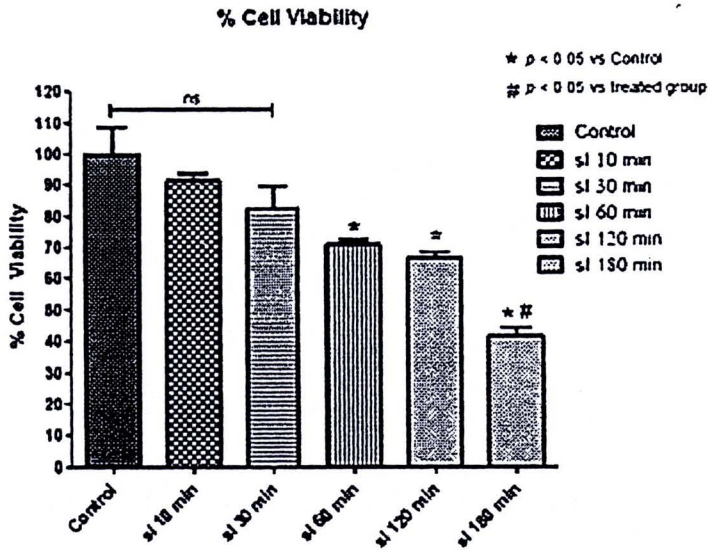
บทที่ 3: ผลการทดลอง

ผลการวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากต้นกฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia) และกลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาในการลดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเนื่องจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate Ischemia)

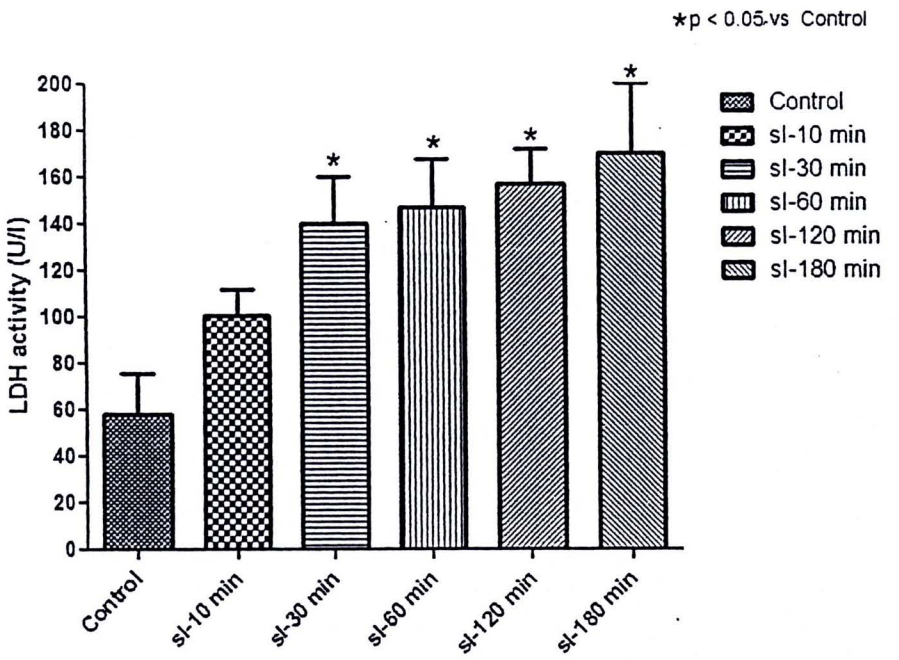
3.1 การทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างของหนูแรท (Adult Rat Ventricular Myocytes; ARVMs) ในสภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)

เมื่อทำให้เซลล์ ARVMs อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลอง โดยไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่เวลาต่าง 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 ให้อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ที่ 180 นาที จึงทำการทดลองเพื่อหาค่าช่วงของความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์หัวใจที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia)



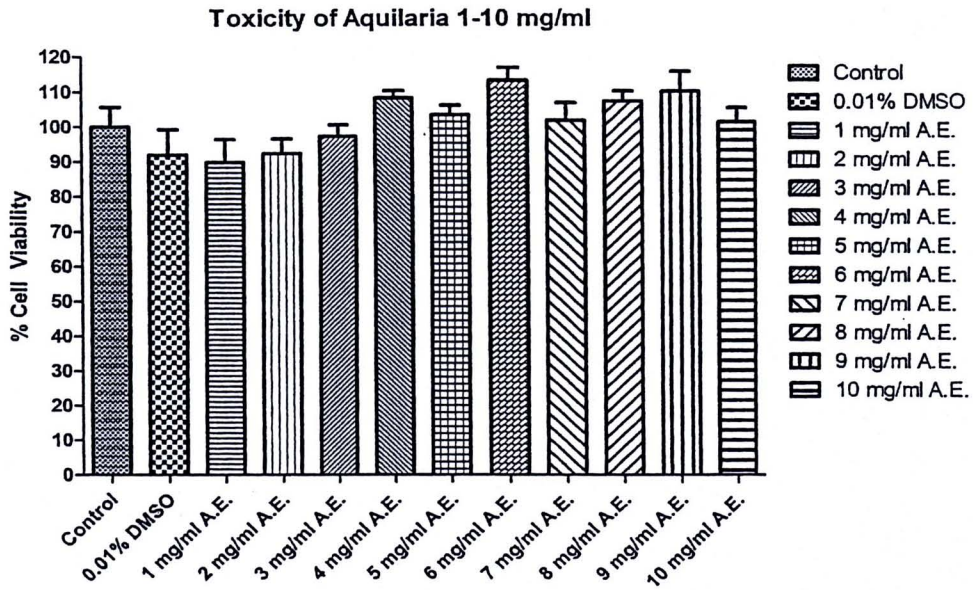
ภาพที่ 1 แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต จากผลการทดลองเพื่อหาระยะเวลาที่มีการตายของเซลล์หัวใจมากที่สุดที่อยู่ในภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) โดยทดลองในช่วงเวลา 10 นาที 30 นาที 60 นาที 120 นาที และ 180 นาที ทำการทดลอง 3 ครั้ง (*p <0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, #p <0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ทำ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



ภาพที่ 2 แสดงระดับการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogynase (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 ก่อนทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และเพาะเลี้ยงต่อข้ามคืน จากนั้นทำการวัดร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต พบว่าในกลุ่มเซลล์ ARVMs ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้นที่ 1 – 10 mg/ml. มีจำนวนเซลล์ที่รอด (% cell viability) ที่มากกว่า 90% ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs (ดังแสดงในภาพที่ 3)

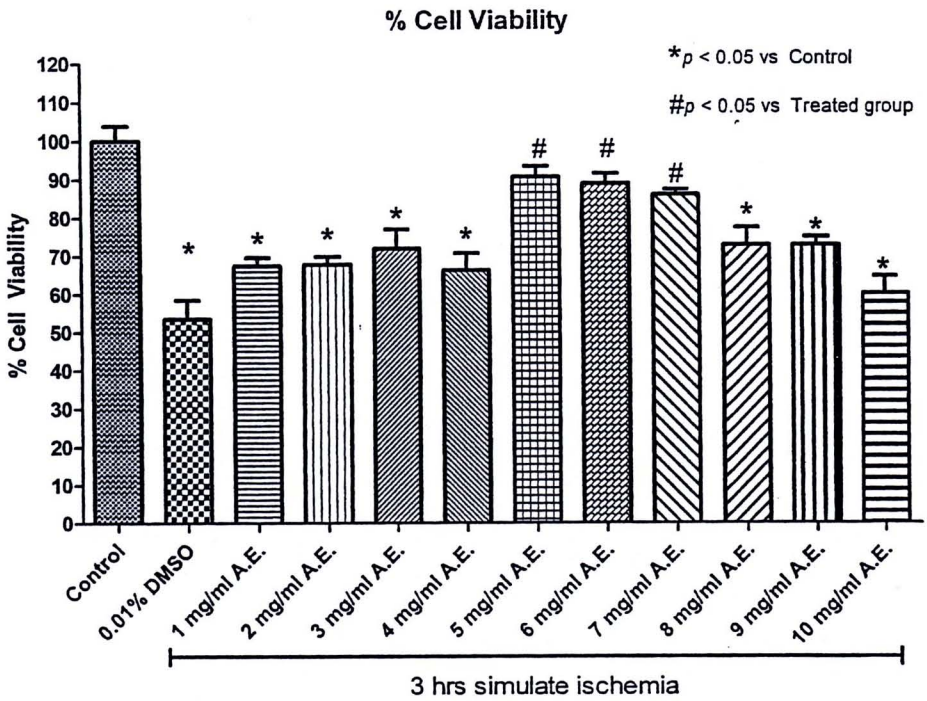


ภาพที่ 3แสดงจำนวนร้อยละของเซลล์ ARVMs มีชีวิตจากการทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้น 1 - 10 mg/ml. เป็นเวลา 60 นาที ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs ทำการทดลอง 3 ครั้ง (*$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ความเข้มข้น 1 – 10 mg/ml.)

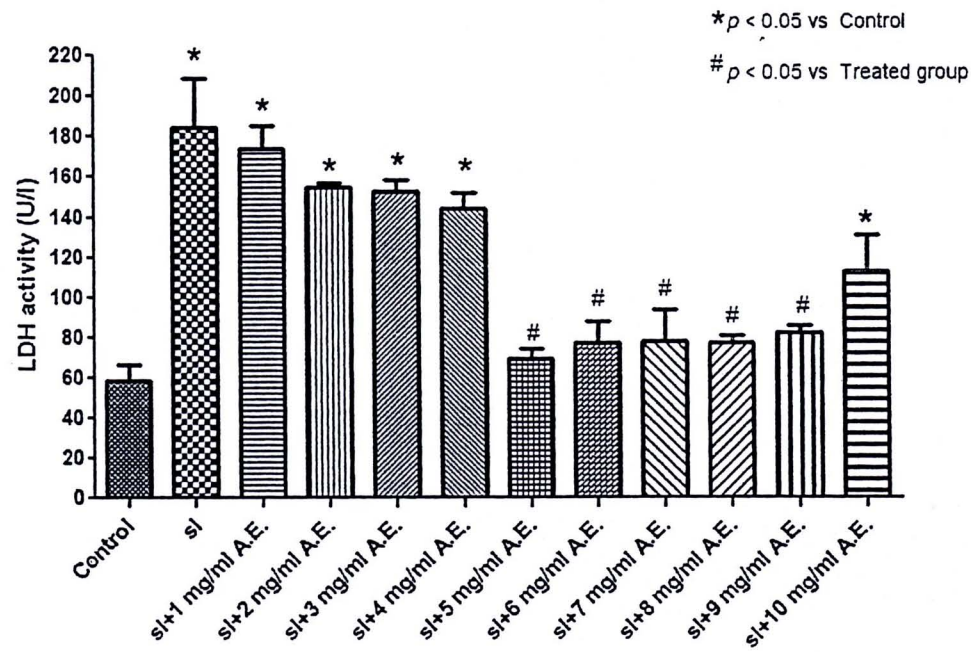
จากผลการทดลองข้อ 3.2 พบว่า ที่ความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs เมื่อทราบข้อมูลขั้นต้นแล้ว จึงทำการทดลองเพื่อหาผลของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาโดยใช้ความเข้มข้นที่ 1 - 10 mg/ml. ที่สามารถลดจำนวนเซลล์ ARVMs ที่ตายจากภาวะขาดเลือดจำลอง (Simulate ischemia) ได้ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ARVMs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

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

ทำการเพาะเลี้ยงแซลล์ 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 จากการทดลองความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาจากช่วงความเข้มข้นที่ 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)



ภาพที่ 5 แสดงระดับการหลั่งเอนไซม์ Lactate dehydrogynase (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 ในสภาวะที่มีและไม่มีการให้สารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษาที่ ก่อนทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะขาดเลือดจำลองเป็นเวลา 180 นาที ดังนี้

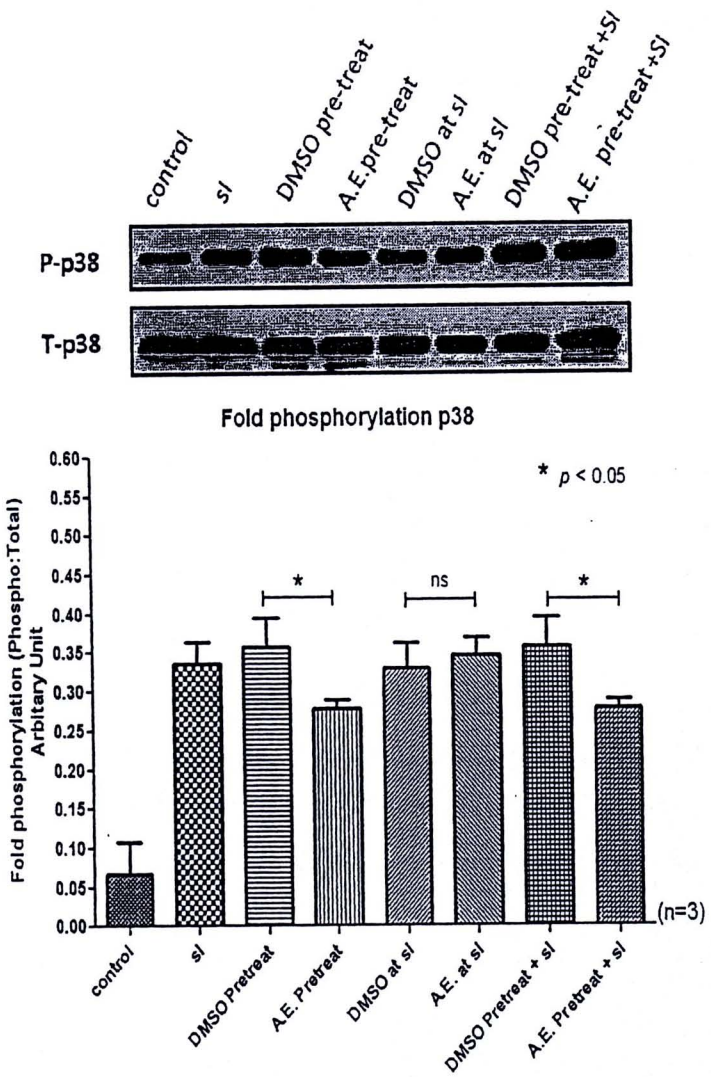
กลุ่มที่ 1 เติม Aq. 60 นาที ก่อน ที่จะทำการกระตุ้นภาวะ SI 180 นาที

กลุ่มที่ 2 เติม Aq. พร้อมกับกระตุ้นภาวะ SI 180 นาที

กลุ่มที่ 3 เติม Aq. ก่อน 60 นาที ดูด Aq. ทิ้ง จากนั้นกระตุ้นให้เกิดภาวะ SI 180 นาที

การวิเคราะห์การกระตุ้น p38 MAPK ที่ถูกกระตุ้นโดย SDS PAGE และ Western blot วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวัดค่าความเข้มแสงของแถบ (Band Intensity) ที่ปรากฏขึ้นบนแผ่นฟิล์ม และนำค่ามาวิเคราะห์เปรียบเทียบ และหาความมีนัยสำคัญทางสถิติทำการทดลอง 3 ครั้งที่ ไม่ขึ้นต่อกัน (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)



ภาพที่ 6 แสดงแถบของโปรตีนที่ถูกกระตุ้นในสภาวะต่าง ๆ (DMSO pre-treat : DMSO 1 hr. ก่อน SI 180 min., AQ-pretreat : 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 ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา(*$p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่ม SI และกลุ่ม DMSO)