

Thesis Title	Study of Oxidative Stress in Vascular Endothelial Cells in Coronary Heart Disease Patients	
Author	Mr. Voravuth Somsak	
Degree	Master of Science (Biochemistry)	
Thesis Advisory Committee:	Dr. Somdet Srichairatanakool	Chairperson
	Dr. Yuttana Munde	Member
	Assist. Prof. Weerachai Nawarawong	Member

ABSTRACT

Vascular endothelial cell (EC) has important functions such as maintenance of blood circulation and fluidity, vascular tone regulation, responses to inflammation and shearing force. Endothelial dysfunction caused by oxidative stress and atherosclerosis can induce pro-coagulant, vasoconstriction and growth-stimulatory activity, and increased adhesive activity for leukocytes. Coronary artery disease (CAD) is the most common form of heart disease and remains the major cause of death in both developed and developing countries. It is referred to a chronic inflammatory disease of the arterial intima characterized by the formation of atherosclerotic plaque, causing angina and heart attacks. Risk factors contributing to the CAD incidence are gender, age, high blood pressure, high plasma cholesterol, smoking, obesity and not being physical exercise. This work was purposed to optimize the conditions for isolation of vascular EC and study the oxidative stress in endothelial veins and arteries vessels from the coronary-artery bypass graft (CABG) patients. Human umbilical veins (HUV) and arteries (HUA) were obtained from post-partum women and used as a model in collagenase isolation and a control in oxidative stress measurement. Collagenase concentration, vascular length, incubation time,

suspension media were optimized to achieve highly viable EC. Trypan-blue exclusion technique was used to evaluate the EC viability. Flow cytometry and immunofluorescent microscopy were used to detect the oxidative stress level in DCF-labeled EC. As a result, incubation of blood vessels with collagenase solution (2,930 IU/L) for 60 minutes was the most suitable for isolation of vascular EC, which more than 80% viable cells were obtained. Opened-collagenization of HUV and HUA produced significantly more respective HUVEC and HUAEC than closed-system collagenization. From opened- and closed-system vascular collagenization, the number of HUAEC was significantly lower than that of HUVEC. M199 solution was a better suspension medium than HBSS for maintaining the viable EC. During storage in suspension media at 4°C, the viability of HUVEC and HUAEC was gradually decreased in time-dependent manner. The viability of EC isolated from HUAEC (95%), RA (93%) and LIMA (95%) was higher than that from HUVEC (88%) and SVG (85%). The number of EC isolated from SVG (53±4 cells/cu.mm) was significantly lower than that from HUV (70±5 cells/cu.mm). The number of EC isolated from RA (7±2 cells/cu.mm) and LIMA (7±1 cells/cu.mm) was not significantly different. The oxidative stress was significantly higher in EC from SVG (15±3 FI unit) than that from HUV (6±1 FI unit), HUA (4±2 FI unit), RA (5±1 FI unit) and LIMA (4±1 FI unit). After challenge with hydrogen peroxide, the oxidative stress was predominantly increased in all EC and remained the highest in the EC from SVG. This study indicated the optimal conditions including collagenase concentration, M199 medium and incubation time for isolation of vascular EC having more than 80% viability. The oxidative stress was the highest in the EC from SVG, probably relating to less success in bypass graft. For the future work, isolated EC may be used for investigation of anti-oxidative and vasodilatation compounds so that the cardiovascular diseases can be prevented or diminished.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ การศึกษาภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปในเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี

ผู้เขียน

วรุณี สมศักดิ์

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ. ดร. สมเดช ศรีชัยรัตนกุล

ประธานกรรมการ

อ. ดร. ยุทธนา หมั่นดี

กรรมการ

ผศ. นพ. วีระชัย นาวารวงศ์

กรรมการ

บทคัดย่อ

เซลล์เอนโดทีเลียมมีบทบาทสำคัญมากมาย เช่น ควบคุมเกี่ยวกับการไหลเวียนของเลือด ควบคุมหลอดเลือด ตอบสนองต่อการอักเสบและภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป ความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมเนื่องจากภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป สามารถกระตุ้นการเกาะกลุ่มของเกร็ดเลือด การหดตัวของกล้ามเนื้อและเพิ่มการจับกับเม็ดเลือดขาว โรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารีจัดอยู่ในกลุ่มของโรคหัวใจซึ่งเป็นสาเหตุการตายในหลายประเทศทั่วโลก เนื่องจากหลอดเลือดแดงชั้นในแข็งตัวจากการอุดตัน ซึ่งมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้แก่ เพศ อายุ ความดันโลหิต ระดับไขมันในเลือด การสูบบุหรี่ ความอ้วนและการออกกำลังกาย งานวิจัยครั้งนี้ได้มีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือด และได้ศึกษาถึงภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปในเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือดที่ใช้ในการผ่าตัดทำทางเบี่ยง ในผู้ป่วยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี หลอดเลือดดำและแดงจากสายสะดือถูกใช้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการแยกเซลล์เอนโดทีเลียม และใช้เป็นกลุ่มควบคุมปกติสำหรับการศึกษาภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไป สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการแยกเซลล์เอนโดทีเลียมที่มีชีวิตได้แก่ ปริมาณของเอนไซม์คอลลาจีเนส ความยาวของหลอดเลือด ระยะเวลาการย่อยของเอนไซม์ และสารตัวกลางที่เหมาะสมต่อการเก็บเซลล์เอนโดที

เลียม การมีชีวิตและปริมาณของเซลล์เอนโดทีเลียมถูกวิเคราะห์โดยวิธี Trypan-blue dye exclusion technique นอกจากนี้ภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปจะวิเคราะห์โดยโฟลซัยโตเมตรและกล้องจุลทรรศน์แบบเรื่อแสง จากผลการทดลองพบว่าปริมาณเอนไซม์คอลลาจีเนส 2,930 หน่วยต่อลิตรที่เวลา 60 นาทีสามารถแยกเซลล์เอนโดทีเลียมที่มีชีวิตได้มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ การตัดเปิดหลอดเลือดจะให้ปริมาณการแยกเซลล์เอนโดทีเลียมมากกว่าการไม่ตัดเปิดหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งหลอดเลือดดำและแดง แต่หลอดเลือดแดง จะให้ปริมาณการแยกเซลล์เอนโดทีเลียมน้อยกว่าหลอดเลือดดำอย่างมีนัยสำคัญ M199 เป็นสารตัวกลางที่เหมาะสมในการรักษาเซลล์เอนโดทีเลียมให้มีชีวิต นอกจากนี้พบว่าเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือดแดงจะมีปริมาณน้อยกว่าหลอดเลือดดำ แต่มีเซลล์เอนโดทีเลียมที่มีชีวิตมากกว่าโดยเฉพาะหลอดเลือดแดงจากทรวงอกด้านซ้าย (LIMA) จากการศึกษาถึงภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปพบว่าเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือดดำ มีระดับภาวะอนุมูลอิสระมากกว่าเซลล์เอนโดทีเลียมจากหลอดเลือดแดง โดยเฉพาะหลอดเลือดดำจากขา (SVG) จากผลการศึกษาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สภาวะที่เหมาะสมในการแยกเซลล์เอนโดทีเลียมที่มีชีวิตประกอบด้วยปริมาณเอนไซม์คอลลาจีเนส 2,930 หน่วยต่อลิตรที่ 60 นาที และเก็บเซลล์ในตัวกลางที่เป็น M199 และจากภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปในเซลล์เอนโดทีเลียมและการมีชีวิตของเซลล์ น่าจะมีความสำคัญต่อการเลือกใช้หลอดเลือดสำหรับทำทางเบี่ยงในผู้ป่วยที่เป็นโรคหลอดเลือดหัวใจโคโรนารี จากงานครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปถึงการยับยั้งภาวะอนุมูลอิสระมากเกินไปในเซลล์เอนโดทีเลียม หรือการใช้สารบางอย่างเพื่อรักษาการมีชีวิตของเซลล์ เป็นต้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
 Copyright © by Chiang Mai University
 All rights reserved