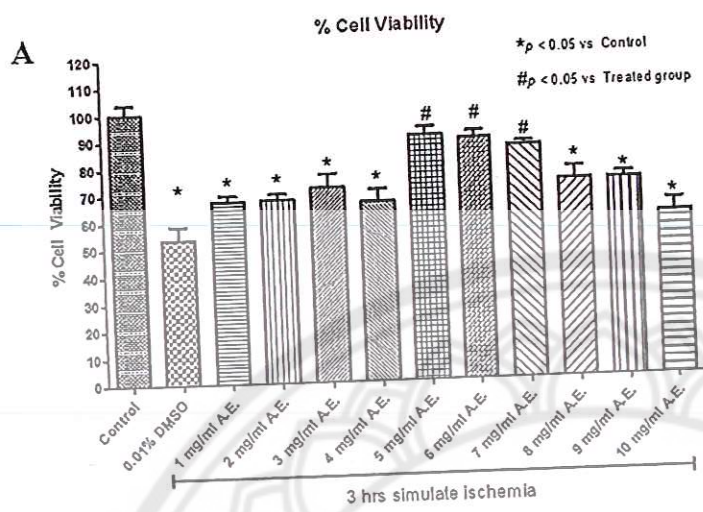


B



Draft-Journal of *Journal of Pharmacy and Pharmacology* มหาวิทยาลัยพระนคร

Figure 2.



Draft-Journal

Pharmacology

Figure 3.

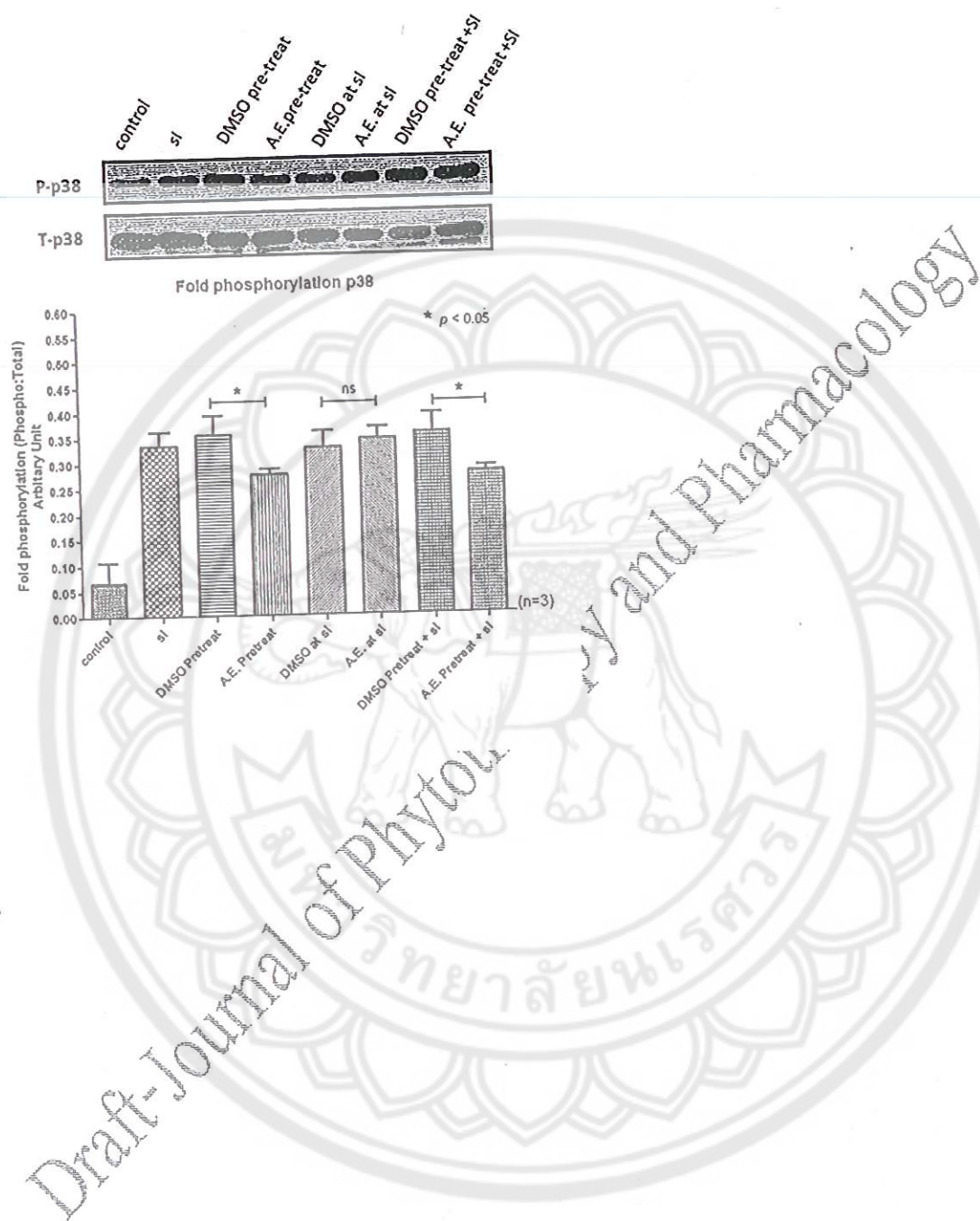


Figure 4.

