

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาของ Celio และ Heizmann (1982) โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี และใช้พาร์วัลบูมินแอนติบอดีความเข้มข้นตั้งแต่ 1: 5,000 ไปจนถึง 1: 30,000 แล้วรายงานว่าไม่พบ พาร์วัลบูมินในหัวใจนั้น แต่จากการศึกษาของ Vongvatcharanon และ Vongvatcharanon (2003) โดยใช้เทคนิคเดียวกัน แต่ใช้พาร์วัลบูมินแอนติบอดีที่มีความเข้มข้นมากกว่า (1:2,000) รายงานการพบพาร์วัลบูมินภายในหัวใจ ผลการศึกษาครั้งนี้ใช้ 2 เทคนิค ได้แก่ เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีและเทคนิคเวสเทอร์นบลอตติงและใช้พาร์วัลบูมินแอนติบอดีความเข้มข้น 1:1,000 ยืนยันการพบพาร์วัลบูมิน ภายในหัวใจ

จากคุณสมบัติของพาร์วัลบูมินในการเป็นปัจจัยในการคลายตัว (relaxing factor) ในกล้ามเนื้อลาย และจากความเชื่อในอดีตที่คิดว่าไม่มีพาร์วัลบูมินภายในหัวใจ จึงนำไปสู่แนวคิดที่จะใช้พาร์วัลบูมินในการรักษาผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไคเอสโตลิก จึงได้มีการศึกษาโดยนำพาร์วัลบูมินของกล้ามเนื้อลายถ่ายทอดไปสู่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ผลการศึกษาพบว่าสามารถแก้ไขปัญหาการคลายตัว (Wahr *et al.*, 1999) และเพิ่มอัตราการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจที่มีการคลายตัวที่ผิดปกติ (Szatkowski *et al.*, 2000) ตลอดจนทำให้การคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจหนูกุ่มที่มีอายุมากขึ้น (Michele *et al.*, 2004) จึงทำให้เชื่อว่าพาร์วัลบูมินน่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการคลายตัวของหัวใจเช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อลาย โดย Coutu และคณะ (2003) ได้อธิบาย กลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในการช่วยให้เกิดการคลายตัวภายในกล้ามเนื้อหัวใจไว้ดังนี้

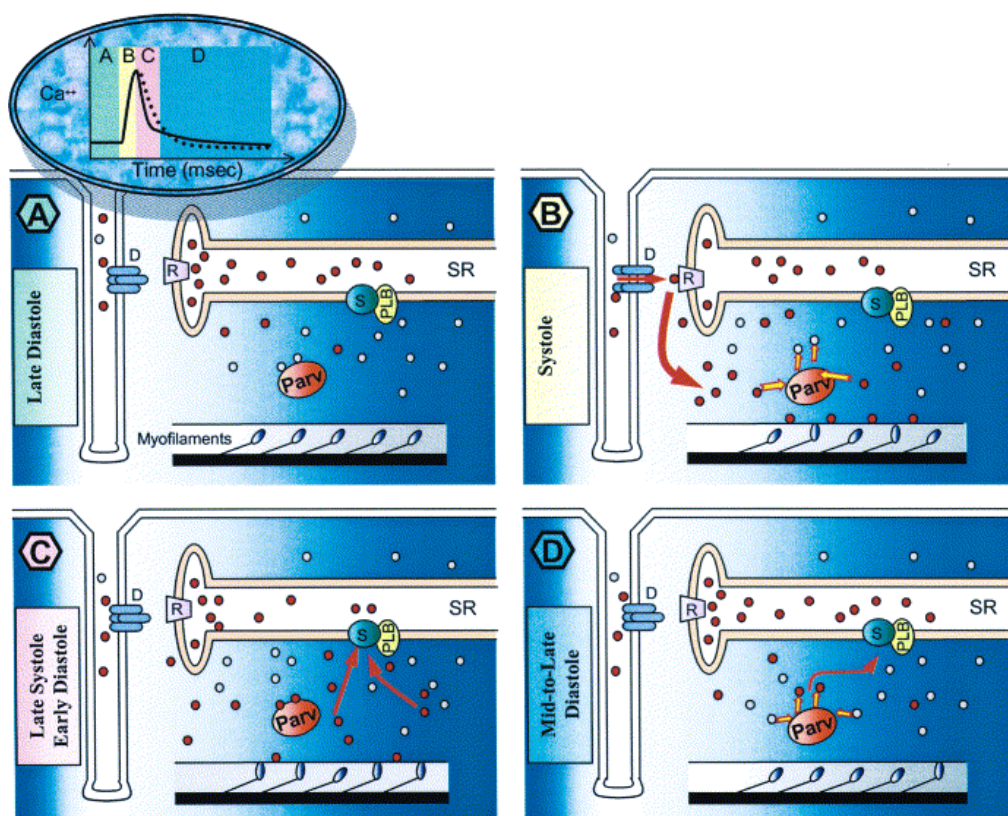
ระยะที่ 1 เป็นระยะท้ายในการคลายตัวของหัวใจ (late diastole) ในระยะนี้ความเข้มข้นของแคลเซียมภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์อยู่ในระดับต่ำ (~10-100 nM) ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมสูง (~1 mM) ในระยะนี้พาร์วัลบูมินจะจับกับแมกนีเซียม (รูปที่ 12 A)

ระยะที่ 2 เป็นระยะที่หัวใจบีบตัว (systole) ระยะนี้ความเข้มข้นของแคลเซียมเพิ่มสูงขึ้น จากการกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ของแคลเซียมจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ โดยผ่าน

แคลเซียมแซนเน็ลและการกระตุ้นให้ซาโคพลาสมีกรีตูลัมหลังแคลเซียมออกมา การเพิ่มของแคลเซียมมีผลทำให้กระตุ้นให้พาร์วัลบูมินปล่อยแมกนีเซียมออกมาเพื่อที่จะจับกับแคลเซียม แต่เนื่องจากการปล่อยแมกนีเซียมออกนั้นเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลานาน จึงทำให้ระยะนี้ แคลเซียมไปจับกับโทรโปนินซีและทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (รูปที่ 12B)

ระยะที่ 3 เป็นระยะท้ายของการบีบตัวของหัวใจ (late systole and early diastole) เป็นระยะที่พาร์วัลบูมินจับกับแคลเซียม ซึ่งส่งผลให้แคลเซียมถูกดึงออกมาจากโทรโปนินซี ทำให้เกิดการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (รูปที่ 12 C)

ระยะที่ 4 เป็นระยะกลางจนถึงระยะท้ายของการคลายตัวของหัวใจ (mid-to-late diastole) ซึ่งเป็นระยะที่พาร์วัลบูมินปล่อยการจับกับแคลเซียม (รูปที่ 12 D)



รูปที่ 12 A-D แสดงกลไกการทำงานของพาร์วัลบูมินในการช่วยในการคลายตัวของหัวใจ ในระยะ

ต่าง ๆ (A) late diastole (B) systole (C) late systole และ early diastole (D) mid-to-late diastole Parv = parvalbumin, SR = sarcoplasmic reticulum, R = ryanodine receptor, S = SR  $Ca^{2+}$  adenosine triphosphate , PLB = phospholamban, วงกลมโปรง = แมกนีเซียมไอออน, วงกลมทึบ = แคลเซียมไอออน (Coutu *et al.*, 2003)

จากผลการศึกษาโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีเปรียบเทียบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่กล้ามเนื้อหัวใจ กล้ามเนื้อโซเลียสและกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์- คิจิทอรัมลองกัช พบว่า กล้ามเนื้อหัวใจมีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินแตกต่างจากกล้ามเนื้ออีก 2 ชนิด โดยพบปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในทุกเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และแต่ละเซลล์พบว่ามี ความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจชี้แสดงว่าแต่ละเซลล์มีปริมาณของพาร์วัลบูมินใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจจะมีส่วนสำคัญในการทำให้กล้ามเนื้อแต่ละเซลล์คลายตัวได้เกือบจะพร้อมเพรียงกัน ซึ่งการที่กล้ามเนื้อหัวใจคลายตัวได้เกือบจะพร้อมเพรียงกันนั้น น่าจะส่งผลช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการคลายตัวของหัวใจด้วย ในขณะที่กล้ามเนื้อโซเลียสและกล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชนั้น เส้นใยมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินไม่เท่ากัน บางเส้นใยมีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนมาก บางเส้นใยมีความเข้มของปฏิกิริยาน้อย ซึ่งอาจชี้แสดงว่า แต่ละเส้นใยมีปริมาณพาร์วัลบูมินแตกต่างกัน กล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชนั้น มีจำนวนเส้นใยที่มีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินเข้มเป็นจำนวนมากกว่ากล้ามเนื้อโซเลียส นอก จากนี้ผลการศึกษาโดยใช้เทคนิคเวสเทอร์นบล็อตติงพบว่ามี การแสดงออกของพาร์วัลบูมินใน กล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชมาก ในขณะที่กล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อโซเลียสมี การแสดงออกของพาร์วัลบูมินน้อยกว่ากล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชอย่างเห็นได้ชัด การที่มีพาร์วัลบูมินมากอาจจะส่งผลให้กล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชคลายตัวได้เร็ว ส่งผลให้การหดตัวครั้งใหม่เกิดขึ้นได้เร็ว จึงทำให้กล้ามเนื้อเอกเทนเซอร์คิจิทอรัมลองกัชจัดอยู่ในกลุ่มหดตัวเร็ว ในขณะที่กล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อโซเลียสถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน โดยจัดอยู่ในกลุ่มหดตัวช้า

จากผลการศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจ แต่ละช่วงอายุทั้ง 2 เทคนิคพบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินตั้งแต่แรกเกิด ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ต่างกับผลการศึกษาในกล้ามเนื้อลาย ซึ่งไม่พบการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลายตั้งแต่แรกเกิดของหนูแรกเกิด แต่พบในหนูหลังคลอด 4 วัน (Olive and Ferrer, 1994 ; Sano *et al.*, 1990) ซึ่ง Leberer และ Pette (1986) ก็ได้เสนอแนะว่าการสร้างพาร์วัลบูมินน่าจะมีความสัมพันธ์กับการใช้งานของอวัยวะนั้น ๆ ซึ่งในกล้ามเนื้อลายส่วนใหญ่ก็จะทำงานหลังคลอด ในขณะที่หัวใจนั้น ทำงานตั้งแต่เป็นตัวอ่อนอยู่ในครรภ์ โดยหัวใจจะทำงานตั้งแต่ตัวอ่อนอายุได้ 9-10 วัน (Gutierrez-Correa *et al.*, 1991) ดังนั้นการพบพาร์วัลบูมินในกลุ่มอายุแรกเกิด จึงมีความสัมพันธ์กับการทำงานของหัวใจ ซึ่งทำงานก่อนคลอด ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้อาจนำไปสู่การศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินของหัวใจ ในระยะที่เป็นตัวอ่อน เพื่ออธิบายถึงความสัมพันธ์ของการสร้างพาร์วัลบูมินกับการทำงานของหัวใจในตัวอ่อน ซึ่งอาจจะนำไปสู่การอธิบายพยาธิสภาพของหัวใจแต่กำเนิดได้ เช่น ภาวะหัวใจเดินผิดปกติแต่กำเนิด

นอกจากนี้ผลการศึกษาโดยใช้ เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ พบว่ากล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรกเกิด มีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินต่างจากหนูอายุ 3 เดือน 6 เดือน และ 12 เดือน โดยที่เซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรกเกิด มีความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินกระจายไม่สม่ำเสมอ โดยกลุ่มเซลล์บางกลุ่ม มีความเข้มกระจายเป็นกลุ่ม บางกลุ่มเซลล์มีปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินน้อย ซึ่งอาจจะแสดงว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุแรกเกิด มีปริมาณของ พาร์วัลบูมินไม่เท่ากัน บางเซลล์มีมากบางเซลล์มีน้อย การมีปริมาณพาร์วัลบูมินที่ไม่เท่ากันนั้น อาจจะส่งผลให้การคลายตัวของแต่ละเซลล์ไม่พร้อมกัน ซึ่งการคลายตัวที่ไม่พร้อมกันนั้น ก็จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจด้วยเช่นกัน ถึงแม้ผลการศึกษาโดยเทคนิคเวสเทิร์น- บล๊อตจึงจะพบว่ามีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูแรกเกิดมากใกล้เคียงพอ ๆ กับหัวใจหนูอายุ 3 เดือน แต่จากการศึกษาลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูอายุแรกเกิดพบว่า มีลักษณะของเซลล์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ แตกต่างจากเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจหนูอายุ 3 เดือน ซึ่งเป็นอย่างมาก โดยเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูแรกเกิดจะมีขนาดเล็กกว่า มีรูปร่างกระสวย นอกจากนี้ไซโตพลาสซึมใสแสดงถึง

การมีองค์ประกอบอื่น ๆ ภายในเซลล์น้อยโดยเฉพาะไมโอไฟบริล เนื่องจากการทำงานของพาร์วัลบูมิน ในการทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวนั้นจะทำงานร่วมกับไมโอไฟบริล ดังนั้นการที่มี ไมโอไฟบริลน้อย ก็จะส่งผลต่อประสิทธิภาพการหดและคลายตัวของหัวใจด้วยเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Zhou และคณะ (2003) พบว่าการคลายตัวของหัวใจนั้นจะทำงานได้อย่างสมบูรณ์และมีประสิทธิภาพ เมื่อหนูมีอายุหลังคลอด 3 สัปดาห์ เป็นต้นไป

ผลจากการศึกษาการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูในแต่ละช่วงอายุโดยใช้ เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี พบว่าความเข้มของปฏิกิริยาอิมมูโนของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูเพิ่มขึ้นจากแรกเกิดไปจนถึงอายุ 12 เดือน นอกจากนี้ผลการศึกษาโดยใช้เวสเทอร์นบล็อตติง พบว่าการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในอายุ 6 และ 12 เดือน ซึ่งเป็นกลุ่มอายุของหนูโตเต็มวัย มีการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นถึง 1.35 และ 1.52 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแรกเกิด และจากการศึกษาของ David และ Marx (1977) พบว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีการเจริญและพัฒนามากขึ้น จากแรกเกิดไปจนถึงหนูที่โตเต็มวัย โดยเซลล์จะมีการเพิ่มขนาด (hypertrophy) และองค์ประกอบภายในเซลล์จะมีการสร้างเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะ myofibril ดังนั้นการเพิ่มของพาร์วัลบูมินนั้นอาจจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของไมโอไฟบริล เพื่อที่จะทำให้อัตราและช่วงเวลาคลายตัวของหัวใจเหมาะสมกับความต้องการโลหิตไปเลี้ยงร่างกายที่เพิ่มขึ้น

จากการศึกษาของ Frenzel และ Feimann (1984) พบว่า myofibril นั้นยังคงเพิ่มจำนวนเมื่อร่างกายมีการเจริญเติบโตในหัวใจของหนูอายุมาก (aging rat) แต่พบว่าประสิทธิภาพการคลายตัวของหัวใจลดลง (Oxenham *et al.*, 2003) ดังนั้นการศึกษาในลำดับต่อไปถึงการแสดงออกของพาร์วัลบูมินในหัวใจหนูอายุมาก จึงเป็นสิ่งที่มีความจำเป็นเพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของการแสดงออกของพาร์วัลบูมินกับพยาธิสภาพในการคลายตัวของหัวใจ (diastolic dysfunction) ซึ่งเป็นภาวะที่พบมากในผู้สูงอายุ

การเพิ่มขึ้นของพาร์วัลบูมินน่าจะมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจเนื่องจากอัตราการไหลเวียนของโลหิตไปเลี้ยงร่างกายจะขึ้นอยู่กับผลคูณของปริมาณโลหิตที่สูบฉีดออกจากหัวใจในแต่ละครั้ง (stroke volume) กับอัตราการเต้นของหัวใจในหนึ่งนาที (heart

rate) ปริมาณของพาร์วัลบูมินที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาตรการสูบฉีดโลหิตออกจากหัวใจในแต่ละครั้ง โดยที่ปริมาตรการสูบฉีดโลหิตออกจากหัวใจในแต่ละครั้งเป็นความแตกต่างระหว่างปริมาณโลหิตในเวนทรีเคิลขณะคลายตัวกับปริมาณโลหิตในเวนทรีเคิลขณะบีบตัว ซึ่งปริมาณโลหิตในเวนทรีเคิลขณะคลายตัว ถูกกำหนดโดยระยะเวลาที่โลหิตไหลเวียนกลับเข้าสู่หัวใจ (ระยะพักของหัวใจ) และอัตราการไหลเวียนของโลหิตกลับเข้าสู่หัวใจ (venous return) โดยระยะเวลาที่โลหิตไหลเวียนกลับเข้าสู่หัวใจจะขึ้นกับอัตราการบีบตัวของหัวใจ ในขณะที่เป็นทารกหัวใจบีบตัวเร็วมากระยะเวลาที่โลหิตไหลกลับเข้าสู่หัวใจสั้น ปริมาณโลหิตที่ไหลเข้าสู่หัวใจมีปริมาณน้อย ในขณะที่ร่างกายเติบโตขึ้น มีความต้องการโลหิตไปเลี้ยงอวัยวะต่าง ๆ เพิ่มขึ้น แต่อัตราการเต้นของหัวใจลดลง แสดงว่าปริมาณของโลหิตในขณะเวนทรีเคิลคลายตัวตัวมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น ปริมาณโลหิตที่เพิ่มขึ้นน่าจะมีสาเหตุมาจากการที่แต่ละเซลล์ของกล้ามเนื้อหัวใจมีการคลายตัวเกือบจะพร้อมเพรียงกันเนื่องจากมีประมาณพาร์วัลบูมินใกล้เคียงกันและเพิ่มมากขึ้นเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น จึงทำให้คลายตัวได้ดีขึ้นเมื่อเข้าสู่ตัวเต็มวัยทำให้มีแรงดันโลหิตที่กระทำต่อผนังเวนทรีเคิลเพิ่มขึ้นและเกิดแรงสูบฉีดโลหิตออกจากหัวใจเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ส่วนอัตราการเต้นของหัวใจมีระบบนำสัญญาณไฟฟ้าและระบบประสาทอัตโนมัติเป็นตัวควบคุมการทำงาน ดังนั้นพาร์วัลบูมินเป็นตัวช่วยเสริมการทำงานของหัวใจให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากยิ่งขึ้น โดยน่าจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของปริมาณโลหิตที่สูบฉีดออกจากหัวใจในแต่ละครั้ง

การศึกษาในลำดับต่อไปจึงควรศึกษาถึงปัจจัยอื่น ๆ ที่อาจจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพาร์วัลบูมินในหัวใจ เช่นปัจจัยทางด้านการออกกำลังกาย โดยจากการศึกษาของ Cai และคณะ (2001) พบว่าผลของการออกกำลังกายทำให้ปริมาณของพาร์วัลบูมินใน กล้ามเนื้อลายเพิ่มขึ้น ดังนั้นการออกกำลังกายจึงอาจจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ พาร์วัลบูมินภายในกล้ามเนื้อหัวใจด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ควรจะศึกษาถึงปัจจัยทางด้านอาหาร สอร์โอมิน ซึ่งอาจจะส่งผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพาร์วัลบูมิน และศึกษาถึงปัจจัยที่อาจจะส่งผลต่อการทำงานของพาร์วัลบูมิน เช่น การเปลี่ยนแปลงของระดับแคลเซียม, แมกนีเซียม, โปแตสเซียม และ โซเดียม หรือผลของยาชนิดต่าง ๆ เช่น ยากลุ่มแคลเซียมบล็อกกิงแชนแนล (calcium blocking channel) หรือ

แคลเซียมแอนทาโกนิส (calcium antagonist) ซึ่งผลของการศึกษาในปัจจุบันที่มีผลในการเพิ่มหรือลดปริมาณ หรือประสิทธิภาพการทำงานของพาร์วัลบูมิน อาจนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกได้