



ผลของ morelloflavone จากผลมะปูดต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงธอราสติก  
ในหนูที่ได้รับซิสพลาติน

**The Effects of Morelloflavone from *Garcinia dulcis* on Contraction of  
Isolated Thoracic Aorta in Cisplatin Treated Rat**

อัญญา สุมาลี

**Adha Sumalee**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Physiology  
Prince of Songkla University**

**2560**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ผลของ morelloflavone จากผลมะปูดต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงธอราซิค  
ในหนูที่ได้รับซิสพลาติน

**The Effects of Morelloflavone from *Garcinia dulcis* on Contraction of  
Isolated Thoracic Aorta in Cisplatin Treated Rat**

อัญญา สุมาลี

**Adha Sumalee**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science in Physiology  
Prince of Songkla University**

**2560**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      ผลของ morelloflavone จากผลมะพุดต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดง  
 ฆอราสิคในหนูที่ได้รับซิสฟลาติน

ผู้เขียน                นายอัญญา สุมาลี

สาขาวิชา              สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
.....	.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธ์ุ หิรัญญะชาติธาดา)	(รองศาสตราจารย์ ดร.เกษร สุวรรณประเสริฐ)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ
.....	(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธ์ุ หิรัญญะชาติธาดา)
.....	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม)	(ดร.ฐาปนี เรืองฤทธิ์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วน  
 หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสรีรวิทยา

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)  
 คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา)  
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นายอัฐฮา สุมาลี)  
นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นายอัฐฮา สุมาลี)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของ morelloflavone จากผลมะพูดต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดง ธอราสิคในหนูที่ได้รับซิสพลาติน
ผู้เขียน	นายอัญญา สุมาลี
สาขาวิชา	สรีรวิทยา
ปีการศึกษา	2560

### บทคัดย่อ

ผลข้างเคียงที่สำคัญอย่างหนึ่งของ cisplatin คือผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด สาเหตุเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ reactive oxygen species ส่งผลให้การคลายตัวของหลอดเลือดลดลง morelloflavone เป็นสารสกัดจากมะพูดมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระ สามารถกระตุ้นให้หลอดเลือดในหนูความดันเลือดปกติและหนูความดันเลือดสูงคลายตัวผ่านการออกฤทธิ์ของ nitric oxide ที่หลั่งจาก endothelium วัตถุประสงค์การวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลแบบเฉียบพลันของ morelloflavone ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดแดง thoracic ในหนูที่ได้รับ cisplatin และศึกษาผลในการป้องกันความเสียหายของหลอดเลือดแดง thoracic ที่เกิดจาก cisplatin โดยการวัดการหดตัว การลดภาวะ oxidative stress และการปรับโครงสร้างของหลอดเลือด การทดลองนี้ใช้หนูตัวผู้ สายพันธุ์ Wistar โดยฉีด cisplatin (7.5 mg/kg) หรือ vehicle (0.9% NaCl) เข้าทางช่องท้อง เจ็ดวันต่อมา นำขึ้นหลอดเลือดแดง thoracic ของหนูกลุ่ม control ที่มี endothelium (intact) และกลุ่มที่ทำลาย endothelium (denuded) และกลุ่ม cisplatin มาทดสอบการคลายตัวที่เกิดจาก morelloflavone ( $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M) การศึกษาฤทธิ์การป้องกันความเสียหายของหลอดเลือดแดง thoracic ที่เกิดจาก cisplatin โดย morelloflavone ทำการทดลองโดยแบ่งหนูออกเป็นสามกลุ่ม ได้แก่ vehicle control, cisplatin และ cisplatin+morelloflavone โดยหนูจะได้รับ morelloflavone (0.1, 1 และ 10 mg/kg) สองครั้งคือ 1 วัน และ 10 นาทีก่อนการฉีด cisplatin เจ็ดวันต่อมา วัดการหดตัวและคลายตัวของขึ้นหลอดเลือดแดง thoracic ต่อ  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M phenylephrine (PE),  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ผลการทดลองพบว่ากลไกการออกฤทธิ์ของ morelloflavone ในการทำให้หลอดเลือดคลายตัวเป็นแบบ endothelium-dependent และหลอดเลือด thoracic aorta ของหนูที่ได้รับ cisplatin จะมีการหดตัวตอบสนองต่อ PE มากกว่ากลุ่ม control ในขณะที่การคลายตัวตอบสนองต่อ ACh จะต่ำกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับ malondialdehyde ใน plasma ที่สูงขึ้นในกลุ่ม cisplatin สามารถลดลงได้โดยการให้ morelloflavone ซึ่งแสดงว่าฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ morelloflavone จะเกิดขึ้นพร้อมกับฤทธิ์การคลายตัวของหลอดเลือด การตรวจทางเนื้อเยื่อวิทยาพบว่า การเพิ่มขนาดของหลอดเลือดชั้น tunica media ในหนูกลุ่ม cisplatin สามารถลดกลับเป็นปกติได้เมื่อได้รับ morelloflavone

**Thesis Title** The effects of morelloflavone from *Garcinia dulcis* on the contraction of isolated thoracic aorta in cisplatin-treated rat

**Author** Mr. Adha Sumaalee

**Major Program** Physiology

**Academic Year** 2017

### Abstract

One of the adverse effects in using a chemotherapeutic drug, cisplatin, is cardiovascular complication. Cisplatin effect on the blood vessels includes an increase in reactive oxygen species which may impair vascular smooth muscle relaxation. A plant biflavonoid extracted from *Garcinia dulcis* (Kurz), morelloflavone, has been shown to possess robust antioxidant activity and recently caused vasodilation via endothelium dependent nitric oxide signaling pathway in both normotensive and hypertensive rats. This study aimed to investigate an acute and protective effect of morelloflavone on the contractile function, oxidative status and structural damage of cisplatin-treated rat thoracic aorta. Male Wistar rats were used and either cisplatin (7.5 mg/kg) or vehicle (0.9% NaCl) was given intraperitoneally. An acute vasorelaxant effect of morelloflavone ( $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M) was tested in isolated thoracic aortic rings of control (endothelium-intact and denuded) and cisplatin-treated rat on day 7 after the injection. To study the protective role of morelloflavone on the contractile function of the aortic rings, rats were divided into three groups including vehicle control, cisplatin and cisplatin + morelloflavone treated group. Morelloflavone (0.1, 1, 10 mg/kg, i.p.) were given twice, 1 day and 10 min before cisplatin injection. Seven days after the treatment, the contractile responses to  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M phenylephrine (PE),  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M acetylcholine (ACh) or sodium nitroprusside (SNP) were investigated. It is found that the vasorelaxation of morelloflavone is endothelium dependent and the contraction response to PE was significantly higher in cisplatin treated group whereas the relaxation responses to ACh found significantly lower when compared to control. Morelloflavone (1 mg/kg) treatment was able to improve the contractile responses to PE, ACh and SNP. Plasma malondialdehyde level which increased significantly in cisplatin group was also subsided by morelloflavone treatment suggesting its antioxidant action occurred along with the vasorelaxation effect. Histological

examination revealed the tunica media proliferation in cisplatin group was restored by morelloflavone treatment.



## กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพันธุ์ หิรัญญะชาติธาดา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย สอนเทคนิค จัดหาอุปกรณ์ ติดตามงานในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนแนะนำการเขียนและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ และขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับความอนุเคราะห์ให้สารทดสอบที่ใช้ในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณคณะกรรมการการสอบและคณาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยาทุกท่านที่มอบความรู้ คำแนะนำ ชี้แนะข้อบกพร่องต่าง ๆ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่มอบทุนการศึกษาและทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณราชกรีฑาสโมสร และมูลนิธิวัฒนธรรมอิสลามเพื่อการศึกษาและการพัฒนาที่มอบทุนการศึกษา ขอขอบคุณ คุณแพทยา หิรัญพันธุ์ สำหรับสอนเทคนิคการผ่าตัดสัตว์ทดลอง การเตรียมเครื่องมือการทดลอง ขอขอบคุณ คุณสุภาพ นวลพลับ คุณวรางคณา ราชชารอง และเจ้าหน้าที่ภาควิชาสรีรวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในเรื่องการทำวิจัยและการจัดทำเอกสารต่าง ๆ ขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ นักศึกษาภาควิชาสรีรวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือทั้งทางด้านการเรียนและให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณ คุณไมตรี นวลพลับและบุคลากรเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองทุกท่าน สุดท้ายขอขอบพระคุณพ่อแม่ ภรรยาที่น่ารักและญาติพี่น้อง ที่คอยเป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนการศึกษาตลอดมา

อัฐยา สุมาลี

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(8)
สารบัญ	(9)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
สัญลักษณ์และตัวย่อ	(13)
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	34
2. วิธีดำเนินการทดลอง	36
วัสดุและอุปกรณ์	37
วิธีดำเนินการ	38
การออกแบบการทดลอง	38
3. ผลการทดลอง	45
4. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	59
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	66
เอกสารอ้างอิง	67
ภาคผนวก	78
ประวัติผู้เขียน	91

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ผลของ morelloflavone ต่อร้อยละการตายและการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับ cisplatin	45
<b>ภาคผนวก</b>	
1. ผลของ phenylephrine (PE) ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M ต่อการหดตัวของ aortic ring ที่แสดงโดยค่า % increase from resting tension	78
2. ผลของ acetylcholine (ACh) ต่อการคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$ M PE ที่แสดงโดยค่า % relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction	79
3. ผลของ morelloflavone (Mor) ต่อการคลายตัวของ aortic ring กลุ่ม control (Con) ที่มี endothelium (intact endothelium) และ endothelium ถูกทำลาย (denuded) และกลุ่ม cisplatin (Cis) ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$ M PE	80
4. ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days)	81
5. ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days)	82
6. ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days)	83
7. ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor)	84
8. ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor)	86
9. ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor)	88
10. ผลของ cisplatin (7.5 mg/kg) (Cis) และ cisplatin+morelloflavone (0.1, 1 และ 10 mg/kg) (Cis+Mor) ต่อระดับ plasma MDA	90

## รายการรูป

รูปที่	หน้า	
1.1	โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin	2
1.2	กลไกการกลไกการเข้าออกที่ผนังเซลล์ของ cisplatin	5
1.3	การสร้างพันธะและผลของ cisplatin ต่อเซลล์	6
1.4	กลไกการเกิด apoptosis และ necrosis ของเซลล์ จาก cisplatin	9
1.5	รูปแบบหลักและแหล่งที่มาของ reactive oxygen species (ROS)	13
1.6	ผลกระทบหลักที่เกิดจากยาที่ทำให้เกิด oxidative stress ในเซลล์	14
1.7	กลไกการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation	16
1.8	ลักษณะผลสุกและผลดิบของมะพุด	17
1.9	โครงสร้างของ morelloflavone	18
1.10	โครงสร้างปกติของผนังหลอดเลือดแดง	21
1.11	กลไกการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด	23
1.12	การควบคุม endothelial nitric oxide synthase (eNOS)	27
1.13	endothelium derived relaxing factor (EDRF) ที่หลั่งจาก endothelium	29
1.14	endothelin-1 (ET1)	30
1.15	ระบบ renin-angiotensin ที่เซลล์ endothelium	31
1.16	แผนภาพสมมติฐานงานวิจัย	35
2.1	แผนผังการทดลองศึกษาการออกฤทธิ์ของ morelloflavone ในหลอดเลือดแดง thoracic	42
2.2	แผนผังการทดลองศึกษาการตอบสนองต่อ PE, ACh และ SNP ในหลอดเลือดแดง thoracic	43
3.1	ผลของ phenylephrine (PE) ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-10}$ - $10^{-4}$ M ต่อการหดตัวของ aortic ring	47
3.2	ผลของ acetylcholine (ACh) ต่อการคลายตัวของ aortic ring	48
3.3	ผลของ morelloflavone ต่อการคลายตัวของ aortic ring	49
3.4	ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม cisplatin 3 วัน	50
3.5	ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม cisplatin 3 วัน	51
3.6	ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม cisplatin 3 วัน	51
3.7	ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring	52

## รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3.8 ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M	53
3.9 ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring	54
3.10 ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M	54
3.11 ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring	55
3.12 ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-7}$ - $10^{-5}$ M	56
3.13 ผลของ cisplatin (7.5 mg/kg) (Cis) และ cisplatin+morelloflavone (0.1,1 และ 10 mg/kg) (Cis+Mor) ต่อระดับ plasma MDA	57
3.14 การศึกษาทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยา	58

### สัญลักษณ์และตัวย่อ

$\alpha$	=	alpha
$\alpha_1$	=	alpha 1
$\beta$	=	beta
$\beta_1$	=	beta 1
$\beta_2$	=	beta 2
AC	=	adenylate cyclase
ACh	=	acetylcholine
ADH	=	antidiuretic hormone
ADP	=	adensinediphosphate
AI	=	angiotensin I
AII	=	angiotensin II
AMP	=	adenosine monophosphate
ANP	=	atrial natriuretic peptide
APAF-1	=	apoptosis promoting activating factor-1
ATP	=	adenosine triphosphate
AT receptor	=	angiotensin receptor
BKCa	=	large conductance calcium-activated potassium channel
CaM	=	calmodulin
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
CAT	=	catalase
cGMP	=	cyclic guanosine monophosphate
Cis	=	cispaltin
cNOS	=	constitutive nitric oxide synthase
COX I	=	constitutive cyclooxygenase
COX II	=	inducible cyclooxygenase
Ctr1	=	copper transporter 1
DAG	=	diacylglycerol
DG	=	diacylglycerol
DISC	=	death-inducing signaling complex

### สัญลักษณ์และตัวย่อ (ต่อ)

DMSO	=	dimethyl sulfoxide
DPPH	=	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
EP	=	epinephrine
EC	=	effective concentration
ECF	=	extracellular fluid
EDCF	=	endothelium-derived contracting factor
EDHF	=	endothelium-derived hyperpolarizing factor
EDRF	=	endothelium-derived relaxing factor
eNOS	=	endothelium nitric oxide synthase
ET	=	endothelin
ET <sub>A</sub>	=	endothelin ชนิด A
ET <sub>B</sub>	=	endothelin ชนิด B
ET-1	=	endothelin-I
GABA	=	γ-aminobutyric acid
GC	=	guanylate cyclase
Glut1	=	glucose transporter 1
GTP	=	guanosine triphosphate
GSH	=	glutathione
HCl	=	hydrochloric acid
IKCa	=	intermediate conductance calcium-activated potassium channel
IP <sub>3</sub>	=	inositol triphosphate
IP <sub>3</sub> -R	=	inositol triphosphate receptor
ISF	=	interstitial fluid
JNK	=	jun amino-terminal kinase
K <sub>ATP</sub>	=	ATP sensitive K <sup>+</sup> channel
K <sub>Ca</sub>	=	calcium-dependent K <sup>+</sup> channel
K <sub>IR</sub>	=	inward rectifier K <sup>+</sup> channel
K <sub>V</sub>	=	delayed rectifier K <sup>+</sup> channel หรือ voltage-dependent K <sup>+</sup> channel

### สัญลักษณ์และตัวย่อ (ต่อ)

LDL	=	low density lipoprotein
L-NOARG	=	<i>N</i> <sup>G</sup> -nitro-L-arginine
MAPK	=	mitogen-activated protein kinase
MDA	=	malondialdehyde
MLCK	=	myosin light chain kinase
MR	=	muscarinic receptor
MW	=	molecular weight
Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> exchanger	=	sodium-calcium exchanger
NADH	=	nicotinamide adenine dinucleotide
NADPH oxidase	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase
NE	=	norepinephrine
NO	=	nitric oxide
NOS	=	nitric oxide synthase
NSCLC	=	non-small cell lung cancer
OCT2	=	organic cation transporter-2
PDGF	=	platelet derived growth factor
PE	=	phenylephrine
PED	=	phosphodiesterase
PED5	=	phosphodiesterase type 5
PGE <sub>1</sub>	=	prostaglandin E <sub>1</sub>
PGG <sub>2</sub>	=	prostaglandin G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	=	prostaglandin H <sub>2</sub>
PGI <sub>2</sub>	=	prostacyclin
PGIS	=	prostacyclin synthase
PIP <sub>2</sub>	=	phosphatidyl inositol bisphosphate
PKC	=	protein kinase C
PKG	=	protein kinase G
PLC	=	phospholipase C
RNS	=	reactive nitrogen species
ROC	=	receptor-operated nonselective cation channel



**สัญลักษณ์และตัวย่อ (ต่อ)**

ROS	=	reactive oxygen species
SAC	=	stretch-activated cation channel
SCLC	=	small cell lung cancer
SKCa	=	small conductance calcium-activated potassium channel
SNP	=	sodium nitroprusside
SOD	=	superoxide dismutase
SR	=	sarcoplasmic reticulum
T <sub>C</sub>	=	tension ของ resting tension (1 g)
T <sub>PE</sub>	=	tension ที่เกิดจากการหด PE
TXA <sub>2</sub>	=	thromboxane A <sub>2</sub>
VIP	=	vasoactive intestinal polypeptide
VSM	=	vascular smooth muscle
μl	=	microliter
μm	=	micrometer

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 บทนำต้นเรื่อง

cisplatin เป็นยาเคมีบำบัดที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่าง ๆ เช่น มะเร็งถุงน้ำดี มะเร็งปอด มะเร็งรังไข่ มะเร็งอذنทะ เป็นต้น แม้ว่า cisplatin จะมีการใช้อย่างแพร่หลายและให้ผลการรักษาโรคมะเร็งได้ดี แต่พบว่าการใช้ cisplatin ในปริมาณสูงและต่อเนื่องจะส่งผลข้างเคียงต่ออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น nephrotoxicity, ototoxicity, neurotoxicity รวมถึง vascular toxicity อีกด้วย

cisplatin ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในหลอดเลือดเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิด vascular toxicity (Deavall et al., 2012) สาเหตุของ vascular toxicity อาจเกิดจากการเพิ่มระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่ง MDA เป็น marker ตัวหนึ่งของการเกิด lipid peroxidation การให้สารลดภาวะ oxidative stress ควบคู่กับการให้ยา cisplatin จะช่วยลดภาวะความเป็นพิษต่ออวัยวะต่าง ๆ จาก cisplatin ได้

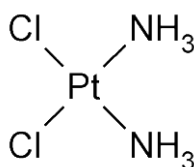
morelloflavone เป็นสารที่สกัดจากผลมะปูดซึ่งเป็นพืชที่พบในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศไทย ฟิลิปปินส์ อินโดนีเซีย มาเลเซีย มะปูดเป็นพืชพื้นเมืองของไทย ที่ถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้าน ซึ่ง morelloflavone เป็นสารในกลุ่ม flavanoid มีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) สามารถยับยั้ง oxidation ของ LDL ที่แยกจาก human plasma โดยวัดระดับ MDA (Hutadilok-Towatana et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า morelloflavone สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา oxidation ของ DPPH radical ได้ (Deachathai et al, 2005) แต่ยังไม่มีการทดลองมาก่อนว่า morelloflavone มีผลในการต้านอนุมูลอิสระที่หลอดเลือด thoracic aorta ที่เกิดจากการได้รับ cisplatin ได้หรือไม่

การทดลองครั้งนี้จึงต้องการศึกษาว่า cisplatin ทำให้เกิดอนุมูลอิสระที่หลอดเลือด thoracic aorta และศึกษาการออกฤทธิ์ของ morelloflavone ในการต้านอนุมูลอิสระที่หลอดเลือด thoracic aorta โดยการวัดระดับ MDA พร้อมกับศึกษาประสิทธิภาพในการลดตัวและคลายตัวของหลอดเลือดแบบ *in vitro*

## 1.2 การตรวจเอกสาร

### 1. Cisplatin

Cisplatin หรือ *cis*-diamminedichloroplatinum (II) เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลของแพลตตินัมเป็นองค์ประกอบ มีลักษณะเป็นผงสีขาวหรือเหลืองเข้มที่อุณหภูมิห้อง สามารถละลายได้ในน้ำหรือ dimethylprimanide และ *N,N*-dimethylformamide cisplatin มีความเสถียรที่อุณหภูมิห้องและที่ความดันบรรยากาศ แต่เมื่อเวลาผ่านไปอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างไปสู่ *trans*-isomer cisplatin มีน้ำหนักโมเลกุล 301.1 กรัม/โมล ความหนาแน่น 3.74 กรัม/ซม.<sup>3</sup> มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 270 องศาเซลเซียส (Jamieson & Lippard, 1999)



รูปที่ 1.1 โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin (Jamieson & Lippard, 1999)

cisplatin ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาครั้งแรกในปี ค.ศ. 1844 โดย M.Peyrone มีการค้นพบสูตรโครงสร้างทางเคมีครั้งแรกโดย Alfred Werner ในปี ค.ศ. 1893 อย่างไรก็ตาม cisplatin ก็ยังไม่ได้มีการนำไปวิเคราะห์ผลทางวิทยาศาสตร์กระทั่งปี ค.ศ. 1960 มีการศึกษาครั้งแรกโดย Rosenberg และคณะ (1965) ที่มหาวิทยาลัยมิชิแกนสเตต พบว่าโมเลกุลของแพลตตินัมในสารประกอบ cisplatin เมื่อผ่านกระบวนการ electrolysis จะสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของ *Escherichia coli* ได้ จึงคาดว่าสามารถนำไปใช้เพื่อยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ ตั้งแต่มีการค้นพบประโยชน์ของ cisplatin ที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งก็ได้มีการศึกษาสารประกอบที่มีอะตอมของโลหะเป็นองค์ประกอบเพื่อใช้รักษามะเร็ง เช่น palladium และอื่น ๆ (Rosenberg et al., 1965)

cisplatin ได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายหลังจากที่พบว่าสามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งในส่วนต่าง ๆ ของร่างกายเช่น มดลูก อัณฑะ ศีรษะและลำคอ ในปี ค.ศ. 1960 มีรายงานการพบคุณสมบัติความเป็นพิษของยา cisplatin ในจำนวนของยาเคมีบำบัดทั้งหลายนั้น cisplatin ถือว่าเป็นยาที่ได้รับความนิยมสูงที่สุด เนื่องจากได้รับการรับรองจาก Food and Drug Administration (FDA) หรือองค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1978 (Frezza et al., 2010)

cisplatin เป็นยาที่ได้รับการพิสูจน์ทางการแพทย์แล้วว่าสามารถยับยั้งมะเร็งชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น เนื้องอก (sarcoma) มะเร็งในเนื้อเยื่อ, กระดุก, กล้ามเนื้อ และหลอดเลือด แม้ว่า cisplatin จะให้ผลในการรักษาทำให้อาการและสุขภาพของผู้ป่วยดีขึ้น แต่ก็ยังมีเรื่องที่ยังคงต้องคำนึงในการรักษาจากการดื้อยาและผลข้างเคียงต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นกับการใช้ยา cisplatin เป็นยาเคมีบำบัด

### 1.1 การใช้ยา cisplatin ในการรักษามะเร็ง

#### 1. มะเร็งปอด

มะเร็งปอดพบว่าเป็นหนึ่งในชนิดของมะเร็งที่มีความร้ายแรง มะเร็งปอดชนิดเซลล์เล็ก (Small cell lung cancer, SCLC) พบมากถึง 15% ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปอด (Chen et al., 2009) ปัจจุบันมีการให้ยาเคมีบำบัดที่มีแพลตตินัมเป็นองค์ประกอบในการรักษามะเร็งชนิดนี้ ได้แก่ยา cisplatin และ carboplatin ในทางคลินิก (Go & Adjei, 1999) cisplatin ถูกนำมาใช้ในการรักษาเป็นส่วนมากเนื่องจากให้ผลในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดี แต่ก็มีผลข้างเคียงที่เกิดจากการใช้ยา cisplatin ตามมาเช่นโรคไต หลอดเลือด และอื่น ๆ ผู้ป่วยที่ได้รับยา cisplatin มักมีอาการวิงเวียนศีรษะและอาเจียน ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่ตามมาจึงต้องมีการติดตามอาการของผู้ป่วยที่ได้รับยาอย่างใกล้ชิดและการให้ยาในปริมาณที่สูงจะต้องมีความจำเป็นเท่านั้น

ตามมาตรฐานการรักษาสำหรับผู้ป่วยมะเร็งปอดชนิดที่ไม่ใช่เซลล์เล็ก (non-small cell lung cancer, NSCLC) คือการผ่าตัดตามด้วยการให้เคมีบำบัดด้วยยา cisplatin ในผู้ป่วยระยะที่ 2 และระยะที่ 3 โดยมีการศึกษาพบว่าการรักษาด้วยเคมีบำบัดแบบเสริมส่งผลให้อัตราการอยู่รอดในห้าปีเท่ากับ 5.3% (Pignon et al., 2008)

#### 2. มะเร็งรังไข่

มะเร็งรังไข่เป็นมะเร็งที่มีอัตราการตายมากที่สุดในกลุ่มของมะเร็งทางนรีเวช ผู้ป่วยส่วนมากที่เป็นมะเร็งรังไข่ได้รับการวินิจฉัยในระยะสุดท้ายเนื่องจากประสิทธิภาพการคัดกรองผู้ป่วยรวมถึงการไม่มีอาการบ่งชี้ในระยะแรกของโรค การรักษาในระยะสุดท้ายของโรคคือการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อออกตามด้วยการให้เคมีบำบัดด้วยยา cisplatin และยาที่มี taxane เป็นองค์ประกอบร่วมด้วย แม้ว่าการรักษาจะให้ผลดีในระยะแรก แต่กลับพบว่าผู้ป่วย 75% กลับมาเป็นโรครีก แล้วผู้ป่วยในกลุ่มนี้มักเกิดภาวะดื้อต่อยาเคมีบำบัดในที่สุดที่และเสียชีวิตจากโรคนี้ (Lynch et al., 2009) ประมาณร้อยละ 90 ของผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งรังไข่เกิดขึ้นโดยไม่ทราบสาเหตุ ส่วนที่เหลือเกิดจากพันธุกรรม และ/หรือ เกี่ยวข้องกับการเป็นมะเร็งเต้านมและลำไส้

cisplatin เป็นยาตัวหลักที่ถูกนำมาใช้ในการรักษามะเร็งรังไข่แม้จะมีผลข้างเคียงตามมาที่รุนแรงและอาจนำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด cisplatin ถูกนำมาใช้ร่วมกับยาเคมีบำบัดชนิดอื่น ๆ เช่น honey venom, withaferin, trichostatin A หรือ 5-aza-2'- deoxycytidine ในผู้ป่วยที่มีความต้านทานต่อยา cisplatin ทั่วไปจะมีการใช้ cisplatin โลโปโซม (Koch et al., 2013)

### 3. มะเร็งศีรษะและคอ

head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) เป็นมะเร็งที่พบได้ทั่วไป โดยพบว่ามีประชากรโลกที่เป็นมะเร็งชนิดนี้เพิ่มขึ้นถึงปีละ 600,000 คนในทุกปี (Parkin et al., 2005) ทั้ง ๆ ที่มีการปรับปรุงการรักษาให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น HNSCC มีความสัมพันธ์กับอัตราการตายที่เพิ่มสูงขึ้น อัตราการรอดตายใน 5 ปีประมาณ 50% ยังไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา cisplatin เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเป็นยาที่ให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคได้ดีพอจึงมีการรักษาโดยการให้ยาตัวอื่นร่วมด้วย เช่น methotrexate, vinblastine, doxorubicin, และ/หรือ gemcitabine (Matsuki et al., 2013)

### 4. มะเร็งเต้านม

มะเร็งเต้านมเป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการตายของผู้หญิงทั่วโลก การให้ยาเคมีบำบัดเป็นวิธีเดียวสำหรับการรักษาโรคมะเร็งเต้านม ซึ่งจะยืดอายุของผู้ป่วยได้นานขึ้น ยาเคมีบำบัดมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อต่อสู้กับมะเร็งเต้านม ยา cisplatin เป็นยาเคมีบำบัดที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการแพร่ขยายของเซลล์มะเร็งเต้านม แต่ก็มีผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยที่ได้รับยาด้วยเช่นกัน (Decatris et al., 2004)

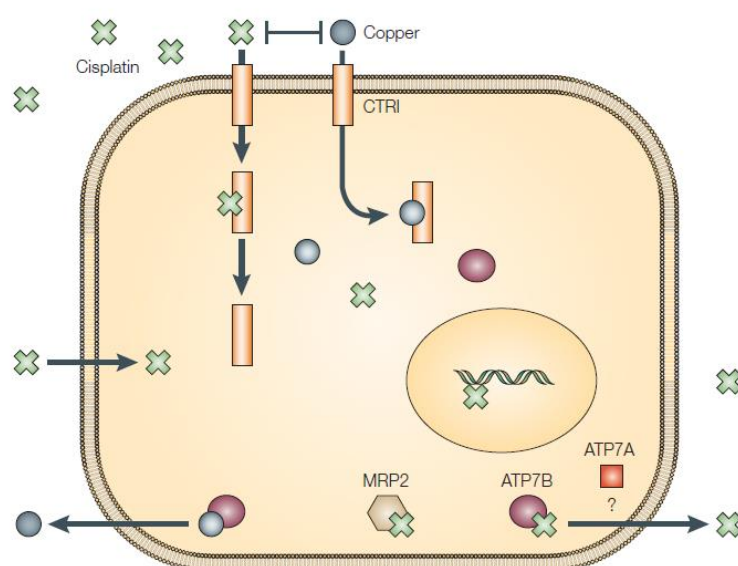
### 5. มะเร็งสมอง

glioblastomamultiforme (GBM) เป็นมะเร็งที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มมะเร็งในสมอง เป็นชนิดที่ร้ายแรงถึงขั้นเสียชีวิตได้ การรักษาในผู้ป่วยกลุ่มนี้คือการผ่าตัดและฉายรังสี ร่วมกับการให้ยาเทโมโซโลไมด์ (temozolomide) มีรายงานว่าการรักษาแบบผ่าตัดและฉายรังสี ร่วมกับการให้ยาจะช่วยยืดอายุให้ผู้ป่วยอยู่รอดได้ 5 ปี แต่โดยรวมแล้วสามารถช่วยให้ผู้ป่วยอยู่รอดได้เพียง 2.5 เดือนเท่านั้น การให้ยา cisplatin ก็มีการใช้ในเด็กที่เป็นเนื้องอกในสมอง เช่นเดียวกับการรักษามะเร็งชนิดอื่นด้วยเช่นกัน (Khan et al., 1982)

## 1.2 กลไกการออกฤทธิ์ระดับโมเลกุลของ cisplatin

กลไกการนำ cisplatin เข้าและออกจากเซลล์ยังไม่เป็นที่แน่ชัด ปัจจุบันกำลังมีการศึกษาอย่างต่อเนื่อง จากการศึกษาพบว่า cisplatin เข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการ passive diffusion และการ influx ผ่านทาง copper transporter 1 (Ctr1) มีการศึกษาทดลองโดยการ

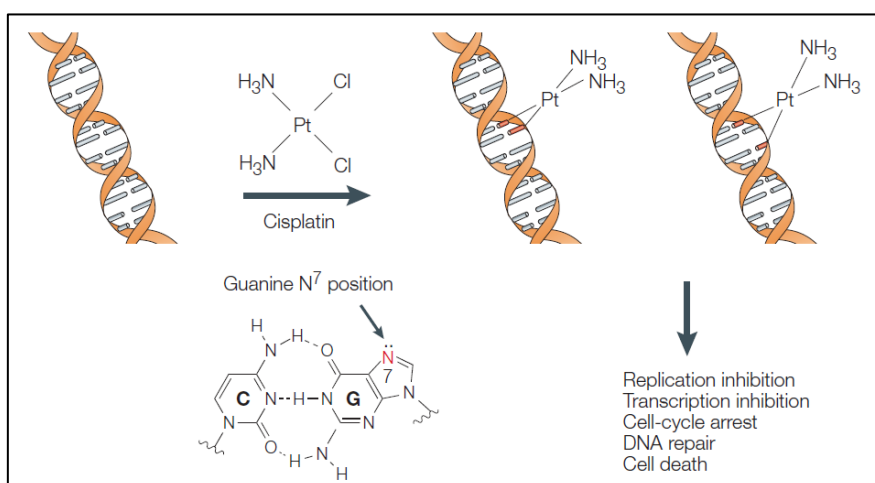
ทำลาย Ctr1 ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์และหนูไม่พบว่ามี cisplatin เข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง และทำให้เซลล์มีความต้านทานต่อยา cisplatin (Ishida et al., 2002) นอกจากนี้ยังมีการศึกษา โดยการหยุดการทำงานของยีน Ctr1 ในเซลล์พบว่าสามารถยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ cisplatin ได้ และเมื่อทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Ctr1 ก็พบว่ามีการสะสมของแพลทตินัมในเซลล์เป็นจำนวนมาก เซลล์มีความไวต่อ cisplatin มีการค้นพบโปรตีน TMEM205 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่รอบ ๆ เยื่อหุ้มเซลล์มีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของ cisplatin ในเซลล์ การวิเคราะห์การโปรตีน TMEM205 ในเนื้อเยื่อของมนุษย์พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ TMEM205 ที่มากขึ้นกับการต้านทานต่อ cisplatin การค้นพบนี้จะมีประโยชน์ต่อการศึกษากการป้องกันผลข้างเคียงจาก cisplatin ต่ออวัยวะต่าง ๆ ได้ในอนาคต นอกจากนี้ Ctr1 แล้ว cisplatin ยังสามารถเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง glucose transporter 1 (Glut1) โดยพบว่าการทำลาย Glut1 ส่งผลให้เซลล์มีความต้านทานต่อ cisplatin ได้ (Shen et al., 2012)



**รูปที่ 1.2** กลไกการเข้าออกที่ผนังเซลล์ของ cisplatin นอกจากจะผ่านเข้าสู่เซลล์โดยวิธี passive diffusion แล้ว cisplatin ยังสามารถเข้าสู่เซลล์โดยวิธี Active transport ทาง copper transporter 1 (Ctr1). Copper-transporting P-type adenosine triphosphate (ATP7B) มีบทบาทในการขับ cisplatin ออกจากเซลล์ ทั้ง Copper และ cisplatin มีส่วนทำให้ความสามารถในการแพร่ผ่านสารตัวอื่นได้ลดลง และยังทำให้เกิดความเสียหายต่อ Ctr1 ได้อีกด้วย (Wang & Lippard, 2005)

cisplatin จะถูกกระตุ้นเมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์ ใน cytoplasm chloride atom ของ cisplatin จะถูกแทนที่ด้วยโมเลกุลของน้ำ เข้าสู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีความเข้มข้นของ chloride ion 3 – 20 mM ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าภายนอกทำให้ไม่เกิด chloride shield แล้วนั้น cisplatin จึงเกิดปฏิกิริยา hydrolysis หรือ aquation คือการแทนที่ด้วยโมเลกุลของน้ำ ซึ่งทำให้ cisplatin อยู่ในรูป aqua form ซึ่งเป็น active form หลังจากนั้น aqua form จะเข้าไปทำ

ปฏิกิริยากับ DNA ซึ่ง platinum atom จะไปสร้างพันธะ co-ordinate covalent bond กับ N-7 ของ guanine และ adenosine ซึ่งทำให้เกิดความผิดปกติในการซ่อมแซมและการทำงานของ DNA ส่งผลให้เซลล์มะเร็งเกิด apoptosis (Fuentes *et al.*, 2003) การเกิดพันธะแบบ 1,2- intrastrand cross-links ของ purine กับ cisplatin เป็นเป็นรูปแบบที่พบบ่อยมากที่สุดที่ส่งผลกับ DNA รูปแบบของพันธะแบบ 1,2- intrastrand cross-links ได้แก่ 1,2- intrastrand d(GpG) adducts และ 1,2- intrastrand d (ApG) adducts พบมากถึง 90% และ 10% ตามลำดับ ขณะที่อีกรูปแบบคือ 1,3- intrastrand cross-links และ interstrand cross-links ก็มีรายงานว่าทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ได้เช่นกัน ด้วยเหตุนี้งานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์จากหลาย ๆ งานกล่าวตรงกันว่า DNA เป็นเป้าหมายของ cisplatin ที่ไปทำให้เกิดความเสียหาย โดยมีหลักฐานจากงานศึกษาทั้งเซลล์ prokaryote และ eukaryote ที่ไม่สามารถซ่อมแซม DNA ได้ (Fraval *et al.*, 1978)



**รูปที่ 1.3** การสร้างพันธะและผลของ cisplatin ต่อเซลล์ cisplatin เกิดปฏิกิริยาการแทนที่ด้วยน้ำ  $[Pt(NH_3)_2Cl(OH)_2]^+$  และ  $[Pt(NH_3)_2(OH_2)_2]^{2+}$  ในเซลล์ อะตอมของแพลตตินัมของ cisplatin สร้างพันธะ covalent กับ N<sup>7</sup> ของ purine เพื่อสร้างเป็น 1,2- หรือ 1,3- intrastrand crosslinks และ interstrand crosslinks (Wang & Lippard, 2005)

### 1.3 cisplatin กับการเกิดภาวะ oxidative stress

ในสภาวะปกติเซลล์จะรักษาระดับของอนุมูลอิสระด้วยการรักษาความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ (เช่น glutathione-GSH, superoxide dismutase-SOD, และ catalase-CAT) แต่ภายใต้สภาวะ oxidative stress ปริมาณอนุมูลอิสระที่มากเกินไปจะไปทำลายโปรตีน ไขมัน และ DNA นำไปสู่การเป็นมะเร็ง เซลล์มะเร็งมีอนุมูลอิสระมากกว่าเซลล์ปกติหลายเท่าตัว ส่วนหนึ่งมาจากการกระตุ้นจากยีนมะเร็งทำให้มีการเพิ่มระดับการเผาผลาญและเกิดความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย ภาวะ oxidative stress เป็นหนึ่งในกลไกที่

สำคัญของ cisplatin ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษ ไมโทคอนเดรียเป็นเป้าหมายหลักของ cisplatin ที่ทำให้เกิด oxidative stress เกิดการสูญเสียโปรตีนกลุ่ม sulfhydryl ส่งผลให้มีการยับยั้งการดูดซึมแคลเซียมและลดการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Saad et al., 2004)

การเกิด oxidative stress ทำให้สภาวะปกติในเซลล์มีความเสียหาย cisplatin เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระที่ไปทำลายให้เซลล์มะเร็งเกิดความเสียหาย เซลล์ตายได้ด้วยวิธีการที่หลากหลายขึ้นกับชนิดของเซลล์มะเร็ง การก่อตัวของอนุมูลอิสระขึ้นกับความเข้มข้นของตัวยา cisplatin และระยะเวลาที่ได้รับ ภาวะสมดุลของปฏิกิริยา redox ภายในเซลล์ถูกควบคุมโดยหมู่ thiol (-SH) ที่เป็นส่วนประกอบของโมเลกุล ในบางสภาวะหมู่ thiol เกิดปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็นอนุมูลอิสระที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ (Desoize, 2002)

อนุมูลอิสระจำนวนมากสามารถทำให้เซลล์ตายได้จากทั้งภายในและภายนอกเซลล์ การตายจากภายนอกเซลล์เกิดจากอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างโดย fas ligand ผ่านกระบวนการ phosphorylation ซึ่งจะไปจับกับโปรตีนและ caspase 8 ทำให้เซลล์ตาย (apoptosis) การตายจากภายในเซลล์เกิดจากอนุมูลอิสระที่ไปกระตุ้นให้มีการปล่อย cytochrome C โดยการกระตุ้น pore-stabilizing protein (Bcl-2 และ Bcl-xL) ซึ่งเป็นโปรตีนยับยั้งและทำลายเซลล์ ทั้งนี้อนุมูลอิสระในปริมาณสูงก็สามารถทำลายเซลล์มะเร็งได้ โดยการทำลายตัวเอง (autophagy) ซึ่งเป็นกระบวนการย่อยสลายตัวมันเองของ cytoplasmic content ใน lysosomes (Shrivastava et al., 2011)

#### 1.4 cisplatin modulation of calcium signaling

cisplatin ภายใต้อิทธิพลของความเข้มข้นของคลอไรด์ในเซลล์ต่ำจะถูก hydrolyze ทำให้มีการเปลี่ยนไปเป็นรูปแบบต่าง ๆ ได้แก่ monoqua [cis-(NH)PtCl(HO)] และ diaqua [cis-(NH)Pt(HO)]<sup>2+</sup> รูปแบบต่าง ๆ ที่เกิดจากการถูก hydrolyze นี้จะเกิดขึ้นมากกว่าพันครั้งเทียบกับ cisplatin ในสภาวะปกติ และทำงานผ่านการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียในการเกิด oxidative phosphorylation ผลจากการขับแคลเซียมออกจากไมโทคอนเดรียและเพิ่มระดับแคลเซียมในเซลล์ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลของแคลเซียมทำให้เซลล์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

mitochondrial glutathione (GSH) มีความสำคัญในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารในชั้นในของไมโทคอนเดรียและการทำงานของ enzyme โดยการรักษา SH ให้เป็นตัวให้อิเล็กตรอนในปฏิกิริยารีดอกซ์ เมื่อหมู่ SH- ของ enzyme ไม่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนก็จะอยู่ในสถานะที่ไม่ถูกกระตุ้น (inactivated) cisplatin ทำให้เกิดภาวะความเป็นพิษโดยเฉพาะต่อไต โดยการลดปริมาณของ GSH และโปรตีนที่ต่อพันธะกับหมู่ SH nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) เป็นตัวช่วยในการรักษาหมู่ SH ช่วยลดความเป็นพิษจากการได้รับ cisplatin ดังนั้นการขาด GSH และ NADPH เป็นการขาด enzyme dehydrogenase ทำให้เกิด uncoupling of oxidative phosphorylation ส่งผลให้เกิด oxidative stress ขึ้น ปฏิกิริยา



ออกซิเดชันของอนุมูลอิสระอันมีความไวต่อชีวโมเลกุลซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน น้ำตาล และกรดนิวคลีอิก ทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Aggarwal, 1998)

กล่าวโดยสรุปคือ cisplatin ทำให้เกิดการเสียสมดุลของแคลเซียมซึ่งเป็นตัวเริ่มต้นในกระบวนการที่สำคัญในเซลล์เช่น lipid peroxidation และการยับยั้งการทำงานของ enzyme กระบวนการเหล่านี้เสียหายจากการที่ไมโทคอนเดรียเสียหาย มีการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย การขาด adenosine triphosphate (ATP) และ cofactor อื่น ๆ ส่งผลสุดท้ายทำให้เซลล์ตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis ดังนั้นหากมีการเพิ่มระดับของแคลเซียมผ่านการให้อาหารเสริมอาจช่วยลดความเป็นพิษจาก cisplatin ได้

### 1.5 cisplatin เหนี่ยวนำไปให้เกิด cell apoptosis

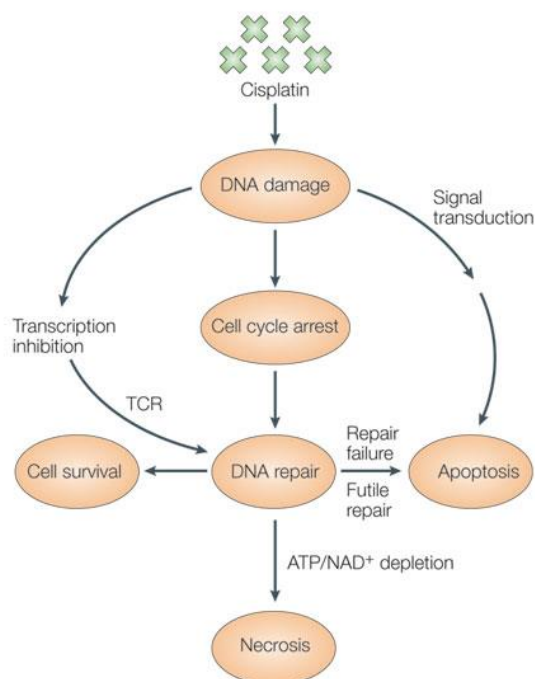
apoptosis เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์แบบที่มีการกำหนดไว้ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับชุดของปฏิกิริยาทางชีวเคมีซึ่งทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ หรือกล่าวอย่างจำเพาะคือเป็นชุดของปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์มีสัญญาณวิทยาเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การบวมของเซลล์ (blebbing), การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นการเหี่ยวของเซลล์, นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน, โครมาตินหนาตัวขึ้น และมีการกระตุ้น caspases การกระตุ้น caspase เป็นกระบวนการที่สำคัญที่เป็นการเริ่มต้นให้เกิด apoptosis เช่นทำให้ตัวรับที่เยื่อหุ้มพลาสมาเสียหาย (caspase 8), มีความผิดปกติที่ไมโทคอนเดรีย (caspase 9) caspases สามารถเป็นได้ทั้งตัวเริ่มต้นหรือตัวทำให้เกิด apoptosis ตัวอย่างของ caspases ที่เป็นตัวเริ่มต้นให้เกิด apoptosis ได้แก่ caspases 8 และ caspases 9 ส่วน caspase ที่เป็นตัวทำให้เกิด apoptosis ได้แก่ caspases 3 และ caspases 7 ที่ส่งผลให้ DNA เสียหายได้ (Salvesen & Abrams, 2004)

cisplatin ทำให้เซลล์ตายโดยกระตุ้นให้เกิด apoptosis การที่เซลล์บางชนิดรอดจากกระบวนการ apoptosis อาจเกิดจากการดื้อต่อยา cisplatin กระบวนการทำให้เกิด apoptosis มีสองทางได้แก่

1. extrinsic pathway เกิดขึ้นเมื่อ ligand จับกับตัวรับของ tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) เกิดกระบวนการโอลิโกเมอไรเซชัน ทำให้เกิด procaspase 8 ผ่านโมเลกุลที่เป็นตัวแปลงไปเป็น death-inducing signaling complex (DISC)

2. intrinsic pathway เกิดจากภาวะเครียดของเซลล์ เช่น DNA เสียหายจะปล่อย cytochrome-c จากไมโทคอนเดรียทำให้ไปกระตุ้น procaspase 9 ผ่านการจับกับ interaction with apoptosis promoting activating factor-1 (APAF-1) และสร้างเป็น apoptosome complex

Bcl-2 ควบคุมการเกิด apoptosis โดยการควบคุมการปล่อย cytochrome-c ที่ตอบสนองต่อ DNA เสียหาย cisplatin ทำให้เกิดความเป็นพิษถึงระดับยีนที่ไปกระตุ้นวิถีใน กระบวนต่าง ๆ ซึ่งส่งผลให้เกิดได้ทั้ง apoptosis และ การดื้อต่อยาเคมีบำบัด



**รูปที่ 1.4** กลไกการเกิด apoptosis และ necrosis ของเซลล์ จาก cisplatin ความเสียหายของ DNA ทำให้หยุดตัวจักรของเซลล์ยับยั้งการ transcription และเริ่มต้นการเกิด apoptosis ของเซลล์ ความเสียหายของ DNA ที่มากเกินไปทำให้เกิดเพิ่มการกระตุ้นของ poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) PARP ตัด NAD<sup>+</sup> และเปลี่ยน ADN-ribose moieties (ADPR) ไปเป็นกลุ่ม carboxyl ของ nuclear protein จึงทำให้เกิดการสูญเสีย NAD<sup>+</sup>/ATP ส่งผลให้เซลล์ necrosis (TCR, transcription-coupled repair) (wang & Linpard, 2005)

### 1.6 cisplatin และ protein kinase C

protein kinase C (PKC) เป็นตัวที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดกับ phospholipid ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการต่าง ๆ ของเซลล์และการควบคุมเซลล์ ปัจจุบันมีงานศึกษาที่ขัดแย้งกันเกี่ยวกับ PKC และการตอบสนองต่อ cisplatin ผลของ PKC ต่อ cisplatin จะตอบสนองในรูปแบบใดขึ้นอยู่กับรูปแบบไอโซไซม์ของ PKC ตามบริบทของเซลล์

### 1.7 cisplatin และ mitogen-activated protein kinase (MAPK)

mitogen-activated protein kinase (MAPK) เป็นกลุ่มของ enzyme ที่ทำหน้าที่ตัวกลางในการรับสัญญาณจากภายนอกที่มีบทบาทสำคัญในทางชีววิทยาหลากหลายอย่าง เช่น ควบคุมการแบ่งตัว การ differentiate การอยู่รอดของเซลล์การปรับกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

และการเคลื่อนที่ของเซลล์ enzyme กลุ่มนี้ทำงานโดยไปปรับความสามารถในการทำงานของ โปรตีนเป้าหมายที่จำเพาะภายในเซลล์ โดยการเติมหมู่ phosphate เข้าไปยัง protein เป้าหมาย ที่ ตำแหน่งกรดอะมิโน serine หรือ threonine ที่จำเพาะ MAPK จึงจัดเป็นกลุ่ม enzyme ที่ เรียกว่า serine/threonine kinase cisplatin กระตุ้นการทำงานของ extracellular-signal-regulated kinase (ERK) p53 ตอบสนองต่อการเสียหายของ DNA เพราะ ERK เติมหมู่ ฟอสเฟตให้กับ p53 ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ p21 ไปยับยั้งการเจริญของเซลล์และทำให้ DNA เสียหาย ดังนั้นการกระตุ้น ERK ทำให้วัฏจักรของเซลล์หยุดลงและเหนี่ยวนำให้เกิดการ เสียหายของ DNA ผ่าน p53

### 1.8 cisplatin และ jun amino-terminal kinase (JNK)

c-Jun N-terminal kinase หรือ stress activated protein kinase เป็นโปรตีนที่ ตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะกดดันต่าง ๆ ถูกกระตุ้นได้จากตัวกระตุ้นหลายตัว เช่น DNA ที่ เสียหาย cisplatin ที่อยู่ในรูป cis และ trans สามารถกระตุ้น JNK pathway ได้ เมื่อ p73 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น apoptosis ของ p53 จับกับ JNK ทำให้ cisplatin เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis

### 1.9 cisplatin และ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK)

ภาวะกดดันจากสิ่งแวดล้อม (environmental stress) เป็นตัวการที่สำคัญที่ทำให้ ให้ cisplatin เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ด้วยการกระตุ้นโปรตีนในกลุ่ม p38 MAPK มีการศึกษาพบว่า EGFR เป็นสารตั้งต้นสำหรับ p38 MAPK และ cisplatin เคลื่อนเข้าไปในเซลล์ ได้รับการกระตุ้นจากการเติมหมู่ฟอสเฟตของ p38 ให้กับ receptor p38 MAPK ร่วมกับ p53 กระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของยีนที่ทำให้เกิด apoptosis ได้แก่ PUMA และ NOXA จึงส่งผลให้ เซลล์เกิด apoptosis ดังนั้น p38 MAPK จึงมีบทบาทสำคัญในการควบคุมให้ cisplatin เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์

### 1.10 cisplatin และ AKT

AKT เป็นโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มของ serine / threonine kinase เกิดจากการถูก กระตุ้นจาก growth factors ต่าง ๆ เช่น PDGF กระตุ้นการเกิด phosphorylation ของ phosphoinositide 3-kinase (PI3K) ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ปล่อยโปรตีน AKT จากเยื่อหุ้มเซลล์ โปรตีน AKT นี้ จะทำให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของสารสื่อประสาทต่าง ๆ เช่น BAD FKHR, caspase 9 เป็นต้น AKT มีความสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ภายในเซลล์ได้แก่ การ แบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ การอยู่รอดของเซลล์ มีรายงานการศึกษาพบว่า cisplatin เหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ทำให้เกิด phosphorylation ของ BAD ที่ ser136 ผ่าน AKT การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า cisplatin เหนี่ยวนำให้ DNA เกิดความเสียหายกระตุ้นให้เกิด

phosphorylation ของ BAD ทั้ง ser-112 ผ่าน ERK cascade และ ser-136 ผ่าน PI-3 K-PKB/Akt cascade การศึกษาในเซลล์มะเร็งรังไข่โดยการยับยั้ง cascade ทั้งสองนี้พบว่าทำให้ยา cisplatin มีประสิทธิภาพมากขึ้น

### 1.11 cisplatin ทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA

การกลายพันธุ์ (mutation) เกิดจากหลายสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับความเครียด DNA ที่ได้รับความเสียหายจะมีการกระตุ้นการตรวจสอบวงจรเซลล์ ดังนั้นจึงมีการชะลอความก้าวหน้าของวงจรเซลล์เพื่อการซ่อมแซม หรือเพื่อขจัดเซลล์อย่างถาวรโดยการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ การตอบสนองของเซลล์ต่อ cisplatin เหล่านี้ย่นย่อให้เกิดการเสียหายของ DNA จะตัดสินว่าเซลล์จะมีชีวิตอยู่หรือตาย

### 1.12 p53 และความเสียหายของ DNA เป็นการตอบสนองต่อ cisplatin

p53 เป็นโปรตีนที่มีชีวิตช่วงเวลาสั้นๆ เป็น transcription factor ที่ควบคุมวัฏจักรเซลล์ ซึ่งถูกกระตุ้นโดย ataxia telangiectasia mutated (ATM) ในสัญญาณของ DNA ที่เสียหาย ในภาวะปกติ p53 จะจับอยู่กับ binding protein เช่น MDM2 ซึ่งจะส่งเสริมการทำลาย p53 ผ่านกระบวนการ ubiquitin/proteasome cell เมื่อได้รับ stress p53 ก็จะถูกกระตุ้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้ง cell cycle และการซ่อมแซม DNA หรือ เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์

### 1.13 ผลข้างเคียงจากยา cisplatin

#### 1.13.1 ผลข้างเคียงจากยา cisplatin ต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด

มีรายงานว่ามีการเกิดอุบัติการณ์สูงของโรคหัวใจและหลอดเลือดในผู้ป่วยที่ได้รับการบำบัดด้วยยา cisplatin มีทั้งในแบบเฉียบพลันหรือระยะยาว cisplatin ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ (Grenader et al., 2006) ในผู้ป่วยบางรายที่ได้รับยา cisplatin พบว่าเกิดการฉีกขาดขึ้นในผนังหลอดเลือดแดง (Ghosh et al., 2008) การติดตามผลในระยะยาวในกลุ่มผู้ป่วยมะเร็งอัมตะที่ได้รับยา cisplatin เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นปกติพบว่า ผู้ป่วยที่ได้รับ cisplatin มีการเพิ่มขึ้นความชุกของโรคความดันโลหิตสูง (Sagstuen et al., 2005)

#### 1.13.2 ผลข้างเคียงจากยา cisplatin ต่อระบบอื่น ๆ

##### 1. hepatotoxicity

การได้รับยา cisplatin ในปริมาณสูงจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อตับได้ (dos Santos et al., 2007)ภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดความเป็นพิษที่ตับเนื่องจากการไปลด glutathione GSH (Yilmaz et al., 2004) ประกอบกับมีหลายงานศึกษาพบว่าระดับ MDA ของตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญและมีการลดลงของสาร

ต้านอนุมูลอิสระในหนูที่ได้รับยา cisplatin (Yilmaz et al., 2005) ตัวชี้วัดที่มีความสำคัญโดยตรงที่เกี่ยวข้องในการก่อให้เกิดความเสียหายและความเป็นพิษต่อเซลล์คือ transaminase เพราะเป็นไซโทพลาซึมที่ถูกปล่อยตัวเข้าสู่ระบบไหลเวียนหลังจากเซลล์ได้รับความเสียหาย การเพิ่มขึ้นของระดับ enzyme ของตับเซรัมและบิลิรูบินเป็นตัวชี้วัดว่าตับได้รับความเสียหาย (İşeri et al, 2007) ความเป็นพิษของ cisplatin ต่อตับมีการแสดงออกของ enzyme cytochrome P450-2E1 ที่เพิ่มขึ้น การศึกษาสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าความเสื่อมของเซลล์ตับร่วมกับมีการอักเสบของเซลล์ร่วมด้วย (Kart et al., 2010) ปัจจุบันได้มีการศึกษาถึงวิธีการป้องกันความเป็นพิษต่อตับจาก cisplatin โดยใช้ตัวยาต่าง ๆ เช่น selenium และ วิตามินอี

## 2. nephrotoxicity

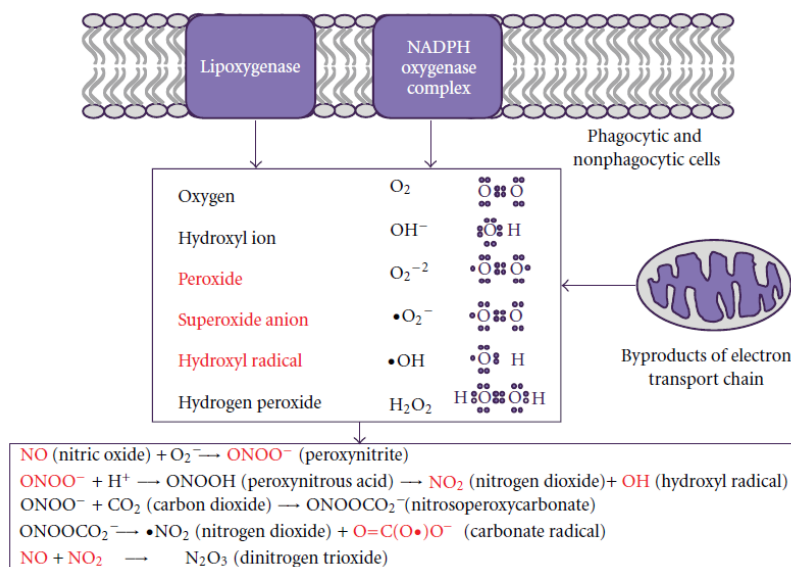
ไตเป็นอวัยวะที่มีการสะสมของ cisplatin มากที่สุดและเป็นเส้นทางหลักสำหรับการขับออก ความเข้มข้นของ cisplatin ที่สะสมในเยื่อบุผิวในหน่วยกรองไตส่วนต้นมีมากกว่าในเซรัมถึง 5 เท่า (Kuhlmann et al., 1997) การสะสมของ cisplatin ในปริมาณสูงนี้ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อไต การสังเคราะห์จากกรดอะมิโน lysine และ methionine ทำให้เกิดสารประกอบแอมโมเนียมที่เรียกว่า carnitine ซึ่งจำเป็นสำหรับการขนส่งกรดไขมันจาก cytosol เข้าไปในไมโทคอนเดรียเพื่อสลายไขมันสร้างพลังงาน การเสียหายของไตส่งผลให้เกิดการยับยั้งการการสังเคราะห์ carnitine และการดูดซึม carnitine ที่กรองไตส่วนต้นเนื่องจากการผลิต Carnitine ลดลง การศึกษาในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาพบว่า cisplatin สามารถเข้าไปในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มได้โดยสองช่องทางคือ copper transporter-1 (Ctr1) และ organic cation transporter-2 (OCT2) ซึ่ง OCT2 พบมากในหน่วยกรองไตส่วนต้น (Ishida et al., 2002) cisplatin ถูกกำจัดที่ไตโดยการกรองสารที่โกลเมอรูลัสและการขับออกที่ท่อไต (Yao et al., 2007)

## 3. ototoxicity

ความเสียหายที่พบมากที่สุดของ cisplatin ที่ทำให้เกิดความพิษต่อหูพบในคอเคลีย (cochlea) ประกอบไปด้วยการสูญเสียของเซลล์ขนด้านนอก การศึกษาพบว่า cisplatin มีผลต่อ stria vascularis ทำให้มีความบกพร่องในการดูดซึมและการหลั่ง  $K^+$  เข้าสู่ของเหลวเรียกว่า endolymph และการเสียหายของสมดุลมแทบอลิซึมของเซลล์ขนทั้งที่อยู่ด้านนอกและด้านในส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและการทำงานบกพร่อง (Casares et al., 2012)

### 1.14 reactive oxygen species (ROS) และ cisplatin

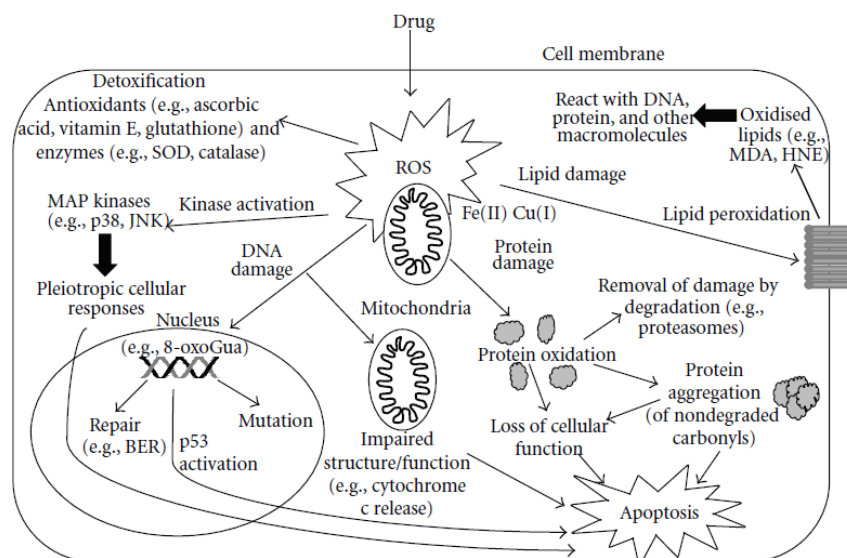
ปฏิกิริยาทางเคมีที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบหรือเรียกว่า reactive oxygen species (ROS) การเกิดปฏิกิริยาเกิดขึ้นเมื่อมีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรของโมเลกุลทำให้ไม่เสถียร ทำให้อนุมูลอิสระเป็นสารที่มีความไวในการเข้าทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารอื่นสูงมาก โดยอนุมูลอิสระจะไปแย่งจับหรือดึงเอาอิเล็กตรอนจากโมเลกุลหรืออะตอมสารที่อยู่ข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียรเช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ตัวอย่างของ ROS ดังแสดงในรูปที่ 1.4 ROS สามารถเกิดขึ้นได้จากหลายแหล่งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ หนึ่งในแหล่งที่มาหลักของ ROS ภายในเซลล์จากไมโทคอนเดรียที่ซูปเปอร์ออกไซด์  $\cdot O_2^-$  ถูกสร้างขึ้นเป็นผลผลิตได้จากกระบวนการ oxidative phosphorylation ปกติ  $\cdot O_2^-$  นอกจากจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ROS แล้ว  $\cdot O_2^-$  มีความสามารถไวต่อการเกิดปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ (NO) กลายเป็นอนุมูลอิสระที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) เช่น peroxyntirite และไนโตรเจนสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้แก่ NO, peroxyntirite และ nitrogen dioxide ผ่านกิจกรรมของ enzyme เช่น nitric oxide synthase 2 (NOS2) and NADPH oxidase (NOX)



รูปที่ 1.5 รูปแบบหลักและแหล่งที่มาของ reactive oxygen species (ROS): อนุมูลอิสระกลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบมักเกิดขึ้นเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย และยังสามารถเกิดจากกิจกรรมของ NADPH และ lipoxigenase เมื่อปล่อยออกมาแล้ว ROS สามารถทำปฏิกิริยาได้กับ NO ที่นำไปสู่การสร้าง reactive nitrogen species (RNS) โมเลกุลของอิเล็กตรอนอิสระจะแสดงเป็นสีแดง (Damian et al., 2012)

ROS มีบทบาทในการส่งสัญญาณและการสร้างสมดุลของเซลล์ (Devasagayam et al., 2004) ตัวอย่างในระบบหลอดเลือด  $O_2^-$  มีบทบาทในการจำกัดระยะเวลาของการตอบสนองต่อ NO, เป็นตัวกลางสำคัญในการทำงานของหลอดเลือด เช่นการควบคุมกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดและความดันโลหิต การกระตุ้นเกล็ดเลือด และการส่งสัญญาณของเซลล์หลอดเลือด (Guzik et al., 2002) อย่างไรก็ตามนอกเหนือจากบทบาททางสรีรวิทยาตามปกติแล้วการผลิต ROS ที่มากเกินไปอาจเกิดขึ้นได้เพื่อตอบสนองต่อความเครียด เช่นความเป็นพิษ ความเสียหายจากรังสีและโรคต่าง ๆ ส่งผลให้ความเครียดออกซิเดชันเฉพาะที่และตอบสนองต่อการปรับตัว

เซลล์มีกลไกการป้องกันที่หลากหลายซึ่งขัดขวางอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันหรือจำกัดความเสียหายภายในเซลล์และช่วยลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของ ROS เช่นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (วิตามินซี, วิตามินอี, กลูตาไธโอน) และ enzyme ต้านอนุมูลอิสระ (thioredoxins, superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione peroxidase) ผลจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้ระดับของ ROS ต่ำ อย่างไรก็ตามหากระดับของ ROS เพิ่มขึ้น ระบบป้องกันไม่สามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ ถ้าเกิดความไม่สมดุลของ ROS และสารต้านอนุมูลอิสระแล้วจะทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ ความเสียหายนี้อาจเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ เช่น DNA โปรตีนและไขมัน และอาจปรับเปลี่ยนสัญญาณทำให้ขาดสัญญาณที่ช่วยดำรงชีพ (survival signaling)



รูปที่ 1.6 ผลกระทบหลักที่เกิดจากยาที่ทำให้เกิด oxidative stress ในเซลล์ การเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์อาจทำให้เกิดความเสียหายของ DNA ออกซิเดชันของไขมันและโปรตีน การส่งสัญญาณของ MAP kinase เป็นตัวกลางที่สำคัญในการตอบสนองของเซลล์ (Damian et al., 2012)

มีหลักฐานที่ชัดเจนว่า oxidative stress ที่เกิดจากยา cisplatin เป็นกลไกของความเป็นพิษในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 1.5 ROS มีผลต่อเซลล์เป้าหมายสำคัญ ได้แก่ DNA, ไขมัน และโปรตีนโมเลกุลเล็ก ๆ ROS อาจทำลายส่วนประกอบของเซลล์ที่สำคัญเหล่านี้ในระดับโมเลกุลที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์โดยผ่าน enzyme kinase ปัจจัยเหล่านี้อาจมีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นการตายของเซลล์ซึ่งเป็นการตอบสนองภาวะ oxidative stress

### 1.15 NADPH oxidases

NADPH oxidases เป็นแหล่งสำคัญของ ROS ในระบบหลอดเลือด การสร้าง superoxide จากโมเลกุลของ oxygen ใช้ NADPH เป็นตัวให้ electron โดย oxidase เป็น enzyme ที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยหลายตัวมารวมกันจาก membrane จับกับ Nox ตัวอย่างของ NADPH oxidase subunits ในผนังหลอดเลือดพบว่ามี Nox1 (Lassègue et al., 2001) และ Nox4 (Ellmark et al., 2005) ซึ่งพบในชั้นกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ขณะที่ Nox2 (Görlach et al., 2000) พบมากในชั้น endothelium การเกิด atherosclerosis ในคนเกี่ยวข้องกับ การเพิ่มขึ้นของ NADPH oxidase subunits ได้แก่ Nox2, p22phox, p47phox และ p67phox ในหลอดเลือดแดง coronary artery (Guzik et al., 2006)

การศึกษาพบว่ามี การแสดงออกของ Nox2 ใน endothelium ของหลอดเลือดแดงของ apolipoprotein E-knockout (ApoE-KO) mice ก่อนการปรากฏตัวของรอยโรค atherosclerosis ในหนู mice ขณะที่ macrophages เป็นแหล่งสำคัญของ Nox2 ในการทำให้เกิด plaques (Judkins et al., 2010)

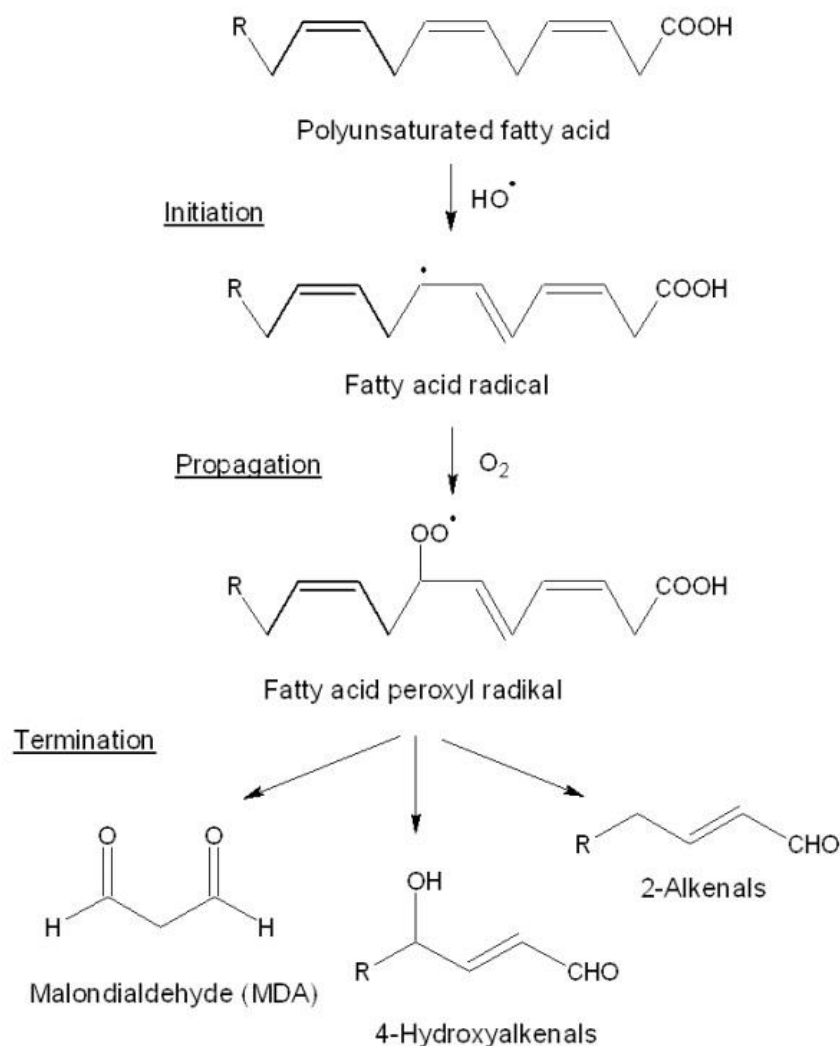
### 1.16 lipid peroxidation

oxidative stress สามารถก่อให้เกิดความเสียหายที่รุนแรงต่อเยื่อหุ้มเซลล์ที่ซึ่งส่งผลให้เกิด lipid peroxidation ซึ่งจะแปลงไขมันไม่อิ่มตัวให้เป็น lipid hydroperoxides ที่มีชีวิต lipid peroxidation เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันแบบลูกโซ่ของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว อนุมูลอิสระเพียง 1 อนุมูลสามารถทำให้เกิดลิปิดเปอร์ออกไซด์ เป็นจำนวนหลายร้อยโมเลกุลก่อนที่จะสิ้นสุดปฏิกิริยา เนื่องจากปฏิกิริยา lipid peroxidation สามารถเกิดได้ง่ายกับเยื่อหุ้มเซลล์ที่ประกอบด้วยลิปิด 2 ชั้น การเกิด lipid peroxidation กับไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีคุณสมบัติที่เปลี่ยนไป ส่งผลกระทบต่อ enzyme และ receptor ต่าง ๆ ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เพิ่มปริมาณของเหลวในเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้ของเหลวในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์ (Avery, 2011) เป็นสาเหตุในเกิดโรคต่าง ๆ ได้อีกด้วย ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก lipid peroxidation ได้แก่ สารไฮโดรคาร์บอน เช่น ethane, ethene และ penthane รวมถึง สาร ketone และสาร aldehyde เป็นต้น ซึ่งสาร aldehyde ที่มีความสำคัญ คือ malondialdehyde (MDA) MDA ทำ



ปฏิกิริยากับฐานกรดนิวคลีอิกเพื่อสร้าง dG, dA และ dC adducts และทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (Niedernhofer et al., 2003) มีการศึกษาหลายชิ้นที่ระบุว่าค่าการวัดค่า MDA จากเซรัมสามารถใช้พยากรณ์ความรุนแรงของโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ (Stocker & Keaney, 2004)

lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดโซ่ (initiation) ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น (propagation) และการสิ้นสุดปฏิกิริยา (termination) ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิปิดและทำให้เกิดอนุมูลลิปิดดังภาพ 1.6 ที่แสดงถึงกลไกการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation



รูปที่ 1.7 กลไกการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation (Laguerre et al., 2007)

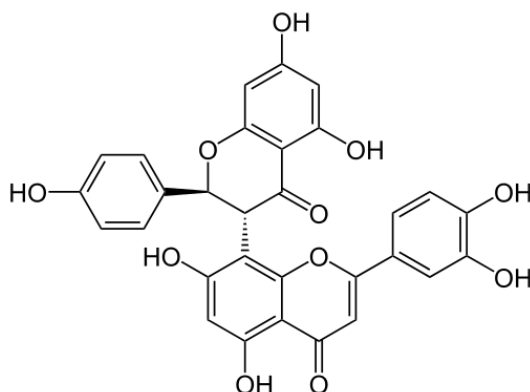
## 2. มะพุด



รูปที่ 1.8 ลักษณะผลสุกและผลดิบของมะพุด (นิจศิริ 2547)

ชื่อสามัญ Garcinia ชื่อวิทยาศาสตร์ *Garcinia dulcis* Kurz จัดอยู่ในวงศ์มังคุด (Guttiferae) ต้นมะพุดเป็นพันธุ์ไม้ที่มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ต้นมะพุดเป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง มีความสูงประมาณ 7-15 เมตร ลำต้นตั้งตรง เปลือกลำต้นเป็นสีน้ำตาลเข้มเรียบ และแตกเป็นร่องตื้น ๆ ตามยาวของลำต้น โดยจะพบมากทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ และภาคใต้ของประเทศ และยังพบในประเทศอินโดนีเซีย มาเลเซีย และฟิลิปปินส์ เรียกว่า mundu ลักษณะใบของต้นมะพุดเป็นใบเดี่ยว ลักษณะของใบเป็นรูปใบหอกหรือแกมรูปขอบขนาน โคนใบกว้างมนตัดตรง เว้าเล็กน้อยคล้ายกับรูปหัวใจและค่อย ๆ สอบเรียวยเล็กไปที่ปลายใบ ส่วนขอบใบเรียบ ใบมีขนาดกว้างประมาณ 8-12 เซนติเมตรและยาวประมาณ 15-25 เซนติเมตร แผ่นใบมักเป็นคลื่นเล็กน้อย เนื้อใบเหนียวและหนา หลังใบเรียบสีเขียวเข้ม ส่วนท้องใบมีขนละเอียด เมื่อแห้งเป็นสีเหลืองอมสีเทา ส่วนก้านใบสั้นย่นขรุขระยาวประมาณ 1.5-2 เซนติเมตร และมีขนบาง ๆ ขึ้นปกคลุม ดอกมะพุดเป็นสีขาวอมเหลือง ดอกเป็นแบบแยกเพศอยู่ในต้นเดียวกัน ดอกมีกลีบดอก 5 กลีบซ้อนกันอยู่ ดอกมีลักษณะตูมเป็นรูปทรงกลม ส่วนกลีบดอกมีลักษณะเป็นรูปทรงกลม หนาและเป็นสีเหลืองอ่อน ผลมะพุดมีลักษณะเป็นรูปทรงกลมหรือเป็นรูปไข่ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-6 เซนติเมตร ผิวผลเรียบและเป็นมัน ผลอ่อนสีเขียว เมื่อสุกเต็มที่จะเป็นสีเหลืองอมสีส้ม เนื้อในผลเป็นสีเหลือง มีรสเปรี้ยวอมหวาน มะพุดเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณทางยาซึ่งชาวบ้านนิยมนำมาใช้เพื่อรักษาช่วยแก้อาการไอ อาการเจ็บคอ ช่วยขับเสมหะ แก้อาการร้อนใน ผลมีฤทธิ์เป็นยาระบายอ่อน ๆ (นิจศิริ, 2547) สารสกัดจากมะพุดประกอบด้วย camboginal, dulciflavan, epicatechin, lupalbigenin, mangostin และ morelloflavone

### 3. morelloflavone



รูปที่ 1.9 โครงสร้างของ morelloflavone ประกอบด้วย apigenin และ luteolin (Deachathai et al., 2005)

morelloflavone เป็นสารสกัดจากมะพูด พบได้ทั้งในใบ ผล ดอก เป็นสารในกลุ่ม biflavonoid ประกอบด้วย apigenin และ luteolin มีน้ำหนักโมเลกุล 556 เป็นสารในกลุ่ม flavonoid morelloflavone มีฤทธิ์ต้านการหลั่ง phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) ในทดลองแบบ *in vitro* ซึ่งสามารถยับยั้งการหลั่ง PLA<sub>2</sub> ในน้ำไขข้อของมนุษย์และในพิษของผึ้ง และยังมีการต้านการอักเสบในหนู mice ที่ถูกเหนี่ยวนำทำให้หูกอักเสบจาก 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA) ให้สามารถยับยั้งการหลั่ง PLA<sub>2</sub> โดยสามารถลดอาการบวมและลดระดับ myeloperoxidase ใน ear homogenates (Gil et al., 1997) นอกจากนี้ morelloflavone สามารถยับยั้งความเป็นพิษ การบวมและการต้านการแข็งตัวของเลือดที่เกิดจาก PLA<sub>2</sub> จากพิษงู (Pereañez et al., 2014)

morelloflavone มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ HIV ชนิด HIV-1 reverse transcriptase (HIV-1 RT) และ HIV-1 (strain LAV-1) ในเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ (Lin et al., 1997)

การศึกษาของ Deachathai และคณะ (2005) พบว่า morelloflavone มีความสามารถดักจับอนุมูลอิสระและมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ที่ความเข้มข้นของ morelloflavone 10  $\mu$ M สามารถกำจัดอนุมูลอิสระ DPPH radical ได้ 51% สอดคล้องกับค่า IC<sub>50</sub> ที่ 13.00  $\mu$ M

morelloflavone มีความสามารถในการลดระดับไขมันในเลือดและป้องกันการเกิด atherosclerotic การยับยั้งการออกซิเดชันของ LDL ในหลอดเลือดแดงในกระต่ายที่ถูกชักนำให้มีไขมันในกระแสเลือดสูง นอกจากนี้ป้องกันการเกิด lipid peroxidation ส่งผลให้ปริมาณ MDA ในพลาสมาลดลง (Decha-Dier et al., 2008)

morelloflavone สามารถยับยั้ง migration ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยการลด activation ของ migration-related molecule ซึ่งที่ความเข้มข้น 0.1-10  $\mu\text{M}$  ช่วยยับยั้งการเกิด phosphorylation ของ ERK ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญและการเคลื่อนของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า morelloflavone ลดการเกิด phosphorylation ของ FAK, c-Src และ ERK และกิจกรรมของ RhoA ได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ในงานศึกษาเดียวกันพบว่า morelloflavone ยับยั้งการขยายตัวของ neointimal ที่เกิดจากการบาดเจ็บของหลอดเลือดแดงในหนู mice ได้อีกด้วย โดย neointimal proliferation เกิดจากการที่หลอดเลือดมีการบาดเจ็บแล้วมีการกระตุ้น vascular smooth muscle cell (VSMC) ให้เพิ่มจำนวนและเคลื่อนย้าย cell เข้าสู่ผนังหลอดเลือดชั้น intimal ส่งผลให้เพิ่มความหนาของผนังหลอดเลือดชั้นดังกล่าวมากขึ้นจนเกิดเป็นโรคหลอดเลือดแดงอุดตัน (atherosclerosis) (Pinkaw et al., 2009)

morelloflavone สามารถยับยั้งการทำงานของ HMG-CoA reductase ที่เตรียมโดยถ่ายฝากยีน plasmid pET 17b-CD-HMG ใน *E.coli* ซึ่งเป็น enzyme ที่ควบคุมการสังเคราะห์คอเลสเตอรอลในร่างกาย โดยวัดความสามารถเร่งปฏิกิริยาในอัตราสูงสุด ( $V_{\max}$ ) และค่าคงที่ของ Michaelis ( $K_m$ ) โดยพบว่าสามารถยับยั้งกิจกรรมของ enzyme ได้ดี ซึ่งการยับยั้งนี้เกิดจากหน่วยย่อยของ morelloflavone แต่ละตัวที่ตำแหน่งวงแหวนฟีนอลิกเดี่ยว (ring B) เข้าแย่งจับกับ enzyme (Tuansulong et al., 2011)

การศึกษาผลของ morelloflavone ต่อการคลายตัวของหลอดเลือดในหนูแรทที่ถูกตัดแยกจากตัวพบว่า morelloflavone มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยอาศัยกลไกกระตุ้นผ่าน endothelium ซึ่งกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์เป็นหลัก และกระตุ้นผ่านทาง  $K_{Ca}$  และ  $K_{ATP}$  channel (Lamai et al., 2013)

ในการศึกษาครั้งนี้จะให้ morelloflavone เข้าทางช่องท้อง และเนื่องจากยังไม่มี การทดลองมาก่อนว่า morelloflavone สามารถถูกดูดซึมเข้ากระแสเลือดได้มากน้อยเพียงใด จึงใช้ขนาดของ morelloflavone 0.1, 1 และ 10 เท่า ของความเข้มข้นที่ได้จากการศึกษาใน organ bath ของ Lamai et al., (2013) โดยคำนวณว่าการกระจายของยาจะอยู่ในส่วน extracellular fluid ซึ่งมีค่า 20% ของน้ำหนักตัว ดังนั้นขนาดที่ใช้ฉีดทางช่องท้องจะเท่ากับ 0.1, 1 และ 10 mg/kg BW

#### 4. กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (vascular smooth muscle)

เลือดไหลเวียนในร่างกายผ่านทางหลอดเลือด หลอดเลือดแดงเป็นหลอดเลือดที่นำเลือดออกจากหัวใจไปสู่ส่วนต่างของร่างกาย หลอดเลือดแดงที่เล็กที่สุดเรียกว่า arteriole ซึ่ง

ต่อกับเส้นเลือดฝอยเล็ก ๆ ซึ่งมีการแลกเปลี่ยนสารอาหารและของเสีย จากนั้นมีการรวมกับ หลอดเลือดอื่นที่ออกจากเส้นเลือดฝอยเพื่อให้เป็นหลอดเลือดดำเล็กที่นำเลือดไปยังหลอดเลือดดำเส้นเลือดใหญ่แล้วส่งเลือดกลับไปสู่หัวใจ

หลอดเลือดแดงเป็นหลอดเลือดที่ทำให้เลือดไหลออกจากหัวใจซึ่งหลอดเลือดแดงทั้งหมดมีผนังหนาพอสมควรที่สามารถทนต่อความดันเลือดสูงที่ไหลออกมาจากหัวใจ อย่างไรก็ตามหลอดเลือดที่อยู่ใกล้กับหัวใจมีผนังที่หนาที่สุดซึ่งมีเส้นใยที่มีความยืดหยุ่นสูง หลอดเลือดแดงชนิดนี้เรียกว่าหลอดเลือดแดงยืดหยุ่น (elastic artery)

ผนังหลอดเลือดแดงประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่

### 1. tunica intima

tunica intima (หรือที่รู้จักกันในชื่อ tunica interna) ประกอบด้วยชั้นเยื่อบุผิว และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ในชั้นนี้มีการเคลือบบุผิวด้วยเยื่อบุผิวชนิดพิเศษที่เรียกว่า endothelium ซึ่งมีความต่อเนื่องตลอดแนวของหลอดเลือด ความเสียหายที่เกิดขึ้นที่ endothelium และเลือดเข้าไปสู่เส้นใยคอลลาเจนข้างใต้เป็นหนึ่งในสาเหตุหลักของการเกิดเป็นลิ่มเลือด endothelium จึงเป็นขอบเขตระหว่างเลือดในหลอดเลือดและผนังของหลอดเลือด ถัดจาก endothelium เป็น basement membrane หรือ basal lamina ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้ endothelium กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ยึดติดกัน basement membrane ให้ความแข็งแรงในขณะที่ยังรักษาความยืดหยุ่นและเป็นเยื่อเลือกผ่านที่ให้การบางชนิดสามารถผ่านทะลุได้ เยื่อชั้นนอกสุดในชั้น tunica intima มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเล็ก ๆ ที่ประกอบด้วยเส้นใยยืดหยุ่นเพื่อให้มีความยืดหยุ่นเพิ่มเติม นอกจากนี้ยังมีเส้นใยคอลลาเจนบางส่วนเพื่อเพิ่มความแข็งแรง

ในหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่มีชั้นหน้าที่แตกต่างจากเส้นใยยืดหยุ่น เรียกว่าเส้นใยยืดหยุ่นชั้นใน (internal elastic membrane) ซึ่งเป็นขอบเขตกับชั้น tunica media เช่นเดียวกับส่วนประกอบอื่น ๆ ในชั้น tunica intima เส้นใยยืดหยุ่นชั้นในนี้มีโครงสร้างที่ช่วย ขณะที่หลอดเลือดยืดออก และเต็มไปด้วยช่องเล็ก ๆ ที่อนุญาตให้มีการแลกเปลี่ยนสารต่าง ๆ ระหว่างชั้นของหลอดเลือด

### 2. tunica media

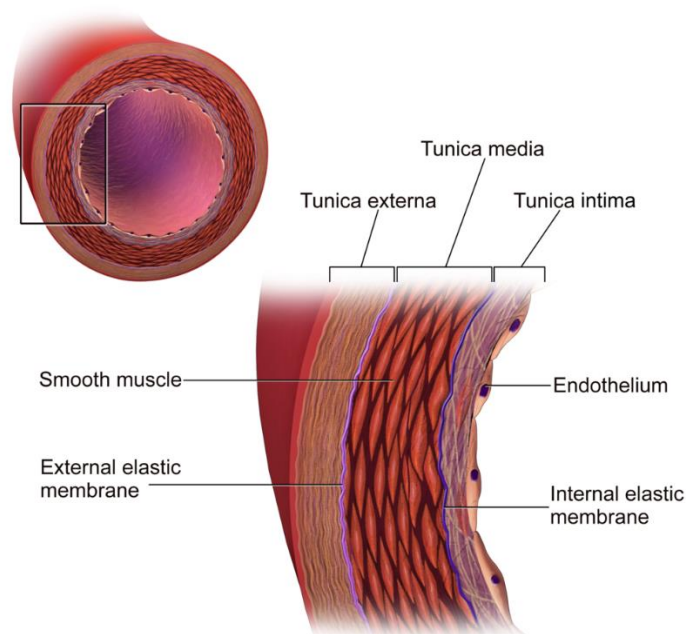
ชั้น tunica media เป็นชั้นกลางที่สำคัญของผนังหลอดเลือด โดยทั่วไปจะเป็นชั้นที่หนาที่สุดในหลอดเลือดแดงและมีขนาดหนากว่าหลอดเลือดดำ ในชั้นนี้ประกอบด้วยชั้นของกล้ามเนื้อเรียบที่รองรับโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ทำจากเส้นใยยืดหยุ่นซึ่งจะจัดเรียงกันเป็นวงกลม มีชั้นของกล้ามเนื้อตามยาว การหดตัวและการคลายตัวของหลอดเลือดทำให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือดลดลงและเพิ่มตามลำดับ ในหลอดเลือดแดงการหดตัวของ

หลอดเลือดทำให้การไหลเวียนของเลือดลดลงเนื่องจากกล้ามเนื้อเรียบในผนังของหลอดเลือดหดตัวทำให้ช่อง lumen แคบและเป็นการเพิ่มความดันเลือด ในทำนองเดียวกันการคลายตัวของหลอดเลือดเพิ่มการไหลเวียนของเลือดให้ lumen ขยายและความดันเลือดลดลง

ชั้นกล้ามเนื้อเรียบนี้ค้ำจุนโดยเส้นใยคอลลาเจนที่ยึดกับชั้น tunica media ทั้งชั้นในและชั้นนอกควบคู่ไปกับเส้นใยคอลลาเจนเป็นเส้นใยยืดหยุ่นจำนวนมากที่ปรากฏเป็นเส้นหยัก การแบ่งขอบเขตของ tunica media จาก tunica externa ในหลอดเลือดแดงใหญ่คือเส้นใยยืดหยุ่นชั้นนอก (external elastic membrane) เส้นใยนี้มักไม่พบในหลอดเลือดแดงขนาดเล็กและในหลอดเลือดดำ

### 3. tunica externa

ชั้น tunica externa หรือ tunica adventitia เป็นชั้นนอกสุด เป็นเนื้อเยื่อที่สำคัญของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน ชั้นนอกของ tunica externa ไม่ชัดเจน แต่ค่อนข้างจะกลมกลืนกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ข้างนอกของหลอดเลือดช่วยยึดหลอดเลือดไว้ให้อยู่ในตำแหน่งของมัน หาก tunica externa ไม่ได้ยึดหลอดเลือดไว้ให้อยู่กับที่ หากมีการเคลื่อนไหวใดๆ อาจส่งผลให้เกิดการรบกวนการไหลเวียนเลือดได้

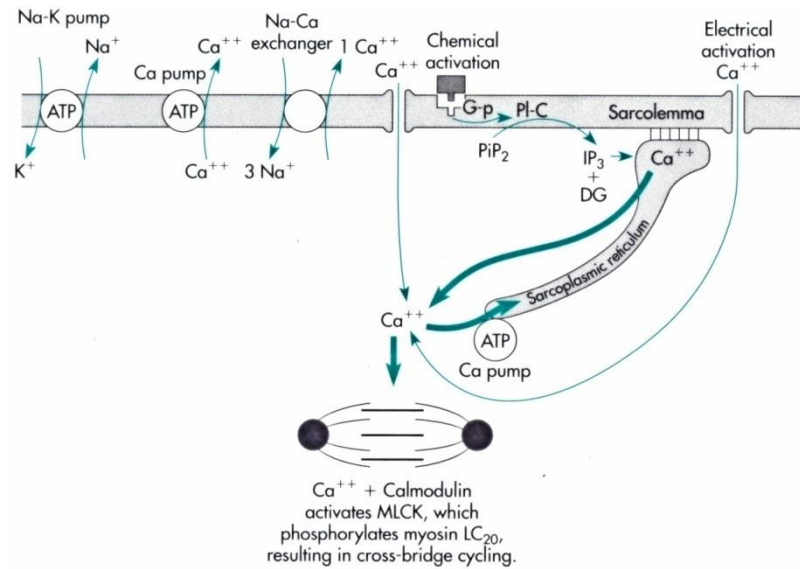


รูปที่ 1.10 โครงสร้างปกติของผนังหลอดเลือดแดง (Swift & Weinstein, 2009)

#### 4.1 กลไกการทำงานของหลอดเลือดแดง

กลไกการเกิด excitation-contraction coupling โดย  $\text{Ca}^{2+}$  เข้าสู่ cytoplasm ได้ 2 ทาง คือ ผ่าน calcium channel ที่เยื่อหุ้มเซลล์และหลังจาก sarcoplasmic reticulum (SR) เมื่อ  $\text{Ca}^{2+}$  เพิ่มจำนวนมากขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง crossbridge ระหว่าง actin และ myosin filaments ซึ่งเกิดขึ้นได้โดย  $\text{Ca}^{2+}$  ใน cytoplasm เข้าจับกับ calmodulin เกิด  $\text{Ca}^{2+}$  - calmodulin complex ซึ่งจะทำหน้าที่กระตุ้น enzyme myosin light-chain kinase (MLCK) ทำให้เกิด phosphorylation ของ myosin light chains จากนั้น actin กับ myosin จึงจะสร้าง crossbridge ได้ แล้วเกิดการเคลื่อนที่ของ actin filament เข้าหากัน

calcium channel ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดมีอยู่ 2 ชนิด คือ receptor-activated calcium channel ซึ่งเปิดจากการกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเคมี โดยที่ไม่ต้องเกิด electrical excitation พบว่าการทำงานของ receptor-activated calcium channel เป็นกลไกหลักในการเกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ สารที่สามารถกระตุ้น (agonists) channel นี้ ได้แก่ catecholamines, serotonin, angiotensin II, vasopressin, endothelin, histamine, neuropeptide Y และ prostanoids เมื่อมี agonists มาจับที่ receptor ทำให้ calcium channel เปิดและ  $\text{Ca}^{2+}$  ใน extracellular fluid (ECF) เคลื่อนที่เข้าสู่เซลล์ แหล่งของ  $\text{Ca}^{2+}$  ที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด นอกจากจะมาจาก ECF แล้ว ยังได้จากการหลั่ง  $\text{Ca}^{2+}$  จาก SR ซึ่งเกิดขึ้นเมื่อ enzyme phospholipase C (PLC) ที่เยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อเรียบถูกกระตุ้น แล้วเกิดสลาย phosphatidyl inositol 4, 5 bisphosphate ( $\text{PIP}_2$ ) ได้ เป็น diacylglycerol (DAG) และ inositol triphosphate ( $\text{IP}_3$ ) จากนั้น  $\text{IP}_3$  กระตุ้น SR ให้หลั่ง  $\text{Ca}^{2+}$  เข้าสู่ cytoplasm การคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด เกิดขึ้นเมื่อการทำงานของ MLCK ถูกยับยั้ง ในขณะที่  $\text{Ca}^{2+}$  ใน cytoplasm ลดลงจากการที่  $\text{Ca}^{2+}$  ถูกปั๊มกลับสู่ SR และ  $\text{Ca}^{2+}$  ส่วนหนึ่งถูกส่งออกนอกเซลล์ ผ่านทาง  $\text{Ca}^{2+}$  - pump และ  $\text{Na}^+$  -  $\text{Ca}^{2+}$  exchanger ที่เยื่อหุ้มเซลล์



รูปที่ 1.11 กลไกการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด (Berne et al., 2010)

## 4.2 การควบคุมการทำงานของหลอดเลือดแดง

### 1. การควบคุมโดยระบบประสาท

ระบบประสาทมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสมดุลของหลอดเลือด ตัวควบคุมหลักได้แก่ศูนย์หัวใจและหลอดเลือดในสมองที่ควบคุมทั้งการทำงานของหัวใจและหลอดเลือด นอกจากนี้ยังมีการตอบสนองทางระบบประสาทจากระบบ limbic และระบบประสาทอัตโนมัติ เป็นปัจจัยสำคัญ

#### 1.1 ระบบประสาทซิมพาเทติก

ระบบประสาทซิมพาเทติกเป็นศูนย์กระตุ้นหัวใจและหลอดเลือด โดยกระตุ้นการทำงานของหัวใจด้วยการควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจและปริมาตรของเลือดที่ออกจากหัวใจ ผ่านการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติกจากเส้นประสาทในการเร่งการเต้นของหัวใจ postganglionic ของระบบประสาทซิมพาเทติกอยู่ที่ adventitial-medial border ของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำทั่วทั้งร่างกาย venule และหลอดเลือดฝอยที่ไม่มีกล้ามเนื้อเรียบจะไม่ได้รับการหลั่งโดยตรงจากระบบประสาทซิมพาเทติก norepinephrine (NE) ถูกปล่อยมาจากปลายประสาทซิมพาเทติก จับกับตัวรับ  $\alpha_1$ - หรือ  $\alpha_2$ -adrenergic ที่บริเวณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของแคลเซียมในเซลล์ ด้วยการปล่อยแคลเซียมจาก sarcoplasmic reticulum (SR) หรือมาจากภายนอกเซลล์ที่เข้ามาทางช่องเปิด plasmalemmal Ca<sup>2+</sup> channel (Guimarães & Moura, 2001) การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมในเซลล์ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยการกระตุ้นของ calmodulin-dependent myosin light chain kinase ซึ่งจำเป็นสำหรับการกระตุ้น myosin ATPase และการจับกันของ myosin กับ



actin filament ในหลอดเลือดประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อเรียบใน tunica media หลายชั้น แต่จะมีเพียงชั้นนอกสุดเท่านั้นที่ได้รับสัญญาณจากประสาทซิมพาเทติก ส่วนชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่อยู่ถัดมาเกิดการหดตัวด้วยเนื่องจากการแพร่ของ NE และการสื่อสารระหว่างเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง (cell-to-cell communication) ผ่าน gap junction

นอกจาก NE แล้วระบบประสาทซิมพาเทติกของหลอดเลือดยังประกอบไปด้วย neuropeptide Y (NPY) หรือ ATP ที่ถูกปล่อยออกมาเป็น cotransmitter ซึ่งสามารถทำให้เกิดการหดตัวได้โดยการกระตุ้นตัวรับ NPY Y<sub>1</sub> หรือ purinergic P<sub>2</sub>X ตามลำดับ ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของคลเซียมในเซลล์ (Pablo Huidobro-Toro & Verónica Donoso, 2004)

## 2. การควบคุมทางระบบฮอร์โมน

นอกจากผลโดยตรงอย่างรวดเร็วและมีผลช่วงสั้น ๆ ของระบบประสาทซิมพาเทติกในการทำให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำและการทำงานของหัวใจ แล้ว ระบบประสาทซิมพาเทติกยังสามารถกระตุ้นได้อย่างยาวนาน โดยกระตุ้นทางอ้อมต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยการกระตุ้นทางระบบฮอร์โมน ซึ่งประกอบด้วยการหลั่งฮอร์โมนอะดรีนาลีน (sympathoadrenal system) และ renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS)

เซลล์ประสาทตัวแรก (preganglionic neuron) ของระบบประสาทซิมพาเทติก ไปเลี้ยงเซลล์ chromaffin ของต่อมหมวกไตชั้นในซึ่งทำหน้าที่ในการสังเคราะห์และหลั่ง epinephrine (80%) และ norepinephrine (20%) เข้าสู่กระแสเลือดไปควบคุมระบบหัวใจและหลอดเลือดโดยการกระตุ้นที่ตัวรับ adrenergic ผลทางสรีรวิทยาของการไหลเวียนของ norepinephrine มีความคล้ายคลึงกับ norepinephrine ที่ปล่อยออกมาทางระบบประสาท การหดตัวของหลอดเลือดเกิดจากตัวกระตุ้นจับกับตัวรับ  $\alpha$ -adrenergic และ  $\beta$ -adrenergic ที่หัวใจ epinephrine กระตุ้นทั้งตัวรับ  $\alpha$ - และ  $\beta$ -adrenergic แต่การตอบสนองสุทธิขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ epinephrine จำนวนของตัวรับแต่ละประเภทและความไวต่อการตอบสนองของตัวรับแต่ละประเภท epinephrine ที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย แต่หลอดเลือดที่มีความต้านทานของกล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อหัวใจและตับจะขยายตัว ขณะที่หลอดเลือดที่ไต ผิวหนังและระบบทางเดินอาหารจะหดตัว ดังนั้นหนึ่งในการตอบสนองทางสรีรวิทยาที่สำคัญของ epinephrine คือการลำเลียงสารต่าง ๆ จากหัวใจออกกระหว่างอวัยวะต่าง ๆ

ฮอร์โมนอีกหนึ่งตัวที่สำคัญใน RAAS คือ renin เป็นเซลล์เฉพาะในไตที่พบใน juxtaglomerular ตอบสนองต่อการไหลเวียนของเลือดที่ลดลงโดยการหลั่ง renin เข้าสู่กระแสเลือด Renin เปลี่ยนโปรตีนพลาสมา angiotensinogen ซึ่งผลิตโดยตับให้อยู่ในรูปแบบที่ใช้พร้อมใช้งาน angiotensin I จากนั้น angiotensin I ที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือดและถูกแปลงเป็น angiotensin II ที่ปอด ปฏิกิริยานี้ได้รับการกระตุ้นด้วยเอนไซม์ enzyme angiotensin converting enzyme (ACE)

angiotensin II ทำให้หลอดเลือดหดตัวทำให้ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นการปล่อย ADH และ aldosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ผลิตโดยต่อมหมวกไต aldosterone ช่วยเพิ่มการดูดซึมโซเดียมเข้าสู่เลือดโดยไต เนื่องจากน้ำจะตามโซเดียมจึงเป็นเพิ่มการดูดซึมน้ำกลับคืนด้วย ปรากฏการณ์นี้จะเพิ่มปริมาณเลือดและเพิ่มความดันโลหิต angiotensin II ยังช่วยกระตุ้นศูนย์ควบคุมความกระหายของไฮโปทาลามัสเพื่อให้ดื่มน้ำมากขึ้นทำให้มีการเพิ่มปริมาณและความดันโลหิต

## 5. endothelium

endothelium เป็นเนื้อเยื่อชั้นเดียวอยู่ชั้นในสุดของหลอดเลือดและต่อมน้ำเหลือง ในผู้ใหญ่ Endothelium มีจำนวนมากถึง 10 ล้านล้านเซลล์ endothelial cell เจริญมาจาก mesoderm ร่วม hematopoietic cell แต่มีลักษณะและหน้าที่แตกต่างกัน ในหลอดเลือดส่วนมาก endothelial cell มีลักษณะที่ต่อกันและไม่เป็นตาข่าย แต่มันสามารถเชื่อมให้เป็นตาข่ายได้ขึ้นอยู่กับหน้าที่ของส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย endothelial cell มีความสามารถในการสังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ basal lamina เช่น matrix metalloproteinase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหลอดเลือด endothelial cell เสียหายเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เกิดจาก ที่มีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดจากการสะสมไขมันและ fibrous tissue ที่ไปทับถมบน endothelial cell ซึ่งก่อให้เกิด plaque และการแข็งตัวนี้ก่อให้เกิดการตีบของหลอดเลือด endothelial cell ที่มีอายุมากก็จะเสื่อมลงตามอายุจากภาวะ telomere shortening ซึ่งเกี่ยวข้องกับอายุของผู้สูงวัย แต่ยังมีปัจจัยอื่นที่เป็นตัวเร่งให้เกิดความเสื่อม ได้แก่ atherosclerosis, ความดันโลหิตสูง, การสูบบุหรี่, และปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลให้อัตราการเต้นของหัวใจสูงขึ้น ทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ ขาดความสามารถในการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดในเซลล์ ทำให้ endothelial cell เสื่อมไปในที่สุด

### 5.1 การสร้างสารที่สำคัญ

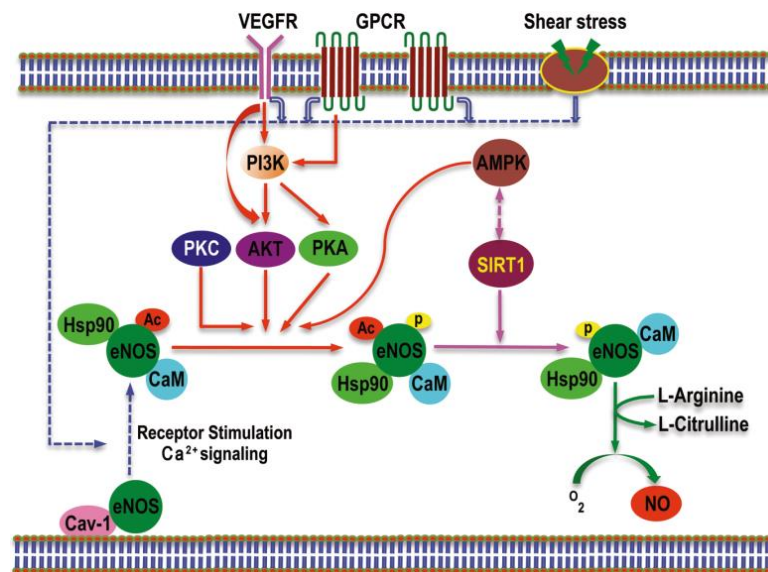
#### 5.1.1 vasodilator

##### 1. nitric oxide (NO)

กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดตอบสนองต่อการกระตุ้นของของระบบประสาทซิมพาเทติกและพาราซิมพาเทติกเพื่อเพื่อรักษาสมดุลความตึงตัวของระบบหัวใจและหลอดเลือด การศึกษาของ Robert Furchgott และคณะใน ค.ศ. 1980 พบว่า acetylcholine ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงของกระต่ายผ่าน endothelium เรียกว่า endothelium-derived

relaxing factor (EDRF) ซึ่งต่อมามีการค้นพบว่าเป็น NO ทำให้ Robert Furchgott และผู้ร่วมวิจัยของเขาได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1998 (Ignarro et al., 1987) เซลล์ endothelium ต่อมาได้รับการยอมรับว่ามีบทบาทสำคัญในการควบคุมความตึงตัวของหลอดเลือด NO ถูกสร้างมาจาก L-arginine โดย enzyme endothelial nitric oxide synthase (eNOS) การกระตุ้นของ NOS ทำให้มีการปล่อยอนุมูลอิสระ NO ซึ่งง่ายต่อการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้น soluble guanylyl cyclase นำไปสู่การเพิ่มขึ้นของ cGMP ภายในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Moncada & Higgs, 1991) NO มีบทบาทที่หลากหลายในการรักษาภาวะสมดุลของหลอดเลือด นอกจากจะก่อให้เกิด vasodilation แล้ว ยังเป็นตัวต้านการเจริญของเซลล์, สารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ และยังยับยั้งการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งได้อีกด้วย การทำงานของ eNOS สามารถถูกกระตุ้นที่รีเซปเตอร์ผ่านตัวกระตุ้นต่าง ๆ ได้แก่ bradykinin, acetylcholine และ thrombin ผ่าน palmitoylation โดยจับกับ calmodulin/calcium และหลังจาก plasma membrane

ปัจจัยเสี่ยงทั่วไปซึ่งทำให้เกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดได้แก่ ไขมันในเลือดสูง ความดันโลหิตสูง การสูบบุหรี่ และโรคเบาหวานล้วนเกี่ยวข้องกับ การลดลงของระดับ NO ในผนังหลอดเลือด แท้จริงแล้วการทำงานของเนื้อเยื่อบุโพรงหลอดเลือด (endothelial dysfunction) หมายถึงการลดลงของฤทธิ์ทางชีวภาพของ NO เนื่องจากมีรายการศึกษาถึงการรักษาโดยกระตุ้นการหลั่ง NO พบว่าให้ผลตอบสนองที่ดีสามารถรักษา endothelial dysfunction และป้องกันการเกิดหลอดเลือดหนาตัว (atherogenesis) นอกจากนี้ยาที่ให้ NO (NO donor) เช่น nitroglycerine ใช้กันอย่างแพร่หลายในผู้ป่วยที่เป็นโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (Yetik-Anacak & Catravas, 2006)



**รูปที่ 1.12** การควบคุม endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ในเยื่อหุ้มเซลล์ eNOS จับกับ caveolin-1 ซึ่งจะป้องกันไม่ให้จับกับ calmodulin และเกิดการกระตุ้น eNOS การเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์จะเป็นตัวกระตุ้นทำให้ eNOS เคลื่อนออกจาก caveolae และการจับกับ calcium-calmodulin (CaM) complex จากนั้น hsp90 ก็มาร่วมเพื่อให้ calcium-activated CaM และปล่อยจากตัวจับของ caveolin ต่อมา eNOS จะถูกฟอสโฟรีเลตจาก protein-kinase (PK) (เส้นสีแดง) และถูกกำจัดหมู่อะซีติล (deacetylation) โดย SIRT1. การเกิดฟอสโฟรีเลชันที่ตำแหน่ง Ser 1177 โดย PKA, AKT (protein kinase B), PKC, และ adenosine monophosphate kinase (AMPK) จะเกิดการกระตุ้นการทำงาน ในขณะที่การเกิดฟอสโฟรีเลชันที่ตำแหน่ง Ser 116 และ Thr 495 จะยับยั้งการทำงานของ eNOS สุดท้าย active eNOS จะเร่งการเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนโมเลกุลออกซิเจนเป็น NO โดยใช้ L-arginine เป็นสารตั้งต้น (Chris et al., 2012)

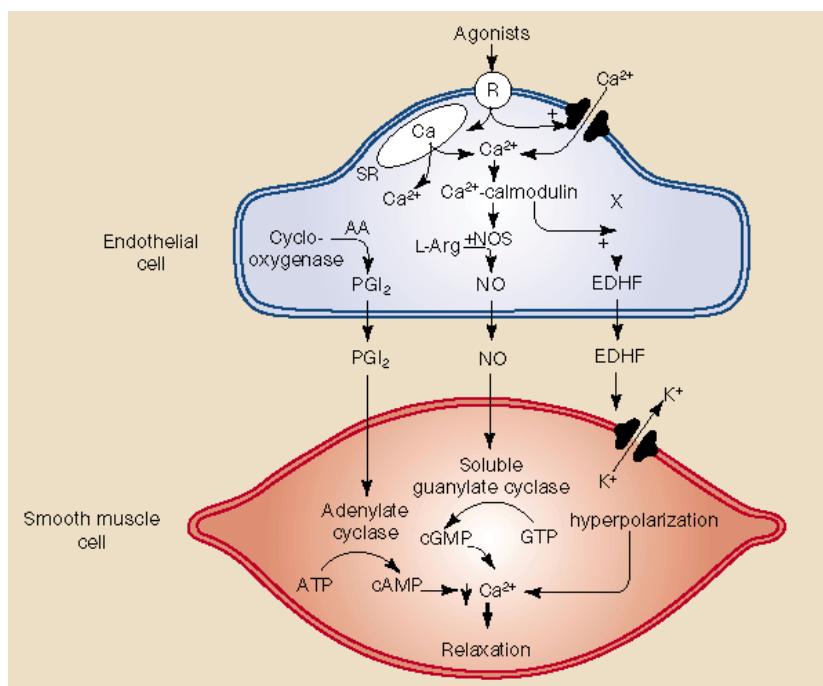
## 2. prostacyclin หรือ prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>)

สารที่สำคัญอีกหนึ่งตัวที่เป็น EDRF ซึ่งการปลดปล่อยจะถูกกระตุ้นด้วยแรงเฉือน (shear stress) และตอบสนองต่อ acetylcholine คือ PGI<sub>2</sub> (Flammer & Lüscher, 2010) ถูกสังเคราะห์โดย cyclooxygenase-2 (COX-2) จาก arachidonic acid (Moncada et al., 1976) การทำงานของ PGI<sub>2</sub> จะจับกับรีเซปเตอร์คือ PGI<sub>2</sub> receptor หรือ IP และไปเพิ่ม cyclic adenosine monophosphate (cAMP) ในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดเช่นเดียวกับในเกล็ดเลือด (Smyth et al., 2008) ในผู้ป่วยที่มีการลดลงของระดับ NO เช่นในผู้ป่วย โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เมื่อ nitric oxide synthase (NOS) ถูกยับยั้งหรือเสียหาย COX-2 ก็จะมีการหลั่ง PGI<sub>2</sub> ให้มีบทบาทเด่นแทนในการทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Szerafin et al., 2006) นอกจากนี้ PGI<sub>2</sub> ยังมีความสำคัญในการยับยั้งการจับกันของเกล็ดเลือดโดยทำงานร่วมกับ NO เช่นเดียวกัน NO และ PGI<sub>2</sub> ยังสามารถยับยั้ง leukocyte adhesion และการขยายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้อีกด้วย (Kawabe et al., 2010) หากมีการเกิดรบกวนสัญญาณ

ประสาทหรือ crosstalk ระหว่างสองตัวแทนอยู่ PGI<sub>2</sub> จะเป็นตัวช่วยในการหลั่ง NO โดยเซลล์ endothelium ในทางตรงกันข้ามการทำงานของ PGI<sub>2</sub> ในกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดถูกกระตุ้นให้มีศักยภาพโดย NO โดยทางอ้อมผ่านการยับยั้ง phosphodiesterase 3 ช่วยยืดอายุครึ่งชีวิต (half-life) ของ cAMP ผลกระทบของ PGI<sub>2</sub> ต่อต้านยา thromboxane (TXA<sub>2</sub>) ที่สังเคราะห์ผ่าน COX-1 และทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (platelet aggregation), การหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) และการขยายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ดังนั้นความสมดุลของทั้งสอง prostanoids คือ PGI<sub>2</sub> และ TXA<sub>2</sub> จึงมีความสำคัญในการรักษาสมดุลระบบหัวใจและหลอดเลือด ความสำคัญของ COX-2 ในการสังเคราะห์ PGI<sub>2</sub> อาจอธิบายถึงผลกระทบที่เป็นอันตรายของสารยับยั้ง COX-2 อาจส่งผลถึงการเสียชีวิตจากโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ เนื่องจากการยับยั้ง COX-2 ทำให้เกิดภาวะเร่งการเกิดหลอดเลือดอุดตันจากกล้ามเนื้อ (prothrombotic state) ที่ทำให้มีการลดลงของ PGI<sub>2</sub>

### 3. endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF)

vasodilator ทุกตัวจะมีการปรับตัวเมื่อมีการให้สารยับยั้งของ NO (เช่น L-NMMA) และ PGI<sub>2</sub> (เช่น aspirin) ซึ่งเชื่อว่ามีสารที่ทำให้เกิดไฮเพอร์โพลาริเซชันของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด โดยมีกลไกของการตอบสนองโดยการเพิ่มขึ้นของโพแทสเซียม (K<sup>+</sup>) ภายนอกเซลล์ ส่งผลให้มีการลดลงของ K<sup>+</sup> ภายในเซลล์ EDHF มีฤทธิ์สั้น ๆ แต่กลไกยังไม่ทราบแน่ชัด กลไกการออกฤทธิ์ที่ทราบคือ กระตุ้นช่องโพแทสเซียมที่ไวต่อ ATP (ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel) และ/หรือ Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase ที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ทำให้ K<sup>+</sup> แพร่ออกจากเซลล์ และเกิด hyperpolarization ตามลำดับ ภาวะเช่นนี้ทำให้ช่องแคลเซียมไอออนที่ไวต่อศักย์ไฟฟ้า (โดยเฉพาะชนิดแอล) ปิด แคลเซียมไอออนแพร่เข้าเซลล์ลดลง และระดับแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ลดลง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังลดความไวของโปรตีนหดตัว (contractile protein) ต่อระดับแคลเซียมไอออนภายในเซลล์ ยับยั้งการกระตุ้น phospholipase C ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดคลายตัวในที่สุด โมเลกุลและสารที่เป็นตัวกลางที่มีกลไกเหมือนกับ EDHF ได้แก่ cytochrome P450 metabolites (Taddei et al., 2006), lipoxygenase products (Faraci et al., 2001), reactive oxygen species (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Ellis & Triggle, 2003), C-type natriuretic peptide (Wei et al., 1994) และ electrical coupling through myoendothelial gap junctions (Griffith et al., 2004)



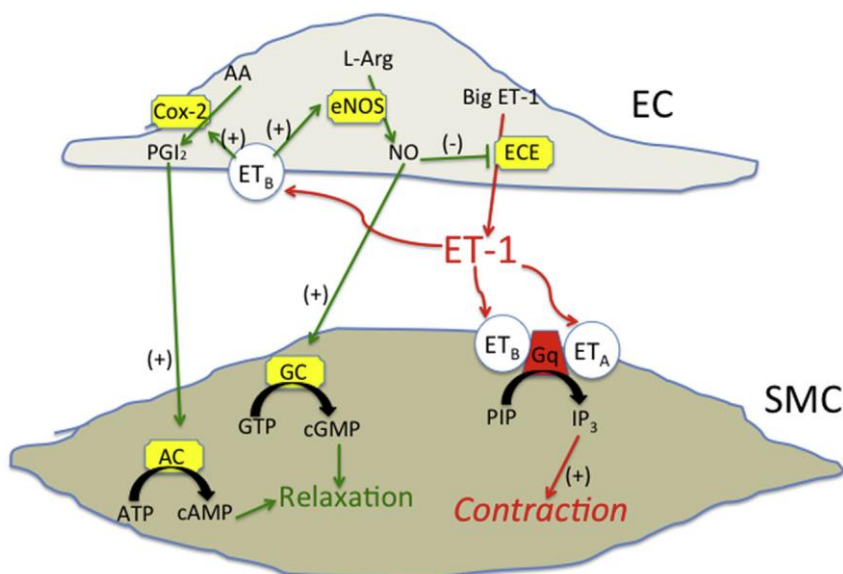
รูปที่ 1.13 endothelium derived relaxing factor (EDRF) ที่หลังจาก endothelium prostacyclin ( $\text{PGI}_2$ ) กระตุ้น adenylate cyclase ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ cyclic AMP (cAMP). Nitric oxide (NO) กระตุ้น soluble guanylate cyclase ทำให้มีการเพิ่มของระดับ cyclic GMP (cGMP). Endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) ทำให้เปิดของ  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent  $\text{K}^+$  channels ในกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ส่งผลให้เกิด hyperpolarization. สารทั้งสามตัวนี้มีความสำคัญไม่เท่ากัน โดย NO มีบทบาทเด่นในหลอดเลือดแดงใหญ่ ขณะที่ EDHF มีบทบาทในหลอดเลือดขนาดเล็กและหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ในกรณีที่ NO ถูกบกรบกวน หรือมีการทำงานลดลง (AA, arachidonic acid; NOS, NO synthase; L-Arg, L-arginine; R, membrane receptor; SR, sarcoplasmic reticulum; X, unknown precursor) (Vanhoutte et al., 1998)

### 5.1.2 vasoconstrictor

#### 1. endothelin-1 (ET-1)

ET-1 เป็นโปรตีนที่มีกรดอะมิโน 21 ตัว สร้างโดย endothelin converting enzyme (ECE) จากตัวตั้งต้นขนาดใหญ่ big ET-1 (Yanagisawa et al., 1988) ET-1 เป็นหนึ่งใน endogenous vasoconstrictors ที่มีศักยภาพมากที่สุด สร้างมาจากเซลล์ endothelium เป็นหลัก นอกจากนี้ยังถูกสร้างมาจากเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด, เซลล์เม็ดเลือดขาว และ macrophage ET-1 และ NO มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิด โดย NO ยับยั้งการปลดปล่อย ET-1 ออกมาจาก endothelium และในทางกลับกัน ET-1 ยับยั้งการทำงานของ NO ที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว (Thorin & Webb, 2010) endothelin มี 3 ไอโซฟอร์มได้แก่ ET-1, ET-2 และ ET-3 โดย ET-1 มีส่วนเกี่ยวข้องมากที่สุดในระบบหลอดเลือดมีส่วนช่วยในการรักษาความตึงตัวของหลอดเลือด การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นจากพยาธิสภาพต่าง ๆ ET-1 สามารถเป็นตัวกระตุ้น

การอักเสบและกระตุ้นการขยายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด (Anggrahini et al., 2009) การเพิ่มขึ้นของ ET-1 มีส่วนเกี่ยวข้องในการเกิดพยาธิสภาพจากความดันโลหิตสูง ภาวะหลอดเลือดและภาวะหัวใจล้มเหลว นอกจากนี้การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ ET-1 และ ECE ก็พบในคนที่ เป็นโรคหลอดเลือดแข็งในระยะต่าง ๆ กลไกทางชีวภาพของ ET-1 เกิดขึ้นผ่านการกระตุ้นของรีเซปเตอร์สองตัวคือ  $ET_A$  และ  $ET_B$  ซึ่งพบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ตัวรับ  $ET_A$  มีความจำเพาะมากต่อ ET-1 ในขณะที่ตัวรับ  $ET_B$  จับได้ดีกับ endothelin ทั้งสามไอโซฟอร์ม ตัวรับ  $ET_A$  เมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้หลอดเลือดหดตัว ส่วนตัวรับ  $ET_B$  พบได้ทั้งเซลล์บุหลอดเลือดและกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ถ้าตัวรับ  $ET_B$  ที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดถูกกระตุ้นจะทำให้หลอดเลือดหดตัว แต่ถ้ากระตุ้นที่เซลล์ endothelium จะทำให้หลอดเลือดคลายตัวทางอ้อมผ่านการสร้างและหลั่งสารในกลุ่ม EDRF ต่าง ๆ โดยเฉพาะ NO และ  $PGI_2$  (De Nucci et al., 1988)  $ET_B$  มีบทบาทสำคัญในการกำจัด ET-1 โดยจับกับตัวรับ ligand ที่อยู่ในเซลล์และย่อยสลายภายในเซลล์ ดังนั้นการลดลงของ  $ET_B$  หรือการยับยั้งการทำงานของตัวรับ  $ET_B$  จะทำให้ความสามารถในการกำจัด ET-1 ลดลง ส่งผลให้ ET-1 มีปริมาณสูงขึ้น

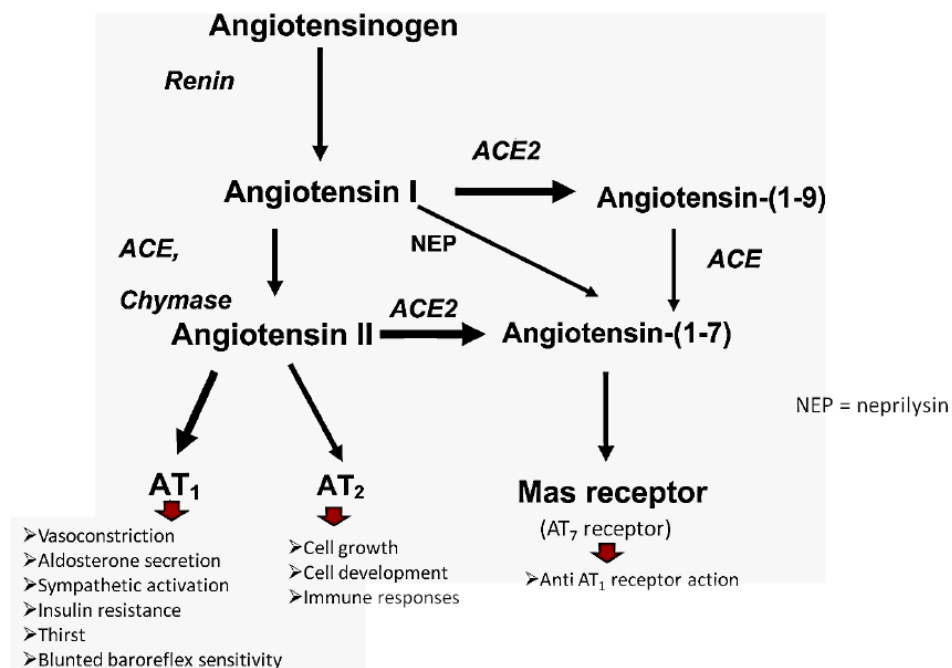


รูปที่ 1.14 endothelin-1 (ET1). Big endothelin-1 ถูกตัดให้เล็กลงด้วย endothelin converting enzyme (ECE) ให้อยู่ในรูปของ Endothelin-1 (ET-1). ตัวรับของ Endothelin คือ  $ET_A$  and  $ET_B$  พบที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด เมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้หลอดเลือดหดตัว  $ET_B$  ยังพบที่เซลล์ endothelium (EC) ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นจะทำให้หลอดเลือดคลายตัวผ่าน NO และ  $PGI_2$  (Cahill & Redmond, 2016)

## 2. Angiotensin-II/AT1R

renin-angiotensin system (RAS) เป็นระบบฮอร์โมนหมุนเวียนที่ควบคุมความดันโลหิต การไหลเวียนเลือด ปริมาณของเหลวและความสมดุลของอิเล็กโตรไลต์ ผลการวิจัยล่าสุด

พบว่า RAS ถูกกระตุ้นจากในหัวใจและผนังหลอดเลือดที่ขยายตัว ซึ่งพบว่ามีความสำคัญในการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง เซลล์ endothelium สามารถสร้าง renin ให้ทำหน้าที่เป็น enzyme เปลี่ยน angiotensinogen ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากตับ ให้เปลี่ยนเป็น angiotensin-I (Ang-I) สารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น angiotensin-II (Ang-II) โดย enzyme angiotensin converting enzyme (ACE) ซึ่งมีมากที่หลอดเลือดของปอด Ang-II เป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์ผ่านตัวรับ Ang-I และ Ang-II ต่อมา Ang-II จะถูกขนส่งออกจากเซลล์ endothelium ทั้งทางด้านเลือดและด้านตรงข้าม Ang-II จับกับตัวรับเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด แล้วทำให้แคลเซียมเข้าเซลล์มาก ส่งผลให้หลอดเลือดจึงหดตัวมากขึ้นตามลำดับ (Fukuda & Sata, 2008) Ang-II เป็นกลางที่กระตุ้นการเกิดหลอดเลือดแดงแข็ง ทำให้หลอดเลือดหดตัว และควบคุมไม่เฉพาะ adhesion molecule (VCAM-1, ICAM-1, P-selectin) เท่านั้น แต่ยังรวมถึง cytokine, chemokine และการหลั่งสารการเจริญเติบโตภายในผนังหลอดเลือดแดง (Tirapelli et al., 2009) ยาที่เป็นตัวยับยั้ง ACE และตัวรับ angiotensin blockers (ARBs) เป็นเครื่องมือเภสัชวิทยาที่ได้รับการยอมรับในการป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็ง endothelium เป็นอวัยวะเป้าหมายที่สำคัญสำหรับยาของระบบหัวใจและหลอดเลือดรวมถึงยาที่เป็นตัวยับยั้ง ACE โดยมีหลักฐานแสดงว่าไม่เพียงแต่ความดันโลหิตลดลง แต่ยังมีผลการต้านการอักเสบได้โดยตรง



รูปที่ 1.15 ระบบ renin-angiotensin ที่เซลล์ endothelium (ACE, angiotensin converting enzyme; AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>, angiotensin receptor subtype 1, 2) (Unger, 2002)



## 5.2 ความเสียหายของ endothelium ที่เกิดจากยา cisplatin

ความเป็นพิษของยา cisplatin เกี่ยวกับระบบหลอดเลือดได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ การศึกษาทางพรีคลินิกแบบ *in vitro* พบว่า cisplatin อาจยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ endothelium ซึ่งผลจากการยับยั้งนี้เป็นตัวเสริมการทำงานของยา cisplatin ในการยับยั้งเซลล์มะเร็ง การศึกษาเชิงพรรณนาผลข้างเคียงจากการใช้ยา cisplatin โดยการวัด human dermal microvascular endothelial cell line (HMEC-1) ซึ่งวัดจากการแสดงออกของ intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) และโปรตีนสองชนิดที่เกี่ยวข้อง fibrinolysis tissue-type plasminogen activator (tPA) และ plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์ endothelium ที่อยู่รอด ซึ่งเสียหายจากกระบวนการชักนำให้เกิด apoptosis โดย cisplatin (Nuver et al., 2010) การศึกษาหลอดเลือดใน stria vascularis ของหนูตะเภาที่ได้รับยา cisplatin อย่างเดียว และได้รับยา cisplatin ร่วมกับ gentamicin โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งมองเห็นได้อย่างชัดเจนว่า endothelium เสียหายเป็นอย่างมาก มีการตกเป็นผลึกตะกอนของไมโทคอนเดรีย มีการหดของผนังในชั้น lumen (Kohn et al., 1997)

Nuver และคณะ (2005) ได้ศึกษาความชุกของภาวะไมโครอัลบูมินูเรีย (microalbuminuria) และการเพิ่มขึ้นของตัวบ่งชี้ความเสียหายของ endothelium ในพลาสมา ได้แก่ vWF, PAI-1, t-PA และ c-reacting protein (CRP) ในผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งอวัยวะจำนวน 90 คนที่ได้รับการรักษาเคมีบำบัดด้วยยา cisplatin เปรียบเทียบกับผู้ป่วยมะเร็งในระยะแรกที่ได้รับการผ่าตัดเอาลูกอัณฑะออก (orchidectomy) และคนทั่วไปที่สุขภาพดี

การศึกษาแบบ cohort study ในผู้ป่วยมะเร็งอวัยวะจำนวน 65 คนที่ได้รับการรักษาเคมีบำบัดด้วยยา cisplatin พบว่ามีการหนาตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญของหลอดเลือดในชั้น intima-media ในหลอดเลือด carotid artery หลังจากได้รับยา 10 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับก่อนได้รับการรักษา การหนาตัวของหลอดเลือดนี้อาจนำไปสู่การเกิดภาวะ atherosclerosis (Lorenz et al., 2007)

Vaughn และคณะ (2008) ได้ศึกษาโดยวัดการทำงานของเซลล์ endothelium ที่ brachial artery ด้วยวิธีการวัด flow-mediated dilation (FMD) ในผู้ป่วยมะเร็งอวัยวะที่ได้รับการรักษาด้วยยา cisplatin พบว่ามีค่าลดลง นอกจากนี้มีการศึกษาในผู้ป่วยหญิงที่เป็นมะเร็งรังไข่ที่ได้รับยา cisplatin พบว่ามีการลดลงของค่า nitroglycerin-mediated vasodilation (NMD) ซึ่งเป็นค่าแสดงการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (de Vos et al., 2004)

โดยทั่วไปในหลอดเลือดที่ปกติ เซลล์ endothelium ที่สมบูรณ์จะมีหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดลิ่มเลือดภายในหลอดเลือดเพื่อทำให้หลอดเลือดปราศจากการอุดตัน cisplatin ชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ endothelium ทำให้มีการกระตุ้นการตอบสนองดังกล่าวโดยไปกระตุ้น procoagulant endothelial microparticles (EMPs) ทำให้สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้างลิ่มเลือดได้ (Lechner et al., 2007) การตอบสนองดังกล่าวของเซลล์ endothelium อาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดและทำให้เสียสมดุลการสลายลิ่มเลือดนำไปสู่การเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตันในหลอดเลือดหลังจากได้รับยา cisplatin ได้

Ito และคณะ (1995) ได้พบว่าเลือดมีการจับตัวกันเป็นก้อนอย่างรุนแรงและพบความเสียหายของ endothelium ในหลอดเลือด superior mesenteric artery ในหนูหลังจากได้รับยาซีพลาทินทางหลอดเลือดแดง ซึ่งความเสียหายนี้พบน้อยกว่าในหนูที่ได้รับวิตามินอีร่วมด้วย เทียบกับหนูที่ได้รับ cisplatin อย่างเดียว

cisplatin ยังทำให้เกิดโรคทางเส้นประสาทโดยการทำลายเซลล์ endothelium ทำให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงเส้นประสาท (vasa nervorum) ส่งผลให้เกิดภาวะขาดเลือดของระบบประสาท นอกจากนี้ cisplatin สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ICAM-1 ผ่านกลไก nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B) ซึ่งทำให้เกิดความเป็นพิษต่อหลอดเลือด (Yu et al., 2008) การศึกษาแบบ *in vitro* ได้พิสูจน์มาแล้วว่า cisplatin กระตุ้นเกล็ดเลือด เซลล์ในกลุ่ม mononuclear และเซลล์ endothelium ซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะเร่งการเกิดภาวะหลอดเลือดอุดตันจากลิ่มเลือด (prothrombotic state) (Togna et al., 2000)

การศึกษาในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ได้รับยา cisplatin ต่อเนื่องมากกว่า 400 mg/m<sup>2</sup> พบว่ามีความสัมพันธ์กับโรคความดันโลหิตสูง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า cisplatin มีความเป็นพิษต่อระบบหลอดเลือด (Bokemeyer et al., 1996) ความเสียหายของ endothelium อาจนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์การเกิดโรคลิ่มเลือดอุดตันและอาจเป็นพิษต่อหัวใจแบบเฉียบพลันได้ มีการศึกษาผู้ป่วยมะเร็งรังไข่ที่ได้รับยา cisplatin จำนวน 65 คนพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคลิ่มเลือดอุดตัน 9% สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าผู้ป่วยที่ได้รับยา cisplatin 179 คนเป็นโรคลิ่มเลือดอุดตัน 14 คน คิดเป็นร้อยละ 9 (Weijl et al., 2000) ในรายงานการศึกษาเดียวกันยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของค่า vWF และมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือด carotid artery มีการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ vWF และโรคลิ่มเลือดอุดตันสัมพันธ์กับผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับยา cisplatin (Licciardello et al., 1985)

การศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ของ Pikerry และคณะ (2005) พบว่าการเพิ่มขึ้นของอุบัติการณ์โรคลิ่มเลือดอุดตันในผู้ป่วยมะเร็งรังไข่จำนวน 100 คนที่เข้ารับการทำเคมี

บำบัดด้วยยา cisplatin โดยเปรียบเทียบในเพศ ช่วงอายุ และได้รับยาเคมีบำบัดในระยะเวลา เดียวกัน

เกี่ยวกับผลข้างเคียงของโรคหัวใจและหลอดเลือด cisplatin ทำให้เกิดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือดจึงก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดอุดตันในระยะยาวได้ ในการศึกษาผู้ป่วย non-small-cell lung cancer (NSCLC) ที่ได้รับยา cisplatin มีอุบัติการณ์เกิดโรค 22% หลังจากรับการรักษาต่อเนื่อง 1 ปี (Numico et al., 2005)

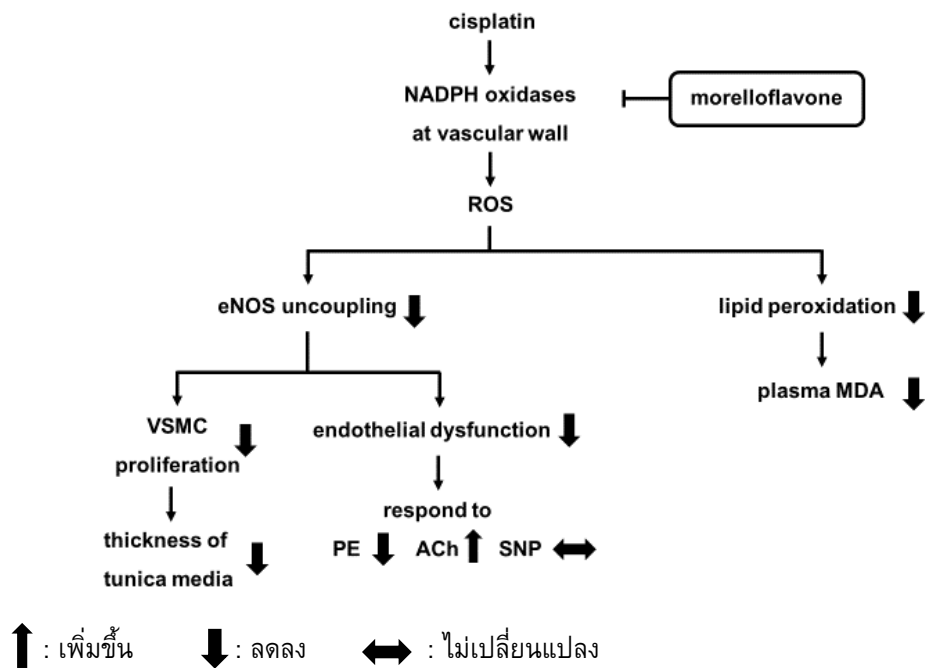
มีรายงานว่าพบผู้ป่วยที่เป็นความดันโลหิตสูง 14% ในผู้ป่วย 21 คนที่เป็นมะเร็งรังไข่ที่ได้รับการรักษาด้วย cisplatin และ 24% เป็น microalbuminuria เทียบกับประชากรหญิงที่ภูมิหลังและช่วงอายุเดียวกันมีอุบัติการณ์เกิดเพียง 3.2% (57) การสูญเสียอัลบูมินทางปัสสาวะอาจเป็นสัญญาณของความเสียหายของ endothelium และเป็นตัวคาดการณ์โรกระบบหัวใจและหลอดเลือด (Hillege et al., 2002)

ขนาดของ cisplatin ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับหลอดเลือดมีหลากหลายขนาดด้วยกัน การศึกษาของ Atalik และคณะ (2010) ใช้ cisplatin ขนาด 10 mg/kg เป็นเวลา 8 วัน พบว่า aortic ring ตอบสนองต่อ PE และ KCl มากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ การศึกษาของ Wehaish และคณะ (2014) ใช้ cisplatin ขนาด 4 mg/kg ต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาตัวกว่ากลุ่ม control ซึ่งเชื่อว่าเป็นการเกิด proliferation ของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด การศึกษาครั้งนี้ใช้ cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg ฉีดเข้าทางช่องท้อง โดยอ้างอิงการศึกษาของ Kunworarath และคณะ (2014) ที่ใช้ cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg ฉีดเข้าทางช่องท้อง ซึ่ง cisplatin ขนาดนี้เป็นขนาดต่ำที่สุดที่ทำให้หนูเป็นไตวายเฉียบพลัน ในวันที่ 3 หลังการฉีด ซึ่งหากใช้ขนาดสูงกว่านี้จะทำให้หนูตายเป็นจำนวนมาก

### 1.3 วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อศึกษาผลของ morelloflavone ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด thoracic aorta ในหนูที่ฉีด cisplatin เทียบกับหนูในกลุ่ม control intact endothelium และ denuded
2. เพื่อศึกษาความเสียหายของหลอดเลือด หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน และ 7 วัน
3. เพื่อศึกษาผลการป้องกันของ morelloflavone ต่อ cisplatin ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อหลอดเลือด

#### 1.4 สมมติฐานงานวิจัย



รูปที่ 1.15 แผนภาพสมมติฐานงานวิจัย cisplatin กระตุ้น enzyme NADPH oxidase ทำให้เกิด ROS morelloflavone มีผลยับยั้งหรือลดการทำงานของ NADPH oxidase เพื่อลดการเกิด ROS (ROS, reactive oxygen species; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; VSMC, vascular smooth muscle cell; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; PE, phenylephrine; Ach, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside)

## บทที่ 2

### วิธีดำเนินการทดลอง

#### วัสดุและอุปกรณ์

##### 2.1 สัตว์ทดลอง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการทดลองในหนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก ระหว่าง 250 - 300 g จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัตว์ทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 23-25 °C ความชื้นสัมพัทธ์ 50 - 55% โดยควบคุมให้มีปริมาณแสงให้มีสัดส่วนความมืดและความสว่าง 12:12 h เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (S.W.T., Thailand) และดื่มน้ำประปาสะอาดไม่จำกัด ปริมาณ

การทดลองจะต้องผ่านการพิจารณาเห็นชอบจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณ การใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ 20/2015

##### 2.2 การเตรียมสารสกัด morelloflavone จากมะพูด

ในการทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์สารบริสุทธิ์ morelloflavone จาก ห้องวิจัย รศ.ดร.วิลาวัลย์ มหาบุษราคัม ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (Deachathai et al., 2005)

ผลมะพูดในการทดลองเก็บจากอำเภอเมือง จังหวัดสงขลา ประเทศไทยและได้ เก็บตัวอย่างพืชไว้ใน herbarium (Collection. No. 02, Herbarium No. 0012652) ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

นำผลมะพูดผลดิบ 8 kg หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ แช่ใน acetone เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นเก็บสารละลายหรือสารสกัดที่ได้จาก acetone ไว้ จากนั้นแช่มะพูดใน methanol อีกเป็นเวลา 3 วัน แล้วเก็บสารละลายหรือสารสกัดที่ได้จาก methanol ไว้ นำสารละลายหรือสารสกัดที่ได้จาก acetone และ methanol ไประเหย (evaporation) สารสกัดหยาบที่ได้จาก acetone ประมาณ 165.80 g ซึ่งแยกออกเป็น 2 ชั้น คือ 1) ชั้นบน (upper layer) เมื่อทำให้แห้ง โดยวิธีลดความดัน พบว่าสารสกัดหยาบมีลักษณะเหนียวหนืด (fraction A, 84.85 g) 2) ชั้นล่าง (lower layer) สกัดต่อด้วย butanol ตามด้วย dichloromethane และ ethyl acetate ได้เป็น dichloromethane soluble (fraction B1, 7.50 g)

ซึ่งใน ethyl acetate soluble (fraction B2, 37.53 g) พบสาร morelloflavone ได้จาก fraction B2I ประมาณ 20.60 mg มี MW 556 โดยการนำ fraction B2 ไปแยกสารสกัด ด้วยวิธี column chromatography ได้เป็น fraction B2A-B2K ซึ่ง fraction B2I นำไปแยกสารสกัดโดยใช้ตัวทำละลาย dichloromethane-acetone ด้วยวิธี column chromatography ได้เป็น สาร morelloflavone

### 2.3 ยาและสารเคมี

1. phenylephrine hydrochloride ( $C_9H_{13}NO_2$ ), Sigma, St.Louis, MO, USA
2. acetylcholine ( $C_7H_{16}NO_2$ ), Sigma, St.Louis, MO, USA
3. sodium nitroprusside ( $C_5FeN_6Na_2O \cdot 2H_2O$ ), Sigma, St.Louis, MO, USA
4. calcium chloride – dihydrate ( $CaCl_2 \cdot HCl$ ), Merck, Darmstadt, Germany
5. D(+)-glucose monohydrate ( $C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$ ), Riedel-de Haën, Seelze, Germany
6. dimethylsulfoxide (DMSO) ( $C_2H_6OS$ ) Sigma, St. Louis, MO, USA
7. magnesium sulphate ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ), May & Baker, Dagenham, England
8. potassium dihydrogen phosphate ( $KH_2PO_4$ ), Riedel-de Haën, Seelze, Germany
9. potassium chloride (KCl), Riedel-de Haën, Seelze, Germany
10. sodium chloride (NaCl), Ajax Finechem, Seven Hills, Australia
11. sodium hydrogen carbonate ( $NaHCO_3$ ), Asia Pacific Specialty, Seven Hills, Australia
12. cisplatin Pfizer Pty Limited, Bentley, Australia and
13. thiopental sodium Scott-Edil Pharmacia Ltd., Soltan (H.P.), India

### 2.4 อุปกรณ์

1. ชุดเครื่องมือผ่าตัดสัตว์ทดลอง
2. ชุด isolated organ bath ขนาด 20 ml
3. เครื่องควบคุมอุณหภูมิน้ำ (thermostat-heater-circulator) model DIN12879 KLASSE I W, HAAKE, Karlsruhe, Germany
4. เครื่องบันทึก MacLab, model 4/20 ADInstruments พร้อมอุปกรณ์ประกอบด้วย force transducer, Model 1030, bridge Amplifier, model 110, และโปรแกรม

chart version 7 สำหรับบันทึกการทดลอง, ADInstruments Pty Ltd, New South Wales, Australia

5. เครื่องชั่งละเอียดตำแหน่ง, model AE200, CH-8606, Greifensee, Switzerland
6. ไปเปิดอัตโนมัติ (automatic pipettes), Eppendorf, Geritebau, Hamburg, Germany
7. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter), model UB-5, Denver Instruments, Denver, USA
8. ถังก๊าซคาร์โบเจน (95%O<sub>2</sub> + 5% CO<sub>2</sub>) พร้อมตัวปรับก๊าซ (gas regulator)
9. เครื่องเหวี่ยงตะกอนความเร็วสูง (centrifuge), Model 4232, A. L. C., Milan, Italy
10. mixer, model VTX-3000L, Tokyo, Japan
11. spectrophotometer (model Spectro SC, Labomed, Culver City, California, USA)

## 2.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

### 2.5.1 ขอบเขตการวิจัย

1. การศึกษาผลการคลายตัวของ morelloflavone แบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว
  - 1.1 control แบ่งเป็นสองกลุ่มย่อย คือ intact endothelium และ denuded หนูกลุ่มนี้จะได้รับการฉีด 0.9% NaCl
  - 1.2 cisplatin หนูกลุ่มนี้จะได้รับการฉีด cisplatin 7.5 mg/kg ทางช่องท้อง
2. การศึกษาผลของ morelloflavone ต่อการหดตัวและคลายตัวของหลอดเลือดแดงชอราลคในหนูที่ได้รับ cisplatin แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มหลัก หรือ 6 กลุ่มย่อย กลุ่มละ 6-8 ตัว ดังนี้
  - 2.1 vehicle control หนูกลุ่มนี้จะได้รับการฉีด DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย morelloflavone (1 ml/kg) 1 วันและ 10 นาที ก่อนฉีดตัวทำละลายของ cisplatin (0.9% NaCl) 15 ml/kg เข้าทางช่องท้อง การทดลองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่ intact endothelial group และ denuded group
  - 2.2 กลุ่ม cisplatin หนูกลุ่มนี้จะได้รับการฉีด DMSO (1 ml/kg) 1 วันและ 10 นาที ก่อนฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

2.3 กลุ่ม cisplatin + morelloflavone หนูกลุ่มนี้จะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อยตามขนาดของ morelloflavone 0.1, 1 และ 10 mg/kg BW ละลายใน DMSO 1 วันและ 10 นาที ก่อนฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg เข้าทางช่องท้อง

## 2.5.2 วิธีดำเนินการทดลอง

### 1. การเตรียมสารละลาย Krebs Henseleit

การเตรียมสารละลาย Krebs Henseleit ในการทดลองเพื่อศึกษาการหดตัวและคลายตัวของ thoracic aortic ring ซึ่งสารละลาย Krebs Henseleit ประกอบด้วยสารต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นในหน่วย mM/L ดังนี้ KCl 4.6, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.12, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.18, NaHCO<sub>3</sub> 25.0, D-glucose 11.66, NaCl 118.41, CaCl<sub>2</sub> 1.90 โดยนำสารที่ต้องการเตรียมมาชั่งน้ำหนักโดยคำนวณค่าความเข้มข้นที่ต้องการเป็น Molar (M) จากสูตร  $(M) = \frac{\text{น้ำหนักสาร (g)}}{\text{น้ำหนักของมวลโมเลกุล (MW)}}$  และละลายสารในน้ำกลั่น แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วย hydrochloric acid (HCl) ที่ความเข้มข้น 2 N

### 2. การเตรียม stock solution ของ morelloflavone

ซึ่งสาร morelloflavone ซึ่งมีลักษณะเป็นผงโดยใช้เครื่องชั่งละเอียดสี่ตำแหน่ง โดยคำนวณค่าความเข้มข้นที่ต้องการเป็น Molar (mole/L) จากสูตร  $(M) = \frac{\text{น้ำหนักสาร (g)}}{\text{น้ำหนักของมวลโมเลกุล (MW)}}$  แล้วละลายด้วย dimethyl sulfoxide (DMSO) จนได้ความเข้มข้นของ stock solution 8 ขนาด ระหว่าง  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  M แต่ละขนาดต่างกัน 10 เท่า ดังนี้  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  และ  $10^{-2}$  M

### 3. การเตรียม stock solution ของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh), และ sodium nitroprusside (SNP)

นำสารที่ต้องการเตรียมมาชั่งน้ำหนักโดยคำนวณค่าความเข้มข้นที่ต้องการเป็น Molar (mole/L) จากสูตร  $(M) = \frac{\text{น้ำหนักสาร (g)}}{\text{น้ำหนักของมวลโมเลกุล (MW)}}$  จากนั้นนำมาละลายด้วยน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นของ stock solution ดังนี้ คือ PE 6 ขนาด ระหว่าง  $10^{-7}$ - $10^{-1}$  M แต่ละขนาดต่างกัน 10 เท่า, ACh 8 ขนาด ระหว่าง  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  M และ SNP ระหว่าง  $10^{-9}$ - $10^{-2}$  M

### 4. การทดลองในหลอดเลือดแดง thoracic aorta

นำหนูมาชั่งน้ำหนัก จากนั้นฉีดยาสลบ thiopental sodium ขนาด 60 mg/kg น้ำหนักตัวหนู เข้าทางช่องท้อง รอให้หนูสลบลึก จากนั้นทำให้หนูเสียชีวิตด้วยการตัดคอโดยเครื่อง guillotine ทำการผ่าตัดเปิดหน้าอกตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic ยาวประมาณ 2.5 -



3 cm ออกแช่ใน Krebs Henseleit solution ที่อุณหภูมิ 4 °C นำหลอดเลือดมาแยก connective tissue และไขมันรอบ ๆ ออกบน petri dish ที่มี Krebs Henseleit solution และ carbogen gas (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) ผ่านตลอดเวลาและตัดหลอดเลือดให้ได้ขนาด 4-5 mm ต่อชิ้น จำนวน 4 ชิ้น สำหรับการเตรียม denuded aortic rings ทำโดยวิธี mechanical disruption แบบ gentle denuded คือการทำลายชั้น tunica intima แต่ไม่ถึงชั้น tunica media (Fingerle et al., 1990) โดยการสอด stainless steel ขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 mm เข้าไปในหลอดเลือดแล้วถูผนังด้านในหลอดเลือดเบา ๆ ประมาณ 30 วินาทีจากนั้นนำหลอดเลือดไปแขวนใน organ bath ที่มี Krebs Henseleit solution ที่ 37 °C โดยให้ carbogen gas ผ่านตลอดเวลา และตัดหลอดเลือด ความยาว 2 mm 2 ชิ้นสำหรับศึกษา histopathology

## 5. แผนการทดลองใน isolated thoracic aortic ring

### 5.1 การศึกษาขนาดของ PE ต่อการหดตัวของ aortic ring

การบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อ เริ่มการทดลองโดยปรับให้หลอดเลือดมีความตึงขณะพักที่ 1 g และ equilibrate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ใน organ bath ทุก ๆ 15 นาที การทดลองจะเริ่มเมื่อหลอดเลือดทั้งหมดที่มีแรงตึงคงที่ประมาณ 0.9-1.09 g การทดลองเริ่มด้วยการหยด stock solution PE จำนวน 8 ความเข้มข้น ระหว่าง 10<sup>-7</sup> - 10<sup>-1</sup> M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20 µl ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ 10<sup>-10</sup> -10<sup>-4</sup> M ตามลำดับ เป็นการให้สารแบบ cumulative บันทึก tension ตลอดเวลาการทดลองและอ่านค่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วย Krebs Henseleit solution รอให้เส้นบันทึกคงที่

ความเข้มข้นของ PE ที่เลือกใช้ในการชักนำให้เกิด precontraction ก่อนการทดลองข้อ 5.2 คือความเข้มข้นที่ทำให้ aortic ring หดตัวประมาณ 70% ของค่า maximal tension

### 5.2 การศึกษาขนาดของ ACh และ SNP ต่อการคลายตัวของ aortic ring

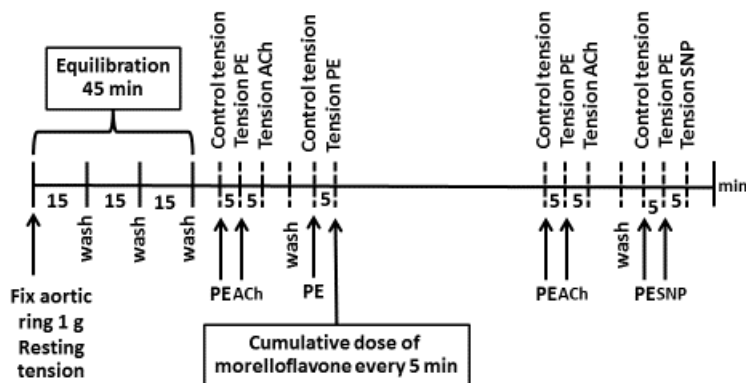
กระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหดตัวคงที่ จากนั้นหยด stock solution ของ ACh จำนวน 9 ขนาด ระหว่าง 10<sup>-10</sup> - 10<sup>-2</sup> M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20 µl การทดลองแบ่งเป็น 2 กลุ่มได้แก่ กลุ่มที่มี endothelium (intact endothelium) และกลุ่มที่มีการทำลาย endothelium (denude) เป็นการให้สารแบบ cumulative บันทึก tension ตลอดเวลาการทดลองและอ่านค่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วย Krebs Henseleit solution รอให้เส้นบันทึกค่า resting tension หลังจากนั้นกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหด

ตัวคงที่ จากนั้นหยด stock solution ของ SNP จำนวน 9 ความเข้มข้น ระหว่าง  $10^{-9}$  –  $10^{-2}$  M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20  $\mu$ l ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-12}$  –  $10^{-5}$  M ตามลำดับ ทำการทดสอบการหดตัวและการคลายตัวของหลอดเลือดอีกครั้งหนึ่ง ด้วย PE และ ACh จากนั้นทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดโดยใช้ SNP ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-5}$  M เพื่อทดสอบการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดตรวจสอบในกรณี endothelium ถูกทำลายหรือเสียหายระหว่างการทดลอง

#### 6. การศึกษาฤทธิ์ของ morelloflavone ต่อคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย PE

เริ่มการทดลองโดยปรับความตึงของหลอดเลือดให้มีความตึงขณะพักที่ 1 g จากนั้น equilibrate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ใน organ bath ทุก ๆ 15 นาที การทดลองจะเริ่มเมื่อหลอดเลือดทั้งหมดที่มีแรงตึงคงที่ประมาณ 0.9 - 1.09 g ทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดเพื่อยืนยันว่าเป็นกลุ่มที่มี endothelium (intact endothelium) และกลุ่มที่มีการทำลาย endothelium (denuded) โดยกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหดตัวคงที่ จากนั้นหยด ACh ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.2 aortic rings ที่มีการคลายตัวได้มากกว่าหรือเท่ากับ 80% ถือว่าเป็น intact endothelium ส่วนกลุ่มที่ไม่คลายตัวถือว่าเป็นกลุ่ม denuded หลังจากนั้นล้างออกด้วยสารละลาย Krebs Henseleit

ต่อมากระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหดตัวคงที่ จากนั้นหยด stock solution ของ morelloflavone จำนวน 9 ขนาด ระหว่าง  $10^{-10}$  -  $10^{-2}$  M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20  $\mu$ l การทดลองแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่มี endothelium (intact endothelium), กลุ่มที่มีการทำลาย endothelium (denude) และกลุ่มที่ได้รับการฉีด cisplatin (Cis) เป็นการให้สารแบบ cumulative บันทึก tension ตลอดเวลาการทดลองและอ่านค่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วย Krebs Henseleit solution รอให้เส้นบันทึกคงที่ จากนั้นบันทึกค่า resting tension ทำการทดสอบการหดตัวและการคลายตัวของหลอดเลือดอีกครั้งหนึ่ง ด้วย PE และ ACh จากนั้นทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดโดยใช้ SNP ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-5}$  M เพื่อทดสอบการคลายตัวของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดตรวจสอบในกรณี endothelium ถูกทำลายหรือเสียหายระหว่างการทดลอง



Ach : acetylcholine  
 PE : Phenylephrine  
 SNP : sodium nitroprusside  
 --- : อ่านค่า tension

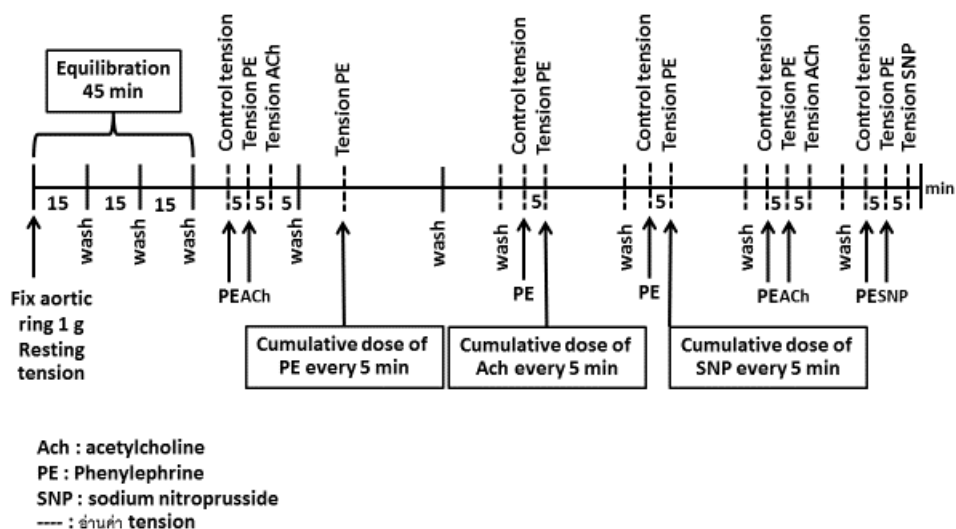
รูปที่ 2.1 แผนผังการทดลองศึกษาการออกฤทธิ์ของ morelloflavone ในหลอดเลือดแดง thoracic

## 7. การศึกษาผลของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring

เริ่มการทดลองโดยปรับให้หลอดเลือดมีความตึงขณะพักที่ 1 g และ equilibrate หลอดเลือด 45 นาที โดยเปลี่ยนสารละลาย Krebs Henseleit ใน organ bath ทุก ๆ 15 นาที หยด stock solution PE จำนวน 8 ความเข้มข้น ระหว่าง  $10^{-7}$  -  $10^{-2}$  M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20  $\mu$ l ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M ตามลำดับ เป็นการให้สารแบบ cumulative บันทึก tension ตลอดเวลาการทดลองและอ่านค่าทุก ๆ 5 นาที จากนั้นล้างออกด้วย Krebs Henseleit solution รอให้เส้นบันทึกคงที่

จากนั้นกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหดตัวคงที่ จากนั้นหยด stock solution ของ ACh จำนวน 9 ขนาด ระหว่าง  $10^{-10}$  -  $10^{-2}$  M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20  $\mu$ l ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M ตามลำดับ จากนั้นล้างออกด้วย Krebs Henseleit solution รอให้เส้นบันทึกคงที่

หลังจากนั้นกระตุ้นการหดตัวของหลอดเลือดโดยใช้ PE ความเข้มข้นที่ได้จากข้อ 5.1 ให้การหดตัวคงที่ จากนั้นหยด stock solution ของ SNP จำนวน 9 ความเข้มข้น ระหว่าง  $10^{-9}$  -  $10^{-2}$  M ตามลำดับ แต่ละขนาดหยดครั้งละ 20  $\mu$ l ซึ่งทำให้ได้ความเข้มข้นใน organ bath เท่ากับ  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M ตามลำดับ



รูปที่ 2.2 แผนผังการทดลองศึกษาการตอบสนองต่อ PE, ACh และ SNP

## 8. การหาค่า lipid peroxidation ของ plasma

ทำโดยหาปริมาณ MDA ตามวิธีของ Ohkawa et al.,(1979) โดยนำ plasma ที่เตรียมไว้มา 0.8 ml จากนั้นเติม 8.1% SDS 0.2 ml, 20% acetic acid 1.5 ml ปรับให้ได้ pH 3.5 ด้วย NaOH เติม 0.8% TBA 1.5 ml ผสมสารทั้งหมดแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 4 ml นำไปต้มที่อุณหภูมิ 95-100 °C นาน 60 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 1 ml และ n-butanol 5 ml เขย่าสารแล้วนำไป centrifuge 4,000 rpm นาน 10 นาที นำสารชั้นบนมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm แล้วหาค่าความเข้มข้นของสารโดยการอ่านค่าจากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นมาตรฐานของ 1,1,3,3 tetramethoxypropane ซึ่งใช้เป็น standard กับค่า absorbance ปริมาณ MDA จะแสดงในหน่วย  $\mu\text{mole}$

## 9. การศึกษา histopathology

หลอดเลือดแดง 2 ชั้น ความยาว 2 mm fix ใน Bouin's solution เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมา embed ใน paraffin นำชิ้นเนื้อไปตัดด้วย rotary microtome ที่ 6  $\mu\text{m}$  จะได้เนื้อเยื่อออกมาเป็นแผ่น ribbon นำไปติดที่แผ่นสไลด์ จากนั้นนำตัวอย่างไปย้อมด้วยสี Mayer's hematoxylin-eosin (H&E) จากนั้นตรวจสอบความเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหลอดเลือดโดยวิธีทางพยาธิวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Olympus DP 73 microscope (Olympus Optical Co, Ltd, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 40 เท่า

## 2.6 การคำนวณ

**2.6.1** วิธีการคำนวณค่า % increase from resting tension และ % relaxation from precontraction ที่ได้จากการทดลองในหลอดเลือดแดง thoracic โดยใช้สูตร

$$\% \text{ increase from resting tension} = \frac{T_{PE} - T_C}{T_C} \times 100$$

$$\% \text{ relaxation from precontraction} = \frac{(T_{PE} - T_C) - (T_M - T_C)}{(T_{PE} - T_C)} \times 100$$

โดย  $T_{PE}$  คือค่า tension ที่เกิดจากการหยด  $10^{-7}$  M PE

$T_M$  คือค่า tension ที่เกิดจากการหยด morelloflavone, ACh และ SNP

$T_C$  คือค่าของ control tension (resting tension)

## 2.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองในแต่ละกลุ่มจะเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนหนูแต่ละกลุ่ม ซึ่งหนูแต่ละตัวในกลุ่มจะมีผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ยจากผลการทดลองใน aortic ring 4 ชั้น ในหนู 1 ตัว จะนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ยและค่าผิดพลาดเฉลี่ยมาตรฐาน (mean  $\pm$  S.E.M) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มโดย t-test และ one-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย Student-Newman Keul post hoc test วิเคราะห์แตกต่างของตัวแปรในกลุ่มเดียวกัน ใช้ one-way repeated measure ANOVA และ Student-Newman-Keul post hoc test โดยยอมรับความแตกต่างที่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ P value < 0.05

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

#### 3.1 ผลของ morelloflavone ต่อ ร้อยละการตายและการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับ cisplatin

หลังจากฉีด cisplatin เป็นเวลา 7 วันพบว่าหนูมีอัตราการรอดชีวิต 55.6% ในกลุ่มที่ได้รับ morelloflavone 0.1 และ 1 mg/kg พบว่าสามารถลดอัตราการตายของหนูลงทำให้หนูมีอัตราการรอดชีวิต 61.5% และ 71.4% ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับ morelloflavone 10 mg/kg พบว่าอัตราการตาย 50% ส่วนหนูในกลุ่ม vehicle control (Con) ไม่มีหนูตายเกิดขึ้น แสดงในตารางที่ 3.1

ในกลุ่ม vehicle control น้ำหนักของหนูเพิ่มขึ้น  $25.7 \pm 2.9$  g การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักหนูในกลุ่ม vehicle control เป็นการแสดงการเจริญแบบปกติของหนู ในหนูกลุ่มที่ได้รับ cisplatin (7.5 mg/kg) ทำให้น้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle control  $44.3 \pm 5.9$  g ( $P < 0.05$ ) การลดลงของน้ำหนักแสดงให้เห็นถึงความเป็นพิษของ cisplatin ต่อสมดุอาหารและของเหลวในร่างกาย morelloflavone 1 mg/kg ช่วยป้องกันความเป็นพิษจาก cisplatin ทำให้อนุมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น  $7.5 \pm 5.2$  g ต่างจากกลุ่ม cisplatin อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ morelloflavone 0.1 และ 10 mg/kg ไม่ได้ต่างจากกลุ่ม cisplatin อย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3.1 ผลของ morelloflavone ต่อร้อยละการตายและการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวในหนูที่ได้รับ cisplatin, vehicle control (Con) n=6; cisplatin (Cis) n=18 ; cisplatin+morelloflavone 0.1 mg/kg (Cis+Mor 0.1 mg/kg) n=13 ; cisplatin+morelloflavone 1 mg/kg (Cis+Mor 1 mg/kg) n=14 ; cisplatin+morelloflavone 10 mg/kg (Cis+Mor 10 mg/kg) n=16 ;+ = เพิ่มขึ้น, - = ลดลง

Treatment	Pre-BW (g)	Post-BW (g)	$\Delta$ BW (g)	Survival rate (%)
Vehicle control	266.7 $\pm$ 4.5	292.3 $\pm$ 6.5	25.7 $\pm$ 2.9	100
Cis (7.5 mg/kg)	280.4 $\pm$ 3.4	236.1 $\pm$ 5.1	-44.3 $\pm$ 5.9*	55.6
Cis+Mor 0.1 mg/kg	270.8 $\pm$ 5.7	239.8 $\pm$ 4.8	-31.0 $\pm$ 7.2*	61.5
Cis+Mor 1 mg/kg	265.0 $\pm$ 4.7	270.1 $\pm$ 6.7	7.5 $\pm$ 5.2*#	71.4
Cis+Mor 10 mg/kg	269.0 $\pm$ 5.6	228.0 $\pm$ 8.7	-41.0 $\pm$ 7.3*	50

\*, #  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

### 3.2 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE) และ acetylcholine (ACh) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring

#### 3.2.1 การตอบสนองของ PE ต่อ aortic ring

ผลของ PE ต่อการหดตัวของ aortic ring แสดงในรูปที่ 3.1 จากการทดลองเมื่อให้ PE ที่ความเข้มข้น  $10^{-10}$  –  $10^{-4}$  M แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า พบว่าหลอดเลือดมีความแข็งแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากค่า resting tension ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  –  $10^{-4}$  M ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M  $89.07 \pm 5.46\%$ , ที่  $10^{-6}$  M  $138.1 \pm 6.57\%$ , ที่  $10^{-5}$  M  $145.44 \pm 7.6\%$ , ที่  $10^{-4}$  M  $126.64 \pm 5.54\%$  ตามลำดับ

ผลของ PE ต่อการหดตัวของ denuded ring แสดงในรูปที่ 3.1 จากการทดลองเมื่อให้ PE ที่ความเข้มข้น  $10^{-10}$  –  $10^{-4}$  M แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า พบว่าหลอดเลือดมีความแข็งแรงในการหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากค่า resting tension ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M ที่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  M  $53.75 \pm 5.96$ , ที่  $10^{-7}$  M  $139.48 \pm 11.71\%$ , ที่  $10^{-6}$  M  $180.82 \pm 5.18\%$ , ที่  $10^{-5}$  M  $186.79 \pm 5.39\%$ , ที่  $10^{-4}$  M  $181.11 \pm 5.06\%$  ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของ aortic ring ที่ได้รับ PE ที่ความเข้มข้นเดียวกัน ระหว่างกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denuded พบว่า aortic ring กลุ่ม denuded มีการหดตัวมากกว่ากลุ่ม intact endothelium อย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-8}$  –  $10^{-4}$  M

ดังนั้นการศึกษาผลของ morelloflavone จากผลมะพูดต่อการหดตัวของหลอดเลือดแดงธอราซิกในหนูที่ได้รับ cisplatin จะเลือกใช้ความเข้มข้นของ PE ที่ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวก่อน (precontraction) ประมาณ 70% ของค่า maximal tension คือ  $10^{-7}$  M

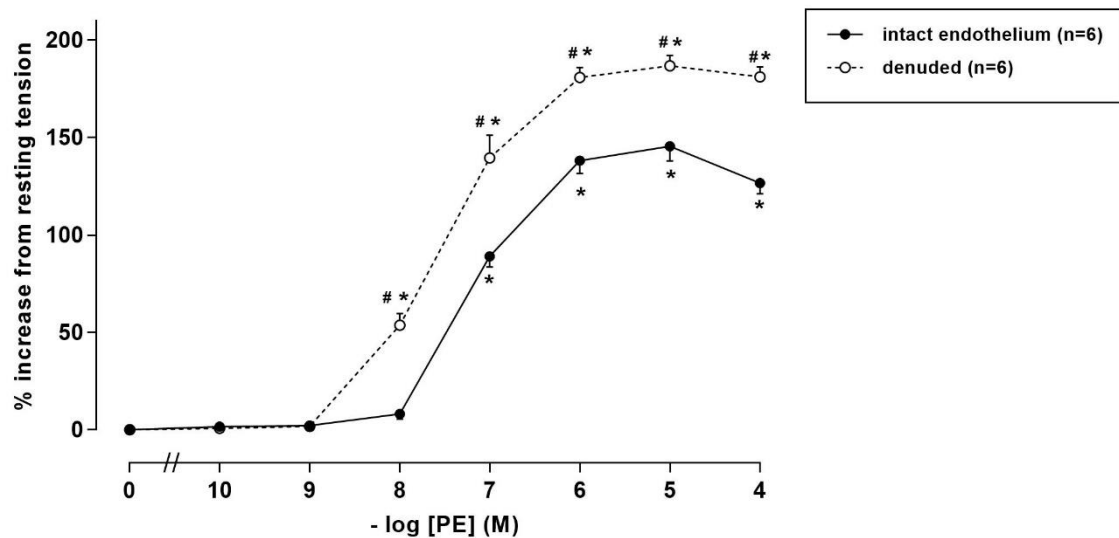
#### 3.2.2 การตอบสนองของ ACh ต่อ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$ M PE

ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม intact endothelium แสดงในรูปที่ 3.2 ผลการทดลองเมื่อให้ ACh จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้น ใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$  –  $10^{-5}$  M ผลการทดลองนี้แสดงค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction พบว่า aortic ring กลุ่ม intact endothelium มีการคลายตัวอย่างมีนัยยะสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M ดังนี้ ที่ความเข้มข้น  $10^{-11}$  M  $10.01 \pm 1.28\%$ , ที่  $10^{-10}$  M  $18.72 \pm 1.34\%$ , ที่  $10^{-9}$  M  $22.72 \pm 1.91\%$ , ที่  $10^{-8}$  M  $26.74 \pm 2.37\%$ , ที่  $10^{-7}$  M  $69.69 \pm 3.45\%$ , ที่  $10^{-6}$  M  $100.11 \pm 0.78\%$  และที่  $10^{-5}$  M  $103.89 \pm 0.92\%$  ตามลำดับ

ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม denude แสดงในรูปที่ 3.2 จากการทดลองเมื่อให้ ACh จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$ - $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring กลุ่ม denude มีการคลายตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control

เมื่อเปรียบเทียบการคลายตัวของ aortic ring ที่ได้รับ ACh ที่ความเข้มข้นเดียวกันระหว่างกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denude พบว่า aortic ring กลุ่ม denude มีการคลายตัวน้อยกว่ากลุ่ม intact endothelium อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M

จากการทดลอง จึงเลือกใช้ ACh ที่ความเข้มข้น  $10^{-5}$  M ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้ aortic ring คลายตัวได้สูงสุด จากค่า control ซึ่ง ACh จะนำไปทดสอบการคลายตัวของ aortic ring ก่อนและหลังการทดลอง



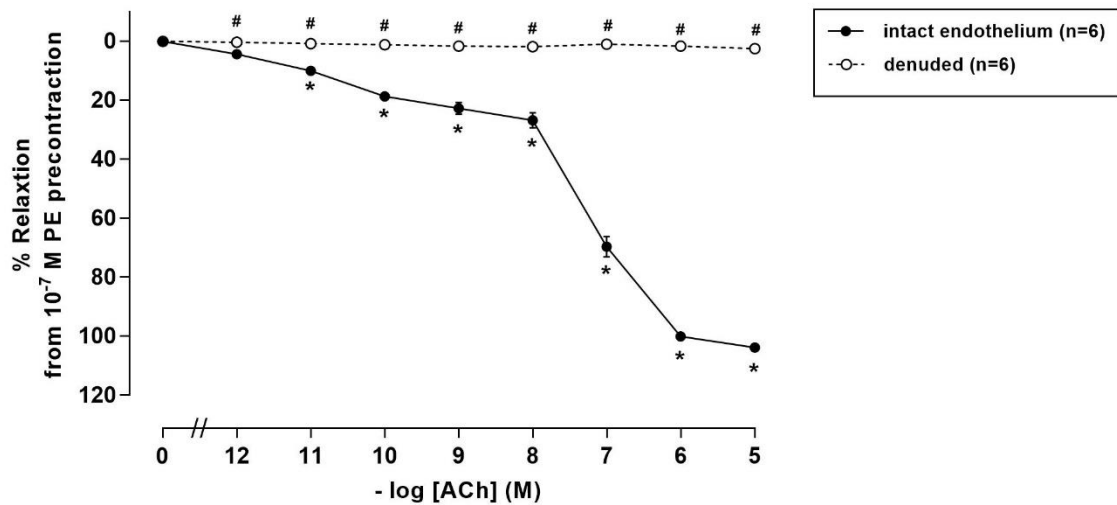
รูปที่ 3.1 ผลของ phenylephrine (PE) ความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-10}$  -  $10^{-4}$  M ต่อการหดตัวของ aortic ring ที่แสดงโดยค่า % increase from resting tension

ค่าที่ แสดงคือ mean  $\pm$  S.E.M. (n=6)

\* $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ของกลุ่มเดียวกัน (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

# $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact endothelium (unpaired t-test)





รูปที่ 3.2 ผลของ acetylcholine (ACh) ต่อการคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ที่แสดงโดยค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction

ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  S.E.M. (n=6)

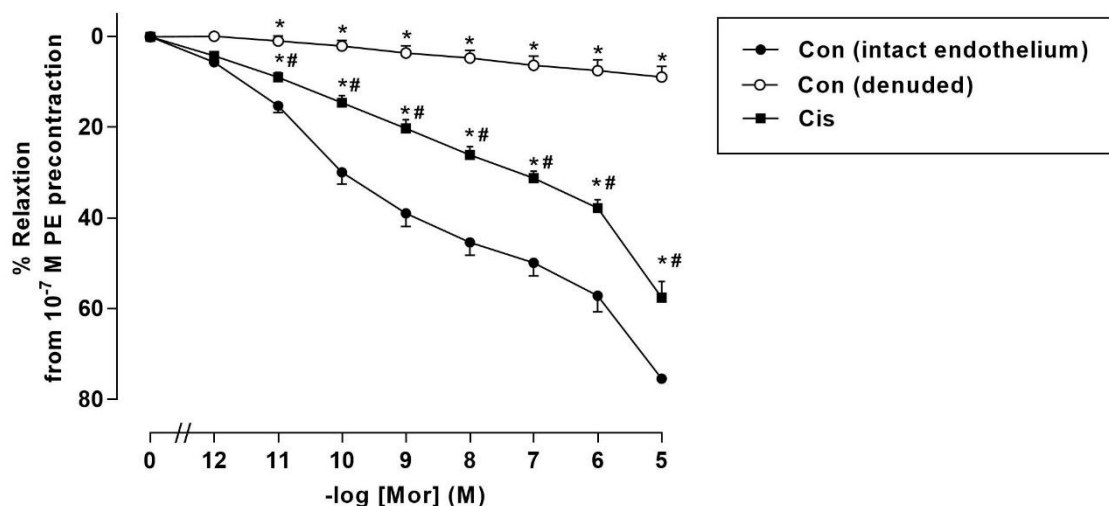
\*P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ของกลุ่มเดียวกัน (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

#P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact endothelium (unpaired t-test)

### 3.3 การศึกษาฤทธิ์ของ morelloflavone ต่อคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$ M PE

ผลของ morelloflavone ต่อคลายตัวของ aortic ring กลุ่ม vehicle control (Con) ที่มี endothelium (intact endothelium) และ endothelium ถูกทำลาย (denuded) และกลุ่ม cisplatin (Cis) ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE แสดงในรูปที่ 3.3 ผลการทดลองนี้แสดงค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction เมื่อให้ morelloflavone จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้น ใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring ที่ได้รับ morelloflavone ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-11}$ ,  $10^{-10}$ ,  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M aortic ring ในกลุ่ม Cis มีการคลายตัวน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (intact endothelium) อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ดังนี้ ที่ความเข้มข้น  $10^{-11}$  M  $8.97 \pm 1.06$  และ  $15.22 \pm 1.39$ , ที่  $10^{-10}$  M  $14.55 \pm 1.51$  และ  $29.88 \pm 2.5$ , ที่  $10^{-9}$  M  $20.24 \pm 1.89$  และ  $38.93 \pm 2.79$ , ที่  $10^{-8}$  M  $26.06 \pm 1.76$  และ  $45.34 \pm 2.76$ , ที่  $10^{-7}$  M  $31.18 \pm 1.45$  และ  $49.82 \pm 2.83$ , ที่  $10^{-6}$  M  $37.76 \pm 1.76$  และ  $57.11 \pm 3.51$  ตามลำดับโดยมีค่า maximal relaxation,  $E_{max}$  (%) ที่ความเข้มข้น  $10^{-5}$  M ของกลุ่ม Cis และ กลุ่ม Con (intact endothelium) เท่ากับ  $75.44 \pm 0.95\%$  และ  $57.54 \pm 3.53\%$  ตามลำดับ โดยในกลุ่ม Con (denuded) ถูกยับยั้งการคลายตัวโดยสมบูรณ์

การศึกษาผลของ morelloflavone ต่อคลายตัวของ aortic ring พบว่า morelloflavone ทำให้ aortic ring คลายตัวโดยผ่านกลไกของ endothelium ซึ่งในกลุ่ม Cis มีความเสียหายของ endothelium ทำให้คลายตัวได้น้อยกว่ากลุ่ม Con (intact endothelium)



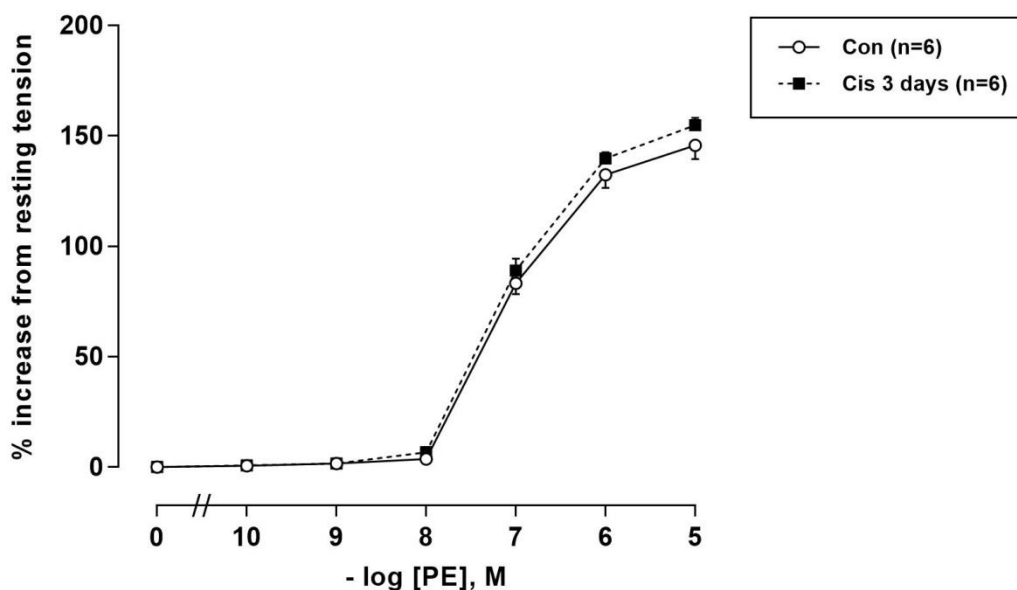
รูปที่ 3.3 ผลของ morelloflavone ต่อการคลายตัวของ aortic ring กลุ่ม control (Con) ที่มี endothelium (intact endothelium) และ endothelium ถูกทำลาย (denuded) และกลุ่ม cisplatin (Cis) ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE

ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM (n=6 ทุกกลุ่มการทดลอง)

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (intact endothelium) และ Con (denuded) ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

### 3.4 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน

การศึกษาผลของ phenylephrine (PE) ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน แสดงในรูปที่ 3.4 จากการทดลองเมื่อหลอดเลือดได้รับ PE ความเข้มข้น  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า พบว่า aortic ring ในกลุ่ม Cis มีการหดตัวไม่ได้แตกต่างจากกลุ่ม Con อย่างมีนัยสำคัญ

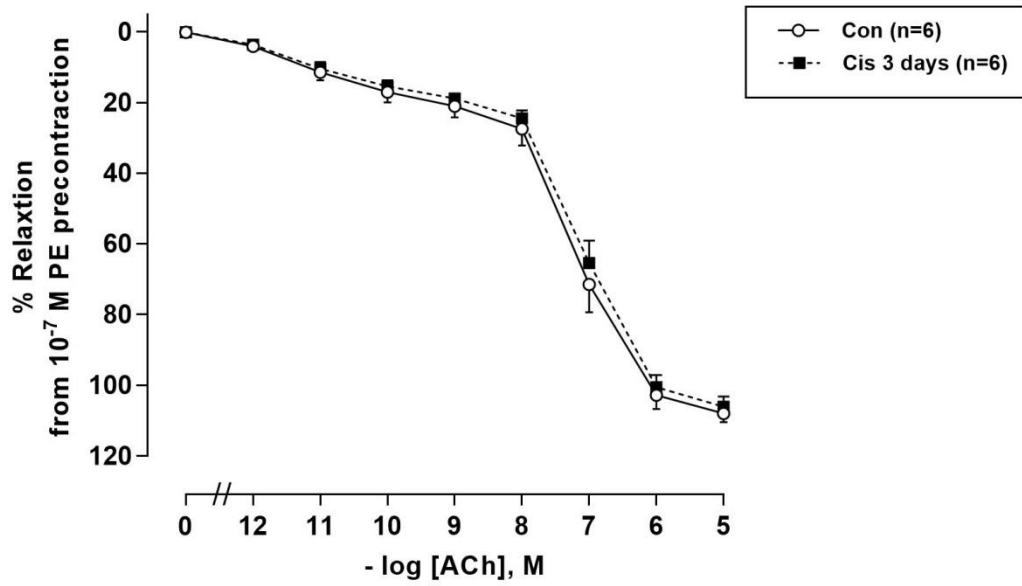


รูปที่ 3.4 ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

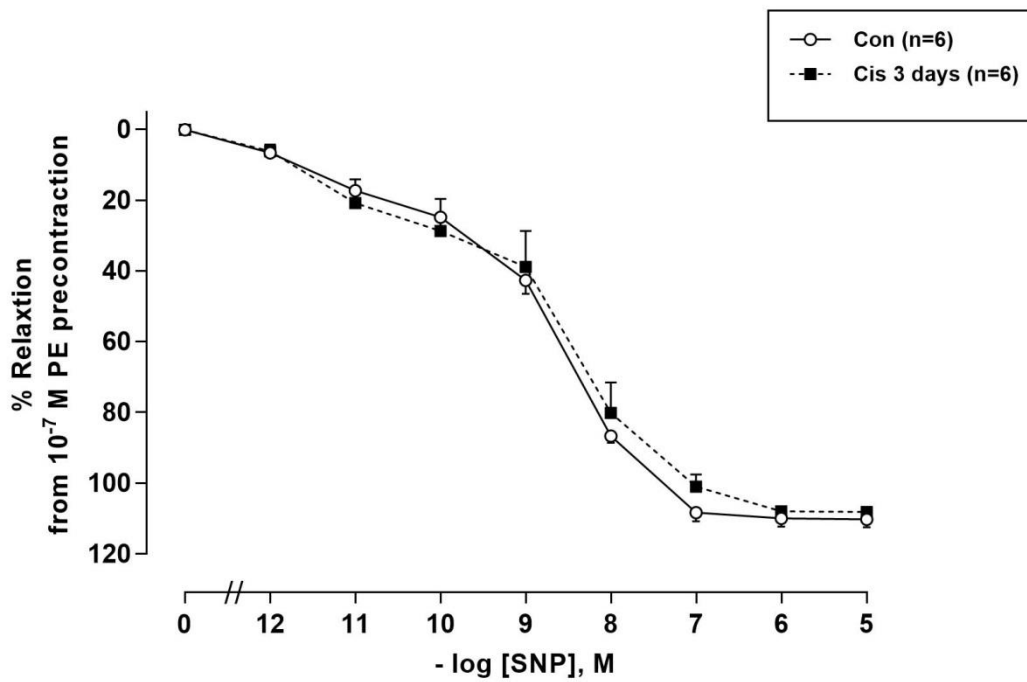
การศึกษารูปของ acetylcholine (ACh) ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม Con และ Cis 3 days แสดงในรูปที่ 3.5 ผลการทดลองนี้แสดงในค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction เมื่อให้ ACh จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring ในกลุ่ม Cis 3 days มีการคลายตัวได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con

การศึกษารูปของ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน ในกลุ่ม Con, Cis, แสดงในรูปที่ 3.6 ผลการทดลองนี้แสดงในค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction เมื่อให้ SNP จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring ตอบสนองต่อการคลายตัวต่อ SNP ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทั้งสองกลุ่ม

จากผลการศึกษารูปของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน พบว่ากลุ่ม Con และ Cis ไม่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงได้ทำการฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูความเสียหายที่เกิดขึ้นของหลอดเลือดและเพื่อศึกษารูปป้องกันของ morelloflavone ต่อ cisplatin ต่อไป



รูปที่ 3.5 ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM



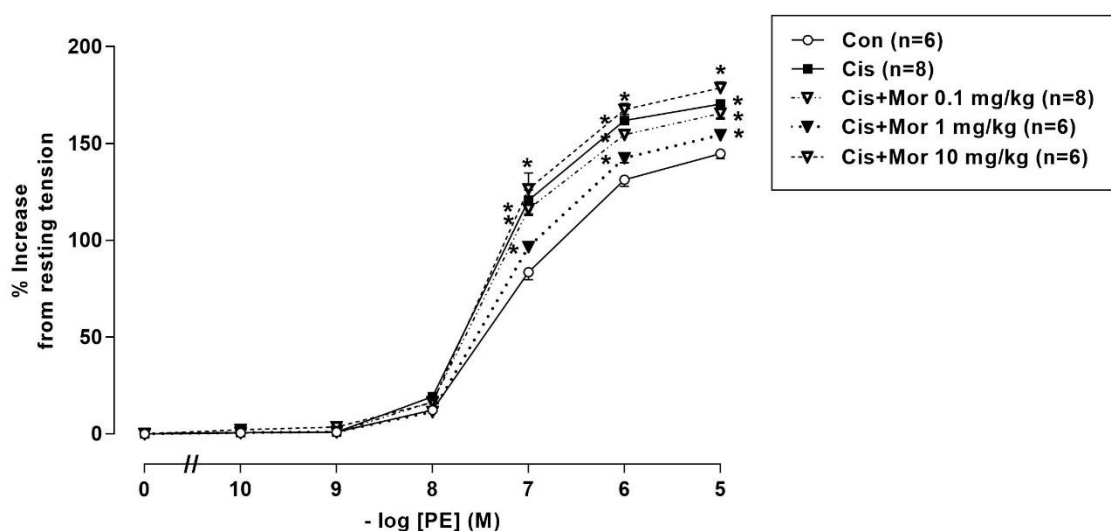
รูปที่ 3.6 ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

### 3.5 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 7 วัน

การศึกษาผลของ phenylephrine (PE) ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 7 วัน แสดงในรูปที่ 3.7 และตารางที่ 7 ในภาคผนวก จากการทดลองเมื่อหลอดเลือดได้รับ PE ความเข้มข้น  $10^{-10}$  -  $10^{-5}$  M ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า พบว่า aortic ring ในกลุ่ม Cis มีการหดตัวมากกว่ากลุ่ม Con อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ตั้งแต่ความเข้มข้นที่  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ดังนี้  $120.76 \pm 5.22$ ,  $161.91 \pm 3.09$  และ  $170.36 \pm 2.28$  ตามลำดับ

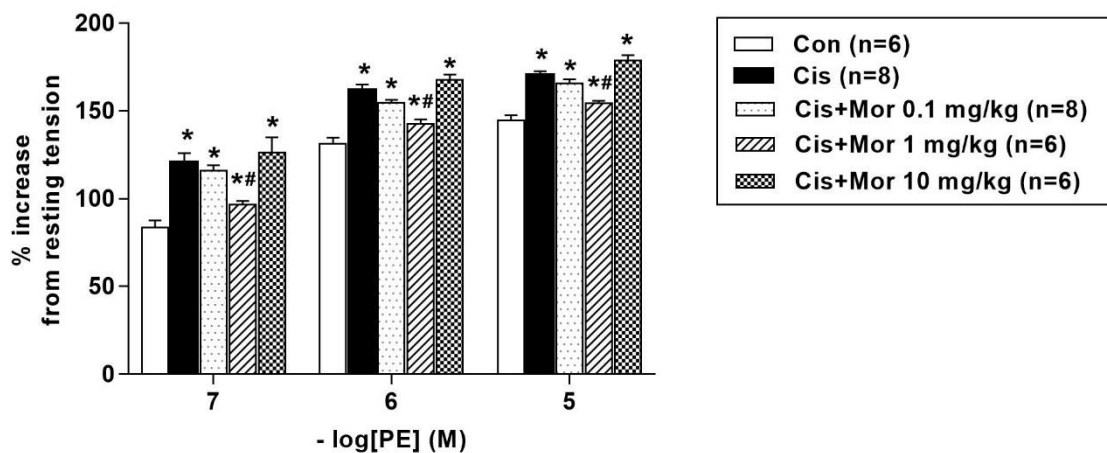
ในกลุ่ม Cis+Mor 1 mg/kg สามารถลดความแรงของการหดตัวเมื่อเทียบกับกลุ่ม Cis มีการหดตัวน้อยกว่ากลุ่ม Cis อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ดังแสดงในรูปที่ 3.8 ตั้งแต่ความเข้มข้นที่  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  ดังนี้  $96.64 \pm 2.15$ ,  $142.53 \pm 2.48$ ,  $154.42 \pm 1.34$  ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม Cis+Mor 0.1 และ 10 mg/kg มีการหดตัวไม่ต่างจากกลุ่ม Cis อย่างมีนัยสำคัญ

ในรูปที่ 3.7 แสดงในรูปกราฟเส้นโดยแสดงเครื่องหมาย \* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Con เพียงอย่างเดียว ในรูปที่ 3.8 แสดงในรูปของกราฟแท่งที่ความเข้มข้นของ PE ระหว่าง  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M เป็นการขยายจากรูปที่ 3.7 โดยแสดงเครื่องหมาย \* และ # มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับเพื่อให้เห็นภาพได้อย่างชัดเจนมากขึ้น



รูปที่ 3.7 ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม vehicle control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบเทียบกับกลุ่ม Con (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)



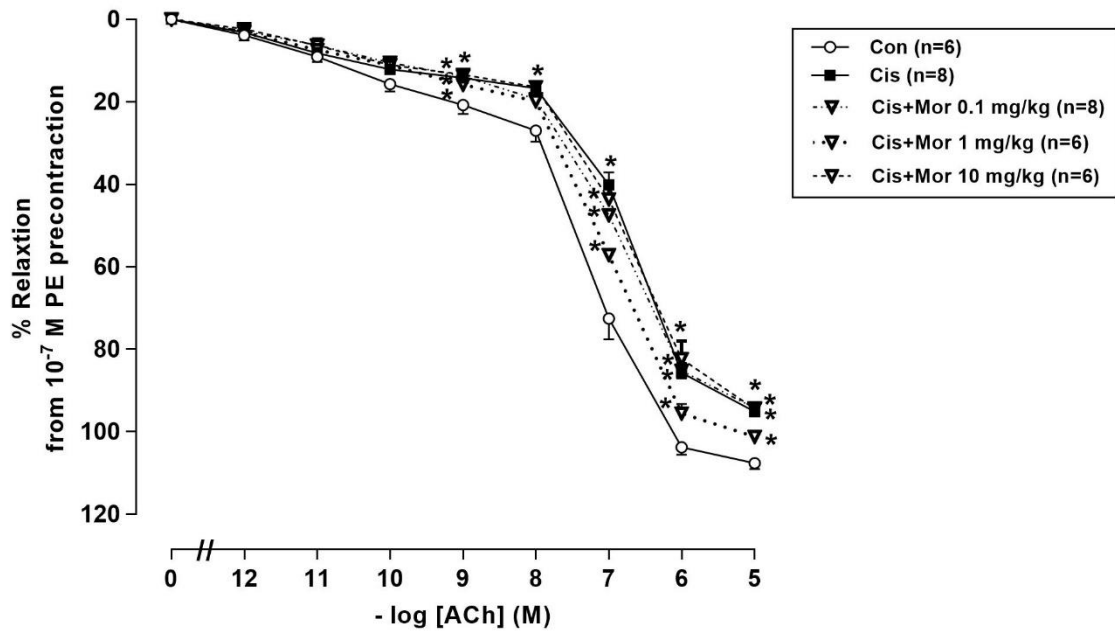
รูปที่ 3.8 ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-7}$  -  $10^{-5}$  M ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM \*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

การศึกษาผลของ acetylcholine (ACh) การคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม Con, Cis, Cis+Mor (0.1, 1 และ 10 mg/kg) แสดงในรูปที่ 3.9 ผลการทดลองนี้แสดงในค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction เมื่อให้ ACh จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้น ใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$ - $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring ที่ได้รับ ACh ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M aortic ring ในกลุ่ม Cis มีการคลายตัวน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (intact endothelium) อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ดังนี้ ที่ความเข้มข้น  $10^{-9}$  M  $14.16 \pm 1.8\%$ , ที่  $10^{-8}$  M  $16.65 \pm 1.57\%$ , ที่  $10^{-7}$  M  $40.13 \pm 2.98\%$ , ที่  $10^{-6}$  M  $85.68 \pm 2.05\%$  และที่  $10^{-5}$  M  $95.14 \pm 1.16\%$  ตามลำดับ

กลุ่ม Cis+Mor 1 mg/kg มีการคลายตัวมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Cis อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M ดังนี้ ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M  $57.1 \pm 0.89\%$ , ที่  $10^{-6}$  M  $95.53 \pm 2.18\%$  และที่  $10^{-5}$  M  $101.19 \pm 1.4\%$  ตามลำดับ

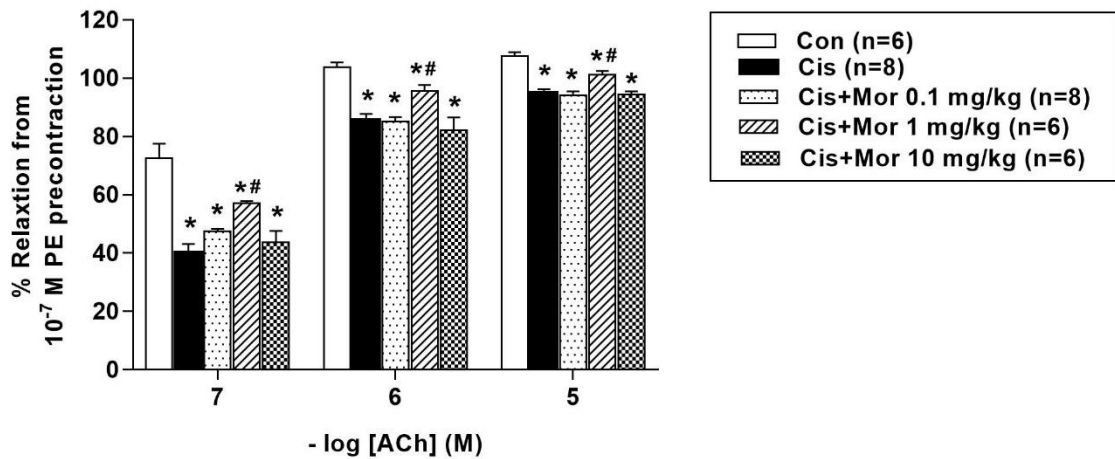
กลุ่ม Cis+Mor 0.1 และ 10 mg/kg มีการคลายตัวไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Cis แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Con ตั้งแต่ความเข้มข้น  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  และ  $10^{-5}$  M

โดยมีค่า maximal relaxation,  $E_{max}$  (%) ที่ความเข้มข้น  $10^{-5}$  M ของกลุ่ม Con, Cis และ Cis+Mor (0.1, 1 และ 10 mg/kg) เท่ากับ  $107.6 \pm 1.34$ ,  $95.14 \pm 1.16$ ,  $94.28 \pm 1.27$ ,  $101.19 \pm 1.4$  และ  $94.45 \pm 1.08$  ตามลำดับ



รูปที่ 3.9 ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

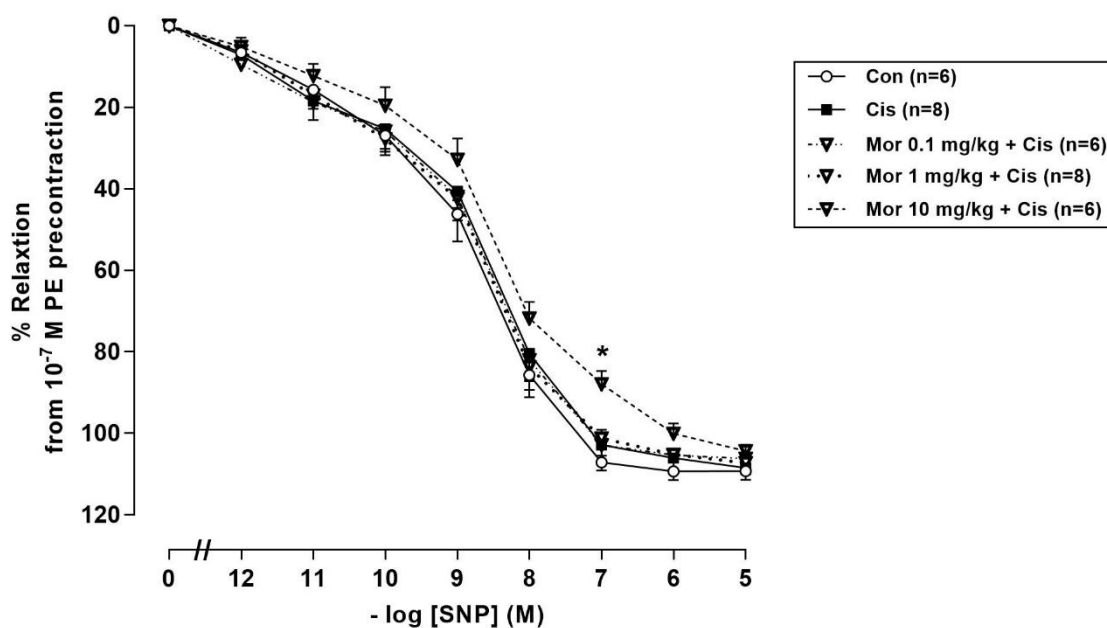


รูปที่ 3.10 ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-7} - 10^{-5}$  M ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, #  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

การศึกษาผลของ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม Con, Cis, Cis+Mor (0.1, 1 และ 10 mg/kg) แสดงในรูปที่ 3.11 ผลการทดลองนี้แสดงในค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction เมื่อให้ SNP จำนวน 8 ขนาด ที่ทำให้ความเข้มข้นใน organ bath แต่ละขนาดมีความเข้มข้นแตกต่างกัน 10 เท่า ระหว่าง  $10^{-12}$  -  $10^{-5}$  M พบว่า aortic ring ตอบสนองต่อการคลายตัวต่อ SNP ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทุกกลุ่ม แต่พบว่า SNP ที่ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M ในกลุ่ม Cis+Mor 10 mg/kg คลายตัวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ( $87.92 \pm 3.18\%$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่ม Con ( $107.12 \pm 1.93\%$ ) และ Cis ( $102.80 \pm 4.14\%$ ) ตามลำดับ

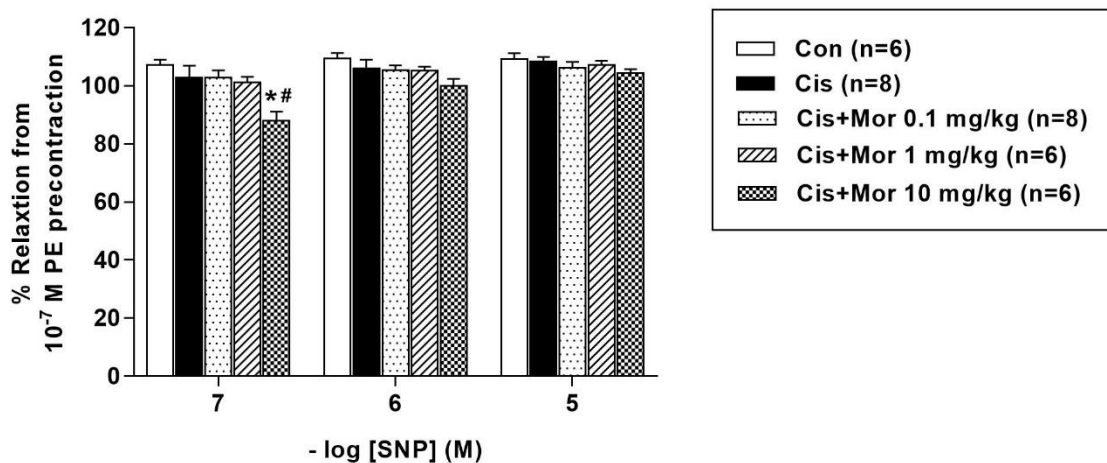
SNP เป็นสารที่ให้ NO ซึ่งทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยไม่ต้องอาศัยกลไกของ endothelium (endothelium-independent) การคลายตัวในกลุ่ม Cis+Mor 10 mg/kg ที่น้อยกว่ากลุ่ม Con และ Cis แสดงว่าอาจจะเป็นผลจากความผิดปกติของ vascular smooth muscle cell ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างซึ่งส่งผลต่อการตอบสนองต่อ SNP การเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของ vascular smooth muscle แสดงในการศึกษาทาง histopathology ต่อไป



รูปที่ 3.11 ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)



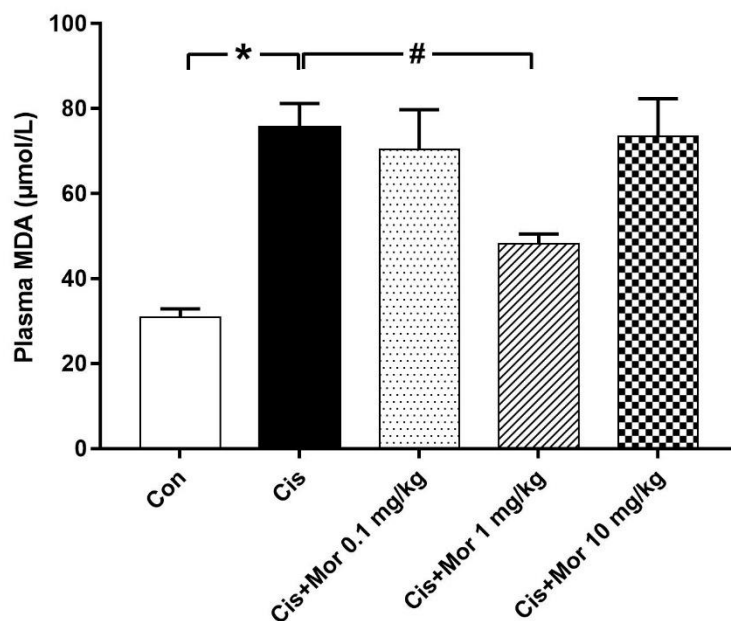


รูปที่ 3.12 ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  M ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM \*, #  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

### 3.6 ผลของ morelloflavone ต่อระดับ plasma MDA

ระดับของ plasma MDA แสดงในรูปที่ 3.13 Plasma MDA ในกลุ่ม Cis สูงกว่ากลุ่ม Con อย่างมีนัยสำคัญ ( $75.52 \pm 5.70$  vs  $30.83 \pm 2.04$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ) เมื่อให้ morelloflavone 1 mg/kg พบว่าสามารถลดระดับ plasma MDA ลงได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Cis ( $48.32 \pm 2.16$  และ  $75.52 \pm 5.70$   $\mu\text{mol/L}$ ,  $P < 0.05$ ) ในขณะที่ morelloflavone 0.1 และ 10 mg/kg พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Cis (รูปที่ 3.13)

MDA เป็นตัวชี้วัดของระดับ lipid peroxidation ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ morelloflavone 1 mg/kg สามารถลดระดับ plasma MDA ลงจึงมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

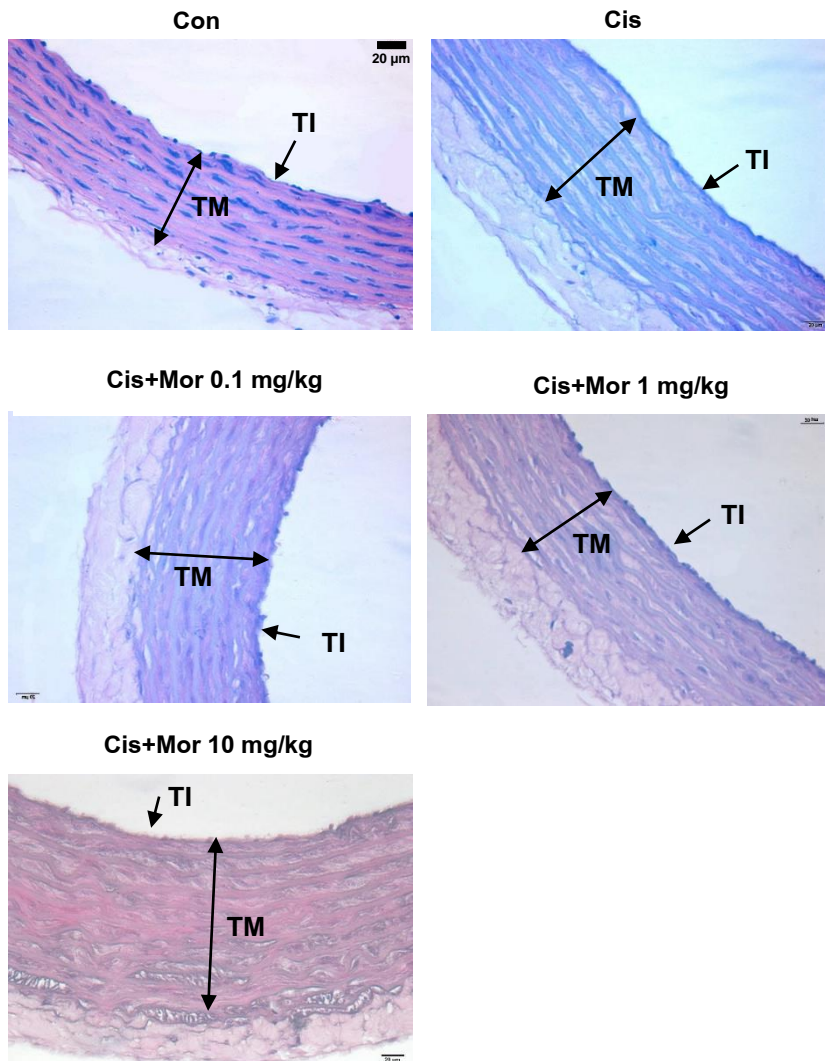


รูปที่ 3.13 ผลของ cisplatin (7.5 mg/kg) (Cis) และ cisplatin+morelloflavone (0.1, 1 และ 10 mg/kg) (Cis+Mor) ต่อระดับ plasma MDA) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบเท่ากับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

### 3.7 histopathological study

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา แสดงในรูปที่ 3.14 หลอดเลือดที่ได้รับการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin stain (H&E) ในกลุ่ม Con, Cis, Cis+Mor (0.1, 1 และ 10 mg/kg) แสดงให้เห็นว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงสำคัญที่บริเวณชั้น tunica intima (TI) ในขณะที่ชั้น tunica media (TM) ของกลุ่ม Cis พบว่ามีขนาดหนากว่ากลุ่ม Con และไม่สามารถระบุโครงสร้างได้อย่างชัดเจน morelloflavone (0.1 and 1 mg/kg) ช่วยลดความหนาของชั้น TM และสามารถเห็นโครงสร้างของกล้ามเนื้อหลอดเลือดได้ชัดเจนมากขึ้น ส่วน morelloflavone (10 mg/kg) ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดมีขนาดหนากว่าทุกกลุ่ม นอกจากนี้พบความไม่ต่อเนื่องกันของ elastic lamina ในชั้น TM และไม่สามารถระบุโครงสร้างในชั้นกล้ามเนื้อเรียบได้



**รูปที่ 3.14** การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา หลอดเลือดที่ได้รับการย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin stain (H&E) ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) 0.1, 1 และ 10 mg/kg (scale bar = 20 μm, x40)

## บทที่ 4

### สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

#### 4.1 ผลของ morelloflavone ต่ออัตราการตาย (%) และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว ในหนูที่ได้รับ cisplatin

การศึกษานี้พบว่าในหนูที่ได้รับ cisplatin หนูมีอัตราการรอดชีวิต 55.56% โดยสาเหตุการตายของหนูยังไม่ทราบแน่ชัด แต่เป็นไปได้ว่ามาจากหลายสาเหตุ เนื่องจาก cisplatin มีผลข้างเคียงต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เช่นไตวายเฉียบพลัน morelloflavone ขนาด 0.1 และ 1 mg/kg สามารถลดอัตราการตายของหนูทดลองได้ เป็นมาจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่ป้องกันพิษจาก cisplatin

ในหนูที่ได้รับ cisplatin ทำให้น้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม control สาเหตุเกิดจากผลข้างเคียงของยา cisplatin ที่ทำให้ท้องอืด ท้องเสีย ลดความอยากในการดื่มน้ำและอาหาร ซึ่งสาเหตุที่กล่าวมาข้างต้นล้วนเป็นสาเหตุที่ทำให้หนูในกลุ่ม cisplatin น้ำหนักลดลง Jacoby และคณะ (2000) ได้ทำการผ่ากระเพาะอาหารของหนูที่ถูกฉีด cisplatin 9 mg/kg พบว่ากระเพาะอาหารมีความเสียหายเกิดขึ้น Francescato และคณะ (2001) ได้ศึกษาในหนูที่ถูกฉีด cisplatin ขนาด 5 mg/kg พบว่ามีโรคท้องร่วงและลดการดื่มน้ำและกินอาหาร ในการศึกษาครั้งนี้ morelloflavone มีผลในการป้องกันการลดลงของน้ำหนักตัวซึ่งเป็นผลมาจากการป้องกันการเกิดท้องเสีย และเพิ่มการดื่มน้ำและกินอาหาร

#### 4.2 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE) และ acetylcholine (ACh) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring

การศึกษานี้ได้ทำการศึกษาแบบ *in vitro* ซึ่งเป็นการศึกษาควบคุมจากใยประสาทจากระบบประสาทอัตโนมัติและระบบฮอร์โมนควบคุมการทำงานของหลอดเลือด โดยทั่วไปในหลอดเลือดปกติในร่างกายถูกควบคุมโดยระบบประสาทอัตโนมัติคือ sympathetic และ parasympathetic ซึ่งระบบประสาท sympathetic มีใยประสาทไปเลี้ยงหลอดเลือด 2 ชนิด คือ sympathetic adrenergic fiber ปลายประสาทหลัง NE ทำให้อหลอดเลือดหดตัว และ sympathetic cholinergic fiber ปลายประสาทหลัง ACh ทำให้อหลอดเลือดคลายตัว ในการศึกษาครั้งนี้เลือกใช้ PE แทนเนื่องจากเป็น selective  $\alpha_1$ -adrenergic receptor (Hussain & Marshall, 1997) ในขณะที่ NE ไม่จำเพาะต่อ receptor ทำให้สามารถจับกับ adrenergic receptor ได้หลายตัว ได้แก่  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$

#### 4.2.1 การตอบสนองของ PE ต่อ aortic ring

ในการศึกษาทดลองครั้งนี้ได้เลือกใช้ PE ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M ในการนี้ทำ precontraction หรือทำให้หลอดเลือดหดตัวก่อน ซึ่งที่ความเข้มข้นนี้ทำให้ aortic ring หดตัวได้ประมาณ 70% เทียบกับค่า resting tension ซึ่งเป็นการออกแบบให้หลอดเลือดมีความตึงตัวเนื่องจากระบบประสาทอัตโนมัติถูกตัดขาด

จากการศึกษาผลการตอบสนองของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denude เมื่อเปรียบเทียบการหดตัวของ aortic ring ที่ได้รับ PE ที่ความเข้มข้นเดียวกันระหว่างกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denuded พบว่า aortic ring กลุ่ม denuded มีการหดตัวมากกว่ากลุ่ม intact endothelium อย่างมีนัยสำคัญ อธิบายได้ว่าในหลอดเลือดที่ไม่มี endothelium จะทำให้ขาดสารในกลุ่ม vasodilator ที่สร้างจาก endothelium เพื่อรักษาสมดุลของหลอดเลือด จึงทำให้หลอดเลือดกลุ่ม denuded ตอบสนองต่อการกระตุ้นมากกว่า

จากกราฟผลการตอบสนองของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring พบว่า PE ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M กราฟมีความชันมาก ส่วนความเข้มข้น  $10^{-6}$  –  $10^{-4}$  M การตอบสนองใกล้เคียงกันมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เหตุผลเนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้นนี้ ส่วนที่ความเข้มข้นสูงนั้นการตอบสนองจะไม่ต่างกันมากเนื่องจาก receptor ทุกตัวมีการจับกับ PE ไปหมดแล้ว จึงไม่สามารถกระตุ้นได้มากกว่านั้น

#### 4.2.2 การตอบสนองของ ACh ต่อ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$

##### M PE

จากการศึกษาผลการตอบสนองของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denude เมื่อเปรียบเทียบการคลายตัวของ aortic ring ที่ได้รับ ACh ที่ความเข้มข้นเดียวกันระหว่างกลุ่ม intact endothelium และกลุ่ม denude พบว่า aortic ring กลุ่ม denude มีการคลายตัวน้อยกว่ากลุ่ม intact endothelium อย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากกลไกของ ACh ออกฤทธิ์ผ่าน endothelium โดยการจับกับ muscarinic receptor ที่ endothelial cell (Grzesk et al., 2014) ทำให้มีการสร้างและหลั่ง vasodilator ได้แก่ NO, PGI<sub>2</sub> และ EDHF จาก endothelial cell (Triggle et al., 2012) ในขณะที่ aortic ring กลุ่ม denude จะขาด vasodilator ที่มาจาก endothelial cell ทำให้คลายตัวลดลง

จากกราฟผลการตอบสนองของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring พบว่า ACh ความเข้มข้น  $10^{-7}$  M กราฟมีความชันมาก ส่วนความเข้มข้น  $10^{-6}$  -  $10^{-5}$  M การตอบสนองใกล้เคียงกันมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เหตุผลเนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ส่วนที่ความเข้มข้นสูงนั้นการตอบสนองจะไม่ต่างกันมากเนื่องจาก receptor ทุก

ตัวมีการจับกับ ACh ไปหมดแล้ว จึงไม่สามารถกระตุ้นได้มากกว่านั้น เช่นเดียวกับการกระตุ้นด้วย PE ก่อนหน้านี้

ในการทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดโดยการควบคุมจาก endothelium จะเลือกใช้ ACh ที่ความเข้มข้น  $10^{-5}$  M ซึ่งทำให้เกิดการคลายตัวได้มากที่สุด

#### 4.3 การศึกษาฤทธิ์ของ morelloflavone ต่อคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย $10^{-7}$ M PE

การคลายตัวของหลอดเลือดของ morelloflavone เกิดจากการกระตุ้นผ่านกลไกของ endothelium ตามรายงานการศึกษาก่อนหน้านี้ (Lamai et al., 2013) โดยกลไกของ morelloflavone ที่กระตุ้นให้หลอดเลือดคลายตัวเกี่ยวข้องกับ nitric oxide (NO) จาก endothelium เป็นหลัก โดยการกระตุ้น phosphorylation ของ eNOS ให้มีการสร้างและหลั่ง NO นอกจากนี้ morelloflavone เป็นสารในกลุ่ม flavonoid ซึ่งมีรายงานว่าทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ (Luna-Vázquez et al, 2013) อย่างไรก็ตามในหนูกลุ่มที่ได้รับการฉีด cisplatin เป็นเวลา 7 วันพบว่ามี การตอบสนองต่อการคลายตัวของหลอดเลือดลดลงหลังจากให้ morelloflavone เมื่อเทียบกับ หนูในกลุ่ม control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในกลุ่ม cisplatin มีความเสียหายเกิดขึ้นที่ endothelium ซึ่งส่งผลต่อการตอบสนองต่อ morelloflavone

#### 4.4 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน

การศึกษาผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 3 วัน แสดงในรูปที่ 3.4 จากการทดลองพบว่า aortic ring ในกลุ่ม Cis มีการหดตัวไม่ได้แตกต่างจากกลุ่ม Con อย่างมีนัยสำคัญ

การศึกษาผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ในกลุ่ม Con และ Cis 3 days แสดงในรูปที่ 3.5 ผลการทดลองพบว่า aortic ring ในกลุ่ม Cis 3 days มีการคลายตัวได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con

การศึกษาผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring แสดงในรูปที่ 3.6 ผลการทดลองพบว่า aortic ring ตอบสนองต่อการคลายตัวต่อ SNP ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของทั้งสองกลุ่ม

การชักนำให้หลอดเลือดเกิดความเสียหายโดย cisplatin 3 วัน ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่ม control ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกทำการฉีด cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg

เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูความเสียหายที่เกิดขึ้นและเพื่อศึกษาผลการป้องกันความเสียหายของหลอดเลือดโดยใช้ morelloflavone

#### 4.5 การศึกษาผลของ phenylephrine (PE), acetylcholine (ACh) และ sodium nitroprusside (SNP) ต่อการหดตัวและการคลายตัวของ thoracic aortic ring หลังจากได้รับ cisplatin 7 วัน

บทบาท morelloflavone ในการป้องกันความเสียหายของหลอดเลือดในการหดตัวและคลายตัวได้ทำการทดสอบในขั้นตอนนี้ต่อมา (รูปที่ 3.7 และ 3.8) การหดตัวที่สูงกว่ากลุ่ม control ของกลุ่ม cisplatin นั้นอาจเป็นผลมาจากความเสียหายของ endothelium ที่ทำให้เกิดความผิดปกติในการผลิตสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัว โดยหลอดเลือดปกติ endothelium จะมีสารที่หลั่งมาเพื่อคอยควบคุมสมดุลของหลอดเลือดที่ไม่ให้หดตัวแรงเกินไป นอกจากนี้ cisplatin อาจจะไปกระตุ้นให้รีเซปเตอร์ของ PE มีความไวต่อการตอบสนองมากกว่าปกติจึงทำให้เพิ่มความแรงการหดตัว โดยการใส่ PE ใน organ bath จะไปจับกับ  $\alpha$ -adrenergic receptor ที่กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด อย่างไรก็ตามความไวต่อการตอบสนองต่อ PE ที่เพิ่มขึ้นยังไม่เป็นที่แน่ชัด (Russell & Watts, 2000) แต่อาจมีความเป็นไปได้ว่ามีกลไกที่ไปกระตุ้นการสังเคราะห์ของตัวรีเซปเตอร์ที่ทำให้ความแรงการหดตัวเพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกับการศึกษาของกอนหนานี้ที่ศึกษาในหลอดเลือดหนูที่ได้รับ cisplatin พบว่ามีความแรงต่อการตอบสนองต่อทั้ง PE และ KCl มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ cisplatin (Atalik et al., 2010) morelloflavone จำนวน 3 ขนาด คือ 0.1, 1 และ 10 mg/kg นำหนักตัวได้ทำการฉีด 24 ชั่วโมง และ 10 นาที ก่อนการฉีด cisplatin การศึกษาผลของ PEต่อการหดตัวพบว่า morelloflavone ช่วยลดความแรงของการหดตัวเมื่อเทียบจากกลุ่มที่ได้รับ cisplatin เพียงอย่างเดียว โดยขนาดของ morelloflavone ที่ได้ผลดีคือ 1 mg/kg ในขณะที่ขนาด 0.1 และ 10 mg/kg ให้ผลไม่ต่างจากกลุ่ม cisplatin

การศึกษาผลของ morelloflavone ในการป้องกันความเสียหายของ endothelium จากยา cisplatin โดยใช้ ACh กระตุ้นให้หลอดเลือดคลายตัว การศึกษาพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ cisplatin ขนาด 7.5 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน ทำให้ endothelium เสียหายบางส่วนโดยผลของ ACh ที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวพบว่าการคลายตัวในกลุ่ม cisplatin น้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 3.9 และ 3.10) ในชั้น endothelium ของหลอดเลือดมีการสร้างสารที่กระตุ้นการคลายตัว เช่น nitric oxide (NO), prostaglandin ( $PGI_2$ ) และ endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Higashi et al., 2009) ความเสียหายที่เกิดขึ้นของ endothelium ที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้น้อยลงเกิดจากการลดลงของสาร NO ซึ่งเป็นสารหลักที่ทำให้เกิดการคลายตัวของหลอดเลือด หรืออาจจะเกิดจากความผิดปกติที่ทำให้ NO บางส่วนไม่ทำงาน และ/หรือ สาเหตุจากความผิดปกติของ cyclic guanosine monophosphate

(cGMP) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ใช้ SNP ซึ่งเป็นสารที่ทำให้ NO กระตุ้นการคลายตัวของ thoracic aortic ring ผลการศึกษาพบว่า การคลายตัวของหลอดเลือดทุกกลุ่มมีการคลายตัวเหมือนกัน (รูปที่ 3.11 และ 3.12) แสดงว่าเป็นการยืนยันว่าความเสียหายเกิดขึ้นที่ endothelium อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดที่เป็นผลมาจาก cisplatin ก็มีส่วนด้วยเช่นกัน การให้ morelloflavone ขนาด 1 mg/kg ก่อนฉีด cisplatin พบว่าทำให้ความเสียหายของ endothelium ลดลง (รูปที่ 3.9 และ 3.10)

oxidative stress ที่เกิดจาก cisplatin มีส่วนสำคัญอย่างมากที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อ endothelium โดยขั้นแรกมาจากการลดการเกิดออกซิเดชันอย่างรวดเร็วของ NO โดย superoxide จำนวนมาก ขั้นต่อมา oxidative stress ทำให้เกิด enos uncoupling เช่นการแยก  $O_2$  ออกจากการสังเคราะห์ NO ทำให้ไม่สามารถสร้าง NO ได้ แต่ไปเกิดเป็น superoxide กลไกการพ่วงของ  $BH_4$  ซึ่งเป็น cofactor ที่สำคัญสำหรับ eNOS น่าจะเป็นอีกสาเหตุของการเกิด eNOS uncoupling และส่งผลให้เกิด endothelial dysfunction โดย Peroxynitrite ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาโดยตรงของ NO และ Superoxide มีความสามารถในการ oxidize  $BH_4$  และทำให้เกิดการขาด  $BH_4$  (Li & Förstermann, 2013)

กลไกการป้องกันของ morelloflavone มีผลต่อ enzyme NADPH oxidase โดยลดการทำงานลงแบบ non-competitive inhibitor (Tuansulong et al., 2011) ช่วยยับยั้งการเกิด eNOS uncoupling ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อ endothelium ซึ่งการให้ morelloflavone ก่อนตามด้วยการฉีด cisplatin ที่ทำให้เกิด ROS จะมีโอกาสเกิด peroxynitrite ซ้ำกว่าหรือเกิดได้น้อยกว่าเพราะการเข้าไปรวมกับ superoxide ที่จะถูก SOD scavenge ต่อไปเป็น hydrogen peroxide แต่ถ้าให้ cisplatin ก่อนเหมือนการรักษาปกติและเกิด thrombosis และ vascular inflammation แล้วและให้ morelloflavone จะไม่สามารถช่วยอะไรเพราะ superoxide ที่เกิดขึ้นมีปริมาณสูงมาก ขณะที่ morelloflavone กระตุ้นการหลั่ง NO ผ่านการกระตุ้นการเกิด phosphorylation ของ eNOS ซึ่ง NO ที่ได้จะเข้าไปรวมกับ superoxide เกิดเป็น peroxynitrite ซึ่งเป็น RNS ความเสียหายที่เกิดขึ้นของหลอดเลือดเกิดได้ทั้ง ROS และ RNS ปฏิกิริยาการรวมเกิดขึ้นเร็วกว่าการเปลี่ยนไปเป็น hydrogen peroxide

#### 4.6 ผลของ morelloflavone ต่อระดับ plasma MDA

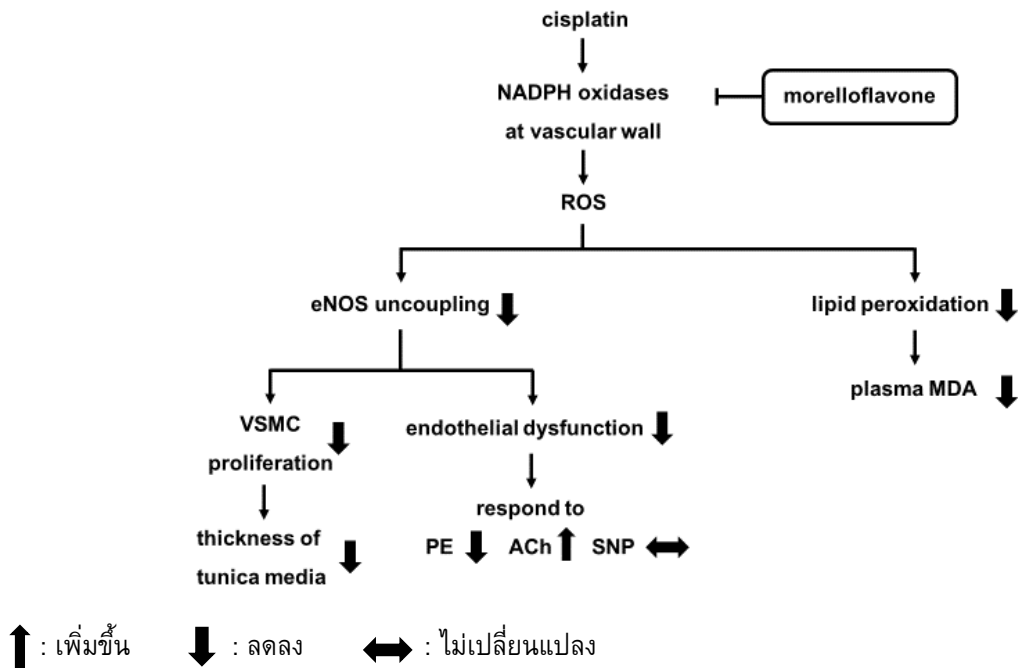
การวัดระดับของ lipid peroxidation ถูกนำมาใช้ในการศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อวัด oxidative stress ที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่ง MDA เป็นที่รู้จักกันแพร่หลายเป็นตัวบ่งชี้ถึง plasma หรือ tissue lipid peroxidation ซึ่งสามารถเป็นตัวแทนการเกิด oxidative stress ในเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้วัด plasma MDA ซึ่งพบว่าในกลุ่ม cisplatin มีปริมาณสูงกว่าในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่ามีภาวะ oxidative stress เกิดขึ้นอย่างรุนแรง การศึกษาก่อนหน้านี้ชี้ว่า oxidative stress ทำให้เกิดโรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือดได้มากมาย เช่น



หลอดเลือดตีบ ความดันโลหิตสูง หัวใจล้มเหลว เป็นต้น oxidative stress เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ ROS ที่ส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายและตายในที่สุด ซึ่ง cisplatin ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และในสัตว์ทดลองได้แสดงให้เห็นในการศึกษาที่ผ่านมา morelloflavone ขนาด 1 mg/kg สามารถยับยั้งการเกิด oxidative stress ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม cisplatin (รูปที่ 3.13) ในขณะที่ขนาด 0.1 และ 10 mg/kg ไม่สามารถยับยั้งการเกิด oxidative stress ได้ ความสามารถของ morelloflavone ที่ป้องกันการเกิด plasma lipid peroxidation เกิดจากคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Hutadilok-Towatana et al., 2007, Decha-Dier et al., 2008, Deachathai et al., 2005)

#### 4.7 histopathological study

การศึกษาทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยาของหลอดเลือด thoracic aortic ring ในชั้น tunica intima ไม่สามารถยืนยันถึงความเสียหายทางโครงสร้างที่เกิดขึ้นในชั้น endothelium จากการย้อมแบบ H&E ได้ (รูปที่ 3.14) อย่างไรก็ตามในชั้น tunica media ซึ่งเป็นชั้นของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด ในกลุ่ม cisplatin พบว่ามีความหนาแน่นมากกว่ากลุ่ม control ซึ่งเกิดจากการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดตามที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ (Wehish et al., 2010, Saleh et al., 2014) หนึ่งในหน้าที่สำคัญของ NO คือการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ดังนั้นการลดลงของ NO จึงส่งผลให้เกิดการ proliferation ของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือดได้ (Tsutsui et al., 2010) morelloflavone ขนาด 10 mg/kg ทำให้หลอดเลือดหนาที่สุด การศึกษาทางเนื้อเยื่อพยาธิวิทยานี้พบว่า morelloflavone ที่ขนาดต่ำ (0.1 และ 1 mg/kg) ช่วยยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ (Decha-Dier et al., 2008)



**รูปที่ 4.1** แผนภาพผลการทดสอบตามสมมติฐานงานวิจัย cisplatin กระตุ้น enzyme NADPH oxidase ทำให้เกิด ROS โดย morelloflavone มีผลยับยั้งหรือลดการทำงานของ NADPH oxidase เพื่อลดการเกิด ROS ลดการเกิด endothelium dysfunction (ROS, reactive oxygen species; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; VSMC, vascular smooth muscle cell; NADPH oxidase, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase; PE, phenylephrine; Ach, acetylcholine; SNP, sodium nitroprusside)

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

1. morelloflavone มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือด thoracic aortic ring คลายตัว โดยใช้กลไกผ่าน endothelium
2. cisplatin ทำให้ endothelium เสียหาย ยืนยันได้จากการตอบสนองต่อ ACh น้อยกว่าในกลุ่ม control และตอบสนองต่อการหดตัวจาก PE มากกว่ากลุ่ม control
3. ความเสียหายของ endothelium ที่เกิดจาก cisplatin ทำให้สารต่าง ๆ ที่สร้างจาก endothelium ลดลง มีผลให้เกิดการตอบสนองต่อ PE มากกว่ากลุ่ม control และกระตุ้นการขยายตัวและเพิ่มจำนวนของกล้ามเนื้อเรียบหลอดเลือด
4. การให้ morelloflavone 1 mg/kg ก่อนการฉีด cisplatin ช่วยลดความเสียหายของหลอดเลือดทั้งในทางสรีรวิทยาและกายวิภาคศาสตร์
5. กลไกของ morelloflavone ในการป้องกันความเสียหายของหลอดเลือดเกิดจากคุณสมบัติ antioxidant และกลไกกระตุ้นการคลายตัวของหลอดเลือดของ morelloflavone ผ่าน nitric oxide ที่หลั่งจาก endothelium
6. การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ซึ่งผลการทดลองที่ได้ควรจะนำไปศึกษาต่อเพิ่มเติมถึงรายละเอียดกลไกที่เกี่ยวข้อง เพื่อสามารถนำมาพัฒนาต่อไปได้

## เอกสารอ้างอิง

- นิจศิริ เรืองรังษี. 2547. มะพูด. *สมุนไพรไทย เล่ม 1*. สำนักพิมพ์บี เฮลท์ดี กรุงเทพฯ
- Aggarwal, S. K. 1998. Calcium modulation of toxicities due to Cisplatin. *Metal-Based Drugs*, 5(2), 77–81.
- Anggrahini, D. W., Emoto, N., Nakayama, K., Widyantoro, B., Adiarto, S., Iwasa, N., Hirata, K. 2009. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. *Cardiovascular Research*, 82(1), 143–151.
- Atalik, K. E., Keleş, B., Uyar, Y., Dündar, M. A., Öz, M., & Esen, H. H. 2010. Vasoprotection by melatonin and quercetin in rats treated with cisplatin. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(12), 1188–1193.
- Avery, S. V. 2011. Molecular targets of oxidative stress. *Biochemical Journal*, 434(2), 201–210.
- Berne, R. M., Koeppen, B. M., & Stanton, B. A. 2010. *Berne & Levy physiology*. Mosby, Elsevier.
- Bokemeyer, C., Berger, C. C., Kuczyk, M. A., & Schmoll, H. J. 1996. Evaluation of long-term toxicity after chemotherapy for testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 14(11), 2923–2932.
- Cahill, P. A., & Redmond, E. M. 2016. Vascular endothelium e Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis*, 248, 97–109.
- Casares, C., Ramrez-Camacho, R., Trinidad, A., Roldn, A., Jorge, E., & Garca-Berrocal, J. 2012. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: Review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 269(12), 2455–2459.
- Chen, G., Huynh, M., Fehrenbacher, L., West, H., Lara, P. N., Yavorkovsky, L. L., Lau, D. 2009. Phase II Trial of Irinotecan and Carboplatin for Extensive or Relapsed Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 27(9), 1401–1404.
- Coletta Francescato, H. Della, Costa, R. S., Rodrigues Camargo, S. M., Zanetti, M. A., Lavrador, M. A., & Bianchi, M. de L. P. 2001. Effect of oral selenium administration on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research*, 43(1), 77–82.

- Deachathai, S., Mahabusarakam, W., Phongpaichit, S., & Taylor, W. C. 2005. Phenolic compounds from the fruit of *Garcinia dulcis*. *Phytochemistry*, 66(19), 2368–2375.
- De Nucci, G., Thomas, R., D'orleans-Juste, P., Antunes, E., Walder, C., Warner, T. D., & Vane, J. R. 1988. Pressor effects of circulating endothelin are limited by its removal in the pulmonary circulation and by the release of prostacyclin and endothelium-derived relaxing factor (lung/guinea pig/rat/icosanoids/cyclooxygenase inhibitors), 85, 9797–9800.
- Deavall, D. G., Martin, E. A., Horner, J. M., & Roberts, R. 2012. Drug-induced oxidative stress and toxicity. *Journal of Toxicology*, 2012, 1–13.
- de Vos, F. Y. F. L., Nuver, J., Willemsse, P. H. B., van der Zee, A. G. J., Messerschmidt, J., Burgerhof, J. G. M., Gietema, J. A. 2004. Long-term survivors of ovarian malignancies after cisplatin-based chemotherapy. *European Journal of Cancer*, 40(5), 696–700.
- Decatris, M. ., Sundar, S., & O'Byrne, K. . 2004. Platinum-based chemotherapy in metastatic breast cancer: current status. *Cancer Treatment Reviews*, 30(1), 53–81.
- Decha-Dier, U., Hutadilok-Towatana, N., Mahabusarakam, W., Sawangjaroen, K., & Pinkaew, D. 2008. Anti-atherogenic effects of morelloflavone from *Garcinia dulcis* leaves in cholesterol fed rabbits. *Journal of Natural Remedies*, 8(2), 151–159.
- Desoize, B. 2002. Cancer and metals and metal compounds: part I--carcinogenesis. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 42(1), 1–3.
- Devasagayam, T. P. A., Tilak, J. C., Bloor, K. K., Sane, K. S., Ghaskadbi, S. S., & Lele, R. D. 2004. Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects. *The Journal of the Association of Physicians of India*, 52, 794–804.
- Dos Santos, N. A. G., Martins, N. M., Curti, C., Pires Bianchi, M. de L., & dos Santos, A. C. 2007. Dimethylthiourea protects against mitochondrial oxidative damage induced by cisplatin in liver of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 170(3), 177–186.
- Ellis, A., & Triggle, C. R. 2003. Endothelium-derived reactive oxygen species: their relationship to endothelium-dependent hyperpolarization and vascular tone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 81(11), 1013–1028.
- Ellmark, S. H. M., Dusting, G. J., Ng Tang Fui, M., Guzzo-Pernell, N., & Drummond, G. R. (2005). The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular

- smooth muscle, *65*(2), 495–504.
- Faraci, F. M., Sobey, C. G., Chrissobolis, S., Lund, D. D., Heistad, D. D., & Weintraub, N. L. 2001. Arachidonate dilates basilar artery by lipoxygenase-dependent mechanism and activation of K(+) channels. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *281*(1), R246-53.
- Fingerle, J., Au, T., Clowes, A. W., & Reidy, M. A. 1990. Intimal lesion formation in rat arotid arteries after endothelial denudation in the absece of medal injury. *Arteriosclerosis*, *10*, 1082–1087.
- Flammer, A. J., & Lüscher, T. F. 2010. Human endothelial dysfunction: EDRFs. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *459*(6), 1005–1013.
- Fralval, H. N. A., Rawlings, C. J., & Roberts, J. J. 1978. Increased sensitivity of UV-repair-deficient human cells to DNA bound platinum products which unlike thymine dimers are not recognized by an endonuclease extracted from *Micrococcus luteus*. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, *51*(1), 121–132.
- Frezza, M., Hindo, S., Chen, D., Davenport, A., Schmitt, S., Tomco, D., & Dou, Q. P. 2010. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. *Current Pharmaceutical Design*, *16*(16), 1813–25.
- Fukuda, D., & Sata, M. 2008. Role of bone marrow renin–angiotensin system in the pathogenesis of atherosclerosis. *Pharmacology & Therapeutics*, *118*(2), 268–276.
- Ghosh, N., Chow, C.-M., Korley, V., & Chisholm, R. 2008. An unusual case of chronic coronary artery dissection: Did cisplatin play a role? *Can J Cardiol*, *24*, 795–797.
- Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Gunasegaran, R., Payá, M., & Alcaraz, M. J. 1997. Morelloflavone, a novel biflavonoid inhibitor of human secretory phospholipase A2 with anti-inflammatory activity. *Biochemical Pharmacology*, *53*(5), 733–740.
- Go, R. S., & Adjei, A. A. 1999. Review of the Comparative Pharmacology and Clinical Activity of Cisplatin and Carboplatin. *Journal of Clinical Oncology*, *17*(1), 409–409.
- Görlach, A., Brandes, R. P., Nguyen, K., Amidi, M., Dehghani, F., & Busse, R. 2000. A gp91phox Containing NADPH Oxidase Selectively Expressed in Endothelial Cells Is a Major Source of Oxygen Radical Generation in the Arterial Wall. *Circulation Research*, *87*(1).
- Grenader, T., Shavit, L., Ospovat, I., Gutfeld, O., & Peretz, T. 2006. Aortic occlusion in patients treated with Cisplatin-based chemotherapy. *The Mount Sinai Journal of*

- Medicine, New York*, 73(5), 810–2.
- Griffith, T. M., Chaytor, A. T., & Edwards, D. H. 2004. The obligatory link: role of gap junctional communication in endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization. *Pharmacological Research*, 49(6), 551–564.
- Grzešek, E., Stolarek, W., Wiciński, M., Szadujkis-szadurska, K., & Grzešek, G. 2014. Effect of acetylcholine on vascular smooth muscle contraction induced by phenylephrine, angiotensin II, and mastoparan-7. *Folia Medica Copernicana*, 2(3), 98–101.
- Guimarães, S., & Moura, D. 2001. Vascular adrenoceptors: an update. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 319–56.
- Guzik, T. J., Sadowski, J., Guzik, B., Jopek, A., Kapelak, B., Przybyłowski, P., Channon, K. M. (2006). Coronary artery superoxide production and NO isoform expression in human coronary artery disease. *Circulation*, 113(2), 333–339.
- Guzik, T. J., West, N. E. J., Pillai, R., Taggart, D. P., & Channon, K. M. 2002. Nitric oxide modulates superoxide release and peroxynitrite formation in human blood vessels. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)*, 39(6), 1088–94.
- Higashi, Y., Noma, K., Yoshizumi, M., & Kihara, Y. 2009. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*, 73, 411–418.
- Hillege, H. L., Fidler, V., Diercks, G. F. H., van Gilst, W. H., de Zeeuw, D., van Veldhuisen, D. J., Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group. 2002. Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*, 106(14), 1777–82.
- Hussain, M. B., & Marshall, I. 1997. Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery. *British Journal of Pharmacology*, 122(5), 849–58.
- Hutadilok-Tawatana, N., Kongkachuay, S., & Mahabusarakam, W. 2007. Inhibition of human lipoprotein oxidation by morelloflavone and camboginol from *Garcinia dulcis*. *Nat Prod Res*, 21(7), 655–662.
- Ignarro, L. J., Byrns, R. E., Buga, G. M., & Wood, K. S. 1987. Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation Research*,

61(6).

- İşeri, S., Ercan, F., Gedik, N., Yüksel, M., & Alican, İ. 2007. Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats. *Toxicology*, 230(2–3), 256–264.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(22), 14298–14302.
- Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J., & Herskowitz, I. 2002. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(22), 14298–302.
- Ito, H., Okafuji, T., & Suzuki, T. 1995. Vitamin E prevents endothelial injury associated with cisplatin injection into the superior mesenteric artery of rats. *Heart and Vessels*, 10(4), 178–84.
- Jacoby, H., Wnorowski, G., Sakata, K., & Maeda, H. 2000. the effect of mgn-3 on cisplatin and adriamycin induced toxicity in the rat. *Int. J. Immunother*, 14.
- Jamieson, E., & Lippard, S. 1999. Structure , Recognition , and Processing of Cisplatin – DNA Adducts. *Chem. Rev.*, 99(9), 2467–2498.
- Judkins, C. P., Diep, H., Broughton, B. R. S., Mast, A. E., Hooker, E. U., Miller, A. A., Drummond, G. R. 2010. Direct evidence of a role for Nox2 in superoxide production, reduced nitric oxide bioavailability, and early atherosclerotic plaque formation in ApoE<sup>-/-</sup> mice. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 298(1), H24–H32.
- Kart, A., Cigremis, Y., Karaman, M., & Ozen, H. 2010. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ameliorates cisplatin-induced hepatotoxicity in rabbit. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(1), 45–52.
- Kawabe, J., Ushikubi, F., & Hasebe, N. 2010. Prostacyclin in Vascular Diseases. *Circulation Journal*, 74(5), 836–843.
- Khan, A. B., D'Souza, B. J., Wharam, M. D., Champion, L. A., Sinks, L. F., Woo, S. Y., Leventhal, B. G. 1982. Cisplatin therapy in recurrent childhood brain tumors. *Cancer Treatment Reports*, 66(12), 2013–20.
- Koch, M., Krieger, M. L., Stölting, D., Brenner, N., Beier, M., Jaehde, U., Bendas, G. 2013. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal



- cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochemical Pharmacology*, 85(8), 1077–1090.
- Kohn, S., Fradis, M., Podoshin, L., Ben-David, J., Zidan, J., & Robinson, E. 1997. Endothelial injury of capillaries in the stria vascularis of guinea pigs treated with cisplatin and gentamicin. *Ultrastructural Pathology*, 21(3), 289–99.
- Kuhlmann, M., Burkhardt, G., & Kohler, H. 1997. Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 12(12), 2478–2480.
- Kunworarath, N., Muangnil, P., Itharat, A., & Hiranyachattada, S. 2014. Acute and subchronic treatment of Hibiscus sabdariffa Linn. extract on renal function and lipid peroxidation in cisplatin-induced acute renal failure rats. *J Physiol Biomed Sci*, 27(1), 5–12.
- Laguerre, M., Lecomte, J., & Villeneuve, P. 2007. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation : Existing methods , new trends and challenges, 46, 244–282.
- Lamai, J., Mahabusarakam, W., Ratithammatorn, T., & Hiranyachattada, S. 2013. Effects of Morelloflavone from Garcinia dulcis on Vasorelaxation of Isolated Rat Thoracic Aorta. *J Physiol Biomed Sci*, 26, 13–17.
- Lassègue, B., Sorescu, D., Szöcs, K., Yin, Q., Akers, M., Zhang, Y., Griendling, K. K. 2001. Novel gp91phox Homologues in Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation Research*, 88(9).
- Lechner, D., Kollars, M., Gleiss, A., Kyrle, P. A., & Weltermann, A. 2007. Chemotherapy-induced thrombin generation via procoagulant endothelial microparticles is independent of tissue factor activity. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 5(12), 2445–2452.
- Li, H., & Förstermann, U. 2013. Uncoupling of endothelial NO synthase in atherosclerosis and vascular disease. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(2), 161–167.
- Licciardello, J. T., Moake, J. L., Rudy, C. K., Karp, D. D., & Hong, W. K. 1985. Elevated plasma von Willebrand factor levels and arterial occlusive complications associated with cisplatin-based chemotherapy. *Oncology*, 42(5), 296–300.
- Lin, Y.-M., Anderson, H., Flavin, M. T., Pai, Y.-H. S., Mata-Greenwood, E., Pengsuparp, T., Chen, F.-C. 1997. In Vitro Anti-HIV Activity of Biflavonoids Isolated from *Rhus*

- succedanea* and *Garcinia multiflora*. *Journal of Natural Products*, 60(9), 884–888.
- Lorenz, M. W., Markus, H. S., Bots, M. L., Rosvall, M., & Sitzer, M. 2007. Prediction of Clinical Cardiovascular Events With Carotid Intima-Media Thickness: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Circulation*, 115(4), 459–467.
- Luna-Vázquez, F. J., Ibarra-Alvarado, C., Rojas-Molina, A., Rojas-Molina, I., & Zavala-Sánchez, M. Á. 2013. Vasodilator compounds derived from plants and their mechanisms of action. *Molecules*, 18(5), 5814–5857.
- Lynch, H. T., Casey, M. J., Snyder, C. L., Bewtra, C., Lynch, J. F., Butts, M., & Godwin, A. K. 2009. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Molecular Oncology*, 3(2), 97–137.
- Matsuki, M., Takahashi, A., Katou, S., Takayanagi, A., Takagi, Y., & Kamata, K. 2013. Pathological complete response to gemcitabine and cisplatin chemotherapy for advanced upper tract urothelial carcinoma: a case report. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi. The Japanese Journal of Urology*, 104(1), 33–7. Retrieved from
- Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., & Vane, J. R. 1976. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature*, 263(5579), 663–665.
- Moncada, S., & Higgs, E. A. 1991. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *European Journal of Clinical Investigation*, 21(4), 361–374.
- Niedernhofer, L. J., Daniels, J. S., Rouzer, C. A., Greene, R. E., & Marnett, L. J. 2003. Malondialdehyde, a Product of Lipid Peroxidation, Is Mutagenic in Human Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 278(33), 31426–31433.
- Numico, G., Garrone, O., Dongiovanni, V., Silvestris, N., Colantonio, I., Di Costanzo, G., Merlano, M. 2005. Prospective evaluation of major vascular events in patients with nonsmall cell lung carcinoma treated with cisplatin and gemcitabine. *Cancer*, 103(5), 994–999.
- Nuver, J., De Haas, E. C., Van Zweeden, M., Gietema, J. A., & Meijer, C. 2010. Vascular damage in testicular cancer patients: a study on endothelial activation by bleomycin and cisplatin in vitro. *Oncology Reports*, 23(1), 247–53.
- Nuver, J., Smit, A. J., van der Meer, J., van den Berg, M. P., van der Graaf, W. T. A., Meinardi, M. T., Gietema, J. A. 2005. Acute Chemotherapy-Induced Cardiovascular Changes in Patients With Testicular Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 23(36), 9130–9137.

- Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. 1979. Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues Thiobarbituric Acid Reaction, 358, 351–358.
- Pablo Huidobro-Toro, J., & Verónica Donoso, M. 2004. Sympathetic co-transmission: the coordinated action of ATP and noradrenaline and their modulation by neuropeptide Y in human vascular neuroeffector junctions. *European Journal of Pharmacology*, 500(1–3), 27–35.
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., & Pisani, P. 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 55(2), 74–108. Retrieved from
- Pereañez, J. A., Patiño, A. C., Núñez, V., & Osorio, E. 2014. The biflavonoid morelloflavone inhibits the enzymatic and biological activities of a snake venom phospholipase A2. *Chemico-Biological Interactions*, 220, 94–101.
- Pignon, J.-P., Tribodet, H., Scagliotti, G. V., Douillard, J.-Y., Shepherd, F. A., Stephens, R. J., LACE Collaborative Group. 2008. Lung Adjuvant Cisplatin Evaluation: A Pooled Analysis by the LACE Collaborative Group. *Journal of Clinical Oncology*, 26(21), 3552–3559.
- Piketty, A.-C., Fléchon, A., Laplanche, A., Nouyrigat, E., Droz, J.-P., Théodore, C., & Fizazi, K. 2005. The risk of thrombo-embolic events is increased in patients with germ-cell tumours and can be predicted by serum lactate dehydrogenase and body surface area. *British Journal of Cancer*, 93(8), 909–914.
- Pinkaew, D., Cho, S. G., Hui, D. Y., Wiktorowicz, J. E., Hutadilok-Towatana, N., Mahabusarakam, W., Fujise, K. 2009. Morelloflavone blocks injury-induced neointimal formation by inhibiting vascular smooth muscle cell migration. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(1), 31–39.
- Rosenberg, B., Van Camp, L., & Krigas, T. (1965). Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature*, 205(4972), 698–699.
- Russell, A., & Watts, S. 2000. Vascular Reactivity of Isolated Thoracic Aorta of the C57BL/6J Mouse 1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 294, 598–604.
- Saad, S. Y., Najjar, T. A., & Alashari, M. 2004. Role of non-selective adenosine receptor blockade and phosphodiesterase inhibition in cisplatin-induced nephrogonadal toxicity in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 31(12), 862–867.

- Sagstuen, H., Aass, N., Fosså, S. D., Dahl, O., Klepp, O., Wist, E. A., ... Bremnes, R. M. 2005. Blood pressure and body mass index in long-term survivors of testicular cancer. *Journal of Clinical Oncology : Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(22), 4980–90.
- Saleh, R. M., Awadin, W. F., Elseady, Y. Y., & Waheish, F. E. 2014. Renal and Cardiovascular Damage Induced by Cisplatin in Rats. *Life Science Journal*, 11(2), 191–203.
- Salvesen, G. S., & Abrams, J. M. (2004). Caspase activation – stepping on the gas or releasing the brakes? Lessons from humans and flies. *Oncogene*, 23(16), 2774–2784.
- Shen, D.-W., Pouliot, L. M., Hall, M. D., & Gottesman, M. M. (2012). Cisplatin Resistance: A Cellular Self-Defense Mechanism Resulting from Multiple Epigenetic and Genetic Changes. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 706–721.
- Shrivastava, A., Kuzontkoski, P. M., Groopman, J. E., & Prasad, A. 2011. Cannabidiol Induces Programmed Cell Death in Breast Cancer Cells by Coordinating the Cross-talk between Apoptosis and Autophagy. *Molecular Cancer Therapeutics*, 10(7), 1161–1172.
- Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., & FitzGerald, G. A. 2008. Prostanoids in health and disease. *The Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S423–S428.
- Stocker, R., & Keaney, J. F. 2004. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 84(4), 1381–1478.
- Swift, M. R., & Weinstein, B. M. 2009. Arterial-venous specification during development. *Circulation Research*, 104(5), 576–88.
- Szerafin, T., Erdei, N., Fülöp, T., Pasztor, E. T., Edes, I., Koller, A., & Bagi, Z. 2006. Increased Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin-Mediated Dilation in Coronary Arterioles of Patients With Diabetes Mellitus. *Circulation Research*, 99(5), e12-317.
- Taddei, S., Versari, D., Cipriano, A., Ghiadoni, L., Galetta, F., Franzoni, F., Salvetti, A. 2006. Identification of a Cytochrome P450 2C9-Derived Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor in Essential Hypertensive Patients. *Journal of the American College of Cardiology*, 48(3), 508–515.
- Thorin, E., & Webb, D. J. 2010. Endothelium-derived endothelin-1. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 459(6), 951–958.

- Tirapelli, C. R., Bonaventura, D., Tirapelli, L. F., & de Oliveira, A. M. (2009). Mechanisms underlying the vascular actions of endothelin 1, angiotensin II and bradykinin in the rat carotid. *Pharmacology*, *84*(2), 111–26.
- Togna, G. I., Togna, A. R., Franconi, M., & Caprino, L. 2000. Cisplatin triggers platelet activation. *Thrombosis Research*, *99*(5), 503–9.
- Triggle, C. R., Samuel, S. M., Ravishankar, S., Marei, I., Arunachalam, G., & Ding, H. 2012. The endothelium: influencing vascular smooth muscle in many ways. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, *90*(6), 713–738.
- Tsutsui, M., Shimokawa, H., Otsuji, Y., & Yanagihara, N. 2010. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: Novel insight from mice lacking all NO synthases. *Pharmacology & Therapeutics*, *128*(3), 499–508.
- Tuansulong, K. A., Hutadilok-Towatana, N., Mahabusarakam, W., Pinkaew, D., & Fujise, K. 2011. Morelloflavone from *Garcinia dulcis* as a novel biflavonoid inhibitor of HMG-CoA reductase. *Phytotherapy Research*, *25*(3), 424–428.
- Unger, T. 2002. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *The American Journal of Cardiology*, *89*(2), 3–9.
- Vanhoutte, P., Wolfe, C. J., & Hole, W. 1998. Vascular biology Old-timer makes a comeback. *Nature*, *396*, 213–216.
- Vaughn, D. J., Palmer, S. C., Carver, J. R., Jacobs, L. A., & Mohler, E. R. 2008. Cardiovascular risk in long-term survivors of testicular cancer. *Cancer*, *112*(9), 1949–1953.
- Wang, D., & Lippard, S. J. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Delivery*, *4*(4), 307–320.
- Wehaish, F. E., Elseady, Y. Y., Saleh, R. M., & Elshal, M. F. 2014. Molecular and Immunohistochemical Evidences for Cardiovascular Damage in Addition to Renal Toxicity of Cisplatin. *Life Science Journal*, *11*(6), 1–8.
- Wei, C. M., Hu, S. L., Miller, V. M., & Burnett, J. C. 1994. Vascular Actions of C-Type Natriuretic Peptide in Isolated Porcine Coronary Arteries and Coronary Vascular Smooth Muscle Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *205*(1), 765–771.
- Weijl, N. I., Rutten, M. F. J., Zwinderman, A. H., Keizer, H. J., Nooy, M. A., Rosendaal, F. R., Osanto, S. 2000. Thromboembolic Events During Chemotherapy for Germ Cell Cancer: A Cohort Study and Review of the Literature. *Journal of Clinical*

- Oncology*, 18(10), 2169–2178.
- Yanagisawa, M., Inoue, A., Ishikawa, Tomohi., Kasuya, Y., Kimura, S., KUMAGAYEt, S., Masaki, T. 1988. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide, 85, 6964–6967.
- Yao, X., Panichpisal, K., Kurtzman, N., & Nugent, K. 2007. Cisplatin Nephrotoxicity: A Review. *The American Journal of the Medical Sciences*, 334(2), 115–124.
- Yetik-Anacak, G., & Catravas, J. D. 2006. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology*, 45(5), 268–276.
- Yilmaz, H. R., Iraz, M., Sogut, S., Ozyurt, H., Yildirim, Z., Akyol, O., & Gergerlioglu, S. 2004. The effects of erdosteine on the activities of some metabolic enzymes during cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacological Research*, 50(3), 287–290.
- Yilmaz, H. R., Sogut, S., Ozyurt, B., Ozugurlu, F., Sahin, S., Isik, B., Ozyurt, H. 2005. The activities of liver adenosine deaminase, xanthine oxidase, catalase, superoxide dismutase enzymes and the levels of malondialdehyde and nitric oxide after cisplatin toxicity in rats: protective effect of caffeic acid phenethyl ester. *Toxicology and Industrial Health*, 21(1–2), 67–73.
- Yu, M., Han, J., Cui, P., Dai, M., Li, H., Zhang, J., & Xiu, R. 2008. Cisplatin up-regulates ICAM-1 expression in endothelial cell via a NF-KB dependent pathway. *Cancer Science*, 99(2), 391–397.

### ภาคผนวก

ตารางที่ 1 ผลของ phenylephrine (PE) ความเข้มข้นระหว่าง  $10^{-10}$ - $10^{-4}$  M ต่อการหดตัวของ aortic ring ที่แสดงโดยค่า % increase from resting tension

ค่าที่ แสดงคือ mean  $\pm$  S.E.M. (n=6)

\*P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ของกลุ่มเดียวกัน (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

#P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact endothelium (unpaired t-test)

Isolated aortic ring	concentration	% increase from resting tension
Intact endothelium	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-10}$ M PE	1.67 $\pm$ 0.76
	$10^{-9}$ M PE	2.13 $\pm$ 0.91
	$10^{-8}$ M PE	8.17 $\pm$ 2.68
	$10^{-8}$ M PE	89.07 $\pm$ 5.46
	$10^{-7}$ M PE	138.1 $\pm$ 6.57*
	$10^{-6}$ M PE	145.44 $\pm$ 7.6*
	$10^{-5}$ M PE	126.64 $\pm$ 5.54*
denuded	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-10}$ M PE	0.76 $\pm$ 0.29
	$10^{-9}$ M PE	1.71 $\pm$ 0.33
	$10^{-8}$ M PE	53.75 $\pm$ 5.96* <sup>#</sup>
	$10^{-7}$ M PE	139.48 $\pm$ 11.71* <sup>#</sup>
	$10^{-6}$ M PE	180.82 $\pm$ 5.18* <sup>#</sup>
	$10^{-5}$ M PE	186.79 $\pm$ 5.39* <sup>#</sup>
	$10^{-4}$ M PE	181.11 $\pm$ 5.06* <sup>#</sup>

ตารางที่ 2 ผลของ acetylcholine (ACh) ต่อการคลายตัวของ aortic ring ที่ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE ที่แสดงโดยค่า % relaxation from  $10^{-7}$  M PE precontraction

ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  S.E.M. (n=6)

\*P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับค่า control ของกลุ่มเดียวกัน (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

#P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม intact endothelium (unpaired t-test)

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Intact endothelium	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	4.35 $\pm$ 0.58
	$10^{-11}$ M ACh	10.01 $\pm$ 1.28*
	$10^{-10}$ M ACh	18.72 $\pm$ 1.34*
	$10^{-9}$ M ACh	22.72 $\pm$ 1.91*
	$10^{-8}$ M ACh	26.74 $\pm$ 2.37*
	$10^{-7}$ M ACh	69.69 $\pm$ 3.45*
	$10^{-6}$ M ACh	100.11 $\pm$ 0.78*
	$10^{-5}$ M ACh	103.89 $\pm$ 0.92*
denuded	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	0.36 $\pm$ 0.37 <sup>#</sup>
	$10^{-11}$ M ACh	0.81 $\pm$ 0.32 <sup>#</sup>
	$10^{-10}$ M ACh	1.12 $\pm$ 0.27 <sup>#</sup>
	$10^{-9}$ M ACh	1.67 $\pm$ 0.86 <sup>#</sup>
	$10^{-8}$ M ACh	1.82 $\pm$ 1.12 <sup>#</sup>
	$10^{-7}$ M ACh	1.01 $\pm$ 1.35 <sup>#</sup>
	$10^{-6}$ M ACh	1.67 $\pm$ 1.09 <sup>#</sup>
	$10^{-5}$ M ACh	2.47 $\pm$ 0.73 <sup>#</sup>



ตารางที่ 3 ผลของ morelloflavone (Mor) ต่อการคลายตัวของ aortic ring กลุ่ม control (Con) ที่มี endothelium (intact endothelium) และ endothelium ถูกทำลาย (denuded) และกลุ่ม cisplatin (Cis) ทำให้หดตัวก่อนด้วย  $10^{-7}$  M PE

ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM (n=6 ทุกกลุ่มการทดลอง)

\*, #  $P < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con (intact endothelium) และ Con (denuded) ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Intact endothelium	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M Mor	5.65 $\pm$ 0.56
	$10^{-11}$ M Mor	15.22 $\pm$ 1.39
	$10^{-10}$ M Mor	29.88 $\pm$ 2.5
	$10^{-9}$ M Mor	38.93 $\pm$ 2.79
	$10^{-8}$ M Mor	45.34 $\pm$ 2.76
	$10^{-7}$ M Mor	49.82 $\pm$ 2.83
	$10^{-6}$ M Mor	57.11 $\pm$ 3.51
	$10^{-5}$ M Mor	75.44 $\pm$ 0.95
denuded	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M Mor	-0.08 $\pm$ 0.38
	$10^{-11}$ M Mor	0.96 $\pm$ 1.09*
	$10^{-10}$ M Mor	2.08 $\pm$ 1.18*
	$10^{-9}$ M Mor	3.61 $\pm$ 1.53*
	$10^{-8}$ M Mor	4.69 $\pm$ 1.63*
	$10^{-7}$ M Mor	6.33 $\pm$ 1.98*
	$10^{-6}$ M Mor	7.5 $\pm$ 2.36*
	$10^{-5}$ M Mor	8.92 $\pm$ 2.31*
Cis	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M Mor	4.18 $\pm$ 0.53
	$10^{-11}$ M Mor	8.97 $\pm$ 1.06* <sup>#</sup>
	$10^{-10}$ M Mor	14.55 $\pm$ 1.51* <sup>#</sup>
	$10^{-9}$ M Mor	20.24 $\pm$ 1.89* <sup>#</sup>

	$10^{-8}$ M Mor	$26.06 \pm 1.76^{* \#}$
	$10^{-7}$ M Mor	$31.18 \pm 1.45^{* \#}$
	$10^{-6}$ M Mor	$37.76 \pm 1.76^{* \#}$
	$10^{-5}$ M Mor	$57.54 \pm 3.53^{* \#}$

ตารางที่ 4. ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

Isolated aortic ring	concentration	% increase from resting tension
Con	Control	$0 \pm 0$
	$10^{-10}$ M PE	$0.66 \pm 0.37$
	$10^{-9}$ M PE	$1.66 \pm 0.36$
	$10^{-8}$ M PE	$3.7 \pm 0.55$
	$10^{-7}$ M PE	$83.31 \pm 5$
	$10^{-6}$ M PE	$132.37 \pm 5.98$
	$10^{-5}$ M PE	$145.76 \pm 6.31$
Cis 3 days	Control	$0 \pm 0$
	$10^{-10}$ M PE	$0.79 \pm 0.4$
	$10^{-9}$ M PE	$1.73 \pm 0.62$
	$10^{-8}$ M PE	$6.78 \pm 1.19$
	$10^{-7}$ M PE	$89.03 \pm 5.36$
	$10^{-6}$ M PE	$139.85 \pm 2.81$
	$10^{-5}$ M PE	$154.88 \pm 3.39$

ตารางที่ 5. ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Con	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	3.99 $\pm$ 0.94
	$10^{-11}$ M ACh	11.34 $\pm$ 2.14
	$10^{-10}$ M ACh	16.96 $\pm$ 2.8
	$10^{-9}$ M ACh	20.97 $\pm$ 3.08
	$10^{-8}$ M ACh	27.36 $\pm$ 4.58
	$10^{-7}$ M ACh	71.37 $\pm$ 7.76
	$10^{-6}$ M ACh	102.78 $\pm$ 3.87
	$10^{-5}$ M ACh	107.87 $\pm$ 2.34
Cis 3 days	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	3.56 $\pm$ 0.88
	$10^{-11}$ M ACh	10.34 $\pm$ 1.76
	$10^{-10}$ M ACh	15.37 $\pm$ 1.68
	$10^{-9}$ M ACh	18.81 $\pm$ 1.51
	$10^{-8}$ M ACh	24.42 $\pm$ 2.18
	$10^{-7}$ M ACh	65.37 $\pm$ 6.29
	$10^{-6}$ M ACh	100.44 $\pm$ 3.28
	$10^{-5}$ M ACh	106.04 $\pm$ 2.8

ตารางที่ 6. ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin 3 วัน (Cis 3 days), ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Con	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M SNP	6.59 $\pm$ 1.19
	$10^{-11}$ M SNP	17.27 $\pm$ 2.85
	$10^{-10}$ M SNP	24.72 $\pm$ 4.08
	$10^{-9}$ M SNP	42.6 $\pm$ 3.68
	$10^{-8}$ M SNP	86.63 $\pm$ 1.86
	$10^{-7}$ M SNP	108.23 $\pm$ 2.34
	$10^{-6}$ M SNP	109.86 $\pm$ 2.18
	$10^{-5}$ M SNP	110.15 $\pm$ 2.18
Cis 3 days	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M SNP	6.08 $\pm$ 1.8
	$10^{-11}$ M SNP	20.73 $\pm$ 6.57
	$10^{-10}$ M SNP	28.64 $\pm$ 8.93
	$10^{-9}$ M SNP	38.84 $\pm$ 10.06
	$10^{-8}$ M SNP	80.07 $\pm$ 8.48
	$10^{-7}$ M SNP	100.92 $\pm$ 3.31
	$10^{-6}$ M SNP	107.89 $\pm$ 0.94
	$10^{-5}$ M SNP	108.07 $\pm$ 1.24

ตารางที่ 7. ผลของ PE ต่อการหดตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

Isolated aortic ring	Concentration	% increase from resting tension
Con	Control	0 $\pm$ 0
	10 <sup>-10</sup> M PE	0.65 $\pm$ 0.25
	10 <sup>-9</sup> M PE	0.95 $\pm$ 0.32
	10 <sup>-8</sup> M PE	12.39 $\pm$ 0.98
	10 <sup>-7</sup> M PE	83.54 $\pm$ 3.99
	10 <sup>-6</sup> M PE	131.28 $\pm$ 3.44
	10 <sup>-5</sup> M PE	144.83 $\pm$ 2.73
Cis	Control	0 $\pm$ 0
	10 <sup>-10</sup> M PE	0.67 $\pm$ 0.2
	10 <sup>-9</sup> M PE	0.93 $\pm$ 0.23
	10 <sup>-8</sup> M PE	19.26 $\pm$ 0.48*
	10 <sup>-7</sup> M PE	120.76 $\pm$ 5.22*
	10 <sup>-6</sup> M PE	161.91 $\pm$ 3.09*
	10 <sup>-5</sup> M PE	170.36 $\pm$ 2.28*
Cis+Mor 0.1 mg/kg	Control	0 $\pm$ 0
	10 <sup>-10</sup> M PE	0.65 $\pm$ 0.31
	10 <sup>-9</sup> M PE	0.97 $\pm$ 0.32
	10 <sup>-8</sup> M PE	16.54 $\pm$ 0.86*
	10 <sup>-7</sup> M PE	116.16 $\pm$ 2.91*
	10 <sup>-6</sup> M PE	154.56 $\pm$ 1.75*
	10 <sup>-5</sup> M PE	165.55 $\pm$ 2.57*
Cis+Mor 1 mg/kg	Control	0 $\pm$ 0
	10 <sup>-10</sup> M PE	0.72 $\pm$ 0.19
	10 <sup>-9</sup> M PE	1.13 $\pm$ 0.23
	10 <sup>-8</sup> M PE	11.42 $\pm$ 1.17

	$10^{-7}$ M PE	$96.64 \pm 2.15^{* \#}$
	$10^{-6}$ M PE	$142.53 \pm 2.48^{* \#}$
	$10^{-5}$ M PE	$154.42 \pm 1.34^{* \#}$
Cis+Mor 10 mg/kg	Control	$0 \pm 0$
	$10^{-10}$ M PE	$2.2 \pm 1$
	$10^{-9}$ M PE	$3.64 \pm 1.35$
	$10^{-8}$ M PE	$16.27 \pm 1.11^*$
	$10^{-7}$ M PE	$126.48 \pm 8.44^*$
	$10^{-6}$ M PE	$167.58 \pm 3.15^*$
	$10^{-5}$ M PE	$178.77 \pm 3.03^*$

ตารางที่ 8. ผลของ ACh ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Con	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	3.8 $\pm$ 1.18
	$10^{-11}$ M ACh	9.07 $\pm$ 1.26
	$10^{-10}$ M ACh	15.66 $\pm$ 1.67
	$10^{-9}$ M ACh	20.74 $\pm$ 2.07
	$10^{-8}$ M ACh	26.94 $\pm$ 2.59
	$10^{-7}$ M ACh	72.55 $\pm$ 4.99
	$10^{-6}$ M ACh	103.75 $\pm$ 1.71
	$10^{-5}$ M ACh	107.6 $\pm$ 1.34
Cis	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	3.15 $\pm$ 1.02
	$10^{-11}$ M ACh	8.21 $\pm$ 1.26
	$10^{-10}$ M ACh	12.09 $\pm$ 1.72
	$10^{-9}$ M ACh	14.16 $\pm$ 1.8*
	$10^{-8}$ M ACh	16.65 $\pm$ 1.57*
	$10^{-7}$ M ACh	40.13 $\pm$ 2.98*
	$10^{-6}$ M ACh	85.68 $\pm$ 2.05*
	$10^{-5}$ M ACh	95.14 $\pm$ 1.16*
Cis+Mor 0.1 mg/kg	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M ACh	2.8 $\pm$ 0.33
	$10^{-11}$ M ACh	6.27 $\pm$ 0.53
	$10^{-10}$ M ACh	10.46 $\pm$ 1.04
	$10^{-9}$ M ACh	13.78 $\pm$ 1.42*
	$10^{-8}$ M ACh	19.29 $\pm$ 1.09*
	$10^{-7}$ M ACh	47.44 $\pm$ 0.94*

	$10^{-6}$ M ACh	$85.16 \pm 1.53^*$
	$10^{-5}$ M ACh	$94.28 \pm 1.27^*$
Cis+Mor 1 mg/kg	Control	$0 \pm 0$
	$10^{-12}$ M ACh	$3.08 \pm 0.51$
	$10^{-11}$ M ACh	$7.42 \pm 0.61$
	$10^{-10}$ M ACh	$11.11 \pm 1.12$
	$10^{-9}$ M ACh	$15.79 \pm 1.24^*$
	$10^{-8}$ M ACh	$19.79 \pm 0.96^*$
	$10^{-7}$ M ACh	$57.1 \pm 0.89^{*\#}$
	$10^{-6}$ M ACh	$95.53 \pm 2.18^{*\#}$
	$10^{-5}$ M ACh	$101.19 \pm 1.4^{*\#}$
	Cis+Mor 10 mg/kg	Control
$10^{-12}$ M ACh		$2.34 \pm 0.58$
$10^{-11}$ M ACh		$6.29 \pm 1.48$
$10^{-10}$ M ACh		$11.01 \pm 1.29$
$10^{-9}$ M ACh		$13.37 \pm 0.79^*$
$10^{-8}$ M ACh		$16.37 \pm 1.13^*$
$10^{-7}$ M ACh		$43.61 \pm 4.01^*$
$10^{-6}$ M ACh		$82.3 \pm 4.24^*$
$10^{-5}$ M ACh		$94.45 \pm 1.08^*$



ตารางที่ 9. ผลของ SNP ต่อการคลายตัวของ thoracic aortic ring ในกลุ่ม control (Con), cisplatin (Cis), cisplatin+morelloflavone (Cis+Mor) ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

Isolated aortic ring	concentration	% relaxation from $10^{-7}$ M PE precontraction
Con	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M SNP	6.53 $\pm$ 1.22
	$10^{-11}$ M SNP	15.69 $\pm$ 2.89
	$10^{-10}$ M SNP	26.88 $\pm$ 3.22
	$10^{-9}$ M SNP	46.19 $\pm$ 6.63
	$10^{-8}$ M SNP	85.68 $\pm$ 5.36
	$10^{-7}$ M SNP	107.12 $\pm$ 1.93
	$10^{-6}$ M SNP	109.33 $\pm$ 2.07
	$10^{-5}$ M SNP	109.23 $\pm$ 2.03
Cis	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M SNP	7.14 $\pm$ 1.26
	$10^{-11}$ M SNP	18.39 $\pm$ 1.84
	$10^{-10}$ M SNP	25.28 $\pm$ 1.82
	$10^{-9}$ M SNP	40.59 $\pm$ 2.14
	$10^{-8}$ M SNP	80.41 $\pm$ 6.7
	$10^{-7}$ M SNP	102.8 $\pm$ 4.14
	$10^{-6}$ M SNP	106.04 $\pm$ 3.03
	$10^{-5}$ M SNP	108.46 $\pm$ 1.47
Cis+Mor 0.1 mg/kg	Control	0 $\pm$ 0
	$10^{-12}$ M SNP	9.49 $\pm$ 1.1
	$10^{-11}$ M SNP	18.68 $\pm$ 4.39
	$10^{-10}$ M SNP	25.92 $\pm$ 5.79
	$10^{-9}$ M SNP	41.88 $\pm$ 5.8
	$10^{-8}$ M SNP	81.96 $\pm$ 7.27
	$10^{-7}$ M SNP	102.8 $\pm$ 2.56

	$10^{-6}$ M SNP	$105.35 \pm 1.75$
	$10^{-5}$ M SNP	$106.21 \pm 2.02$
Cis+Mor 1 mg/kg	Control	$0 \pm 0$
	$10^{-12}$ M SNP	$6.15 \pm 1.34$
	$10^{-11}$ M SNP	$17.05 \pm 1.83$
	$10^{-10}$ M SNP	$27.77 \pm 3.06$
	$10^{-9}$ M SNP	$42.37 \pm 2.21$
	$10^{-8}$ M SNP	$83.68 \pm 3.01$
	$10^{-7}$ M SNP	$101.15 \pm 1.95$
	$10^{-6}$ M SNP	$105.2 \pm 1.41$
	$10^{-5}$ M SNP	$107.27 \pm 1.36$
	Cis+Mor 10 mg/kg	Control
$10^{-12}$ M SNP		$5.11 \pm 2.14$
$10^{-11}$ M SNP		$12.25 \pm 2.88$
$10^{-10}$ M SNP		$19.51 \pm 4.37$
$10^{-9}$ M SNP		$32.82 \pm 5.11$
$10^{-8}$ M SNP		$71.78 \pm 3.96$
$10^{-7}$ M SNP		$87.92 \pm 3.18^{*#}$
$10^{-6}$ M SNP		$100.01 \pm 2.43$
$10^{-5}$ M SNP		$104.3 \pm 1.45$

ตารางที่ 10. ผลของ cisplatin (7.5 mg/kg) (Cis) และ cisplatin+morelloflavone (0.1,1 และ 10 mg/kg)

(Cis+Mor) ต่อระดับ plasma MDA

ค่าที่แสดงคือ mean  $\pm$  SEM

\*, # P<0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Con และ Cis ตามลำดับ (one-way ANOVA with multiple comparison using Student-Newman-Keuls post hoc test)

Treatment	Plasma MDA level ( $\mu\text{mol/L}$ )
Con	30.83 $\pm$ 2.04
Cis	75.52 $\pm$ 5.7*
Cis+Mor 0.1 mg/kg	70.44 $\pm$ 9.34*
Cis+Mor 1 mg/kg	48.32 $\pm$ 2.16*#
Cis+Mor 10 mg/kg	73.42 $\pm$ 8.94*

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายอัญญา สุมาลี  
 รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710220117  
 วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขากายภาพบำบัด)	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2557

## ทุนการศึกษา

1. ทุนผู้ช่วยสอน คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2557 - 2559
2. ทุนราชกรีฑาสโมสร ปีการศึกษา 2557 - 2559
3. ทุนมูลนิธิวิวัฒน์ธรรมอิสลามเพื่อการศึกษาและการพัฒนา (วกพ.) ปีการศึกษา 2557 - 2559

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

**Sumalee, A., Mahabusarakum, W., Kirirat, P. and Hiranyachattada, S.** 2015. Effect of morelloflavone from *Garcinia dulcis* on the contraction of isolated thoracic aorta of cisplatin-treated Rat. *The 8<sup>th</sup> Scientific Congress Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS) 2015*, Bangkok, Thailand. P:130