



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ AMP deaminase ชนิดหัวใจในการทำงาน
พลังงานกลับมาใช้
และการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหมูที่เพาะเลี้ยงขึ้น

โดย

นางสาวกรรณิการ เสริมสุวิทย์วงศ์

กรกฎาคม 2552

กิตติกรรมประกาศ

ลำดับแรกผู้วิจัยขอขอบพระคุณผู้ให้การสนับสนุนการศึกษาวิจัยนี้โดยงานวิจัยชิ้นนี้ได้รับการสนับสนุนวิจัยประเภททุนวิจัยหลังปริญญาเอกจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ประพนธ์ วิไลรัตน์ ที่กรุณาให้คำแนะนำที่ดีและมีประโยชน์เป็นอย่างมากต่องานวิจัยจนทำให้งานวิจัยชิ้นนี้ประสบความสำเร็จ และหัวหน้าภาควิชา (รศ.ดร.วาสนา สุขุมศิริชาติ) รวมถึงบุคลากรในภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มศว. โดยเฉพาะ ผศ.ดร.วัลยา ธเนศพงศ์ธรรม ที่ให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือในส่วนข้อแนะนำเทคนิควิจัยและการใช้เครื่องมือต่างๆของภาควิชาฯ เป็นอย่างดี และรศ.ดร.อรลักษณ์ แพรัตกุล และ ผศ.ดร.นริศรา คำแก่น ในการให้การอนุเคราะห์สารสกัดหยาบสมุนไพรจากหญ้าดอกขาวในการศึกษาวิจัยต่อเนื่องจากการศึกษาวิจัยนี้

ท้ายนี้ในการทำงานวิจัยชิ้นนี้ ผู้วิจัยประสบอุปสรรคอย่างมากทั้งด้านคำถามในงานวิจัยที่เลือกไว้ที่ต้องปรับคำถามและแผนการวิจัยให้เหมาะสมในหลายครั้งจากปัญหาแวดล้อม ทั้งยังต้องพัฒนาอุปกรณ์ในการวิจัยบางชิ้นเอง ขณะดำเนินการวิจัยผู้วิจัยยังประสบทางการเงินและสุขภาพเป็นอย่างมาก ผู้วิจัยจึงขอขอบพระคุณมารดาและพี่ของข้าพเจ้าที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการเงินที่ไม่เพียงพอ และเป็นกำลังใจให้ผู้วิจัยตลอดเวลา

สารบัญ

1.	บทคัดย่อ	1
2.	บทนำ	4
3.	วิธีการทดลอง	6
4.	ผลการทดลอง	8
5.	บทวิจารณ์และสรุป	15
6.	หนังสืออ้างอิง	20
7.	Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	23
8.	ภาคผนวก	24

Project Code : PDF15/43

Project Title : การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ ชนิดหัวใจในการนำพลังงานกลับมาใช้และการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่เพาะเลี้ยงขึ้น

Investigator : กรรณิกา เสริมสุวิทย์วงศ์ (Kannika Sermsovitayawong)

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

E-mail Address : kannikasermso@yahoo.com

Project Period : since Jul 2000 (2 years extended)

Keywords : Adenosine, Early hypoxia, Reperfusion injury, High glucose, Apoptosis, Expression

Title for publication: Endogenous adenosinergic effect in cardiac protection under high glucose after early hypoxic reperfusion injury

Sermsovitayawong K¹, Wilairat P².

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Abstract

Worsen prognosis and high prevalence of death is often found in nondiabetic MI patients with stress hyperglycemia during onset of infarction. Adenosine triggers the intracellular signaling that inhibits apoptotic process in both preconditioning and postconditioning conditions. Whether either adenosine signaling or adenosine metabolism regulates the protective pathway in the model of hyperglycemic hypoxia remains unclear.

Method Mimicry to infarct model with hyperglycemia, the system was established by culture of cardiac myoblasts in the presence of high glucose and very low O₂ tension in a closed chamber. Reperfusion injury of H9C2 cardiac myoblast rescued by medium with serum was assayed. Role of either adenosine metabolism or adenosine triggering have been evaluated by use of either adenosine or non-selective antagonist for adenosine receptor, theophylline and analyses of DNA fragmentation and transcript levels.

Result Reduction of LDH release confirmed the prevention of cardiac necrosis by new medium. The antagonist for adenosine receptor inhibits anti-apoptotic process by new medium as shown by the lower number of fragmented DNA. As expected, the prolong treatment of adenosine during reperfusion period did not prevent apoptosis as shown by a similar pattern of DNA fragmentation. Comparison of RNA analyses of H9C2 cells after rescue demonstrated the high level of up-regulated genes of ADGL, ENT2, Bax, Nix, and HIF1-β. Bnip3 and Nix, but

not Bax, were activated when post-treated with theophylline. Further expression analysis confirmed the involvement of adenosine signaling and adenosine metabolism to this rescued mechanism for inhibition of apoptosis.

Conclusion The obtained data from this study suggested that adenosine signaling appears to be the active cardio-protective mechanism from Bax independent cardiac apoptosis after hyperglycemic hypoxia-reperfusion.

หัวเรื่องเพื่อการเผยแพร่ : การศึกษาวิเคราะห์กลไกของอะดีโนซีนภายในเซลล์ในการป้องกันเซลล์หัวใจในสภาวะที่มีระดับของกลูโคสสูงจากการทำลายโดยออกซิเจนที่ไหลเวียนกลับหลังการขาดออกซิเจนระยะต้น

กรรณิกา เสริมสุวิทยวงศ์¹ ประพนธ์ วิไลรัตน์²

¹ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บทคัดย่อ

ผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดที่ไม่มีโรคเบาหวานร่วมแต่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจากภาวะเครียดขณะที่มีอาการหัวใจขาดเลือดมักมีการพยากรณ์ของอาการของโรคที่ไม่ดีและมีอัตราการตายสูง adenosine กระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์หัวใจเพื่อป้องกันการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ทั้งก่อนและหลังกระบวนการไหลเวียนกลับของเลือดหลังการขาดเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลชัดเจนเกี่ยวกับการส่งสัญญาณของ adenosine ในเซลล์หรือระบบเมแทบอลิซึมของ adenosine ว่ามีผลต่อกลไกการต้านการตายแบบ apoptosis ของหัวใจในผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดที่มีภาวะที่มีกลูโคสในเลือดสูงหรือไม่

การดำเนินการวิจัย เซลล์ตัวอ่อนของเซลล์หัวใจ (H9C2) ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีระดับของกลูโคสที่สูงและมีระดับออกซิเจนต่ำมากในระบบปิดและทำการตรวจสอบการช่วยชีวิตเซลล์ หลังการเลี้ยงในระบบได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่โดยการทดแทนด้วยอาหารใหม่ที่มีซีรัมได้มีการศึกษาบทบาทของการส่งสัญญาณของ adenosine ในเซลล์หรือระบบเมแทบอลิซึมของ adenosine โดยใช้ทั้ง adenosine และ/หรือตัวยับยั้งตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจง (theophylline) และประเมินระดับ DNA fragmentation และระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง

ผลการทดลอง การลดระดับการหลั่งเอนไซม์ LDH ยืนยันการป้องกันการตายของเซลล์แบบ necrosis โดยการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ ตัวยับยั้งตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจงยับยั้งกลไกการ

ด้านการตายของเซลล์โดยการทดแทนด้วยอาหารใหม่โดยการเพิ่มปริมาณของ DNA fragment เป็นไปตามที่คาดการณ์ว่าการบ่มเซลล์ด้วย adenosine ในระยะยาวไม่ป้องกันการตายแบบ apoptosis ในการเปรียบเทียบปริมาณระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ กับยีนควบคุมในเซลล์ที่บ่มในที่มีระดับออกซิเจนต่ำมากและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่โดยการทดแทนด้วยอาหารใหม่พบว่า ยีนของ ADSL ENT2 Bax Nix และ HIF1- β มีระดับการแสดงออกสูงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนปกติ เมื่อให้ theophylline กับเซลล์ที่ได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่พบว่า Bnip3 และ Nix มีการแสดงออกของยีนเพิ่มเติมไม่พบปรากฏการณ์นี้กับ Bax การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเพิ่มเติมยืนยันความเกี่ยวข้องของการส่งสัญญาณของ adenosine ในเซลล์หรือระบบเมแทบอลิซึมของ adenosine ในการช่วยเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีระดับของกลูโคสจากการบาดเจ็บหลังได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่

สรุป ผลการวิจัยนำไปสู่ข้อเสนอแนะว่า การทำงานของ adenosine ในเซลล์เป็นกลไกที่ทำงานในการป้องกันเซลล์หัวใจที่อยู่ในสภาวะที่มีระดับของกลูโคสสูงจากการตายของเซลล์ชนิดไม่ผ่านกลไกของ Bax และการบาดเจ็บหลังได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่

บทนำ

ผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดที่ไม่มีโรคเบาหวานร่วม แต่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเฉียบพลันจากภาวะเครียดขณะที่มีอาการหัวใจขาดเลือดเป็นภาวะดื้ออินซูลิน (insulin resistance) ที่คล้ายกับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 นั้น มักมีการพยากรณ์ของโรคที่ไม่ดีและมีอุบัติการณ์การตายสูง [1] โดยไม่สัมพันธ์กับการทำงานที่ผิดปกติของหัวใจห้องซ้าย (left ventricular function) บริเวณของเนื้อเยื่อหัวใจที่ขาดเลือด (infarct size) ที่มีขนาดใหญ่ หรือการเพิ่มขึ้นอย่างเฉียบพลันของมาร์คเกอร์ของระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ข้อมูลจากงานวิจัยที่ผ่านมาหลายฉบับสนับสนุนว่า ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากระดับของสารออกซิแดนท์ (oxidative stress) และกระตุ้นกลไกการอักเสบที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก [2-6] นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงหลังอาหารในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ต้องไม่พึ่งพาอินซูลิน ยังมีผลโดยตรงต่อความผิดปกติของการไหลเวียนของเลือดโดยเฉพาะในหลอดเลือดขนาดเล็กและการเกิดภาวะแทรกซ้อน [7] อย่างไรก็ตามมีรายงานที่ขัดแย้งว่าภาวะน้ำตาลในเลือดสูงในหนูที่ถูกทำให้เกิดภาวะเบาหวานโดยใช้ streptozotocin (STZ) ในช่วงเวลาสั้น (4 สัปดาห์) กลับมีผลดีต่อการลดการบาดเจ็บของเซลล์หลังหัวใจขาดเลือดเมื่อปิดกั้นหลอดเลือดโคโรนารีด้านซ้ายและมีการไหลเวียนของเลือดกลับไปใหม่ [8] เมื่อเทียบกับหนูที่ถูกกระตุ้นเกิดเป็นภาวะเบาหวานในระยะยาวกว่า 12 สัปดาห์

การเพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมาผลักดันให้เกิดการผลิตโมเลกุลที่ให้อิเลคตรอน (electron donors เช่น NADH/H^+) จาก tricarboxylic acid cycle มากขึ้นจนมีผลต่อการขนส่งอิเล็กตรอนเดี่ยว (singlet oxygen) ไปที่ออกซิเจนเกิดอนุมูลอิสระเช่น superoxide หรือ reactive oxygen species (ROS) อื่นๆ เป็นต้น ROS ที่เพิ่มขึ้นจะเกิดปฏิกิริยากับ nitric oxide (NO) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่สังเคราะห์โดยเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เกิดเป็น peroxynitrite ที่จะไปกระตุ้นกระบวนการต่างๆ เช่น apoptosis และ necrosis [9] การเพิ่มระดับกลูโคสในพลาสมายังมีผลต่อการลดระดับของ NO และมีบทบาทต่อการนำกระแสประสาท การควบคุมตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันและการเกาะติดของเซลล์ควบคุมการอักเสบกับผนังหลอดเลือด [10-11]

Adenosine เป็นโมเลกุล purine nucleoside ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งพลังงานในรูปของ ATP และ ADP และเป็นโมเลกุลตัวกลางที่นำส่งสัญญาณจากสิ่งเร้าภายนอกสู่ภายในเซลล์ (signal transduction) ผ่านการทำงานของตัวรับ (adenosine receptor, AR) บนผิวเซลล์ที่มีหลายชนิด (A1, A2A, A2B, และ A3) ทำหน้าที่หนึ่งในการควบคุมการไหลเวียนของหลอดเลือดในระบบต่างๆรวมทั้งหัวใจ เป็นที่ทราบดีว่า adenosine ป้องกันเซลล์หัวใจชนิด myocardium จากการบาดเจ็บจากการ

ไหลเวียนกลับของเลือดหลังการขาดเลือด (reperfusion injury) โดยการเพิ่ม adenosine จากภายนอก เซลล์ เพิ่มการกระตุ้นผ่าน AR ด้วย adenosine ภายในเซลล์ หรือเพิ่มการกระตุ้นด้วยสารกลุ่มที่เป็น agonists ต่อตัวรับ adenosine และเกิดการบาดเจ็บเพิ่มขึ้นเมื่อยับยั้งกลไกการป้องกันดังกล่าวโดยลดการทำงานของสารส่งสัญญาณภายในเซลล์โดย antagonists ต่อตัวรับ adenosine ซึ่งมีการศึกษาที่สนับสนุนเกี่ยวกับการป้องกันเซลล์หัวใจจากการบาดเจ็บเช่นนี้ทั้งในระดับการทดสอบในสัตว์ทดลองและงานวิจัยทางคลินิก [12-14]

รายงานเกี่ยวกับการทำงานของ adenosine ต่อการปรับระดับออกซิแดนซ์หรือสารอนุมูลอิสระ พบว่าการเติม adenosine จะกระตุ้นให้เซลล์หัวใจที่เพาะเลี้ยง (cultured cardiomyocytes) ในสารอาหารที่มีกลูโคสและออกซิเจนในระดับปกติให้หลั่ง nitric oxide เพิ่มขึ้นโดยการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ adenosine ที่เพิ่มขึ้นทำให้ปกป้องไมโทคอนเดรียจากการทำลายโดยสารอนุมูลอิสระ (hydrogen peroxide) และการใช้ antagonist ต่อตัวรับ adenosine ชนิด A2 สามารถยับยั้งการกระตุ้นดังกล่าว [15]

อย่างไรก็ดีจนถึงปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการส่งสัญญาณของ adenosine ในเซลล์หรือระบบเมทาบอลิซึมของ adenosine ว่ามีผลต่อกลไกการต้านการตายแบบ apoptosis ของเซลล์หัวใจในผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดที่มีภาวะที่มีกลูโคสในเลือดสูงหรือไม่ คณะผู้วิจัยสันนิษฐานว่าเซลล์หัวใจจะถูกปกป้องจากการทำลายโดยการไหลเวียนกลับของเลือดและออกซิเจน หลังการขาดออกซิเจนในภาวะที่มีกลูโคสในเลือดสูงในระยะสั้น แต่กลูโคสจะมีผลเสียต่อเซลล์เมื่อเซลล์ขาดออกซิเจนในระยะที่ยาวขึ้นทำให้เกิดการสะสมสารอนุมูลอิสระในเซลล์มากขึ้น โดยมีการเปลี่ยนแปลงการควบคุมการตอบสนองผ่านส่งสัญญาณของ adenosine ในเซลล์เป็นกลไกควบคุมกลไกหนึ่ง การศึกษาทางอนุชีววิทยาของการควบคุมการป้องกันเซลล์หัวใจจากการทำลายโดยการไหลเวียนกลับของออกซิเจนหลังการขาดออกซิเจนระยะต้น (early phase of hypoxia) จากการป้องกันเซลล์โดยกลูโคสเป็นการทำลายเซลล์โดยระดับกลูโคสที่สูงโดยเน้นที่กลไกการทำวานของ adenosine น่าจะอธิบายเบื้องต้นเกี่ยวกับบทบาทของ adenosine ต่อการตายของเซลล์หัวใจในสภาวะของผู้ป่วยโรคหัวใจขาดเลือดที่ไม่มีโรคเบาหวานร่วม แต่มีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเฉียบพลันจากภาวะเครียดได้

วัตถุประสงค์

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับอนุชีววิทยาที่เกี่ยวกับผลของการส่งสัญญาณของ adenosine ภายในเซลล์ (adenosine signaling) และระบบเมแทบอลิซึมเพื่อรักษาระดับของ adenosine โดย purine nucleotide cycle ในเซลล์ตัวอ่อนของเซลล์หัวใจที่มีระดับของกลูโคสที่สูงต่อการตายแบบ apoptosis ในสภาวะที่มีการบาดเจ็บจากการไหลเวียนกลับของออกซิเจนหลังการขาดออกซิเจนในระยะต้นก่อนการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis จากสภาวะกรดในเซลล์ (acidic apoptosis)

วิธีทดลอง

1. ทดสอบการขาดออกซิเจนของเซลล์หัวใจที่มีภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงในระยะต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนของเซลล์หัวใจ (H9C2 cardiac myoblast, ATCC) ในอาหาร DMEM-10% FBS (Hyclone, USA) ที่ 37°C 5% CO₂ เมื่อจะทำการทดสอบการขาดออกซิเจนของเซลล์หัวใจทำการเพาะเลี้ยงเซลล์จำนวน 5x10⁵ เซลล์ต่อหลุมในจานเลี้ยง 6 หลุม บ่มที่ 37°C 5% CO₂ เป็นเวลา 16-17 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนอาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดที่มีระดับของกลูโคสที่สูง (4,500 mg/l) ที่ไม่มี FBS นำจานเลี้ยงลงเพาะในโถบ่มที่มีออกซิเจนต่ำ (< 0.5% โดย O₂ indicator) ในระบบปิดนาน 18, 21, และ 24 ชั่วโมง เมื่อต้องการให้ออกซิเจนกลับสู่เซลล์ใหม่เปิดโถแล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงตามชนิดที่ต้องการใช้ทดสอบทันที เช่นใช้การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ที่มีระดับของกลูโคสที่สูงและเติม FBS 2% หรือเติม theophylline หรือ adenosine เพิ่มเติม และบ่มที่ตู้เพาะเลี้ยงปกติเป็นเวลา 3.5 ชั่วโมง

ทำการทดสอบการกู้ชีพของเซลล์เมื่อให้ออกซิเจนกลับสู่เซลล์ใหม่โดย ทำการตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์และการตายของเซลล์ทันที เก็บอาหารเลี้ยงเพื่อตรวจสอบการบาดเจ็บของเซลล์ และเก็บสารสกัดเซลล์ใน Trizol (Gibco-BRL) ที่ -20 °C เพื่อการทดสอบต่อไป

2. ตรวจสอบการบาดเจ็บ การอยู่รอด และการตายของเซลล์

2.1 LDH test เพื่อตรวจสอบการบาดเจ็บของเซลล์หรือ necrosis

ทำการตรวจสอบระดับ lactate dehydrogenase ในเซลล์ในแต่ละสภาวะทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จ (Human) วัดโดยหลักการโคเอนติคที่ 37 °C และวัดการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 340 นาโนเมตร

2.2 MTT test เพื่อตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์

ทำการตรวจสอบระดับการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยการเร่งปฏิกิริยาสลายสาร MTT (0.5 mg/ml) ที่ 37 °C เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมงและวัดการดูดกลืนที่ 520 นาโนเมตร หลังหยุดปฏิกิริยาและสกัดผลิตภัณฑ์ formazan ด้วย dimethyl sulfoxide

2.3 DNA fragment analysis เพื่อตรวจสอบการตายของเซลล์

ทำการตรวจสอบระดับการตายของเซลล์แบบ apoptosis ด้วยการย่อยเซลล์ที่บ่มในขั้นตอนต่างๆด้วยสารละลาย Proteinase K-SDS-NaCl ที่ 55 °C ข้ามคืนและสกัดด้วย phenol-chloroform และตกตะกอนด้วยเอทานอลปริมาตร 3.5 เท่าที่ -20 °C 30 นาที จากนั้นนำไปตรวจสอบปริมาณด้วยการวิเคราะห์โดยเจล จากนั้นวัดและประเมินปริมาณความเข้มของ DNA fragment ด้วย Genetools (SynGene)

3. ตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงหลังการกู้ชีพของเซลล์

ตรวจสอบตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมตายแบบ apoptosis การเจริญเติบโตของเซลล์ การตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ และการควบคุมการขนส่งและเมแทบอลิซึมของ adenosine โดยประเมินปริมาณเชิงเปรียบเทียบด้วยยีนควบคุม

3.1 สกัดอาร์เอ็นเอตามวิธีของ Gibco-BRL วัดและปรับระดับความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอ ทำปฏิกิริยา reverse transcription โดยใช้ pooled specific reverse primers สำหรับยีน Bax, Bnip3, Nix, P53, P21, HIF1-alpha, HIF1-beta, AMPDs, ADSS, ADSL, ENTs และยีนควบคุม beta-actin

3.2 ทำการปรับสภาวะของ PCR และทำการวิเคราะห์ผลเบื้องต้นโดยเจลเพื่อตรวจสอบว่าได้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียว จากนั้นจึงนำสภาวะที่เหมาะสมไปทดสอบการปรับสภาวะของ PCR ในเครื่อง real time PCR (RotorGene 6000) ต่อไป

3.3 ทำการตรวจสอบระดับการแสดงออกของยีนต่างๆ ตามสภาวะที่คัดเลือกได้โดยทำการประเมินปริมาณเชิงเปรียบเทียบด้วยยีนควบคุมทุกครั้ง

3.4 นำผลการทดสอบที่ได้ไปคำนวณค่า $\Delta\Delta C_t$

ผลการทดลอง

การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ในระบบที่มีกลูโคสสูงหลังสภาวะขาดออกซิเจน

เมื่อบ่มเซลล์ในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ 18 ชั่วโมงไม่พบการบาดเจ็บของเซลล์ที่รุนแรงโดยสังเกตได้จากรูปร่างของเซลล์ที่ปกติก่อนได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่และมีสภาวะที่เซลล์ยังถูกกู้ชีพได้ โดยสังเกตจากลักษณะของเซลล์ส่วนใหญ่ยังมีรูปร่างปกติเช่นกันหลังได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่กว่า 3.5 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในระบบออกซิเจนต่ำ 21 ชั่วโมง แต่พบการบาดเจ็บที่สังเกตได้จากการที่เซลล์เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเกิดขึ้นและมีระดับ Lactate dehydrogenase (LDH) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่บ่งชี้ถึงการรั่วของผนังเซลล์และการตายของเซลล์หัวใจแบบ necrosis เพิ่มขึ้นหลังบ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำตั้งแต่ 21 ชั่วโมงมีการบาดเจ็บเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนตามเวลาแบบทวีคูณและเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์เป็น bleb cells ซึ่งบ่งชี้ภาวะ apoptosis หลังบ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำที่ 24 ชั่วโมงตามลำดับ (รูปที่ 1) บ่งชี้ว่าที่เวลา 21 ชั่วโมงเซลล์เริ่มเกิดการบาดเจ็บระยะต้นโดยสภาวะออกซิเจนต่ำก่อนการได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่

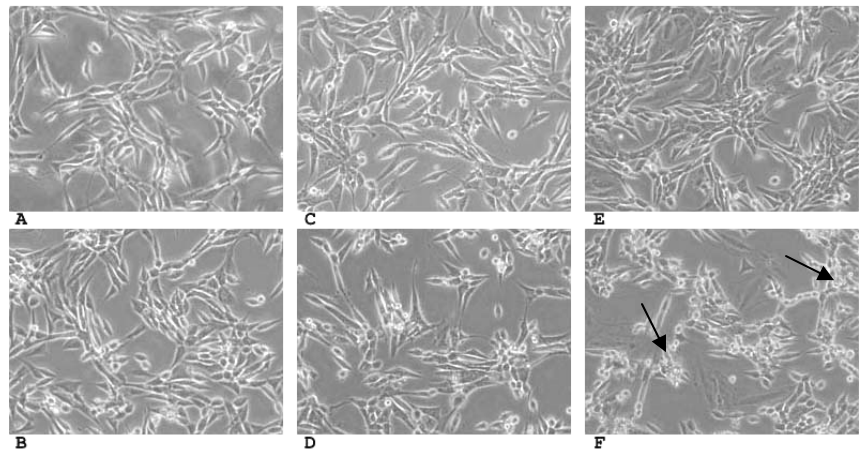
รูปที่ 1 บบ แสดงเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างของเซลล์รวมถึง bleb cells (ลูกศร) หลังบ่มในสภาวะต่างๆ ตามเวลาที่ระบุ ล่าง แสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ LDH และเวลาในการบ่มเซลล์ในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ

A, C, E ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบที่มีออกซิเจนปกติ 18 ชม.

21 ชม. และ 24 ชม. ตามลำดับ

B, E, F ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ 18 ชม.

21 ชม. และ 24 ชม. ตามลำดับ

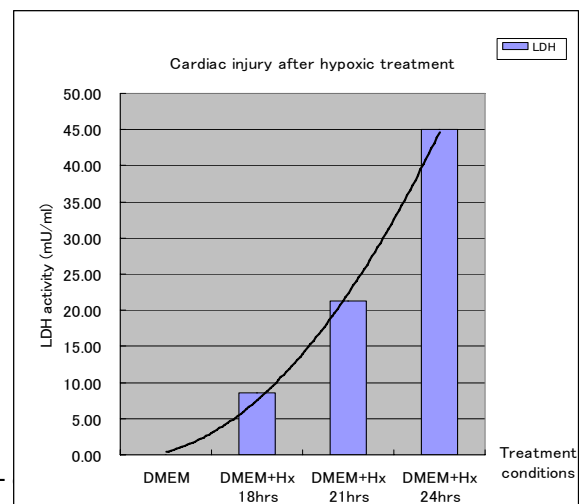


DMEM ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบที่มีออกซิเจนปกติ

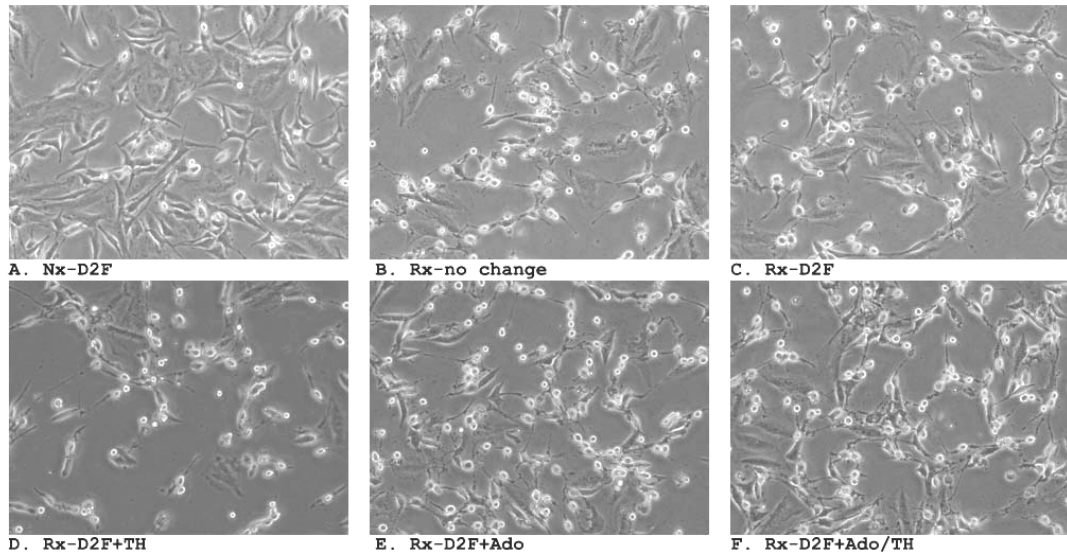
DMEM+Hx18hrs ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ 18 ชม.

DMEM+Hx21hrs ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ 21 ชม.

DMEM+Hx24hrs ผลของเซลล์ที่บ่มในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำ 24 ชม.



รูปที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบรูปร่างของเซลล์หลังบ่มในสภาวะทดสอบ



Nx_D2F เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติเป็น DMEM และ 2%FBS

Rx_ หลังบ่มในสภาวะที่ขาดออกซิเจนและรับออกซิเจนกลับไปใหม่

D2F เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM และ 2%FBS

D2F+TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS และ theophylline 240 μ M

D2F+Ado เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS และ adenosine 1 mM

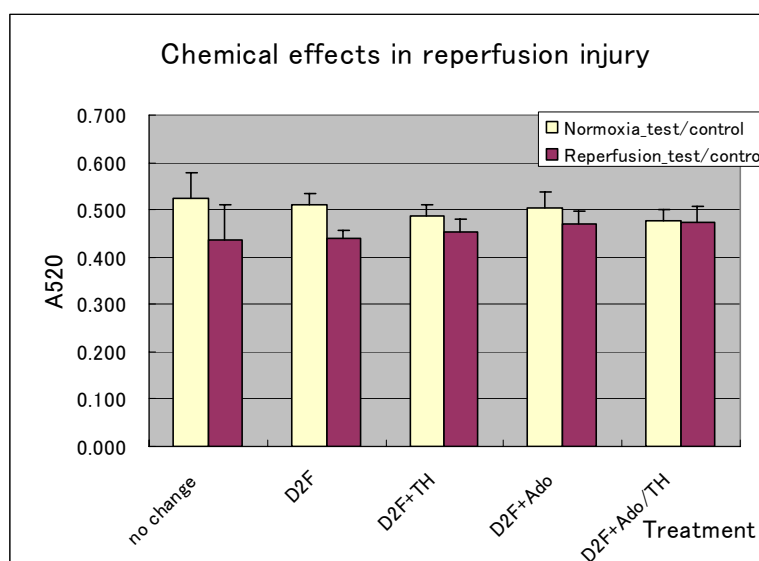
D2F+Ado/TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS theophylline 240 μ M และ adenosine 1 mM

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบปิดที่มีออกซิเจนต่ำนาน 21 ชั่วโมงและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่ 3.5 ชั่วโมงกับเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนปกติพบว่าเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนต่ำเวลานานได้มีการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ไปหลังรับออกซิเจนกลับไปใหม่โดยมีเซลล์ส่วนหนึ่งที่มีการหดตัวโดยโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell shrinkage) บางส่วนมีขนาดนิวเคลียสเล็กลง (nuclear condensation) และมีจำนวนเซลล์ที่มีลักษณะเช่นนี้เปลี่ยนไปตามระบบของอาหารที่ใช้ทดแทนหลังรับออกซิเจนกลับไปใหม่ (รูปที่ 2) นอกจากนี้การป้องกันทำลายเซลล์โดยการทดแทนด้วยอาหารใหม่เป็นการลดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ที่เซลล์หลั่งออกมาซึ่งได้ถูกยับยั้งอย่างชัดเจนโดยสารยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine (theophylline)

การตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์

ในการตรวจสอบโดยวิเคราะห์การทำงานของไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนปกติและเซลล์ที่เพาะเลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนต่ำในระบบปิดนาน 21 ชั่วโมงและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่ 3.5 ชั่วโมงพบว่า ไม่มีความแตกต่างของการอยู่รอดของเซลล์ในทั้ง 2 สภาวะอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3)

รูปที่ 3 การตรวจสอบการอยู่รอดของเซลล์โดย MTT test



Normoxia_test/control เป็นการวัดผลการทดสอบเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีออกซิเจนปกติของตัวอย่างในสภาวะต่างๆ เทียบกับตัวควบคุม

Reperfusion_test/control เป็นการวัดผลการทดสอบหลังจากการรับออกซิเจนกลับไปใหม่ของตัวอย่างในสภาวะต่างๆ เทียบกับตัวควบคุม No change เมื่อไม่ได้มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบ

D2F เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM และ 2%FBS

D2F+TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS และ theophylline 240 μ M

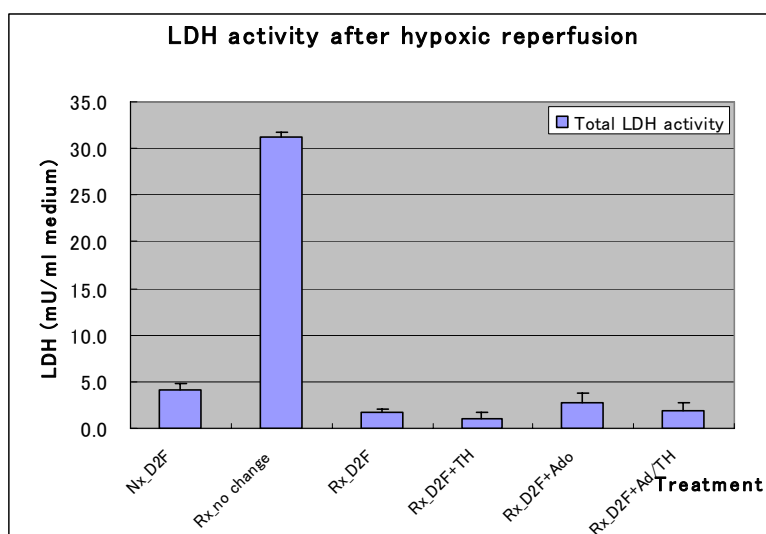
D2F+Ado เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS และ adenosine 1 mM

D2F+Ado/TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะทดสอบเป็น DMEM 2%FBS theophylline 240 μ M และ adenosine 1 mM

การตรวจสอบการบาดเจ็บของเซลล์

ในการตรวจสอบการบาดเจ็บของเซลล์พบว่า มี LDH ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลังจากเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อรับออกซิเจนกลับไปใหม่สูงถึงกว่า 30 mU/ml ซึ่งเพิ่มจาก LDH ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังภาวะขาดออกซิเจน 10 mU/ml และพบว่า ปริมาณ LDH ลดลงกว่า 70% เมื่อเซลล์ได้รับการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีการเติมเฉพาะ FBS เมื่อเทียบกับสภาวะที่ไม่ได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์หลังการรับออกซิเจนกลับไปใหม่ บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ลดสารที่เป็นพิษต่อเซลล์พร้อมกับการทำงานของโปรตีนจากซีรัมช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์ (รูปที่ 4) นอกจากนี้การเติม theophylline 240 μ M adenosine 1mM หรือ ทั้ง theophylline และ adenosine ร่วมกันเพิ่มลงอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ในสภาวะทดสอบ ไม่มีผลต่อการเพิ่มหรือลดการบาดเจ็บของเซลล์อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีการเติมเฉพาะ FBS

รูปที่ 4 การตรวจสอบการบาดเจ็บหรือการตายแบบ necrosis ของเซลล์โดยวัดปริมาณ LDH ที่รั่วมาจากเซลล์



Nx_D2F เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติเป็น DMEM และ 2%FBS

Rx_ หลังบ่มในสภาวะที่ขาดออกซิเจนและรับออกซิเจนกลับไปใหม่

No change เมื่อไม่ได้มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลังบ่มในสภาวะที่ขาดออกซิเจนและรับออกซิเจนกลับไปใหม่

D2F เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM และ 2%FBS

D2F+TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM 2%FBS และ theophylline 240 μ M

D2F+Ado เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM 2%FBS และ adenosine 1 mM

D2F+Ado/TH เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็น DMEM 2%FBS theophylline 240 μ M และ adenosine 1 mM

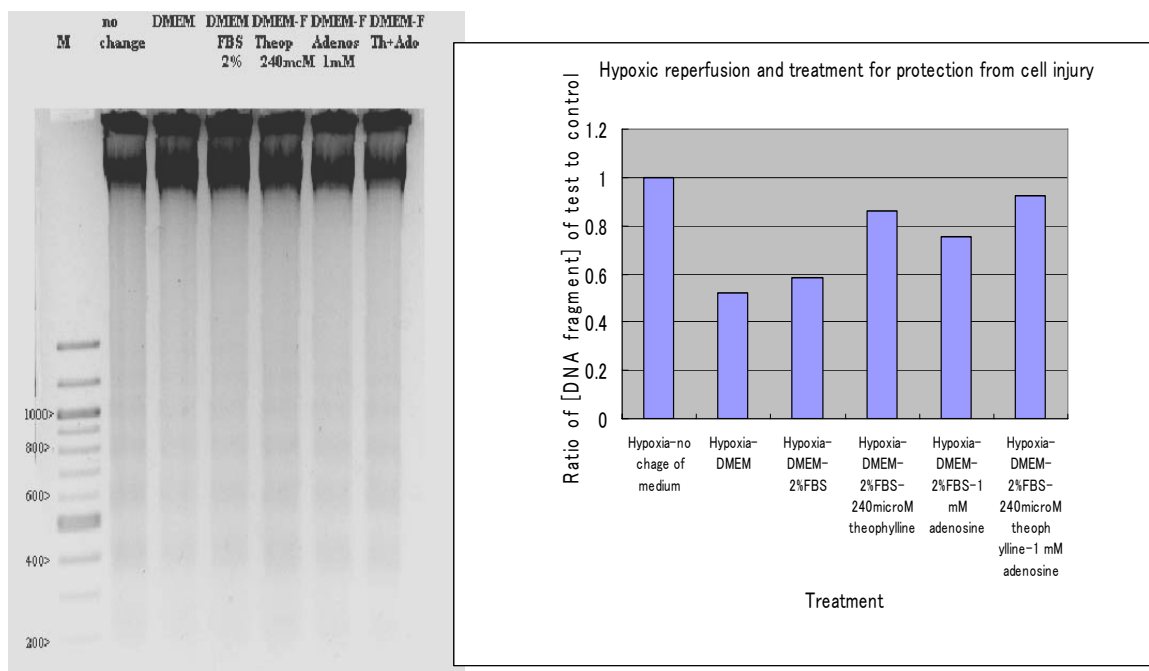
การวิเคราะห์ปริมาณ apoptosis

การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า เซลล์หัวใจหลังไอออนโซเดียมที่สูงออกนอกเซลล์เมื่อเซลล์ต้องการลดความเป็นกรดที่สูงขึ้นภายในเซลล์เมื่ออยู่ในสภาวะออกซิเจนต่ำโดยผ่านการทำงานของ $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger ในเซลล์ ผลของการวิเคราะห์ปริมาณ DNA fragment แสดงว่าการเปลี่ยนอาหารใหม่ที่มีกลูโคสปริมาณสูงและซีรั่ม 2% เมื่อเริ่มการรับออกซิเจนกลับไปใหม่ทำให้ลดปริมาณอนุโมลิสรวมถึงลดปริมาณไอออนโซเดียมที่สูงนอกเซลล์ (ซึ่งพบว่ากระบวนการนี้ถูกยับยั้งได้โดยการบ่มเซลล์ในอาหารที่มี pH ต่ำกว่า 6.9 ช่วงสั้นก่อนการรับออกซิเจนกลับไปใหม่เช่นกัน แต่ไม่ได้แสดงผลการทดสอบ) จึงทำให้มีการลดการทำงานของกลไกที่กระตุ้นการทำงานของ endonuclease และกระบวนการ apoptosis ไปเกือบ 50% ในการทดสอบนี้พบว่า theophylline (ตัวยับยั้งตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจง) ยับยั้งกลไกการต้านการตายของเซลล์โดยมีการเพิ่มปริมาณของ DNA fragment นอกจากนี้ยังมีผลที่ขัดแย้งเกี่ยวกับฤทธิ์ของ adenosine ในการต้านกลไกการยับยั้ง apoptosis ว่า การบ่มเซลล์ด้วย adenosine ในปริมาณสูงระยะยาวกระตุ้นการตายแบบ apoptosis (รูปที่ 5) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบผลของ adenosine ต่อการตายของเซลล์พบว่า adenosine มีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเพิ่มระดับ necrosis และลดระดับ apoptosis (รูปที่ 4 และ 5)

รูปที่ 5 การประเมินกระบวนการ apoptosis จากการวิเคราะห์ปริมาณ DNA fragment

ซ้าย แสดงผลของการวิเคราะห์ DNA ที่สกัดจากเซลล์จากระบบทดสอบโดย gel electrophoresis (ตามระบุในรูป)

ขวา แสดงผลของการวิเคราะห์ความเข้มของแถบ DNA โดยโปรแกรม Gene Tools



การเปรียบเทียบปริมาณระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ กับยีนควบคุมในเชิงปริมาณ

ในการเปรียบเทียบปริมาณระดับการแสดงออกของยีนต่าง ๆ กับยีนควบคุมในเซลล์ที่บ่มในที่มีระดับออกซิเจนต่ำมากและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่โดยการทดแทนด้วยอาหารใหม่พบว่า ยีนของ ADSL ENT2 Bax Nix และ HIF1- β มีระดับการแสดงออกสูงกว่า 3.5 เท่าเมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในระบบที่มีออกซิเจนปกติ (รูปที่ 6) แสดงว่า เซลล์ตอบสนองต่อระบบออกซิเจนต่ำโดยผลิต RNA ของยีน HIF1- α และ HIF1- β เพิ่มขึ้น เพื่อปกป้องเซลล์จากสภาวะออกซิเจนต่ำโดยเซลล์พยายามที่จะเพิ่มปริมาณของ adenosine ในเซลล์โดยผ่านการเพิ่มการผลิต AMP ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่จะสลายต่อได้ adenosine ด้วยการเพิ่มการทำงานของ ADSL ซึ่ง AMP ทำหน้าที่กระตุ้นปัจจัยยังชีพ เช่น AMP activated protein kinase นอกจากนี้เซลล์ยังเพิ่มการนำเข้า adenosine จากภายนอกในเซลล์โดย transporter เช่น ENT2 เพื่อควบคุมสมดุลย์ของระดับ adenosine ขณะเดียวกันยังพบปริมาณ RNA ของ Nix ที่ในระดับสูงกว่าในเซลล์ปกติมากบ่งชี้ถึงการกระตุ้นกลไก apoptosis ในภาวะที่มีกลูโคสสูงต่างจากการตายโดยกระบวนการ apoptosis ในเซลล์ที่มีการสะสมของภาวะเป็นกรดสูงซึ่งจะกระตุ้น Bnip3 ซึ่งเป็น apoptotic factor ตัวหลัก (16)

ผลของตัวยับยั้งตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจง (theophylline)

เมื่อให้ theophylline กับเซลล์หัวใจที่ขาดออกซิเจนและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่พบว่าในขณะที่เซลล์เกิด apoptosis มากขึ้น ยีนของ Bnip3 และ Nix มีการแสดงออกของยีนเพิ่มแต่พบว่าการแสดงออกของยีน Bax มีการเปลี่ยนแปลงน้อย (รูปที่ 7) บ่งชี้ว่ากลไกการควบคุมการทำงานของ Bax ต่างจาก Bnip3 และ Nix ที่ไม่ถูกควบคุมการแสดงออกของยีนโดยการกระตุ้นส่งสัญญาณผ่านการทำงานของตัวรับ adenosine นอกจากนี้การกระตุ้น apoptosis ของ theophylline ยังผ่านกระบวนการทำงานของ p53 และ HIF1beta ซึ่งอาจจะควบคุม apoptotic factors ตัวอื่นๆ เช่น Bnip3 Nix เป็นต้น

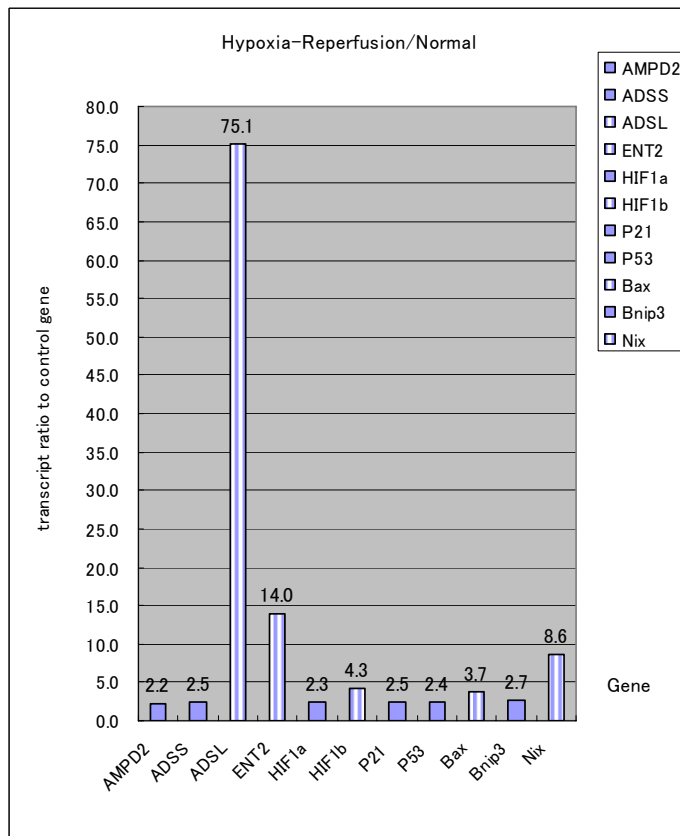
นอกจากนี้ theophylline ยังกระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องเมทาบอลิซึมของ adenosine คือ AMPD2, ADSL, ENT2 เสนอแนะว่า ตัวรับ adenosine ทำงานปรับสมดุลเพื่อเพิ่มระดับ adenosine ในเซลล์ในสภาวะทดสอบ (รูปที่ 7)

ผลของ adenosine ที่เพิ่มขึ้นในเซลล์จากการนำเข้าจากภายนอก

ในการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนเพิ่มเติมโดยศึกษาผลของการเติม adenosine ในปริมาณที่สูง ซึ่งนำไปสู่การเพิ่มระดับ adenosine ภายในเซลล์พบว่า AMP deaminase ซึ่งทำหน้าที่

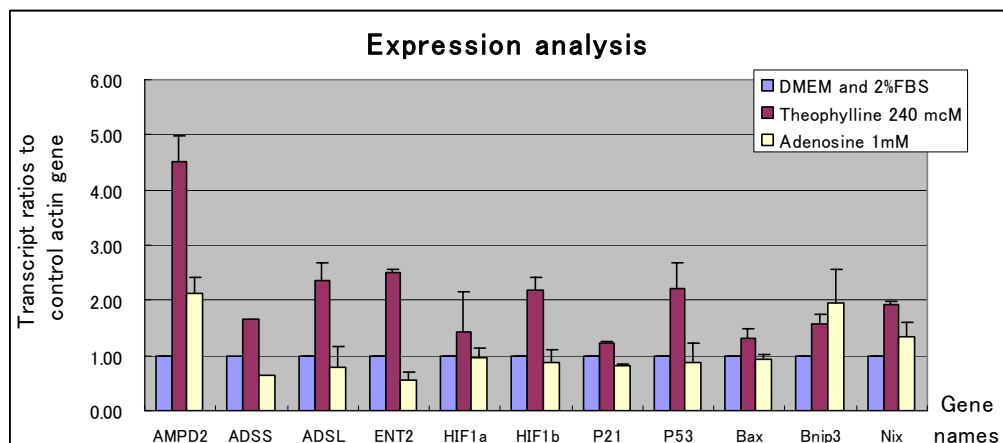
นำ AMP กลับมาใช้มีระดับเพิ่มขึ้นจากระดับ AMPD2 RNA ที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ Equilibrative nucleoside transporter ซึ่งทำหน้าที่ส่ง adenosine เข้าเซลล์มีระดับ ENT2 RNA ลดลงบ่งชี้ถึงความสามารถลดปริมาณ adenosine ภายในเซลล์ นอกจากนี้การเพิ่มระดับ adenosine ภายในเซลล์ยังส่งผลถึงการลดโปรตีนควบคุมการเจริญของเซลล์ เช่น p21 และเพิ่มระดับการแสดงออกของยีน Bnip3 ซึ่งตอบสนองต่อทั้งกระบวนการ apoptosis และ necrosis (รูปที่ 7)

รูปที่ 6 การเปรียบเทียบปริมาณระดับการแสดงออกของยีนทดสอบกับยีนควบคุม



AMPD2, ADSS, ADSL, ENT2, HIF1- α , HIF1b, P21, P53, Bax, Bnip3, Nix แสดงค่าของยีน AMP deaminase type2, Adenylosuccinate synthase, Adenylosuccinate lyase, Equilibrative nucleoside transporter type2, Hypoxia inducible factor-1 alpha, Hypoxia inducible factor-1 beta, P21/WAF1 (cell cycle regulator), P53 (tumor suppressor), 3 apoptotic factors (Bax, Bnip3, Nix หรือ Bnip3 related protein) ตามลำดับ

รูปที่ 7 ผลของ Theophylline และ Adenosine ต่อระดับการแสดงออกของยีนทดสอบกับยีนควบคุม เมื่อศึกษาเปรียบเทียบเชิงปริมาณ



สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

Early phase in hypoxic reperfusion

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่ศึกษาการทำงานของ adenosine ในเซลล์ที่ทำงานในการป้องกันเซลล์หัวใจที่อยู่ในสภาวะที่มีระดับของกลูโคสสูง ช่วงเวลาของการขาดออกซิเจนที่ถูกเลือกในการศึกษานี้เป็นภาวะที่ยังไม่ปรากฏ bleb cells หลังจากบ่มในสภาวะออกซิเจนต่ำเป็นเวลา 21 ชั่วโมงก่อนให้ออกซิเจนกลับไปใหม่ซึ่งเป็นการขาดออกซิเจนระยะต้น เมื่อตรวจสอบปริมาณ LDH ที่เซลล์หลั่งออกมาพบว่า เซลล์หลั่ง LDH ในช่วงดังกล่าวน้อยกว่าเมื่อบ่มในสภาวะเดียวกันที่ 24 ชั่วโมงที่เริ่มตรวจพบ bleb cells หลังบ่มในสภาวะออกซิเจนต่ำถึง 50% และที่เวลา 21 ชั่วโมงนี้เซลล์เริ่มมีการบาดเจ็บชัดเจน หลังมีการให้ออกซิเจนกลับไปใหม่และกู้ชีพเซลล์ด้วยการเปลี่ยนอาหารใหม่โดยสังเกตจากการเปลี่ยนรูปร่างของเซลล์ (cell shrinkage และ cell condensation) เมื่อวิเคราะห์ผลของปริมาณ LDH ร่วมกับผลของ DNA fragmentation ที่มี DNA fragment ปริมาณน้อยมาก (<10% ของ DNA ทั้งหมด) เทียบกับการศึกษาอื่นๆ ที่ทดสอบเซลล์ H9C2 ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและกลูโคสสูง (16, 17) ซึ่งพบ DNA fragment ปริมาณมากจากสภาวะเป็นกรดสูง สภาวะที่ทดสอบนี้ให้ผลสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cai L และคณะซึ่งศึกษาเซลล์หัวใจในสภาวะที่มีออกซิเจนปกติที่เกิด apoptosis เมื่อสัตว์ทดลองมีกลูโคสระดับสูงในเลือด (18) ทำให้สรุปได้ว่า ในระบบที่บ่มในสภาวะที่มีกลูโคสสูงและออกซิเจนต่ำในระยะต้นนี้ เซลล์ถูกทำให้บาดเจ็บจากการคั่งของอนุมูลอิสระหรือการลดลงของ antioxidants ปริมาณมากกว่าการเกิดภาวะกรดในเซลล์ แต่ผลในการศึกษานี้ขัดแย้งกับการศึกษาของคณะของ Kim MH (21) ที่พบว่า การบ่มเซลล์ในกลูโคสระดับสูงก่อนบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำและไม่มีกลูโคสช่วยป้องกันเซลล์จากการตายเมื่อเทียบกับเซลล์ที่บ่มในกลูโคสระดับปกติ เพราะกลูโคสในระดับสูงลดการทำงานของ Na^+/H^+ exchanger (NHE) ทำให้เกิดการลดปริมาณกรดภายในเซลล์โดยกระตุ้น $\text{H}^+/\text{HCO}_3^-$ co-transport ซึ่งจะทำให้ระดับแคลเซียมในเซลล์ไม่สูงและลดสภาวะ acidic apoptosis (19-20)

การเปลี่ยนอาหารใหม่ให้เซลล์ที่ได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่หลังบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำในระยะต้นช่วยลดปริมาณสารอนุมูลอิสระและไอออนโซเดียมนอกเซลล์ ผลตามรูปที่ 6 บ่งชี้ว่าเซลล์ทำการสังเคราะห์ AMP สูงขึ้นจากการที่มี ADP สูงขึ้นอย่างมาก จึงมีผลให้เกิด AMP สูงขึ้นและมีผลต่อการกระตุ้น AMP activated protein kinases (AMPK) โดยตรง หรือมีการชะลอการสูญเสีย adenosine จากเซลล์ ทำให้กระตุ้น AMP activated protein kinases (AMPK) โดยการส่งสัญญาณผ่านการทำงานของ adenosine receptor ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (22,23) จากข้อมูลที่

ผ่านมาโดยส่วนใหญ่ระบุฤทธิ์ของ AMPK ในการยับยั้งการทำลายเซลล์หัวใจจากการให้ออกซิเจนกลับไปใหม่ โดยเพิ่มการนำเข้ากลูโคส กระบวนการสลายกลูโคส และยับยั้งการใช้พลังงานของเซลล์ (24-26)

HIF1 เป็นโปรตีนควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์ (transactivators) ของกลุ่มยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะออกซิเจนต่ำ เมื่อทำการทดสอบที่มีระดับกลูโคสสูงในงานวิจัยชิ้นนี้พบว่า ยีน HIF1- β มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่ ซึ่งข้อมูลสอดคล้องกับการศึกษาของ Yim S และคณะ (27) ว่า ยีนของ HIF1- β หรือ ARNT เท่านั้นมีความจำเป็นต่อการตอบสนองต่ออินซูลินและการตอบสนองต่อสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำเมื่อทดสอบในเซลล์หัวใจที่เพาะเลี้ยงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อโปรตีน HIF1- α ในสภาวะทั้งสอง เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลที่ขัดแย้งกันในการศึกษาของ Marfella R และคณะ (28) ที่พบว่า การแสดงออกของยีน HIF1- α อาจเป็นปัจจัยหนึ่งสำหรับการพยากรณ์สภาวะการบาดเจ็บของเซลล์โดยสารอนุมูลอิสระโดย Marfella R และคณะได้ทำการทดสอบในสภาวะที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเมื่อเกิดการขาดเลือดโดยบีบหลอดเลือดโคโรนารีหัวใจด้านซ้าย เซลล์หัวใจจะเกิดการสะสมสารอนุมูลอิสระมากและเกิดการขยายของบริเวณเซลล์ที่ตาย (infarct size) บริเวณกว้างจากสภาวะนี้และเกิดการขยายบริเวณเซลล์ที่ตายมากขึ้นเมื่อควบคุมระดับกลูโคสในเลือดได้ไม่ดี ซึ่งสภาวะนี้แปรผันกับระดับการแสดงออกของยีน HIF1- α ข้อมูลที่แตกต่างกันอาจเกิดจากการศึกษาของ Yim S และคณะและงานวิจัยชิ้นนี้เป็นการทดสอบในระดับเซลล์ที่เพาะเลี้ยงขึ้น แต่งานวิจัยของ Marfella R และคณะซึ่งทดสอบในสัตว์ทดลองที่มีกลูโคสในเลือดปกติที่สภาวะของการขาดเลือดที่ทำให้เกิดสภาวะที่รุนแรงต่อเซลล์มากกว่าจากขนาดของเซลล์ที่ตาย (> 40% ของห้องหัวใจด้านซ้าย) หลังได้รับเลือดไหลเวียนกลับไปใหม่ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลการศึกษาเปรียบเทียบ ยีน HIF1- α และ HIF1- β ในสัตว์ทดลอง

Bax ถูกพบในเซลล์หลากหลายชนิดและเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่หลักในการควบคุมกลไกการกระตุ้นการเกิด apoptosis ขณะที่ P53 และ P21/WAF1 ควบคุมกลไก apoptosis โดยเป็นตัวกำหนดการชะลอการดำเนินของวงจรชีวิตของเซลล์ (cell cycle check points) และ Bnip3 เป็นโปรตีนที่มีบทบาททั้งกระบวนการ apoptosis และ necrosis โดยเฉพาะ apoptosis ที่เกิดจากภาวะเป็นกรดในเซลล์หัวใจ (acidic apoptosis) ในรายงานเร็วๆ นี้พบว่า Nix ซึ่งเป็นโปรตีนควบคุมกลไก apoptosis ที่มีโครงสร้างของโปรตีนคล้าย Bnip3 มีบทบาทต่อกลไกการเกิดโรคของเซลล์หัวใจ (hypertrophy) และ cardiac fibrosis เมื่อทำการศึกษาในเซลล์ในสภาวะที่มีระดับกลูโคสสูงที่ถูก

ทำลายโดยออกซิเจนที่ได้รับกลับไปใหม่หลังการขาดออกซิเจนในระยะต้น พบว่าระดับ RNA ของ Bax และ Nix เพิ่มขึ้นชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ribe D และคณะ (29) ที่โปรตีนของ Bax เพิ่มขึ้นเมื่อมีการทำงานของ NADPH oxidase เพิ่มขึ้นซึ่งผลิต superoxide radicals เพิ่มขึ้น แต่ผลการศึกษาขัดแย้งกับงานวิจัยของ Kim MH และคณะที่พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนของ Bax และ Bcl2 ในสภาวะที่เซลล์หัวใจถูกป้องกันจากการตายโดยการให้กลูโคสในระดับสูงก่อนเกิดการขาดออกซิเจน (21)

Adenosine receptor and its inhibition

สารยับยั้งตัวรับ adenosine ชนิดที่ 2 (A2AR) มีบทบาทต่อการกระตุ้นเซลล์ให้ผลิต superoxide radicals (O_2^-) โดย NADPH oxidase เพิ่มขึ้นมีผลต่อการลดการยับยั้งการบาดเจ็บของเซลล์หัวใจ (29) Theophylline ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นสารยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจงและยังมีฤทธิ์ร่วมของการยับยั้ง phosphodiesterase แบบไม่เจาะจงซึ่งจะทำให้เพิ่มระดับ cAMP ในเซลล์ด้วย แม้ว่าสารยับยั้ง phosphodiesterase ชนิดที่ 4 จะออกฤทธิ์ในป้องกันการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยการกระตุ้นด้วย nitric oxide (30) แต่ผลจากการใช้ theophylline 240 μM กับเซลล์ที่ได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่หลังบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำพบว่า เซลล์ตายด้วย apoptosis มากขึ้น (พบ DNA fragment มากขึ้น) แสดงว่า theophylline ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจงมากกว่า

การศึกษาผลของ theophylline ต่อการยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine ของเซลล์ที่อยู่ในสภาวะที่มีระดับกลูโคสสูงที่รอดหลังสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำระยะต้นและพบว่า การแสดงออกของยีนที่ควบคุม purine metabolism ถูกยับยั้งโดย theophylline มีผลทำให้ AMP ในเซลล์ลดลงจากการที่มีระดับ RNA ของ AMP deaminase สูงขึ้นมากขณะที่มีการเปลี่ยนแปลงระดับ RNA ของ ADSS และ ADSL ระดับน้อยกว่า อาจทำให้เกิดการสังเคราะห์เปลี่ยน AMP ไปเป็น inosine monophosphate (IMP) จึงมีผลลดการทำงานของ AMPK นอกจากนี้ theophylline ยังมีผลต่อการลดการนำเข้า adenosine เข้าสู่เซลล์โดย ENT ซึ่งเป็นการควบคุมย้อนกลับจากการที่การส่งสัญญาณของ adenosine ลดลงเช่นที่พบในเซลล์ของก้านสมอง (brainstem) (31)

มีข้อมูลเพิ่มเติมว่าระดับการแสดงออกของยีน HIF1b เพิ่มขึ้นอีกหลังได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่เมื่อถูกยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine แต่ไม่พบปรากฏการณ์นี้กับยีน HIF1a แสดงว่า HIF1b ถูกควบคุมโดยการทำงานของตัวรับ adenosine นอกจากนี้ตัวรับ adenosine ยังมี

บทบาทชัดเจนต่อโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมกลไกการกระตุ้นการเกิด apoptosis

การตรวจสอบระดับ RNA ของยีนหรือโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมกลไกการกระตุ้นการเกิด apoptosis เช่น Bax Bnip3 Nix (หรือ Bnip3L) p53 และ p21/WAF1 ทำให้รู้ถึงกลไกการควบคุมการตอบสนองต่อสภาวะออกซิเจนต่ำของเซลล์หัวใจ RNA ของยีน P53 และ Nix เพิ่มขึ้นชัดเจนเมื่อทำการตรวจสอบบทบาทของตัวรับ adenosine โดยใช้สารยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine แบบไม่เจาะจง แม้ว่าโปรตีนของ P53 และ p21/WAF1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นในเซลล์หัวใจที่เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีกลูโคสสูงและในหัวใจหนูเบาหวาน (32, 33) แต่ยังไม่มียางานของผลของการยับยั้งการทำงานของตัวรับ adenosine ต่อการแสดงออกของ RNA ของทั้ง P53 และ p21/WAF1 Nix เป็นโปรตีนซึ่งแสดงออกในเนื้อเยื่อหลายชนิดทำหน้าที่ควบคุมการโตของเซลล์หัวใจโดยกลไก apoptosis ถูกควบคุมโดยสภาวะเครียดของเซลล์ผ่านโปรตีน Gαq และยังไม่มียางานวิจัยที่สนับสนุนการทำงานของ Nix ในสภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจน (34) ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการพบการเปลี่ยนแปลงของ RNA ของยีน Nix หลังบ่มในสภาวะที่มีกลูโคสสูงและออกซิเจนต่ำระยะสั้นและได้รับออกซิเจนกลับไปใหม่เป็นครั้งแรก สรุปได้ว่าการศึกษานี้การลดปริมาณ RNA ของยีน P53 และ Nix โดยกลไกของตัวรับ adenosine เป็นปัจจัยหนึ่งในการป้องกันการตายของเซลล์ที่ขาดออกซิเจนในสภาวะที่มีระดับกลูโคสสูง

Adenosine induced cell death

adenosine มีบทบาทในการป้องกันเซลล์หัวใจชนิด myocardium จากการบาดเจ็บจากการไหลเวียนกลับของเลือดหลังการขาดเลือด (12) adenosine กระตุ้นเซลล์หัวใจให้หลัง NO เพิ่มขึ้นโดยการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ที่เพิ่มขึ้นทำให้ปกป้องไมโทคอนเดรียจากการทำลายโดยสารอนุมูลอิสระ (hydrogen peroxide) [15] ระดับกลูโคสสูงช่วยเร่งการผลิตของทั้ง NO และ superoxide (SO) แบบไม่สมดุลย์ในสัตว์ทดลองทำให้มีปริมาณ SO สูงกว่า NO ถึง 7 เท่าเป็นเหตุให้เกิดความผิดปกติของเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดและการทำลายชีวโมเลกุลในเซลล์โดย peroxynitrite (10) adenosine ปริมาณที่เหมาะสมอาจช่วยปรับการขาดสมดุลย์นี้ได้ แต่มีรายงานว่าปริมาณ NO ที่สูงมากไปมีผลต่อการทำลายเซลล์เช่นกัน (35)

adenosine มีผลโดยตรงต่อการเร่งการทำงานของ AMP deaminase ขณะที่เซลล์หัวใจหมูที่ถูกบ่มในสภาวะออกซิเจนต่ำผลิต AMP deaminase ลดลง และการบ่มด้วย adenosine ก่อนบ่มในสภาวะออกซิเจนต่ำช่วยเร่งการผลิต AMP deaminase โดยผ่านกลไกของตัวรับ adenosine และ

protein kinase C (PKC) เช่นกัน นอกจากนี้ β -adrenergic agonist มีผลต่อการผลิต AMP deaminase เช่นเดียวกับ adenosine (36) ในการศึกษาที่ให้ผลคล้ายคลึงกัน AMP deaminase ถูกกระตุ้นให้ผลิตเพิ่มขึ้นในสภาวะที่มีการเติม adenosine ในช่วงที่ให้ออกซิเจนกลับไปใหม่ แต่สภาวะที่มี adenosine ภายนอกเซลล์สูงมากกระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่กระบวนการ apoptosis โดย NO ที่เพิ่มขึ้นอย่างมากอาจเกิดจากการควบคุมโดย Bnip3 ที่มีระดับมากขึ้น บ่งชี้ถึง AMP deaminase เป็นปัจจัยหลักปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นกระบวนการ apoptosis โดย adenosine เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนของยีนอื่นที่ทำการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Wahab NN, Cowden EA, Pearce NJ, Gardner MJ, Merry H, Cox JL; ICONS Investigator. Is blood glucose an independent predictor of mortality in acute myocardial infarction in the thrombolytic era? *J Am Coll Cardiol*. 2002 Nov 20;40(10):1748-54.
2. Ceriello A. Cardiovascular effects of acute hyperglycaemia: pathophysiological underpinnings. *Diab Vasc Dis Res*. 2008 Nov;5(4):260-8.
3. Ceriello A. Acute hyperglycaemia: a 'new' risk factor during myocardial infarction. *Eur Heart J*. 2005 Feb;26(4):328-31. Epub 2004 Nov 30.
4. Ishihara M, Inoue I, Kawagoe T, Shimatani Y, Kurisu S, Nishioka K, Umemura T, Nakamura S, Yoshida M. Impact of acute hyperglycemia on left ventricular function after reperfusion therapy in patients with a first anterior wall acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 2003 Oct;146(4):674-8.
5. Marfella R, Siniscalchi M, Esposito K, Sellitto A, De Fanis U, Romano C, Portoghese M, Siciliano S, Nappo F, Sasso FC, Mininni N, Cacciapuoti F, Lucivero G, Giunta R, Verza M, Giugliano D. Effects of stress hyperglycemia on acute myocardial infarction: role of inflammatory immune process in functional cardiac outcome. *Diabetes Care*. 2003 Nov;26(11):3129-35.
6. Esposito K, Nappo F, Marfella R, Giugliano G, Giugliano F, Ciotola M, Quagliaro L, Ceriello A, Giugliano D. Inflammatory cytokine concentrations are acutely increased by hyperglycemia in humans: role of oxidative stress. *Circulation*. 2002 Oct 15;106(16):2067-72.
7. Frantz S, Calvillo L, Tillmanns J, Elbing I, Dienesch C, Bischoff H, Ertl G, Bauersachs J. Repetitive postprandial hyperglycemia increases cardiac ischemia/reperfusion injury: prevention by the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. *FASEB J*. 2005 Apr;19(6):591-3. Epub 2005 Jan 25.
8. Xu G, Takashi E, Kudo M, Ishiwata T, Naito Z. Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Exp Mol Pathol*. 2004 Feb;76(1):57-65.
9. Di Filippo C, Cuzzocrea S, Rossi F, Marfella R, D'Amico M. Oxidative stress as the leading cause of acute myocardial infarction in diabetics. *Cardiovasc Drug Rev*. 2006 Summer;24(2):77-87.
10. Ceriello A, Quagliaro L, D'Amico M, Di Filippo C, Marfella R, Nappo F, Berrino L, Rossi F, Giugliano D. Acute hyperglycemia induces nitrotyrosine formation and apoptosis in perfused heart from rat. *Diabetes*. 2002 Apr;51(4):1076-82.
11. Giugliano D, Marfella R, Coppola L, Verrazzo G, Acampora R, Giunta R, Nappo F, Lucarelli C, D'Onofrio F. Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation*. 1997 Apr 1;95(7):1783-90.
12. Peart JN, Headrick JP. Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther*. 2007 May;114(2):208-21. Epub 2007 Mar 12.

13. Kin H, Zatta AJ, Lofye MT, Amerson BS, Halkos ME, Kerendi F, Zhao ZQ, Guyton RA, Headrick JP, Vinten-Johansen J. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovasc Res.* 2005 Jul 1;67(1):124-33. Epub 2005 Apr 1.
14. Ross AM, Gibbons RJ, Stone GW, Kloner RA, Alexander RW; AMISTAD-II Investigators. A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial of adenosine as an adjunct to reperfusion in the treatment of acute myocardial infarction (AMISTAD-II). *J Am Coll Cardiol.* 2005 Jun 7;45(11):1775-80.
15. Xu Z, Park SS, Mueller RA, Bagnell RC, Patterson C, Boysen PG. Adenosine produces nitric oxide and prevents mitochondrial oxidant damage in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2005 Mar 1;65(4):803-12.
16. Graham RM, Frazier DP, Thompson JW, Haliko S, Li H, Wasserlauf BJ, Spiga MG, Bishopric NH, Webster KA. A unique pathway of cardiac myocyte death caused by hypoxia-acidosis. *J Exp Biol.* 2004 Aug;207(Pt 18):3189-200.
17. Webster KA, Graham RM, Bishopric NH. BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2005 Jan;38(1):35-45. Epub 2004 Dec 13.
18. Cai L, Li W, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium: mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway. *Diabetes.* 2002 Jun;51(6):1938-48.
19. Kusuoka H, Matsuda S, Ishikawa M, Koga K, Mori T, Yamaguchi H, Nishimura T. Difference in the mechanisms for compensating ischemic acidosis in diabetic rat hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 1998 Aug;30(8):1643-9.
20. Inserte J, Barba I, Hernando V, Abellán A, Ruiz-Meana M, Rodríguez-Sinovas A, Garcia-Dorado D. Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res.* 2008 Mar 1;77(4):782-90. Epub 2007 Dec 4.
21. Kim MH, Jung YS, Moon CH, Lee SH, Baik EJ, Moon CK. High-glucose induced protective effect against hypoxic injury is associated with maintenance of mitochondrial membrane potential. *Jpn J Physiol.* 2003 Dec;53(6):451-9.
22. da Silva CG, Jarzyna R, Specht A, Kaczmarek E. Extracellular nucleotides and adenosine independently activate AMP-activated protein kinase in endothelial cells: involvement of P2 receptors and adenosine transporters. *Circ Res.* 2006 Mar 17;98(5):e39-47. Epub 2006 Feb 23.
23. Frederich M, Zhang L, Balschi JA. Hypoxia and AMP independently regulate AMP-activated protein kinase activity in heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 May;288(5):H2412-21. Epub 2005 Jan 6.
24. Young LH, Li J, Baron SJ, Russell RR. AMP-activated protein kinase: a key stress signaling pathway in the heart. *Trends Cardiovasc Med.* 2005 Apr;15(3):110-8. Review.

25. Russell RR 3rd, Li J, Coven DL, Pypaert M, Zechner C, Palmeri M, Giordano FJ, Mu J, Birnbaum MJ, Young LH. AMP-activated protein kinase mediates ischemic glucose uptake and prevents postischemic cardiac dysfunction, apoptosis, and injury. *J Clin Invest*. 2004 Aug;114(4):495-503.
26. Wang Y, Gao E, Tao L, Lau WB, Yuan Y, Goldstein BJ, Lopez BL, Christopher TA, Tian R, Koch W, Ma XL. AMP-activated protein kinase deficiency enhances myocardial ischemia/reperfusion injury but has minimal effect on the antioxidant/antinflammatory protection of adiponectin. *Circulation*. 2009 Feb 17;119(6):835-44. Epub 2009 Feb 2.
27. Yim S, Choi SM, Choi Y, Lee N, Chung J, Park H. Insulin and hypoxia share common target genes but not the hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*. 2003 Oct 3;278(40):38260-8. Epub 2003 Jul 21.
28. Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, Piegari E, Nappo F, Esposito K, Berrino L, Rossi F, Giugliano D. Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia*. 2002 Aug;45(8):1172-81. Epub 2002 Jun 26.
29. Ribé D, Sawbridge D, Thakur S, Hussey M, Ledent C, Kitchen I, Hourani S, Li JM. Adenosine A2A receptor signaling regulation of cardiac NADPH oxidase activity. *Free Radic Biol Med*. 2008 Apr 1;44(7):1433-42. Epub 2008 Jan 5.
30. Kwak HJ, Park KM, Choi HE, Chung KS, Lim HJ, Park HY. PDE4 inhibitor, roflumilast protects cardiomyocytes against NO-induced apoptosis via activation of PKA and Epac dual pathways. *Cell Signal*. 2008 May;20(5):803-14. Epub 2007 Dec 28.
31. Snell BJ, Day A, Ledent C, Lawrence AJ. [(3)H]Adenosine uptake in brainstem membranes of CD-1 mice lacking the adenosine A(2a) receptor. *Life Sci*. 2004 May 28;75(2):225-35.
32. Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B, Anversa P, Kajstura J. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes*. 2001 Oct;50(10):2363-75.
33. Mönkemann H, De Vriese AS, Blom HJ, Kluijtmans LA, Heil SG, Schild HH, Golubnitschaja O. Early molecular events in the development of the diabetic cardiomyopathy. *Amino Acids*. 2002;23(1-3):331-6.
34. Gálvez AS, Brunskill EW, Marreez Y, Benner BJ, Regula KM, Kirschenbaum LA, Dorn GW 2nd. Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress. *J Biol Chem*. 2006 Jan 20;281(3):1442-8. Epub 2005 Nov 16.
35. Han W, Fu S, Wei N, Xie B, Li W, Yang S, Li Y, Liang Z, Huo H. Nitric oxide overproduction derived from inducible nitric oxide synthase increases cardiomyocyte apoptosis in human atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 2008 Nov 12;130(2):165-73. Epub 2008 Jun 27.
36. Hohl CM. AMP deaminase in piglet cardiac myocytes: effect on nucleotide metabolism during ischemia. *Am J Physiol*. 1999 May;276(5 Pt 2):H1502-10.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

อยู่ระหว่างการปรับแก้ จะส่งเพื่อขอรับพิจารณาตีพิมพ์วารสารนานาชาติ เช่น International Journal of Cardiology ภายใน 1-2 เดือน (ภาคผนวก)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสความสนใจในวงกว้าง)

ได้มีระบบทดสอบที่นำไปประยุกต์ในการศึกษาสารสมุนไพรต้านการบาดเจ็บหรือตายของเซลล์หัวใจ ซึ่งได้เริ่มต้นนำไปใช้แล้วโดยทำการศึกษาในสัตว์ทดลองจากหนูตัวเมีย

- เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)

คาดว่าจะนำระบบทดสอบที่ได้ไปใช้ในงานวิจัยต่อเนื่องซึ่งจะมีนิสิตปริญญาโท/ผู้ช่วยวิจัยมาศึกษา ขยายงานวิจัยต่อ

3. อื่นๆ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

ได้นำเสนอในงานประชุม BMB conference ในเดือน 7-8 พฤษภาคม 2552 (ภาคผนวก)



CARDIAC PROTECTION FROM REPERFUSION INJURY BY ADENOSINE AND VERNONIA CINEREA LESS. AQUEOUS EXTRACT

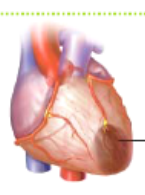


Kannika Sermsuvitayawong¹, Narisa Kamkaen², Ornlaksana Paeratakul², Prapon Wilairat³

¹Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110 (kannikasermu@yahoo.com)

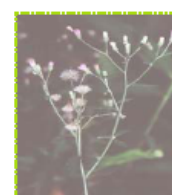
²Faculty of Pharmacy, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110

³Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400



Introduction

Reperfusion injury is mainly due to oxidative damage to intracellular bio-molecules and thus antioxidants, and also anti-inflammatory agents, have been used widely in clinical therapy. Cardiac protection from reperfusion injury by promising antioxidants were also extensively studied in clinical trials (1-3). Free radical scavengers (melatonin, edaravone) and an inhibitor of xanthine oxidase (allopurinol) were shown to improve clinical outcome in patients with acute myocardial infarction. However, less is known about the use of natural compounds identified from Thai herbs for cardiac protection. As *Vernonia Cinerea* Less was reported to have the anti-inflammatory effects (4,5), we therefore speculated that this plant extract may have an anti-oxidative activity and could have an effect comparable to adenosine, one agent of cardioprotectants, in the inhibition of cardiac injury after infarction.



Materials & Methods

Plant materials: Aerial parts from *Vernonia Cinerea* Less. were collected at Nakhon Nayok province in May 2007. A voucher species were deposited at Herbarium of the Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy.

Crude extracts: The plant materials were washed by tapping water, dried in hot air oven at 50°C and powdered by knife mill and blender. The aqueous extracts were obtained by maceration method at room temperature for 7 days. After filtration using Buchner funnel, the wet samples were then placed under vacuum by freeze dryer.

Cell culture, treatment and analysis: H9C2 cardiac myoblasts were treated under chronic hypoxic stress (<1% O₂ observed by oxygen indicator) for 28 hrs. Cells were post-treated during reperfusion/re-oxygenation for 3.5 hrs with adenosine (1 mM) and Vc extract (800 µg/ml) following re-oxygenation by DMEM medium containing 2%FBS (Gibco-BRL). Later, it was observed morphological changes by inverted microscope and assayed for cell viability/ mitochondrial activity using MTT (3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide).

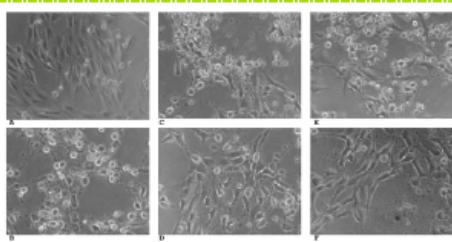


Figure 1 Microscopic examination of H9C2 treated by <1% hypoxia for 28 hrs and 3.5 hr-reoxygenation. The conditions for post-treatment are indicated under photography.

A. Normoxia
B. Hypoxia without replacement of new medium
C. Replacement of new medium by DMEM and 2%FBS
D. Replacement of new medium by DMEM and 2%FBS containing adenosine 1 mM
E. Replacement of new medium by DMEM and 2%FBS containing dimethyl sulfoxide 0.8%
F. Replacement of new medium by DMEM and 2%FBS containing dimethyl sulfoxide 0.8% and Yadokkaow extract at 800 µg/ml medium

This work partly supported by a grant from Thailand Research Fund.

Plant extract obtained from a project under a research plan entitled "Research and Development on Herbal Products for Smoking Cessation Aids".

Results & Discussion

In this study, we evaluated anti-oxidative functions of adenosine and an aqueous extract of *Vernonia cinerea* Less (Vc) on cardiac reperfusion injury. Post-treatment during re-oxygenation for 3.5 hrs with adenosine (1 mM) and Vc extract (800 µg/ml) showed improvement in cell morphology, but had no effect on mitochondrial activity using MTT assay. Post-treatment of adenosine studied in MI patients was reported to reduce the cardiac infarct size (6) but a large clinical outcome trial remains to be studied. Here, Vc extract was shown to have a comparable effect to adenosine, one of cardio-protective agent, in the inhibition of cardiac injury after infarction.

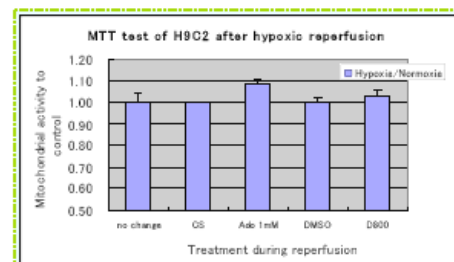


Figure 2 Cell viability of H9C2 assayed by MTT test after 3.5 hrs reoxygenation

"No change" is no replacement of new medium
"OS" contains DMEM and 2%FBS
"Ado" contains DMEM, 2%FBS and adenosine 1 mM
"DMSO" contains DMEM, 2%FBS and dimethyl sulfoxide 0.8%
"D800" contains DMEM, 2%FBS, dimethyl sulfoxide 0.8% and Yadokkaow extract 800 µg/ml medium

Conclusion

These preliminary data have demonstrated the effect of aqueous extract of *Vernonia cinerea* Less in reducing injury on cardiac myoblasts after re-oxygenation. This is comparable to adenosine effect in cardiac protection. Cellular and molecular studies of this plant herbal effect and the characterization of chemical component(s) responsible for this effect will need to be conducted.

References

1. Dominguez-Rodriguez A, Abreu-Gonzalez P, et al. Contemp Clin Trials. 2007 Jul;28(4):532-9. Epub 2006 Oct 17.
2. Tsujita K, Shimomura H, Kaikita K, et al. Circ J. 2006 Jul;70(7):832-7.
3. Guan W, Osamal T, Kamada T, et al. J Cardiovasc Pharmacol. 2003 May;41(5):699-705.
4. Iwalewa EO, Iwalewa OJ, Adedoye IO. J Ethnopharmacol. 2003 Jun;86(2-3):229-34.
5. Latha RM, Geetha T, Varalakshmi P. Gen Pharmacol. 1998 Oct;31(4):601-6.
6. Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata NA, et al. J Am Coll Cardiol. 1999 Nov 15;34(6):1711-20.

Summary of Manuscript

Title: Endogenous adenosinergic effect in cardiac protection after early hypoxic reperfusion injury under high glucose

Authors: Sermvitayawong K¹, Wilairat P^{2**}

¹Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

²Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University

Abstract

Less is known about the effect of ischemic period before reperfusion injury under hyperglycemic stress. Adenosine triggers the intracellular signaling that inhibits apoptotic process in both preconditioning and post-conditioning. Whether either adenosine signaling or adenosine metabolism regulates the protective pathway in the model of ischemic reperfusion under hyperglycemic stress remains unclear. Role of either adenosine metabolism or adenosine triggering in the mechanism of cardiac protection were evaluated in model of re-oxygenated injury after early period of hypoxia under high glucose. RNA analyses of H9C2 cells after rescue from re-oxygenated injury demonstrated the up-regulated genes of ADSL and ENT2, Bax, Nix, and HIF1- β . The antagonist for adenosine receptor, theophylline, was shown to inhibit this anti-apoptotic process. Expression of Bnip3 and Nix, not Bax, were stimulated when post-treated with theophylline, suggesting that adenosine signaling appears to be the active cardio-protective mechanism from Bax-transcript independent cardiac apoptosis after early period of hypoxia under high-glucose stress.

Keywords: Reperfusion injury, high glucose, early hypoxia, adenosine, oxidative stress

*(**This manuscript has not yet been submitted to the mentor for any review or comment)*

Introduction

Worsen prognosis and high prevalence of death in non-diabetic MI patients with stress hyperglycemia during onset of infarction was not associated to abnormal left ventricular function, large infarct size, or immediate response of inflammatory protein markers (1). Postprandial hyperglycemia in diabetic patients directly affected to the defects of microcirculation and diseased complications (7). Previous reports revealed the increased oxidative stress and stimulated pathways of inflammation in these occurrences (2-6). High level of glucose forces the production of free radicals including superoxide, reactive oxygen species (ROS), which reacts to nitric oxide (NO) then later produces peroxynitrite, a stimulating substance for apoptosis and necrosis (9). Contradict evidences demonstrated the reduced reperfusion injury after LCA occlusion or hypoxic treatment by short-term hyperglycemia or pretreatment by high glucose (8, 37). It remains unclear about the effect of ischemic period before reperfusion injury under hyperglycemic stress.

Adenosine functions in regulating circulatory systems via the activation of adenosine receptors (A1, A2A, A2B and A3). It is known that the increased level of extracellular adenosine to stimulate AR activation or agonists for AR protects myocardium from reperfusion injury. Studies in preclinical trials and clinical trails suggested adenosine as a potent cardiac protector (12-14). Adenosine stimulated NO release in vitro by the activation of A2AR and endothelial nitric oxide synthase resulting in the protection of mitochondrial injury from hydrogen peroxide (15).

Less is known about adenosinergic effect on MI patients with hyperglycemic stress. We hypothesized that evaluation of hyperglycemic effect when treating at short-term to long-term or early period of hypoxia could explain the critical mechanism for cardiac protection. Adenosine mechanism may involve in the decreased level of reperfusion injury in MI patients with stress hyperglycemia.

Materials and Methods

Cell treatment at early period of hypoxia and re-oxygenation

H9C2 cardiac myoblast (ATCC) was maintained in DMEM (4,500 mg/l glucose)-10% FBS (Hyclone, USA). Cells were plated at 5×10^5 cells/well for 16 hrs before changing the medium to DMEM (no FBS), further incubated in closed hypoxic chamber at <0.5% Oxygen (observed by O_2 indicator). Re-oxygenation and rescue of cells by immediate change of medium to DMEM-2%FBS. Theophylline or adenosine was added as indicated. After 3.5 hr-re-oxygenation, cells were assayed for viability test, treated for analysis of DNA fragment and harvested for RNA storage at -20°C .

Cell injury, viability, and cell death

LDH test by kinetic assay (Human, USA) was performed to measure the level of cell necrosis. MTT at 0.5 mg/ml was used for assaying mitochondrial activity and cellular viability for 1.5 hrs. DNA fragmentation was analyzed for activation of endo-nuclease cleavage of chromosomal DNA prepared by a method using Proteinase K-SDS-NaCl/ phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation and semi-quantified the weakly intensified band of DNA fragment by Genetools (SynGene).

Gene expression and DNA-quantitation by real time-PCR

RNA prepared as a method of Gibco-BRL was reverse-transcribed using pooled specific reverse primers of Bax, Bnip3, Nix, P53, P21, HIF1-alpha, HIF1-beta, AMPDs, ADSS, ADSL, ENTs and beta-actin. Quantitative PCR was performed in RotorGene 6000 (Corbette Research, Australia). Data was analyzed by comparison with control gene and calculated as $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Results

Increased levels of LDH release from H9C2 cells treated under high level of glucose and hypoxic stress was direct/exponential proportional to increased incubation time of hypoxia (Figure 1B). The selected early period was 21 hrs of hypoxic treatment since no bleb cell of cardiac myoblast after 21 hr-hypoxia was microscopically observed and the later injury which was seen as cell shrinkage and nuclear condensation, found after 3.5 hrs of reperfusion, indicating early phase of reperfusion injury under this experimental condition (Figure 1A). Replacement of new medium (DMEM with 10%FBS) before period of reperfusion reduced cell injury as compared to continued incubation without change of medium, indicated by 10 fold reduction of LDH release (from >30 mU/ml to <4 mU/ml), shown in figure 1C and 1D. The rescued process was partially inhibited by theophylline, a non-selective adenosine antagonist, at 240 μ M indicated by an increased level of DNA fragmentation.

Heart cells compensate its imbalanced intracellular pH via

Discussion

Early phase in hypoxic reperfusion

This is first demonstration of adenosinergic effect on cardiac protection from hypoxic reperfusion injury under high glucose/hyperglycemia. Though the hypoxic period is early as detected by no bleb cells and low LDH level before reperfusion, the fragment analysis also confirmed early period of hypoxia as only <10% obtained DNA fragments, contrasting to the other in vitro studies under acidic environment. This data is correlated to the in vivo study of hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium under normal aeration by Cai L et.al. (18), suggesting that at this early phase of hypoxic treatment, cardiac myoblasts might be damaged by reduced anti-oxidative status, not the intracellular acidity. High level of glucose suppresses the activity of Na⁺/H⁺ exchanger (NHE) leading to lowering uptake of calcium ions, apoptosis and cardiac injury (19-20). However, the report of Kim MH et.al