

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

บทบาทของฮอโมนเพศ
ต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ

โดย

รศ. จงกลณี วัฒนาเพิ่มพูล
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาของโครงการ ทั้ง 3 ท่าน คือ Prof. Dr. R. John Solaro (University of Illinois at Chicago) ศ.ดร. นทีทิพย์ กฤษณามระ และ ศ.ดร.เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์ ที่ให้คำปรึกษาอย่างต่อเนื่องตลอดโครงการ โดยเฉพาะ Prof. Dr. R. John Solaro ซึ่งกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในการดำเนินงานวิทยานิพนธ์ ของ นักศึกษาภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษกในด้านการตรวจวัดปริมาณของแคลเซียมอิสระ ภายในเซลล์ อีกทั้งขอขอบพระคุณ Assoc. Prof. Dr. Peter J. Reiser (Ohio State University) ที่ช่วย สอนเทคนิคการตรวจวัด Myosin Heavy Chain Isoforms แก่นักศึกษาภายใต้การควบคุมวิทยานิพนธ์ และขอขอบพระคุณ ศ.ดร.ประพนธ์ วิไลรัตน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเกี่ยวกับการตรวจวัด Calcium ATPase Activity

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา นางโกสุม วงศ์ไทย และ นางสาวชลลดา ยี่สาพิยะ ที่ ช่วยทำบัญชีเบิกจ่ายและพิมพ์รายงานต่างๆ และ นายเทพมนัส บุปผาอินทร์ มล นฤติ เกษมสันต์ และ นางสาวอริยพร ถาวรไกรวงศ์ นักศึกษาภายใต้การดูแลที่มีส่วนร่วมดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RSA/11/2544
ชื่อโครงการ : บทบาทของฮอโมนเพศต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ
ชื่อนักวิจัย : รศ.ดร. จงกลณี วัฒนาเพิ่มพูล
E-mail Address : tejwt@mahidol.ac.th
ระยะเวลาโครงการ: ธันวาคม 2543 – พฤศจิกายน 2546

บทบาทของฮอโมนเพศต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ ได้พบในเบื้องต้นแล้วว่าหัวใจของหนูขาวที่ขาดฮอโมนเพศจากรังไข่เป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ หลังการตัดรังไข่ จะทำงานผิดปกติไปในการทำงานเดียวกับพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลว งานวิจัยนี้จึงเน้นศึกษาเพื่อตอบคำถามต่อไปนี้ คือ 1) การออกกำลังกายเป็นประจำสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจที่พบหลังขาดฮอโมนเพศจากรังไข่เหมือนการให้ฮอโมนทดแทนหรือไม่? 2) ผลกระทบของการขาดฮอโมนเพศจากรังไข่ที่พบ เกิดจากกลไก และตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงใดในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ? และ 3) ฮอโมนเพศชายจากลูกอ๊อดจะมีผลกระทบต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหรือไม่ อย่างไร?

เมื่อให้หนูขาววิ่งออกกำลังกายบนลู่วิ่งไฟฟ้าด้วยโปรแกรมการวิ่งที่ 65-75% ของ maximum oxygen consumption เป็นเวลา 5 วัน/สัปดาห์ โดยเริ่มโปรแกรม 1 สัปดาห์หลังการผ่าตัด พบว่าการวิ่งออกกำลังกายเป็นประจำตลอดช่วงการขาดฮอโมนเพศหลังการตัดรังไข่ สามารถป้องกันทั้งการเปลี่ยนแปลงการทำงาน และการเพิ่มจำนวนของ β_1 -Adrenergic receptors ของหัวใจ ที่เหนี่ยวนำจากสภาวะขาดฮอโมนเพศจากรังไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการให้ฮอโมนเพศทดแทน

เมื่อศึกษาถึงกลไกและตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ที่ส่งผลให้การทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจเปลี่ยนแปลงหลังการตัดรังไข่ โดยเฉพาะการเพิ่มความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของแคลเซียม พบว่า ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ (Ca^{2+} transients) สำหรับการหดตัวของกล้ามเนื้อเปลี่ยนแปลงตามสมมติฐานที่ได้ตั้งไว้ คือ การขาดฮอโมนเพศจากรังไข่เป็นเวลานานสามารถทำให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์เพื่อการหดตัวลดลง ส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อปรับตัวให้เพิ่มความไวต่อการกระตุ้นของแคลเซียม เช่นเดียวกัน จำนวนของ β_1 -Adrenergic receptors ที่เพิ่มขึ้นหลังการขาดฮอโมนเพศน่าจะเป็นอีกกลไกการปรับตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เพื่อเพิ่มปริมาณของแคลเซียมภายในเซลล์สำหรับการหดตัว อีกทั้งการทำหน้าที่เก็บกลับแคลเซียมของ Sarcoplasmic reticulum ซึ่งพบทำงานได้ลดลงแต่ความไวเพิ่มขึ้น น่าจะเป็นอีกสภาวะการปรับตัวที่เกิดขึ้นของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพื่อให้ยังสามารถทำงานได้นั่นเอง

ส่วนบทบาทของฮอโมนเพศชาย พบว่า ในสภาวะปกติฮอโมนเพศชายมีความสำคัญต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจเช่นกัน แต่ถ้าในเลือดมีปริมาณฮอโมนแอนโดรเจนสูงเกิน จะกลับเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะ Hypertrophy ของหัวใจขึ้นอีกทั้งทำให้ปริมาณ β_1 -Adrenergic receptors ลดลง ซึ่งทั้งสองสภาวะที่พบมีลักษณะเช่นเดียวกับพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลว การศึกษาต่อในกลุ่มที่มีฮอโมนเพศชายสูงจะนำมาซึ่งข้อมูลพื้นฐานความรู้ที่จะยังประโยชน์ ทั้งในการหาแนวทางการป้องกัน และการรักษาโรคหัวใจได้ต่อไป

คำหลัก: เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ ฮอโมนเพศ การวิ่งออกกำลังกายเป็นประจำ แคลเซียมอิสระภายในเซลล์

ABSTRACT

Project Code : RSA/11/2540
Project Title : Role of Sex Hormones in Cardiac Myofilament Activation
Investigator : Assoc. Prof. Dr. Jonggonnee Wattanapermpool
E-mail Address : tejwt@mahidol.ac.th
Project Period : December 2000 – November 2003

Our previous studies have demonstrated the significant role of sex hormones in cardiac myofilament activity (1-3). Further experiments reported here focused on answering three questions. 1) Can exercise training be used as an alternative for preventing changes in cardiac myofilament activation in ovariectomized rat hearts? 2) Which mechanisms and sites of action in cardiac myofilament activity were induced by ovarian sex hormone deficiency? 3) Does male sex hormone play significant role in cardiac myofilament activity?

We approached the first question by subjecting the exercise groups one week after surgery to a nine-weeks of treadmill-running program of 65-75% maximum oxygen consumption. Results of our studies clearly indicate the cardio-protective effects of exercise training on changes in cardiac myofilament Ca^{2+} activation in ovariectomized rats. Alterations in expression of β_1 -adrenergic receptors and Hsp72 may in part play a mechanistic role in the cardio-protective effects.

As hypothesized, changes in myofilament Ca^{2+} activation after ovarian sex hormone deficiency was found to involve the suppressed magnitude of intracellular Ca^{2+} transients during cardiac contraction as well as prolongation of Ca^{2+} decay during relaxation. These results resemble many earlier reports in heart failure (33-38). Measurements of sarcoplasmic reticulum (SR) Ca^{2+} uptake activity demonstrated a decrease in maximum Ca^{2+} uptake activity but an increase in Ca^{2+} sensitivity for the uptake. These changes in SR Ca^{2+} uptake activity is correlated well with changes in SR Ca^{2+} pump (SERCA) activity. It is therefore possible that a reduction in intracellular Ca^{2+} concentration induce after long term deprivation of ovarian sex hormones stimulated many adaptive mechanisms including an increase in the amount of β_1 -adrenergic receptors, and an increase in SR Ca^{2+} uptake sensitivity via SERCA activity in order to maintain the cardiac function.

Besides ovarian sex hormone, male sex hormone was also found to be significant for the cardiac function. Suppression of maximum myofilament actomyosin ATPase activity was detected in castrated rats. However, in male rats with high testosterone level in the plasma after injection, cardiac hypertrophy was induced. Moreover, the amount of β_1 -adrenergic receptors was suppressed. Hypertrophy and reduced β_1 -adrenergic receptor level were also indicators of heart failure. It is therefore very interesting to study more on the high-dose testosterone model to explore information on the role of male sex hormones in cardiac myofilament activity.

Keywords: cardiac myofilaments, sex hormones, exercise training, intracellular free calcium

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วิธีการทดลอง	3
ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล	8
เอกสารอ้างอิง	26
Output ของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว	28
ภาคผนวก	29

บทนำ

ปัญหาของโรคกล้ามเนื้อหัวใจ ล้วนเป็นปัญหาใหญ่ที่ส่งผลสุดท้ายให้ผู้ป่วยถึงแก่ความตายด้วยโรคหัวใจล้มเหลว ซึ่งแต่ละปีมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคหัวใจในอัตราที่สูงมาก โดยข้อมูลทางสถิติของอัตราการเกิดโรคหัวใจล้มเหลว ได้แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างกลุ่มผู้ป่วยเพศหญิงและชายที่อายุต่าง ๆ กัน โดยหญิงวัยเจริญพันธุ์มีอัตราการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวน้อยมากเมื่อเทียบกับเพศชายในอายุที่ใกล้เคียงกัน(1) แต่อัตราการเกิดโรคจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน (2-4) จนเท่าอัตราในผู้ชาย ข้อมูลเหล่านี้ทำให้ตั้งข้อสังเกตได้ 2 ข้อคือ 1) เป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเพศที่หลั่งจากรังไข่ในวัยเจริญพันธุ์นั้น อาจมีบทบาทสำคัญในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือด (Protective role) ซึ่งจะเป็นผลให้เกิดโรคหัวใจต่าง ๆ ได้ หรือ 2) เป็นไปได้ว่าฮอร์โมนเพศชายที่หลังจากลูกอันธะอาจมีผลกระตุ้นเสริม (Potentiating role) ต่อการทำงานของระบบหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคหัวใจต่าง ๆ ได้ง่าย แม้ว่าความแตกต่างของเพศต่อการเกิดโรคหัวใจจะเห็นเด่นชัด และมีสมมติฐานที่น่าจะเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศที่แตกต่างกันต่อการทำงานของหัวใจ แต่ความรู้และความเข้าใจพื้นฐานถึงนัยสำคัญของฮอร์โมนเพศต่าง ๆ เหล่านี้ ต่อการทำงานของหัวใจ โดยเฉพาะต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรงนั้นยังมีอยู่น้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากความจำกัดด้านเทคนิคการศึกษา จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาให้ทราบถึงความสัมพันธ์ของฮอร์โมนเพศเหล่านี้ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งจะทำให้ได้มาซึ่งองค์ความรู้ใหม่ที่จะสามารถนำมาใช้เป็นแนวทางในการรักษาและป้องกันโรคกล้ามเนื้อหัวใจในผู้ป่วย ซึ่งอาจมีความแตกต่างกันจากอิทธิพลของฮอร์โมนเพศที่แตกต่างกันนั่นเอง

การศึกษาเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการของเรา ซึ่งมุ่งประเด็นการศึกษาที่บทบาทของฮอร์โมนเพศหญิงจากรังไข่ต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่า หนูที่ขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เป็นเวลา 10 สัปดาห์จะมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจอย่างมีนัยสำคัญ(5) คือมีการลดลงของ maximum actomyosin ATPase activity ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเกิดปฏิกิริยาการหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ยังทำให้เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มความไวต่อการกระตุ้นโดยแคลเซียม (Hypersensitivity) เพื่อการหดตัว ผลการศึกษานี้มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงในทำนองเดียวกับรายงานการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในคนที่ เป็นโรคหัวใจชนิดต่าง ๆ (6-9) จึงเป็นไปได้อย่างมาก ที่การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เป็นเวลานานจะเป็นสาเหตุนำมาซึ่งพยาธิสภาพของหัวใจ เช่น cardiomyopathy จนทำให้เกิดการเพิ่มความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของแคลเซียม เพื่อเป็นการปรับตัวให้ยังคงสามารถทำงานได้ในสภาวะที่มีพยาธิสภาพของหัวใจนั่นเอง

การศึกษาต่อมาโดยใช้เทคนิค Single Skinned Fiber Preparation พบว่าการเพิ่มความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของแคลเซียมภายหลังการตัดรังไข่ สามารถพบเช่นกันในการตรวจวัดแรงหดตัวของเส้นใย Trabeculae จากหัวใจห้องล่าง โดยการเปลี่ยนแปลงนี้ เกิดจำเพาะที่กล้ามเนื้อหัวใจเท่านั้น แต่จะไม่พบที่กล้ามเนื้อลาย(10) นอกจากนี้ยังพบว่า การเปลี่ยนแปลงการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจนี้เป็นผลจากการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ โดยไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับน้ำหนักตัวของหนูที่เพิ่มขึ้น

หลังจากการขาดฮอร์โมนเพศ(11) และการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ภายหลังการตัดรังไข่เพียงพอที่จะป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจเหล่านี้ได้(11)

ปัจจุบันเป็นที่ทราบดีว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในหญิงวัยหมดประจำเดือนนั้น มักก่อให้เกิดผลข้างเคียงตามมา เช่นการเกิดมะเร็งเต้านม จึงเกิดคำถามว่า มีวิธีอื่นใดหรือไม่ที่ปลอดภัยและประหยัด ซึ่งสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนจากรังไข่เหล่านี้ได้? การแพทย์ปัจจุบันได้นำการออกกำลังกายมาเป็นส่วนหนึ่งในการรักษาและฟื้นฟูผู้ป่วยโรคหัวใจต่างๆ รวมทั้งโรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน(12-14) ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลการศึกษาได้บ่งชี้ความเป็นไปได้ของการออกกำลังกายเป็นประจำ(exercise training) ในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจจากพยาธิสภาพหลายอย่างได้ (6, 15, 17) หากการออกกำลังกายสามารถเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้แทนการให้ฮอร์โมนทดแทนในหญิงวัยหมดประจำเดือนได้ จะเป็นข้อปฏิบัติที่มีคุณค่ามากในการป้องกันรักษาโดยไม่ต้องสิ้นเปลืองการใช้ยาต่างๆ ซึ่งล้วนต้องส่งข้อจำกัดกลับมาจากต่างประเทศ

สำหรับกลไกและตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ นั้น การศึกษาเบื้องต้นพบว่า อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมอิสระภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ การศึกษาต่อให้ทราบถึงกลไกและตำแหน่งการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศจากรังไข่ ย่อมทำให้ได้มาซึ่งพื้นฐานความรู้ความเข้าใจถึงการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนเหล่านั้นได้ ซึ่งจะยังประโยชน์อย่างมากในการหาแนวทางการป้องกันและการรักษาโรคต่อไปได้

เมื่อเปรียบกับการศึกษาของฮอร์โมนเพศหญิง การศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจมีน้อยกว่ามาก อีกทั้งข้อมูลที่มีในปัจจุบันยังมีความขัดแย้งมากในแง่บทบาทของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของหัวใจ นั่นคือ มีทั้งที่ชี้ถึง Potentiating action ของฮอร์โมนแอนโดรเจนในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหัวใจ และที่ชี้ถึงนัยสำคัญของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของหัวใจ จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งที่จะศึกษาให้ทราบถึงความสัมพันธ์หรือบทบาทของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรง

โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อศึกษาบทบาทของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ โดยแบ่งการศึกษาตามวัตถุประสงค์ย่อยของโครงการ เพื่อตอบคำถามดังต่อไปนี้คือ

- I. การออกกำลังกายเป็นประจำจะเป็นอีกทางเลือกเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ได้หรือไม่ อย่างไร?
- II. ผลกระทบของการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ที่พบ เกิดจากกลไกและตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงใดในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ?
- III. ฮอร์โมนเพศชายจากลูกอัณฑะมีผลกระทบต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจหรือไม่ อย่างไร?

วิธีการทดลอง

ระเบียบวิธีวิจัยของแต่ละวัตถุประสงค์ย่อย

- I. การออกกำลังกายเป็นประจำจะเป็นอีกทางเลือก เพื่อการป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ได้หรือไม่อย่างไร?

จะดำเนินการศึกษาเป็น 3 ส่วน คือ

i) Biochemical Study

จะแบ่งหนูขาว Sprague Dawley ออกเป็น 4 กลุ่มดังนี้คือ

- กลุ่มควบคุมที่ไม่ออกกำลังกาย (Sedentary)
- กลุ่มควบคุมที่ออกกำลังกาย (Exercise)
- กลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ไม่ออกกำลังกาย (Ovariectomized Sedentary)
- กลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ออกกำลังกาย (Ovariectomized Exercise)

หนูขาวจะได้รับการผ่าตัดรังไข่ภายใต้การสลบด้วย Nembutal ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะผ่านขั้นตอนการสลบและการผ่าตัดเหมือนกลุ่มทดลองแต่ไม่ตัดรังไข่ออก จากนั้นหนูทุกกลุ่มจะได้รับการดูแลในสภาวะที่เหมือนกันอย่างถูกต้องตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของคณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดลเป็นเวลา 10 สัปดาห์หลังการผ่าตัด และจะเริ่มการฝึกหนูกลุ่มออกกำลังกายให้วิ่งบนจักรยานไฟฟ้าที่ 1 สัปดาห์หลังการผ่าตัด เมื่อครบสัปดาห์แรกของการฝึกจะให้หนูวิ่งออกกำลังกายต่อในสัปดาห์ถัดไปเป็นเวลา 1 ชั่วโมง/วัน 5 วัน/สัปดาห์ ที่โปรแกรมการวิ่ง 65-75% ของ Max. Oxygen Consumption โดยปรับโปรแกรมการวิ่งตามน้ำหนักตัวของหนูตามการคำนวณของ Bedford et al.(1979) (17) เมื่อครบ 10 สัปดาห์ จะนำหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูขาวมาเตรียมเส้นใยกล้ามเนื้อ เพื่อตรวจวัด Ca^{2+} -dependent actomyosin ATPase activity ที่ pH 7.0

ii) Receptor Study

เป็นที่ทราบดีว่าการกระตุ้นของ β_1 -adrenergic receptors ที่ผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งที่ Ca^{2+} -channels บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อ และ Ca^{2+} -ATPase บน sarcoplasmic reticulum (SR) ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมที่สำคัญภายในเซลล์กล้ามเนื้อ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของปริมาณหรือความสามารถในการจับ agonist ของ β_1 -adrenergic receptors ที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจย่อมมีผลกระทบให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ได้ จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของการออกกำลังกายต่อการเปลี่ยนแปลงของ receptors นี้ในหนูขาดฮอร์โมนเพศเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

iii) Heat Shock Protein Study

การออกกำลังกายจะเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง Heat-induced endogenous protective protein (Heat Shock Protein 72, Hsp72) ซึ่งมีรายงานแล้วว่ามีคุณสมบัติเป็น cardio-protective factor (18) โดย Hsp72 ในหัวใจหนูขาวตัวเมียจะมีมากกว่าตัวผู้ถึงสองเท่า (19) อีกทั้งการขาดฮอร์โมนเพศหลัง

การตัดรังไข่จะทำให้ปริมาณ Hsp72 ลดลง จึงเป็นที่น่าสนใจว่าการออกกำลังกายเป็นประจำอาจสามารถเหนี่ยวนำการสร้าง Hsp72 ในหัวใจหนูขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ จึงตรวจวัดปริมาณของ Hsp72 ของหนูทั้ง 4 กลุ่มเปรียบเทียบกับด้วยวิธี Immunoblot Analysis

II. ผลกระทบของการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ที่พบเกิดจากกลไกและตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงใดในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ?

จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการของเราซึ่งพบว่า การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่มีผลกระทบต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ คือเหนี่ยวนำให้การเพิ่มความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของแคลเซียม ทั้งนี้ อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ที่ใช้ในการกระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อ การศึกษานี้จึงเน้นศึกษาถึงผลกระทบที่ SR ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญที่สุดในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในการทำหน้าที่ควบคุมปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ ทั้งด้านการเก็บ การสะสม และการปล่อยแคลเซียม เพื่อใช้ในการหดตัวเมื่อได้รับการกระตุ้น โดยแบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วนย่อยคือ

- i) **SR Ca^{2+} -uptake Study:** เพื่อตรวจวัดความสามารถรวมในการดึงเก็บ Ca^{2+} เข้า SR
 - ii) **SR Ca^{2+} -ATPase Activity:** เพื่อตรวจวัดการทำงานของ ATPase pump โดยตรง
 - iii) **Intracellular Free Calcium Study:** เพื่อตรวจวัดปริมาณของ Ca^{2+} ภายในเซลล์
- สำหรับส่วนที่ i และ ii จะดำเนินการศึกษาในหนู 5 กลุ่ม คือ

1. กลุ่มควบคุม (SHAM + Oil)
2. กลุ่ม OVX ควบคุม (OVX + Oil)
3. กลุ่ม OVX ที่ทดแทนด้วย Estrogen (OVX + E_2)
4. กลุ่ม OVX ที่ทดแทนด้วย Progesterone (OVX + Prog.)
5. กลุ่ม OVX ที่ทดแทนด้วย Estrogen + Progesterone (OVX + E_2 + Prog.)

ส่วนการศึกษาย่อยที่ iii จะดำเนินการศึกษาในหนูเพียง 3 กลุ่มแรกเท่านั้น โดยหนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการฉีดฮอร์โมนเข้าใต้ผิวหนัง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ตั้งแต่วันที่ 2 หลังการผ่าตัดรังไข่จนสิ้นสุดการทดลอง โดยทุกกลุ่มจะศึกษาในช่วงเวลาใกล้เคียงกันและจำนวนครั้งการฉีดฮอร์โมนเท่ากัน เมื่อครบกำหนดเวลาจะตัดเอาหัวใจห้องล่างซ้ายมาเตรียม Homogenate สำหรับตรวจวัด SR Ca^{2+} uptake หรือเตรียม SR Membrane vesicle สำหรับตรวจวัด SR Ca^{2+} -ATPase Activity และเตรียม Cardiac myocytes สำหรับการตรวจวัด Ca^{2+} Transients

III. ฮอร์โมนเพศชายจากลูกอัณฑะมีผลกระทบต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจหรือไม่ อย่างไร?

เนื่องจากข้อมูลด้านบทบาทของฮอร์โมนเพศชายมีอยู่น้อยและมีความขัดแย้ง ในส่วนการศึกษานี้จึงแบ่งศึกษา 2 กลุ่มการทดลองคือ

- i) กลุ่มขาดฮอร์โมนเพศหลังตัดลูกอัณฑะ (Orchidectomy)
- ii) กลุ่มฮอร์โมนเพศชายในเลือดสูงจากการฉีดเสริม

โดยศึกษาทั้งด้านการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจด้วย Biochemical Study และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ β_1 -adrenergic receptors บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูทั้ง 2 กลุ่มการศึกษา ดังกล่าว

วิธีการวิจัยทั่วไป

I. การเตรียมส่วนประกอบเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจและการตรวจวัด Ca^{2+} -dependent actomyosin ATPase activity

โปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อ จะเตรียมจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูขาวตามวิธีของ Pagani & Solaro, 1984 (20) โดยนำเนื้อเยื่อหัวใจมาบดละเอียดด้วย Omni mixer homogenizer และ glass-glass homogenizer แล้วสกัดด้วย Triton X-100 ทำให้สะอาดโดยล้างประมาณ 3-4 ครั้งด้วย Standard buffer ซึ่งประกอบด้วย 60 mM KCl, 30 mM imidazole, pH 7.0, 2 mM MgCl_2 และ protease pepstatin A (0.5 mg/ml) และ PMSF (0.2 mM) ปริมาณโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่เตรียมได้ จะตรวจวัดโดยวิธีของ Lowry et al. 1951 (21)

Ca^{2+} -dependent actomyosin ATPase activity ของเส้นใยกล้ามเนื้อที่เตรียมได้จะตรวจวัด โดยการวัดปริมาณอินทรีรีฟอสเฟตที่ปล่อยออกมาจากปฏิกิริยาที่ 30°C ซึ่งประกอบด้วยเส้นใยกล้ามเนื้อประมาณ 4-5 mg/ml ใน 2 mM Mg^{2+} , 60 mM imidazole, 5 mM MgATP^{2-} 120 mM ionic strength, pH 7.0 หรือ 6.5 ตามลำดับ ปริมาณของแคลเซียมไอออนอิสระในปฏิกิริยาจะแตกต่างกันจากความเข้มข้นที่ pCa (-log of molar free calcium) เท่ากับ 7.5 ถึง 4.875 ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารต่างๆในปฏิกิริยาได้จากโปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งใช้ค่าคงที่การแยกตัวของสาร (dissociation constants) ตามรายงานของ Fabiato, 1981 (22). ความเข้มข้นของอินทรีรีฟอสเฟตจะตรวจวัดตามวิธีของ Carter & Karl, 1982 (23) ความสัมพันธ์ระหว่าง pCa-ATPase activity จะสร้างขึ้นโดยใช้ Nonlinear least square regression ที่จะเข้ากับสมการ Hill equation ดังนี้คือ

$$\text{relative activity} = [\text{Ca}^{2+}]^n / (K + [\text{Ca}^{2+}]^n)$$

- ค่า $K = \text{pCa}_{50}$ = ค่าความเข้มข้นของแคลเซียมอิสระที่ให้ 50% ของปฏิกิริยาสูงสุด ซึ่งจะบ่งบอกความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นด้วยแคลเซียมไอออน
- ค่า $n = \text{Hill coefficient}$ = ค่าทางอ้อมที่บ่งถึง cooperativity ของโปรตีนบนเส้นใยกล้ามเนื้อเมื่อเกิดปฏิกิริยา
- ค่าของ ATPase activity ที่ปริมาณแคลเซียมต่ำ ($\text{pCa}=7.5$) และสูง ($\text{pCa}=4.875$) จะบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อที่สภาวะคลายตัวและหดตัวตามลำดับ

II. การตรวจวัดปริมาณและความสามารถในการเกาะจับ β_1 -adrenergic receptors

ผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะเตรียมจากกล้ามเนื้อส่วน left ventricle ของหัวใจหนูขาว โดยดัดแปลงวิธีของ Baker & Potter, 1980 (24) ซึ่งทำได้โดยนำเนื้อเยื่อหัวใจมาบดด้วย homogenizer แล้ว

ปั่นตกตะกอนที่ 49,000 g ใน 50 mM Tris-HCl-1mM EGTA buffer จำนวน 2 ครั้ง pellet สุดท้ายที่ได้ จะทำให้แขวนตะกอนใน buffer เดิมและพร้อมสำหรับการตรวจวัด receptors และปริมาณโปรตีน

การตรวจวัดปริมาณและความสามารถในการเกาะจับของ β_1 -adrenergic receptor จะใช้ [3 H]Dihydroalprenolol ([3 H]-DHA) ตามวิธีของ Cervoni และคณะ, 1981 (29) โดยย่อแล้วคือ incubate ส่วนผสมของผนังเซลล์กล้ามเนื้อและ [3 H]-DHA ปริมาณต่างๆ ระหว่าง 0.5-40 nM ที่ 25° C เป็นเวลา 20 นาที ใน metabolic shaker ที่ความเร็วการเขย่า 60 ครั้ง/นาที จากนั้นกรองส่วนผสมของปฏิกิริยา ด้วย Whatman glass fiber filters แล้วล้างอีกประมาณ 4 ครั้งด้วย ice-cold Tris-EGTA (pH 8.0) เพื่อกำจัดส่วนของสารรังสีที่ไม่เกิดการจับออกให้หมด เป้าแผ่นกระดาษกรองให้แห้งแล้วเติม scintillation fluid เพื่อทำการตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง Liquid scintillation spectrometer สำหรับ nonspecific binding นั้น จะทำการตรวจวัดในส่วนผสมของปฏิกิริยาเมื่อเติม 20 μ M ของ (-)-alprenolol อยู่ด้วย

ข้อมูลที่ได้จะคำนวณหาค่าคงที่การจับตัว ค่าคงที่การแยกตัว (dissociation constant, K_d) และปริมาณของ receptor (receptor density, B_{max}) โดยใช้ Scatchard plots แบบ Linear regression analysis ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

III. การเตรียม Cardiac Homogenate และการตรวจวัด SR Ca^{2+} -Uptake

Cardiac Homogenate จะเตรียมจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย โดยการบดด้วย Teflon-glass Thomas tissue grinder ซึ่งใช้การหมุนด้วย motor ที่ความเร็วรอบ 600 rpm เป็นจำนวน 20-40 ครั้ง จากนั้นกรองผ่านผ้ากรองเพื่อเอากากออก Filtrate ที่กรองได้จะมีทั้ง SR Vesicles และ Mitochondria อยู่ด้วย ดังนั้นการตรวจวัดจะใช้ Sodium Azide ยับยั้ง Ca^{2+} -uptake ของ Mitochondria

SR Ca^{2+} -Uptake จะตรวจวัดตามวิธีของ Pagani & Solaro (1984) และ Edes et al. (1995) (25) ที่ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ต่างๆ ในช่วง pCa ($-\log [freeCa^{2+}]$) 8.0 ถึง 4875, pH 7.0, 37° C โดยมี Ca^{45} อยู่ด้วย ปฏิกิริยาจะเริ่มต้นเมื่อเติม 5 mM ATP และปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาโดยมีการเขย่าตลอดเวลาเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นจะกรองปฏิกิริยาส่วนหนึ่งผ่าน Millipore filter พร้อมตรวจวัดส่วนที่กรองและส่วนที่เหลือของปฏิกิริยาด้วยเครื่อง β -counter เพื่อการคำนวณหาค่าการดักเก็บ

IV. การเตรียม SR Membrane Vesicles และการตรวจวัด SR Ca^{2+} -ATPase Activity

SR Membrane Vesicles จะเตรียมจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย ซึ่งผ่านการบดด้วยหัวปั่นบด และการ centrifuge หลายขั้นตอน เพื่อกำจัดโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อและอื่นๆที่ไม่ต้องการ กระทั่งในขั้นตอนสุดท้ายจะปั่นด้วย Sucrose Gradient Ultracentrifugation ที่ 40,000 rpm เพื่อให้ได้ SR vesicles ซึ่งสามารถเก็บที่ -80 °C กระทั่งการใช้ตรวจวัด

SR Ca^{2+} -ATPase Activity จะตรวจวัดโดยวิธีการ Triple enzyme assay (Ca^{2+} -ATPase, Pyruvate kinase และ Lactate dehydrogenase) เพื่อให้ได้สารตรวจวัดสุดท้ายคือ NAD^+ ตามวิธีของ Chu et al. (1988) (26) ซึ่งจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของ NADH อย่างต่อเนื่อง ที่การดูดกลืนแสง 340

นาโนเมตร ในช่วงที่การเปลี่ยนแปลงเป็นแบบ Linear นาน 5 นาที ทั้งนี้จะตรวจวัดปฏิกิริยาของเอนไซม์ ที่ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ต่างๆกันจาก pCa 8 ถึง 5, pH 7.0

V. การตรวจวัด Ca^{2+} Transients ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะเตรียมโดยการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ Collagenase ตามรายงาน ของ Wolska et al. (1996) (27) จากนั้นจะนำเซลล์มาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ในวงจรการหด-คลายตัวของเซลล์ โดยใช้สาร Fura2 fluorescence technique ซึ่งสารดังกล่าวจะปล่อย แสง Fluorescence ได้ เมื่อมี Ca^{2+} มาจับ จึงตรวจวัดการปล่อยสัญญาณแสงที่ความยาวคลื่น 340 และ 380 นาโนเมตร เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณ Ca^{2+} อิสระได้

ผลการทดลองและการวิจารณ์ผล

1) ศึกษาความเป็นไปได้ของการออกกำลังกายเป็นประจำในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่

Table 1. Body, heart, uterine, and plantaris citrate synthase activities from sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups.

	SEDENTARY		EXERCISE	
	SHAM	OVX	SHAM	OVX
Body weight, g	265 ± 5.1	336 ± 7.5*	280 ± 3.9*	324 ± 3.2*
Heart weight, g	0.80 ± 0.02	0.93 ± 0.01*	0.89 ± 0.02*	0.95 ± 0.02*
Uterine weight, g	0.56 ± 0.03	0.11 ± 0.00*	0.53 ± 0.04	0.10 ± 0.009*
Soleus weight, g	0.094 ± 0.001	0.128 ± 0.005*	0.118 ± 0.004*	0.118 ± 0.003*
% Heart/body	0.304 ± 0.004	0.278 ± 0.005*	0.318 ± 0.004*	0.293 ± 0.003 [#]
% Soleus/body	0.037 ± 0.001	0.038 ± 0.001	0.039 ± 0.001	0.036 ± 0.000
Citrate synthase activity (μmole/g protein/min)	44.6 ± 1.9	44.4 ± 1.9	57.8 ± 1.9*	52.4 ± 1.6*

Values are means ± SE of 8-9 rats. * *P* < 0.05 and [#] *P* < 0.05 represent significant difference from sedentary-sham controls and sedentary-ovariectomized rats, respectively.

ผลการทดลองในตารางที่ 1. แสดงถึงค่าน้ำหนักตัว น้ำหนักหัวใจ น้ำหนักมดลูก และค่าปฏิกิริยาเอนไซม์ Citrate Synthase ของกล้ามเนื้อลายส่วน Plantaris ของหนูทั้ง 4 กลุ่มการทดลอง จะเห็นว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ตัดรังไข่ เมื่อได้ออกกำลังกายจะมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่การขาดฮอร์โมนเพศภายหลังการตัดรังไข่ จะมีผลให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่าแม้หนูจะออกกำลังกายหรือไม่ก็ตาม ในทำนองเดียวกัน น้ำหนักหัวใจที่เพิ่มขึ้นภายหลังการออกกำลังกายเป็นประจำ ยังคงน้อยกว่า น้ำหนักของหัวใจที่เพิ่มขึ้นภายหลังการตัดรังไข่ ไม่ว่าจะออกกำลังกายหรือไม่ก็ตาม โดยการออกกำลังกายเป็นประจำภายหลังการขาดฮอร์โมนจากรังไข่นั้น ไม่มีผลกระทบเสริมต่อน้ำหนักตัวและหัวใจแต่อย่างใด เมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงสภาวะ Hypertrophy ของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าการออกกำลังกายในหนูปกติจะทำให้ขนาดของหัวใจเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ในทางตรงกันข้าม การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่กลับมีผลกระทบให้ขนาดของหัวใจเล็กลงจากกลุ่มควบคุม แต่การออกกำลังกายเป็นประจำภายหลังการตัดรังไข่ยังคงส่งผลให้เพิ่มขนาดของหัวใจให้กลับเป็นปกติเท่ากลุ่มควบคุม โดยการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหัวใจเฉพาะห้องล่างซ้ายของหนูแต่ละกลุ่ม สอดคล้องในทำนองเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักหัวใจที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการออก

กำลังกายเป็นประจำ มีอิทธิพลในการเพิ่มความสามารถในการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจโดยเฉพาะจากหัวใจห้องล่างซ้ายแม้ในสภาวะขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ก็ตาม ทั้งนี้การลดลงของน้ำหนักมดลูกในหนูตัวผู้ยืนยันภาวะการขาดฮอร์โมนเพศอย่างชัดเจน นอกจากนี้ ระดับของการออกกำลังกายเป็นประจำ สามารถยืนยันได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ Citrate Synthase ของกล้ามเนื้อขาหลังของหนูกลุ่มออกกำลังกายโดยไม่มีผลกระทบจากการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่แต่อย่างใด

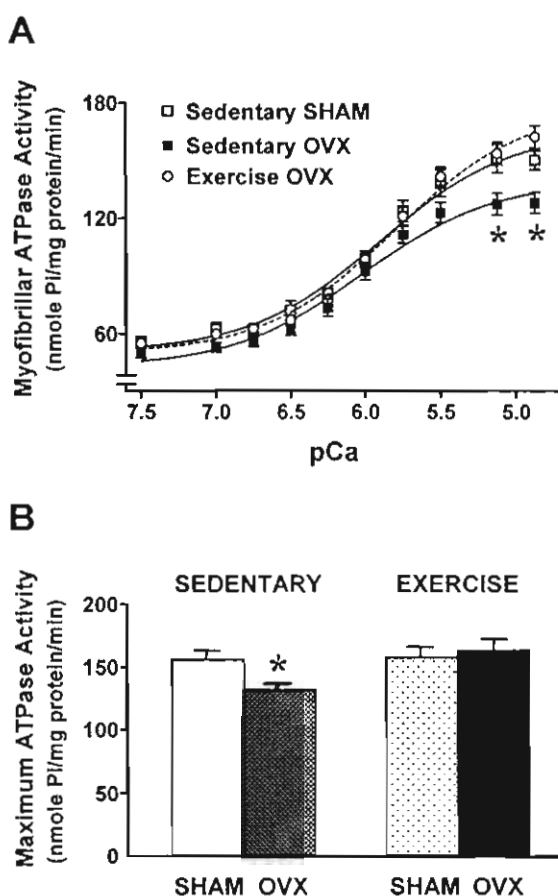


Fig. 1. (A) Effects of ovariectomy and exercise training on the Ca^{2+} -dependent MgATPase activities of cardiac myofibrils in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875, pH 7.0. **(B)** Comparisons of maximum MgATPase activities between sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups. Data are means $\pm$ SE from 8-9 preparations with 2-3 rat hearts for each preparation. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

เมื่อตรวจวัดค่าปฏิกิริยาการหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ (Ca^{2+} -activated actomyosin ATPase activity) ของหัวใจหนูแต่ละกลุ่ม ได้ค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุด (maximum acto-myosin ATPase activity) และค่าความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นโดยแคลเซียม (calcium sensitivity) ซึ่งแสดงด้วยค่า pCa_{50} ดังสรุปในรูปที่ 1 และ 2 ตามลำดับ พบว่า การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่มีผลลดค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุดน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงข้าม การออกกำลังกายเป็นประจำ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุดของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจในหนูปกติ แต่การออกกำลังกายภายหลังการตัดรังไข่ สามารถป้องกันการลดลงของค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุดนี้ได้

มีประสิทธิภาพ คือกลับมาเป็นปกติเท่ากับกลุ่มควบคุม ในทำนองเดียวกัน การออกกำลังกายเป็นประจำไม่
มีผลกระทบต่อความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นโดยแคลเซียมแต่อย่างไร แต่ค่าความไวนี้จะมี
ค่ามากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูตัดรังไข่ และเช่นเดียวกับการออกกำลังกายเป็นประจำจะสามารถ
ป้องกันการเพิ่มความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจต่อการกระตุ้นของแคลเซียมให้กลับเป็นปกติได้ เมื่อ
ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของ Myosin Heavy Chain (MHC) isoforms ของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจกลุ่ม
ต่างๆนี้ พบว่า การเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของ MHC จาก α -MHC เป็น β -MHC ในหัวใจหนูขาด
ฮอร์โมนเพศจากรังไข่นั้น สามารถกลับเป็นปกติเหมือนกลุ่มควบคุมเมื่อให้หนูออกกำลังกายเป็นประจำ
ภายหลังการตัดรังไข่ ดังแสดงในรูปที่ 3 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นอย่างชัดเจนว่าการออกกำลังกายเป็น
ประจำ สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจที่เกิดขึ้นจากสภาวะขาดฮอร์โมนเพศจากรัง
ไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

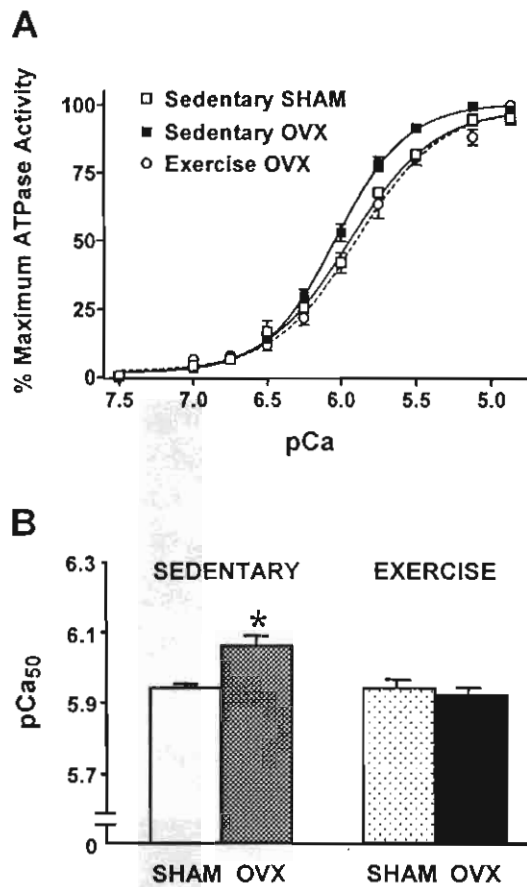


Fig. 2. (A) Effects of ovariectomy and exercise training on the % maximum MgATPase activities of cardiac myofibrils in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875, pH 7.0. **(B)** Comparisons of pCa₅₀ determinants between sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups. Data are means $\pm$ SE from 8-9 preparations with 2-3 rat hearts for each preparation. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

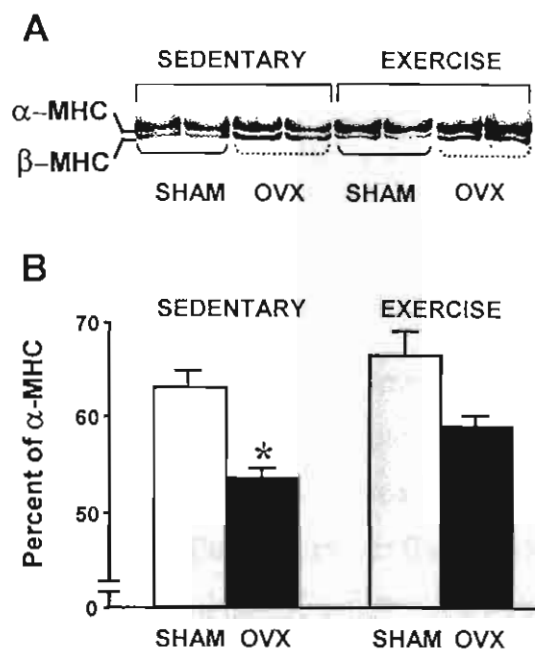


Fig. 3. (A) Myosin heavy chain (MHC) region of SDS gels on which were samples of left ventricular trabeculae from sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups. (B) Relative amount of α -MHC (as a percentage of total MHC) of left ventricular trabeculae from each group. Data are means $\pm$ SE from 8 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

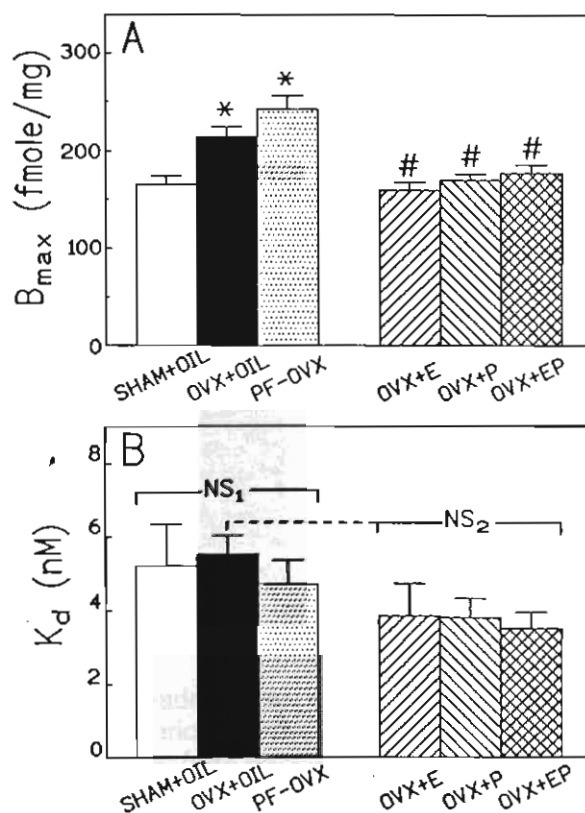


Fig. 4. The density (B_{max} , A) and dissociation constant (K_d , B) of β_1 -adrenergic receptors in cardiac membrane preparations from sham control injected with oil (SHAM+OIL), paired ovariectomized rats (PF-OVX), and various groups of ovariectomized rats injected with oil (OVX+OIL), estrogen (OVX+E), progesterone (OVX+P), or estrogen plus progesterone (OVX+EP). Values represent mean $\pm$ SE of 7-8 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from SHAM+OIL using Student-Newman-Keuls Test after ANOVA. # $P < 0.05$ = significantly different from OVX+OIL using Student-Newman-Keuls Test after ANOVA. NS = not significantly different among the groups.

การศึกษาต่อมาได้ตรวจวัดปริมาณและความสามารถในการจับจำเพาะของ β_1 -adrenergic receptor บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยใช้สาร H_3 -DHA (Tritiated Dihydroalprenolol) ในหนูกลุ่มต่างๆที่ให้ฮอร์โมนทดแทน และหนูกลุ่มออกกำลังกายเป็นประจำ ผลการศึกษาในรูปที่ 4 และ 5 แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การขาดฮอร์โมนเพศเป็นเวลา 10 สัปดาห์ จะเหนี่ยวนำให้ปริมาณของ receptors เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการจับจำเพาะของ receptors แต่อย่างใด ซึ่งปัจจุบันเป็นที่ทราบแล้วว่าการเพิ่มปริมาณของ β_1 -adrenergic receptors ที่หัวใจจะเป็นโทษต่อการทำงานของหัวใจ (28) นอกจากนี้พบว่า การให้ฮอร์โมนทดแทนทั้ง estrogen หรือ progesterone ล้วนสามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนของ β_1 -adrenergic receptors ได้ เช่นเดียวกับการวิ่งออกกำลังกายเป็นประจำหลังการตัดรังไข่ สามารถป้องกันการเพิ่มจำนวนของ receptors ได้ ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการออกกำลังกายเป็นประจำสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจได้ โดยอาจมีกลไกหนึ่งผ่านการป้องกันการเพิ่มขึ้นของ β_1 -adrenergic receptors ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

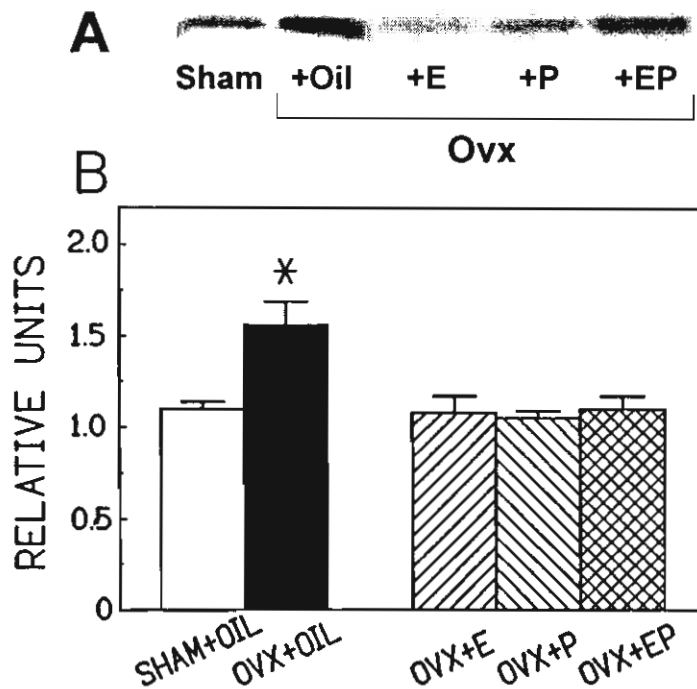


Fig. 5 Immunoblot of β_1 -adrenergic receptor proteins from left ventricular homogenates of various groups of rat hearts (A) and summary of immunoblot analyses from each group (B). Data are presented as mean $\pm$ SE of 4-6 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from other groups using Student-Newman-Keuls Test after ANOVA.

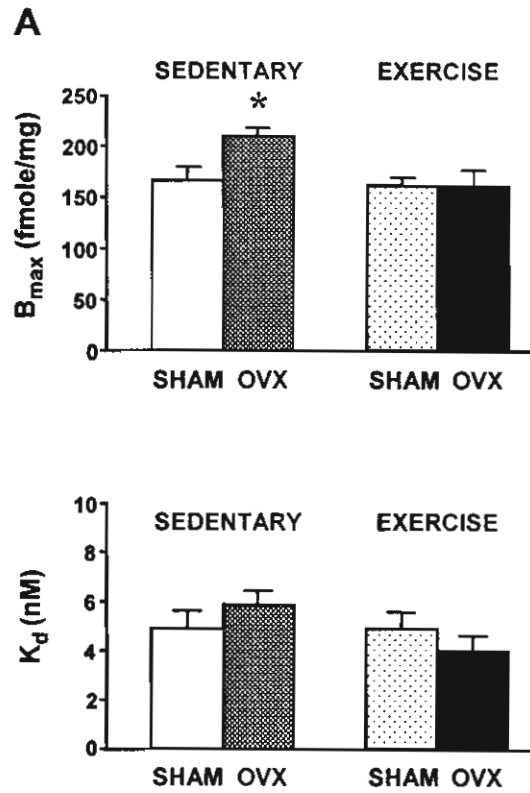


Fig. 6. Comparisons of density (B_{max} , **A**) and dissociation constant (K_d , **B**) of cardiac β_1 -adrenergic receptors in left ventricular membrane preparations from sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups. Data are means $\pm$ SE of 8 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

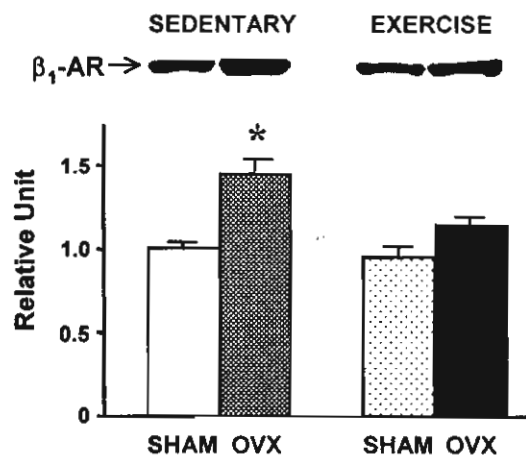


Fig. 7. Region of β_1 -adrenergic receptor proteins on immunoblots on which were samples of left ventricular homogenates from sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups (**upper panel**) and comparisons of the relative intensity unit from densitometry of immunoblots from each group (**lower panel**). Data are means $\pm$ SE from 4 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Heat Shock Protein 72 (Hsp72) ซึ่งเป็นที่ทราบว่ามี ความสำคัญในการออกฤทธิ์เป็น Cardioprotective factor (29-31) พบว่า หัวใจของหนูตัดรังไข่มีปริมาณ ของ Hsp72 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่หนูออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอไม่ทำให้ Hsp72 แตกต่าง จากหนูกลุ่มควบคุม การออกกำลังกายเป็นประจำในหนูตัดรังไข่กลับสามารถป้องกันการลดลงของ Hsp72 ได้ ดังแสดงในรูปที่ 8 ผลการศึกษานี้สนับสนุนการแนะนำให้ออกกำลังกายเป็นประจำเพื่อเป็น อีกแนวทางในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่ แม้ว่าการศึกษานี้จะดำเนินการในสัตว์ทดลองซึ่งอาจไม่เกิดผลเหมือนในคน แต่การแนะนำให้ออกกำลัง กายเป็นประจำเสริมจากการป้องกันด้วยวิธีอื่นๆ เช่น การให้ฮอร์โมนทดแทน น่าจะยังประโยชน์ได้ดีต่อ สุขภาพโดยทั่วไป

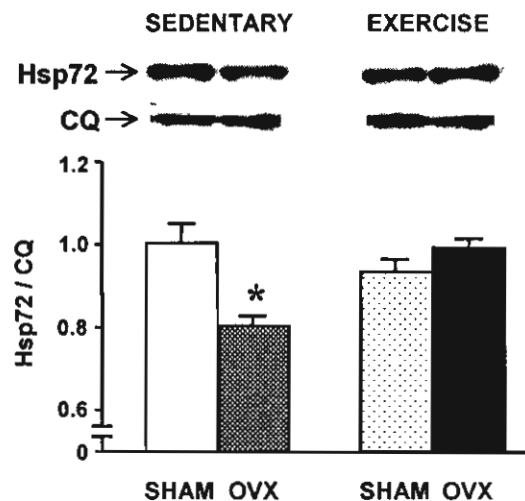


Fig. 8. Region of Hsp72 and calsequestrin on immunoblots on which were samples of left ventricular homogenates from sham controls (SHAM) and ovariectomized rats (OVX) of sedentary and exercise groups (upper panel) and comparisons of the relative Hsp72 to the relative calsequestrin intensity from densitometry of immunoblots from each group (lower panel). Data are means $\pm$ SE from 4 hearts. * $P < 0.05$ = significantly different from sedentary-sham controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

II) ศึกษากลไกและตำแหน่งการเปลี่ยนแปลงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่

ผลการศึกษาเบื้องต้นจากห้องปฏิบัติการของเรา ได้ชี้ให้เห็นความเป็นไปได้อย่างมากที่การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เป็นเวลานานในหนูขาว จะมีผลกระทบให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งส่งผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจเกิดการเปลี่ยนแปลงให้เพิ่มความไวต่อการกระตุ้นของแคลเซียม เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของหลายส่วนที่เกี่ยวข้องคือ ส่วนการทำงานของ Ca^{2+} channels บนผนังเซลล์ ส่วนการทำงานของ SR ซึ่งเป็นแหล่งเก็บและปล่อยแคลเซียมที่สำคัญภายในเซลล์ ส่วนการทำงานของโปรตีนบนผนังเซลล์ที่ทำหน้าที่ส่งแคลเซียมออกนอกเซลล์และอื่นๆ ในสภาวะปกติของร่างกายนั้น การทำงานของส่วนต่างๆดังกล่าว จะได้รับการปรับเปลี่ยนเมื่อมีการกระตุ้น β_1 -adrenergic

receptors บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ β_1 -adrenergic receptors ทั้งในแง่ของปริมาณและความสามารถในการจับ Agonists ของ Receptors (Binding affinity) ล้วนมีผลกระทบให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ได้ จึงได้เริ่มด้วยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ β_1 -adrenergic receptors ในหนูตัดรังไข่เปรียบเทียบกับหนู Sham ซึ่งพบแล้วว่า จำนวนของ receptors บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีค่าเพิ่มขึ้นในหัวใจหนูตัดรังไข่ โดยค่า Binding affinity ไม่เปลี่ยนแปลงดังแสดงในผลการศึกษานี้

การศึกษาในส่วนที่ 2 เน้นที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่ตำแหน่งการทำงานของ SR โดยตรวจวัดทั้ง SR Ca^{2+} -uptake และ SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity ทั้งนี้ SR Ca^{2+} -uptake จะตรวจวัดจาก Cardiac homogenates ที่เตรียมจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้าย ซึ่งจะมีทั้ง SR vesicles และ mitochondria อยู่รวมกัน ดังนั้นในการตรวจวัดจะใช้ Sodium azide เพื่อยับยั้ง Ca^{2+} -uptake ของ Mitochondria อีกทั้งยังยับยั้งการปล่อยแคลเซียมออกจาก SR ผ่านทาง Ryanodine receptors ด้วย Ruthenium Red จากนั้นตรวจวัด SR Ca^{2+} -uptake จากปริมาณของ Ca^{45} -EGTA ต่างๆกัน ในปฏิกิริยาที่ 37°C ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 9 พบว่า การขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เป็นเวลา 10 สัปดาห์หลังการตัดรังไข่ในหนูขาว จะพบการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของค่า SR Ca^{2+} -uptake rate เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้าม ค่า Ca^{2+} -uptake sensitivity กลับพบสูงขึ้นในหนูตัดรังไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (รูปที่ 10) การให้ฮอร์โมนทดแทนทั้ง estrogen และ progesterone ต่างสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ SR Ca^{2+} -uptake ในหนูตัดรังไข่ได้ ผลการศึกษาดังกล่าวพบในทำนองเดียวกับรายงานการศึกษาล่าสุดที่พบในกล้ามเนื้อหัวใจผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลว โดยกลุ่มของ EG Kranias, et al. (2001) (32) การตรวจวัด SR Ca^{2+} -ATPase activity ซึ่งเป็นโปรตีนหลักที่ใช้ในการขนส่งแคลเซียมเข้าเก็บใน SR จะช่วยชี้เฉพาะมากขึ้น ถึงตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเมื่อขาดฮอร์โมนเพศเป็นเวลานาน

เมื่อตรวจวัด SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity จาก SR vesicles ที่เตรียมจากกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูกลุ่มต่างๆ ด้วยวิธี Triple Enzyme Assay ในหนู 5 กลุ่มการทดลอง ดังสรุปค่าน้ำหนักตัว น้ำหนักหัวใจ และน้ำหนักของมดลูกในตารางที่ 2 ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 11 ซึ่งชี้ให้เห็นการลดลงอย่างมีนัยสำคัญของค่าปฏิกิริยาสูงสุดของ SERCA activity ในหนูขาดฮอร์โมนเพศเป็นเวลา 10 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจาก SERCA activity จะลดลงแล้ว ยังพบว่าปริมาณของ SERCA บนผนังของ SR ลดลงด้วยอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในตารางที่ 3 ในขณะเดียวกัน ความไวของโปรตีน SERCA ในการปั๊ม Ca^{2+} กลับเข้า SR มีค่าเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญในหัวใจหนูตัดรังไข่ดังแสดงในรูป 12 อีกทั้งการให้ฮอร์โมนทดแทนทั้ง estrogen หรือ progesterone ล้วนสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ SERCA ได้ ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการทำงานในการเก็บกลับ Ca^{2+} ของ SR นั้น เป็นผลที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ SERCA activity นั้นเอง

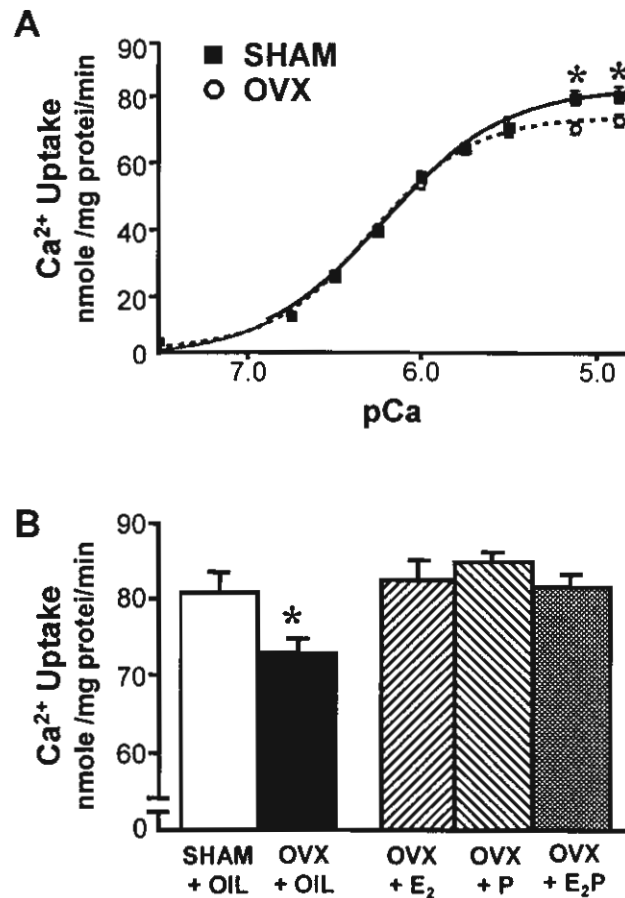


Figure 9. Ca^{2+} uptake of sarcoplasmic reticulum (SR) vesicle in left ventricular homogenates. **(A)** Effects of ovariectomy on the initial rates of Ca^{2+} uptake by SR vesicle in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875 at pH 7.0. **(B)** Comparison of maximum Ca^{2+} uptake rates among sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized with hormones supplementation rats. Data are means $\pm$ SE from 8-9 preparations. * $P < 0.05$ = significantly different from sham-controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

จะเห็นว่าการขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่เป็นเวลานาน 10 สัปดาห์ มีผลให้เส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจมีความสามารถการหดตัวลดลง แต่ความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของ Ca^{2+} เพิ่มขึ้น ทั้งนี้จะเกิดจากสมมติฐานหลักคือ มีการลดลงของปริมาณ Ca^{2+} ภายในเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการกระตุ้นการหดตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ ซึ่งการศึกษาที่พบว่าค่า Maximum SR Ca^{2+} -uptake rate และ SERCA activity ลดลงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจของหนูตัดรังไข่ ย่อมเป็นข้อมูลหนึ่งที่สนับสนุนความเป็นไปได้อย่างมากของสมมติฐานดังกล่าว หากการขาดฮอร์โมนเพศเป็นเวลานานมีผลให้ปริมาณแคลเซียมภายในเซลล์ลดลงดังสมมติฐานจริง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจน่าจะพยายามปรับเปลี่ยนทดแทนให้จำนวนของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพื่อการกระตุ้นการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อให้เพิ่มขึ้นเป็นปกติ โดยกลไกหนึ่งคือการเพิ่มปริมาณของ β_1 -adrenergic receptors เพื่อเพิ่มการตอบสนองต่อการกระตุ้นของ agonists แล้วให้จำนวนแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มขึ้นจากการเพิ่มปริมาณแคลเซียมที่ขนส่งเข้าเซลล์ผ่าน Ca^{2+} channels และ/หรือ การเพิ่มปริมาณแคลเซียมที่สะสมใน SR เพื่อให้สามารถปล่อยออกมามากขึ้นเมื่อมีการกระตุ้น ดังนั้นจึงตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ Free Ca^{2+} ภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ใช้ในการหดตัว/คลายตัวของเส้นใยกล้ามเนื้อ

TABLE 2. Body, left ventricle, and uterine weight of sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized rats with hormones supplementation.

Parameters	SHAM	OVX	OVX + E ₂	OVX + P	OVX + E ₂ P
Body Weight (g)	280 ± 2.6	346 ± 6.5*	243 ± 3.3* [#]	335 ± 4.7*	249 ± 6.4* [#]
Left Ventricular Weight (g)	0.57 ± 0.01	0.64 ± 0.01*	0.53 ± 0.01* [#]	0.61 ± 0.02*	0.55 ± 0.01* [#]
LW/BW	0.204 ± 0.004	0.186 ± 0.003*	0.217 ± 0.003* [#]	0.182 ± 0.004*	0.223 ± 0.004* [#]
Uterine Weight (g)	0.45 ± 0.02	0.11 ± 0.01*	0.49 ± 0.01 [#]	0.11 ± 0.01*	0.51 ± 0.02 [#]

Results are means ± SE for 10-11 rats each group. SHAM represents sham-operated control; OVX, ovariectomized rats; OVX+E₂, ovariectomized plus estrogen supplementation; OVX + P, ovariectomized plus progesterone supplementation; OvX + E₂P, ovariectomized plus either estrogen or progesterone supplementation. * $P < 0.05$ vs sham-operated controls, and [#] $P < 0.05$ vs ovariectomized rats.

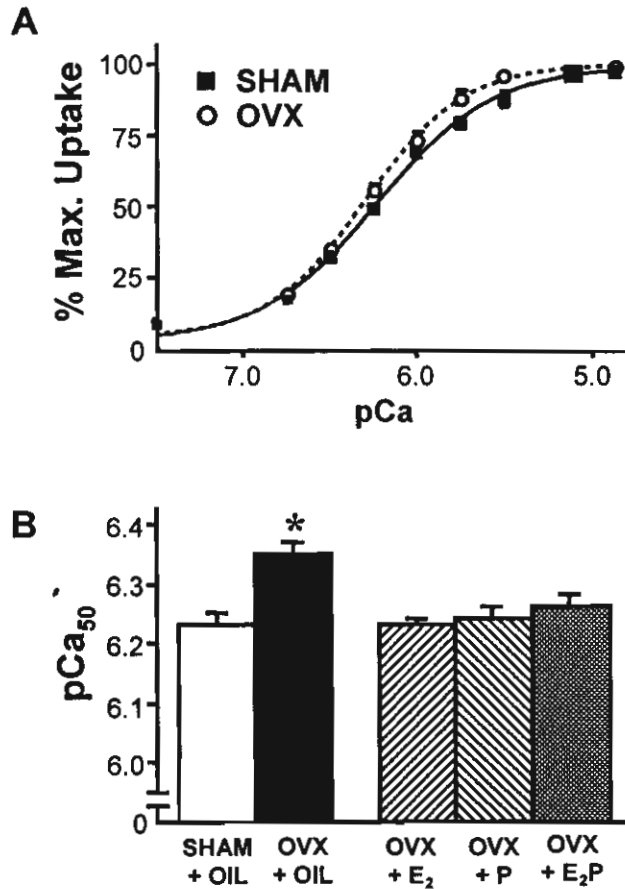


Figure 10. Ca²⁺ uptake of sarcoplasmic reticulum (SR) vesicle in left ventricular homogenates. **(A)** Effects of ovariectomy on the % maximum rate of Ca²⁺ uptake measured in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875 at pH 7.0 for each preparation. **(B)** Comparison of pCa₅₀ determinants among sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized with hormones supplementation rats. Data are means ± SE from 8-9 preparations. * $P < 0.05$ = significantly different from sham-controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

TABLE 3. Comparisons of the relative SERCA and phospholamban (PLB) to the relative calsequestin intensity from densitometer of immunoblots from the sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized rats with hormones supplementation.

Parameters	SHAM	OVX	OVX + E ₂	OVX + P	OVX + E ₂ P
SERCA/CQ	1.04 ± 0.04	0.76 ± 0.08*	1.05 ± 0.08	0.97 ± 0.09	1.05 ± 0.04
PLB/CQ	1.01 ± 0.02	0.99 ± 0.09	1.04 ± 0.06	0.99 ± 0.07	0.90 ± 0.05
SERCA/PLB	1.03 ± 0.05	0.82 ± 0.14	1.01 ± 0.04	1.01 ± 0.13	1.18 ± 0.06

Results are means ± SE for 6 hears each group. SHAM represents sham-operated control; OVX, ovariectomized rats; OVX + E₂, ovariectomized plus estrogen supplementation; OVX + P, ovariectomized plus progesterone supplementation; Ovx + E₂P, ovariectomized plus either estrogen or progesterone supplementation. * *P* < 0.05 vs sham-operated controls.

ตารางที่ 4 สรุปค่าน้ำหนักตัว น้ำหนักหัวใจ น้ำหนักมดลูก และจำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ จากหนู 3 กลุ่มการทดลองที่ดำเนินการตรวจวัด Ca²⁺ Transients และการหดตัวของเซลล์ จะเห็นว่า เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจากหัวใจหนูตัดรังไข่มีความสามารถในการหดตัว (% Shortening) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากหนูกลุ่มควบคุม โดยรูปแบบการหดตัวแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งจะเห็นว่าใช้เวลาในการหดตัวถึงสูงสุดเพิ่มขึ้น (Time to Peak) และใช้เวลาในการคลายตัวกลับ (T₈₀) นานขึ้นด้วย อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นเมื่อคำนวณค่าความเร็วในการหดตัว (+dL/dt) และความเร็วในการคลายตัว (-dL/dt) ล้วนมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อให้ฮอร์โมน estrogen ทดแทนหลังการตัดรังไข่ พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของ % Shortening ได้เท่านั้น โดยไม่มีผลต่อเวลาที่ใช้ในการหดตัว/คลายตัว และความเร็วการหด/คลายตัว ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจน่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทั้งส่วนของ Free Ca²⁺ และส่วนของโปรตีนเส้นใยกล้ามเนื้อที่รวมเป็นเครื่องจักรกลสำหรับการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ

TABLE 4. General Characteristics of Sham Control and Ovariectomized With/Without Estrogen Supplemented Rats

Parameters	SHAM	OVX	OVX+E2
n	18	19	19
Body Weight, g	267 ± 3.3	323 ± 3.4*	251 ± 3.2
Heart Weight, g	1.11 ± 0.01	1.26 ± 0.02*	1.10 ± 0.02
HW/BW Ratio	0.415 ± 0.005	0.388 ± 0.006*	0.438 ± 0.009
Uterine Weight, g	0.563 ± 0.021	0.124 ± 0.004*	0.336 ± 0.021*

Results are means ± SE from each group. SHAM represents sham-operated control; OVX, ovariectomized rats; OVX + E₂, ovariectomized plus estrogen supplementation. * *P* < 0.05 vs sham-operated control.

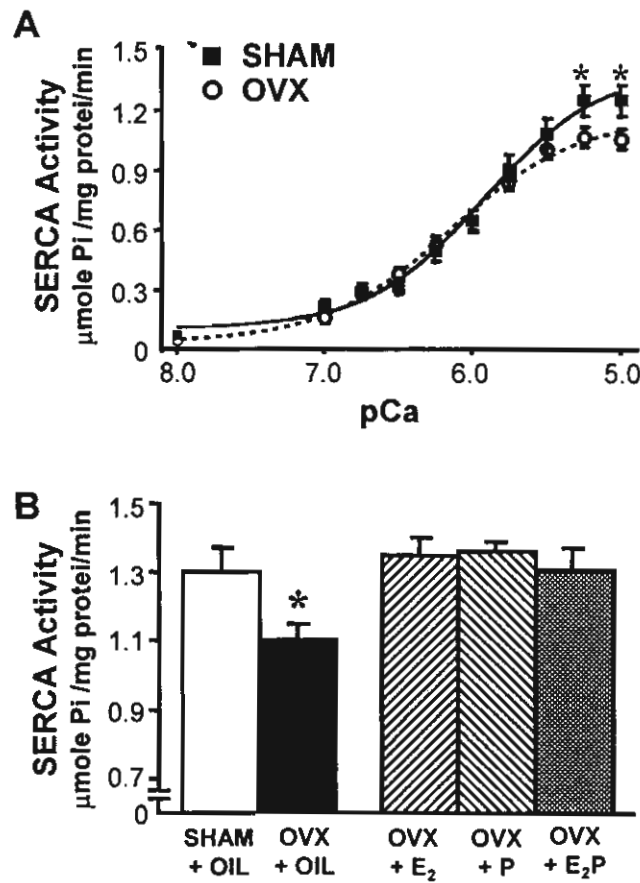


Figure 11. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity in sarcoplasmic reticulum membrane vesicles. **(A)** Effects of ovariectomy on SERCA activities in SR membrane vesicle in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875 at pH 7.0. **(B)** Comparison of maximum SERCA activities among sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized with hormones supplementation rats. Data are means $\pm$ SE from 15-16 preparations. * $P < 0.05$ = significantly different from sham-controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

TABLE 5. Properties of Isolated Myocytes from Sham Control and Ovariectomized With/Without Estrogen Supplemented Hearts.

Parameters	SHAM	OVX	OVX+E2
Hearts	4	5	5
Cells, n	14	19	18
% Shortening	8.35 $\pm$ 0.39	6.50 $\pm$ 0.27*	8.23 $\pm$ 0.37
Time to Peak, msec	173 $\pm$ 11	228 $\pm$ 13*	233 $\pm$ 8.9*
T_{80} , msec	170 $\pm$ 13	334 $\pm$ 22*	236 $\pm$ 18* [#]
+dL/dt, $\mu\text{m}/\text{sec}$	104.3 $\pm$ 6.8	71.0 $\pm$ 4.9*	74.2 $\pm$ 5.5*
-dL/dt, $\mu\text{m}/\text{sec}$	92.0 $\pm$ 7.9	48.6 $\pm$ 4.7*	57.6 $\pm$ 5.2*

Results are means $\pm$ SE; n = no. of cells; T_{80} , time required fro cell to 80% of full relaxation from the peak of shortening; +dL/dt, rate of cell shortening; -dL/dt, rate of cell relengthening. * $P < 0.05$ vs SHAM; $P < 0.05$ vs OVX.

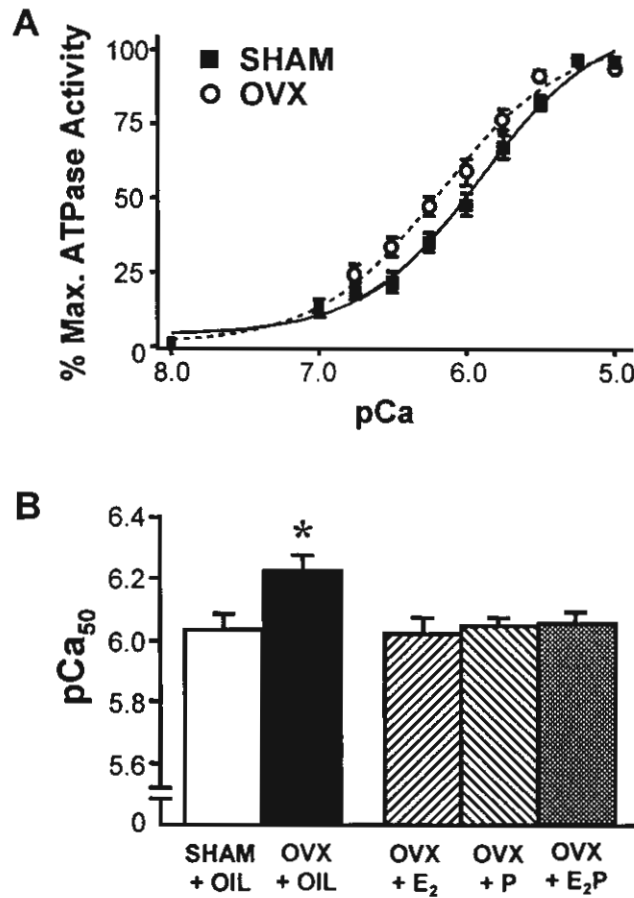


Figure 12. Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) activity in sarcoplasmic reticulum membrane vesicles. **(A)** Effects of ovariectomy on the % maximum SERCA activities measured in various calcium concentrations ranging from pCa 7.5 to 4.875 at pH 7.0 for each preparation. **(B)** Comparison of pCa₅₀ determinants among sham-controls, ovariectomized rats and ovariectomized with hormones supplementation rats. Data are means $\pm$ SE from 15-16 preparations. * $P < 0.05$ = significantly different from sham-controls using Student Newman-Keuls test after ANOVA.

ผลการตรวจวัด Ca^{2+} Transients พร้อมๆกับการหดตัว/คลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจสรุปในตารางที่ 6 และรูปที่ 13 ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณ Free Ca^{2+} ภายในเซลล์ก่อนการหดตัว (baseline Ca^{2+}) ไม่แตกต่างกัน แต่ปริมาณของ Ca^{2+} สูงสุดในเซลล์ขณะหดตัวมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในหัวใจหนูกลุ่มตัดรังไข่ตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเวลาการเพิ่ม Ca^{2+} ภายในเซลล์ (Time to Peak) แต่อย่างไร ในทางตรงข้าม หัวใจหนูขาดฮอร์โมนเพศจะยังคงใช้เวลานานขึ้นในการลดปริมาณ Free Ca^{2+} ภายในเซลล์ (Time decay, T_{50}) อย่างมีนัยสำคัญจากหนูกลุ่มควบคุม โดยการให้ estrogen ทดแทนสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ Ca^{2+} Transients หลังการตัดรังไข่ได้ ผลการศึกษาทั้งด้าน Cell Shortening และ Ca^{2+} Transients ของหัวใจหนูขาดฮอร์โมนเพศจากรังไข่นี้คล้ายคลึงกับรายงานการศึกษาที่พบในหัวใจที่มีพยาธิสภาพหัวใจล้มเหลว (33-38) ซึ่งล้วนสนับสนุนบทบาทสำคัญของฮอร์โมนเพศหญิงต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ อีกทั้งชี้ถึงความจำเป็นในการศึกษาต่อให้ทราบถึงพื้นฐานความรู้ดังกล่าว เพื่อเป็นประโยชน์ในการหาแนวทางทั้งการป้องกันและรักษาพยาธิสภาพที่จะเกิดขึ้นภายหลังการขาดฮอร์โมนเพศ

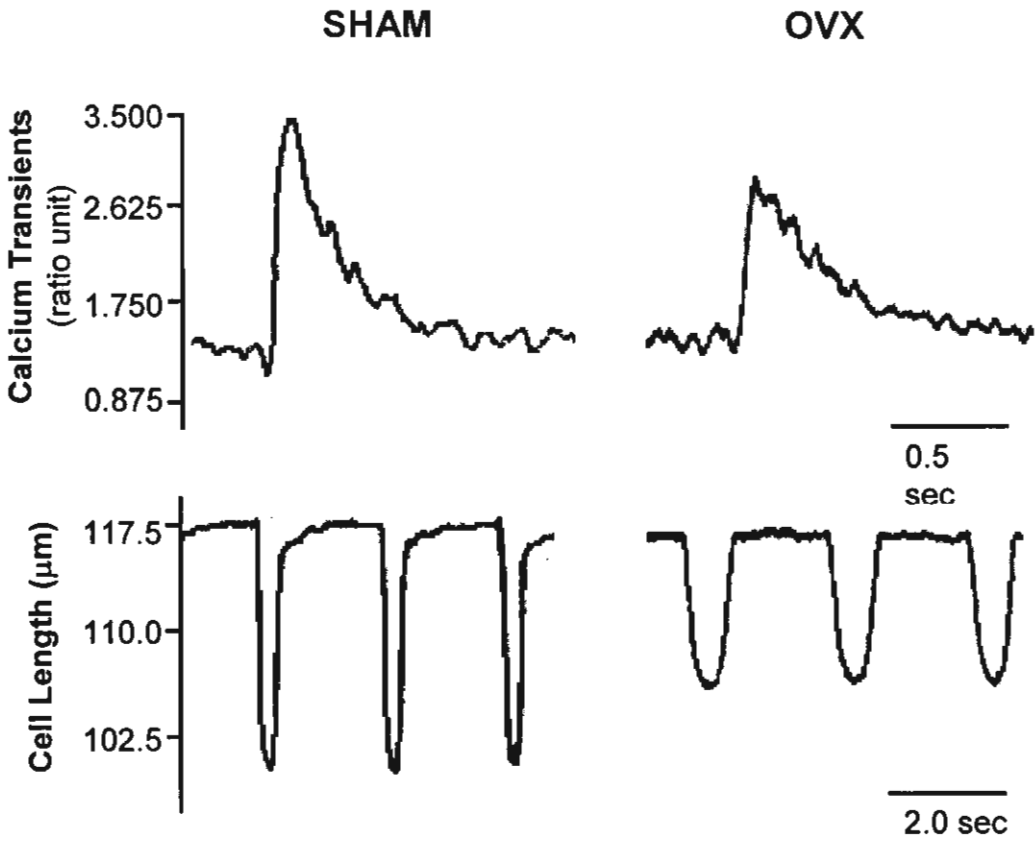


Figure 13. Representative recordings of mechanics and Ca^{2+} transients of myocytes isolated from sham (SHAM) and ovariectomized (OVX) rat hearts. **Top:** Ca^{2+} transients. **Bottom:** cell shortening.

TABLE 6. Ca^{2+} Transients of Isolated Cardiomyocytes from Sham-operated and Ovariectomized With/Without Estrogen Supplemented Hearts

Parameters	SHAM	OVX	OVX+E2
Hearts	7	6	6
Cells, n	20	20	20
Baseline, ratio unit	1.36 ± 0.04	$1.33 \pm 0.04^*$	1.37 ± 0.03
Amplitude, ratio unit	2.12 ± 0.13	$1.74 \pm 0.10^*$	2.26 ± 0.14
Time to Peak, msec	95.3 ± 4.3	95.5 ± 1.9	97.7 ± 2.2
T_{50} , msec	180 ± 10.7	$232 \pm 9.3^*$	196 ± 9.3

Results are means $\pm$ SE ; n = number of cells; baseline, 340/380 ratio at rest; amplitude, peak of 340/380 ratio – baseline ratio; T_{50} , times required for cell to achieve 50% of full relaxation of Ca^{2+} signal to baseline ratio from peak ratio.
 $^* P < 0.05$ vs SHAM.

III) การศึกษาผลกระทบของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจ

บทบาทของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของหัวใจนั้น มีรายงานการศึกษาน้อยกว่าในฮอร์โมนเพศหญิงมาก ข้อมูลส่วนใหญ่ยังมีความขัดแย้งในด้านบทบาทของฮอร์โมนต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ในขณะที่การขาดฮอร์โมนเพศชายในหนูขาวหลังการตัดลูกอัณฑะนั้น พบการเปลี่ยนแปลงในระดับอวัยวะที่เหมือนหัวใจของหนูตัวจริงไซ่ อีกทั้งการให้ฮอร์โมนเพศชายทดแทนแก่หนู

จัดตั้งไขสามารถป้องกันกาเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ได้เหมือนการให้ออสโตรเจนทดแทน แต่ในทางตรงข้าม การใช้ฮอร์โมนเพศชายเพื่อการเสริมสร้างสมรรถภาพและสร้างกล้ามเนื้อในกลุ่มนักกีฬานั้น กลับพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในระดับสรีรวิทยาของเซลล์และอวัยวะ ซึ่งส่งผลให้เกิดปัญหาการตายเฉียบพลันด้วยโรคหัวใจได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาเพื่อใหทราบถึงบทบาทสำคัญของฮอร์โมนเหล่านี้ต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจโดยตรง โดยการตรวจวัดทั้งการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อและการเปลี่ยนแปลงของ β_1 -adrenergic receptors บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ทั้งในสภาวะขาดฮอร์โมนเพศชายหลังการตัดอัณฑะ และสภาวะที่มีฮอร์โมนสูงในเลือดด้วยการฉีดเพิ่มเติม ซึ่งผลการศึกษาในหนูตัดอัณฑะได้ชี้ให้เห็นว่า ในสภาวะปกติของร่างกายนั้น ฮอร์โมนเพศชายน่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจเช่นเดียวกับฮอร์โมนเพศหญิง (ตารางที่ 7 และ รูปที่ 14) ทั้งนี้เนื่องจากการขาดฮอร์โมนเพศชายเป็นเวลา 10 สัปดาห์ สามารถเหนี่ยวนำให้ค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุดของเส้นใยกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แม้จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่าความไวของเส้นใยกล้ามเนื้อต่อการกระตุ้นของแคลเซียม และไม่มีผลกระทบต่อ β_1 -adrenergic receptors (รูปที่ 15) ดังนั้นความเป็นไปได้ที่ฮอร์โมนเพศชายจะออกฤทธิ์เป็น Potentiating Factor ให้เกิดผลเสียต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจนั้น อาจเกิดขึ้นในสภาวะที่ร่างกายมีฮอร์โมนเพศในเลือดที่ระดับสูงกว่าปกติดังที่เกิดขึ้นในกลุ่มนักกีฬาที่ใช้ฮอร์โมนเสริมสมรรถภาพ จึงดำเนินการศึกษาในหนูกลุ่มที่ให้ฮอร์โมนเสริมเพื่อให้มีปริมาณในเลือดสูงมากกว่าปกติ

Table 7. Body weight (BW), heart weight (HW), uterine weight (UW) and citrate synthase (CS) activity in plantaris muscle of sedentary-sham (Sed-Sham), exercise-sham (Ex-Sham), sedentary-ovariectomized (Sed-Ovx), and exercise-ovariectomized (Ex-Ovx) rats.

Parameters	Sed-Sham	Ex-Sham	Sed-Ovx	Ex-Ovx
BW (g)	267.5 ± 3.8 (13)	278.3 ± 3.9* (9)	337.3 ± 5.2** (11)	323.7 ± 4.4** (10)
HW (g)	0.812 ± 0.013 (13)	0.887 ± 0.016* (9)	0.933 ± 0.012** (11)	0.959 ± 0.013** (10)
% HW / BW	0.304 ± 0.003 (13)	0.319 ± 0.004* (9)	0.277 ± 0.004* (11)	0.296 ± 0.002# (10)
LW (g)	0.569 ± 0.010 (9)	0.654 ± 0.014* (8)	0.657 ± 0.009* (8)	0.677 ± 0.013* (8)
% LW / BW	0.215 ± 0.003 (9)	0.231 ± 0.005* (8)	0.193 ± 0.003* (8)	0.211 ± 0.003# (8)
UW (g)	0.567 ± 0.034 (9)	0.528 ± 0.042 (9)	0.112 ± 0.004** (9)	0.105 ± 0.005** (9)
CS (μmole DTNB /g /min)	46.6 ± 2.0 (8)	57.8 ± 1.9* (8)	44.4 ± 1.9 (8)	52.4 ± 1.9**# (8)

Data are given as mean ± SEM for the number of animals shown in parentheses. *P<0.05 = significantly different from Sed-Sham. **P<0.05 = the groups that are not different but significantly different from other groups. # P<0.05 = significantly different from Sed-Ovx.

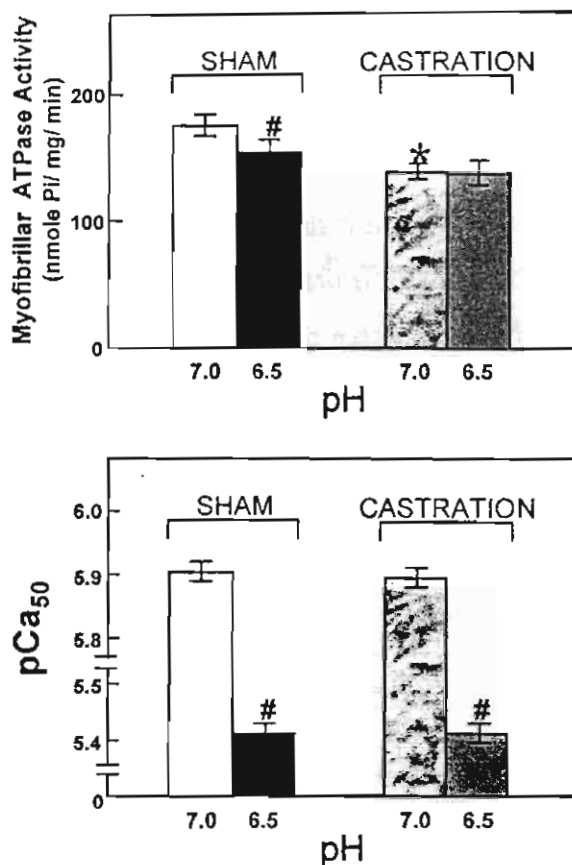


Figure 14. Maximum Ca^{2+} -activated MgATPase activity (A) and pCa_{50} (B) of left ventricular myofibrillar preparations from sedentary-sham (Sed-SHAM), exercise-sham (Ex-SHAM), sedentary-ovariectomized (Sed-OVX), and exercise-ovariectomized (Ex-OVX) rats. Data are present as Mean $\pm$ SEM.

* $P < 0.05$ represents significant difference from sedentary-sham group.

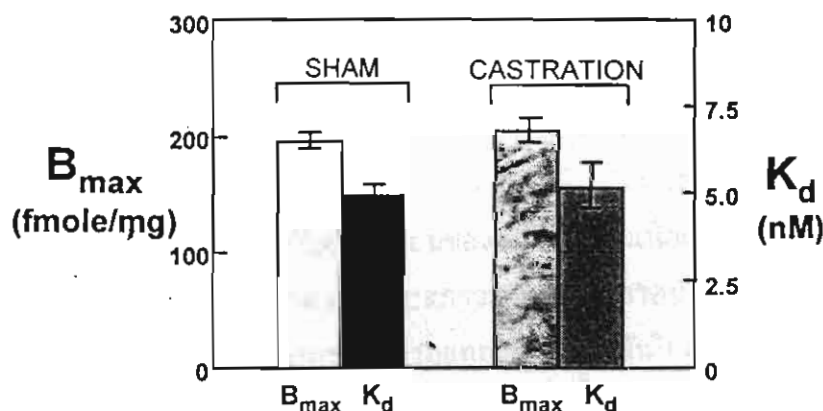


Figure 15. β_1 -adrenergic receptor density ($B_{\max}$, A) and dissociation constant (K_d , B) of cardiac membrane preparations from sedentary sham (Sed-SHAM), exercise sham (Ex-SHAM), sedentary-ovariectomized (Sed-OVX), and exercise-ovariectomized (Ex-OVX) rats. Data represent as Mean $\pm$ SEM. * $P < 0.05$ represents significant difference from sedentary-sham group.

ผลการศึกษาพบว่า การฉีด Testosterone Propionate แก่หนูขาวเพศผู้ในปริมาณ 15 mg/kgBW เข้าได้ผิวหนัง 3 ครั้ง/สัปดาห์ เป็นเวลา 10 สัปดาห์ จะสามารถเหนี่ยวนำให้ปริมาณของ testosterone ในเลือดสูงขึ้นประมาณ 10 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วย Corn oil ธรรมดาแทนการฉีดฮอร์โมน (ตารางที่ 8) ปริมาณ testosterone สูงในเลือดเป็นเวลา 10 สัปดาห์นั้น

สามารถเหนี่ยวนำให้น้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม ทั้งนี้คาดว่าเกิดจาก Anabolic effect ของฮอร์โมน testosterone ซึ่งทำให้ร่างกายเกิด lipolysis เป็นการลดการสะสมของไขมัน (39-43) ในทางตรงกันข้ามกับน้ำหนักตัวที่ลดลง น้ำหนักหัวใจ(HW) กลับเพิ่มขึ้นหรือไม่เปลี่ยนแปลงสำหรับ น้ำหนักหัวใจห้องล่างซ้าย (LVW) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จึงส่งผลให้ %HW/BW หรือ %LVW/BW ซึ่งเป็น Hypertrophic index ของกล้ามเนื้อหัวใจสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0005$) ดังสรุปในตารางที่ 1 โดยผลการเพิ่ม Hypertrophic index นี้พบในทำนองเดียวกับที่พบโดย Malhotra et al. (44)

Table 8. Body weight (BW), heart weight (HW), percentage of heart to body weight ratio (%HW/BW), left ventricular weight (LVW), percentage of left ventricular weight to body weight ratio (%LVW/BW), and serum testosterone level of 10 week vehicle-injected (Vehicle) and high dose testosterone-injected (High-T) rats.

Parameters	Vehicle (12)	High-T (12)
BW (g)	438.6 ± 7.2	374.0 ± 3.5***
HW (g)	1.25 ± 0.03	1.35 ± 0.03*
% HW / BW	0.286 ± 0.006	0.361 ± 0.001***
LVW (g)	0.84 ± 0.01	0.83 ± 0.02***
% LVW / BW	0.191 ± 0.003	0.361 ± 0.001***
Serum Testosterone (µg/dl)	1.08 ± 0.19 (8)	11.73 ± 1.29*** (8)

Data are given as mean ± SEM for the number of animals shown in parentheses. * $P<0.05$ = significantly different from vehicle group. *** $P<0.0005$ =significantly different from vehicle group.

สำหรับผลกระทบของการมีปริมาณ testosterone สูงในเลือดต่อการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าปริมาณฮอร์โมนที่สูงเป็นเวลา 10 สัปดาห์ ในหนูขาวนั้น ไม่มีผลกระทบต่อค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุด และค่าความไวต่อการกระตุ้นด้วยแคลเซียมของเส้นใยกล้ามเนื้อแต่อย่างใด (รูปที่ 16) แม้ปริมาณฮอร์โมนจะสูงขึ้น 10 เท่าในเลือดก็ตาม โดยสภาวะความเป็นกรดยังคงสามารถลดค่าปฏิกิริยาการหดตัวสูงสุด และ ลดค่าความไวต่อการกระตุ้นด้วยแคลเซียมของเส้นใยกล้ามเนื้อได้ตามคาดหมายเหมือนในหนูกลุ่มควบคุมทุกประการ ผลการศึกษานี้ ยืนยันความสำคัญของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของหัวใจในสภาวะปกติของร่างกาย การศึกษาต่อในหนูกลุ่มดัดอันทะแล้วให้ฮอร์โมนทดแทนในระดับ Subphysiological doses เพื่อดูผลกระทบต่อการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อหัวใจว่ามี Dose response effect ในช่วง physiological levels หรือไม่ เพื่อเพิ่มความเข้าใจถึงบทบาทของฮอร์โมนเพศชายและให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนมากขึ้น

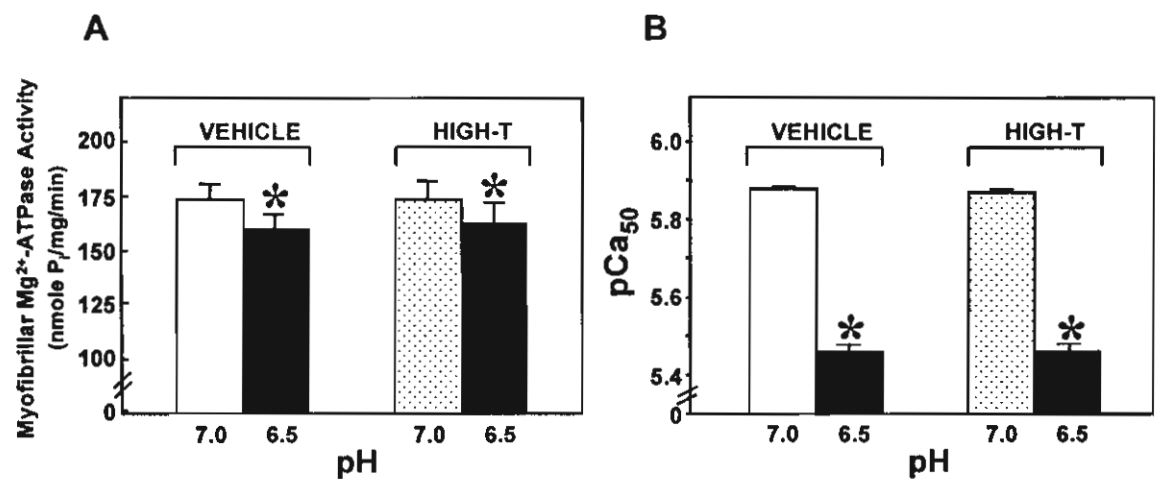


Figure 16. Maximum Ca^{2+} -activated MgATPase activity (A) and pCa_{50} (B) of left ventricular myofibrillar preparations from vehicle-injected (VEHICLE) and high dose testosterone-injected (HIGH-T) rats. Data are present as Mean $\pm$ SEM.
* $P < 0.0005$ represents significant difference from pH 7.0 of the same group.

ในด้านผลกระทบต่อ β_1 -adrenergic receptors บนผนังเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ พบว่าการมีปริมาณฮอร์โมนเพศชายสูงในเลือดเป็นเวลา 10 สัปดาห์ มีผลทำให้จำนวนของ receptors ลดลงอย่างมาก ($P < 0.0005$) จากกลุ่มควบคุม โดยค่า Binding affinity ไม่เปลี่ยนแปลง ดังแสดงในรูปที่ 17 ผลการศึกษานี้มีผลเช่นเดียวกับที่พบในหัวใจผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลว โดยในผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวนั้นจะพบการเพิ่มขึ้นของระดับ Catecholamines ในเลือดซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุที่ส่งผลให้จำนวนของ receptors ลดลงในผู้ป่วย ดังนั้นจึงน่าตรวจวัดปริมาณของ Catecholamines ในเลือดของหนูกลุ่มมีฮอร์โมนเพศชายสูงในเลือดนี้เพื่อเป็นการยืนยันผลให้ชัดเจน

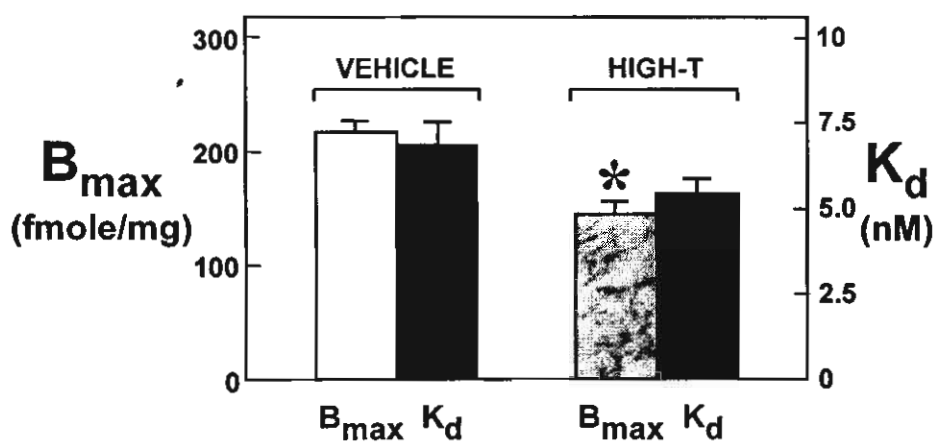


Figure 17. β_1 -adrenergic receptor density (B_{max}) and dissociation constant (K_d) of cardiac membrane preparations from vehicle-injected (VEHICLE) and high dose testosterone-injected (HIGH-T) rats. Data represent as Mean $\pm$ SEM.
* $P < 0.0005$ represents significant difference from vehicle group.

เอกสารอ้างอิง:

1. Kalin MF. and B. Zumoff. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55: 330-352, 1990.
2. Croft P. and PC. Hannaford. Risk factors for acute myocardial infraction in women: evidence from the Royal College of General Practitioner's oral contraception study. *BMJ* 298: 165-168, 1989.
3. Kuhn FE. and CE. Rackley. Coronary artery disease in women: risk factos, evaluation, treatment, and prevention. *Arch. Intern. Med.* 153: 2626-2636, 1993.
4. Psaty BM., et al. A review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal women. *Arch. Intern. Med.* 153: 1421-1427, 1993.
5. Wattanapernpool J. Increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats. *Life Science* 61: 12-19, 1998.
6. Hasenfuss G., et al. Alteration of contractile function and excitation-contraction coupling in dilated cardiomyopathy. *Cir. Res.* 70:1225-1232, 1992.
7. Heyder S., et al., Myofibrillar Ca^{2+} sensitivity of cardiomyopathic hamster hearts. *Pflugers Arch-Eur. J. Physiol.* 429:539-545, 1995.
8. Wolf MR. et al. Calcium sensitivity of isometric tension is increased in canine experimental heart failure. *Circ. Res.* 76: 781-789, 1995.
9. Wolf MR., et al. Myofibrillar calcium sensitivity of isometric tension is increased in human dilated cardiomyopathies. *J Clin. Invest.* 98: 167-176, 1996.
10. Wattanapernpool J. and PJ. Reiser. Differential effects of ovariectomy on calcium activation of cardiac and soleus myofilaments. *Am. J. Physiol.* 277: H467-H473, 1999.
11. Wattanapernpool J. et al. Estrogen supplement prevents the calcium hypersensitivity of cardiac myofilaments in ovariectomized rats. *Life Sciences* 66: 533-543, 2000.
12. McCredie RJ., et al. : Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens . *JACC* . 32(5): 1331-1335, 1998.
13. Radwanska E. : The role of reproductive hormones in vascular disease and hypertension. *Steroids* 58: 605-610, 1993.
14. Haffner SM., et al. : Low level of sex hormone-binding globulin and testosterone are associated with smaller, denser low density lipoprotein in normoglycemic men. *J Clin Endocrinol Metab.* 81: 3697-3701, 1996.
15. Arndt H., et al. Calcium sensitivity and unloaded shortening velocity of hypertrophied and non-hypertrophied skinned human atrial fibres. *Pflugers Arch.* 415:209-213, 1989.
16. Mangels RA., et al. Food deprivation and the facilitatory effects of estrogen in female hamsters: The LH surge and locomotor activity. *Physiology & Behavior* 60: 837-843, 1996.
17. Bedford TG, Charles MT, Noe CW, Robert AO, and Carl VG. Maximum oxygen consumption of rats and its changes with various experimental procedures. *J Appl. Physiol.* 47(6): 1278-1283, 1979.
18. Snoeckx LHEH, Cornelussen RN, Van Nieuwenhoven FA, Reneman RS, and Van Der Vusse GJ. Heat shock proteins and cardiovascular pathophysiology. *Physiological Reviews* 81: 1461-1497, 2001.
19. Voss MR, Stallone JN, Li M, Cornelussen RNM, Knuefermann P, and Knowlton AA. Gender differeneeces in the expression of heat shock proteins: the effect of estrogen. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285: H687-H692, 2003.
20. Pagani ED & RJ Solaro. Methods for measuring functional properties of sarcoplasmic reticulum and myofibrils in small samples of myocardium. In: *Methods in Pharmacology* (Schwartz, A., Ed) pp 44-61, Plenum Publishing Corp., New York. 1984.
21. Lowry DH., et al. Protein measurement with Folin Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 165-175, 1951.
22. Fabiato A. Myoplasmic free calcium concentration reached during the twitch of an intact cardiac cell during calcium-induced release from the sarcoplasmic reticulum of a skinned cardiac cell from the adult rat or rabbit ventricle. *J. Gen. Physiol.* 78: 457-497, 1981.
23. Carter SG & DW Karl. Inorganic phosphate assay with malachite green: An improvement and evaluation. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 7: 7-13, 1981.

24. Baker SP and Potter LT. Purification and partial characterization of cardiac plasma membranes rich in beta-adrenoceptors. *Membr Biochem* 3: 185-205, 1980.
25. Edes I., et al. Effects of Levosimendan, a cardiotonic agent targeted to troponin C, on cardiac function and on phosphorylation and Ca^{2+} sensitivity of cardiac myofibrils and sarcoplasmic reticulum in guinea pig heart. *Circ Res.* 77:107-113, 1995.
26. Chu A, Dixon MC, Saito A, Seiler S, Fleischer S. Isolation of sarcoplasmic reticulum fractions referable to longitudinal tubules and junctional terminal cisternae from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol.* Vol. 157 pp36-46, 1988.
27. Wolska BM., et al. CGP-48506 increases contractility of ventricular myocytes and myofilaments by effects on actin-myosin reaction. *Am. J. Physiol.* 270 (Heart Circ. Physiol. 39):H24-H32, 1996.
28. Lefkowitz RJ, Rockman HA, and Koch WJ. Catecholamines, cardiac beta-adrenergic receptors, and heart failure. *Circulation* 101: 1634-1637, 2000.
29. Marber MS, Mestral R, Chi SH, Sayen MR, Yellon DM, and Dillmann WH. Overexpression of the rat inducible 70-kD heat stress protein in a transgenic mouse increases the resistance of the heart to ischemic injury. *J Clin Invest* 95: 1446-1456, 1995.
30. Radford NB, Fina M, Benjamin IJ, Moreadith RW, Graves KH, Zhao P, Gavva S, Wiethoff A, Sherry D, Malloy CR, and William RS. Cardioprotective effects of 70-kDa heat shock protein in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci* 93: 2339-2342, 1996.
31. Trost SU, Omens JH, Karlson WJ, Meyer M, Mestral R, Covell JW, and Dillmann WH. Protection against myocardial dysfunction after a brief ischemic period in transgenic mice expressing inducible heat shock protein 70. *J Clin Invest* 101: 855-862, 1998.
32. Dash R., et al. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling in failing human myocardium. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33: 1345-53, 2001.
33. Piacentino V 3rd, Weber CR, Chen X, Weisser-Thomas J, Margulies KB, Bers DM, Houser SR. Cellular basis of abnormal calcium transients of failing human ventricular myocytes. *Circ Res.* 4;92(6):651-8, 2003.
34. Frank KF, Bolck B, Brixius K, Kranias EG, Schwinger RH. Modulation of SERCA: implications for the failing human heart. *Basic Res Cardiol.* 97 Suppl 1:172-8, 2002.
35. Maier LS, Braunhalter J, Horn W, Weichert S, Pieske B. The role of SR Ca^{2+} -content in blunted inotropic responsiveness of failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 34(4):455-67, 2002.
36. Mishra S, Gupta RC, Tiwari N, Sharov VG, Sabbah HN. Molecular mechanisms of reduced sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} uptake in human failing left ventricular myocardium. *J Heart Lung Transplant.* 21(3):366-73, 2002.
37. Dash R, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 33(7):1345-53, 2001.
38. Sen L, Cui G, Fonarow GC, Laks H. Differences in mechanisms of SR dysfunction in ischemic vs. idiopathic dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000 Aug;279(2):H709-18.
39. Dahlmann B, Mai B, and Reinauer H. The influence of testosterone on the alkaline proteolytic activity in rat skeletal muscle. *Biochem. Biophys. Acta.* 177: 220-34, 1969.
40. Seidell J, et al. Visceral fat accumulation is positively associated with insulin, glucose and C-peptide levels but negatively with testosterone levels. *Metabolism* 39: 897-901, 1990.
41. Refue'-Scrive M, Marin P, and Bjorntorp P. Effect of testosterone on abdominal adipose tissue in men. *Intern. J. Obest.* 15: 791-5, 1991.
42. Marin P, Oden B, and Bjorntorp P. Assimilation and mobilization of triglycerides in subcutaneous abdominal and femoral adipose tissue in vivo in men: effects of androgens. *J. Clin. Endo. Metab.* 80: 239-43, 1995.
43. Xu X, De Pergola G, and Bjorntorp P. Testosterone increases lipolysis and the number of β -adrenoceptors in male rat adipocytes. *Endocrin* 128: 379-82, 1991.
44. Malhotra A., et al. Effect of sex hormones on development of physiological and pathological cardiac hypertrophy in male and female rats. *Am. J. Physiol.* 259 (Heart Circ. Physiol. 28): H866-871, 1990.

Output ของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ 2 ฉบับคือ

- Thawornkaiwong A., Preawnim S., and Wattanpermpool J. Upregulation of β_1 -adrenergic receptors in ovariectomized rat hearts. *Life Sciences* 72: 1813-1824, 2003.
- Bupha-Intr T. and Wattanpermpool J. Cardio-protective effects of exercise training on myofilament calcium activation in ovariectomized rats. *J Applied Physiology* (Accepted for publication in *J. Applied Physiology*)

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- ในเชิงวิชาการ

ได้สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ เป็นนักศึกษาระดับปริญญาตรี 1 คน คือ

นางสาวอริยพร ถาวรไกรวงศ์

นักศึกษาระดับปริญญาโท 1 คน คือ

มล. นฤดี เกษมสันต์

และนักศึกษาระดับปริญญาเอก 1 คน คือ

นายเทพมนัส บุญผาอินทร์

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนานาชาติ ตามบทความย่อ 1 เรื่อง คือ

- Bupha-Intr T. and Wattanpermpool J. Exercise training prevents the changes in cardiac myofilament activity and β -adrenergic receptor density in ovariectomized rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 33(6): A17, 2001.

ภาคผนวก

Reprinted from

Life Sciences

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Life Sciences 72 (2003) 1813–1824

Upregulation of β_1 -adrenergic receptors in ovariectomized rat hearts

Ariyaporn Thawornkaiwong, Surin Preawnim, Jonggonnee Wattanapermpool*

Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Received 19 July 2002; accepted 16 September 2002



Upregulation of β_1 -adrenergic receptors in ovariectomized rat hearts

Ariyaporn Thawornkaiwong, Surin Preawnim, Jonggonnee Wattanapermpool*

Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama 6 Road, Bangkok 10400, Thailand

Received 19 July 2002; accepted 16 September 2002

Abstract

Changes in cardiac myofilament Ca^{2+} activation have been demonstrated in ovariectomized rats. The underlying mechanisms responsible for these changes, however, are unknown. Accordingly, we measured both density and binding affinity of cardiac β_1 -adrenergic receptors in sarcolemmal preparations from 10-week ovariectomized rats, pair-fed ovariectomized rats, and sham-operated control rats. Receptor protein content was also measured by immunoblotting. Deprivation of ovarian sex hormones for 10 weeks induced a significant upregulation of β_1 -adrenergic receptors without affecting binding affinity. The same magnitude of receptor upregulation was also detected in pair-fed ovariectomized hearts. To determine which hormone is responsible for the observed increase in β_1 -adrenergic receptor density, various sex hormone supplemental regimens were administered to ovariectomized rats. Subcutaneous injection of estrogen (5 $\mu\text{g}/\text{rat}$), progesterone (1 mg/rat), or estrogen plus progesterone three times a week all effectively prevented the upregulation of the β_1 -adrenoceptors. Western blot analyses using polyclonal antibody of β_1 -adrenergic receptors revealed the same pattern of changes in the protein content of the receptors in these various groups of experimental hearts as those obtained from the receptor binding assay. These results suggest a possible direct suppressive effect of ovarian sex hormones on the expression of cardiac β_1 -adrenergic receptors.

© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: β_1 -adrenergic receptors; Ovarian sex hormones; Estrogen; Progesterone

Introduction

An increase in calcium responsiveness of cardiac myofilament activation in ovariectomized rats has been shown in both biochemical and mechanical studies [1,2] but the underlying mechanism is still unknown. Long-term deprivation of ovarian sex hormones has been found to induce the Ca^{2+} hypersensitivity of cardiac myofilament activation with suppressed maximum myofibrillar ATPase

* Corresponding author. Tel./fax: +662-246-1375.

E-mail address: tejwt@mahidol.ac.th (J. Wattanapermpool).

activity in rats [1,2]. In contrast, force measurement in single soleus fiber preparations from ovariectomized rats demonstrated no shift in myofibrillar Ca^{2+} sensitivity but showed significantly less maximal tension generation [2]. The associated increase in body weight after ovariectomy did not contribute in any way to the increase in myofibrillar Ca^{2+} sensitivity [3]. These results thus suggest a cardiac-specific effect of ovarian sex hormones on myofibrillar Ca^{2+} activation. Differential cardio-regulatory effects of ovarian sex hormones on the Ca^{2+} activation of the myofilaments were also introduced based on the finding that estrogen but not progesterone replacement could abolish the Ca^{2+} hypersensitivity of the myofilaments in these ovariectomized rats [3]. A surprising issue related to these findings is the similar Ca^{2+} hypersensitive effect reported in many studies in both animal and human cardiomyopathic hearts [4–6] with almost the same magnitude of change as that detected in ovariectomized hearts. It is therefore interesting to investigate the possible mechanism by which estrogen deprivation induces increased calcium responsiveness of cardiac myofilament activation.

Stimulation of cardiac β -adrenergic receptors is the most prominent and functionally relevant means among mechanisms controlling cardiac function [7]. Binding of agonists to β_1 -adrenoceptors activates cAMP-dependent protein kinase via G-protein coupling process that mediates the phosphorylation of several intracellular proteins responsible for a calcium-mediated increase in cardiac contractility [8]. It remains an unresolved question whether alteration in cardiac adrenergic signaling is a contributing cause or a result of ventricular dysfunction detected in many pathological conditions. It is, however, generally accepted that chronically augmented stimulation of the β -adrenergic system is toxic to the heart and may contribute to the pathogenesis of heart failure [9]. It has also been shown that overexpression of β_1 -adrenoceptors in the heart may lead to a short-lived improvement of cardiac function but ultimately leads to marked cardiomyopathy [10]. In human and several animal models of heart failure, the elevated circulating catecholamines result in the reduction in the density and functional activity of cardiac β_1 -adrenergic receptors [11,12]. It is currently believed that desensitization protects the heart from the deleterious effects of inotropic β_1 -adrenergic stimulation. In contrast to cardiomyopathic condition, studies in ovariectomized rats demonstrated no change in the plasma catecholamine level [13]. With the similar Ca^{2+} hypersensitive effect detected in the ovariectomized hearts to those in cardiomyopathic hearts, it was of interest to investigate whether ovariectomy induces any change in the β_1 -adrenergic receptors that may be responsible for the functional alterations of the heart.

In the present investigation we have asked the following questions: did long term deprivation of ovarian sex hormones affect the density and binding affinity of cardiac β_1 -adrenergic receptors? Which ovarian sex hormone played a significant role in controlling the activity of β_1 -adrenoceptors? To answer these questions, analyses of β_1 -adrenergic receptors in the sarcolemmal preparations from 10-week ovariectomized and pair-fed ovariectomized rat hearts were compared to that of sham control using [^3H]-dihydroalprenolol, [^3H]-DHA, as an agonist for the assay. Immunoblots of β_1 -adrenoceptors in various cardiac homogenate preparations were also determined. Studies of hormonal supplementation groups were consequently examined using ovariectomized rats as control.

Methods

Animal Preparations

Female Sprague Dawley rats were ovariectomized or sham-operated at 8–9 weeks of age. The rats were kept in a temperature-controlled room with a 12-hour light/dark cycle throughout the duration of