

190951

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



190951



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อ
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.สราวุธ คำปวน และคณะ

มิถุนายน 2555



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ในหลอดทดลองของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาต่อ
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.สราวุธ คำปวน และคณะ

มิถุนายน 2555



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.สราวุธ คำปวน คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. อ.จิณิภรณ์ เมมรุ่งเรืองวงศ์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณชูศักดิ์ เรืองรัตนภูมิ เจ้าของต้นกฤษณา ที่เอื้อเฟื้อมอบลำต้นกฤษณา เพื่อให้ผู้วิจัยได้ทำการสกัดสารเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบคุณ อ.ดร.ภาณุมาศ ทองอยู่ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการสกัดสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณา

ขอขอบคุณหน่วยวิจัย คณะสหเวชศาสตร์ และคณะสหเวชศาสตร์ ที่สนับสนุนการใช้เครื่องมือ ครุภัณฑ์ และอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

ขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรสำหรับทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

สราวุธ คำปวน

มี.ย. 2555

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 ทำการวิเคราะห์การบาดเจ็บของเซลล์ด้วยการตรวจวัดระดับเอนไซม์ของแลคเตต ดีไฮโดรจีเนส 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

190951

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 สมมุติฐาน 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 dehydrogynase (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 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากแก่นไม้กฤษณาที่ช่วงความเข้มข้นที่ 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: วิจัยและสรุปผลการทดลอง	26
เอกสารอ้างอิง	28