

อธิบดีมหาวิทยาลัย



สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ชื่อโครงการ ระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของโปรตีนเซียมชนิดขึ้นกับเอทีพีในหัวใจหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน สิริวิทยาวรรณ
 หน่วยงานที่สังกัด คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
 เดือน ปี ที่เสร็จโครงการ 31 /12/2561

คณะผู้วิจัย สังกัด

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 21 มี.ค. 2565
เลขทะเบียน 1049744
เลขเรียกหนังสือ 2 0L
55

- | | | |
|------------------------------------|---|-------|
| 1. ผศ. ดร. ดวงเดือน สิริวิทยาวรรณ | คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร | ๑1758 |
| 2. ผศ. ดร. ปิยะนุช ฐิติวุฒิเกียรติ | คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร | 2558 |
| 3. ผศ. ดร. เตือนจิตร น่วมจิตร | คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร | |
| 4. ผศ. นส.พ.อนุศักดิ์ กิจถาวรรัตน์ | คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย | |

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
 งบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร สาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ
 ปีงบประมาณ 2558

Executive Summary

ชื่อโครงการวิจัย ระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของช่องโปรตีนเชื่อมชนิดขึ้นกับเอทีพีในหัวใจหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว
 ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงเดือน สิริวิทยาวรรณ
 สังกัด ภาควิชา เทคโนโลยีหัวใจและทรวงอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

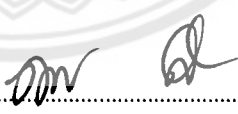
วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อเปรียบเทียบระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของช่องโปรตีนเชื่อมชนิดขึ้นกับเอทีพี คือ Kir6.1 และ Kir6.2 ในส่วนต่างๆ ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูในภาวะปกติและภาวะหัวใจล้มเหลว

งานวิจัย เป็นรูปแบบ experimental study ทำการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยแบ่งหนูเป็นกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง หนูในกลุ่มทดลองจะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวโดยทำการรัดหลอดเลือดเออร์ต้า จากนั้นทำการประเมินการทำงานของหัวใจโดยใช้คลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงจนพบว่าหัวใจหนูมีลักษณะทางโครงสร้างเปลี่ยนแปลงไป จากนั้นนำหัวใจหนูบริเวณเวนทริเคิลซ้ายจากทั้งสองกลุ่มมาสกัดแยกโปรตีนและศึกษาจำเพาะระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของช่องไอออนโปรตีนเชื่อมชนิดขึ้นกับเอทีพีชนิด Kir6.1 และ Kir6.2 โดยวิธี immunoblotting จากการศึกษาพบว่าหน่วยย่อยของช่องไอออนโปรตีนเชื่อมชนิด Kir6.1 บน plasma membrane ลดลง ในขณะที่มีบริเวณ organelles membrane มีปริมาณเพิ่มขึ้น ส่วนหน่วยย่อยชนิด Kir6.2 นั้นพบได้ชัดเจนพบบริเวณ plasma membrane แต่ไม่พบในส่วนอื่นๆของเซลล์ และพบว่ามีแนวโน้มลดลงในภาวะหัวใจล้มเหลว ข้อมูลที่ได้แสดงให้เห็นถึงความเกี่ยวข้องของ ช่องไอออนโปรตีนเชื่อมชนิดขึ้นกับเอทีพี กับภาวะหัวใจล้มเหลว สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการศึกษาพัฒนาายาที่เกี่ยวข้องกับช่องไอออนเพื่อลดอันตรายจากภาวะหัวใจล้มเหลวได้

ผลสำเร็จของโครงการที่ได้รับ

มีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการสืบเนื่อง การประชุมวิชาการระดับชาติครั้งที่ 4 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตศรีราชา วันที่ 28 สิงหาคม 2563

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน สิริวิทยาวรรณ)

หัวหน้าโครงการ

Abstract

Objective: To investigate the protein levels of ATP sensitive potassium channel subunits, Kir6,1 and Kir6.2 in rat cardiomyocytes responding to pressure overloading

Method: 10 Wistar rats were separated into control, (sham-operated) group, and trans-aortic constriction - induced heart failure group (LVH group). Cardiomyocytes were isolated and then subjected to extract protein into cytoplasm, organelle membrane and plasma membrane fraction. Kir6.1 and Kir6.2 protein were detected by immunoblotting technique.

Results: The study showed that Kir6.1 was distributed in organelle membranes and plasma membrane whereas Kir6.2 was distributed only in plasma membranes. Significantly, kir6.1 decreased in plasma membrane fraction of LVH group (n=8). In organelle membrane fraction, though Kir6.1 tended to be higher in LVH but not reach statistical significance (n= 7). Kir6.2 levels were lower, but not significantly, in LVH group when compared to that of sham group (n = 5).

Conclusion: Kir6.1 subunit was decreased significantly in LVH group



Chapter I

Introduction

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะหัวใจล้มเหลวเป็นสาเหตุการตายที่สำคัญของผู้ป่วยทั่วโลก ใน 1 ปีมีประชากรที่เสียชีวิตจากภาวะหัวใจล้มเหลวมากกว่า 300,000 คน (1) ในประเทศไทย โรคหัวใจเป็นสาเหตุการตายและการเข้ารับการรักษาพยาบาลลำดับต้นๆของประเทศ (2) และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียในเชิงทรัพยากรบุคคลและเศรษฐกิจ ดังนั้นการป้องกัน หรือการชะลอการดำเนินโรค การป้องกันภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่เกิดจากโรคหัวใจล้มเหลว จึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งส่วนหนึ่งต้องอาศัยความรู้ความเข้าใจในพยาธิสรีรวิทยาของโรค ภาวะหัวใจล้มเหลวจะมีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ การศึกษาพบว่าสาเหตุหลักของการตายในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเกิดจาก ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะและการการดำเนินโรคที่แย่งลง (3) ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการทำงานของช่องไอออนต่างๆบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ หนึ่งในช่องไอออนที่มีบทบาทต่อภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะคือ ช่องโปตัสเซียมชนิดขึ้นอยู่กับเอทีพี (ATP-sensitive potassium channels, K_{ATP})

K_{ATP} เป็นตัวเชื่อมโยงภาวะเมตาบอลิซึมและเหตุการณ์ทางไฟฟ้าของเซลล์ ในภาวะปกติช่องไอออนชนิดนี้จะปิด แต่จะเปิดเมื่อมีระดับเอทีพีในเซลล์ลดลง การเปิดของช่องไอออนชนิดนี้ ทำให้มีการไหลออกของโปตัสเซียมไอออน ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงทางศักย์ไฟฟ้าของเซลล์ กล่าวคือทำให้ action potential duration (APD) สั้นลง มีการศึกษาพบว่า การเปิดของช่องไอออนชนิดนี้เพียง 1% สามารถทำให้ action potential duration สั้นลงได้มากกว่าครึ่งหนึ่ง (4) APD ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นปัจจัยหนึ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะได้และมีผลต่อการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ ได้มีการศึกษาพบว่า K_{ATP} มีบทบาทในภาวะหัวใจล้มเหลว Yamada et al. (5) พบว่า Kir 6.2 ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของช่องโปตัสเซียมชนิดนี้ มีบทบาทในการต่อต้านการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวจากภาวะ pressure overload โดยการศึกษาพบว่าในหนู Kir6.2 knockout เมื่อเกิด ventricular pressure overload จะมีการเปลี่ยนแปลงของ action potential duration เกิด congestive heart failure ภายใน 2 ชั่วโมงหลังเกิด pressure overload และครึ่งหนึ่งของหนูเหล่านี้เสียชีวิตภายใน 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ใน volume overload model พบว่า เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่มี eccentric hypertrophy เมื่อนำมาศึกษาโดยวิธี patch clamp technique พบว่ากระแสไฟฟ้าไหลออกไม่ตอบสนองต่อ K_{ATP} channel modulators คือ cromakalim และ glibenclamide ซึ่งแตกต่างจากเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูปกติ (6) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่า ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวจากการเหนี่ยวนำของ tumor necrosis factor- α K_{ATP} channels สูญเสียความสามารถตอบสนองต่อภาวะ stress ในขณะที่ gating mechanism ยังคงอยู่ (7) เหล่านี้เป็นข้อมูลสนับสนุนบทบาทของ K_{ATP} channels ในภาวะหัวใจล้มเหลว อย่างไรก็ตามในขณะนี้ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่า จำนวนหรือปริมาณของ K_{ATP} channels ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ หรืออยู่ในส่วนต่างๆของเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่อย่างไรในภาวะหัวใจล้มเหลว

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณโปรตีน ของหน่วยย่อยของ K_{ATP} channels ในภาวะหัวใจล้มเหลวได้แก่ หน่วยย่อย Kir6.1 และ Kir6.2 ในส่วนต่างๆของเซลล์ได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์ ไซโตพลาสซึมและเยื่อหุ้มออร์แกนเนล

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ATP sensitive potassium channels ทำหน้าที่เสมือนเป็น molecular sensors ของ cell metabolism โดยการ coupling การเปลี่ยนแปลงด้านเมตาบอลิซึมของเซลล์เข้ากับ electrical activity ของเซลล์ K_{ATP} channels มีบทบาทสำคัญในเนื้อเยื่อหลายชนิด เช่น มีบทบาทในการหลั่งอินซูลินของ pancreatic β -cells, การคลายตัวของ smooth muscle, การหลั่ง neurotransmitter และการบีบตัวของหัวใจ (8) ช่องไอออนชนิดนี้มีลักษณะเป็น hetero-octameric stoichiometry ซึ่งมี 2

ส่วนประกอบใหญ่คือ ส่วนที่เป็น pore-forming subunit (Kir6) และ regulatory subunit (SUR) (9) ช่องไอออนชนิดนี้จะทำงานได้ต้องมี 2 subunits นี้ประกอบกัน ส่วนที่เป็น pore forming subunit ยังแบ่งได้เป็น 2 ชนิดคือ Kir6.1 และ Kir6.2 ส่วน SUR แบ่งได้เป็น SUR1 และ SUR2 ซึ่งแบ่งย่อยได้เป็น SUR2A และ SUR2B ในเนื้อเยื่อต่างๆ จะมี K_{ATP} channels ที่มีการประกอบของ subunits ที่ต่างกัน เช่นใน β -cell พบว่าเป็น Kir6.2/SUR1 ในขณะที่เซลล์ของ vascular smooth muscle พบ K_{ATP} channels ที่ประกอบมาจาก Kir6.1/SUR2B ส่วนในเยื่อหุ้มเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่า K_{ATP} channels ประกอบด้วย Kir6.2/SUR2A subunits เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้ยังพบ Kir6.1 ร่วมด้วยในปริมาณน้อย (10)

บทบาทของ K_{ATP} channels ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจค่อนข้างเด่นชัดในกลไกการป้องกันการบาดเจ็บของหัวใจหลังการขาดเลือดโดย ischemic preconditioning การศึกษาชี้ว่า ผลการปกป้องหัวใจของ K_{ATP} channels อย่างน้อยบางส่วน จะผ่านทาง Kir6.1 subunit ซึ่งเชื่อว่าเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ K_{ATP} channel ของ mitochondria (mito K_{ATP}) และมีการแสดงออกที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยซึ่งในภาวะปกติจะมีปริมาณไม่มากนักและยังมีข้อขัดแย้งกันอยู่ ทั้งนี้การศึกษายังแสดงให้เห็นว่า มีการเคลื่อนย้ายของ ion channels ดังกล่าวระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และ intracellular compartment ในกลไกดังกล่าวด้วย ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่า ในภาวะหัวใจล้มเหลวที่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์นั้น K_{ATP} channels มีบทบาทหรือมีการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านปริมาณและ activity อย่างไร การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า K_{ATP} channels มีบทบาทต่อต้านการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวจาก pressure overload (5) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองต่อ modulator และภาวะ stress น้อยลง (7) อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงเชิงปริมาณของหน่วยย่อยของ ion channel ชนิดนี้ที่ตอบสนองต่อภาวะหัวใจล้มเหลวยังมีค่อนข้างจำกัด Reyes et al (11) พบว่าในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว ที่มีความบกพร่องของการตอบสนองต่อการออกกำลังกายมี Kir6.2 E32K มากผิดปกติ Borlak et al (12) ได้ทำการหาการ expression ของยีนของช่องไอออนชนิดต่างๆในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวระยะสุดท้ายพบว่า Kir6.1 mRNA มีปริมาณเพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อ right ventricle แต่ไม่เปลี่ยนแปลงใน left ventricle ในขณะที่ Kir6.2 ลดลงประมาณ 20% ของ control อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้เป็นการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวระยะสุดท้ายที่ได้รับยาและยังไม่มีการศึกษาถึงระดับโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในระยะต้นๆของภาวะหัวใจล้มเหลว

Significance of Study

ผลการทดลองจะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจในกระบวนการของการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลว สามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับพัฒนายาต่อไป

Hypothesis

มีการเปลี่ยนแปลง ของระดับของ Kir 6.2 บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Kir6.1 ในส่วนเยื่อหุ้มออร์แกนเนลล์

Chapter II

Research Methodology

วิธีดำเนินงานวิจัย

Experimental design

รูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลองโดยทำการทดลองในหนู (Wistar rat) โดยออกแบบการทดลองดังนี้ หนูเพศผู้วีสตาร์แรทจำนวน 14 ตัวจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม ควบคุม (Sham) และกลุ่มหัวใจล้มเหลวที่เหนียวมาโดยการผูกมัดหลอดเลือดเออร์ตา (Trans-aortic constriction-induced heart failure, TAC) เมื่อหนูมีภาวะหัวใจล้มเหลว หนูทั้งสองกลุ่มจะถูกการุณยฆาตโดยการฉีด over dose pentobarbital 100 mg/Kg จากนั้นจะทำการเปิดช่องอกและตัดหัวใจออกมาอย่างรวดเร็ว ใส่ในหลอดทดลองที่มีฝาปิดสนิทและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำชิ้นเนื้อบริเวณ left ventricle มาทำการแยกและหาโปรตีนที่เป็นหน่วยย่อยของ K_{ATP} channels โดยวิธี immunoblotting

สัตว์ทดลอง

โปรโตคอลได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง หนูวีสตาร์เพศผู้อายุ 4-6 สัปดาห์จาก ศูนย์ สัตว์ทดลองแห่งชาติ จะถูกนำมาเลี้ยงที่สถานสัตว์วิจัยเพื่อการทดลองที่มีการควบคุมอุณหภูมิ และความมืด/สว่างช่วงละ 12 ชม. เลี้ยงด้วยอาหารและน้ำตามมาตรฐาน

การเหนียวมาให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวในหนู

หนูกลุ่มที่ 1 (sham-operated rats) จะถูกวางยาสลบและผ่าตัดเปิดช่องอกโดยไม่มีการผูกหลอดเลือดเอออร์ตา สอดท่อช่วยหายใจโดยใช้ IV catheter 16G ต่อท่อช่วยหายใจกับกับเครื่องช่วยหายใจ (small animal ventilator เปิดผิวหน้าบริเวณ 5th intercostal space ด้านซ้ายยาวประมาณ aortic arch ยกหลอดเลือดขึ้นแต่ไม่ผูกหลอดเลือด จากนั้นเย็บปิดกล้ามเนื้อระหว่างช่องอก หนูกลุ่มที่ 2 กลุ่ม trans-aortic constriction (TAC) จะได้รับการผ่าตัดเปิดช่องอกเช่นเดียวกับหนูกลุ่ม sham แต่จะผูกหลอดเลือดเอออร์ตาให้แคบลงประมาณ 25-30% จากขนาดปกติด้วยไหมเย็บ เพื่อให้ systemic vascular resistance เพิ่มขึ้นและนำมาให้เกิด systolic heart failure จากนั้นจะทำการปิดช่องอกด้วยวิธีเดียวกับกลุ่ม 1 เมื่อครบ 16 สัปดาห์หลังผ่าตัดจะทำการตรวจประเมินการทำงานของหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงโดยดูการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและค่า ejection fraction (EF) และ fractional shortening (FS) เกณฑ์ที่ใช้ในการกำหนดว่าหนูมีภาวะหัวใจล้มเหลวคือ ค่า EF ประมาณ $\leq 50\%$ หรือ FS ประมาณ $\leq 25\%$ หรือหนูมีอาการหอบเหนื่อย ไม่กินอาหาร น้ำหนักลด

การประเมินการทำงานของหัวใจ

ประเมินด้วย 2 D transthoracic echocardiography, 30 MHz linear array transducer โดยเริ่มจากการให้ยาสลบ หนู Pentobarbital 60 mg/kg เข้าทางหน้าท้อง ประเมินการทำงานของหัวใจและโครงสร้างของหัวใจใน parasternal long- and short-axis และใช้วิธีการ bi-plane area-length. เมื่อ ejection fraction ต่ำกว่า 50% หรือหนูแสดงอาการเช่นหอบเหนื่อย กินอาหารได้น้อยลง แสดงว่าหนูมีภาวะหัวใจล้มเหลว

การศึกษาระดับโปรตีน

Protein extraction and Immunoblotting

การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจใช้ชุดสกัดสำเร็จรูปที่สามารถแยก plasma membrane protein และ โปรตีนในส่วนต่างๆของเซลล์ได้ (MinuteTMCat # SM 005, Invent Biotechnologies, USA). มีวิธีการดังนี้ นำชิ้นเนื้อหัวใจหนู (สดหรือแช่แข็ง) ส่วน left ventricle น้ำหนัก 30 mg ถูก homogenized ด้วย lysis buffer (buffer A) และ beads ที่อุณหภูมิ 4 OC หลังจากนั้นจะถูกกรอง และปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 RPM, เก็บส่วนที่เป็นตะกอนและทำการ resuspend หลังจากนั้นนำไปปั่น

เหวี่ยงที่ 3000 rpm จะได้ตะกอนที่มี intact nuclei อยู่ และอีกส่วนจะเป็น supernatant ซึ่งจะถูกปั่นเหวี่ยงต่อด้วยความเร็ว 16,000 X g อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที ได้ส่วน cytosol fraction (supernatant) และ ตะกอน (pellete) ประกอบด้วย total membrane protein fraction, organelles and plasma membranes ตะกอนจะถูก resuspend และ buffer อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ส่วนที่เป็นตะกอน คือ organelle membrane protein ส่วน supernatant นำไป centrifuged at 14,000 rpm (16,000 X g) เป็นเวลา 15-30 นาที ได้ตะกอนที่มี plasma membrane protein fraction ทั้งหมดจะถูกละลายใน Triton X-100 buffer และทำ protein determination ด้วย Bradford assay และทำให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ประมาณ 0.5 ug/ul.

Protein fractions จะถูกแยกโดยใช้ stain free technology ที่ทำให้สามารถมองเห็นโปรตีนทั้งหมด เมื่อนำ gel หรือ membrane ไป visualized โดย Gel Documentation system ได้ วิธีการแยกโปรตีนอย่างสังเขปคือ ใช้ sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (10% TGX –stain free acrylamide gel) โดยใช้ Bio-Rad Mini-Protein II system (Laemmli 1970). โปรตีนที่แยกแล้วถูก transfer ไปยัง PVDF membrane และ detect protein ที่สนใจด้วย ด้วย anti Kir 6.1 (anti-Kir6.1 antibody, #APC-105, Alomone labs, Jordan) or Kir 6.2 (anti-Kir6.2 antibody, #APC-020, Alomone labs, Jordan) นำไปดูและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนสัมพันธ์ด้วย Gel Documentation system (GelDoc, Bio-rad). ใช้ control loading protein เป็น total protein จาก TGX-stain free technology ที่ได้แสดงบน membrane ของแต่ละ lane

Statistical analysis

ระดับของโปรตีน จะแสดงออกมาในรูปแบบ normalized optical density (normalized O.D.) ได้จากการวัด density ของ band ของโปรตีนที่สนใจ/total protein density ในเลนนั้น ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าพารามิเตอร์ของสองกลุ่มโดยใช้ non-parametric test หรือ one sample student's t test/one sample Wilcoxon test ขึ้นอยู่กับการกระจายตัวของข้อมูล

บทที่ 3 ผลการวิจัย

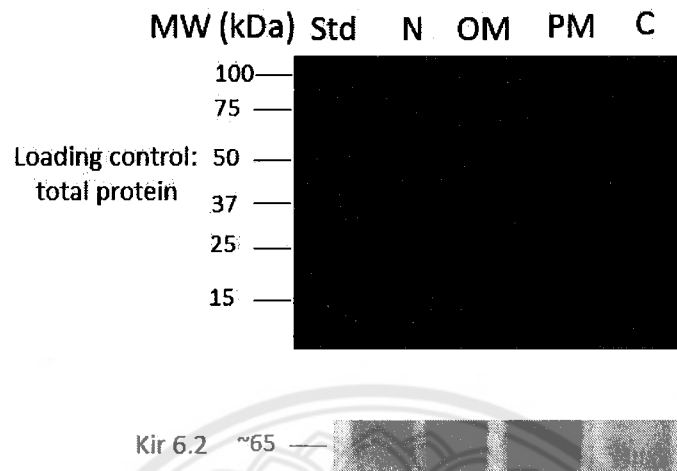
3.1 ข้อมูลทั่วไป

หลังการผ่าตัด 4 เดือน ได้นำหนูจากกลุ่ม Sham จำนวน 4 ตัวและหนูจากกลุ่ม TAC จำนวน 6 ตัว จากหนูกลุ่มละ 10 ตัว นำมาตรวจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูงพบว่า หนูในกลุ่มทดลองมี หัวใจห้องล่างซ้ายหนา (IVSd และ IVSs) กว่าหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ EF และ FS ไม่แตกต่างกัน รายละเอียดดังตาราง 3.1 และ รูปตัวอย่างที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 แสดงผลการตรวจหัวใจด้วยคลื่นเสียงสะท้อนความถี่สูง

Parameters	Sham (N= 4) Mean ± S.D	LVH (n=6) Mean ± S.D.	P value
LVPWd	0.20 ± 0.04	0.24 ± 0.03	0.08
LVPWs	0.33 ± 0.03	0.37 ± 0.04	0.11
LVIDd	0.63 ± 0.04	0.62 ± 0.05	0.90
LVIDs	0.31 ± 0.04	0.28 ± 0.05	0.50
IVSd	0.18 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.001*
IVSs	0.27 ± 0.03	0.36 ± 0.05	0.01*
FS	50.37 ± 7.48	54.45 ± 4.55	0.3
EDV	0.58 ± 0.11	0.61 ± 0.12	0.60
ESV	0.08 ± 0.03	0.11 ± 0.11	0.50
SV	0.50 ± 0.11	0.46 ± 0.21	0.79
CO (L)	0.42 ± 0.10	0.40 ± 0.08	0.43
EF (%)	85.31 ± 6.51	87.95 ± 3.69	0.84

LVPWd = diastolic left ventricular posterior wall thickness, LVPWs = systolic left ventricular posterior wall thickness, LVIDd = diastolic left ventricular internal diameter, LVIDs = systolic left ventricular internal diameter, IVSd = interventricular septum in diastole, IVSs = interventricular septum in systole, FS = fractional shortening, EDV = end diastolic volume, ESV = end systolic volume, SV = stroke volume, CO = cardiac output, EF = ejection fraction, * indicates p< 0.05

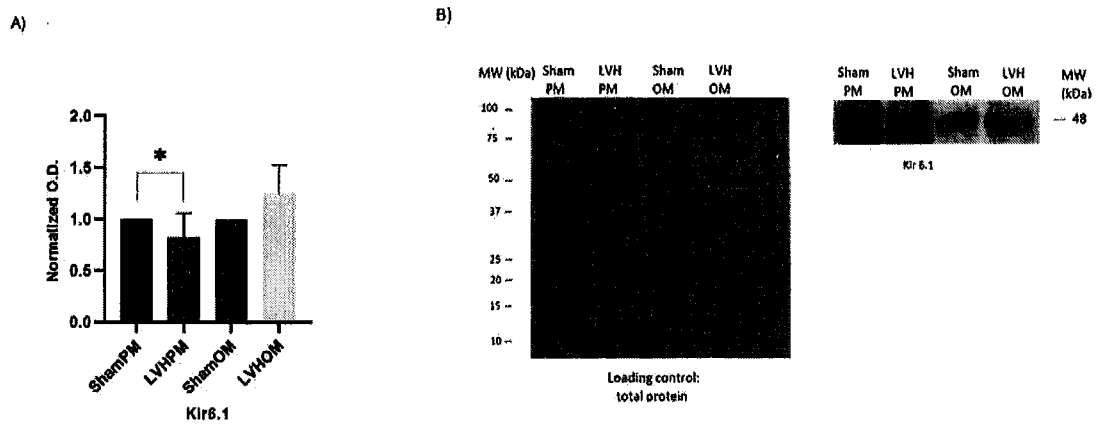


ภาพที่ 3.3 แสดงการกระจายตัวของ Kir6.2 ในกลุ่มหนู sham OM = organelle membrane fraction, PM = plasma membrane fraction, C = cytosolic fraction, N = nuclear protein

3.3 การเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีน Kir 6.1 และ Kir 6.2

3.3.1 การเปลี่ยนแปลงของ Kir6.1

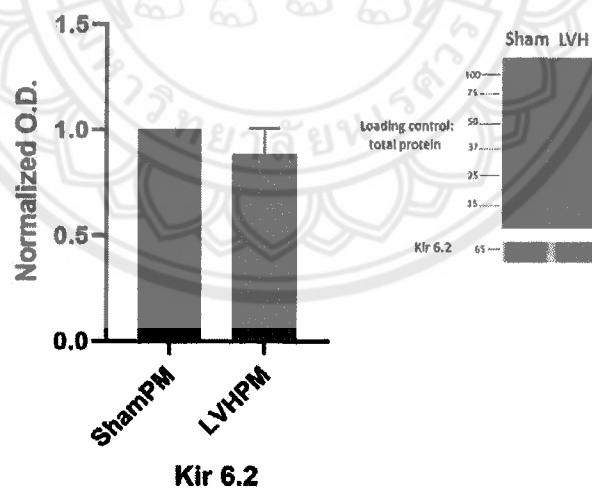
เนื่องจากใน cytosol ไม่สามารถ detect protein Kir6.1 ได้ จึงทำการเปรียบเทียบเฉพาะ organelle's membrane และ plasma membrane พบว่า ใน plasma membrane มีการลดลงของ protein Kir 6.1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (1 v.s 0.87 [0.73-0.99], $p < 0.01$, $n=8$) ในขณะที่ organelles membrane มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (1 v.s 1.13 [0.94-1.40], $p = 0.07$, $n = 7$) ข้อมูลแสดงในรูปแบบ median [25th percentile -75th percentile] ดังแสดงในภาพ 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบระดับโปรตีน Kir6.1 ในหัวใจหนู sham และ LVH A) กราฟเปรียบเทียบ normalized O.D. ของหนู Sham และ หนู LVH B) ภาพตัวอย่าง Kir6.1 band ที่พบจากหนู sham และ หนู LVH
 OM = organelle membrane fraction, PM = plasma membrane fraction, C = cytosolic fraction, N = nuclear protein

3.3.2 การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน Kir 6.2

ระดับของ Kir 6.2 ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (1 v.s. 0.83 [0.74-0.97] p = 0.25 n = 5, data is presented as median [25th percentile -75th percentile]) ดังแสดงในภาพ 3.5



ภาพที่ 3.5 แสดงระดับโปรตีนของ Kir 6.2 บริเวณ plasma membranes -ของกลุ่ม sham และ LVH
 ShamPM = sham plasma membrane, LVHPM = LVH plasma membrane

|

บทที่ 5

อภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

การศึกษานี้พบว่า การกระจายของระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของ ATP sensitive potassium channel, Kir6.1 และ Kir6.2, ที่ต่างกัน โดยพบการแสดงออกของ Kir6.2 บริเวณ cell membrane แต่ไม่พบใน cytosol หรือที่ organelle membrane ในขณะที่พบ Kir6.1 บริเวณ cell membrane และบริเวณ organelle membrane ด้วย ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับหลายๆ การศึกษาที่ระบุว่า Kir6.2 subunit เป็นส่วนประกอบของ plasma membrane K_{ATP} channel อย่างไรก็ตามบางการศึกษาพบ Kir 6.2 บริเวณ mitochondria (13, 14) ในหัวใจหนูโดยวิธีการทาง immunoblotting (western blot) แต่ไม่พบในการศึกษา

Kir 6.1 เป็น subunit ที่มีการตั้งสมมติฐานว่าเป็นส่วนประกอบหนึ่งของ mitochondrial KATP channels (mitoKATP) แม้ว่าบางการศึกษาจะไม่พบการแสดงออกดังกล่าวก็ตาม (15) ในการศึกษาครั้งนี้พบ Kir 6.1 ใน organelles membrane ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่ง organelles ที่มีปริมาณมากที่สุดคือ mitochondria จึงเป็นไปได้ว่า Kir 6.1 ที่พบอาจเป็น mitochondria K_{ATP} subunit แต่ยังคงต้องการการศึกษายืนยันโดยวิธีการที่มีความจำเพาะมากขึ้น สำหรับการพบบริเวณ plasma membrane นั้น แม้การศึกษาที่ผ่านมาจะระบุว่าพบได้ปริมาณน้อยหรือไม่พบเลย (10) อย่างไรก็ตาม มีบางการศึกษาที่ระบุว่า Kir 6.1 เป็น subunit หนึ่งที่อยู่บริเวณ plasma membrane และมีการเปิดของช่องไอออนที่แตกต่างจาก Kir 6.2 โดยมีระยะเวลาการเปิดที่ต่อเนื่องยาวนานกว่า Kir6.2 (16) และคาดว่าเป็นส่วนหนึ่งที่กำหนด action potential duration ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่สามารถตรวจพบ Kir6.1 ที่ บริเวณ plasma membrane และพบได้เด่นชัดมากกว่า subcellular fraction อื่นๆ

บทบาทที่เด่นชัดของ KATP channels ต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจนั้น พบว่ามีบทบาทในด้าน cardio-protection และ arrhythmias โดย K_{ATP} channels จะปิดในภาวะพักและเปิดเมื่อมีระดับของ ATP ใน cell ลดลง เช่นในภาวะ ischemia การเปิดของ K_{ATP} channels ทำให้มีการไหลออกของ potassium ion ทำให้ action potential duration สั้นลง ลด calcium overload แรงบีบตัวลดลง ลดความต้องการพลังงาน ทำให้ลดการบาดเจ็บของเซลล์ (11) แต่นอกจากผลในการปกป้องกล้ามเนื้อหัวใจแล้วยังมีผลในเชิงลบที่เกิดจาก action potential duration ที่สั้นลง คือทำให้เกิด arrhythmia ได้ (17) Denice M.Hodgson และคณะ (7) ได้ศึกษาในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู (mice) ที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวจากการเหนี่ยวนำของ TNF α โดยใช้เทคนิค α -myosin heavy chain gene regulation พบว่า ในภาวะขาดออกซิเจน(DNP-induced hypoxic stress) การเปิดของ K_{ATP} channels มีความผิดปกติไปจากเซลล์ที่เป็น wild type โดยพบว่า K_{ATP} channel activity ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจล้มเหลว มี activity น้อยลง 3 เท่า ส่งผล monophasic action potential duration สั้นลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับกลุ่ม wild type การมี action potential duration ที่สั้นลงไม่มาก ส่งผลทำให้เกิด calcium overload ที่มากกว่าและทำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บได้ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าระดับ K_{ATP} channel subunit ทั้ง Kir6.1 และ Kir 6.2 ที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีปริมาณที่ลดลงสนับสนุนการศึกษาดังกล่าว และอาจอธิบายว่าเพราะเหตุใดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจล้มเหลวจึงง่ายต่อการเกิดการบาดเจ็บเมื่อมีการกระตุ้นจากภาวะ stress หรือ ischemia

เนื่องจาก K_{ATP} channel เป็นส่วนหนึ่งในการกำหนด action potential duration จึงมีความเกี่ยวข้องกับการเกิด arrhythmias พบว่า KATP channels ชักนำไปให้เกิด early repolarization การสั้นลงของ QT interval และการลดลงของ refractory period ซึ่งอาจส่งเสริมให้เกิด re-entrant arrhythmias ได้ (12) เป็นไปได้ว่า การลดลงของ plasma membrane KATP channels อาจมีผล protective effect หรืออาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิด arrhythmias ได้ บทบาทของ plasma membrane K_{ATP} channels ต่อการเกิด arrhythmias ควรได้รับการศึกษาอย่างลึกซึ้งต่อไป

ว ๑๗
๕๕
๑๗๕๘
๒๕๕๕

๑๐๔๙๗๔๔
๒๑ มี.ค. ๒๕๖๕

สัญญาเลขที่ ๒๕๕๘๕๗



ข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ การพัฒนาหนูให้มีภาวะหัวใจล้มเหลวด้วยการรัดหลอดเลือดเอออร์ตาให้ตีบแคบเกินไป
วิธีการที่ซับซ้อน ต้องอาศัยประสบการณ์เพราะหนูอาจเสียชีวิตระหว่างการผ่าตัดได้หากรัดหลอดเลือดเอออร์ตาให้ตีบแคบเกินไป
อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้พบว่า การรัดหลอดเลือดเอออร์ตาที่ประมาณ 25% ช่วยลดอัตราการเสียชีวิตระหว่างผ่าตัด แต่ทำให้
หนูพัฒนาเป็นภาวะหัวใจล้มเหลวที่มี ejection fraction ลดลงมากกว่า 50% ภายในระยะเวลา 4 เดือนไม่ได้ ดังนั้นในการศึกษา
ครั้งนี้พบว่าการเปลี่ยนแปลงของหัวใจหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยการรัดหลอดเลือดเอออร์ตานั้นเป็นการหนาตัวของกล้ามเนื้อ
หัวใจด้านล่างซ้ายเท่านั้น

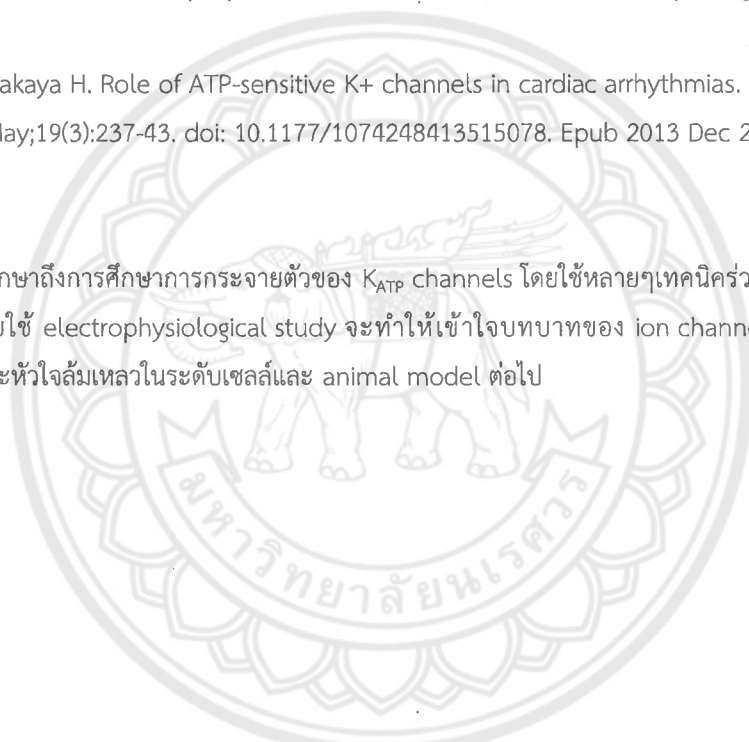
References

1. Liu, L., & Eisen, H. J. (2014). Epidemiology of heart failure and scope of the problem. *Cardiol Clin*, 32(1), 1-8. doi: 10.1016/j.ccl.2013.09.009
2. Bureau of Policy and Strategy, Ministry of Public Health. (2012). Report on Health Resources, 2012. access online <http://bps.ops.moph.go.th/index.php?mod=bps&doc=5>
3. Wu, A. H., & Das, S. K. (1999). Sudden death in dilated cardiomyopathy. *Clin Cardiol*, 22(4), 267-272.
4. Faivre, J. F., & Findlay, I. (1990). Action potential duration and activation of ATP-sensitive potassium current in isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Biochim Biophys Acta*, 1029(1), 167-172.
5. Yamada, S., Kane, G. C., Behfar, A., Liu, X. K., Dyér, R. B., Faustino, R. S., Terzic, A. (2006). Protection conferred by myocardial ATP-sensitive K⁺ channels in pressure overload-induced congestive heart failure revealed in KCNJ11 Kir6.2-null mutant. *J Physiol*, 577(Pt 3), 1053-1065. doi: 10.1113/jphysiol.2006.119511
6. Alvin, Z. V., Millis, R. M., Hajj-Mousssa, W., & Haddad, G. E. (2011). ATP-Sensitive Potassium Channel Currents in Eccentrically Hypertrophied Cardiac Myocytes of Volume-Overloaded Rats. (2011). *Int J Cell Biol*, 838951. doi: 10.1155/2011/838951
7. Hodgson, D. M., Zingman, L. V., Kane, G. C., Perez-Terzic, C., Bienengraeber, M., Ozcan, C., ... Terzic, A. (2003). Cellular remodeling in heart failure disrupts K(ATP) channel-dependent stress tolerance. *EMBO J*, 22(8), 1732-1742. doi: 10.1093/emboj/cdg192
8. Isomoto, S., & Kurachi, Y. (1997). Function, regulation, pharmacology, and molecular structure of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 8(12), 1431-1446.
9. Bryan, J., Vila-Carriles, W. H., Zhao, G., Babenko, A. P., & Aguilar-Bryan, L. (2004). Toward linking structure with function in ATP-sensitive K⁺ channels. *Diabetes*, 53 Suppl 3, S104-112.
10. Isomoto, S., Yamada, M., Horio, Y., & Kurachi, Y. (1997). Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system. *Jpn J Physiol*, 47 Suppl 1, S5-6.
11. Reyes, S., Park, S., Johnson, B. D., Terzic, A., & Olson, T. M. (2009). KATP channel Kir6.2 E23K variant overrepresented in human heart failure is associated with impaired exercise stress response. *Hum Genet*, 126(6), 779-789. doi: 10.1007/s00439-009-0731-9
12. Borlak, J., & Thum, T. (2003). Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J*, 17(12), 1592-1608. doi: 10.1096/fj.02-0889com

13. Lacza Z, Snipes JA, Miller AW, Szabó C, Grover G, Busija DW. (2003). Heart mitochondria contain functional ATP-dependent K⁺ channels. *J Mol Cell Cardiol.* Nov;35(11):1339-47. doi: 10.1016/s0022-2828(03)00249-9. PMID: 14596790.
14. Cuong DV, Kim N, Joo H, Youm JB, Chung JY, Lee Y, Park WS, Kim E, Park YS, Han J. (2005) Subunit composition of ATP-sensitive potassium channels in mitochondria of rat hearts. *Mitochondrion.* Apr;5(2):121-33. doi: 10.1016/j.mito.2004.12.001. PMID: 16050978.
15. Foster, D. B., Rucker, J. J., & Marbán, E. (2008). Is Kir6.1 a subunit of mitoK(ATP)? *Biochemical and biophysical research communications*, 366(3), 649–656. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.11.154>
16. S. Chen, D. Lodwick, R. D. Rainbow. (2014). Identification of Kir6.1-containing ATP-sensitive potassium channels at the cardiomyocyte sarcolemmal membrane. In: *The Physiology Society Meeting, 2014; London.*
17. Nakaya H. Role of ATP-sensitive K⁺ channels in cardiac arrhythmias. (2014). *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* May;19(3):237-43. doi: 10.1177/1074248413515078. Epub 2013 Dec 23. PMID: 24367007.

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาถึงการศึกษารกระจายตัวของ K_{ATP} channels โดยใช้หลายๆเทคนิคร่วม การศึกษาถึง activity ของ KATP channels โดยใช้ electrophysiological study จะทำให้เข้าใจบทบาทของ ion channel นี้เพิ่มขึ้น รวมถึงผลของ modulators ต่อภาวะหัวใจล้มเหลวในระดับเซลล์และ animal model ต่อไป



บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ การศึกษาการกระจายตัวของโปรตีน Kir6.1 และ Kir6.2 ในส่วนต่างๆของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูได้แก่ nucleus, organelle, plasma membrane และ cytosol ทั้งภาวะปกติและภาวะหัวใจล้มเหลวและการศึกษาปริมาณโปรตีน Kir6.1 และ Kir6.2 ใน Organelle และ Plasma membrane เปรียบเทียบกันระหว่างกล้ามเนื้อหัวใจหนูในภาวะปกติกับในภาวะหัวใจล้มเหลว โดยทำการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting ผลการศึกษาพบว่าในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูปกติและหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวสามารถพบ Kir6.1 ได้ใน Organelle และ Plasma membrane ส่วน Kir6.2 พบได้ที่ plasma membrane ที่เดียว

สำหรับส่วนที่ 2 ซึ่งเป็นการศึกษาปริมาณโปรตีน Kir6.1 และ Kir6.2 ในแต่ละส่วนของเซลล์พบว่า ระดับของ Kir6.1 ของหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว ที่บริเวณ plasma membrane ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่บริเวณ organelle membrane มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทาง ส่วนปริมาณ Kir6.2 protein ที่พบใน Plasma membrane ของกลุ่มหนูที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกัน



ภาคผนวก

ตาราง เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ที่กิจกรรมวางแผนไว้ และ กิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ

วัตถุประสงค์ที่กิจกรรมวางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
เปรียบเทียบระดับโปรตีนของหน่วยย่อยของช่องโปกัสเซียมคือ Kir6.1 และ Kir6.2ในส่วนต่างๆของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูในภาวะปกติ เปรียบเทียบกับในภาวะหัวใจล้มเหลว	ได้ดำเนินการสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ของการวิจัย	ได้ผลของการวิจัยเป็นตามที่ได้ตั้งสมมติฐาน
2.แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย	บางส่วนของงานวิจัยได้ดำเนินการเผยแพร่ผลงาน นำเสนอด้วยวาจา ในที่ประชุมระดับชาติ รวมทั้งการตีพิมพ์สืบเนื่อง	มีนักวิชาการสนใจในการนำเสนอตามที่คาดหวัง
3.ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ	ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติที่มีค่า Impact Factor	ขอเปลี่ยนแปลง KPI เป็น นำเสนอในที่ประชุมวิชาการระดับชาติ