ผลของอายุและการออกกำลังกายต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมินภายในหัวใจหนูขาวใหญ่

The Effect of Age and Exercise on Parvalbumin Expression in Rat Hearts

กาญจนา ครชาตรี

Kanjana Kornchatri

0

เลขหมู่ QP321.5 ก62 2551 ก. 2

Bib Key 308695

9/ ธ.ค. 2551

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science in Anatomy

Prince of Songkla University

2551

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของอายุและการออกกำลังกายต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมินภายในหัวใจหนูขาวใหญ่

ผู้เขียน นางสาวกาญจนา ครชาตรี

สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.วันดี อุดมอักษร)

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ทวีพร ประลมพ์กาญจน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. ทพ.สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของอายุและการออกกำลังกายต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ภายในหัวใจหนูขาวใหญ่
ผู้เขียน	นางสาวกาญจนา ครชาตรี
สาขาวิชา	กายวิภาคศาสตร์
ปีการศึกษา	2550

บทคัดย่อ

พาร์วัลบูมินเป็นโปรตีนที่มีความสามารถในการจับกับแคลเซียม ทำหน้าที่ให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจหนู การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของอายุและการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลา นานต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน (PV) ในหัวใจหนู หนูสายพันธุ์ Wistar อายุ 3, 6, 12 และ 18 เดือน ถูกแบ่งเป็นสอง 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม และ กลุ่มว่ายน้ำ หนูกลุ่มว่ายน้ำถูกฝึกให้ว่ายน้ำในถังน้ำวน เป็นเวลา 10-20 นาทีต่อวันเป็นระยะเวลา 6 เดือน เมื่อเสร็จสิ้นการฝึกให้ว่ายน้ำหนูกลุ่มดังกล่าวจะมีอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน จากนั้นจึงนำหัวใจหนูมาศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี และเวทเทอร์น บล็อทติ้ง เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน จากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของปฏิกิริยาอิมมูโนและการแสดงออกของ PV ลดลงในหนูอายุ 18 และ 24 เดือน ในกลุ่มควบคุม แต่เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12 และ 18 เดือน แต่ในหนูอายุ 24 เดือน ทั้งสองกลุ่มมีการแสดงออกของ PV ไม่แตกต่างกันจากผลการศึกษาเสนอแนะว่า การออกกำลังกายตั้งแต่วัยหนุ่มจนถึงวัยกลางคนสามารถชักนำให้เพิ่มการแสดงออกของ PV ได้

ดีกว่าการออกกำลังกายในวัยชรา การที่พาร์วัลบูมินในหัวใจในวัยชราลดลง อาจนำไปสู่การอธิบายพยาธิสภาพของการบกพร่องในการคลายตัวของหัวใจซึ่งพบมากในผู้สูงอายุ และการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำมีผลทำให้พาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นอาจนำไปสู่แนวทางในการป้องกันและรักษาโรคหัวใจชนิดไดแอสโตลิค

Thesis Title	Effect of age and exercise on parvalbumin expression in rat hearts
Author	Miss Kanjana Kornchatri
Major Program	Anatomy
Academic Year	2007

ABSTRACT

Parvallbumin is a cytoplasmic calcium-binding protein, functions as a cardiomyocyte relaxation factor. The aim of this study was to investigate the effect of aging and long term swimming exercise on expression of PV in rat heart. Male wistar rats age: 3, 6, 12 and 18 months were each divided into groups: a control group (C) and a swimming group (S). The rats in the swimming group were trained by swimming 10-20 min/day in a circulating water tank for six months. As the end of exercise period, the rats were 9, 12, 18, 24 months of age after that the rats were anethetized. Then, their hearts were removed and processed for immunohistochemistry and Western blotting in order to detect the parvallbumin expression. The intensity of PV immunoreactivity and the expression of PV in the heart tissue of sedentary animals decreased in 18 and 24 months age groups. However, the exercise group of the rat age

9, 12 and 18 months showed an increase of PV compared to their control group. This results indicate that PV is down - regulated in aging rats and up-regulated by exercise except at 24 months. Hence exercise in adult, middle age rat could reduce the effects of aging better than with age rats. Down – regulation of PV in aging heart may consider as a possible cause of diastolic dysfunction in elderly. The swimming exercise mediated an increase of PV expression which may lead to a new approach for preventing and treatment of diastolic heart failure.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จอย่างสมบูรณ์ ผู้เขียนขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุราพร วงศ์วัชรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์ และ ดร. วันดี อุดมอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำและประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ตลอดเวลาระยะการดำเนินงานและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ทวีพร ประลมพ์กาญจน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ทพ.สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่ให้ข้อเสนอแนะและแก้ไขข้อบกพร่อง

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการประสานงานด้านต่างๆ และให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณคุณวิไลรัตน์ กันควรและคุณเพรพิงค์ โลจนไพบูลย์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบคุณภาควิชากายวิภาคศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือในการทำวิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุนอุดหนุนในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณสถานเลี้ยงสัตว์ทดลองภาคใต้สำหรับความอนุเคราะห์ในเรื่องสัตว์ทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาเป็นอย่างสูงที่ให้การสนับสนุนมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ขออโหสิกรรมแก่สัตว์ทดลองทุกตัวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

กาญจนา ครชาตรี

สารบัญ

	หน้า
รายการรูป	(9)
รายการตารางภาคผนวก	(11)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(12)
1. บทนำ	1
2. วิธีการวิจัย	26
3. ผลการทดลอง	42
4. บทวิจารณ์	57
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	74
ประวัติผู้เขียน	87

รายการรูป

		หน้า
บทที่ 1:	รูปที่ 1-1 แสดงวงจรการขนส่งแคลเซียมในกล้ามเนื้อลาย	7
	รูปที่ 1-2 แสดงกลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในการช่วยการคลายตัวของหัวใจในระยะต่างๆ	7
	รูปที่ 1-3 แสดงลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของหัวใจสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม	16
	รูปที่ 1-4 แสดงโครงสร้างของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ	17
	รูปที่ 1-5 แสดงกลไกการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ	18
บทที่ 2:	รูปที่ 2-1 แสดงการว่ายน้ำของหนูกลุ่มว่ายน้ำ	28
บทที่ 3:	รูปที่ 3-1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน	43
	รูปที่ 3-2 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักหัวใจหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ24 เดือน	44
	รูปที่ 3-3 แสดงสัดส่วนน้ำหนักหัวใจเทียบน้ำหนักตัวหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน	45
	รูปที่ 3-4 แสดงการย้อม Masson's trichrome ของเนื้อเยื่อหัวใจหนูอายุ 18 และ 24 เดือน กลุ่มควบคุมเทียบกลุ่มว่ายน้ำ	47

รายการรูป (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 3-5 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ EDL และกลุ่มควบคุมเชิงลบ 50

รูปที่ 3-6 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน 51

รูปที่ 3-7 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูกลุ่มควบคุมเทียบกลุ่มว่ายน้ำ 52

รูปที่ 3-8 แสดงแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูกลุ่มอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำ 54

รูปที่ 3-9 แสดงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูในอายุ9, 12, 18 และ 24 เดือน 55

รูปที่ 3-10 แสดงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูในอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำ 56

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1. ตารางที่1 แสดงค่าเฉลี่ยและทดสอบความแตกต่างของการแสดงออก ของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูของกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มว่ายน้ำใน แต่ละกลุ่มอายุ 75
2. ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนู 75
3. ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบความแตกต่างของการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ในแต่ละกลุ่มอายุ 76
4. ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ในแต่ละกลุ่มอายุ 76

ตัวย่อและสัญลักษณ์

PV	=	Parvalbumin
EDL	=	Extensor digitolum longus
SR	=	Sarcoplasmic reticulum
C	=	Control group
S	=	Swimming group
Ca^{2+}	=	calcium
Mg^{2+}	=	magnesium
SERCA 2a	=	SR Ca^{2+} transport/regulatory proteins - Ca^{2+}-ATPase

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

โรคหัวใจล้มเหลว (Heart failure) เป็นโรคที่มีอันตรายร้ายแรงถึงชีวิตและมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างเร็ว อัตราการเสียชีวิตจากโรคหัวใจล้มเหลวอยู่ใน 5 อันดับแรกของการเสียชีวิตในปี 2548 โรคหัวใจล้มเหลวมี 2 ชนิด ได้แก่โรคหัวใจชนิดซีสโตลิค (Systolic heart failure) จะพบได้ประมาณ 60% และสามารถรักษาด้วยยาต่างๆ เช่น β–blockers (Senior, 2001) ส่วนโรคหัวใจอีกประเภทหนึ่งได้แก่ โรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิค (Diastolic heart failure) ซึ่งพบได้ประมาณ 40% (Senni and Redfield, 2001; Schmidt *et al.*, 2004) ซึ่งโรคหัวใจชนิดนี้ยังไม่ทราบสาเหตุและยังไม่มีการรักษา

โรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคเป็นโรคที่พบมากในผู้สูงอายุ (Omahony, 2003) เกิดจากการที่หัวใจห้องล่างซ้ายคลายตัวผิดปกติ ทำให้เพิ่มความต้านทานในการที่เลือดจะไหลเข้าสู่หัวใจห้องล่างซ้ายมีผลทำให้เลือดสูบฉีดไปเลี้ยงร่างกายไม่เพียงพอ จึงเกิดภาวะหัวใจวาย (Haney *et al.*, 2005) โดยปัจจัยที่ทำให้การคลายตัวของหัวใจผิดปกติได้แก่ hypertrophy, asynchrony, ischemia, abnormal loading และ abnormal Ca^{2+} flux (Eugene, 1992) การชราภาพเป็นอีกปัจจัยที่ทำให้การทำงานของหัวใจระยะคลายตัวลดลงซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดโรคหัวใจชนิดไดแอสโตลิคในผู้สูงอายุ โดยการชราภาพจะทำให้การคลายตัวของหัวใจในระยะต้นลดลง (Levy *et al.*, 1993) จากการศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจ

ล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคพบว่ามีการคลายตัวช้าเนื่องจากมีความบกพร่องในการดึงแคลเซียมไอออนกลับเข้าสู่ซาโคพลาสมิคเรติคูลัม (Morgan, 1991) ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบัน จึงมุ่งเน้นไปที่การเพิ่มอัตราการดึงแคลเซียมกลับเข้าสู่ซาโคพลาสมิคเรติคูลัม จึงนำไปสู่ความสนใจที่จะศึกษาโปรตีนพาร์วัลบูมิน (parvalbumin) เนื่องจากโปรตีนพาร์วัลบูมินทำหน้าที่จับกับแคลเซียม (Ca^{2+} binding protein) โดยดึงแคลเซียมออกจาก Troponin C และส่งกลับเข้าสู่ซาโคพลาสมิคเรติคูลัม จึงเป็นสิ่งสำคัญที่ช่วยในการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อลายชนิดหดและคลายตัวเร็ว (fast-twitch) (Berchtold, 1983) จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้ พบว่าโปรตีนพาร์วัลบูมินอยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Inguma *et al.*, 1991; Vongvatcharanon U. and Vongvatcharanon S., 2003: Vongvatcharanon *et al.*, 2006) จากการศึกษาของ Coutu และ คณะ (2003) ได้มีการเสนอแนวความคิดว่า พาร์วัลบูมินน่าจะทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณพาร์วัลบูมินจึงน่าจะมีผลต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ จากการศึกษาในกล้ามเนื้อลายพบว่าปัจจัยด้านอายุมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณพาร์วัลบูมิน โดยพบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินลดลงในหนูที่มีอายุมาก (Cai *et al.*, 2001) และจากการศึกษาของ Vongvatcharanon และคณะ (2006) พบว่ามีการแสดงออกของ พาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นในหนูวัยหนุ่มสาว แต่ยังไม่มีการศึกษาว่าในวัยชรามีการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินหรือไม่ จึงนำไปสู่ความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหนูหลังจากวัยหนุ่มสาวไปจนถึงวัยชรา ซึ่งผลของการศึกษาอาจนำไปอธิบาย พยาธิสภาพของการบกพร่องของการคลายตัวของหัวใจซึ่งพบมากในวัยชรา และอาจนำไปสู่การอธิบายพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคได้ จากการศึกษาของ Fagard (1997) พบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลานานทำให้การทำงานของหัวใจมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยทำให้ผนังของหัวใจห้องล่างซ้ายหนาขึ้น,น้ำหนักของหัวใจเพิ่มขึ้น, เพิ่มปริมาณเลือดที่สูบฉีดออกจากหัวใจต่อนาที

(cardiac output), ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ในระดับเซลล์นั้น พบว่าในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะมีไมโตคอนเดรียและเอนไซม์ที่ช่วยในการทำงานของหัวใจ เช่น SR Ca^{2+} transport/regulatory proteins -Ca^{2+}-ATPase (SERCA 2a) และ mitochondria cytochrome oxidase เพิ่มขึ้น (Wisloff *et al.*, 2001) และยังพบว่าการออกกำลังกายในผู้สูงอายุจะมีส่วนช่วยให้การทำงานของหัวใจมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยทำให้การทำงานในระยะคลายตัวของหัวใจดีขึ้น, ช่วยเพิ่มการไหลของเลือดในระยะเริ่มต้นของหัวใจคลายตัวและลดอัตราการไหลของเลือดเข้าสู่หัวใจห้องบน (Levy *et al.*, 1993) ซึ่งการทำให้การคลายตัวของหัวใจดีขึ้นนั้นยังไม่มีการอธิบายว่าเกิดจากสาเหตุใด ดังนั้นจึงนำไปสู่ความสนใจที่จะศึกษาผลของการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ซึ่งผลของการศึกษาอาจนำไปสู่การอธิบายกลไกพื้นฐานในการทำให้การคลายตัวของหัวใจดีขึ้น ซึ่งอาจนำไปสู่แนวทางในการป้องกันและรักษาโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคในอนาคต

2. การตรวจเอกสาร

Ca^{2+} binding protein ในระบบประสาท แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ parvalbumin, calbidin และ calretinin แต่ในกลุ่มที่ไม่ใช่ระบบประสาทพบ 3 ชนิด คือ parvalbumin, calmodulin และ S100 โปรตีน (Schaub *et al.*, 2007) ที่พบในกล้ามเนื้อลาย, กล้ามเนื้อหัวใจ และ กล้ามเนื้อเรียบ (Maugran and Golt, 1999) ซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหด และคลายตัวดีขึ้น (Schaub *et al.*, 2007)

2.1 โครงสร้างและการทำงานของพาร์วัลบูมิน

พาร์วัลบูมินเป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียม (Ca^{2+} binding protein) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) แต่มีคุณสมบัติจับกับแคลเซียมได้ดีกว่าแมกนีเซียม (Kretsinger, 1980) มีน้ำหนักโมเลกุล 11 kDa โดยมีสูตรโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มอีเอฟแฮน (EF-hand) ประกอบด้วย 3 EF-hand เชื่อมต่อกันขดเป็นวงก้นหอย (helix loop helix) (Kretsinger and Nockolds, 1973) โดยมีการเรียงตัวของกรดอะมิโนที่สามารถจับได้กับแคลเซียมเป็น 2 รูปแบบ คือ แอลฟา (α-type) และแบบเบต้า (β type) (Nakayama *et al.*, 1992) พาร์วัลบูมิน พบมากในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อที่มีการหดและคลายตัวเร็ว กระบังลมและลิ้น (Berchtold *et al.*, 1983; Inaguma *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่นต่อมไร้ท่อ (Endo et al.,1985) เซลล์ผิวหนัง และเนื้อเยื่อในระบบประสาทส่วนกลาง ส่วนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจพบพาร์วัลบูมินในปริมาณน้อย (Inguma *et al.*, 1991) โปรตีนพาร์วัลบูมินมีหน้าที่ช่วยในการหดและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อลาย (Jiang *et al.*, 1990) และควบคุมสมดุลแคลเซียม (calcium buffering) ในเซลล์ประสาท (Paus *et al.*, 1996)

กลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลาย

ในระยะพักความเข้มข้นของแคลเซียมภายในไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อลายจะอยู่ระหว่าง 10 -100 nM. ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมจะเท่ากับ 1 mM ในระยะนี้ พาร์วัลบูมินจะจับกับแมกนีเซียม ในภาวะที่กล้ามเนื้อถูกกระตุ้น ซาโคพลาสมิกเรติคูลัมจะหลั่งแคลเซียมออกมาทำให้แคลเซียมมีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 100 mM. ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมจะเท่ากับ 1 mM ในระยะนี้ พาร์วัลบูมินจะจับกับแมกนีเซียม ในภาวะที่กล้ามเนื้อถูกกระตุ้นซาโคพลาสมิกเรติคูลัมจะหลั่งแคลเซียมออกมาทำให้แคลเซียมมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเป็น 100 mM ซึ่งมีผลทำให้พาร์วัลบูมินปล่อยการจับจากแมกนีเซียมและจับกับแคลเซียม แต่เนื่องจากการปล่อยแมกนีเซียมใช้เวลานาน (100 มิลลิวินาที) ดังนั้นจึงมีผลทำให้แคลเซียมที่หลั่งจากซาโคพลาสมิกเติคูลัม ไปจับกับโทรโปนินซี (troponin c) ทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย และหลังจากพาร์วัลบูมินปล่อยแมกนีเซียมออก พาร์วัลบูมินก็จะจับกับแคลเซียมแทนโดยการดึงแคลเซียมออกมาจากโทรโปนินซี มีผลทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ดังนั้นปริมาณของพาร์วัลบูมินจึงมีผลต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อด้วยเช่นกัน หลังจากนั้นแคลเซียมจะถูกส่งกลับเข้าสู่ซาโครพลาสมิกเรติคูลัมอีกครั้ง ซึ่งเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยพลังงาน (ATP) ในการขนส่ง (รูปที่ 1-1)

จากคุณสมบัติของพาร์วัลบูมินในการคลายตัว (relaxing factor) ในกล้ามเนื้อลายนั้นจึงนำไปสู่แนวคิดที่จะใช้พาร์วัลบูมินในการรักษาผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิก ซึ่งจากการศึกษาของ Morgan (1991) โดยศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่าผู้ป่วยโรคหัวใจวายชนิดไดแอสโตลิกมีการคลายตัวของหัวใจช้าเนื่องจากมีความบกพร่องในการดึงแคลเซียมออนกลับเข้าสู่ ซาโครพลาสมิกเรติคูลัม จึงได้มีการศึกษาโดยเทคนิคการถ่ายทอดยีนพาร์วัลบูมินจากกล้ามเนื้อลายชนิด fast-twich เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหดตัวได้มากขึ้น และส่งผลกระตุ้นอัตราการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

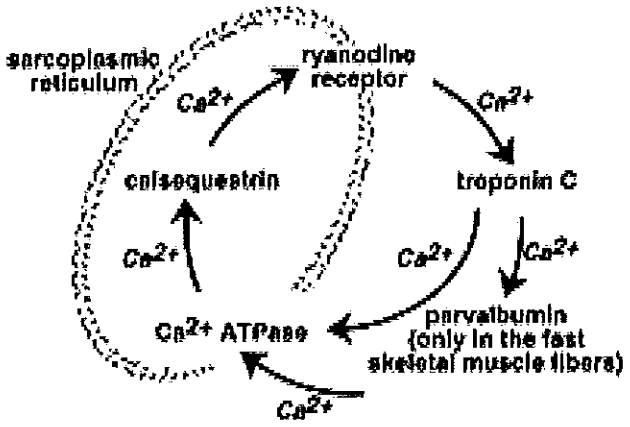
เพิ่มขึ้น (Wahr *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าการกระตุ้นการสร้างพาร์วัลบูมินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูที่มีอายุมากมีผลให้การทำงานของหัวใจระยะไดแอสโตลิกดีขึ้น (Schmidt *et al.*, 2004) จึงทำให้เชื่อว่า พาร์วัลบูมินน่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการคลายตัวของหัวใจ เช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อลาย โดย Coutu และคณะ (2003) ได้มีแนวคิดในการอธิบายกลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในการช่วยให้เกิดการคลายตัวภายในกล้ามเนื้อหัวใจไว้ดังนี้

ระยะที่ 1 เป็นระยะท้ายในการคลายตัวของหัวใจ (late diastole) ในระยะนี้ความเข้มข้นของแคลเซียมในไซโตพลาสซึมของเซลล์อยู่ในระดับต่ำ (~10 -100 nM) ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูง (~ 1 mM) ในระยะนี้พาร์วัลบูมินจะจับกับแมกนีเซียม

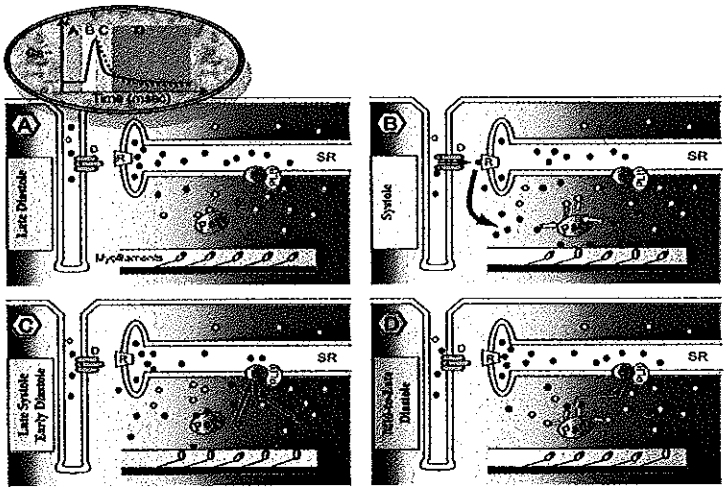
ระยะที่ 2 เป็นระยะที่หัวใจบีบตัว (systole) ระยะนี้ความเข้มข้นของแคลเซียมเพิ่มโดยแคลเซียมเข้ามาภายในเซลล์โดยผ่านแคลเซียมแชนเน็ล (Ca^{2+} channel) และจากการกระตุ้นให้ซาโคพลาสมิคเรติคูลัมหลั่งแคลเซียมออกมา การเพิ่มของแคลเซียมมีผลทำให้กระตุ้นให้พาร์วัลบูมินปล่อยแมกนีเซียมออกมาเพื่อจะจับกับแคลเซียม แต่เนื่องจากการปล่อยแมกนีเซียมออกจากนั้นเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลานานจึงทำให้ระยะนี้แคลเซียมไปจับโทรโปนินซีและทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ

ระยะที่ 3 เป็นระยะท้ายของการบีบตัวของหัวใจ (late systole and diastole) เป็นระยะที่พาร์วัลบูมินจับแคลเซียม ซึ่งส่งผลให้แคลเซียมถูกดึงออกจากโทรโปนินซี ทำให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ระยะที่ 4 เป็นระยะกลางจนถึงระยะท้ายของการคลายตัวของหัวใจ (mid-to-late diastole) ซึ่งเป็นระยะที่พาร์วัลบูมินปล่อยการจับกับแคลเซียมและกลับไปจับกับแมกนีเซียม



รูปที่1-1 แสดงวงจรการขนส่งแคลเซียมในกล้ามเนื้อลายจากซาโคพลาสมิกเรติคูลัมไปยังโทรโปนินซีและพาร์วัลบูมิน (Berchtold *et al.*, 2000)



รูปที่ 1-2 แสดงกลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในการช่วยคลายตัวของหัวใจในระยะต่าง ๆ late diastole (B) systole (C) late systole and early diastole (D) mid-to-late diastole (Coutu *et al.*, 2003)

2.2 โครงสร้างและการทำงานของหัวใจ

กายวิภาคศาสตร์ของหัวใจ

หัวใจเป็นก้อนกล้ามเนื้อที่มีลักษณะพิเศษ มีรูปร่างรี วางตัวอยู่ในช่องอก โดยอยู่ระหว่างปอดทั้งสองข้าง หัวใจแบ่งเป็น 4 ห้อง ผนังหัวใจประกอบด้วยเซลล์ส่วนใหญ่ที่ทำหน้าที่ในการหดและคลายตัว เรียกว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocyte)

เยื่อหุ้มหัวใจ (Pericardium)

หัวใจถูกปกคลุมด้วยพังพืดที่เรียกว่า pericardium มีลักษณะเป็นถุงสองชั้น ชั้นนอกเรียกว่า parietal pericardium ส่วนชั้นที่อยู่ชิดกล้ามเนื้อหัวใจเรียกว่า visceral pericardium โดยชั้น parietal pericardium เป็นตัวแยกหัวใจออกจากอวัยวะอื่นๆของช่องอก นอกจากนี้ชั้น parietal pericardium แบ่งชั้นย่อยออกเป็นอีก 2 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอก (fibrous layer) และชั้นใน (serous layer)

ผนังของหัวใจประกอบด้วยเนื้อเยื่อเรียงตัวกัน 3 ชั้น

1. Epicardium คือ ชั้นของ visceral pericardium เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีลักษณะเป็นแผ่นทำหน้าที่ห่อหุ้มกล้ามเนื้อหัวใจ

2. Myocardium เป็นชั้นกล้ามเนื้อที่มีการยืดและคลายตัวเป็นจังหวะ ความหนาของกล้ามเนื้อหัวใจแตกต่างกันออกไปในหัวใจแต่ละห้องขึ้นอยู่กับความแรงของการบีบตัว ลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนั้นถูกยึดไว้ด้วยกันโดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ทำให้กล้ามเนื้อมีการจัดตัวเป็นมัดๆ (bundle) และแต่ละมัดมีลักษณะวางตัวต่อเนื่องกัน

3. Endocardium เป็นผนังชั้นในสุดมีลักษณะเป็น squamous epithelium บางๆ ประกอบด้วยชั้นของ endothelium และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นนี้ประกอบด้วย elastic fiber, collagen fiber และหลอดเลือด ทำหน้าที่ห่อหุ้มป้องกันผนังด้านในของหัวใจ ลิ้นของหัวใจก็ถูกหุ้มด้วยชั้นของ Endothelium เช่นกัน

ห้องของหัวใจ (chamber of the heart)

ภายในหัวใจมีจำนวน 4 ห้อง ห้องบนเรียกว่า atrium มีจำนวน 2 ห้อง แบ่งออกเป็นห้องซ้ายและห้องขวา ส่วนหัวใจห้องล่างเรียกว่า ventricle มีทั้งซ้ายและขวาเช่นเดียวกัน atrium ทั้ง 2 ข้างเป็นห้องหัวใจที่มีผนังบาง ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของเลือดเข้าสู่ ventricle ในขณะที่ ventricle คลายตัว รวมถึงช่วยเพิ่มความแรงในการบีบตัวของ ventricle โดยการที่ atrium หดตัวบีบเลือดเข้าสู่ ventricle ในช่วงปลายของระยะคลายตัวของ ventricle atrium ขวารับเลือดดำ จากหลอดเลือดดำใหญ่ superior และ inferior vena cava รวมทั้งเลือดดำที่มาจากหัวใจซึ่งผ่านมาทาง coronary sinus ด้วย ส่วน atrium ซ้ายรับเลือดแดงจาก pulmonary vein ส่วน ventricle ทั้งสองมีหน้าที่ในการสูบฉีดเลือด โดยที่เลือดจากหัวใจ ventricle ขวาจะสูบฉีดเลือดเข้าสู่ระบบ pulmonary circulation ซึ่งมีความดันต่ำ ดังนั้นจึงมีผนังค่อนข้างบาง ส่วน ventricle ซ้ายสูบฉีดเลือดเข้าสู่ systemic circulation ซึ่งมีความดันสูง ทำให้ผนัง ventricle ซ้ายหนากว่าข้างขวา โดยที่ปริมาตรใน ventricle ทั้งสองเท่ากัน

ลิ้นหัวใจ (Cardiac valves)

ภายในหัวใจมีลิ้น 4 อัน แยกออกเป็น 2 กลุ่ม

1. atrioventricular valves (AV valves) ประกอบด้วย 1) mitral valve ซึ่งมี 2 แฉก กั้นระหว่าง atrium และ ventricle ข้างซ้าย และ 2) tricuspid valve เป็นลิ้นที่มี 3 แฉกกั้นระหว่าง atrium และ ventricle ข้างขวา ที่ปลายของลิ้นทั้งสองอันมีเนื้อเยื่อเป็นเส้นเรียก chordae tendinae ซึ่งยึดติดกับส่วนของกล้ามเนื้อที่ยื่นออกมาจากผนังของ ventricle ที่เรียก papillary muscles ลิ้นทั้งสองจะช่วยป้องกันไม่ให้เลือดไหลย้อนกลับจาก ventricle เข้าสู่ atrium ในขณะที่ ventricle บีบตัว

2. semilunar valves เป็นลิ้นที่กั้นอยู่ระหว่าง ventricle กับหลอดเลือดใหญ่ที่ติดต่อกับ ventricle ทั้งสองข้าง ได้แก่ 1.) aortic valve กั้นระหว่าง ventricle ซ้ายกับหลอดเลือด aorta จะ

ช่วยป้องกันไม่ให้เลือดแดงที่ไหลเข้าสู่ aorta ไหลย้อนกลับเข้าสู่ ventricle ซ้าย ในขณะที่ ventricle คลายตัว 2.) pulmonic valve กั้นระหว่าง ventricle ขวากับ pulmonary artery ลิ้นนี้ช่วยป้องกันการไหลย้อนกลับของเลือดใน pulmonary artery เข้าสู่ ventricle ขวาในระยะที่ ventricle คลายตัว

ขณะที่หัวใจบีบตัว ซึ่งเรียกว่าระยะซีสโตลี (systole) ในช่วงที่ ventricle ทั้งสองบีบตัวเกิดแรงดันเลือดเข้าสู่หลอดเลือดนั้นทั้ง mitral valve และ tricuspid valve จะปิด ส่วน aortic valve และ pulmonic valve จะเปิด ในระยะที่หัวใจคลายตัวซึ่งเรียกว่า ไดแอสโตลี (diastole) mitral valve และ tricuspid valve จะเปิดออกเพื่อให้เลือดจาก atrium ไหลเข้าสู่ ventricle ส่วน aortic valve และ pulmonic valve จะปิด (รูปที่ 1-3) (บังอร, 2548; อลิสา, 2545)

โครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ

กล้ามเนื้อหัวใจพบได้ที่ผนังห้องบนและล่าง โดยเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะมีลายตัดขวางและมีรูปร่างคล้ายทรงกระบอกเหมือนเซลล์กล้ามเนื้อลาย แต่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีการแตกแขนง มีนิวเคลียส 1 หรือ 2 อันเป็นรูปไข่อยู่กลางเซลล์ องค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนั้นประกอบไปด้วยไมโอไฟบริล (myofibril) คล้ายกับที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อลาย โดยการเรียงตัวของฟิลาเมนท์ทำให้มีแถบทึบจางสลับกันไป ทิคฟิลาเมนท์มีไมโอซิน (myosin) ประกอบด้วย 2 เฮวีเชน (heavy chains) และไลท์เชน (light chains) 2 คู่ เฮวีเชนเกิดจากสายโพลีเพบไทด์ (polypeptide chains) ที่มีลักษณะเป็นแท่ง 2 เส้นพันกันเป็นเกลียวในลักษณะเป็นแอลฟาฮีลิก (α-helix) ประกอบด้วยส่วนหางที่มีลักษณะเป็นแท่งและส่วนหัวที่มีลักษณะกลมจะจับกับอะดีโนซีนไตรฟอสเฟส (adenosine triphospate) ทำหน้าที่ในการเกิดคร๊อซบริจ (cross-bridges) ระหว่างทิคและทินฟิลาเมนท์ ภายในทินฟิลาเมนท์มีแอคทิน (actin) ซึ่งประกอบด้วยเม็ดจีแอคทิน (G-actin) เรียงตัวเป็นสายเอฟแอคทิน (F-actin) และบริเวณจีแอคทินจะมีบริเวณ แอคทีฟ (active) ซึ่งเป็นที่สำหรับให้หัวของไมโอซินมาเกาะ

เอฟแอคทิน 2 สายจะพันกันเป็นเกลียวคล้ายลูกปัด 2 สายพันกันแต่ละช่วงของเกลียวจะมีร่องตื้น ๆเป็นที่อยู่ของโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) ซึ่งเป็นสายของโปรตีน ในระยะพักโทรโปไมโอซินจะอยู่บริเวณแอคทีฟบนจีโปรตีน นอกจากนี้บนแอฟแอคทินยังมีส่วนที่เรียกว่าโทรโปนิน (troponin) ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วยย่อยคือ โทรโปนินที (troponin T) ทำหน้าที่จับกับโทรโปไมโอซิน,โทรโปนินซี (troponin C) ทำหน้าที่จับกับแคลเซียมและโทรโปนินไอ (troponin I) ทำหน้าที่ยับยั้งปฏิกิริยาระหว่างแอคทินและไมโอซิน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจแต่ละเซลล์จะต่อกันตรงปลายแต่ละด้านของเซลล์ เรียกว่าอินเตอร์คาเลเทดดิส (intercalated disks) ทำให้เกิดแรงยึดเหนี่ยวกันแน่นระหว่างใยกล้ามเนื้อ ซึ่งจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือส่วนขวาง (transverse portion) จะพบรอยต่อ (junctional complex) 2 ชนิด ได้แก่ รอยต่อมาคูลาร์แอคเฮียเรน (macular adherens) และรอยต่อฟาสเซียแอคเฮียเรน (fascia adherens) และส่วนข้าง (lateral portion) จะพบรอยต่อแก็บ (gap junction) จำนวนมาก ทำให้ไอออนแพร่จากเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่งได้อย่างอิสระ การถ่ายทอดสัญญาณเป็นไปอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทั้งหมดหดตัวได้พร้อมกัน และในไซโตพลาสซึมยังประกอบไปด้วยไมโตรคอนเดรีย (mitochrondria) จำนวนมาก ทีทูบูล (T-tubule) มีขนาดใหญ่ยื่นเข้ามาตรงบริเวณอินเตอร์คาเลเทดดิส ซึ่งตรงกับซีไลน์ (Z-line) (ในกล้ามเนื้อลาย ทีทูบูลอยู่ตรงกับส่วนที่เป็นรอยต่อระหว่างแถบทึบกับแถบสว่าง) แต่มีจำนวนน้อยกว่าในกล้ามเนื้อลาย ในกล้ามเนื้อหัวใจจะพบไดแอด (diad) ซึ่งเป็นบริเวณที่ซาโคพลาสมิกเรติคูลัมสัมผัสกับทีทูบูล (รูปที่ 1-4)

วงจรการทำงานของหัวใจ (Cardiac cycle)

การเต้นของหัวใจแต่ละครั้ง เกิดจากการส่งผ่านกระแสไฟฟ้าจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ สัญญาณไฟฟ้าจะถูกส่งจากเนื้อเยื่อพิเศษที่เหนี่ยวนำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้า ซึ่งจะควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ โดยจะตอบสนองต่อสิ่งต่าง ๆ เช่น ระบบประสาทอัตโนมัติ (sympatatic และ

parasympathetic) อัตราการเต้นของหัวใจที่เป็นปกติ เกิดจากการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจที่ปกติ ในระดับเซลล์นั้น กระบวนการเกิดสัญญาณไฟฟ้าถูกกระตุ้นโดยกระบวนการชีวเคมีภายในเซลล์ ซึ่งเนื้อเยื่อพิเศษนี้จะสามารถเกิดการดีโพลาไรด์เซชั่น (depolarization) ขึ้นได้เอง จึงทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมอัตราการเต้นของหัวใจ บริเวณห้องบนขวาของหัวใจที่เรียกว่า sinoatrial node (SA node) จะประกอบด้วยเนื้อเยื่อพิเศษที่เหนี่ยวนำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้า ที่สามารถเกิดกระบวนการดีโพลาไรด์เซชั่นได้เองและอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการเต้นของหัวใจ ซึ่งเนื้อเยื่อพิเศษเหล่านี้จะได้รับอิทธิพลโดยตรงจาก ระบบประสาทอัตโนมัติและระบบต่อมไร้ท่อ กระบวนการ depolarizing-repolarized ซึ่งเรียกว่า action potential จะถูกส่งสัญญาณจากเนื้อเยื่อพิเศษที่เหนี่ยวนำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้ากระจายไปยังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจแต่ละเซลล์

Action potential เกิดใน SA node การส่งผ่าน action potential ไปยังหัวใจห้องบนทั้งซ้ายและขวาจะส่งผ่านเนื้อเยื่อพิเศษที่เหนี่ยวนำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้า แล้วจึงแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในผนังหัวใจห้องบนทำให้หัวใจห้องบนหดตัว หลังจากนั้น action potential ก็จะถูกส่งไปยัง atrioventricular node (AV node) ที่อยู่ระหว่าง ventricular septum ซึ่งในเนื้อเยื่อหัวใจจะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อพิเศษที่เหนี่ยวนำให้เกิดสัญญาณไฟฟ้า และ His bundle ซึ่งในบริเวณ AV node นี้การส่งสัญญาณจะช้าลง ทำให้หัวใจห้องบนและห้องล่างหดตัวไม่พร้อมกัน การส่งสัญญาณไฟฟ้าจะถูกส่งไปทั่วหัวใจผ่านทาง His bundle ซึ่งจะให้แขนงซ้ายและขวาไปตามผนังกั้นหัวใจห้องล่าง แล้วแตกเป็นแขนงเล็กๆ เรียกว่า Purkinje system fiber ซึ่งสัญญาณไฟฟ้าจะผ่านจาก Purkinje fiber ไปยังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ส่วนในระดับเซลล์ action potential จะส่งผ่านอีกเซลล์หนึ่งไปยังอีกเซลล์หนึ่ง ผ่าน intercalated disks ซึ่งบริเวณนี้จะมี gap junctions ที่มีความต้านทานต่ำ ยอมให้สัญญาณไฟฟ้าผ่าน ส่วนสัญญาณไฟฟ้าในห้องล่างจะถูกเหนี่ยวนำ บริเวณ interventricular septum ก่อน จากนั้นจะถูก

ส่งไปยังบริเวณด้านหน้า anteroapical และด้านหลัง ตามลำดับ หัวใจห้องล่างขวาถูกเหนี่ยวนำหลังหัวใจห้องล่างซ้ายเล็กน้อย การเหนี่ยวนำให้เกิดให้เกิดสัญญาณไฟฟ้าทำให้เกิดการหดและคลายตัวของ cardiac chamber ทำให้เกิดการส่งผ่านเลือดจากหัวใจห้องล่างไปยังหลอดเลือดแดงเอออร์ต้า และพัลโมนารี่

วงจรการหดและคลายตัวของหัวใจ

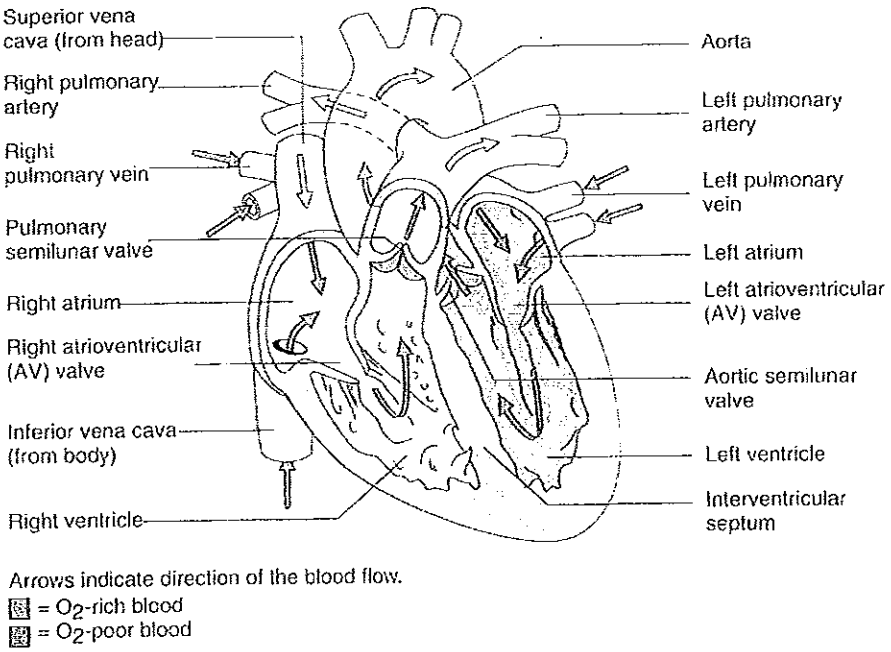
เริ่มจากระยะที่หัวใจห้องล่างคลายตัวสมบูรณ์ (ventricular end diastolic) ซึ่งเป็นระยะก่อนการบีบตัว (systole) โดยความดันในหัวใจห้องล่าง จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ความดันในหัวใจห้องล่างมากกว่าห้องบนทำให้ลิ้นหัวใจ mitral และลิ้น tricuspid ปิด ความดันในหัวใจห้องล่างก็จะเพิ่มอย่างรวดเร็วจนทำให้ลิ้นaortic และลิ้น pulmonicเปิด จึงเกิดการสูบฉีดเลือดไปร่างกาย ซึ่งในระหว่างที่ลิ้น mitral/tricuspid ปิด ลิ้น aortic /pulmonic เปิด ปริมาตรของหัวใจห้องล่างจะคงที่ เรียกระยะนี้ว่า isovolumic contraction ระหว่างที่เกิดการสูบฉีดเลือด ความดันในหัวใจห้องล่าง,หลอดเลือดเอออร์ต้า, พัลโมนารี่ ทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงในเวลาเดียวกัน เมื่อความดันในหัวใจห้องล่างต่ำกว่าความดันในหลอดเลือดแดงเอออร์ต้า, พัลโมนารี่ ลิ้น aortic/pulmonic ปิด การสูบฉีดเลือดก็จะหยุด ซึ่งเมื่อลิ้น aortic /pulmonicปิด ปริมาตรก็จะคงที่เรียกระยะนี้ว่า isovolumic relaxation เมื่อความดันหัวใจห้องล่างต่ำกว่าห้องบน ลิ้น atrioventricular (AV) ก็จะเปิด ซึ่งเป็นสัญญาณของระยะที่เกิดการไหลของเลือดเข้าสู่หัวใจห้องล่าง (ventricular filling) โดยในระยะแรกเลือดจะไหลเข้าสู่หัวใจห้องล่างอย่างรวดเร็ว แต่ในขณะที่หัวใจห้องล่างคลายตัวอยู่ในช่วงกลาง ซึ่งเรียกว่าไดแอสตาซิส (diastasis) จะมีปริมาณเลือดเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ไหลเข้าสู่ระยะนี้ ซึ่งในระยะนี้หัวใจทั้ง 4 ห้องจะคลายตัวทั้งหมด จึงเรียกระยะนี้ว่าระยะหัวใจคลายตัว (diastole) (Lewinter and Osal., 2004)

กลไกการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ

Excitatio-contraction coupling (ECC) คือกระบวนการเกิดดีโพลาไรด์เซชั่นที่เยื่อหุ้มเซลล์ นำไปสู่การหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยเกิดการกระจาย action potential ไปตาม sarcolemma และ intercellular membrane เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะถูกล้อมรอบด้วยท่อเล็กๆที่เรียงตัวประสานกัน เรียกว่า sarcoplasmic reticulum (SR) ซึ่ง SR เป็นแหล่งสะสมแคลเซียมและจะปล่อยแคลเซียมเข้าสู่ cytoplasm ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ การหลั่งแคลซียมจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อมีการบีบตัวของหัวใจ นอกจากนี้ยังพบว่า บริเวณเยื่อหุ้มของ SR ในบริเวณ diad จะมี ryanodine receptor (RyR) channel ซึ่งจะเป็นช่องทางปล่อยแคลเซียมออกจาก SR

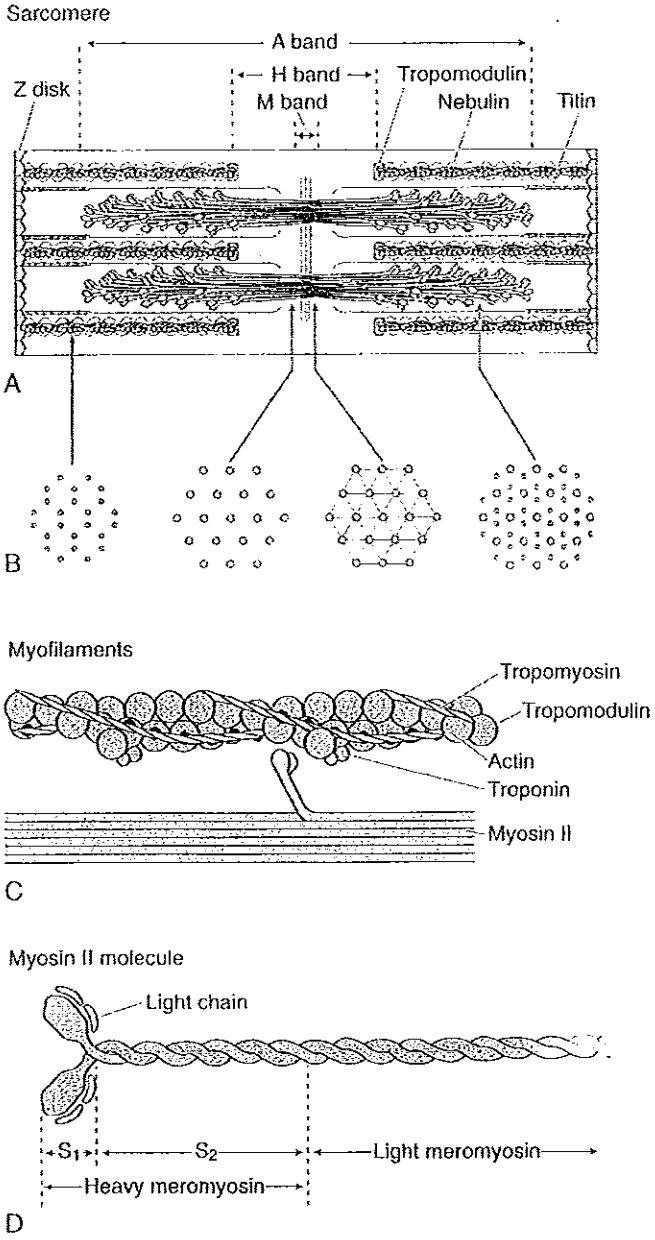
อีกแหล่งหนึ่งของแคลเซียมที่ทำให้กล้ามเนื้อหัวใจเกิดการหดตัวก็คือ T-Tubule ซึ่งบริเวณ T-tubule จะมี dihydropyridine (DHP) receptors channel ซึ่งจะเป็นช่องทางนำแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอีกทางหนึ่ง ดังนั้นเมื่อเกิด action potential จาก sarcolemma และ intercellular membrane เข้าสู่ภายในเซลล์โดยผ่านเข้ามาทาง T-tubule ก็จะทำให้ DHP receptors channel เปิด แคลเซียมจากภายนอกเซลล์ก็จะเข้าสู่ภายในเซลล์และไปกระตุ้นให้ RyR channel ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ SR เปิด ทำให้แคลเซียมที่อยู่ใน SR หลั่งเข้าสู่ไซโตพลาสซึม ซึ่งแคลเซียมที่อยู่ในไซโตพลาสซึมนี้จะจับกับโทรโปนินซีเกิดเป็นแคลซียมโทรโปนินคอมเพล็ค (Ca^{2+} - troponin complex) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโทรโปไมโอซิน โดยทำให้บริเวณแอคทีฟ (active site) บนแอคทินเปิดออก เกิดการครอสบริดระหว่างแอคทิน และไมโอซินฟิลาเมนท์ ทำให้เกิดการหดสั้นข้าวของไมโอไฟบริล ซึ่งตรงกับระยะหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อ action potential สิ้นสุดลง แคลเซียมใน ไซโพลาสซึมก็จะถูกดึงกลับเข้าสู่ extracellular space ผ่านทาง Na-Ca exchanger นอกจากนี้แคลเซียมส่วนใหญ่จะถูกดึงกลับเข้าสู่ SR ผ่านโปรตีนที่ชื่อว่า SERCA 2a ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของ SR โปรตีน SERCA 2a จะใช้พลังงาน

(ATP) ในการดึงแคลเซียมกลับเข้าสู่ SR เมื่อจำนวนแคลเซียมในไซโตพลาสซึมลดลงสู่ระดับปกติ เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Lewinter and Osal., 2004) (รูปที่1-5)

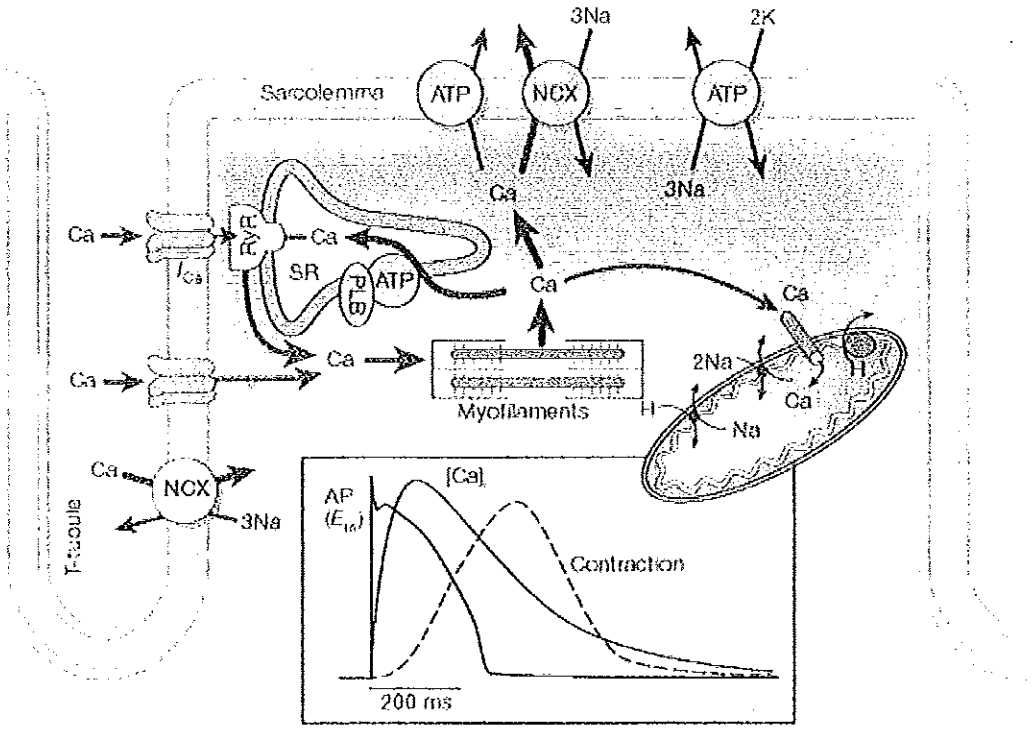


รูปที่ 1-3 แสดงลักษณะกายวิภาคศาสตร์ของหัวใจสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม

(Sherwood *et al.*, 2005)



รูปที่ 1-4 แสดงโครงสร้างของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Gartner and Hiatt, 2007)



รูปที่ 1-5 แสดงกลไกการหดและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Bers, 2002)

2.3 ผลของอายุต่อการทำงานของหัวใจ

จากการศึกษาทั้งในคนปกติทั้งชายและหญิงพบว่า อายุที่เพิ่มมากขึ้นมีผลต่อการทำงานของหัวใจ โดยทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจลดลง โดยมีผลทำให้ Cardiac output และ stroke volume ลดลง นอกจากนี้การศึกษาด้วยวิธี Echocardiography พบว่าในคนที่มีอายุอยู่ในระหว่าง 25 ถึง 80 ปี ผนังด้านหลังของหัวใจห้องล่างซ้ายจะหนาตัวขึ้นถึง 25 % ซึ่งเมื่อผนังของหัวใจเกิดภาวะ hypertrophy ก็จะมีผลเพิ่มการทำงานของหัวใจในการสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Sjogren,1972; Gerstenblith *et al.*, 1977) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะ hypertrophy ของผนังหัวใจห้องล่างซ้าย เกิดจากการที่มีอายุเพิ่มขึ้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเส้นใย elastin และ collagen ของผนังหลอดเลือดแดง โดยทำให้จำนวนเส้นใย elastin ลดลง แต่จำนวนเส้นใย collagen เพิ่มขึ้น มีผลทำให้หลอดเลือดแดงแข็ง ซึ่งเมื่อหลอดเลือดแดงแข็งก็ทำให้อัตราการเต้นของชีพจรเร็วขึ้นความดันเลือดในระยะหัวใจบีบตัวเพิ่มขึ้น หลอดเลือดแดง aorta ขยาย (Gerstenblith *et al.*, 1977; Brownlee *et al.*,1988) ทำให้อัตราการไหลของเลือดในระยะเริ่มต้นของหัวใจคลายตัวลดลง จึงเกิดกลไกการชดเชยเพื่อให้ปริมาณเลือดที่ส่งไปเลี้ยงร่างกายมีเพียงพอ โดยมีผลทำให้ขนาดของหัวใจห้องบนซ้ายมีขนาดเพิ่มขึ้น การไหลของเลือดเข้าสู่ห้องบนซ้ายก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ซึ่งการเพิ่มขึ้นของปริมาณเลือดในหลอดเลือดแดง aorta มีผลทำให้หลอดเลือดแดงขยาย ส่งผลให้ผนังหัวใจห้องล่างซ้ายเกิดภาวะ hypertrophy ส่วนในเนื้อเยื่อของหัวใจพบว่ามีการสะสมของสารพวก lipufuscin ซึ่งเป็นสารจำพวกไขมัน โดยจะสะสมในช่องว่างของนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนอกจากนี้ยังพบว่ามีการสะสมของสารพวก amyloid ในชั้นกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งพบมากในหัวใจห้องบน การสะสมแคลเซียมตามผนังหัวใจและหลอดเลือดจะเพิ่มขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้นซึ่งมีผลทำให้เกิดการแข็งและตีบตันของผนังหัวใจและหลอดเลือด ลิ้นหัวใจต่างๆ จะหนาตัวขึ้น (Fleg *et al.*,1993) นอกจากนี้พบว่าอายุมีผลทำให้เกิด pathological hypertrophy โดยมีผลทำ

ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร

ให้ขนาดของหัวใจโตขึ้น สัดส่วนน้ำหนักตัวเทียบกับน้ำหนักหัวใจเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น ขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้นทั้งด้านกว้างและด้านยาว (Mcmullen and Jennings, 2007) มีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจน, เนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันแทรกอยู่ระหว่างเซลล์มากขึ้นแต่มีการสะสมของไกลโคเจนลดลง (Lin *et al.*, 2007) จำนวนของ pacemaker cell ใน SA node ลดลงซึ่งจะส่งผลต่อการเกิดสัญญาณไฟฟ้าในหัวใจ และอายุยังมีผลทำให้กระบวนการ metabolism ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจลดลง ลดการสร้าง ATP ของ mitochondria (Fleg *et al.*, 1993; Michale and Rich, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่าอายุมีผลต่อการทำงานของหัวใจ โดยทำให้อัตราการไหลของเลือดในระยะเริ่มต้นของการคลายตัวของหัวใจห้องล่างซ้ายลดลง ซึ่งสาเหตุเกิดจากการเปลี่ยนโครงสร้างของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า กลุ่มสัตว์ทดลองที่มีอายุมากจะมีอัตราการดึงกลับของแคลเซียมเข้าสู่ซาโคพลาสมิกเรติคูลัมในระยะที่มีการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจช้ากว่ากลุ่มสัตว์ทดลองที่มีอายุน้อยดังนั้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้นประสิทธิภาพในการคลายตัวของหัวใจจึงลดลง (Froehlich *et al.*, 1978) ซึ่งจากการที่อายุเพิ่มขึ้นมีผลต่อการทำงานของหัวใจจึงทำให้พบว่าในผู้สูงอายุมีอัตราการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดสูง โดยเฉพาะโรคหัวใจวายชนิดไดแอสโตลิค (Diastolic heart failure) โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจวายชนิดนี้มีมากกว่า 50% ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคหัวใจวายที่มีอายุมากกว่า 75 ปี (Vasan *et al.*, 1999; Kitzman *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 1976)

2.4 ผลของการออกกำลังกายต่อการทำงานของหัวใจ

การออกกำลังกายเริ่มต้นจากการกระตุ้นระบบประสาทส่วนกลางก่อน โดยจะเพิ่มระดับการหลั่งของ catecholamine อย่างรวดเร็วจากสมองส่วน diencephalon, vasomotor area ของ medulla ซึ่งการเพิ่มของฮอร์โมนในระบบประสาท (epinephrine และ norepinephrine) จะไปกระตุ้นหัวใจโดยตรง โดยทำให้หัวใจบริเวณ SA node เกิดกระบวนการดีโพลาไรเซชั่นอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจโดยผ่านระบบประสาท sympathetic นอกจากนี้การออกกำลังกายยังมีผลเพิ่มการหดตัวของหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดดำทำให้เพิ่มอัตราการไหลกลับของเลือดเข้าสู่หัวใจห้องบนขวา โดยในระยะแรกของการออกกำลังกายนั้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในหลอดเลือดโดยจะทำเกิดการไหลของพลาสมาจากหลอดเลือดฝอยเข้าสู่ช่องว่างในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อ หลังจากนั้นระบบน้ำเหลืองก็จะดูดพลาสมากลับเข้าสู่ระบบหลอดเลือดดำ แต่จะมีพลาสมาบางส่วนยังคงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อจึงทำให้ร่างกายเกิดการปรับตัวโดยเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและเพิ่มปริมาณเลือดที่สูบฉีดออกจากหัวใจในแต่ละครั้ง ทำให้อัตราการไหลเวียนของโลหิตทั่วร่างกายมีความสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่า การออกกำลังกายแบบ aerobic จะช่วยเพิ่มความจุของหัวใจห้องล่างและทำให้ผนังของหัวใจหนาขึ้น (Scuderi et al., 1997: Birrer and O connor, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าการออกำลังกายมีผลทำให้เกิด physiological hypertrophy ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยเพิ่มขนาดของเซลล์ทั้งทางด้านกว้างและด้านยาว น้ำหนักของหัวใจเพิ่มขึ้น ซึ่งความแตกต่างระหว่าง physiological hypertrophy และ pathological hypertrophy คือ การออกกำลังกายสามารถช่วยให้เพิ่มขนาดของหัวใจ เซลล์กล้ามเนื้อขยายขนาด ผนังหัวใจหนาขึ้น ความกว้างของห้องหัวใจเพิ่มขึ้น ทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานการทำงานของหัวใจ แต่โครงสร้างภายในเซลล์กล้ามเนื้อยังคงเดิม (Batista, 2007) แต่ pathological hypertrophy เกิดจากการที่ร่างกายตอบสนองต่อโรคต่างๆของหัวใจ เช่น โรคความดันโลหิตสูง, โรคลิ้นหัวใจ, โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด

(Seidman *et al.*, 2001) และการซราภาพ (Fleg *et al.*, 1993) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างกล้ามเนื้อหัวใจ ทำให้ผนังหัวใจหนาขึ้น ช่องว่างของห้องหัวใจลดลง หรือทำให้ผนังหัวใจบางลงแต่ช่องว่างของห้องหัวใจเพิ่มขึ้น (Pluim *et al.*, 2000)นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ Fibroblast และ เส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้น (Batista, 2007) ซึ่งมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจลดลง การหดและการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจไม่มีประสิทธิภาพ ซึ่งจากการศึกษาของ Elyse (2006) พบว่าการออกกำลังกายจะมีผลต่อหัวใจโดยจะเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจและเพิ่มปริมาณการสูบฉีดเลือดในแต่ละครั้งโดยจะเพิ่มปริมาณเลือดในระยะสุดท้ายของหัวใจคลายตัว (end-diastolic volume) ส่วนการศึกษาในระดับเซลล์พบว่าหนูที่มีการออกกำลังกายสม่ำเสมอและเป็นระยะเวลานาน มีไมโตคอนเดรียเพิ่มขึ้น การหดตัวดีขึ้น และมีการเพิ่มของเอนไซม์ที่ช่วยในการทำงานของหัวใจ เช่น SERCA 2a และ mitochondria cytochrome oxidase (Wisloff *et al.*, 2001)

จากการศึกษาของ Fagard (1997) พบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอและเป็นระยะเวลานาน มีผลทำให้ผนังหัวใจห้องล่างซ้ายหนาขึ้น, น้ำหนักของหัวใจเทียบกับน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เพิ่มปริมาณเลือดที่สูบออกจากหัวใจต่อนาที (cardiac output) ลดอัตราการเต้นของหัวใจ และพบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำทำให้เลือดมาเลี้ยงเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมากขึ้น, สามารถลดขนาดของบริเวณผนังของหัวใจที่ขาดเลือดและเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจห้องล่างซ้ายโดยการเพิ่มการบีบตัวของหัวใจ (Freimamn *et al.*, 2005) ซึ่งการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำมีผลต่อการทำงานของหัวใจมากกว่าการออกกำลังกายโดยการวิ่ง ทำให้หัวใจทำงานอย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและเพิ่มปริมาตรของเลือดในระยะสุดท้ายของการคลายตัวของหัวใจห้องล่างซ้าย (Greenen *et al.*, 1988)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการศึกษาโปรตีนพาร์วันบูมินนั้นได้มีการศึกษาโดยใช้เทคนิคต่างๆ เช่น HPLC (High performance liquid chromatography), 2D electrophoresis (Two-dimensionnal electrophoresis) และ Western blotting (Stuhlfauth *et al.*, 1984) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวนั้นสามารถที่จะศึกษาปริมาณของพาร์วัลบูมินได้ แต่การศึกษาด้วยวิธีการดังกล่าวไม่สามารถบอกได้ว่า เซลล์หรือเนื้อเยื่อส่วนใดมีพาร์วัลบูมินเป็นองค์ประกอบเนื่องจากเนื้อเยื่อของหัวใจประกอบด้วยเซลล์และเนื้อเยื่อหลายชนิดได้แก่ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ, fibroblast, collagen fiber และหลอดเลือดจำนวนมากมาย ซึ่งในขั้นตอนการสกัดโปรตีนต้องนำเนื้อเยื่อทุกส่วนไปสกัดจึงไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นพาร์วัลบูมินที่มาจากส่วนใดของหัวใจ จากการศึกษาของ Celio และ Heizman เมื่อปี พ.ศ. 1982 โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry และใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อ พาร์วัลบูมินสูงโดยเจือจางความเข้มข้น (dilution) 1:5,000 ไปจนถึง 1:30,000 แล้วรายงานว่าไม่พบพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจต่อมาได้มีการใช้เทคนิค immunohistochemistry แต่ใช้แอนติบอดีที่เจือจางความเข้มข้น 1:1000 และ 1:2,000 พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูเท่านั้น นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหัวใจหนูอายุต่างๆกันตั้งแต่แรกเกิดจนถึงวัยหนุ่มสาว โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ร่วมกับ Western blotting (Vongvatcharanon *et al.*, 2006) พบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินมากขึ้นมื่อมีอายุมากขึ้น ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้เทคนิค immunohistochemistry ร่วมกับ Western blotting จึงใช้ในการศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจ ในหนูวัยหนุ่มสาวจนถึงวัยชรา และศึกษาปัจจัยการออกกำลังกายต่อการแสดงออกของ พาร์วัลบูมิน กลุ่มอายุของหนูที่ศึกษาเปรียบเทียบกับอายุคนได้ดังนี้ หนูอายุ 12 เดือน (Adult) เทียบได้กับคนอายุ 30 ปี (วัยผู้ใหญ่), 18 เดือน (middle age)

เทียบได้กับคนอายุ 45 ปี (วัยกลางคน), 24 เดือน (aging) เทียบได้กับคนอายุ 60 ปี (วัยชรา) (http://www.ratbehavior.org/RatYears.htm) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกศึกษาในหนูตั้งแต่วัยหนุ่มสาวจนถึงวัยชราในการศึกษาปัจจัยด้านอายุ และสำหรับปัจจัยด้านออกกำลังกายเลือกศึกษาทุกวัย ได้แก่ 3, 6, 12, 18 เดือน เพื่อศึกษาว่าวัยใดที่การออกกำลังกายมีผลมากที่สุด โดยเลือกออกกำลังกายแบบว่ายน้ำและออกกำลังกายเป็นระยะเวลานาน (6 เดือน) เนื่องจากมีการศึกษางานวิจัยต่างๆพบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำมีผลต่อการทำงานของหัวใจ โดยเพิ่มขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจและยังเพิ่มปริมาณเลือดในระยะสุดท้ายของการคลายตัว ห้องล่างซ้าย (Geenen *et al.*, 1988) จากการศึกษาของ Fagard (1997) พบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำ วันละ 1 ชั่วโมง 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 1 ปี ทำให้การทำงานของหัวใจมีประสิทธิภาพมากขึ้นโดยทำให้ผนังของหัวใจห้องล่างซ้ายหนาขึ้น, น้ำหนักของหัวใจเพิ่มขึ้น, เพิ่มปริมาณเลือดที่สูบฉีดออกจากหัวใจต่อนาที (cardiac output), ลดอัตราการเต้นของหัวใจ ส่วนในระดับเซลล์นั้น พบว่าในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะมีไมโตคอนเดรียและเอนไซม์ที่ช่วยในการทำงานของหัวใจ เช่น SERCA 2a และ mitochondria cytochrome oxidase เพิ่มขึ้น (Wisloff *et al.*, 2001)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปตีนพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูอายุต่างๆ ได้แก่ 9 เดือน (adult), 12 เดือน (adult), 18 เดือน (middle age) และ 24 เดือน (aging)

2. เพื่อศึกษาผลของการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินภายในหัวใจหนูอายุต่างๆได้แก่ 3 เดือน (young), 6 เดือน (young adult), 12 เดือน (adult) และ 18 เดือน (middle age)

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

1 วิธีดำเนินการ

1.หนูขาวใหญ่พันธุ์วิสตาร์ (Wistar rats) เพศผู้ อายุ 3, 6, 12 และ 18 เดือน จากสถานทดลองสัตว์ภาคใต้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และได้รับจรรยาบรรณสัตว์ทดลองเลขที่ ศธ 0521.11/161 ออกเป็น 2 กลุ่มการทดลอง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control group) เลี้ยงในสภาวะปกติและไม่ได้รับการฝึกว่ายน้ำ

กลุ่มที่ 2 กลุ่มว่ายน้ำ (swimming group) ฝึกให้หนูแต่ละกลุ่มอายุว่ายน้ำสัปดาห์ละ 3 ครั้ง (จันทร์, พุธ, ศุกร์) ในเวลาเดียวกัน (13.00 น.) โดยในสัปดาห์แรกเริ่มว่าย 5 นาทีและเพิ่มระยะเวลาว่ายน้ำไปจนกระทั่งได้กลุ่มละ 12-22 นาทีต่อครั้ง โดยใช้ circulating pump ที่อัตราการไหล 45 เมตร/นาที และอุณหภูมิที่ 28 °C เป็นระยะเวลา 6 เดือนหลังจากว่ายน้ำ เช็ดตัวหนูด้วยผ้าขนหนูและส่องไฟ เพื่อให้ความอบอุ่น (รูปที่ 2-1 A, B และC) โดยจัดระดับของการออกกำลังกายอยู่ในระดับหนัก ซึ่งจะให้หนูว่ายน้ำจนหนูเริ่มจม ลำตัวเริ่มตรงดิ่ง และว่ายทวนกระแสน้ำไม่ได้ และเมื่อนำหนูขึ้นมาจากน้ำ หนูจะมีลักษณะการหายใจที่หอบเหนื่อย หมดแรง และอยู่นิ่งเป็นระยะเวลาหนึ่ง

วิธีการและระยะเวลาการว่ายน้ำดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Gunduz และคณะ (2004) กับ Matsumoto และคณะ (1996)

หลังจากครบกำหนด 6 เดือนหนูจะมีอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ดังนั้นจึงมีกลุ่มสัตว์ทดลองจำนวน 8 กลุ่มดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม อายุ 9 เดือน ไม่ได้รับการฝึกว่ายน้ำ จำนวน 10 ตัว (C9)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มควบคุม อายุ 12 เดือน ไม่ได้รับการฝึกว่ายน้ำจำนวน 10 ตัว (C12)

กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุม อายุ 18 เดือน ไม่ได้รับการฝึกว่ายน้ำจำนวน 10 ตัว (C18)

กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุม อายุ 24 เดือน ไม่ได้รับการฝึกว่ายน้ำจำนวน 10 ตัว (C24)

กลุ่มที่ 5 กลุ่มทดลอง อายุ 9 เดือน ได้รับการฝึกว่ายน้ำ 22 นาทีต่อครั้งจำนวน 10 ตัว (E9)

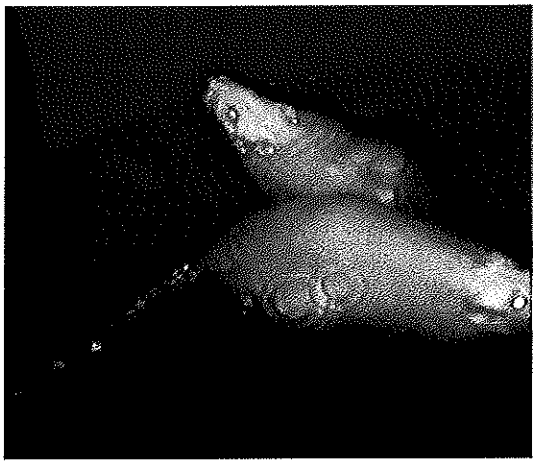
กลุ่มที่ 6 กลุ่มทดลอง อายุ 12 เดือน ได้รับการฝึกว่ายน้ำ 22 นาทีต่อครั้งจำนวน 10 ตัว (E12)

กลุ่มที่ 7 กลุ่มทดลอง อายุ 18 เดือน ได้รับการฝึกว่ายน้ำ 15 นาทีต่อครั้งจำนวน 10 ตัว (E18)

กลุ่มที่ 8 กลุ่มทดลอง อายุ 24 เดือน ได้รับการฝึกว่ายน้ำ 12 นาทีต่อครั้งจำนวน 10 ตัว (E24)

ระหว่างการทดลอง สัตว์ทดลองได้รับน้ำและอาหารตามปกติและอยู่ในห้องที่ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง, ความมืด 12 ชั่วโมง และควบคุมอุณหภูมิที่ 22 $^{\circ}$C

หลังจากครบกำหนดระยะเวลาในแต่ละกลุ่มทดลอง นำหนูไปสลบโดยฉีด pentobarbital (75 ml/kg) เข้าช่องท้อง แล้วนำหัวใจหนูในแต่ละกลุ่มไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน โดยวิธี Immunohistochemistry ร่วมกับ Western blotting โดยดัดแปลงจากงานวิจัยของ ศุภพงษ์ อิ่มสรรพางค์ และคณะ (2006) (รูปที่ 2-1)



รูปที่ 2-1 A แสดงหนูกำลังว่ายน้ำ

รูปที่ 2-1 B แสดงหนูกำลังว่ายน้ำในถังน้ำวน

รูปที่ 2-1 C แสดงการเช็ดตัวและส่องไฟให้หลังจากว่ายน้ำ

2. การย้อม Masson's trichrome

หลักการ เป็นการย้อมติดสี 3 สี ซึ่งอาจจะมีการย้อมสี nucleus หรือไม่ก็ได้ โดยขั้นตอนแรกจะเป็นการย้อมสีที่มีคุณสมบัติเป็นกรด ซึ่งจะทำให้องค์ประกอบภายในเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นกรดทางชีวเคมีติดสีแดง เช่น cytoplasm, muscle และcollagen เพื่อเป็นการแยกแต่ละส่วนขององค์ประกอบภายในเซลล์ หลังจากนั้นจึงนำไปแช่ใน phosphotungstic acid เนื่องจาก cytoplasm มีคุณสมบัติให้สารซึมผ่านได้น้อยกว่า collagen ทำให้สีเดิมหลุดออกจาก collagen แต่ไม่หลุดออกจาก cytoplasm อีกทั้ง phosphotungstic acid ยังเป็นตัวกลางในการติดสีของสาร aniline blue กับ collagen ทำให้ collagen ติดสี blue ส่วน nucleus ไม่ได้ทำปฏิกิริยากับสีดังกล่าว จึงติดสีดำ หากทำการย้อม nucleus ด้วยสีที่มีคุณสมบัติเป็นเบส เช่น hematoxylin จะทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินม่วง

2.1 ละลายพาราพลาส (deparafinizaion) ในไซลีน (xylene) 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2.2 ดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ (rehydration) โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 100 %, 95 % อย่างละ 2 ครั้ง นานครั้งละ 5 นาที แล้วจึงแช่ในน้ำประปานาน 5 นาที

2.3 ย้อมด้วย 5% potassium dichromate 60 นาทีแล้วล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา 1 นาที

2.4 ย้อมด้วย mayer's hematoxylin นาน 15 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา 10 นาที

2.5 แช่ในน้ำอุ่น 1 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย 0.6% phosphotungstic acid 10 นาที แล้วล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา 1 นาที

2.6 ย้อมด้วย mixture solution 20 นาที ตามด้วย 1% acetic acid 2 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที แล้วล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา 1 นาที

2.7 ย้อมด้วย 2.5% phosphotungstic acid 20 นาทีแล้วล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา 1 นาที

2.8 ย้อมด้วย 0.4% aniline blue 15 นาทีตามด้วย 1% acetic acid 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาทีแล้วล้างส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา 1 นาที

2.9 ทำการ dehydration, clearing, permount และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

2.10 ศึกษาพยาธิวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล (DP 11, Olympus)

3. Immunohistochemistry technique

หลักการ เป็นเทคนิคสำหรับการบอกชนิดของแอนติเจนในเซลล์หรือในเนื้อเยื่อโดยอาศัยการการเกิดปฏิกิริยาของแอนติเจนกับแอนติบอดีที่สัมพันธ์กัน

3.1 ขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (Tissue processing for wax embedding)

นำกล้ามเนื้อหัวใจไปรักษาสภาพใน 10% ฟอร์มาลีน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา (Tissue processing) ดังนี้

3.1.1.Dehydration (ดึงน้ำออกจากเซลล์) โดยแช่ในแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 50%, 75%, 95% และ 100% ตามลำดับ โดยแช่อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที และแช่ค้างคืนในแอลกอฮอล์ 100%

3.1.2.Clearing (ทำให้เซลล์ใส) แช่ในไซลีน (xylene) นาน 2 ชั่วโมง และแช่ทิ้งไว้ค้างคืนอีกครั้ง

3.1.3.Melted paraplast แช่เนื้อเยื่อในพาราพลาสต์เหลว 4 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง เพื่อให้พาราพลาสต์ซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อ

3.1.4.Embedding ฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาสต์เหลว และทิ้งไว้ให้พาราพลาสต์แข็งตัว

3.1.5.Sectioning ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ความหนา 5 ไมครอน และวางเนื้อเยื่อบน TESPA-coated slide

3.2 ขั้นตอนการย้อมเนื้อเยื่อ

3.2.1. Deparaffinization ละลายพาราพลาสในไซลีน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2.2. ดึงน้ำเข้ามาในเนื้อเยื่อ (Rehydration) โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 100%, 100%, 90%, 70% และ 50% อย่างละ 5 นาทีตามลำดับ แล้วจึงแช่น้ำประปา 5 นาที

3.2.3. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3%triton X-100 ใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer นาน 30 นาที

3.2.4. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M.Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2.5. แช่เนื้อเยื่อในบล็อกกิ้งซีรัม (block serum, horse serum dilution 1:200) อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาทีเพื่อ block non-specific background

3.2.6. แช่เนื้อเยื่อใน primary antibody (Monoclonal mouse anti-parvalbumin) อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4 $^{\circ}$C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.7. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2.8. แช่เนื้อเยื่อใน secondary antibody (Biotinylated anti-mouse) อัตราส่วน 1:200 อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที

3.2.9. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% H_2O_2 ในเมททานอลนาน 40 นาที

3.2.10. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2.11. แช่เนื้อเยื่อใน avidin biotinylate enzyme complex (ABC) ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 120 นาที

3.2.12. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

3.2.13. แช่เนื้อเยื่อใน 3-amino, 9-ethy-carbazole (AEC) นาน 10 นาที

3.2.14. ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา นาน 10 นาที

3.2.15. ย้อมด้วยอีมาทอกซีลิน (Hematoxylin) นาน 5 นาที

3.2.16. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา นาน 10 นาที

3.2.17. ดึงน้ำออก (Dehydration) ด้วยการแช่ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 50%, 70%, 90% , 90%, 100% และ 100% ครั้งละ 5 นาทีตามลำดับ

3.2.18. แช่เนื้อเยื่อในไซลีน 5 นาที 2 ครั้ง

3.2.19. หยดเปอร์เมาท์ (Permount) และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

3.2.20.ศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscopy) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิตอล (DP 11,Olympus)

3.2.21. เนื้อเยื่อของกลุ่มควบคุมเชิงลบ (Negative control) นำมาย้อมโดยวิธีเดียวกับวิธีข้างต้นแต่ไม่ใส่ primary antibody

4. Western blotting

หลักการ Western blot เป็นวิธีการตรวจทางอิมมูน (Immunoassays) ที่ใช้ตรวจแถบแอนติเจนที่มีความสัมพันธ์กับแอนติบอดี โดยใช้เอนไซม์พวก HRP (Horse Radish Peroxidase) ที่จับแอนติบอดี โดยเอนไซม์จะทำปฏิกิริยากับ substrate ที่ให้สี หรือให้แสง (chemiluminescent) เป็นแถบสัญญาณว่ามีการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนและแอนติบอดีที่สัมพันธ์กัน

4.1 การเตรียมโปรตีน (sample preparation)

4.1.1.นำกล้ามเนื้อหัวใจส่วนเวนตริเคิลทั้งซ้ายและขวาบดให้ละเอียดภายใต้อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง

4.1.2.นำกล้ามเนื้อที่ละเอียดที่บดเป็นผงแล้วไปแช่ในน้ำยาย่อยสลาย (complete lysis buffer) และทำให้เย็นจนแข็งในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) และทิ้งไว้ละลายจนเป็นของเหลว (thawed)

4.1.3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ตั้งที่อุณหภูมิที่ 4 °C ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง

4.1.4. นำส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยใช้ Protein assay kit และใช้เครื่อง microplate reader วัดความเข้มข้นของโปรตีนโดยใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 562 นาโนเมตร

4.1.5. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาสมการมาตรฐานและนำมาคำนวณหาปริมาณ โปรตีนที่จะใช้ในการเตรียมสารละลายโปรตีน

4.1.6. นำสารละลายโปรตีนไปเตรียมในแซมเปิ้ลบัฟเฟอร์ (sample buffer, Laemmli Sample Buffer) และนำไปให้ความร้อนที่ 60 °C นาน 10 นาที

4.2 การเตรียมเจล (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis)

4.2.1. ประกอบกระจกสำหรับเตรียมเจล

4.2.2. เตรียม 12% Polyacrylamide resolving gel และทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชั่น

4.2.3. เตรียม 4% Polyacrylamide stacking gel และทิ้งไว้ 30 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชั่น

4.2.4.นำสารละลายโปรตีนมาแยกด้วยชุดอิเล็กโตรโฟรีซีส (electrophoresis apparatus) โดยการหยดสารละลายโปรตีน 20 ug ลงในหลุม

4.2.5. เติม SDS-eletrophoresis buffer ลงในแชมเบอร์

4.2.6. ปล่อยกระแสไฟฟ้า 5 mA/gel จนกระทั่งโปรตีนถูกแยกจนถึงขอบล่างของเจล

4.3. การย้อมเจล

ย้อมเจลด้วย Coomissie Brilliant Blue R 250 นาน 20 นาที แล้วจึงล้างส่วนเกินออกด้วยสารละลายดีสเตนนิ่ง (destaining solution) เพื่อตรวจสอบปริมาณการหยอดและการแยกของโปรตีนตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล

4.4 การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังกระดาษไนโตรเซลลูโลสเมมแบรน (Blotting)

4.4.1.ประกอบเจลและเมมเบรนลงใน Mini Trans-Blot และเติมทรานซ์เฟอร์บัฟเฟอร์ (transfer buffer) ลงไปในแชมเบอร์พร้อมใส่น้ำแข็ง

4.4.2. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลลงบนเมมเบรน ด้วยกระแสไฟฟ้า 250 mA นาน 2 ชั่วโมง

4.4.3. นำเมมเบรนไปแช่ใน 0.1% Ponceau S (w/v) in 5% acetic acid (v/v) นาน 5 นาที เพื่อตรวจสอบการย้ายโปรตีน

4.4.4. ล้าง0.1% Ponceau S ด้วย 0.1 M NaOH

4.4.5. ล้างเมมเบรนด้วยน้ำกลั่น

4.4.6. block non-specific background โดยนำเมมเบรนไปแช่ใน 5% non fat dried milk ใน Tris buffer saline (TBS) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง

4.4.7. ล้างเมมเบรนด้วย Tris buffer saline with tween 20 (TBST) 200 ml.

2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4.4.8. แช่เมมเบรนใน Primary antibody (Monoclonal anti-parvalbumin) in 3%non fat dried milk ใน TBS อัตราส่วน 1:1,000 นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.4.9. ล้างเมมเบรนด้วย TBST 200 ml. 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4.4.10. แช่เมมเบรนใน Secondary antibody (Anti-Mouse IgG HRP-linked antibody, HRP-conjugated Anti-biotin Antibody) in 3% non fat dried milk ใน TBS อัตราส่วน 1:5,000 นาน 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.4.11. ล้างเมมเบรนด้วย TBST 200 ml. 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

4.4.12. ล้างเมมเบรนด้วย TBS 200 ml. 1 ครั้ง 5 นาที

4.4.13. แช่เมมเบรนใน chemiluminescence reagents นาน 5 นาที

4.4.14. Exposed membrane ด้วย hyperfilm ที่เวลา 1ชั่วโมง นาน5 นาที

4.4.15. วัดขนาดแถบโปรตีนโดยนำแผ่นฟิล์มไปสแกนโดยโปรแกรม Image Quant TL (V.2003.03) (Amersham)

5. การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโปรตีนในแต่ละกลุ่มอายุ โดยใช้สถิติ one-way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของโปรตีนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำที่มีอายุเท่ากัน โดยใช้สถิติ student T-test

6. วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

6.1 สารเคมี

6.1.1 สำหรับอิมมูโนอิสโตเคมิสทริ (Immunohistochemistry)

1. 50% alcohol
2. 70% alcohol
3. 75% alcohol
4. 90% alcohol
5. 95% alcohol
6. Absolute alcohol
7. ABC kit (Avidin-biotin-peroxidase, Vector Laboratories)
8. Biotinylated anti-mouse IgG antibody(Vector Laboratories)
9. Dry acetone
10. Distilled water
11. Harris's hematoxylin
12. Hydrogenperoxide
13. Methanol
14. Monoclonal anti-parvalbumin(Parv-19,Sigma)
15. Normal horse serum (Vector Laboratories,Berlingham,CA)
16. NovaRED (Vector Laboratories), 3-amino, 9-ethy-carbazole (AEC)
17. Paraplast plus
18. Permount
19. Tap water

20. Tespa

21. Tris

22. Triton x-100

23. Xylene

6.1.2. สำหรับเวสเทอร์นบล็อทติ้ง (Western blotting)

1. β-mercaptoethanol (BME)

2. Acrylamide gel

3. Amonium persulfate

4. Anti-Mouse IgG HRP-linked antibody, HRP-conjugated Anti-biotin Antibody (Cell Signaling,Danvers,USA)

5. Aprotinin

6. Bovine serum albumin

7. Coomassie blue R-250

8. Distilled water

9. EGTA

10. ECL Plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Amersham)

11. Glycine

12. Leupeptin

13. Laemmli Sample Buffer

14. Methanol

15. Magnesium chloride

16. Monoclonal anti-parvalbumin (Parv-19,Sigma)

17. Phosphate buffer saline (PBS)

18. PMSF

19. Resolving gel buffer

20. Sodium deoxycholate

21. Sodium dodecyl sulfate (SDS)

22. Sodium fluoride

23. Sodium pyrophosphate

24. Sodium vanadate

25. Stack gel buffer

26. TEMED

27. Triton x-100

6.2 อุปกรณ์

6.2.1. เครื่องแก้ว

1. กรวยกรอง (Funnel)

2. กระบอกตวง (Cylinder)

3. ขวดเก็บตัวอย่าง (Specimen bottle)

4. ขวดเตรียมสาร

5. จานรอง (Petri dish)

6. บีกเกอร์ (Beaker)

7. ปิเปต (Pipette)

8. ภาชนะย้อมสี (Staining jar)

6.2.2. สำหรับเวสเทอร์นบล็อทติ้ง

1. กล่องประกอบฟิล์มกับกระดาษไนโตรเซลลูโลส

2. กระดาษไนโตรเซลลูโลส (Nitrocellulose membrane)

3. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (Magnetic sterrer)

4. เครื่องมือผ่าตัด

5. เครื่องวัดpH (pH meter)

6. เครื่องช่วยเขย่า (Vortex)

7. เครื่องสำรองไฟฟ้า

8. เครื่องปั่นแยกสารด้วยอุณหภูมิ (Centrifuge and adjust temperature)

9. ชุดอิเล็กโตรโฟรีซีสแบบ Mini protein 3 cell

10. ชุดบล็อกโปรตีน (Mini trans-blot cell)

11. ตู้ดูดควัน (Fume hood)

12. ตู้อบ (Oven)

13. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)

14. นาฬิกาจับเวลา

15. ปิเปต (Pipette)

16. ปิเปตทิป (Pipettetip)

17. ฟิล์มเอ็กซเรย์ (Hyper film)

18. ถาดหลุมขนาดเล็ก (Microwell plate)

19. อุปกรณ์บดเนื้อเยื่อ (Homogenizer)

20. อุปกรณ์ประกอบกระจก (Gel cassette preparation)

21. ไมโครปิเปต (Micropipet)

22. โปรแกรม Image Quant TL (V.2003.03)

6.2.3. สำหรับอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรี

1. กระจกปิดสไลด์

2. กระดาษกรองเบอร์ 1 (Filter paper)

3. กล่องเก็บ serial section

4. กล่องเก็บสไลด์

5. กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (Bright field microscope)

6. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (Digital camera)

7. เครื่องตัดชิ้นเนื้อชนิดล้อหมุน (Rotary microtome)

8. เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (Tissue embedding center)

9. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)

10. เครื่องกวนสารเคมีอัตโนมัติ (Magmetic sterrer)

11. เครื่องให้ความร้อนเฉพาะ (Termostat)

12. เครื่องวัด pH (pH meter)

13. ช้อนตักสาร

14. คีมจับชิ้นเนื้อตัวอย่าง (Forceps)

15. ตู้หลอมพาราฟิน (Paraffin oven)

16. ตู้ดูดควัน

17. ตู้อบ (Oven)

18. ตัวบล็อกชิ้นเนื้อ (Mold and Ring)

19. ถาดอลูมิเนียม

20. แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)

21. ที่สำหรับใส่สไลด์ย้อมสี (Rack)

22. ที่จับ Rack (Holder)

23. นาฬิกาจับเวลา

24. ปิเปต (Pipette)

25. ปิเปตทิป (Pipette tip)

26. แผ่นสไลด์ (Slides)

27. แผ่นความร้อน (Hot plate)

28. ผ้าก๊อซ

29. พู่กัน (Paint brush)

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลพื้นฐาน

1.1 น้ำหนักตัวหนูกลุ่มควบคุมและว่ายน้ำในทุกช่วงอายุ

จากผลการศึกษาพบว่า หนูอายุ 9 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำ มีน้ำหนักเฉลี่ยน้อยกว่ากลุ่ม 9, 12, 18 และ 24 เดือน น้ำหนักของหนูทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำเพิ่มขึ้นในหนูอายุ 12 เดือน หนูอายุ 18 เดือนทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำมีน้ำหนักใกล้เคียงกับกลุ่มอายุ 12 เดือน หนูกลุ่มควบคุมอายุ 24 เดือน มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากในขณะที่กลุ่มว่ายน้ำน้ำหนักเพิ่มขึ้นน้อยกว่ามาก (รูปที่ 3-1)

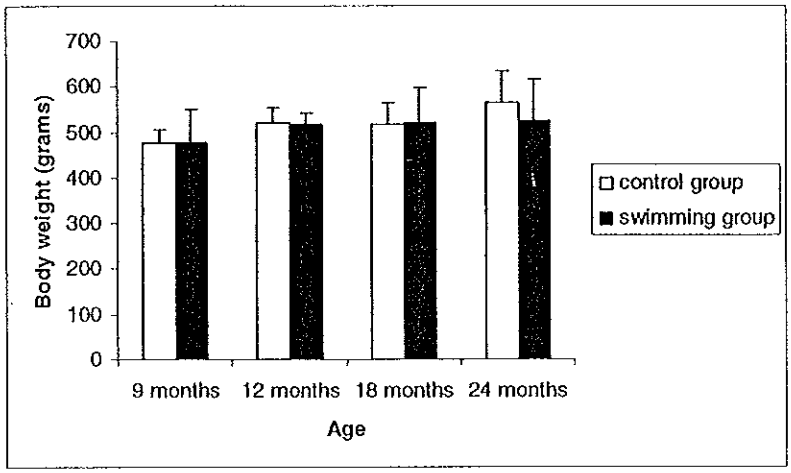
1.2 น้ำหนักหัวใจ

หัวใจในหนูกลุ่มควบคุมมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น (9, 12 และ 18 เดือน) และเพิ่มมากขึ้นในหนูอายุ 24 เดือน (รูปที่ 3-2) ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มอายุ 9, 12 และ 18 เดือน น้ำหนักหัวใจกลุ่มว่ายน้ำมากกว่ากลุ่มควบคุมที่มีอายุเท่ากัน ในขณะที่กลุ่มอายุ 24 เดือน กลุ่มควบคุมมีน้ำหนักหัวใจมากกว่ากลุ่มว่ายน้ำอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

1.3 สัดส่วนของน้ำหนักหัวใจเทียบน้ำหนักตัว

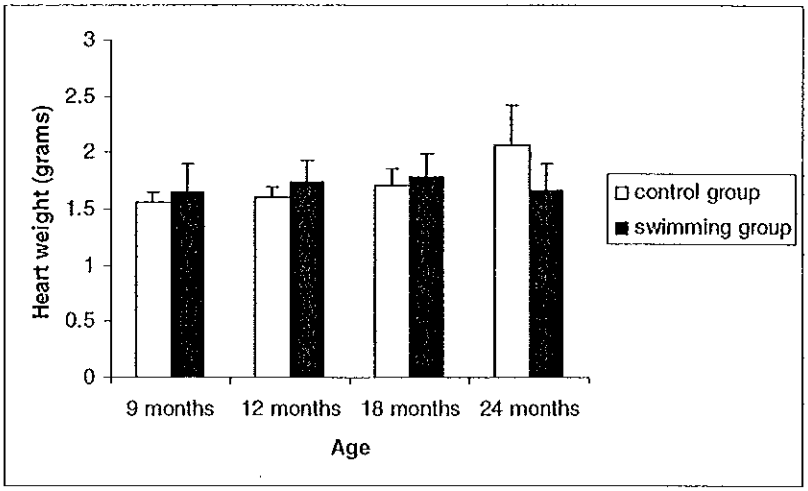
ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหัวใจเทียบกับน้ำหนักตัวในกลุ่ม 9, 12, 18 และ 24 เดือน มีค่าใกล้เคียงกันเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำในทุกกลุ่มอายุ ได้แก่ 9, 12, 18 และ 24 เดือน (รูปที่ 3-3)

กราฟแสดงน้ำหนักตัว



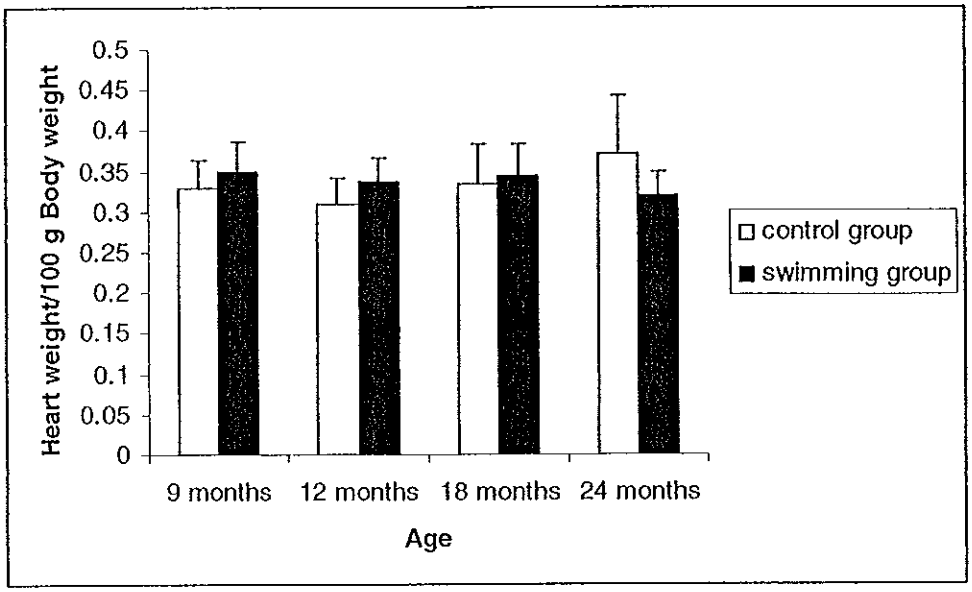
รูปที่ 3-1 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน

กราฟน้ำหนักหัวใจ



รูปที่ 3-2 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักหัวใจหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน

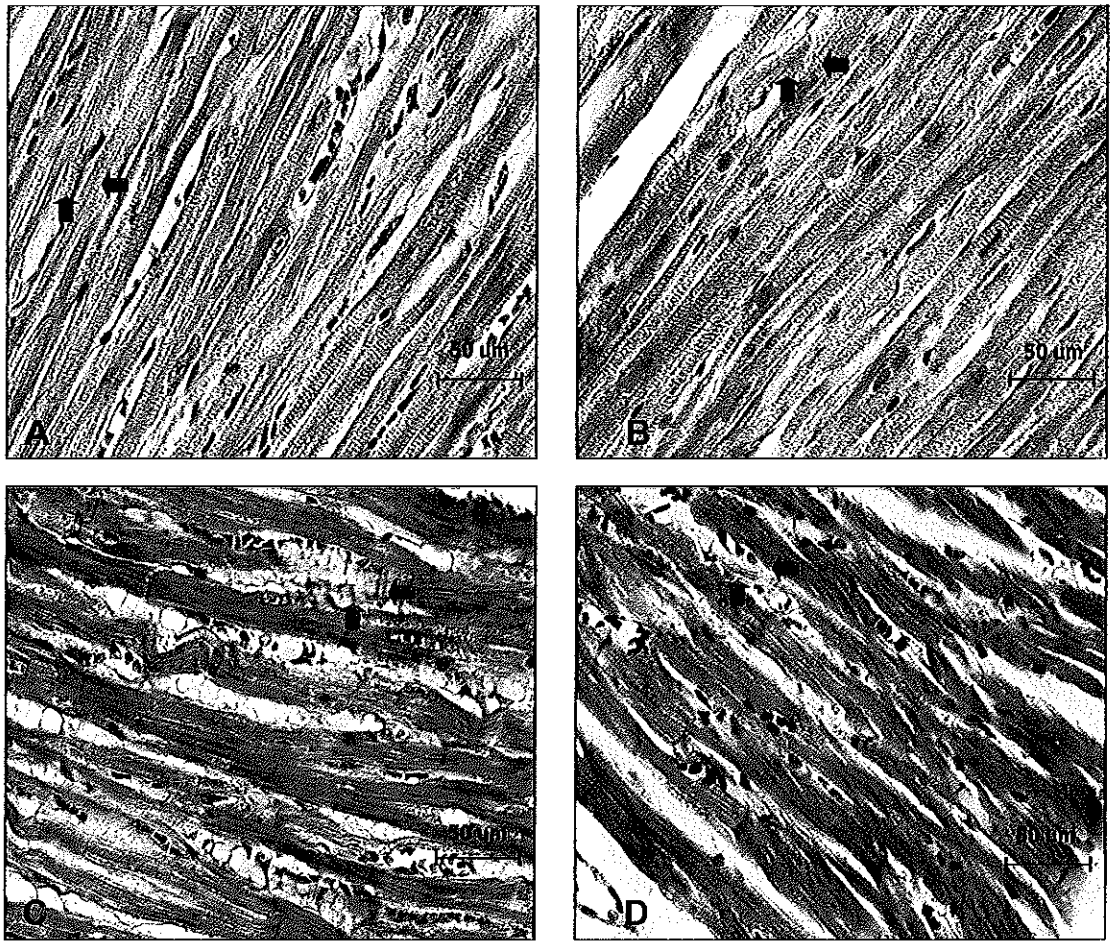
กราฟแสดงสัดส่วนน้ำหนักหัวใจเทียบน้ำหนักตัวหนู



รูปที่ 3-3 แสดงสัดส่วนน้ำหนักหัวใจเทียบน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน

2. ลักษณะของการย้อมกล้ามเนื้อหัวใจจากการย้อม Masson's trichrome

เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ มีรูปร่างคล้ายทรงกระบอก ภายในไซโตพลาสซึมมีลักษณะเป็นลายตามขวาง มีนิวเคลียสรูปไข่มีจำนวน 1 หรือ 2 อัน อยู่กลางเซลล์ มีเยื่อหุ้มเซลล์ห่อหุ้มโดยรอบในแต่ละเซลล์ ซึ่งจากการย้อม Masson's trichrome พบว่าในหัวใจหนูอายุ 18 เดือน มีลักษณะของเซลล์ และคอลลาเจนไฟเบอร์ ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำไม่แตกต่างกัน โดยหัวใจหนูอายุ 24 เดือน กลุ่มควบคุมมีเซลล์ขนาดโตกว่า และมีคอลลาเจนไฟเบอร์มากกว่ากลุ่มอายุ 18 เดือน แต่กลุ่มว่ายน้ำอายุ 24 เดือน มีคอลลาเจนไฟเบอร์ น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 3-4 A-D)



รูปที่ 3-4 แสดงการติดสีของคอลลาเจนไฟเบอร์ (ลูกศร ,สีน้ำเงิน)ในเนื้อเยื่อหัวใจหนู กลุ่มควบคุมอายุ 18 และ 24 เดือน (A และ C) กลุ่มว่ายน้ำอายุ 18 และ24 เดือน (B และ D)

3. การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลายของหนูโดยอาศัยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสทรีในตัวควบคุมเชิงบวกและตัวควบคุมเชิงลบ

3.1 พบปฏิกิริยาของพาร์วัลบูมินภายในไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อ EDL ซึ่งในแต่ละ fiber มีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินแตกต่างกัน (รูปที่ 3-5 A) และไม่พบปฏิกิริยาของพาร์วัลบูมินในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-5 B)

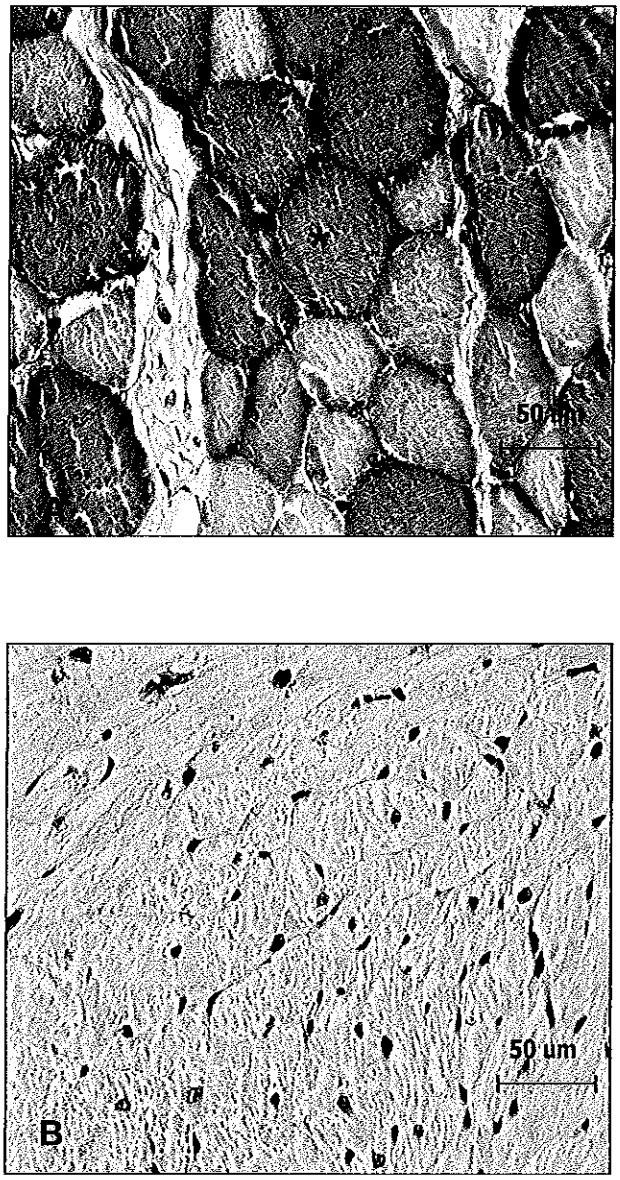
3.2 การเปรียบเทียบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุต่างๆ

จากการศึกษาลักษณะเซลล์ในกล้ามเนื้อหัวใจส่วนเวนตริเคิลของหนูอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือนพบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูมีรูปร่างเป็นทรงกระบอก มีการแตกแขนงและมีนิวเคลียสเป็นรูปยาวรีอยู่กลางเซลล์ พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอในไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อหัวใจหนูทุกช่วงอายุโดยที่ในช่วงอายุ (รูปที่ 3-6 A-D) โดยที่ในช่วงอายุ 9 และ 12 เดือนมีความเข้มของปฏิกิริยาของพาร์วัลบูมินมาก (รูปที่ 3-6 A และ B) ขณะที่ความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินลดลงในกล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 18 เดือน (รูปที่ 3-6 C) และความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินมีความเข้มน้อยสุดในกล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 24 เดือน (รูปที่ 3-6 D)

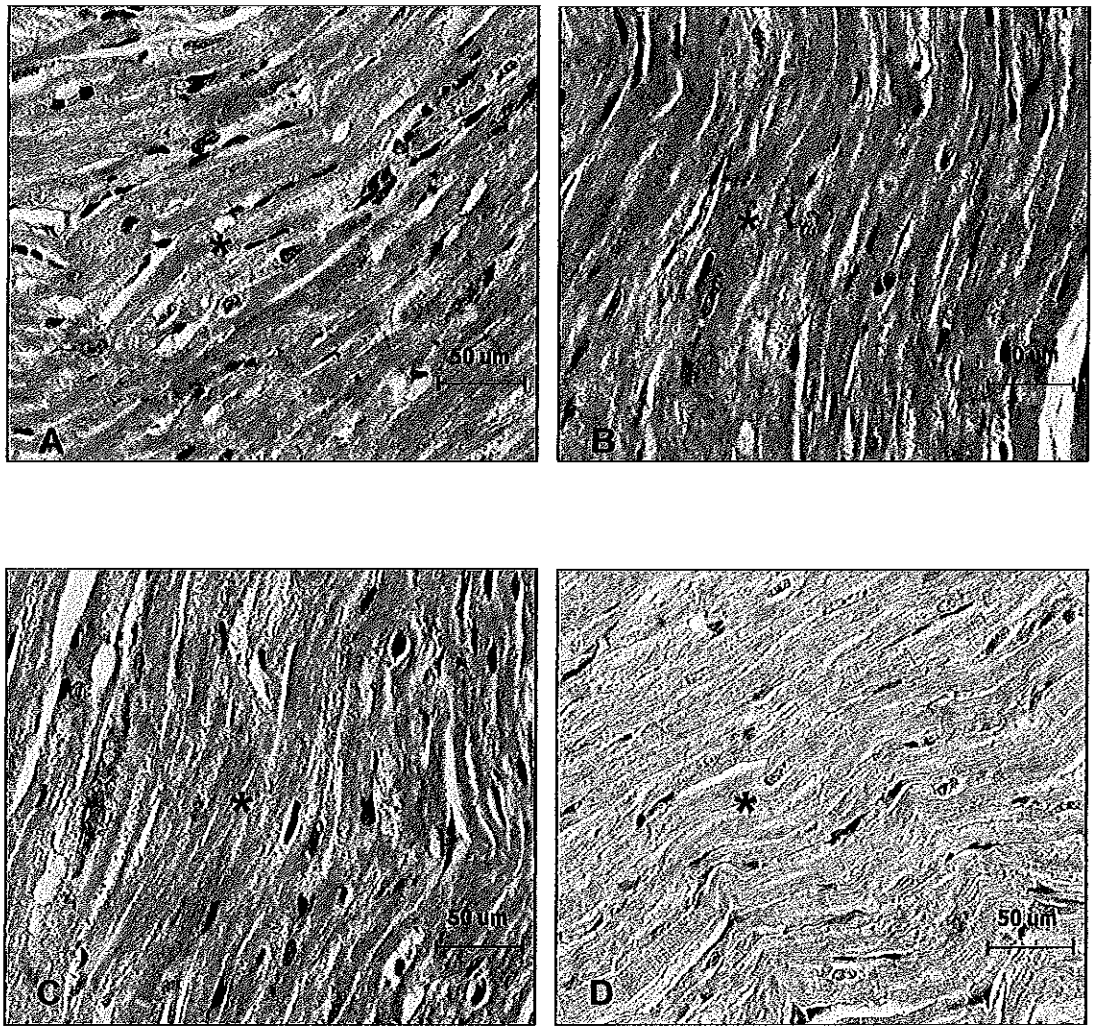
3.3 การเปรียบเทียบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจหนูว่ายน้ำ (swimming, S) และควบคุม (control, C) ในกลุ่มอายุต่างๆกัน

จากการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบกับกลุ่มว่ายน้ำในแต่ละช่วงอายุพบว่าหนูช่วงอายุ 9, 12 และ 18 เดือน กลุ่มว่ายน้ำมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินเพิ่มมากขึ้นอย่างสังเกตได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมในช่วงอายุเดียวกัน (รูปที่ 3-7 A, B, C, D, E และ F) ในขณะที่

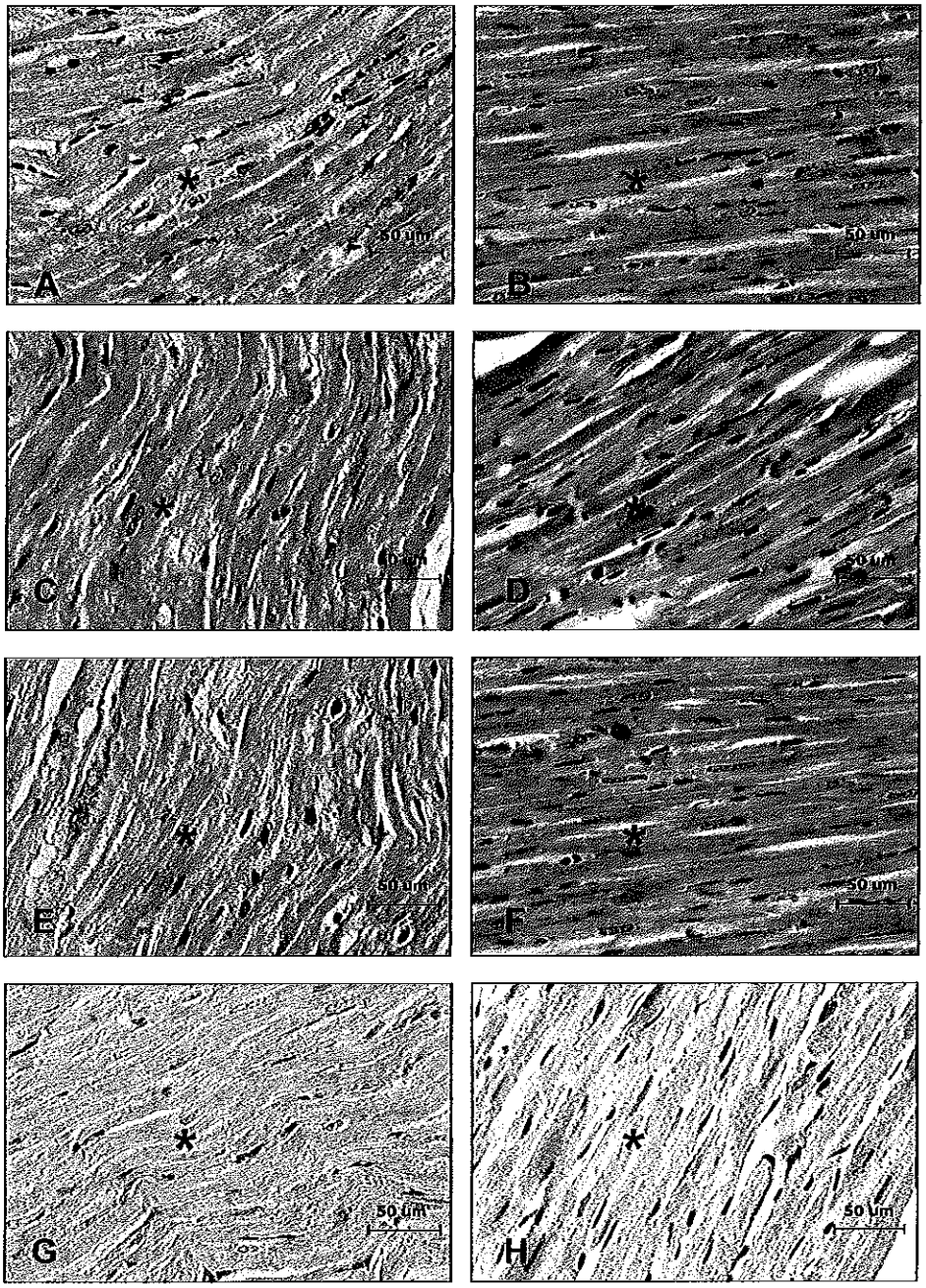
หนูอายุ 24 เดือน กลุ่มว่ายน้ำมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3-7 G และ H)



รูปที่ 3-5 A แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ EDL (สีน้ำตาล,*) และไม่พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (B)



รูปที่ 3-6 A, B, C และ D แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมิน (สีน้ำตาล,*) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ตามลำดับ

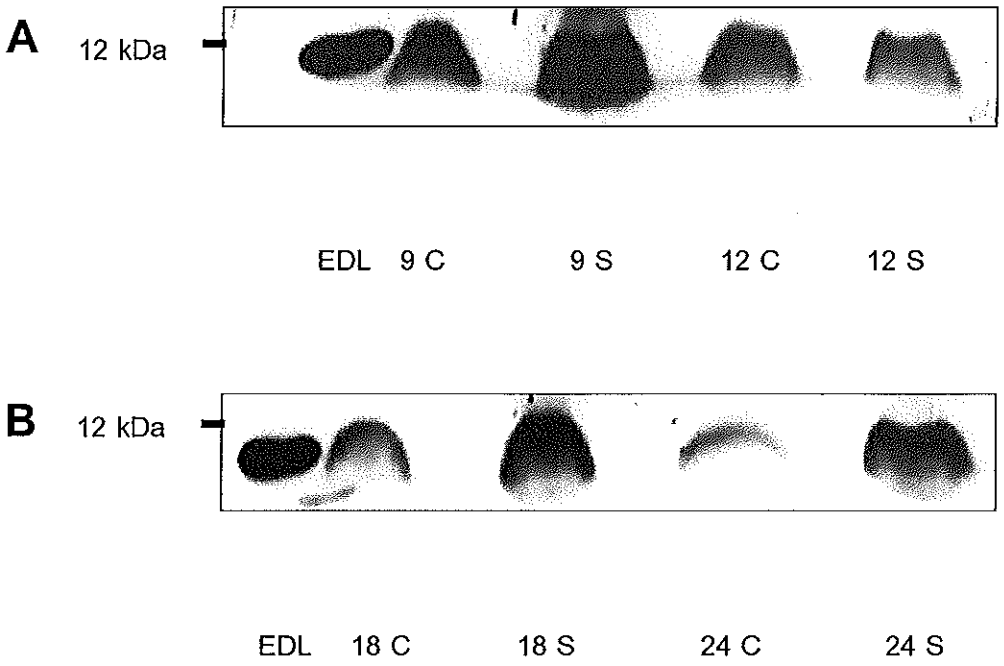


รูปที่ 3-7 A, C, E และ G แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมิน (สีน้ำตาล,*) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน (กลุ่มควบคุม) เปรียบเทียบกับ B, D, F และ H ซึ่งเป็นหนูอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน (กลุ่มว่ายน้ำ) ตามลำดับ

4. การเปรียบเทียบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูโดยเทคนิคเวสเทอร์น บล็อทติ้ง

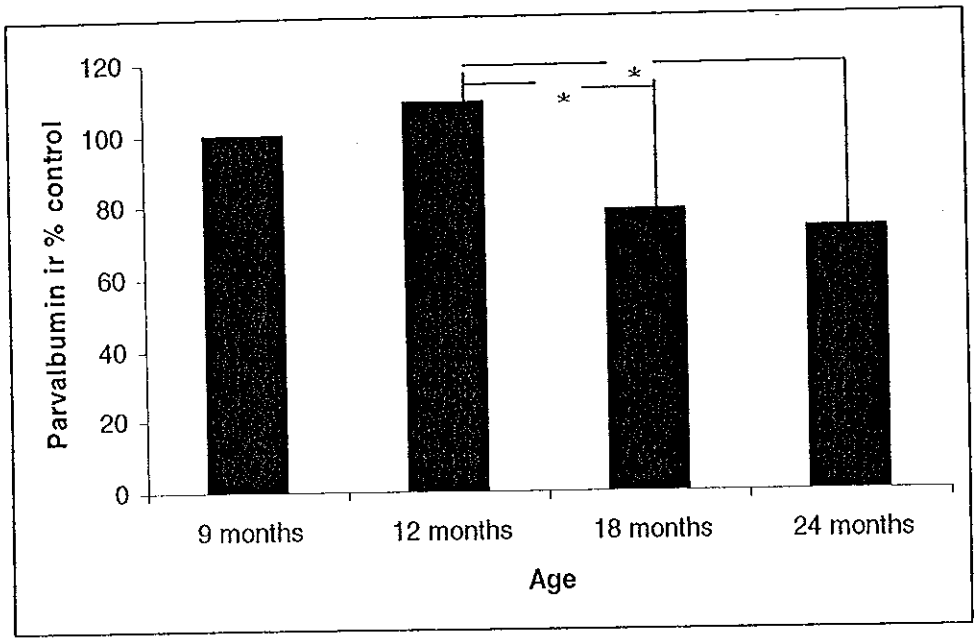
จากการศึกษาพบแถบโปรตีนพาร์วัลบูมิน ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 12 kDa ของกล้ามเนื้อ EDL และกล้ามเนื้อหัวใจในทุกช่วงอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุม (C) และกลุ่มว่ายน้ำ (S) (รูปที่ 3-8 A และB) จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินในแต่ละช่วงอายุโดยเทียบเป็น 100% พบว่าอายุเป็นตัวแปรที่มีผลต่อการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ($P<0.05$) โดยที่หนูอายุ 9 เดือนมีค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีนคิดเป็น 100% และทดสอบทางสถิติพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูอายุ 12 เดือน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีน108.5% แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูอายุ 12 เดือนกับ 18 เดือน (78.66%) และ 24 เดือน (73.26%) พบว่าความเข้มค่าเฉลี่ยของแถบโปรตีนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินในหนูอายุ 18 เดือนเมื่อเทียบกับหนูอายุ 24 เดือน (รูปที่ 3-9)

จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินของหนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มว่ายน้ำในแต่ละช่วงอายุพบว่า การแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูอายุ 9,12 และ 18 เดือน โดยหนูอายุ 9 เดือนกลุ่ม C มีค่าเฉลี่ยคิดเป็น100% กลุ่ม S = 133.44% อายุ 12 เดือนกลุ่ม C มีค่าเฉลี่ยคิดเป็น 100% กลุ่ม S = 129.2% ($P<0.05$) และกลุ่ม 18 เดือน กลุ่ม C มีค่าเฉลี่ยคิดเป็น 100 % กลุ่มS = 167.2 ($P<0.01$) แต่ในหนูอายุ 24 เดือนพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของหนูกลุ่มC (100%) และกลุ่ม S (109.3) (รูปที่ 3-10)



รูปที่ 3-8 A และB แสดงแถบโปรตีนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ EDL หัวใจหนูกลุ่มอายุต่างๆ ได้แก่ 9, 12, 18 และ 24 เดือน ทั้งกลุ่มควบคุม (C) และกลุ่มว่ายน้ำ (S)

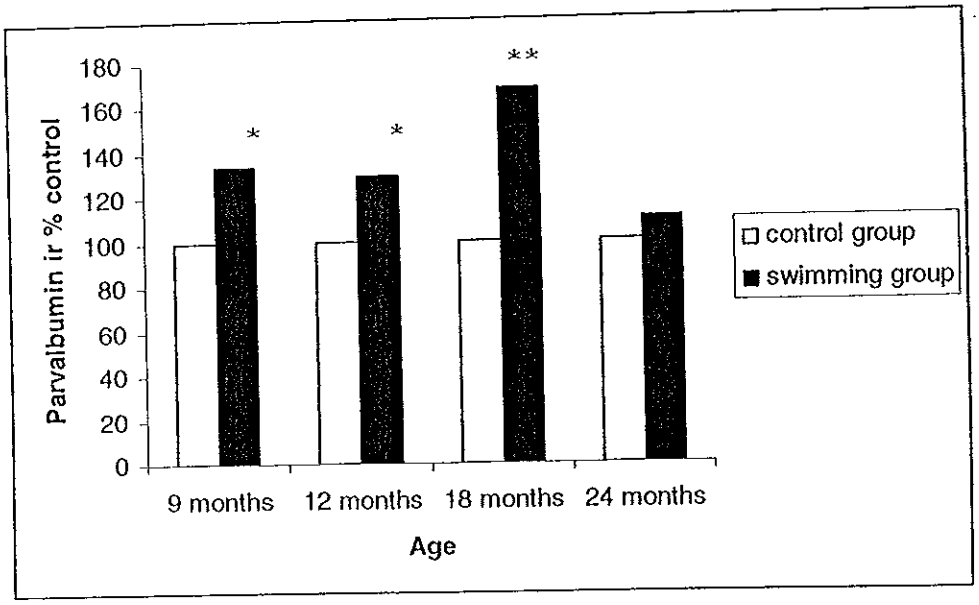
การเปรียบเทียบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละกลุ่มอายุ



รูปที่ 3-9 แสดงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูในแต่ละช่วงอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.05$)

การเปรียบเทียบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละอายุ

ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มว่ายน้ำ



รูปที่ 3-10 แสดงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูกลุ่มว่ายน้ำและกลุ่มควบคุมใน

แต่ละช่วงอายุ 9, 12, 18 และ 24 เดือน (* แสดงความแตกต่างอย่างมี

นัยสำคัญที่ $P<0.05$, ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $P<0.01$)

บทที่4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า น้ำหนักของหนูกลุ่มว่ายน้ำและกลุ่มควบคุม ทุกช่วงอายุเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแสดงให้เห็นว่าการฝึกว่ายน้ำไม่ได้มีผลทำให้หนูเกิดความเครียดจนรับประทานอาหารได้น้อยลงและสังเกตว่ากลุ่มอายุ 24 เดือน มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เกิดจากการที่มีอัตราการเผาผลาญอาหารน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Uchida (1978) และจากผลการศึกษาสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวพบว่าหนูที่ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำมีสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มอายุและมีสัดส่วนของน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่มควบคุมเล็กน้อยในช่วงอายุเดียวกันยกเว้นหนูกลุ่มอายุ 24 เดือน แสดงว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำมีผลทำให้หัวใจสูบฉีดโลหิตมากขึ้น จากการศึกษาของ Evanaelista *et al.* (2003) พบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำมีผลทำให้สัดส่วนน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาครั้งนี้โดยการที่สัดส่วนของน้ำหนักตัวต่อน้ำหนักหัวใจที่เพิ่มขึ้นนั้นเนื่องจากมีการมีการอธิบายว่าเกิดจากน้ำหนักและปริมาตรของหัวใจห้องล่างทั้งสองห้องเพิ่มขึ้น (Evangelista *et al.*, 2003; Geenen *et al.*, 1988) แต่ในกลุ่มอายุ 24 เดือน หนูกลุ่มควบคุมมีสัดส่วนน้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มว่ายน้ำทั้งที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น อาจมีสาเหตุมาจาก dilated cardiomyopathy ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Meinrad (2008) และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าน้ำหนักหัวใจหนูกลุ่มอายุ 24 เดือนมีน้ำหนักหัวใจมากกว่ากลุ่มอายุ 18 เดือนเนื่องมาจากมีการเพิ่มขึ้นของเส้นใยคอลลาเจน (Gerstenblith *et al.*, 1977; Brownlee *et al.*,1988) และมีการสะสมของสาร

พวก lipufuscin ซึ่งเป็นสารพวกไขมันในช่องว่างของนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจรวมทั้งการเกิดภาวะ Hypertrophy ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Fleg *et al.*, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ โดยพบว่าจากการย้อม Masson's trichrome ในหัวใจหนูอายุ 24 เดือนมีคอลลาเจนไฟเบอร์และขนาดของเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูอายุ 18 เดือนและเมื่อเทียบหนูกลุ่ม ว่ายน้ำกับกลุ่มควบคุมพบว่ามีปริมาณคอลลาเจนไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Batista และคณะ (2008) พบว่าการออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำไม่ได้ทำให้ปริมาณของคอลลาเจนไฟเบอร์ในกล้ามเนื้อหัวใจหนูเพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้

การแสดงออกของพาร์วัลบูมินในวัยชรา ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคอิมมูโนอิสโตเคมิสทรีพบว่าหนูกลุ่มอายุ 9 และ 12 เดือนมีการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเข้มมาก และปฏิกิริยาจะลดลงในหนูกลุ่มอายุ 18 เดือนและ 24 เดือน ตามลำดับ ส่วนผลการศึกษาโดยเวสเทอร์ บล็อท พบว่า หนูอายุ 9 และ 12 เดือนมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินมากและมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินลดลงในหนูวัยผู้ใหญ่ (18 เดือน) และลดลงเป็นอย่างมากในหนูวัยชรา 24 เดือน ซึ่งจากการใช้ทั้งสองเทคนิคผลการศึกษามีความสอดคล้องกันโดยสรุปได้ว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจของหัวใจหนูลดลงในหนูวัยผู้ใหญ่และวัยชรา ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ (Cai *et al.*, 2001) ซึ่งศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลาย และพบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมิลลดลงในหนูวัยผู้ใหญ่และหนูวัยชราและสอดคล้องกับการศึกษาของ Vongvatcharanon *et al* (2006) ซึ่งศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูพบว่ามีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นจากหนูแรกเกิด จนถึงหนูอายุ 12 เดือน อย่างมีนัยสำคัญ จากการศึกษาของ Meerson และคณะ (1987) พบว่าอัตราการสร้าง RNA และโปรตีนลดลงในหนูวัยชรา นั้นอาจอธิบายได้ว่าเนื่องจากในหนูวัยชรา มีการลดลงของจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ อาจจะโดยการลดลงของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอาจจะมีสาเหตุมาจากเซลล์

กล้ามเนื้อหัวใจเกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งในหัวใจมนุษย์นั้นพบว่า เมื่อมีอายุระหว่าง 20-90 ปี มีจำนวนเซลล์ลดลง 40-50% ของจำนวนเซลล์ทั้งหมด ซึ่งการลดลงของเซลล์ทำให้เซลล์ที่เหลือมีขนาดใหญ่ขึ้น (hypertrophy) (Weisfeldt, 1998) ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ในหัวใจในวัยชรานั้น อาจจะเป็นสาเหตุให้มีการสร้างพาร์วัลบูมิลลดลงเช่นกัน และเนื่องจากพาร์วัลบูมินมีคุณสมบัติในการเป็นปัจจัยในการคลายตัวของกล้ามเนื้อลายและยังไม่มีการค้นพบพาร์วัลบูมินในหัวใจ จึงมีการนำพาร์วัลบูมินมาใช้ในการรักษาโรคหัวใจชนิดไดแอสโตลิค ซึ่งมีความบกพร่องของการคลายตัวโดยมีการนำยีนของพาร์วัลบูมินซึ่งนำมาจากกล้ามเนื้อลายชนิดหดและคลายตัวเร็ว (fast-twitch) ของหนูมาสอดแทรกในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่มีความบกพร่องของการคลายตัวและในหนูวัยชราพบว่าการคลายตัวของหัวใจดีขึ้น (Wahr *et al.*,1999; Coutu *et al.*, 2003; Michele *et al.*, 2004; Schimet *et al.*, 2004) ซึ่งนำไปสู่ความเชื่อที่ว่าพาร์วัลบูมินน่าจะทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจคลายตัวเช่นกัน แต่เทคนิคการถ่ายทอดยีนดังกล่าวนั้นมีผลทำให้กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เนื่องจากใช้ไวรัส เป็นเวคเตอร์และอาจทำให้เกิด overexpression ของพาร์วัลบูมินขึ้นได้ (Senior, 2001) ดังนั้นการใช้เทคนิคดังกล่าวจึงต้องได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องก่อนที่จะนำมาใช้กับมนุษย์ Coutu และคณะ (2003)ได้อธิบายกลไกของพาร์วัลบูมินในการทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ โดยในระยะพักภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีระดับ Ca^{2+} น้อยและ พาร์วัลบูมินจะจับกับ Mg^{2+} แต่เมื่อมีการกระตุ้นกล้ามเนื้อมีผลทำให้ Ca^{2+} สูงขึ้น ซึ่งผลของการที่ Ca^{2+} ในไซโตพลาสซึมสูงขึ้นทำให้พาร์วัลบูมินปล่อย Mg^{2+} เพื่อไปจับกับ Ca^{2+} แต่กระบวนการปล่อย Mg^{2+} นั้นเป็นกระบวนการที่เป็นไปอย่างช้า ๆ ดังนั้น Ca^{2+} ที่หลั่งออกมาเพิ่มขึ้นจะไปจับกับโทรโปนินซี ซึ่งมีผลทำให้กล้ามเนื้อหดตัว หลังจากปล่อย Mg^{2+} พาร์วัลบูมินก็ดึง Ca^{2+} ออกมาจากโทรโปนินซีและส่งกลับไปเก็บภายในซาโคพลาสมิกเรติคูลัม มีผลทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณพาร์วัลบูมินก็น่าจะมีผลต่อการคลายตัวของหัวใจ ซึ่งในหนูวัยชรานั้น

พบว่ามีความบกพร่องของการคลายตัวของหัวใจ (diastolic dysfunction) เนื่องจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจคลายตัวช้า (Weisfeldt, 1978; 1980) นอกจากนั้นหัวใจมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิดก็พบว่าในวัยชราหัวใจคลายตัวช้าเช่นเดียวกัน (Levy *et al.*, 1993) ซึ่งการอธิบายในระดับเซลล์ถึงสาเหตุของการที่กล้ามเนื้อหัวใจคลายตัวช้านั้นยังไม่ชัดเจนนัก

ในหัวใจมนุษย์นั้นได้มีการอธิบายถึงสาเหตุการบกพร่องในการคลายตัวว่ามีสาเหตุมาจากการที่แคลเซียมถูกดึงกลับเข้าสู่ SR ช้าเนื่องจากมีจำนวนของ SR ลดลง (Cai *et al*,. 1998) ในหนู Wistar rat วัยชราได้มีการอธิบายถึงสาเหตุที่ทำให้การคลายตัวช้า เกิดจากการดึงแคลเซียมกลับสู่ SR ช้ามีสาเหตุมาจาก Ca^{2+} ATPase ลดลง (Jiang และ Narayanon, 1990) ดังนั้นการลดลงของ Ca^{2+} ATPase ร่วมกับการลดลงของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูวัยชราอาจนำมาสู่การอธิบายถึงสาเหตุของความบกพร่องของการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งอาจนำไปสู่การอธิบายถึงสาเหตุของโรคหัวใจวายชนิดไดแอสโตลิค (diastolic heart failure) ซึ่งมีอัตราการเกิดเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มขึ้นและเป็นอาการที่พบมากในวัยชรา (Schmidt *et al.*, 2004) การแสดงออกของ พาร์วัลบูมินในหัวใจหนูที่ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมิสตรี พบว่าหัวใจหนูกลุ่มที่ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำอายุ 9, 12 และ 18 เดือนมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการฝึกที่มีอายุเท่ากัน ในขณะที่กลุ่มอายุ 24 เดือนมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเข้มกว่าเล็กน้อยในกลุ่มว่ายน้ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยที่จัดระดับของการออกกำลังกายให้อยู่ในระดับหนัก เนื่องจากมีการให้หนูว่ายน้ำไปจนถึงระยะท้ายของการว่ายน้ำ โดยดูจากการที่หนูเริ่มจมน้ำ ลำตัวเริ่มตรงดิ่ง และว่ายทวนกระแสน้ำไม่ได้ และเมื่อนำหนูขึ้นมาจากน้ำ หนูจะมีลักษณะการหายใจที่หอบเหนื่อย หมดแรงและอยู่นิ่งเป็นระยะเวลาหนึ่ง

ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคเวสเทอร์น บล็อทติ้ง พบว่า หัวใจหนูกลุ่มว่ายน้ำอายุ 9, 12 และ 18 เดือนมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในขณะที่หนูอายุ 24 เดือนกลุ่มว่ายน้ำมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ผลการศึกษาโดยใช้ทั้งสองเทคนิคสามารถสรุปได้ว่า การฝึกให้ว่ายน้ำ สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้น โดยที่การกระตุ้นให้เพิ่มการแสดงออกของพาร์วัลบูมินนั้นพบว่าสัดส่วนการเพิ่มขึ้นแตกต่างกันในแต่ละช่วงอายุโดยที่อายุ 9 เดือนมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้น 1.33 เท่า, 12 เดือนมีสัดส่วนเพิ่มขึ้น 1.29 เท่า ในขณะที่ 18 เดือนมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 1.47 เท่า และการที่หัวใจหนูอายุ 18 เดือนมีสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของพาร์วัลบูมินมากกว่ากลุ่มอายุ 9 และ 12 เดือน อาจเป็นเพราะหนูอายุ 9 และ 12 เดือน มีปริมาณพาร์วัลบูมินในภาวะปกติที่ไม่ได้รับการกระตุ้นสูงอยู่แล้ว เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยการฝึกให้ว่ายน้ำจึงมีการกระตุ้นให้เพิ่มการสร้างพาร์วัลบูมินไม่มากนัก ในขณะที่หนูอายุ 18 เดือนนั้นมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินลดลง ดังนั้นจึงสามารถกระตุ้นให้สร้างพาร์วัลบูมินได้เพิ่มมากขึ้น ซึ่งกลุ่มอายุ 18 เดือน เป็นกลุ่มอายุที่มีความสำคัญเนื่องจากอาจจะนำไปใช้ในการป้องกันโรคหัวใจล้มเหลวชนิดที่มีความบกพร่องของการคลายตัวของหัวใจโดย หนูอายุ 9 เดือน ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำตั้งแต่อายุ 3 เดือน ซึ่งเป็นวัยหนุ่มสาว (young adult)

หนูอายุ 12 เดือน ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำตั้งแต่อายุ 6 เดือน ซึ่งเป็นวัยผู้ใหญ่ (adult)

หนูอายุ 18 เดือน ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำตั้งแต่อายุ 12 เดือน ซึ่งเป็นวัยกลางคน (middle age)

ส่วนหนูอายุ 24 เดือน ได้รับการฝึกให้ว่ายน้ำตั้งแต่อายุ 18 เดือน ซึ่งเป็นวัยชรา (aging)

ดังนั้นการได้ออกกำลังกายตั้งแต่วัยหนุ่มสาวไปจนถึงวัยผู้ใหญ่สามารถกระตุ้นการสร้างพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นได้ในปริมาณมากแต่การเริ่มการออกกำลังกายในวัยกลางคน สามารถ

กระตุ้นการสร้างพาร์วัลบูมินได้น้อยดังนั้นการออกกำลังกายตั้งแต่วัยเด็กหรือวัยหนุ่มสาวให้ผลดีกว่าการออกกำลังกายในวัยกลางคน

จากการศึกษาของ Michele และคณะ (2004) โดยการใช้ยีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลายของหนูถ่ายทอดไปยังกล้ามเนื้อหัวใจของหนู พบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหนูวัยหนุ่มมากกว่าในหนูวัยชรา ซึ่ง Michele และคณะ ได้อธิบายว่าอาจมีสาเหตุเนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูวัยชรา เช่น จำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจลดลงและมีการสร้างโปรตีนลดลง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุในการอธิบายการแสดงออกของพาร์วัลบูมินลดลงในหัวใจหนูวัยชรา และการที่การออกกำลังกายกระตุ้นให้มีการสร้างพาร์วัลบูมินได้น้อยในหัวใจหนูวัยชราเมื่อเทียบกับวัยอื่น ๆ ซึ่งผลการศึกษานี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ Cai และคณะ (2001) โดยการให้หนูอายุ 18 และ 24 เดือนออกกำลังกายโดยการวิ่งเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ ซึ่งการออกกำลังกายโดยการวิ่งสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลาย EDL เพิ่มขึ้นทั้งในหนูอายุ 18 และ 24 เดือน ซึ่งผลที่แตกต่างกันในหนูกลุ่มวัยชรานั้นอาจเป็นเพราะการใช้วิธีการออกกำลังกายแตกต่างกัน และเนื้อเยื่อที่มีผลในการกระตุ้นให้สร้างพาร์วัลบูมินแตกต่างกัน (กล้ามเนื้อลายมีความแตกต่างกับกล้ามเนื้อหัวใจ)

จากการศึกษาพบว่าวัยชรามีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจลดลงเช่นการหดและการคลายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจลดลงซึ่งมีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงการเป็นโรคหัวใจ แต่การออกกำลังกายมีผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจดีขึ้นโดยเฉพาะทำให้การหดตัวและการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้นซึ่งการทำให้การหดตัวและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจขึ้นนี้มีการอธิบายว่าเกิดจาก การออกกำลังกายมีผลทำให้การแสดงออกของ SR Ca^{2+}- ATPase mRNA ในหัวใจเพิ่มขึ้น การแสดงออก SR Ca^{2+}- ATPase mRNA เพิ่มขึ้นก็จะมีผลให้พลังงาน(ATP) ที่ใช้ในการนำ Ca^{2+} กลับเข้าสู่ SR ได้ดีขึ้น มีผลทำให้การคลายตัวของหัวใจดีขึ้น การเพิ่มของการแสดงออก SR Ca^{2+} - ATPase mRNA ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของการ

แสดงออกพาร์วัลบูมิน อาจเป็นเหตุผลที่นำไปใช้ในการอธิบายถึงผลของการออกกำลังกายในการทำให้การคลายตัวของหัวใจดีขึ้น ซึ่งข้อมูลนี้อาจนำไปสู่การป้องกันและรักษาโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิค ซึ่งมีความผิดปกติของการคลายตัวของหัวใจ

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

พบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูมีมากในช่วงวัยหนุ่มสาว และลดลงเมื่อมีอายุมากขึ้น โดยเฉพาะวัยชราซึ่งสัมพันธ์กับการอธิบายการเกิดความบกพร่องในการคลายตัวของหัวใจในวัยชรา ขณะที่การออกกำลังกายแบบหนักสามารถเพิ่มการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูได้โดยเฉพาะอย่างยิ่ง วัยหนุ่มสาวถึงวัยผู้ใหญ่ แต่ได้ผลเล็กน้อยในวัยกลางคนถึงวัยชราซึ่งสัมพันธ์กับการอธิบายผลของการออกกำลังกายต่อการทำงานของหัวใจดีขึ้น

ดังนั้นในการศึกษาในลำดับต่อไปจึงควรศึกษาถึงระดับของการออกกำลังกายว่าการออกกำลังกายระดับใดและระยะเวลานานเท่าไรน่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพาร์วัลบูมินมากที่สุด ซึ่งอาจนำไปสู่การออกกำลังกายที่เหมาะสมสำหรับในกลุ่มคนแต่ละวัยซึ่งมีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินแตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาดังกล่าวอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคได้

การประยุกต์ใช้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณพาร์วัลบูมินลดลงในหนูวัยสูงอายุแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจที่ลดลง สามรถนำไปสู่การอธิบายถึงการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิคในผู้สูงอายุได้ และนอกจากนี้ยังพบว่า การออกกำลังกายโดยการว่ายน้ำในระดับหนักมีผลกระตุ้นการสร้างพาร์วัลบูมินในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูในกลุ่มอายุ 9, 12 และ 18 เดือน ซึ่งพาร์วัลบูมินมีหน้าที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจโดยทำให้การ

คลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้น แต่การออกกำลังกายระดับหนักในหนูกลุ่มอายุ 24 เดือน พบว่าสามารถกระตุ้นการสร้างพาร์วัลบูมินได้น้อย การออกกำลังลังกายแบบหนักจึงไม่ส่งผลดีต่อหัวใจในกลุ่มสูงอายุแต่การออกกำลังกายแบบหนักจะส่งผลดีต่อหัวใจในวัยผู้ใหญ่และวัยกลางคน ดังนั้นการออกกำลังกายแบบหนักจึงไม่เหมาะสมกับผู้สูงอายุ

เอกสารอ้างอิง

บังอร ฉางทรัพย์. 2548. *กายวิภาคศาสตร์ 1.* จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย: กรุงเทพ.

ศุภพงษ์ อิ่มสรรพางค์, อุราพร วงศ์วัชรานนท์, วราภรณ์ พรหมวิกร และ สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์. 2006. *ความสัมพันธ์ของอายุกับการเปลี่ยนแปลงของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนู.* ภาควิชากายวิภาคศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สถิติสาธารณสุข. 2548. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ: กระทรวงสาธารณสุข.

อลิสา สุวัณณปุระ. 2545. *สรีระวิทยาเล่ม 1.*ภาควิชาสรีระวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Batista, E.C., Batista E.C., Ramalho, J.D.S., Reis., F.C.G., Barros, C.C., Moraes, M.R. Pesquero, J.L., Bacurau, R.F.P., Pesquero, J.B. and Araujo, R.C. 2008. Swimming training exacerbates pathological cardiac hypertrophy in kinin B_2 receptor-deficient mice. *Inter. Immunopharm.* 8: 271-275.

Berchtold, M.W., Brinkmeier, H. and Muntener, M. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: It's crucial role for muscle and function, plasticity and disease. *Physiol. Rev.* 80:1216-1265

Berchtold, M.W., Celio, M.R. and Heizmann C.W. 1983. Parvalbumin in non-muscle tissues of the rat. *J. Biol. Chem.* 259: 5189-5196.

Birrer, R.B. and O'conner, F.G. 2004. *Sport medicine for the primary care physician.*3 rd Ed. CRC press: Florida.

Brenner, D,A., Apstein, C.S. and Saupe, K.W. 2001. Exercise training attenuates age-associated diastolic dysfunction in rats. *Circulation.* 104: 221-226.

Bers, D.M. 2002. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* 415: 198.

Brownlee, M., Cerami, A. and Vlassara, H. 1998. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N. Engl. J. Med.* 318:1315-1321.

Celio, M.R. and Heizman, C.W. 1982. Calcium-binding protein parvalbumin as a neuronal Marker. *Nature.* 293: 300-302.

Cia, D.Q., Li M., Qin, L. and Chan, K.M. 2001. Parvalbumin expression is downregulated in rat fast-twitch skeletal muscle during aging. *Arch. Biochem. Biophy.* 387: 202-208.

Coutu, P., Hirsch, J.C., Szatkowsk, M.L. and Metzger, J.M. 2003. Targeting diastole dysfunction By genetic engineering of calcium handling protein. *Trends. Cardiovasc. Med.* 13:,63-67.

Elyse, F and Lease, K.E. 2006. New untwist on Diastole What gone around come back. Circulation. 113: 2477-2479.

Endo, T., Takazawa, K. and Onaya, T. 1985. Parvalbumin exists in rat endocrine glands. *Endocrinology. 117: 527-531.*

Eugene, B. 1992. *Heart disease.*4th Ed. W.B. Saunders Company: Philadelphia.

Evangelista, F.S., Brum, P.C. and Krieger, J.E. 2003. Duration-controlled swimming

exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz. J. Med. Bio. Res.* 36: 1751-1759.

Fleg, J.L., Schulman, S.P. and Gerstenblith, G. 1993. Additive effects of age and silent myocardial ischemia on the left ventricular response to upright cycle exercise. *J. Appl. Physiol.* 75: 499.

Freimann, S., Scheinowitz, M., Yekutieli, D., Feinberg, M.S., Eldar, M. and Icekson, G.K. 2005. Prior exercise training improves the outcome of acute myocardial infarction in the rat. *JACC.* 45: 931-938.

Frochlich, J.P., Lakatta, E.G. and Beard, E. 1978. Studies of sarcoplasmic reticulum function and contraction duration in young and aged rat myocardium. *J. Mol. Cell.Cardiol.* 10: 427-438.

Gartner, L.P. and Hiatt, J.L. 2007. *Color Textbook of Histology.* 3rd Ed. W.B. Saunders Company. ST. Louis.

Geenen, D., Buttrick, P. and Scheuer, J. 1988. Cardiovascular and hormonal responses to swimming and running in the rat. *J. App. Physiol.* 65: 116-123.

Gerstenblith G., Frederiksen J. and Yin FCP. 1997. Echocardiographic assessment of a normal adult aging population. *Circulation.* 56: 273-278.

Gunduz, F., Senturk, U.K., Aktekin, B. and Aktekin, M.R. 2004. The effect of one year's swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. *Physiol. Res.* 53: 171-176.

Haney, S., Sur, D. and Xu, Z. 2005. Diastolic heart failure: A review and primary care perspective. *J. Am. Board. Fam. Pract.* 18: 189-198.

Heizmann, C.W., Berchtold, M.W. and Rowlerson, A.M. 1982. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 7243-7247

Inaguma, Y., Kurobe, N., Shinohara, H. and Kata, K. 1991. Sensitive immunoassay for rat parvalbumin: tissue distribution and developmental change. *Biochem. Biophy. Acta.* 1075: 68-74

Jiang, M.T. and Narayonon, N. 1990. Effects of aging on phospholambar phosphorelation and calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mech Aging Dev.* 54: 87-101.

Kitzman, D.W., Gardin, J.M. and Gottdiener, J.S. 2001. Importance of heart failure with preserved systolic function in patients $\geq$65 years of age: CHS Research Group: Cardiovascular Health Study. *Am. J. Cardiol.* 87: 413-419.

Krestsinger, R.H. 1980. Structure and evaluation of calcium-modulated protein. *C.R.C. Crit. Rev. Biochem.* 8: 119-174.

Kretsinger, R.H. and Nockolds, C.E.1973. *J. Biol. Chem.* 248: 3313-3326.

Levy, WC, Cerqueira, MD, Abrass, IB, Schwartz, RS and Stratton, JR. 1993. Endurance exercise training augments diastolic filling at rest and during exercise in healthy young and older men. *Circulation.* 88: 116-126.

Lewimter, M.M. and Osal, G. 2004. *The Heart.* 11th Ed. Magraw-hill: New york.

Lin, J., Lopez, E.F., Jin Y., Remmen, V.H., Bauch, T., Han, H.C., and Lindsay, M.L. 2008. Age-related cardiac muscle sarcopenia: Combining experimental and mathematical modeling to identify mechanisms. *Exper. Gerontol.* 43, 296-306.

Maughan, D.W. and Godt, R.E., 1999. Parvalbumin concentration and diffusion coefficient in frog myoplasm. *J.Muscle Res. Cell Motil.* 20: 199-209.

Matsumoto, K., Ishinara, K., Tanak, K., Inoue, K. and Fushiki, T. 1996. An adjustable-current swimming pool for the evaluation of endurance capacity of mice. *J. Appl. Physiol.* 81(4): 1843-1849.

Macmullen, J.R. and Jinnings, G.L. 2007. Differences between pathological and physiological cardiac hypertrophy: Novel therapeutic strategies to treat heart failure. *Cli. Exp. Pharm. Physiol.* 34: 255-262.

Meerson, F.Z., Javich, M.P. and Lerman, M.I. 1978. Decrease in the rate of RNA and protein synthesis and degradation in the myocardium under long-term compensatory hyperfunction and on aging. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 10: 145-159.

Meinrad, B., Doris, W., Jonathan, M., Sandstede, J., Kostler, H., Hahn, D., Neubauer, S., and Dubach P. 2008. Effects of Exercise Training on Myocardial Energy Metabolism a and Ventricular Function Assessed by Quantitative Phosphorus-31 Magnetic Resonance Spectroscopy and Magnetic Resonance Imaging in Dilated Cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 51: 1883-1890.

Michael, W. and Rich. 2005. *Cardiovascular Disease in the Elderly*. Humana: New Jersey.

Michele, D.E., Szatkowski, M.L., Aibayya, F.P. and Metzger, J.M. 2004. Parvalbumin gene delivery improves diastolic function in the aged myocardium in vivo. *Molecular Therapy.*10: 399-403.

Morgan and J.P. 1991. Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 325: 625-632.

Nakayama, S., Moncrief, N. and Kretsinger, R. 1992. *J. Mol. Evol.* 34: 416-448

Omahony, M., Sinead, M.F., Victor, S., Shu, F.H., John A.S., Maurice, B. and Michale, B. 2003. Diastolic heart failure in older people. *Age and Ageing.* 32:519-524.

Pauls, T.L. 1996. *In guidebook to the calcium binding proteins (Celio, M., Ed).* Oxford University Press: Oxford. U.K.

Pluim, B.M., Zwinderman, A.H., Van der Laarse, A., Van der Wall, E.E. 2000. The athlete,s heart: A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* 101: 397-412.

Schaub, M.C. and Heizmann , C.W., 2007. Calcium,troponin, calmodulin, S100 proteins: From myocardial basics to new therapeutic strategies. *Biochem. Biophysicl. Res. Commu.* 369, 247-264.

Schmidt, U., Zhu, X., Lebeche, D., Hug, F., Guerrero, J.L. and Hajjar, R.J. 2004. In vivo gene transfer of parvalbumin improves diastolic function in aged rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 66:318-323.

Scuderi, R.G. Mccann, D.P., Bruno, J.P. 1997. *Sport medicine principle of primary care.* Mosby: Missouri.

Seidman, J.G. and Seidman, C. 2001. The genetic basis for cardiomyopathy: From mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell.* 104: 557-567.

Senior, K. 2001. Heart failure:running to the rescue. *DDT.* 6: 275-276.

Senni, M. and Redfield, M.M. 2001. Heart failure with preserved systolic function: A different natural history. *J. Am. Coll. Cardio.* 38: 1277-1282.

Sherwood, L., klandorf, H. and Yancey, P.H. 2005. *Animal physiology from Genes to Organisms.* Brooks/cole: USA.

Siogren, A.I. 1972. Left ventricular wall thickness in patients with Circulatory overload of the left ventricle. *Ann. Clin. Res.* 4: 310-318.

Stuhlfauth, I., Reininghaus, J., Jockusch, H. and Heizmann, C.W. 1984. Calcium-biding protein, parvalbumin, is reduced in mutant mammalian muscle with abnormal contractile Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4814-4818.

Uchida, K., Nomura, Y., Kadowaki, M., Takase, H., Takano, K. and Takeeuchi, N. 1978. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J. Lip. Res.* 19: 544-552.

Vasan, R.S., Larson, M.G., Benjamin, E.J., Evans, J.C., Reiss, C.K. and Levy, D. 1999. Congestive heart failure in subjects with normal versus reduced left ventricular ejection fraction:prevakence and mortality in a population-based conort. *J. Am. Coll.Cardial.* 33: 1948-1955.

Vongvatcharanon, U. and Vongvatcharanon, S. 2003. Localization of parvalbumin calcium binding protein in the rat heart. *Science Asia.* 29: 319-325.

Vongvatcharanon, U., Imsonpang, S., Promwikorn, W. and Vongvatcharanon, S. 2006. Up-regulation of parvalbumin expression in newborn and adult rat heart. *Acta Histochemica.* 108: 447-454.

Wahr, P.A., Michele, D.E. and Metzger, J.M. 1999. Parvalbumin gene transfer corrects diastolic dysfunction in diseased cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (21): 11982-11985.

Weisfeldt, M.L. 1975. Function of cardiac muscle in aging rat. *Adv. Ec.p Med. Biol.* 61: 95-118.

Weisfeldt, M. 1998. Aging changes in the cardiovascular system, and responses to stress. *Am J Hypertens.* 11: 415-455.

Wisloff, U., Loennechena, J.P., Falcka, G., Belsvaga, V., Currieb, S., Smithb, G. and Ellingsen, O. 2001. Increased contractility and calcium sensitivity in cardiac myocytes isolated from endurance trained rats. *Euro .Soci. Cardiol.* 50: 495-508.

Wong, W.F., Gold, S., Fukuyama, O. and Blanchette, P.L. 1981. Diastolic dysfunction in elderly patients with congestive heart failure. *Am. J. Cardiol.* 63: 1526-1528.

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยและทดสอบความแตกต่างของการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน

ในหัวใจหนูของกลุ่มควบคุมเทียบกับกลุ่มว่ายน้ำในแต่ละกลุ่มอายุ

			t-test			t-test			t-test			t-test
	cont 9 m.	ex 9 m		cont 12 m	ex 12 m		cont 18 m	ex 18 m		cont 24 m	ex 24 m	
	47.51	77.29	**0.022**	48.06	75.01	**0.016**	33.89	78.5	**0.003**	48.79	36.11	**0.157**
	82.97	84.41		70.14	70.34		56.62	51.26		52.01	44.98	
	61.15	93.56		60.02	85.28		46.22	76.46		43.09	54.07	
	45.75	85.84		88.95	102.6		43.64	102.16		44.04	53.01	
	74.38	74.9		71.22	104.1		64.88	101.69		40.46	61.42	
Mean	**62.35**	**83.20**		**67.68**	**87.46**		**49.05**	**82.01**		**45.68**	**49.92**	
SD	**16.33**	**7.41**		**15.12**	**15.47**		**11.99**	**21.11**		**4.65**	**9.67**	

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนู

Descriptives

PV

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
9	5	62.3520	16.33348	7.30456	42.0713	82.6327	45.75	82.97
12	5	67.6780	15.12131	6.76246	48.9024	86.4536	48.06	88.95
18	5	49.0500	11.98954	5.36189	34.1630	63.9370	33.89	64.88
24	5	45.6780	4.64723	2.07831	39.9077	51.4483	40.46	52.01
Total	20	56.1895	15.04425	3.36400	49.1486	63.2304	33.89	88.95

ตารางที่ 3 แสดงการทดสอบความแตกต่างของการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละกลุ่มอายุ

ANOVA

PV

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1657.131	3	552.377	3.344	.046
Within Groups	2643.130	16	165.196		
Total	4300.261	19			

ตารางที่ 4 แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละกลุ่มอายุ

Multiple Comparisons

Dependent Variable: PV

LSD

(I) gr	(J) gr	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
9	12	-5.32600	8.12885	.522	-22.5584	11.9064
	18	13.30200	8.12885	.121	-3.9304	30.5344
	24	16.67400	8.12885	.057	-.5584	33.9064
12	9	5.32600	8.12885	.522	-11.9064	22.5584
	18	18.62800*	8.12885	.036	1.3956	35.8604
	24	22.00000*	8.12885	.016	4.7676	39.2324
18	9	-13.30200	8.12885	.121	-30.5344	3.9304
	12	-18.62800*	8.12885	.036	-35.8604	-1.3956
	24	3.37200	8.12885	.684	-13.8604	20.6044
24	9	-16.67400	8.12885	.057	-33.9064	.5584
	12	-22.00000*	8.12885	.016	-39.2324	-4.7676
	18	-3.37200	8.12885	.684	-20.6044	13.8604

*. The mean difference is significant at the .05 level.

การเตรียมสารสำหรับ Western blot

1.การเตรียมสารสำหรับการเตรียมตัวอย่าง

1.1. Lysis buffer (1ml)

0.1M Sodium pyrophosphate	400	µl
0.5 M Na Fluoride	100	µl
Sodium deoxycholate	0.01	g
1 M Tris pH 8.0	20	µl
0.5 M EGTA	20	µl
Triton X-100	10	µl
100 mM PMSF	10	µl
1M Magnesium chloride	5	µl
0.1M Sodium vanadate	1	µl
De -ionized water	430	µl
Leupeptin	2	µl
Apotinin	10	µl

1.2. 1 M Tris pH 8.0

Tris	60.57	g

ผสม 300 ml de -ionized water ,แล้วปรับ pH = 8.0 ด้วย HCl แล้วจึงเติมน้ำให้ได้ปริมาตร 500 ml

1.3. 0.1 M Na pyrophosphate

Na pyrophosphate	5.318	g
เติม de -ionized ให้ได้ปริมาตร	200	ml

1.4. 0.5 M Na Fluoride

Na Fluoride	2.099	g

เติม de -ionized water ให้ได้ปริมาตร 100 ml แล้ว Steriled ด้วย autoclave

1.5. 0.5 M EGTA

EGTA	3.804	g

เติม de -ionized water ให้ได้ปริมาตร 20 ml แล้วปรับ pH = 8.5

1.6. 100 mM PMSF

PMSF	0.174	g
เติม Isopropanol ให้ได้ปริมาตร	10	ml

2. การเตรียมสารสำหรับหยอดตัวอย่าง

Laemmli Sample Buffer

Laemmli Sample Buffer	950	µl
β-mercaptoethanol	50	µl

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้นแล้วนำไปให้ความร้อน 100 °C นาน10 นาที

3. การเตรียมสารสำหรับการทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

3.1. 4% Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel

Tris (HCL) pH 6.8	1.008	ml
Acrylamide	528	µl
10% SDS solution	40	µl
10% Ammonium persulphate	50	µl
TEMED	10	µl
De -ionized water	2.36	ml

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้นแล้วเจลโพริเมอร์ไรด์เซชั่น 1 ชั่วโมง

3.2. 4% Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel

Tris (HCL) pH 8.8	2.5	ml
Acrylamide	4	ml
10% SDS solution	100	µl
10% Ammonium persulphate	100	µl
TEMED	4	µl
De -ionized water	3.28	ml

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้นแล้วเจลโพริเมอร์ไรด์เซชั่น 30 นาที

3.3. 1 X SDS electrophoresis buffer

Tris- base	3.02	g
Glycine	18.80	g
SDS	1	g
เติม distilled water ให้ได้ปริมาตร	1000	ml

3.4. 1.5 M Tris- HCl pH 8.8

Tris-base	27.23	g

เติม de -ionized water 80 ml แล้วปรับ pH= 8.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 150 ml

3.5. 0.5 M Tris –HCl pH 6.8

Tris –base	6	g

เติม de -ionized water 60 ml แล้วปรับ pH= 6.8 ด้วย HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

4. การเตรียมสารสำหรับการย้อมเจล

4.1. 0.1% Coomissie Blue R 250 Straining solution

Coomissie Blue R 250	1	g
Methanol	400	ml
Acetic acid	100	ml
De -ionized water	500	ml

เตรียมสารเคมีตามปริมารข้างต้น

4.2. Destraining solution

Methanol	400	ml
Acetic acid	100	ml
De -ionized water	500	ml

เตรียมสารเคมีตามปริมารข้างต้น

5.การเตรียมสารสำหรับการทำบล็อทติ้ง

5.1. Transfer buffer

Tris	3.03	g
Glycine	14.4	g
Methanol	200	ml
เติม distilled water ให้ได้ปริมาตร	1000	ml

5.2. TBST buffer (Tris buffer saline with tween 20)

5 M NaCl	30	ml
1M Tris pH 8.0	10	ml
Tween -20	1	ml
เติม de -ionized ให้ได้ปริมาตร	1000	ml

5.3. TBS buffer (Tris buffer saline)

5 M NaCl	30	ml
1M Tris pH 8.0	10	ml
เติม de -ionized water ให้ได้ปริมาตร	1000	ml

5.4. 5 M NaCl

NaCl 292.2 g

เติม de -ionized water ให้ได้ปีริมาตร 1000 ml

5.5. 1 M Tris pH 8.0

Tris 60.57 g

เติม de -ionized water 300 ml แล้วปรับ pH= 8.0 fh;p HCl แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 500 ml

การเตรียมสารสำหรับ Immunohistochemistry

1. 0.1M Tris-Phosphate buffer

Tris	25	g
$Na_2HPO_4 2H_2O$	6	g
$Na_2H_2PO_4 2H_2O$	1.25	g
NaCl	35	g
Adjust pH to 7.6		
เติม distilled water ให้ได้ปริมาตร	1000	ml

2. 0.1M Tris-phosphate buffer containing 0.3% Triton X-100

0.1M Tris-phosphate buffer	300	ml
Triton X-100	900	µl

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น

3. TESPA-coated slide

70% Alcohol	500	ml
Dry Acetone	500	ml
Tespa	2	ml
distilled water	750	ml

วิธีการเตรียม

แช่แผ่นสไลด์ใน 70% Alcohol นาน 2 ชั่วโมงแล้วนำมาเช็ดให้สะอาด หลังจากนั้นนำไปอบให้แห้ง 30 นาที นำสไลด์แช่ใน Dry Acetone 30 วินาที 2 ครั้งแล้วจึงนำไปแช่น้ำกลั่น 30 วินาที 2 ครั้ง แล้วนำไปอบให้แห้ง 12-15 ชั่วโมง

การเตรียมสารสำหรับ Masson's trichrome

1. 0.4% aniline blue

aniline blue	4.0	g.
acetic acid	80.0	ml.
น้ำกลั่น	1000.0	ml.

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้นแล้วนำสารละลายสีที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเติม acetic acid ปริมาตร 80 ml. ลงไป ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

2. Mixture solution

1% acid fuchsin	9.0	ml.
2% orange G	9.0	ml.
1% ponceau xylidine red	27.0	ml.
acetic acid	9.0	ml.
น้ำกลั่น	180.0	ml.

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้น

3. 0.6% phosphotungstic acid

phosphotungstic acid	6.0	g.
น้ำกลั่น	1000.0	ml.

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้น

4. 2.5% phosphotungstic acid

phosphotungstic acid	25.0	g.
น้ำกลั่น 1000.0 ml.		

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้น

5. 5% potassium dichromate

potassium dichromate	50.0	g.
น้ำกลั่น	1000.0	ml.

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้น

6. 1% acetic acid

acetic acid	10.0	ml.
น้ำกลั่น	1000.0	ml.

เตรียมสารตามปริมาณข้างต้น

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวกาญจนา ครชาตรี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 4822006

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
พยาบาลศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2547