

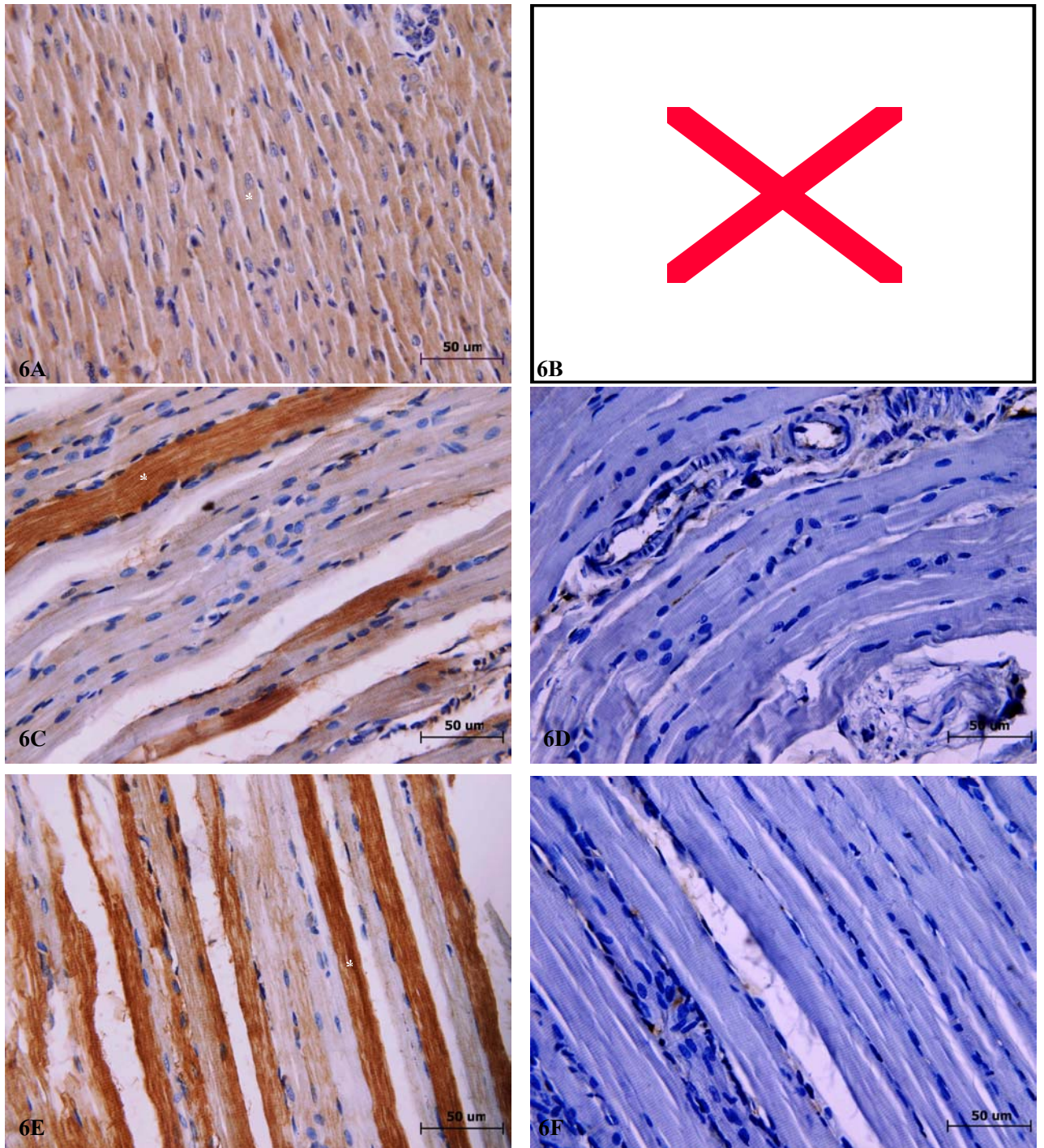
บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การยืนยันการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจโดยใช้ 2 เทคนิค

1.1 การชี้แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลายทั้ง 2 ชนิด ในหนูอายุ 6 สัปดาห์ โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสเทรี

จากการศึกษา พบปฏิกิริยาอิมมูโน (immunoreactivity) ของพาร์วัลบูมินในไฮโดรทาลัสซิมของกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ กล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อโซเลียสและกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิทิทอรัมลองกัซ และพบว่ากล้ามเนื้อหัวใจมีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมิน ต่างจากกล้ามเนื้อลาย โดยที่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจทุกเซลล์มีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินเท่า ๆ กัน (รูปที่ 6A) ในขณะที่เซลล์กล้ามเนื้อโซเลียสและกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิทิทอรัมลองกัซ บางเซลล์พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินมาก บางเซลล์พบน้อย และยังพบว่ากล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิทิทอรัม-ลองกัซมีเซลล์ที่พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินมากเป็นจำนวนมากกว่ากล้ามเนื้อโซเลียส (รูปที่ 6C และ 6E) และไม่พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) (รูปที่ 6B, 6D และ 6F)



รูปที่ 6 A, C และ E แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมิน (สีน้ำตาล, *) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ, เซลล์กล้ามเนื้อโซเลียสและเซลล์กล้ามเนื้อเอกแทนเซอร์ดิจิตอรัม-ลองกัสดตามลำดับ และ B, D และ F แสดงกลุ่มควบคุมเชิงลบ

1.2 การชี้แสดงพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลายทั้ง 2 ชนิด ในหนูอายุ 6

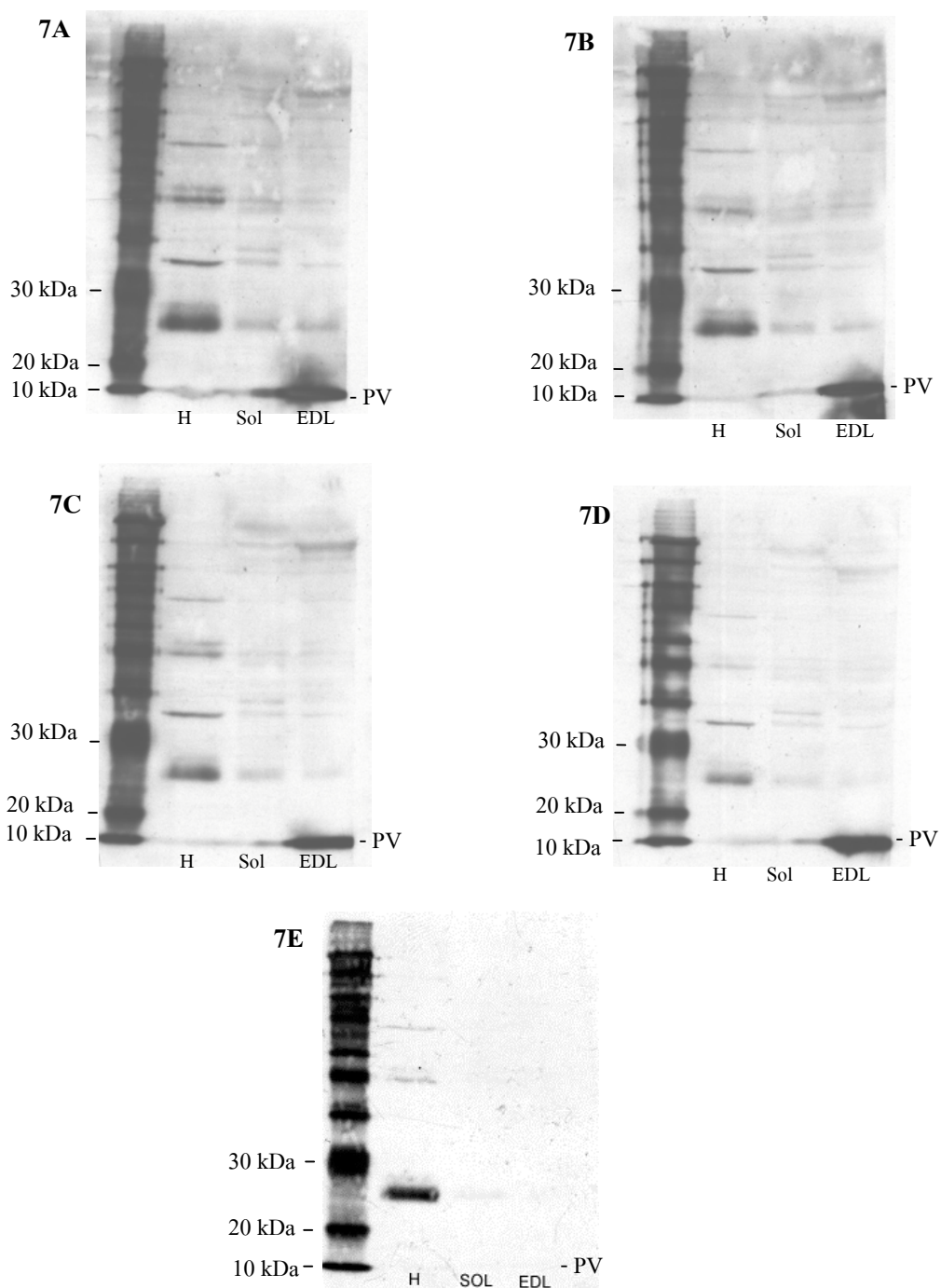
สัปดาห์ โดยเทคนิคเวสเทอร์นบล็อตติง

การศึกษาเริ่มจากการหาสภาวะที่เหมาะสมของเทคนิคเวสเทอร์นบล็อตติง โดยทำการศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจซึ่งเป็นกล้ามเนื้อประเภทหดตัวช้า (slow-twitch) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเชิงบวก (positive control) คือกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์- ดีจิตอรูมลงกัชและกล้ามเนื้อโซเลียส ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อประเภทหดตัวเร็ว (fast-twitch) และหดตัวช้า (slow-twitch) ตามลำดับ การทดลองแบ่งเป็นสองชุด ชุดแรกเป็นการทดลองปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่ง (primary antibody) และชุดที่สองเป็นการปรับความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่สอง (secondary antibody) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

การทดลองปรับความเข้มข้นของพาร์วัลบูมินแอนติบอดี (anti-parvalbumin antibody; primary antibody) ทำโดยใช้ความเข้มข้นที่ 1:250, 1:500 และ 1:1,000 และใช้ แอนติ-เมาส์ไอจีจี แอนติบอดีเฮทอาร์พี (anti-mouse IgG, HRP linked antibody; secondary antibody) ที่ความเข้มข้น 1:1,000 พบว่าที่ความเข้มข้น 1:250 และ 1:500 ความทึบของพื้นหลัง (background) เข้มและจำนวนโปรตีนที่ไม่ต้องการ (non specific protein bands) มากเกินไป ในขณะที่ความเข้มข้น 1:1,000 พบว่าความทึบของพื้นหลังจาง และจำนวนโปรตีนที่ไม่ต้องการมีจำนวนลดลง และการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดยังคงชัดเจน ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ 1:1,000 หลังจากนั้นจึงทำการทดลองปรับความเข้มข้นของแอนติ-เมาส์ไอจีจี แอนติบอดีเฮทอาร์พี (แอนติบอดีตัวที่สอง) เพื่อหาสัดส่วนที่เหมาะสมระหว่างแอนติบอดีตัวที่หนึ่งและแอนติบอดีตัวที่สองที่จะทำให้ลดความทึบของพื้นหลังและโปรตีนที่ไม่ต้องการ โดยใช้แอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ความเข้มข้น 1:1,000 และใช้แอนติบอดีตัวที่สองเข้มข้น 1:2,000, 1:3,000, 1:4,000 และ 1:5,000 พบว่าการใช้ความเข้มข้นของแอนติบอดีตัวที่สอง 1:2,000, 1:3,000 และ 1:4,000 นั้น ความทึบของพื้นหลังและจำนวนโปรตีนที่ไม่ต้องการยังคงเข้ม การใช้ความเข้มข้น 1:5,000 ทำให้ความทึบของพื้นหลัง จางลงและจำนวนโปรตีนที่ไม่ต้องการลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในขณะที่การแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิดยังคงสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน

นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อโซเลียสใกล้เคียงกัน แต่ปริมาณการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์-ดิจิตอรูมลงกัช มีมากกว่ากล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อโซเลียส

ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมที่สุดในการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมิน ด้วยวิธีเวสเทอร์นบลอตติง คือใช้ความเข้มข้นของพาร์วัลบูมินแอนติบอดี 1:1,000 และใช้ความเข้มข้นแอนติเมาส์ไอจีจี แอนติบอดีเฮทอาร์พีที่ความเข้มข้น 1:5,000 กับ โปรตีนปริมาณ 10 μg ซึ่งจะใช้ในการศึกษาการแสดงออกโปรตีนพาร์วัลบูมิน ในกล้ามเนื้อหัวใจของแต่ละกลุ่มอายุต่อไป



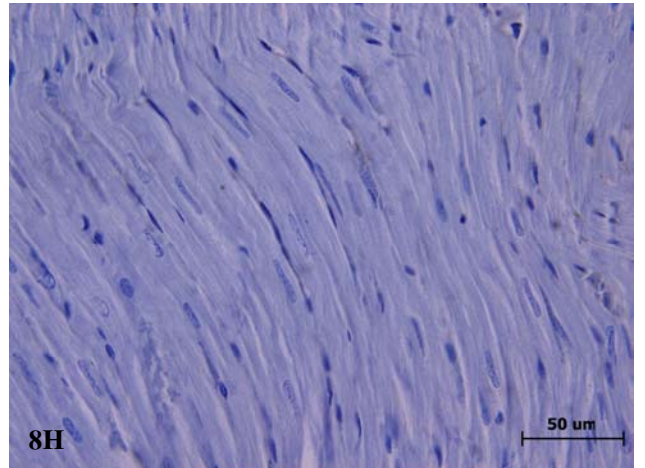
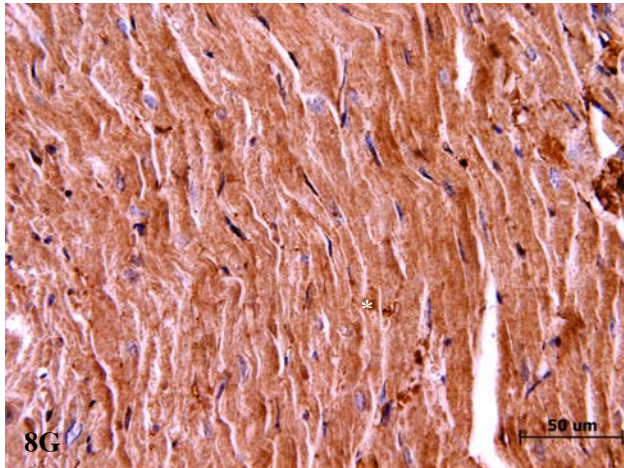
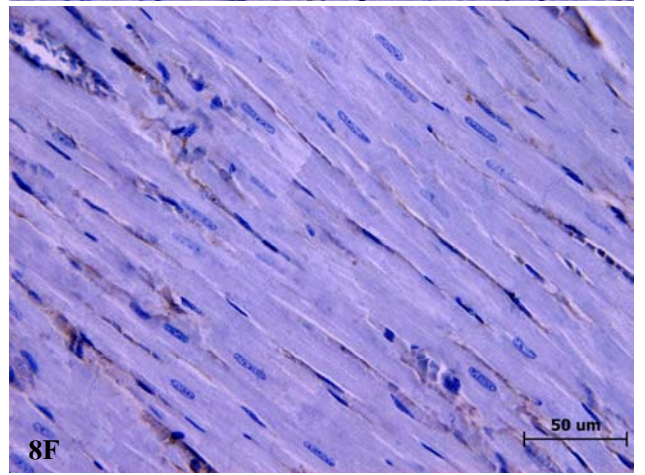
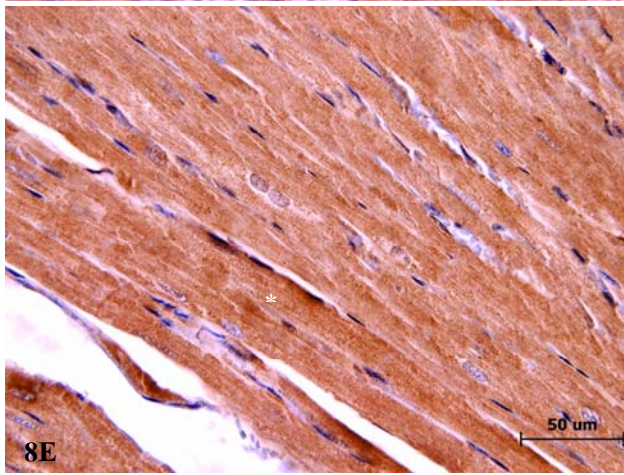
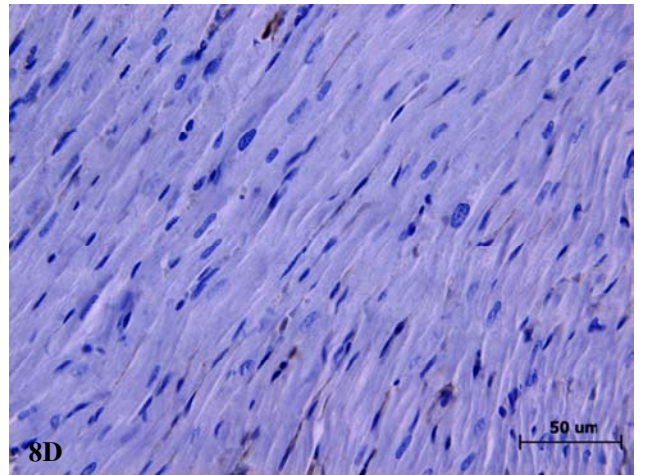
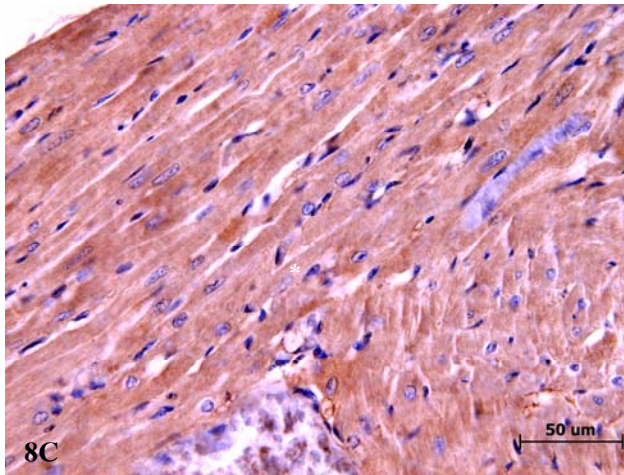
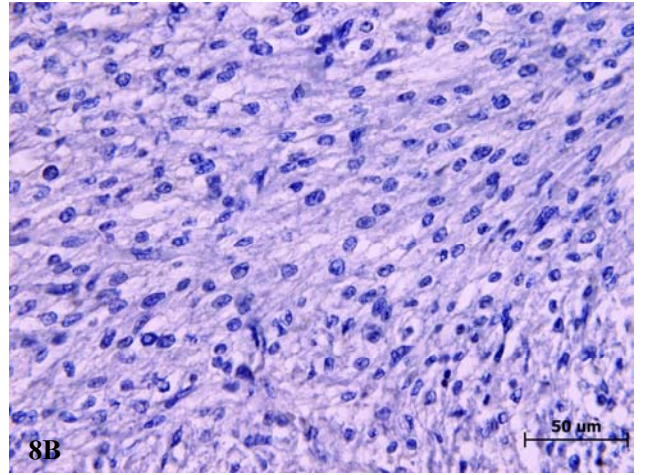
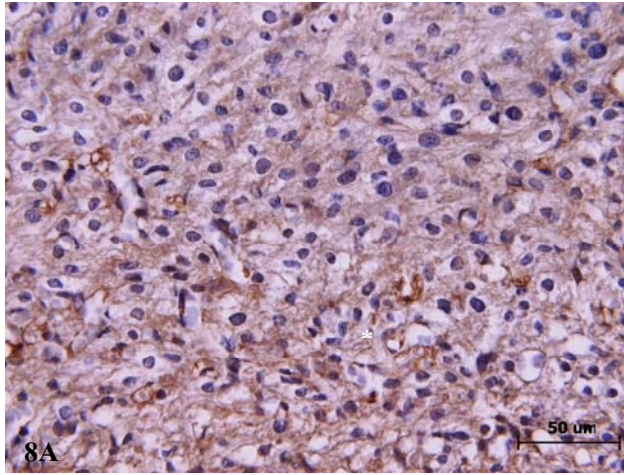
รูปที่ 7 ภาพถ่ายฟิล์มเอ็กซ์เรย์แสดงการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน (PV) ในกล้ามเนื้อหัวใจ (H) กล้ามเนื้อโซเลียส (Sol) และกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์ดิจิตอรูมลงอกซ์ (extensor digitorum lungus, EDL) โดย และรูป A, B, C, และ D แสดงแอนติบอดีตัวที่สองที่ความเข้มข้น 1:2,000, 1:3,000, 1:4,000 และ 1:5,000 รูป E แสดงตัวควบคุมเชิงลบ

2. การศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูอายุต่าง ๆ

2.1 การเปรียบเทียบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูอายุ

ต่าง ๆ โดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

จากการศึกษาพบว่า ลักษณะเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจในหนูอายุแรกเกิด เซลล์กล้ามเนื้อยังเจริญและพัฒนายังไม่สมบูรณ์เต็มที่ เซลล์กล้ามเนื้อมีรูปร่างคล้ายกระสวย มีนิวเคลียสเป็นรูปไข่อยู่กลางเซลล์ ไซโตพลาสซึมใส ส่วนกลุ่มอายุ 3 เดือน, 6 เดือน และ 12 เดือน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีพัฒนาการที่สมบูรณ์ นิวเคลียสยาวรี อยู่บริเวณกลางเซลล์ เซลล์มีรูปเป็นทรงกระบอกและมีการแตกแขนง และพบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในไซโตพลาสซึมของกล้ามเนื้อหัวใจในทุกช่วงอายุ โดยอายุแรกเกิดพบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินกระจาย ไม่สม่ำเสมอภายในไซโตพลาสซึม โดยบางเซลล์กล้ามเนื้อมีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินมาก บางเซลล์น้อย (รูปที่ 8A) และในขณะที่อายุ 3 เดือน, 6 เดือน และ 12 เดือน พบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินเข้มสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตพลาสซึมและมากขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น (รูปที่ 8C, 8E และ 8G) และไม่พบปฏิกิริยาอิมมูโนของ พาร์วัลบูมิน ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 8B, 8D, 8F และ 8H)

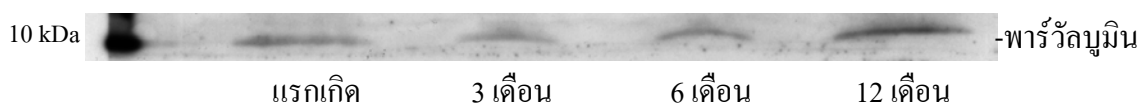


รูปที่ 8 A, C, E และ G แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลลูมิน (สีน้ำตาล, *) ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอายุแรกเกิด, 3 เดือน, 6 เดือนและ 12 เดือน ตามลำดับ และ B, D, F และ H แสดงกลุ่มควบคุมเชิงลบ

2.2 การเปรียบเทียบการแสดงออกของพาร์วัลลูมินในกล้ามเนื้อหัวใจของหนูอายุต่าง ๆ โดยเทคนิคเวสเทอร์บล็อตติง

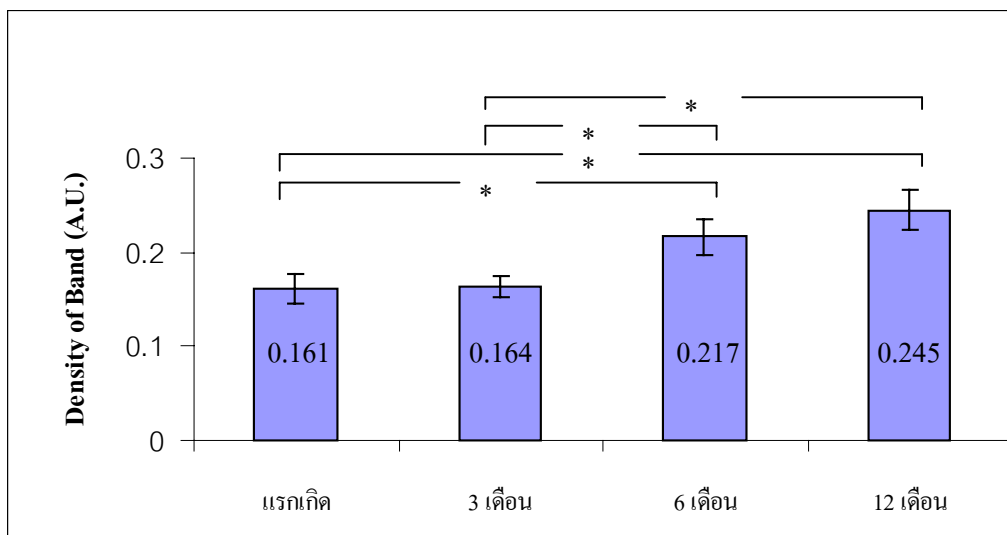
พบการแสดงออกของพาร์วัลลูมินในทุกกลุ่มอายุ ตั้งแต่แรกเกิดไปจนถึง 12 เดือน (รูปที่ 9) จากการวิเคราะห์การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแถบพาร์วัลลูมินในแต่ละอายุโดย one-way ANOVA พบว่าอายุเป็นตัวแปรที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของพาร์วัลลูมิน ($P < 0.05$) เมื่อนำค่าเฉลี่ยของแถบโปรตีนพาร์วัลลูมินในแต่ละอายุมาเปรียบเทียบโดยใช้ least significant difference พบว่ากลุ่มอายุ 3 เดือนมีการแสดงออกของพาร์วัลลูมินเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับอายุแรกเกิด และเพิ่มขึ้นอย่างไม่มีนัยสำคัญ การแสดงออกของพาร์วัลลูมินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน หัวใจหนูอายุ 6 เดือน และ 12 เดือน ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอายุแรกเกิดและ 3 เดือน (รูปที่ 10)

จากการเปรียบเทียบสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของพาร์วัลลูมินในกลุ่มอายุต่าง ๆ พบว่ากลุ่มอายุ 3 เดือน มีการแสดงออกของพาร์วัลลูมินเพิ่มขึ้นเป็น 1.02 เท่า กลุ่มอายุ 6 เดือน เพิ่มขึ้นเป็น 1.35 เท่า และกลุ่มอายุ 12 เดือน เพิ่มขึ้นเป็น 1.52 เท่า ของกลุ่มอายุแรกเกิด (รูปที่ 11)



รูปที่ 9 ภาพถ่ายฟิล์มเอ็กซ์เรย์แสดงการแสดงออกของพาร์วัลลูมินในหัวใจหนูอายุต่าง ๆ (แสดงเฉพาะแถบโปรตีนพาร์วัลลูมินเท่านั้น)

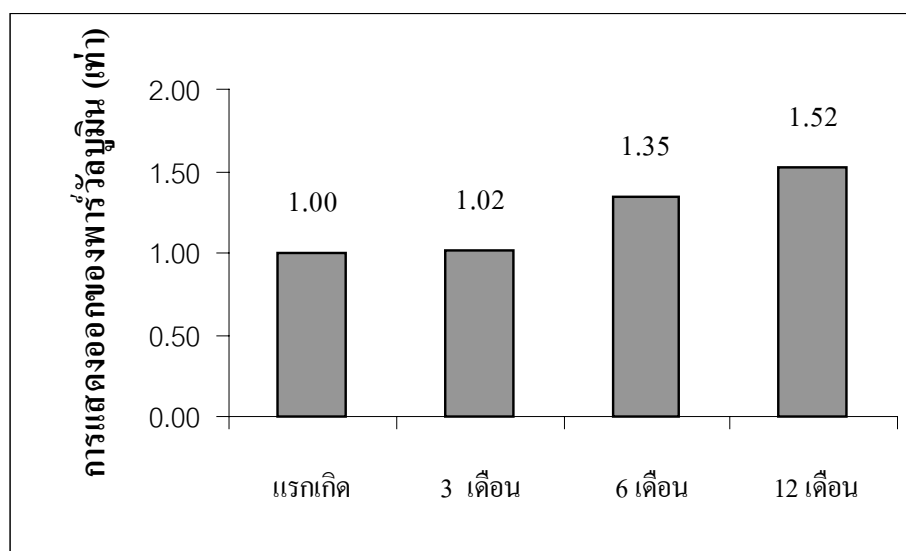
การเปรียบเทียบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละอายุ



รูปที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของแถบ โปรตีนพาร์วัลบูมินในแต่ละอายุ

* แสดงการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของพาร์วัลบูมินอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

สัดส่วนการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในแต่ละอายุ



รูปที่ 11 แสดงสัดส่วนการเพิ่มของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูอายุต่าง ๆ เมื่อเทียบกับกลุ่ม

แรกเกิด