

รายงานการวิจัย

ผลร่วมกันของยาต้านเบต้าแอดรีเนอร์จิกรีเซพเตอร์และ
แองจิโอเทนซินรีเซพเตอร์ต่อการดำเนินโรคระยะแรกในภาวะหัวใจล้มเหลว

**Combined effects of β -adrenergic blocker and
angiotensin receptor blocker on the early progression of
heart failure**

ผู้ดำเนินงานวิจัย

ผศ.ดร.เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์

ดร.อาตุลย์ มีพลู

ผศ.ดร.จันทรวรรณ แสงแข

เริ่มบริการ

21 ส.ค. 2551 *๑๕/๑๑/๑๙*

17 ก.ย. 2551

234335

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2548-2549

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2548-2549

มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ : ผลร่วมกันของยาต้านเบต้าแอดรีเนอร์จิกรีเซพเตอร์และแองจิโอเทนซินรีเซพเตอร์ต่อการดำเนินโรคระยะแรกในภาวะหัวใจล้มเหลว

Combined effects of β -adrenergic blocker and angiotensin receptor blocker on the early progression of heart failure

ผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ นางเพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์
 วุฒิการศึกษา Ph.D. (Physiology), University of Melbourne, Australia
 ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
 โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3166
 E-mail petchara@buu.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ นายอาคูลย์ มีพลู
 วุฒิการศึกษา ปริญญาโท (กายวิภาคศาสตร์) มหาวิทยาลัยมหิดล
 ตำแหน่ง อาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
 โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3167

ชื่อ นางสาวจันทร์วรรณ แสงแข
 วุฒิการศึกษา Ph.D. (Biological and Medical Science), University of Paris 13, France
 ตำแหน่ง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
 โทรศัพท์ 038-745900 ต่อ 3166

ผลร่วมกันของยาต้านเบต้าแอดรีเนอร์จิกรีเซพเตอร์และ แองจิโอเทนซินรีเซพเตอร์ต่อการดำเนินโรคระยะแรกในภาวะหัวใจล้มเหลว

เพชรรัตน์ ตรงต่อศักดิ์ อาดุลย์ มีพลู และ จันทรวรรณ แสงแข

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

บทคัดย่อ

การดำเนินโรคในภาวะหัวใจล้มเหลวมีความสัมพันธ์กับการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกและ rennin-angiotensin system มากกว่าปกติ จึงได้มีการเสนอแนะว่าการรักษาโดยการให้ยาที่มีผลปิดกั้น β -adrenergic receptors และ angiotensin II receptors พร้อมกันน่าจะช่วยชะลอการดำเนินโรคและช่วยปรับให้หัวใจทำงานได้ดีขึ้น การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อทดสอบผลร่วมกันของยา angiotensin receptor blocker (ARB) และ β -blocker (BB) ในรูปแบบการทดลองโดยใช้ norepinephrine infusion เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพคล้ายในภาวะหัวใจล้มเหลว การทดลองได้แบ่งหนูขาวออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้ (1) กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยาใดๆ (CLRT), (2) กลุ่มที่ให้ norepinephrine infusion (NE) ทางใต้ผิวหนังในขนาด $100 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$, (3) กลุ่มที่ให้ NE infusion และให้ยา BB (propranolol $20 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$; BB), (4) กลุ่มที่ให้ NE infusion และให้ยา ARB (losartan $15 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$) ร่วมกับยา BB (propranolol $15 \text{ mg}/\text{kg}/\text{d}$) (ARB+BB) การให้ยาแก่หนูขาวใช้วิธีละลายยาในน้ำกินและให้ยาเป็นระยะเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่า กลุ่ม NE จะมีการเพิ่มอย่างมีนัยสำคัญของ cardiac mass index, left ventricular (LV) mass index, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และการสะสมของ collagen ในผนังของ interventricular septum และ LV การให้ยา BB และ ARB+BB สามารถทำให้ดัชนีเหล่านี้ลดลง โดยยา ARB+BB นั้นมีแนวโน้มลด hypertrophic mass index และการสะสมของ collagen ได้มากกว่า แต่ยา BB มีแนวโน้มลดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้มากกว่า การประเมินการทำงานของหัวใจได้ใช้วิธีการทดลองแบบ isolated heart perfusion และประเมินในขณะที่กระตุ้นหัวใจในระดับต่ำและระดับสูงด้วย isoproterenol 10^{-9} M and 10^{-6} M ตามลำดับ การทดลองพบว่าหัวใจกลุ่ม NE มีการเสื่อมในหน้าที่ทั้งในช่วงบีบตัวและคลายตัว ดังจะเห็นได้จากการลดลงของค่า LV pressure, $dP/dt \text{ max}$ และ $dP/dt \text{ min}$ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า ventricular end diastolic pressure (VEDP) สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ การให้ยา BB ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่ของหัวใจที่เกิดจาก NE ได้ แต่มีผลให้ VEDP ลดลงเล็กน้อย การให้ยา ARB+BB นั้นสามารถปรับการทำงานของหัวใจทั้งในช่วงบีบตัวและคลายตัวให้ดีขึ้นได้บางส่วนขณะถูกกระตุ้นในระดับต่ำ แต่เมื่อกระตุ้นอย่างแรงก็จะพบการเสื่อมหน้าที่ได้ โดยสรุปผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การให้ยา ARB และ BB ร่วมกันสามารถปรับการทำงานของหัวใจให้ดีขึ้นได้บางส่วนและป้องกันการเกิด cardiac hypertrophy และ fibrosis ซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโดย NE การให้ non-selective β -blocker ในขนาดยาที่สูงไม่สามารถปกป้องการทำงานของหัวใจได้

Combined effects of β -adrenergic blocker and angiotensin receptor blocker on the early progression of heart failure

Petcharat Trongtorsak, Ardool Meepool, and Chantarawan Saengkhae

Department of Medical Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 30131

Abstract

The progression of heart failure is associated with hyper-activation of sympathetic nerve and rennin-angiotensin system. It has been proposed that combined blockade of β -adrenergic receptors and angiotensin II receptors may prevent the progression of heart failure and improve cardiac function. The purpose of this study was to investigate the combined effects of angiotensin receptor blocker (ARB) and β -blocker (BB) in a model of norepinephrine-infusion imitating the pathological condition of heart failure. Rats were separated into 4 groups as follows: (1) non-treated control (CTRL); (2) norepinephrine treatment by subcutaneously infusion at 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ (NE); (3) NE infusion with BB treatment (propranolol 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$; BB); (4) NE infusion with combined treatment of ARB (losartan 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) and BB (propranolol 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) (ARB+BB). The drugs were dissolved in drinking water and all treatments were continued for 14 days. NE significantly increased cardiac mass index, left ventricular (LV) mass index, myocyte diameter and collagen deposition in inter-ventricular septum and LV. Both BB and ARB+BB treatment reversed these changes. ARB+BB showed a tendency to have more pronounced effects on hypertrophic mass index and the amount of collagen, whereas BB exhibited more intense effect on myocyte size. Cardiac function was assessed using isolated heart perfusion upon the low and high stimulation with isoproterenol 10^{-9} M and 10^{-6} M respectively. NE showed a systolic and diastolic dysfunction, as indicated by decreases in LV pressure, dP/dt max and dP/dt min, as well as an insignificantly higher ventricular end diastolic pressure (VEDP) compared to CTRL. BB could not prevent cardiac dysfunction induced by NE, except for the slightly decrease in VEDP. In comparison, ARB+BB partly preserved systolic and diastolic functions during low stimulation, but not at high stimulation. In conclusion, the findings demonstrated that combined treatment with ARB and BB could partly improve cardiac function and prevent cardiac hypertrophy and fibrosis induced by NE. Moreover, treatment with non-selective β -blocker at high dose could not preserve cardiac function.

สารบัญเรื่อง

| | |
|--------------------|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ค |
| สารบัญเรื่อง | ง |
| สารบัญตาราง | ฉ |
| สารบัญรูปภาพ | ฅ |
| คำอธิบายคำย่อ | ซ |

| | |
|---|----|
| บทนำ (Introduction) | 1 |
| การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง | 1 |
| สมมุติฐานหรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย | 4 |
| วัตถุประสงค์ของโครงการ | 5 |
| ขอบเขตของการวิจัย | 5 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 6 |
| วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods) | 7 |
| สัตว์ทดลองและการให้ยา | 7 |
| การประเมินผลของยาต่อการทำงานของหัวใจ (cardiac function) | 8 |
| การประเมินผลของยาต่อการเกิด cardiac fibrosis | 9 |
| การประเมินผลของยาต่อการเกิด cardiac hypertrophy | 9 |
| การประเมินผลของยาต่อ hypertrophy mass index | 9 |
| การประเมินผลของยาต่อขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ | 9 |
| การวิเคราะห์ข้อมูล | 9 |
| ผลการทดลอง (Results) | 11 |
| ผลของยาต่อ cardiac hypertrophy | 11 |
| ผลของยาต่อ cardiac fibrosis | 13 |
| ผลของยาต่อการทำงานของหัวใจ (cardiac function) | 15 |
| การทำงานของหัวใจขณะถูกกระตุ้นในระดับต่ำ | 15 |
| การทำงานของหัวใจขณะถูกกระตุ้นอย่างแรง | 17 |

| | |
|---|----|
| อภิปรายผลการทดลอง (Discussion) | 22 |
| ผลของยาในการป้องกันการเกิด cardiac hypertrophy และ cardiac fibrosis | 22 |
| ผลของยาในการป้องกันการเสื่อมหน้าที่การทำงานของหัวใจ | 24 |
| สรุปและเสนอแนะ | 26 |
| เอกสารอ้างอิง (References) | 28 |

สารบัญตาราง

- ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลของยาต่อดัชนีชี้วัดภาวะหัวใจโตทั้งในระดับอวัยวะ ระดับเนื้อเยื่อ และระดับเซลล์

สารบัญภาพ

- รูปที่ 1 แผนภูมิแสดงพยาธิสรีรวิทยาในภาวะหัวใจล้มเหลวและแนวคิดของงานวิจัย
- รูปที่ 2 เปรียบเทียบผลการให้ยาต่อการเปลี่ยนแปลงของ collagen ในผนังหัวใจ
- รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลง LVP และ $dP/dt \text{ max}$ เมื่อให้ Isoproterenol 10^{-9} M
- รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลง VEDP และ $dP/dt \text{ min}$ เมื่อให้ Isoproterenol 10^{-9} M
- รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลง LVP และ $dP/dt \text{ max}$ เมื่อให้ Isoproterenol 10^{-6} M
- รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลง VEDP และ $dP/dt \text{ min}$ เมื่อให้ Isoproterenol 10^{-6} M

คำอธิบายตัวย่อ

| | |
|---------------|---|
| ACE | angiotensin converting enzyme |
| ACE-I | angiotensin converting enzyme inhibitor |
| Ang II | angiotensin II |
| ARB | angiotensin receptor blocker |
| BB | β -blocker |
| BW | body weight |
| $[Ca^{2+}]_i$ | ความเข้มข้นของ calcium ภายในเซลล์ |
| CO | cardiac output |
| CTRL | control |
| dP/dt max | อัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วง ventricle บีบตัว |
| dP/dt min | อัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วง ventricle คลายตัว |
| HW | heart weight |
| Iso | isoproterenol |
| LV | left ventricular |
| LVP | left ventricular pressure |
| LVW | left ventricular weight |
| NE | norepinephrine |
| PLB | phospholamban |
| RAAS | rennin-angiotensin-aldosterone system |
| RVW | right ventricular weight |
| RyR | ryanodine receptor |
| SR | sarcoplasmic reticulum |
| SERCA2 | sarcoplasmic reticulum calcium pump |
| VEDP | ventricular end diastolic pressure |

บทนำ (Introduction)

ภาวะหัวใจล้มเหลว (heart failure) เป็นภาวะผิดปกติที่หัวใจไม่สามารถฉีดเลือดออกไปเลี้ยงเนื้อเยื่อให้เพียงพอกับความต้องการของร่างกายได้ เนื่องจากมีความผิดปกติในการบีบตัวและ/หรือการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (Braunwald, 2001) ภาวะหัวใจล้มเหลวมักเป็นผลพวงสุดท้ายของโรคส่วนใหญ่ในระบบหัวใจและหลอดเลือด เช่น โรคหัวใจขาดเลือด โรคความดันโลหิตสูง ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ ความผิดปกติของลิ้นหัวใจ เป็นต้น (Francis, 2001) ปัจจุบันมีประชากรกว่า 20 ล้านคนที่ต้องทนทุกข์ทรมานกับภาวะหัวใจล้มเหลว ความชุก (prevalence) ของการเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวประมาณ 0.4-2 % ของประชากรทั่วไป (Dominguez, 1999) ภาวะหัวใจล้มเหลวจัดเป็นการเจ็บป่วยที่ร้ายแรง เพราะการดำเนินของโรคจะทำให้ประสิทธิภาพการฉีดเลือดของหัวใจเลวลงเรื่อยๆ จนทำให้ 50% ของผู้ป่วยโรคนี้นับตายอย่างฉับพลัน (sudden cardiac death) (de Teresa et al, 2000) ประมาณครึ่งหนึ่งของผู้ป่วยที่ได้รับการวินิจฉัยว่ามีภาวะหัวใจล้มเหลว มักตายภายใน 4 ปี และผู้ป่วยที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวอย่างรุนแรงตายภายใน 1 ปี (Dominguez et al, 1999) แม้ว่าปัจจุบันนี้การศึกษาวินิจฉัยทำให้ทราบพยาธิสรีรวิทยาของโรคนี้น่าจะดีขึ้น และมีการนำผลการศึกษามาพัฒนาการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลว แต่ยังคงพบว่าผู้ป่วยโรคนี้อัตราการป่วยและอัตราการตายสูง ดังนั้นยังมีความจำเป็นต้องทำการศึกษาวินิจฉัยเพื่อพัฒนาการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลวให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยโรคนี้น่าจะสามารถดำเนินชีวิตอย่างปกติสุข ช่วยลดภาวะเสี่ยงต่อการตายอย่างฉับพลันของผู้ป่วย และยังสามารถป้องกันการดำเนินโรคไม่ให้เลวร้ายยิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลบ่อย เป็นการช่วยประหยัดงบประมาณค่ารักษาพยาบาล และช่วยให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง (Review Literature)

สาเหตุของภาวะหัวใจล้มเหลวมีมากมายซึ่งอาจเกิดจาก โรคหลอดเลือดของหัวใจ (coronary artery disease) ความผิดปกติของลิ้นหัวใจ (valvular heart disease) โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) และอื่นๆ (Francis, 2001) ไม่ว่าภาวะหัวใจล้มเหลวจะเกิดจากสาเหตุใดก็ตาม การเกิดพยาธิสภาพจะมีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ จะพบความผิดปกติในหน้าที่ของหัวใจทำให้ปริมาตรเลือดที่ฉีดออกจากหัวใจต่อหน่วยเวลา (cardiac output; CO) ลดลง ในระยะแรกหัวใจจะมีการปรับตัวเพื่อคงระดับ CO ดังนี้ (1) การเพิ่มปริมาตรเลือดในหัวใจ หรือเพิ่ม preload มีผลเพิ่มแรงบีบตัวตาม Frank-Starling Mechanism (2) กล้ามเนื้อหัวใจเกิด hypertrophy โดยมีการเพิ่มมวลของ contractile tissue (3) มีการกระตุ้นประสาทและฮอร์โมน (neurohormonal activation) พบว่ามีการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเทติก (sympathetic nerve) ทำให้มีการหลั่ง norepinephrine (NE) ซึ่งจะมีผลเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจ นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้น rennin-angiotensin-aldosterone

system (RAAS) เพื่อคงระดับแรงดันเลือดและการนำเลือดไปสู่อวัยวะสำคัญ การปรับตัวของหัวใจนี้จะสามารถเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจและช่วยคงระดับ CO ได้ในระยะแรก แต่เมื่อต้องปรับตัวเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติของหัวใจได้ (Braunwald, 2001; Zevitz et al, 2006)

การดำเนินของโรคในภาวะหัวใจล้มเหลวพบว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในเนื้อเยื่อหัวใจโดยเฉพาะใน left ventricle (LV) ดังนี้ เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (apoptosis) สูญเสียเส้นใยปกติที่ยึดเหนี่ยวระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเกิด hypertrophy และมีการสะสมเส้นใยในช่องว่างระหว่างเซลล์อย่างผิดปกติ (interstitial fibrosis) (Francis, 2001; Jessup & Brozena; 2003; Zevitz et al; 2006) นอกจากนี้ยังพบว่าหัวใจมีการเจริญเติบโตแบบผิดปกติ โดยมีการเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีนและมีการแสดงออกของ fetal genes ซึ่งมักไม่พบในหัวใจของคนปกติที่โตเต็มวัย (Francis, 2001) การเกิด left ventricular hypertrophy เป็นผลให้ผนังของ LV แข็งขาดความยืดหยุ่นและไม่สามารถคลายตัวอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมักจะนำไปสู่การเพิ่มความดันใน LV ในระยะคลายตัว (left ventricular diastolic pressure) (Francis, 2001; Jessup & Brozena; 2003) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนี้ยังเกิดควบคู่กับการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกอย่างผิดปกติ เป็นผลให้ระดับฮอร์โมน norepinephrine (NE) ในเลือดเพิ่มขึ้นมาก (Naga Prasad et al, 2001) หากระดับ NE ในเลือดสูงการดำเนินโรคจะเกิดรุนแรงขึ้นและการพยากรณ์โรคไม่ดี (Braunwald, 2001) การกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกและการลดปริมาณเลือดที่ไหลออกจากหัวใจเป็นผลให้กระตุ้น RAAS ทำให้ระดับฮอร์โมน angiotensin II (AngII) ในเลือดเพิ่มขึ้น (Campbell et al, 2001; Frams et al, 2001) ทั้ง NE และ AngII มีผลทำให้หลอดเลือดตีบตัว ยังเป็นการเพิ่มภาระงานแก่หัวใจ ทำให้หัวใจต้องทำงานหนักขึ้น นอกจากนี้ AngII ยังกระตุ้นให้มีการหลั่ง aldosterone ซึ่งทำให้มีการคั่งของเกลือและน้ำในร่างกาย เป็นการเพิ่มภาระงานให้แก่อวัยวะอีกทางหนึ่ง (Carson, 1996; Francis; 2001) นอกจากนี้การเพิ่มระดับ NE และ AngII ในเลือดแล้ว ยังพบว่ามีการหลั่งสารตีบหลอดเลือด endothelin-1 และ tumor necrosis factor ซึ่งมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Francis, 2001; Jessup & Brozena; 2003; Zevitz et al; 2006)

ยังมีหลักฐานยืนยันว่าทั้ง NE และ AngII มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในกล้ามเนื้อหัวใจ สารทั้งสองมีผลกระตุ้นให้เกิดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) (Chiba et al, 1989; Booz et al, 1996) ซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มแรงบีบตัวของหัวใจในระยะแรกของการดำเนินโรค แต่ในระยะยาวแล้วกลับทำให้แรงบีบตัวของหัวใจลดลง (Conrad & Brooks, 1991) การเพิ่มระดับ AngII ยังส่งผลให้เกิดเส้นใยในผนังหัวใจอย่างผิดปกติ (cardiac fibrosis) ทำให้ผนังหัวใจขาดความยืดหยุ่น (Ruzicka & Leenen, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่าทั้ง NE และ AngII ยังมีผลกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocyte apoptosis) ซึ่งสัมพันธ์กับการลดประสิทธิภาพการบีบตัวของหัวใจในระยะดำเนินโรค (Colucci et al, 2000; Kajstura et al, 1997) ดังนั้นการกระตุ้นประสาท

และฮอร์โมนอย่างเรอรั้งในภาวะหัวใจล้มเหลวจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหัวใจอย่างผิดปกติซึ่งจะนำไปสู่การบีบตัวที่ผิดปกติได้ (Francis, 2001; Zevitz et al; 2006) จากการศึกษาพบว่าในภาวะหัวใจล้มเหลวกล้ามเนื้อหัวใจจะมีความผิดปกติในกลไกการหดตัว (excitation-contraction coupling) ลดอัตราเร็วในการหดตัวและคลายตัว แรงหดตัวลดลง (Conrad et al, 1991) จากการศึกษาในหนูทดลองที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวพบว่าโปรตีนของ calcium pump ที่ sarcoplasmic reticulum มีระดับลดลง ซึ่งโปรตีนนี้มีบทบาทในการนำ Ca^{2+} ออกจาก cytoplasm (Liao et al, 2007) แสดงว่าเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในภาวะหัวใจล้มเหลวน่าจะมีความบกพร่องในการจัดการกับระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ NE ยังมีผลเพิ่มการนำ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระดับ Ca^{2+} ในเซลล์สูงเกินไปจนเหนียวนำไปเกิด cardiac arrhythmia ทำให้ผู้ป่วยตายอย่างเฉียบพลัน (Zevitz et al, 2006)

การรักษาภาวะหัวใจล้มเหลวในอดีตมักให้ยากระตุ้นแรงบีบตัวของหัวใจ (inotropic drug) และยาในกลุ่มขยายหลอดเลือด (vasodilator) เพื่อช่วยลดภาระงานแก่หัวใจ (afterload) โดยมุ่งบรรเทาอาการและอาการแสดงซึ่งจะช่วยให้ผู้ป่วยมีอาการดีขึ้นในระยะแรก แต่ผลระยะยาวแล้วกลับทำให้เพิ่มอัตราการตาย (Katz, 2003) ดังได้กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าการกระตุ้นประสาทและฮอร์โมนมีผลให้การดำเนินโรคในภาวะหัวใจล้มเหลวรุนแรงยิ่งขึ้น การรักษาในปัจจุบันจึงมุ่งระงับการดำเนินโรคที่เป็นผลจากการกระตุ้นประสาทและฮอร์โมน (Francis, 2001; Greenberg, 2001; Lee & Vasan, 2006) ยาที่มักได้รับการเลือกใช้ในระดับแรกได้แก่ (1) ยาที่มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ NE ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติก โดยยาออกฤทธิ์ปิดกั้นที่ β -adrenergic receptors (β -blockers) ที่หัวใจและหลอดเลือด (2) ยาในกลุ่ม angiotensin converting enzyme inhibitor (ACE-I) ที่มีผลยับยั้งเอนไซม์ ACE ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิต AngII (3) ยาในกลุ่มที่มีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ของ AngII โดยออกฤทธิ์ปิดกั้นที่ AngII receptors (angiotensin receptor blocker; ARB) (Braunwald, 2001; Jessup & Brozena, 2003; Lee & Vasan, 2006)

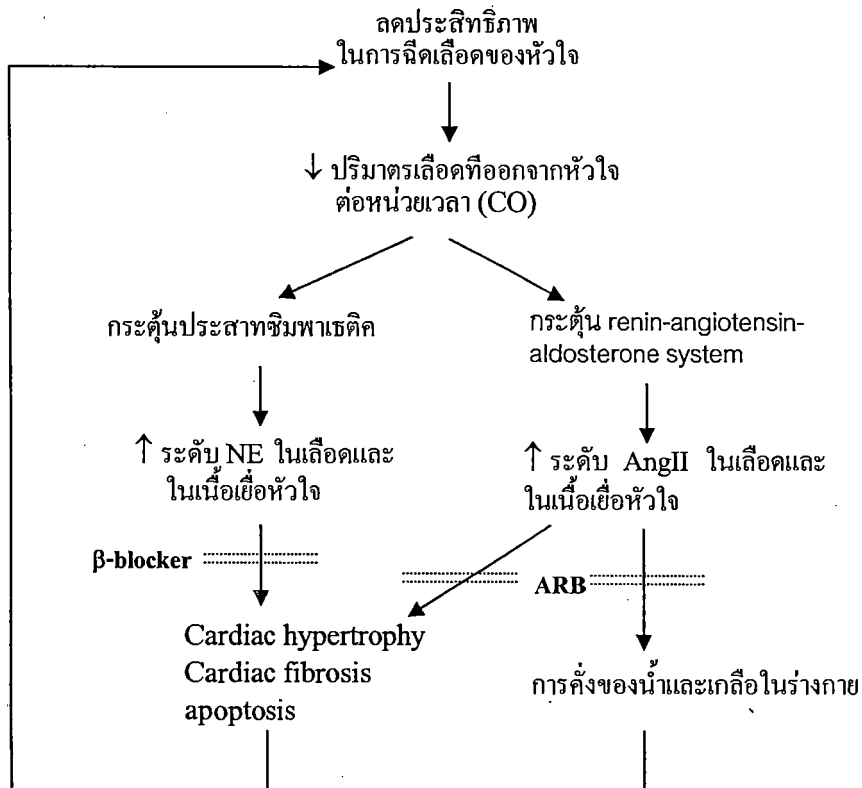
มีรายงานยืนยันถึงประสิทธิผลของ β -blockers ในการรักษาว่า ยาในกลุ่มนี้มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจ (Bristow, 2000; Cruz et al, 2007; Sabbah, 1999) ลดภาวะหัวใจโต (Khattar, 2003; Sabbah, 1999) ลดการตาย (apoptosis) ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Sabbah, 1999) อีกทั้งยังลดความบ่อยของการเกิดอาการในผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว จึงลดอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาล และลดอัตราการตายของผู้ป่วย (Bristow, 2000; Packer, 2001) นอกจากนี้ β -blockers ยังสามารถลดระดับ AngII ในเลือดของผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวอีกด้วย (Campbell, 2001) ส่วนผลการศึกษารักษาภาวะหัวใจล้มเหลวด้วย ACE-I พบว่า ACE-I สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฉีดเลือดของหัวใจในภาวะหัวใจล้มเหลว (Lui et al, 1997) และมีผลทำให้หลอดเลือดขยายตัวจึงลดความต้านทานต่อการฉีดเลือดของหัวใจ ทำให้ภาระงาน (afterload) ของหัวใจลดลงด้วย (Frans et al, 2001) นอกจากนี้ ACE-I ยังให้ผลลด ventricular hypertrophy และลด

อัตราการตาย (Jessup & Brozena, 2003; Khattar, 2003) อย่างไรก็ตามการรักษาด้วย ACE-I ในทางคลินิกพบว่า การทำงานของหัวใจในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวเรื้อรังยังคงเลวลงเรื่อย ๆ ตามการดำเนินโรค และผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อผลข้างเคียงของยา (Peterson & Dunlap, 2002) ทั้งนี้เพราะยังมีเอนไซม์อื่นนอกเหนือจาก ACE ที่สามารถสร้าง AngII ได้เช่น chymase และ cathepsin เป็นต้น (Dostal & Baker, 1999) การยับยั้งการทำงานของ ACE นั้นไม่สามารถปิดกั้นการสร้าง AngII ได้อย่างสมบูรณ์ จึงพบว่าการดำเนินโรคยังคงเป็นมากขึ้น (Roig et al, 2000) ด้วยเหตุนี้จึงได้มีการเสนอแนะให้ใช้ยาในกลุ่ม ARB ซึ่งมีผลการศึกษายืนยันว่าน่าจะให้ผลดีกว่า ACE-I ผู้ป่วยมีความทนต่อยาได้ดีกว่าการให้ ACE-I อีกทั้งยังลดอัตราการเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลและอัตราการตายอีกด้วย (Berger et al, 2007; Granger et al, 2003; McMurray et al, 2003; Pfeffer et al, 2003; Pitt et al, 1997; Yusuf et al, 2003) นอกจากนี้ยังการนำ ARB ให้ร่วมกับ ACE-I ในการรักษาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง RAAS ผลการศึกษาพบว่าสามารถลดอัตราการป่วยและอัตราการตายได้ (McMurray et al, 2006) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า การให้ ARB ร่วมกับ ACE-I นั้นมีผลทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเสียหายที่ในการหดตัวโดยเฉพาะในภาวะที่ได้รับอาหารที่มีโซเดียมต่ำ (Trongtorsak et al, 2003) ดังนั้นการใช้ยาทั้งสองร่วมกันจึงควรต้องใช้อย่างระมัดระวัง โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่ต้องได้รับอาหารที่มีโซเดียมต่ำ

เนื่องจากการปิดกั้นผลจากประสาทหรือฮอร์โมนอย่างใดอย่างหนึ่งนั้น ไม่สามารถยับยั้งการดำเนินโรคอย่างสมบูรณ์ได้ เพราะอีกระบบหนึ่งยังทำงาน การปิดกั้นผลจากประสาทและฮอร์โมนพร้อมๆ กันน่าจะให้ผลการรักษาที่ดีกว่า (รูปที่ 1) เนื่องจากยังไม่ปรากฏการศึกษายืนยันผลของการให้ β -blocker ร่วมกับ ARB ในภาวะหัวใจล้มเหลว จึงนำมาสู่การศึกษาค้นคว้าเพื่อทดสอบผลการให้ β -blocker และ ARB ต่อการทำงานของหัวใจ ภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) และต่อการสะสมเส้นใยในผนังหัวใจ (cardiac fibrosis)

สมมติฐานหรือกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าพยาธิสภาพในภาวะหัวใจล้มเหลวนั้นเกิดจากการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกและระบบ RAAS ทำให้ระดับ NE และ AngII ในเลือดเพิ่มขึ้น สารทั้งสองออกฤทธิ์ผ่าน β -adrenergic receptors และ angiotensin receptor ตามลำดับ ส่งผลให้เกิดภาวะหัวใจโต การสะสมเส้นใยในผนังหัวใจ การตายของเซลล์ และเกิดการคั่งของเกลือและน้ำในร่างกาย ความผิดปกติเหล่านี้ทำให้หัวใจต้องทำงานหนักและเสียหายที่ในการฉีดเลือดได้ ดังนั้นหากให้ยา β -blocker ร่วมกับ ARB เพื่อไปปิดกั้นการออกฤทธิ์ของ NE และ AngII พร้อมๆ กัน น่าจะส่งผลให้ลดการเกิดภาวะหัวใจโต ลดการสะสมเส้นใยในผนังหัวใจ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของหัวใจได้มากกว่าการปิดกั้นฤทธิ์ของ NE อย่างเดียว



รูปที่ 1: แผนภูมิแสดงพยาธิสรีรวิทยาในภาวะหัวใจล้มเหลว และแนวคิดของงานวิจัยในการให้ยาเพื่อลดการดำเนินโรค (ตรงตำแหน่งเส้นปะ) ด้วยยากลุ่ม β -blocker และ ARB

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาประสิทธิผลร่วมของยา β -blocker และ ARB ต่อการทำงานของหัวใจในภาวะหัวใจล้มเหลว
2. เพื่อศึกษาผลร่วมของยา β -blocker และ ARB ต่อการเกิดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) ในระยะดำเนินโรคในภาวะหัวใจล้มเหลว
3. เพื่อศึกษาผลร่วมของยา β -blocker และ ARB ต่อการสะสมเส้นใยในเนื้อเยื่อหัวใจ (fibrosis) ในภาวะหัวใจล้มเหลว

ขอบเขตของการวิจัย

รูปแบบของการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) โดยทำการทดลองในหนูขาว (rats) ที่เหนี่ยวนำให้มีพยาธิสภาพคล้ายกับภาวะหัวใจล้มเหลวด้วยวิธี NE infusion จากนั้นแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ไม่ให้ยา กลุ่มที่ให้ β -blocker อย่างเดียว และกลุ่มที่ให้ β -blocker ร่วมกับ ARB โดยทดสอบผลของยาต่อการทำงานและต่อโครงสร้างของหัวใจหนูทุกกลุ่ม ในการทดสอบผลของยาต่อการทำงานของหัวใจนั้น จะใช้วิธีทดสอบการตอบสนองของหัวใจต่อ

สารที่มีฤทธิ์กระตุ้นหัวใจ เพื่อประเมินการทำงานของกล้ามเนื้อหัวใจ ส่วนการทดสอบผลของยาต่อโครงสร้างของหัวใจนั้น จะใช้วิธีประเมินการเกิดภาวะหัวใจโต (Cardiac hypertrophy) ทั้งในระดับอวัยวะและระดับเซลล์ นอกจากนี้ยังประเมินการสะสมเส้นใยในเนื้อเยื่อหัวใจ (fibrosis) ด้วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทำให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิก เพื่อการรักษาผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลวต่อไป ซึ่งคาดว่าจะส่งผลให้การดำเนินโรคในผู้ป่วยลดลงและผู้ป่วยไม่ต้องเข้ารับการรักษาในโรงพยาบาลบ่อย ทำให้ประหยัดงบประมาณค่ารักษาพยาบาล และเป็นการช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย อย่างไรก็ตามการนำองค์ความรู้นี้ไปใช้ในทางคลินิกควรต้องมีการประเมินว่าสามารถลดอัตราการป่วยและอัตราการตายของผู้ภาวะหัวใจล้มเหลวได้หรือไม่ต่อไป
2. สามารถนำความรู้ที่ได้จากงานวิจัยนี้ไปสอดแทรกในการสอนนักศึกษาแพทย์และนักศึกษาในสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพของมหาวิทยาลัยบูรพา ซึ่งเป็นการพัฒนาการเรียนการสอนให้ก้าวทันกับความรู้ใหม่ๆด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย (Materials and Methods)

1. สัตว์ทดลองและการให้ยา

การทดลองได้ปฏิบัติตามข้อปฏิบัติในการใช้สัตว์ทดลอง และผ่านการเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยของมหาวิทยาลัยบูรพา

การศึกษานี้ใช้หนูแรท (rats) สายพันธุ์ Sprague Dawley เพศผู้ น้ำหนักตัวประมาณ 200-250 g การศึกษานี้จะเหนี่ยวนำให้หนูมีสภาพคล้ายภาวะหัวใจล้มเหลวด้วยวิธี NE infusion โดยใช้ mini-osmotic pump ซึ่งจะทำให้ระดับ NE ในเลือดสูงตลอดระยะเวลาของการทดลองและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหัวใจคล้ายในภาวะหัวใจล้มเหลว (Bonfont-Rousselot et al, 2002; Briest et al, 2001; Zimmer et al, 1995)

เตรียม NE (Sigma) ใน 0.9% NaCl ซึ่งมี 0.1 mg/ml ascorbic acid (Sigma) เพื่อป้องกันการเกิด oxidation บรรจุสารละลายที่เตรียมแล้วลงใน mini-osmotic pump (Alzet corporation, Palo Alto, CA, USA) ด้วยกระบวนการปลอดเชื้อ ความเข้มข้นของ NE จะปรับตามน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองเพื่อให้ mini-osmotic pump ปลดปล่อย NE ด้วยอัตรา 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{h}$ เป็นเวลาอย่างน้อย 14 วัน จากนั้นทำการผ่าตัดหนูเพื่อฝัง mini-osmotic pump โดยเริ่มจากทำให้หนูสลบด้วย 40 mg/kg pentobarbital sodium (Ceva Sante Animate) โดยฉีดเข้าช่องท้อง ทำการผ่าตัดเปิดผิวหนังด้านหลังบริเวณคอ ฝัง mini-osmotic pump ที่บรรจุ NE ไว้บริเวณใต้ผิวหนังแล้วเย็บปิดแผล และเริ่มใช้หนูในการทดลองหลังจากทำการผ่าตัด 1 วัน

การทดลองได้แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มๆละ 15 ตัว ดังนี้ (1) กลุ่มควบคุม (control; CTRL) เป็นหนูปกติที่ไม่ได้รับสารใดๆ (2) กลุ่มที่ได้รับเฉพาะ NE infusion (NE) (3) กลุ่มที่ได้รับ NE infusion และให้ยา propranolol (β -adrenergic receptor blocker; Astra Zeneca) 20 mg/kg/d (BB) (4) กลุ่มที่ได้รับ NE infusion และให้ยา propranolol 15 mg/kg/d ร่วมกับ losartan (angiotensin receptor blocker; Merck Sharp & Dohne) 15 mg/kg/d (ARB+BB) การให้ NE infusion และการให้ยานั้นจะให้เป็นเวลา 14 วัน การให้ยา β -blocker และ ARB จะเริ่มให้ 1 วันหลังผ่าตัดและให้โดยวิธีผสมยาในน้ำกิน เพื่อหลีกเลี่ยงการรบกวนหนู เพราะจากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าหนูที่ได้รับ NE infusion หากรบกวนหนูด้วยการฉีดยาหรือป้อนยาทางปาก หนูจะเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวอย่างเฉียบพลันและตายในที่สุด ดังนั้นหนูกลุ่มที่ 3 จะได้รับน้ำกินที่ผสมกับ propranolol ส่วนหนูกลุ่มที่ 4 จะได้รับน้ำกินที่ผสมกับ propranolol และ losartan โดยทำการปรับขนาดของยาทุกวันตามปริมาณน้ำที่หนูกินในรอบ 24 ชม. เพื่อให้หนูได้รับยาใกล้เคียงกับขนาดที่กำหนด เมื่อให้ยาครบ 14 วันจึงนำหนูไปใช้สำหรับการทดลองขั้นต่อไป

2. การประเมินผลของยาต่อการทำงานของหัวใจ (Cardiac function)

นำหนูที่ผ่านขั้นตอนในข้อที่ 1 แล้วมาชั่งน้ำหนักตัว และฉีด Heparin 1000 i.u./kg เข้าทางช่องท้อง หลังจากนั้น 20 นาทีทำหนูให้สลบด้วย pentobarbitone sodium 60 mg/kg โดยฉีดเข้าช่องท้อง เมื่อหนูสลบเปิดช่องอกแล้วแยกหัวใจออกจากตัวสัตว์ทดลอง นำหัวใจใส่ในภาชนะที่บรรจุ Krebs-Henseleit buffer ซึ่งประกอบด้วย (mM) 118 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 25.2 NaHCO_3 , 1.8 CaCl_2 , 11 Glucose, 1 pyruvic acid และปรับให้มี pH 7.4 วางภาชนะที่บรรจุหัวใจบนน้ำแข็งและให้ 95% O_2 - 5% CO_2 ตลอดเวลา จากนั้นทำการแยกเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากหัวใจ ชั่งน้ำหนักของหัวใจแล้วนำหัวใจแขวนบน Langendorff perfusion apparatus ซึ่งหัวใจจะได้รับการหล่อเลี้ยงด้วย Krebs-Henseleit buffer ที่มี pH 7.4 และให้ 95% O_2 - 5% CO_2 ตลอดเวลา อุณหภูมิของสารละลายได้รับการควบคุมให้คงที่ที่ 35°C โดย thermocirculator ปรับให้มี perfusion rate 6 ml/min/g tissue จากนั้นตัดผนัง left atrium ให้เป็นช่องแล้วใส่ latex balloon เข้าไปจน balloon เข้าไปใน left ventricle ปลายอีกด้านหนึ่งต่อเข้ากับ pressure transducer (BIOPAC Inc.) ซึ่งเชื่อมโยงกับระบบบันทึกคอมพิวเตอร์ (BIOPAC Inc.) เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดันใน left ventricle ตลอดการทดลอง ปรับปริมาตรของ balloon ให้ได้ end diastolic pressure (EDP) ในช่วง 5-10 mmHg ปลอยให้หัวใจเข้าสู่สภาวะคงที่เป็นเวลา 20-30 นาที ก่อนเริ่มทดลอง

การประเมินการทำงานของหัวใจจะประเมินในขณะที่หัวใจถูกกระตุ้นด้วย Isoproterenol (Sigma) ซึ่งเป็น β -adrenergic agonist ในขนาดยาต่ำ (10^{-9} M) และขนาดยาสูง (10^{-6} M) การทดลองจะเริ่มด้วยการให้ Isoproterenol (Iso) 10^{-9} M เป็นเวลา 5 นาที บันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดันของ left ventricle ทั้งก่อนและระหว่างให้ยา จากนั้นล้างยาออกและปล่อยให้หัวใจพักเป็นเวลา 15-20 นาที จึงประเมินการทำงานของหัวใจเมื่อถูกกระตุ้นอย่างแรงด้วย Iso 10^{-6} M เป็นเวลา 5 นาที และบันทึกการเปลี่ยนแปลงแรงดันของ left ventricle ทั้งก่อนและระหว่างให้ยา หากพบว่าหัวใจใดเกิด cardiac arrhythmia โดยเฉพาะในช่วงที่ให้ Iso 10^{-6} M จะตัดข้อมูลจากหัวใจเหล่านี้จากการวิเคราะห์ จากกราฟแรงดันของ left ventricle ที่บันทึกได้นำมาวิเคราะห์หาตัวชี้วัดการทำงานของหัวใจดังนี้ left ventricular pressure (LVP; mmHg) เป็นความดันที่เพิ่มขึ้นขณะ ventricle บีบตัว, dP/dt max (mmHg/s) เป็นอัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วงที่ ventricle บีบตัว, dP/dt min (mmHg/s) เป็นอัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วงที่ ventricle คลายตัว, และ ventricular end diastolic pressure (VEDP, mmHg) เป็นค่าความดันต่ำสุดใน ventricle ก่อนที่จะเริ่มบีบตัว ตัวชี้วัดเหล่านี้จะคำนวณให้อยู่ในรูปร้อยละของค่าก่อนให้ Iso (% of baseline) เปรียบเทียบการทำงานของหัวใจหนูแต่ละกลุ่มด้วยสถิติวิเคราะห์

เมื่อประเมินการทำงานของหัวใจเรียบร้อยแล้ว จะนำหัวใจแช่ในน้ำยาคงสภาพ Buoin's solution เพื่อหาปริมาณ collagen

3. การประเมินผลของยาต่อการเกิด cardiac fibrosis

นำหัวใจมาตัดแยกส่วนของหัวใจออกเป็น atria, right ventricle, inter ventricular septum, และ left ventricle ชั่งน้ำหนักของเนื้อเยื่อแต่ละส่วน นำเนื้อเยื่อแต่ละส่วนไปทำให้แห้งด้วย lyophilizer ทำการบั่นทึกน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อ แล้งนำไป hydrolyzed ด้วยกรด HCl เข้มข้นที่ 110°C จนแห้ง จากนั้นละลายตะกอนตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2 ml ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยการเขย่าอย่างแรงด้วยเครื่อง vortex mixer เป็นระยะ หลังจากตะกอนตัวอย่างละลายหมดแล้วนำสารละลายตัวอย่างจำนวน 200 μ l ผสมกับ 1.4% chloramines T (Acros Organics) ใน 0.5 M sodium acetate 10% isopropanol แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นผสมกับ Ehrlich's solution 500 μ l ซึ่งเป็นส่วนผสมของ 10 M p-dimethylaminobenzaldehyde, 70% isopropanol และ 30% perchloric acid (Acrosb Organics) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 550 nm และคำนวณหาปริมาณของ hydroxyproline โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ทำด้วยวิธีเดียวกัน โดยใช้สารละลาย trans-4-hydroxyl-L-proline (Acros Organics) ที่ความเข้มข้น 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 และ 0.03125 mg/ml เป็นตัวอย่าง จากนั้นทำการคำนวณหาปริมาณของ hydroxyproline ต่อ 1 g ของน้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อแต่ละส่วน และคำนวณหาปริมาณ collagen โดยนำปริมาณของ hydroxyproline ที่ได้คูณกับค่าคงที่ 7.46 ซึ่งคำนวณตามวิธีของ Weber et al (1987) ที่ชื่อว่า collagen ประกอบด้วย hydroxyproline 13.4% ปริมาณ collagen จะแสดงในรูปแบบ mg collagen ต่อ 100 g น้ำหนักแห้งของเนื้อเยื่อ (mg%) ทำการวิเคราะห์หาปริมาณ collagen ในหัวใจหนูทุกกลุ่ม นำค่าเฉลี่ยที่ได้จากหนูแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกันด้วยสถิติวิเคราะห์

4. การประเมินผลของยาต่อการเกิด cardiac hypertrophy

4.1 การประเมินผลของยาต่อ hypertrophy mass index

นำค่าของน้ำหนักของหัวใจ (heart weight; HW) ที่ได้จากข้อ 2 และค่าน้ำหนักเปียก (wet weight) ของ right ventricle (RVW) และ left ventricle (LVW) ที่ได้จากในข้อ 3 มาคำนวณหา cardiac mass index, right ventricular mass index, และ left ventricular mass index โดยเทียบกับน้ำหนักตัว (body weight; BW) ซึ่งใช้เป็นดัชนีชี้วัดภาวะ cardiac hypertrophy แสดงค่าดัชนีในรูปแบบ HW/BW (g/kg), RVW/BW (mg/g) และ LVW/BW (mg/g) ตามลำดับ นำค่าเฉลี่ยของดัชนีที่ได้จากหนูแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกันด้วยสถิติวิเคราะห์

4.2 การประเมินผลของยาต่อขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

การศึกษาส่วนนี้จะประเมินภาวะ cardiac hypertrophy ในระดับเซลล์ โดยนำหนูจากข้อที่ 1 กลุ่มละ 3 ตัวมาทำให้สลบด้วย pentobarbitone sodium 60 mg/kg โดยฉีดเข้าช่องท้อง ตัดแยกหัวใจ

ผลการทดลอง (Results)

ผลของยาต่อ Cardiac Hypertrophy

หนูกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับยาใดๆ ได้ควบคุมอายุของหนูกลุ่มนี้ให้มีอายุใกล้เคียงกับหนูกลุ่มทดลองทั้ง 3 กลุ่ม และแยกหัวใจเพื่อนำไปศึกษาในช่วงเวลาเดียวกันด้วย ตารางที่ 1 แสดงค่าดัชนีชี้วัดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) ของหนูทั้ง 4 กลุ่ม ดังจะเห็นว่าหนูกลุ่มที่ให้ NE infusion (NE) อย่างเดียวเป็นเวลา 14 วัน มีผลเพิ่ม HW/BW โดยเฉลี่ย 14% เพิ่ม LVW/BW โดยเฉลี่ย 20% และเพิ่มเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocyte diameter) โดยเฉลี่ย 29% และเมื่อเปรียบเทียบดัชนีเหล่านี้กับค่าของกลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับค่า RVW/BW ของกลุ่ม NE ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า การให้ NE infusion มีผลเพิ่มมวลของหัวใจและทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยเฉพาะในส่วนของ left ventricle ซึ่งบ่งชี้ว่าหัวใจของหนูกลุ่มนี้เกิดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy)

หนูในกลุ่มที่ให้ NE infusion ควบคู่กับการให้ยา β -blocker (BB) เป็นเวลา 14 วัน พบว่า β -blocker สามารถลด HW/BW และ LVW/BW อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NE อย่างไรก็ตาม β -blocker สามารถลดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NE ($P < 0.05$) ค่า LVW/BW ของหนูกลุ่มนี้ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยเฉลี่ย 15% และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนค่า RVW/BW นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า β -blocker มีผลลดภาวะหัวใจโตที่เกิดจาก NE ในระดับเซลล์ได้อย่างเด่นชัด (ตารางที่ 1)

หนูในกลุ่มที่ให้ NE infusion ควบคู่กับการให้ยา angiotensin receptor blocker ร่วมกับ β -blocker (ARB+BB) เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการให้ยาทั้งสองร่วมกันมีผลลด HW/BW อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NE ($P < 0.05$) ค่า LVW/BW ของหนูกลุ่มนี้สูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยเฉลี่ย 12% และต่ำกว่ากลุ่ม NE อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีผลลดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยพบว่าเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ลดลงและแตกต่างจากของหนูในกลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนค่า RVW/BW นั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่ม NE (ตารางที่ 1) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถลดภาวะหัวใจโตที่เกิดจาก NE

หากเปรียบเทียบกลุ่ม ARB+BB กับกลุ่ม BB แล้ว พบว่าดัชนีชี้วัดทุกค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ อย่างไรก็ตามจากตารางที่ 1 จะเห็นว่า การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker นั้นมีแนวโน้มลด HW/BW และ LVW/BW ได้มากกว่าแสดงว่าการให้ยาร่วมกันมีแนวโน้มลดมวลของเนื้อเยื่อได้

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบผลของการให้ยาต่อดัชนีชี้วัดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) ทั้งในระดับอวัยวะ ระดับเนื้อเยื่อ และระดับเซลล์

| Parameters | CTRL | NE | BB | ARB+BB |
|----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
| HW/BW (g/kg) | 4.124±0.07 (n=8) | 4.692±0.119* (n=8) | 4.397±0.100 (n=8) | 4.196±0.054** (n=8) |
| RVW/BW (mg/g) | 0.571±0.031 (n=7) | 0.652±0.062 (n=7) | 0.586±0.037 (n=7) | 0.659±0.022 (n=7) |
| LVW/BW (mg/g) | 1.521±0.059 (n=7) | 1.824±0.059* (n=7) | 1.759±0.035* (n=7) | 1.708±0.048 (n=7) |
| Myocyte diameter (μm) | 11.687±0.461 (n=3) | 15.100±0.407* (n=3) | 11.057±0.473** (n=3) | 11.450±0.472** (n=3) |

แสดงค่าในรูป mean±SEM; n คือจำนวนกลุ่มตัวอย่าง, CTRL: control; NE: norepinephrine; BB: β-blocker; ARB+BB: angiotensin receptor blocker+ β-blocker; HW/BW: heart weight per body weight ratio; RVW/BW: right ventricular weight per body weight ratio; LVW/BW: left ventricular weight per body weight ratio. *P<0.05 vs CTRL, **P<0.05 vs NE.

มากกว่า แต่การให้ยา β -blocker มีผลลดเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้มากกว่าจนต่ำกว่ากลุ่มควบคุมโดยเฉลี่ย 5% แสดงให้เห็นว่า β -blocker มีแนวโน้มลดภาวะหัวใจโตในระดับเซลล์ (cardiomyocyte hypertrophy) ได้มากกว่า

ผลของยาต่อ Cardiac Fibrosis

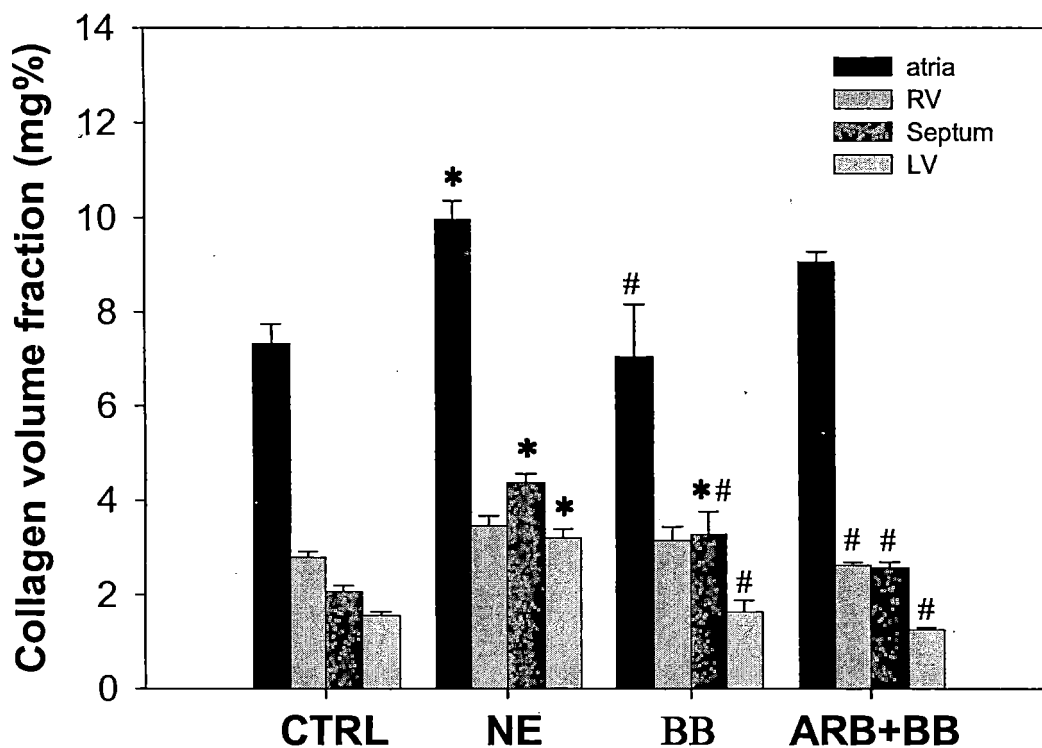
เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณ collagen ใน atria ของหัวใจหนูทั้ง 4 กลุ่ม พบว่ากลุ่ม NE นั้นมีปริมาณ collagen มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (9.97 ± 0.39 vs 7.23 ± 0.41 mg%; $P < 0.05$) การให้ยา β -blocker ในกลุ่ม BB นั้นสามารถลดปริมาณ collagen และแตกต่างจากกลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (7.05 ± 1.12 vs 9.97 ± 0.39 mg%; $P < 0.05$) ส่วน collagen ใน atria ของหนูกลุ่ม ARB+BB มีปริมาณต่ำกว่ากลุ่ม NE อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (9.07 ± 0.21 vs 9.97 ± 0.39 mg%; $P > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 2

เมื่อพิจารณาปริมาณ collagen ใน right ventricle (รูปที่ 2) พบว่ากลุ่ม NE มีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (3.46 ± 0.21 vs 2.80 ± 0.12 mg%) ส่วนปริมาณ collagen ใน right ventricle ของกลุ่ม BB (3.15 ± 0.29 mg%) ไม่แตกต่างจากกลุ่ม NE การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker มีผลลดปริมาณ collagen ในผนังหัวใจส่วนนี้และมีค่าต่ำกว่ากลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2.63 ± 0.05 vs 3.46 ± 0.21 mg%; $P < 0.05$)

จากรูปที่ 2 จะเห็นว่า NE มีผลให้ปริมาณ collagen ในส่วน septum เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (4.36 ± 0.19 vs 2.07 ± 0.12 mg%; $P < 0.05$) เมื่อให้ β -blocker อย่างเดียวมีผลลด collagen ในส่วน septum และแตกต่างจากกลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3.28 ± 0.48 vs 4.36 ± 0.19 mg%; $P < 0.05$) แต่ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (3.28 ± 0.48 vs 2.07 ± 0.12 mg%; $P < 0.05$) การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถลดปริมาณ collagen ในส่วน septum ได้อย่างมากจนมีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม แต่มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (2.58 ± 0.12 vs 4.36 ± 0.19 mg%; $P < 0.05$)

เมื่อพิจารณาในส่วน left ventricle จะเห็นว่า NE มีผลให้ปริมาณ collagen ในหัวใจส่วนนี้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (3.21 ± 0.18 vs 1.55 ± 0.08 mg%; $P < 0.05$) การให้ยา β -blocker อย่างเดียว และให้ ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถลดปริมาณ collagen ใน left ventricle (1.64 ± 0.24 และ 1.26 ± 0.04 mg% ตามลำดับ) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม NE อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 2

แม้ว่าปริมาณ collagen ในหัวใจแต่ละส่วนของหนูกลุ่ม ARB+BB ไม่ต่างจากกลุ่ม BB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker มีผลลดปริมาณ collagen ในผนังหัวใจห้องล่างได้ในสัดส่วนที่มากกว่าการให้ยา β -blocker อย่างเดียว ดังในรูปที่ 2 หากเปรียบเทียบปริมาณ collagen ในกลุ่ม NE แล้วจะเห็นว่า collagen ในส่วน right ventricle, septum, และ left ventricle



รูปที่ 2 เปรียบเทียบผลของการให้ยา β -blocker (BB) และการให้ angiotensin receptor blocker ร่วมกับ β -blocker (ARB+BB) ต่อการเปลี่ยนแปลงของ collagen ใน atria, right ventricle (RV), inter-ventricular septum, และ left ventricle (LV) ในหัวใจหนูขาวที่เหนียวทำให้เกิดพยาธิสภาพด้วย norepinephrine infusion (NE), CTRL: control;

* $P < 0.05$ vs corresponding control, # $P < 0.05$ vs corresponding NE

ของกลุ่ม BB ลดลงโดยเฉลี่ย 9%, 25% และ 49% ตามลำดับ แต่ในขณะที่กลุ่ม ARB+BB นั้นลดลงโดยเฉลี่ยถึง 24%, 41% และ 61% ตามลำดับ ดังนั้นผลการทดลองในส่วนนี้ชี้ให้เห็นว่า การให้ยา β -blocker อย่างเดียว และให้ ARB ร่วมกับ β -blocker นั้นสามารถลดการสะสมเส้นใยในผนังหัวใจ (cardiac fibrosis) แต่การให้ ARB ร่วมกับ β -blocker จะให้ผลที่เด่นชัดกว่าในหัวใจห้องล่าง

ผลของยาต่อการทำงานของหัวใจ (Cardiac Function)

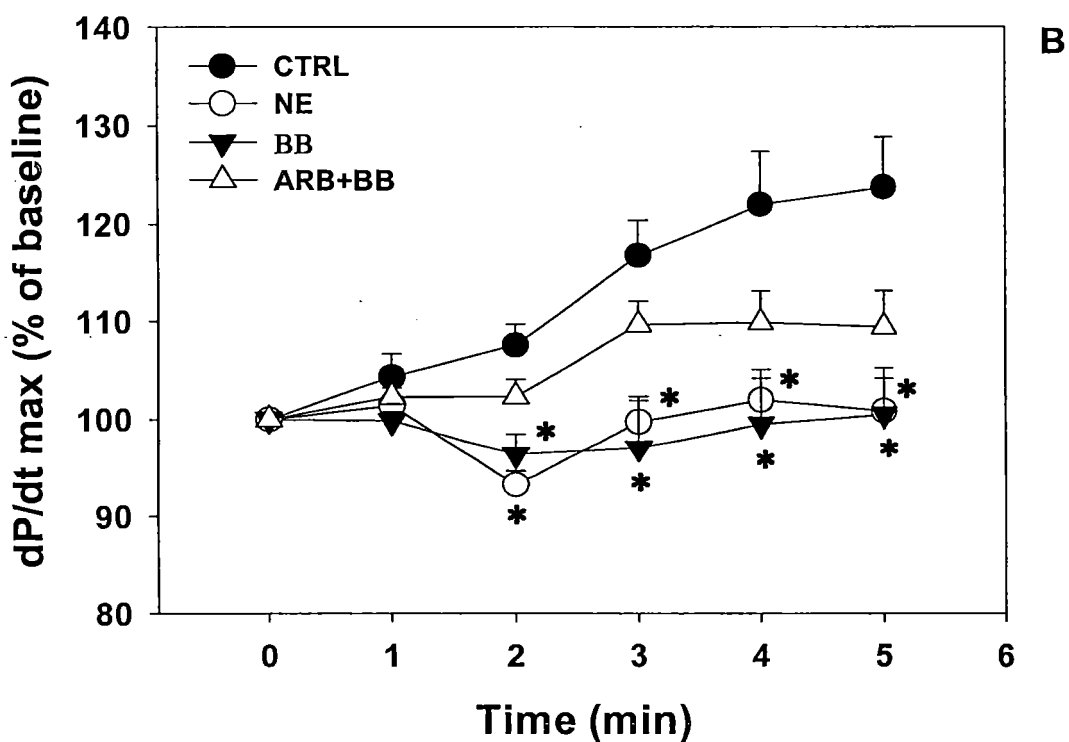
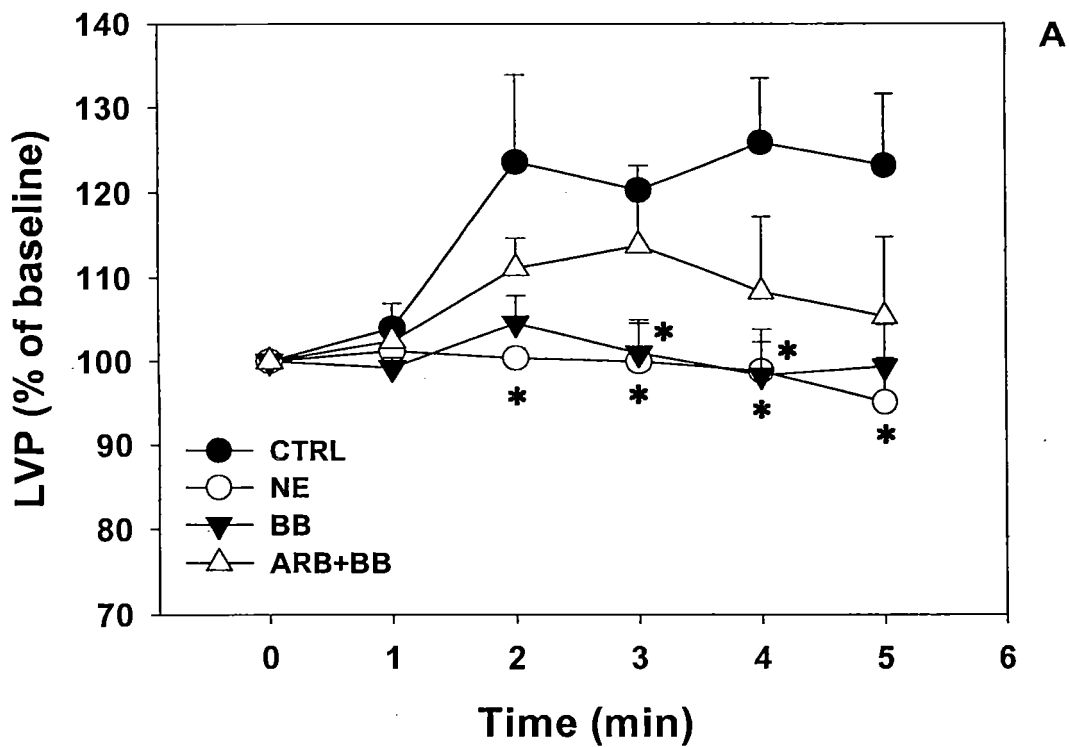
การศึกษานี้ได้ประเมินการทำงานของหัวใจใน 2 สถานะ คือ (1) สถานะที่หัวใจถูกกระตุ้นในระดับต่ำด้วย Isoproterenol (Iso) 10^{-9} M และ (2) สถานะที่หัวใจถูกกระตุ้นอย่างแรงด้วย Iso 10^{-6} M เพื่อเปรียบเทียบการปรับตัวต่อระดับภาระงานของหัวใจที่ได้จากหนูทั้ง 4 กลุ่ม

การทำงานของหัวใจขณะถูกกระตุ้นในระดับต่ำ

รูปที่ 3 แสดงการทำงานของหัวใจในช่วงบีบตัว (systolic function) ขณะให้ Iso 10^{-9} M เป็นเวลา 5 นาที โดยรูปที่ 3A แสดงการเปลี่ยนแปลง LVP หรือความดันของ left ventricle ขณะบีบตัว ซึ่งจะแปรผันกับแรงบีบตัวโดยตรง เมื่อให้ Iso 10^{-9} M พบว่า LVP ของหัวใจหนูกลุ่มควบคุมจะเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 20-26% โดยเพิ่มสูงสุดในนาทีที่ 4 ($125.87 \pm 7.57\%$ of baseline) ในขณะที่หัวใจกลุ่ม NE นั้นไม่มีการเพิ่ม LVP แต่กลับลดลงในนาทีที่ 5 ($95.10 \pm 5.27\%$ of baseline) นอกจากนี้ยังพบว่าค่า LVP ของกลุ่มนี้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 2-5 ($P < 0.05$) การตอบสนองของหัวใจกลุ่ม BB ต่อ Iso 10^{-9} M นั้น พบว่า LVP เพิ่มขึ้นสูงสุดเพียง 5% โดยเฉลี่ยในนาทีที่ 2 และมีค่าต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 3-4 ($P < 0.05$) ส่วนการตอบสนองของหัวใจกลุ่ม ARB+BB นั้นพบว่าสามารถเพิ่ม LVP ได้โดยเฉลี่ย 11-14% โดยเพิ่มสูงสุดในนาทีที่ 3 ($113.77 \pm 5.99\%$ of baseline) ดังแสดงในรูปที่ 3A

รูปที่ 3B แสดงการเปลี่ยนแปลง dP/dt max ซึ่งเป็นอัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วงที่ ventricle บีบตัวหรือเป็นตัวชี้วัดของอัตราเร็วในการบีบตัว เมื่อให้ Iso 10^{-9} M ค่า dP/dt max ของกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 8-24% ในช่วง 2-5 นาทีที่ให้สาร ในขณะที่กลุ่ม NE นั้นไม่สามารถเพิ่ม dP/dt max ได้ และพบว่าลดลงต่ำสุดในนาทีที่ 2 โดยลดลงถึง 7% โดยเฉลี่ย ค่า dP/dt max ในนาทีที่ 2-5 ของกลุ่มนี้มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อพิจารณาในกลุ่ม BB พบว่าไม่สามารถเพิ่ม dP/dt max เช่นกัน และต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 2-5 ($P < 0.05$) (รูปที่ 3B) ส่วนการตอบสนองของหัวใจกลุ่ม ARB+BB นั้นพบว่าสามารถเพิ่ม dP/dt max ได้ในนาทีที่ 3-5 โดยเพิ่มขึ้น 9-10% โดยเฉลี่ย ดังแสดงในรูปที่ 3B

ผลการทดลองในรูปที่ 3 แสดงให้เห็นว่าการให้ NE มีผลทำให้หัวใจเสื่อมหน้าที่ในช่วงบีบตัว (systolic function) การให้ยา β -blocker ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่นี้ได้ แต่การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถช่วยปรับการทำงานของหัวใจในช่วงบีบตัวให้กลับคืนมาได้บางส่วน



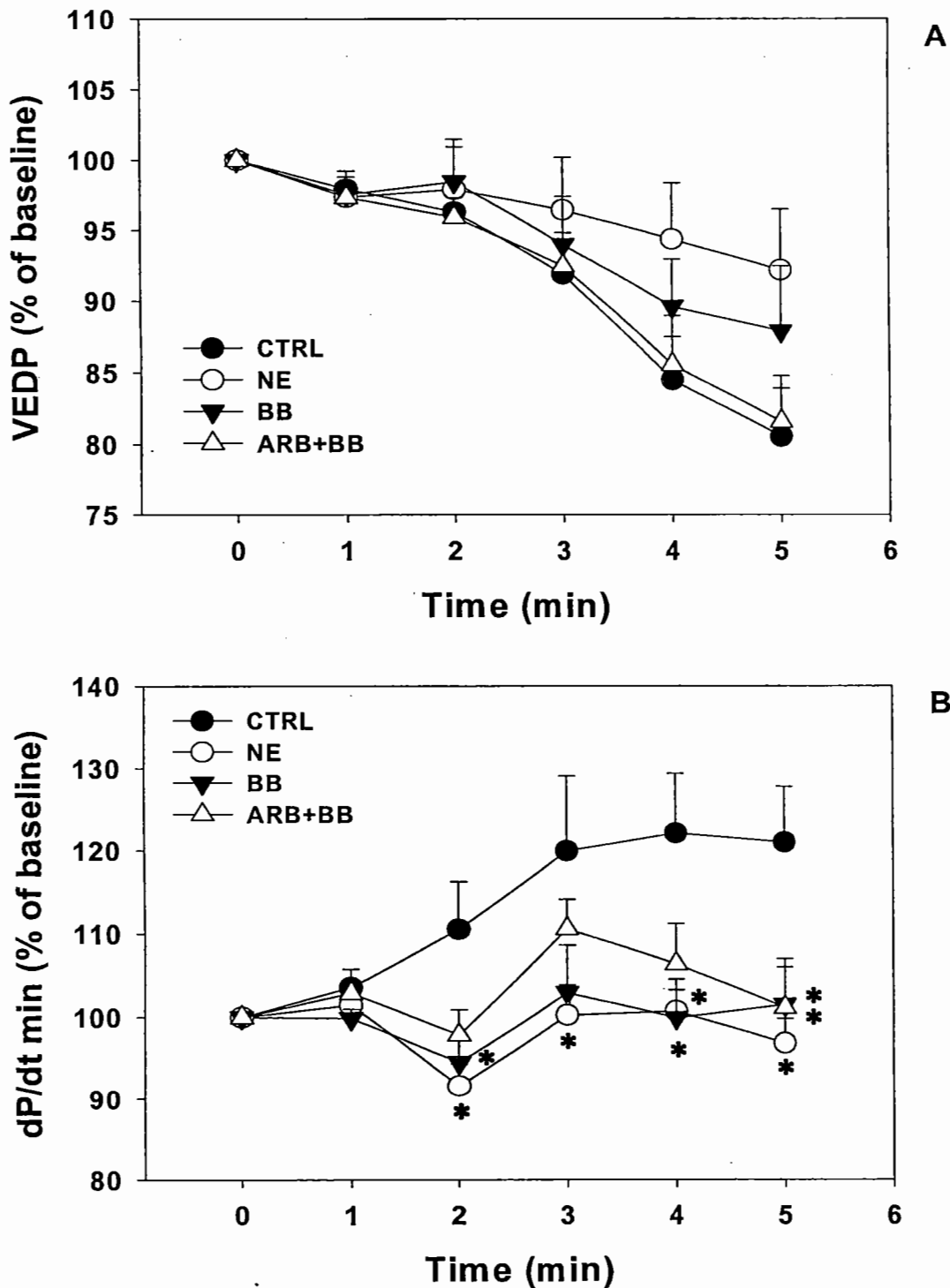
รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลง LVP (A) และ dP/dt max (B) ของหัวใจจากหนูขาวทั้ง 4 กลุ่ม ในขณะที่ให้ Isoproterenol 10^{-9} M, n=9 ทุกกลุ่มทดลอง; CTRL: control; NE: norepinephrine; BB: β -blocker; ARB+BB: angiotensin receptor blocker+ β -blocker; * P <0.05 vs control

รูปที่ 4 แสดงการทำงานของหัวใจในช่วงคลายตัว (diastolic function) เมื่อให้ Iso 10^{-9} M เป็นเวลา 5 นาที ในรูป 4A แสดงการเปลี่ยนแปลงของ VEDP ซึ่งเป็นค่าความดันต่ำสุดใน ventricle ก่อนที่จะเริ่มบีบตัว VEDP เป็นตัวชี้วัดของความสามารถในการคลายตัวของ ventricle เพื่อรับเลือดเข้า จากรูป 4A จะเห็นว่าขณะให้ Iso 10^{-9} M ค่า VEDP ของกลุ่มควบคุมและกลุ่ม ARB+BB มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่กลุ่ม BB และ NE นั้นลดลงได้น้อยกว่า โดยในนาทีที่ 5 พบว่าค่า VEDP ลดลงโดยเฉลี่ย 19%, 18%, 12% และ 8% ตามลำดับ เมื่อทดสอบทางสถิติพบว่าทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการให้ Iso 10^{-9} M มีแนวโน้มทำให้ VEDP ลดลง การให้ NE มีแนวโน้มเพิ่ม VEDP และยา β -blocker สามารถลดผลของ NE ต่อ VEDP ได้บางส่วน แต่ถ้าให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีผลช่วยปรับให้ VEDP กลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

รูปที่ 4B แสดงการเปลี่ยนแปลง dP/dt min ซึ่งเป็นอัตราการเปลี่ยนแปลงแรงดันในช่วงที่ ventricle คลายตัวหรือเป็นตัวชี้วัดอัตราเร็วในการคลายตัว เมื่อให้ Iso 10^{-9} M พบว่าค่า dP/dt min ของกลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 11-22% ในนาทีที่ 2-5 ส่วนการตอบสนองในกลุ่ม NE, BB และกลุ่ม ARB+BB นั้นมีลักษณะคล้ายกัน กล่าวคือ ค่า dP/dt min จะลดลงในนาทีที่ 2 โดยลดลงเฉลี่ย 8%, 5% และ 2% ตามลำดับ ในนาทีที่ 3 ค่า dP/dt min จะกลับเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่ม BB และ ARB+BB ประมาณ 3% และ 11% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้ว พบว่ากลุ่ม NE มีค่าต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 2-5 ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่ม BB และกลุ่ม ARB+BB มีค่าต่างจากกลุ่มควบคุมในนาทีที่ 4-5 และ 5 ตามลำดับ ($P < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 4B ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ NE ทำให้การคลายตัวของ ventricle เสื่อมหน้าที่ การให้ β -blocker ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่นี้ได้ ส่วนการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีแนวโน้มทำให้อัตราเร็วในการคลายตัวของ ventricle ดีขึ้น

การทำงานของหัวใจขณะถูกกระตุ้นอย่างแรง

ภายหลังจากให้ Iso 10^{-9} M แล้วเป็นเวลา 15-20 นาที จะเริ่มกระตุ้นหัวใจอีกครั้งอย่างแรง ด้วย Iso 10^{-6} M เป็นเวลา 5 นาที รูปที่ 5 แสดงการทำงานของหัวใจในช่วงบีบตัวขณะให้ Iso 10^{-6} M โดยในรูป 5A แสดงการเปลี่ยนแปลงของ LVP จะเห็นว่าหัวใจของหนูกลุ่มควบคุมเมื่อถูกกระตุ้นเป็นครั้งที่ 2 LVP จะเพิ่มขึ้นในนาทีที่ 2 จากนั้นจะค่อยๆลดลง ค่า LVP ของหัวใจกลุ่มนี้เพิ่มโดยเฉลี่ย 8-26% ในกลุ่ม NE นั้นพบว่าไม่สามารถเพิ่ม LVP ได้แต่กลับลดลง โดยในนาทีที่ 5 ลดลงถึง 16% และพบว่ามีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 4-5 ($P < 0.05$) การตอบสนองของหัวใจกลุ่ม BB นั้นคล้ายกับกลุ่ม NE โดยในนาทีที่ 5 ลดลงถึง 18% และเช่นเดียวกันค่านี้มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 4-5 ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่ม ARB+BB สามารถเพิ่ม LVP ในนาทีที่ 2 ได้เฉลี่ย 16% จากนั้นจึงค่อยๆลดลงจนต่ำกว่าก่อนให้ Iso 10^{-6} M ถึง 8% ดังแสดงในรูปที่ 5A



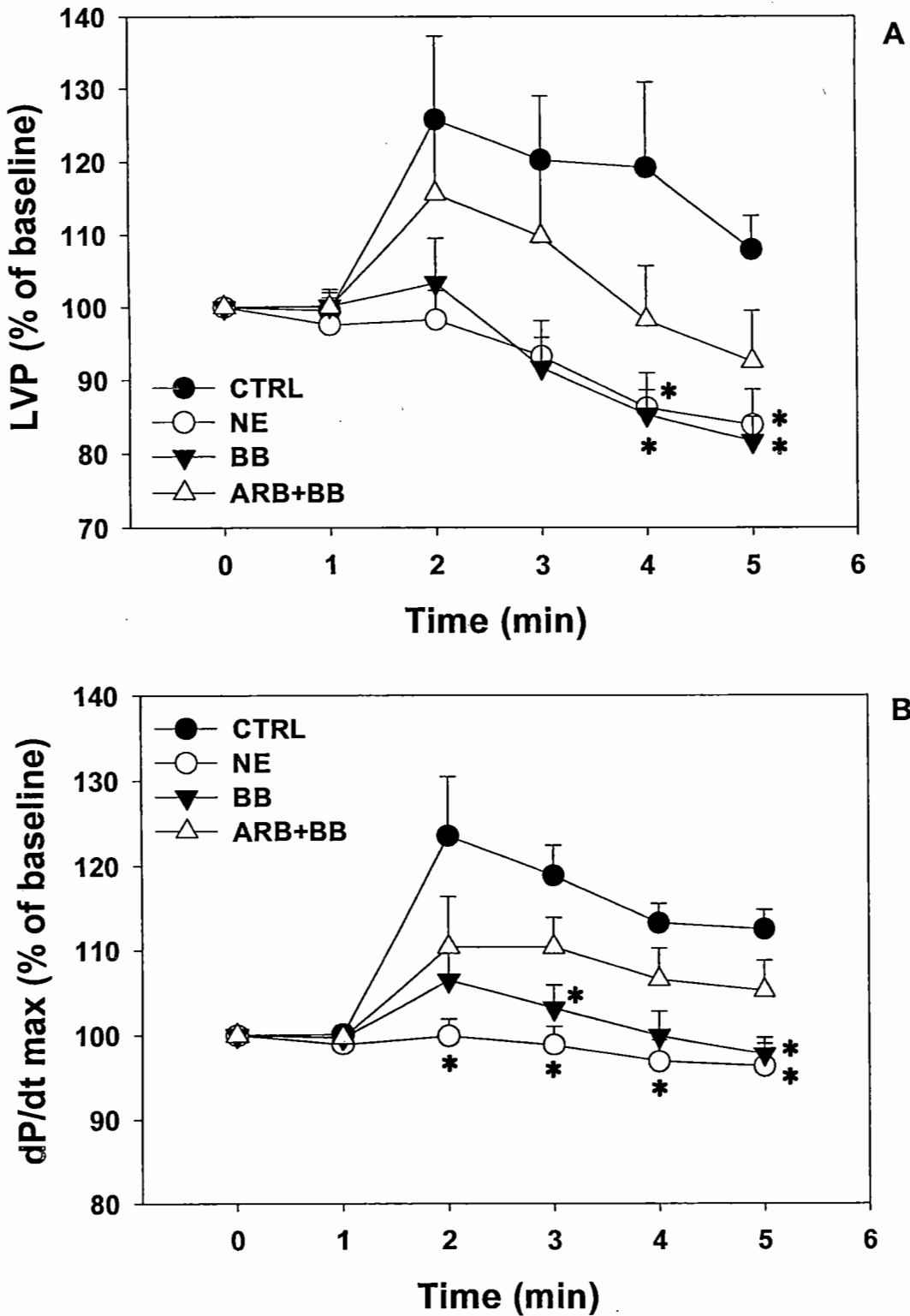
รูปที่ 4 แสดงการเปลี่ยนแปลง VEDP (A) และ dP/dt min (B) ของหัวใจจากหนูขาวทั้ง 4 กลุ่ม ในขณะที่ให้ Isoproterenol 10^{-9} M, n=9 ทุกกลุ่มทดลอง; CTRL: control; NE: norepinephrine; BB: β -blocker; ARB+BB: angiotensin receptor blocker+ β -blocker; * $P<0.05$ vs control

รูปที่ 5B แสดงการเปลี่ยนแปลงของ dP/dt max ขณะให้ Iso 10^{-6} M จะเห็นว่าในกลุ่มควบคุมสามารถเพิ่ม dP/dt max ในนาทีที่ 2 แล้วจึงค่อยๆลดลง โดยเพิ่มขึ้นเฉลี่ย 13-24% หัวใจกลุ่ม NE นั้นไม่สามารถเพิ่ม dP/dt max ได้แต่กลับลดลง โดยในนาทีที่ 5 ลดลงประมาณ 4% และพบว่า การตอบสนองของกลุ่มนี้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 2-5 ($P < 0.05$) หัวใจของกลุ่ม BB สามารถเพิ่ม dP/dt max ในนาทีที่ 2-3 เพียง 3-7% และพบว่า การตอบสนองของกลุ่มนี้ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 3 และ 5 ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่ม ARB+BB นั้นเมื่อให้ Iso สามารถเพิ่ม dP/dt max โดยเฉลี่ย 5-10% ดังแสดงในรูปที่ 5B

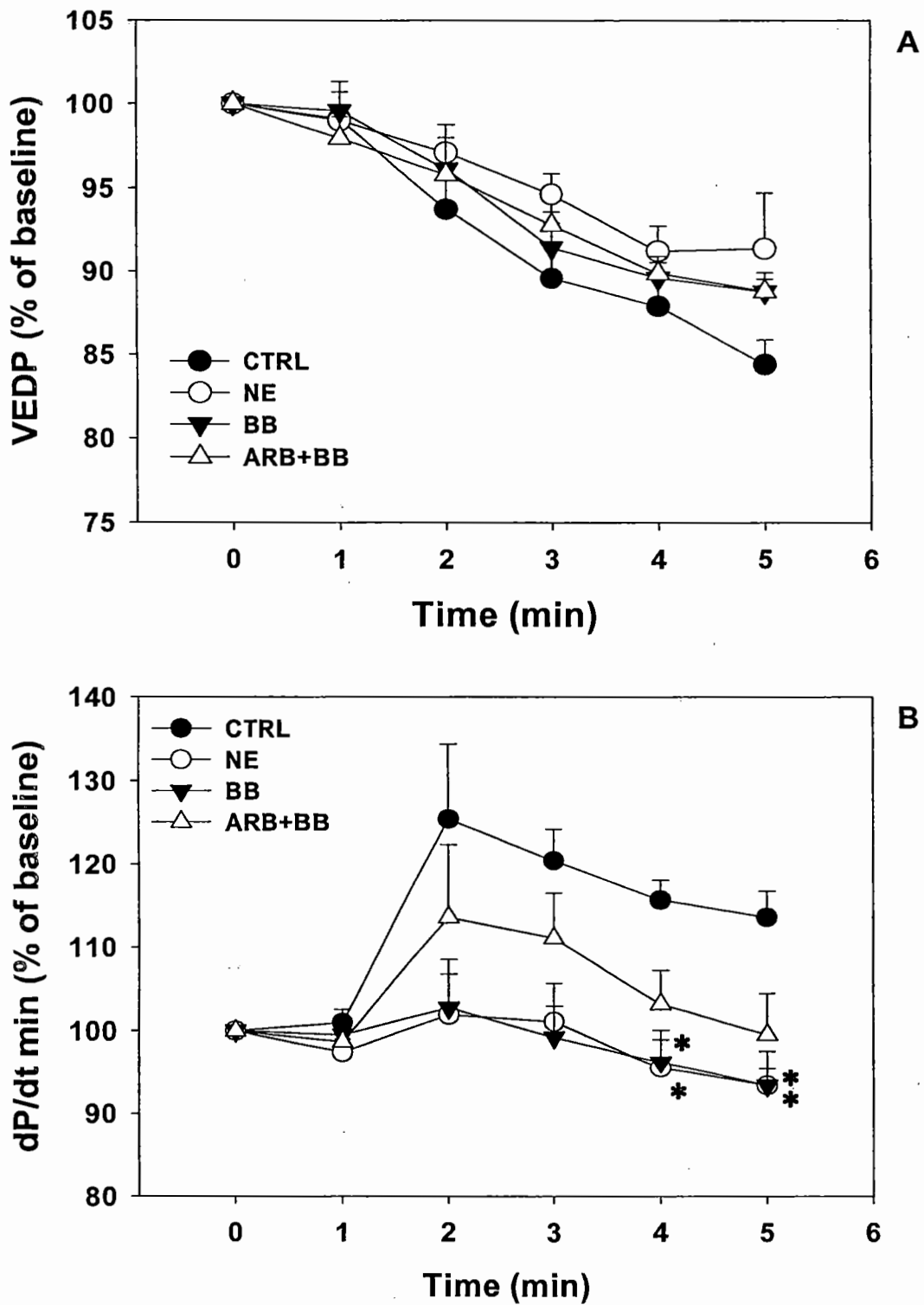
ผลการทดลองในรูปที่ 5 ช่วยยืนยันผลการทดลองในรูปที่ 3 ว่าการให้ NE มีผลทำให้หัวใจเสื่อมหน้าที่ในช่วงบีบตัว (systolic function) การให้ยา β -blocker ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่นี้ได้ แต่การให้ยา ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถช่วยปรับการทำงานของหัวใจในช่วงบีบตัวให้กลับคืนมาได้บางส่วน

รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ VEDP และ dP/dt min เมื่อกระตุ้นหัวใจอย่างแรงด้วย Iso 10^{-6} M ในรูปที่ 6A จะเห็นว่าค่า VEDP ของกลุ่มควบคุมลดลง โดยในนาทีที่ 5 ลดลงเฉลี่ย 16% ส่วนกลุ่ม NE นั้นค่า VEDP จะลดลงได้น้อยกว่า โดยเฉพาะในนาทีที่ 5 ลดลงได้เพียง 8% กลุ่ม BB และกลุ่ม ARB+BB มีระดับของ VEDP ใกล้เคียงกันตลอดช่วงที่กระตุ้น โดยในนาทีที่ 5 ลดลง 11% เท่ากัน หากเปรียบเทียบกับผลการทดลองเมื่อกระตุ้นหัวใจครั้งแรกด้วย Iso 10^{-9} M (รูปที่ 4A) จะเห็นว่าหัวใจกลุ่ม ARB+BB นั้นเมื่อได้รับการกระตุ้นอย่างแรงมีแนวโน้มทำให้ VEDP เพิ่มขึ้น ดังจะเห็นว่า มีระดับสูงกว่ากลุ่มควบคุม (รูปที่ 6A)

รูปที่ 6B แสดงการเปลี่ยนแปลงของค่า dP/dt min ขณะให้ Iso 10^{-6} M จะเห็นว่าค่า dP/dt min ของกลุ่มควบคุมจะเพิ่มขึ้นในนาทีที่ 2 จากนั้นจะลดลง และค่านี้เพิ่มโดยเฉลี่ย 14-25% ส่วนกลุ่ม NE และกลุ่ม BB นั้นแม้ว่าจะถูกกระตุ้นอย่างแรงก็ไม่สามารถเพิ่มค่า dP/dt min ได้ โดยในนาทีที่ 5 ลดลง 7% และ 6% ตามลำดับ และพบว่า มีค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 4-5 ($P < 0.05$) การตอบสนองของกลุ่ม ARB+BB นั้นพบว่าค่า dP/dt min เพิ่มขึ้นประมาณ 14% ในนาทีที่ 2 จากนั้นกลับลดลง ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันผลการทดลองในรูปที่ 4B ว่าการให้ NE ทำให้การคลายตัวของ ventricle เสื่อมหน้าที่ การให้ β -blocker ไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่นี้ได้ ส่วนการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีแนวโน้มทำให้อัตราเร็วในการคลายตัวของ ventricle ดีขึ้น



รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลง LVP (A) และ dP/dt max (B) ของหัวใจจากหนูขาวทั้ง 4 กลุ่ม ในขณะที่ให้ Isoproterenol 10^{-6} M; CTRL: control (n=6); NE: norepinephrine (n=8); BB: β -blocker (n=6); ARB+BB: angiotensin receptor blocker+ β -blocker (n=7); * $P < 0.05$ vs control



รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลง VEDP (A) และ dP/dt min (B) ของหัวใจจากหนูขาวทั้ง 4 กลุ่ม ในขณะที่ให้ Isoproterenol 10^{-6} M; CTRL: control (n=6); NE: norepinephrine (n=8); BB: β -blocker (n=6); ARB+BB: angiotensin receptor blocker+ β -blocker (n=7); * $P < 0.05$ vs control

อภิปรายผลการทดลอง (Discussion)

การศึกษานี้ได้ใช้วิธีให้ NE infusion 100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{d}$ เพื่อเหนี่ยวนำให้หัวใจหนูขาวมีพยาธิสภาพคล้ายในภาวะหัวใจล้มเหลวซึ่งมีการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกทำให้มีระดับ NE สูงในเลือดและในเนื้อเยื่อหัวใจ จากนั้นได้ทดสอบผลของยาโดยให้ β -blocker (propranolol 20 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) หรือให้ ARB (losartan 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) ร่วมกับ β -blocker (propranolol 15 $\text{mg}/\text{kg}/\text{d}$) ผลการทดลองพบว่า NE infusion มีผลทำให้เกิดภาวะหัวใจโต (cardiac hypertrophy) ดังจะเห็นได้จากมีการเพิ่มขึ้นของค่า HW/BW, LVW/BW และขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocyte diameter) นอกจากนี้ NE ยังทำให้เกิดการสะสมเส้นใยในหัวใจอย่างผิดปกติ (cardiac fibrosis) ดังจะเห็นได้จากมีปริมาณ collagen เพิ่มขึ้นใน atria, inter-ventricular septum และ left ventricle การให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีแนวโน้มลด HW/BW, LVW/BW และปริมาณ collagen ได้มากกว่าการให้ β -blocker อย่างเดียว อย่างไรก็ตาม β -blocker มีแนวโน้มลดขนาดของเซลล์ได้มากกว่า

เมื่อประเมินการทำงานของหัวใจโดยกระตุ้นในระดับต่ำด้วย Iso 10^{-9} M แล้วตามด้วยกระตุ้นหัวใจอย่างแรงด้วย Iso 10^{-6} M พบว่า NE infusion มีผลให้หัวใจเสื่อมหน้าที่ในช่วงบีบตัว (systolic function) ดังจะเห็นว่าไม่สามารถเพิ่ม LVP และ dP/dt max เมื่อกระตุ้นระดับต่ำ และค่าเหล่านี้กลับลดลงเมื่อกระตุ้นอย่างแรง NE infusion ยังมีผลให้หัวใจเสื่อมหน้าที่ในช่วงคลายตัว (diastolic function) ดังจะเห็นว่าค่า VEDP มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และไม่สามารถเพิ่ม dP/dt min เมื่อกระตุ้นระดับต่ำและกลับลดลงเมื่อกระตุ้นอย่างแรง การให้ยา β -blocker อย่างเดียวไม่สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่ของหัวใจได้ แต่การให้ ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถป้องกันการเสื่อมหน้าที่ได้บางส่วนทั้งในช่วงบีบตัวและช่วงคลายตัวเมื่อกระตุ้นในระดับต่ำ อย่างไรก็ตามเมื่อหัวใจถูกกระตุ้นอย่างแรงก็จะพบการเสื่อมหน้าที่ทั้งในช่วงบีบตัวและคลายตัวได้

ผลของยาในการป้องกันการเกิด cardiac hypertrophy และ cardiac fibrosis

การศึกษานี้ได้เลือกใช้วิธี NE infusion ในการเหนี่ยวนำให้หัวใจหนูขาวเกิดพยาธิสภาพและเป็นรูปแบบการทดลองที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Barth et al, 2000; Briest et al, 2001 and Zimmer et al, 1995) การให้ NE ในลักษณะนี้จะสามารถกระตุ้นระดับของ NE ในเลือดซึ่งมีลักษณะคล้ายในภาวะหัวใจล้มเหลว มีรายงานยืนยันว่า NE มีผลก่อให้เกิด cardiac hypertrophy และเพิ่มการแสดงออกของ protooncogenes ซึ่งมักไม่พบในหัวใจผู้ใหญ่ที่โตเต็มวัย นอกจากนี้หลังให้ NE เพียง 3 วัน มีผลให้ระดับ cardiac output ลดลง (Zimmer et al, 1995) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้มีลักษณะเหมือนในหัวใจที่ทำงานล้มเหลว (Francis, 2001) การศึกษานี้ก็ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อให้ NE เป็นเวลา 14 วัน มีผลให้หัวใจของหนูกลุ่มนี้เกิด cardiac hypertrophy ทั้งในระดับอวัยวะ เนื้อเยื่อ และระดับเซลล์ โดยเฉพาะในส่วนของ left ventricle จะเกิดมากกว่า right ventricle นอกจากนี้ NE

ยังทำให้มีการสะสม collagen ใน atria, septum และ left ventricle เพิ่มขึ้น ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่รายงานว่า NE infusion ทำให้เกิด left ventricular hypertrophy และใน ventricle จะมีการเพิ่มขึ้นของ collagen I และ collagen III mRNA (Barth et al, 2000; Briest et al, 2001)

ในภาวะหัวใจล้มเหลวการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างในผนังหัวใจเกิดจากทั้ง catecholamine ของประสาทซิมพาเทติก และจาก AngII ของระบบ RAAS (Chiba et al, 1989; Booz et al, 1996) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงทดสอบผลของการให้ยาร่วมเพื่อปิดกั้นการออกฤทธิ์ทั้ง NE และ AngII พร้อมกันต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหัวใจ จากการประเมินผลของยาภายหลังการให้ยา β -blocker หรือให้ ARB ร่วมกับ β -blocker เป็นเวลา 14 วัน แก่หนูที่ได้รับ NE infusion พบว่า การให้ยาทั้ง 2 แบบมีผลลด cardiac mass index, left ventricular mass index และขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อได้อย่างเด่นชัด นอกจากนี้ยังมีผลลดการสะสมของ collagen ใน right ventricle, septum และ left ventricle ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ยา β -blocker หรือให้ ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถลดการเกิด cardiac hypertrophy และ cardiac fibrosis ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของ NE การศึกษาอื่น ๆ ทั้งในทางคลินิกหรือในสัตว์ทดลองที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหัวใจล้มเหลวในรูปแบบอื่นก็พบเช่นเดียวกันว่า การให้ β -blocker หรือให้ ARB อย่างเดียวมีผลลด left ventricular mass index และลดการเกิด cardiac fibrosis ได้ (Muller-Brunotte et al, 2005; Nishio, 2006; Soga et al, 2006) การศึกษาครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่าการให้ยาร่วม ARB กับ β -blocker นั้นมีแนวโน้มลด hypertrophy index และ collagen ใน ventricle ได้มากกว่าการให้ β -blocker อย่างเดียว (ตารางที่ 1 และรูปที่ 2) ข้อสังเกตอย่างหนึ่งในหัวใจของหนูกลุ่มที่ได้ β -blocker อย่างเดียวก็คือขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจลดลงอย่างมากจนกระทั่งเล็กกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมถึง 5% (ตารางที่ 1) การศึกษานี้ได้ให้ propranolol ในขนาดที่ค่อนข้างสูง (20 mg/kg/d) จึงอาจเป็นไปได้ว่าการให้ β -blocker ในขนาดยาสูงและให้เป็นเวลานานอาจทำให้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเกิดการฝ่อ (myocyte atrophy) ข้อสันนิษฐานนี้เกิดจากการศึกษาเบื้องต้นที่ได้ลองให้ propranolol 30 mg/kg/d แล้วพบว่าหัวใจของหนูจะมีขนาดเล็ก ซีดและไม่สามารถศึกษาการทำงานของหัวใจได้เนื่องจากมีการบีบตัวที่ไม่สม่ำเสมอ โดยปกติในหัวใจจะมี β -adrenergic receptor อยู่ 2 ชนิดคือ β_1 -receptor (70-80%) และ β_2 -receptor (20-30%) การกระตุ้น β_1 -receptor นานๆจะก่อให้เกิดผลเสียมักทำให้เกิด hypertrophy และ apoptosis ในทางตรงกันข้ามการกระตุ้น β_2 -receptor อย่างสม่ำเสมอจะช่วยปกป้องหัวใจและช่วยให้หัวใจทำงานดีขึ้น (Zheng et al, 2005) propranolol ที่ใช้ในการศึกษานี้มีผลปิดกั้นทั้ง β_1 -receptor และ β_2 -receptor อาจเป็นไปได้ว่าการให้ propranolol ในขนาดสูงอาจมีผลปิดกั้น β_2 -receptor อย่างมากแล้วทำให้เซลล์ฝ่อและมีการเสื่อมหน้าที่ อย่างไรก็ตามข้อสันนิษฐานนี้ยังไม่ได้รับการพิสูจน์จึงควรต้องทำการศึกษาต่อไป ผลการศึกษานี้อาจนำไปสู่ข้อเสนอแนะได้ว่าการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลวด้วย β -blocker นั้นควรเลือกยาในกลุ่มที่ปิดกั้นเฉพาะ β_1 -receptor หรือ

ปิดกั้น β_1 -receptor ขณะเดียวกันกระตุ้น β_2 -receptor (partial β_2 -adrenergic receptor agonist) น่าจะ
ให้ผลการรักษาที่ดีกว่า

ผลของยาในการป้องกันการเสื่อมในหน้าที่การทำงานของหัวใจ

ในการบีบตัวของหัวใจปกตินั้นแรงบีบตัวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายใน cytoplasm ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) การควบคุม $[\text{Ca}^{2+}]_i$ นั้นจะขึ้นอยู่กับ ryanodine receptor (RyR) ซึ่งทำหน้าที่ปล่อย Ca^{2+} ออกจาก sarcoplasmic reticulum (SR) และ SR Ca^{2+} ATPase (SERCA2) ซึ่งทำหน้าที่นำ Ca^{2+} กลับไปเก็บใน SR การทำงานของ SERCA2 นั้นอยู่ภายใต้การควบคุมของ phospholamban (PLB) หากโปรตีนนี้อยู่ในสภาพ phosphorylated PLB จะทำให้ SERCA2 นำ Ca^{2+} กลับไปเก็บใน SR ได้ดีขึ้น (Konrad et al, 2003) ในภาวะหัวใจล้มเหลวพบว่าการลดลงของ LVP และอัตราเร็วในการบีบตัวของ left ventricle (Kiss et al, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าการลดลงของโปรตีน RyR และ $[\text{Ca}^{2+}]_i$ เมื่อกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (Armoundas et al, 2007) ในภาวะหัวใจล้มเหลวยังพบว่าการลดลงของอัตราการคลายตัวของหัวใจ (Kiss et al, 1995) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่พบว่าการลดลงของระดับ mRNA และระดับโปรตีนของ PLB และ SERCA2 (Armoundas et al, 2007; Kiss et al, 1995; Zarian-Herzberg et al, 1996) นอกจากนี้เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจที่ได้จากผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวนั้นจะมีระดับ Ca^{2+} ในเซลล์สูงกว่าปกติในช่วงหัวใจคลายตัว (diastolic calcium concentration) (Del Monte et al, 2002) ซึ่งสันนิษฐานว่าน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการเพิ่มของ VEDP ในภาวะหัวใจล้มเหลว (Nishio, 2006; Soga et al, 2006)

การศึกษานี้ได้ประเมินการทำงานของหัวใจที่ได้จากหนูขาวแต่ละกลุ่มโดยการกระตุ้นด้วย Iso ในขนาดต่ำและขนาดสูง พบว่าหัวใจของกลุ่ม NE นั้นมีการเสื่อมหน้าที่ในช่วงบีบตัว (systolic function) เพราะเมื่อกระตุ้นแล้วไม่สามารถเพิ่ม LVP และ dP/dt max ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดของแรงบีบตัวและอัตราเร็วในการบีบตัวของหัวใจตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้หัวใจเสื่อมหน้าที่ในช่วงคลายตัว (diastolic function) เพราะเมื่อกระตุ้นแล้วไม่สามารถเพิ่ม dP/dt min และ VEDP มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ค่าทั้งสองนี้เป็นดัชนีชี้วัดของอัตราเร็วในการคลายตัวและความสามารถในการคลายตัวของ ventricle เพื่อรับเลือดเข้าตามลำดับ ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Laycock et al (1995) อย่างไรก็ตามอาจเกิดข้อโต้แย้งว่าการให้ NE อาจมีผลทำให้หัวใจตอบสนองต่อ β -adrenergic agonist ลดลงดังที่พบในภาวะหัวใจล้มเหลวเรื้อรังในคน (Brodde et al, 1992) การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าทำให้ catecholamine infusion ในลักษณะเดียวกับการศึกษานี้ มีผลเพิ่ม β_1 -receptor ใน ventricular myocyte แต่ atrial myocyte จะมี receptor ลดลง (Zhao et al, 1996) นอกจากนี้เมื่อกระตุ้น adenylyl cyclase ด้วย forskolin ก็สามารถเพิ่มระดับ cAMP ได้ (Bowling et al, 1990) ดังนั้นการที่พบว่าหัวใจกลุ่ม NE ไม่ตอบสนองต่อ Iso ไม่น่าเกิดจาก β -receptor downregulation หรือผิดปกติใน β -adrenergic receptor signaling pathway อย่างเดียว ส่วน

หนึ่งน่าจะเป็นผลจากการเสื่อมหน้าที่ในกล้ามเนื้อหัวใจ ซึ่งมีหลักฐานสนับสนุนจากการศึกษาที่ เหนี่ยวนำให้หนูขาวเกิดภาวะหัวใจล้มเหลวในลักษณะคล้ายกับการศึกษานี้ก็พบว่ามีการเสื่อมใน หน้าที่ของหัวใจ โดยมีการลดลงของ LV ejection fraction อัตราการคลายตัว และมีการเพิ่มขึ้นของ VEDP (Mori et al, 2005) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดระดับโปรตีนของ SERCA2 และมีการนำ Ca^{2+} กลับเข้า SR ลดลง (Tokuhisa et al, 2006)

จากการทดลองที่พบว่าหัวใจของหนูขาวกลุ่มที่ให้ β -blocker นั้นมีลักษณะการตอบสนอง ต่อ Iso ในขนาดต่ำและขนาดสูงคล้ายกับกลุ่ม NE กล่าวคือ ไม่สามารถเพิ่ม LVP, dP/dt max, และ dP/dt min แสดงว่าน่าจะมีการเสื่อมในหน้าที่ทั้งในช่วงบีบตัวและช่วงคลายตัว การศึกษาอื่นก่อน หน้านี้ในสัตว์ทดลองที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว โดยได้ให้ β -blocker ในขนาดยาที่ต่ำกว่าการศึกษานี้ มากกลับพบว่า β -blocker สามารถช่วยให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น (Cruz et al, 2007; Mori et al, 2005) ความแตกต่างในผลการทดลองอาจเกิดจากหลายปัจจัยดังนี้ การศึกษาที่อ้างถึงข้างต้นนั้นได้ ประเมินการทำงานของหัวใจในตัวสัตว์ทดลองและในภาวะที่ไม่ได้กระตุ้นหัวใจ ดังนั้นหากภาวะ ของโรคอยู่ในระยะ compensated heart failure ก็อาจมีการทำงานของหัวใจที่ใกล้เคียงปกติได้ (Zevitz et al, 2006) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการเลือกใช้ยา β -blocker ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่ แตกต่างกัน ในการศึกษาของ Mori et al (2005) ได้ใช้ยา carvedilol (10 mg/kg/d) ซึ่งนอกจากจะมี ฤทธิ์ปิดกั้น β_1 -receptor แล้วยังมีฤทธิ์กระตุ้น β_2 -receptor ด้วย (Dheins et al, 1992) ดังที่กล่าวมา ข้างต้นแล้วว่าการกระตุ้น β_2 -receptor จะช่วยปกป้องหัวใจและช่วยให้หัวใจทำงานดีขึ้น (Zheng et al, 2005) การเสื่อมหน้าที่ของหัวใจเมื่อให้ β -blocker ในขนาดยาที่สูงมากในการศึกษานี้ยังอาจเกิด จากเซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดเล็กลงมากดังที่กล่าวแล้วข้างต้น ฉะนั้นจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้อาจ นำไปสู่การเสนอแนะว่า การให้ nonselective β -blocker อย่างเดียวในขนาดยาที่สูงไม่สามารถปรับ การทำงานของหัวใจให้ดีขึ้นได้เมื่อหัวใจต้องทำงานหนัก

การศึกษานี้ยังพบว่าการให้ ARB พร้อมกับ β -blocker ในขนาดยาที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ β -blocker อย่างเดียวสามารถช่วยปรับการทำงานของหัวใจให้ดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากเมื่อกระตุ้นใน ระดับต่ำจะมีการเพิ่ม LVP, dP/dt max และ dP/dt min อย่างไรก็ตามเมื่อกระตุ้นหัวใจอย่างแรกก็จะ ปรากฏการเสื่อมหน้าที่ของหัวใจได้ การศึกษาก่อนหน้านี้ก็พบเช่นเดียวกันว่าการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker ทำให้หัวใจของหนูขาวที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวทำงานดีขึ้นในภาวะที่ไม่มีการกระตุ้นหัวใจ (Mori et al, 2005) ยังมีการศึกษาไม่มากนักเกี่ยวกับผลร่วมกันของ ARB กับ β -blocker การศึกษา ส่วนใหญ่จะยืนยันผลดีของ ARB ว่าสามารถเพิ่มระดับโปรตีน SERCA2 ในภาวะหัวใจล้มเหลวซึ่ง มักมีระดับของโปรตีนนี้ลดลง จึงเชื่อว่า ARB น่าจะช่วยปรับการนำ Ca^{2+} กลับ SR ให้ดีขึ้น (Soga et al, 2006; Tokuhisa et al, 2006) นอกจากนี้การศึกษาของ Mori et al (2005) โดยให้ β -blocker (celiprolol) ในขนาด 10 mg/kg/d แก่หนูขาวที่มีภาวะหัวใจล้มเหลวก็สามารถเพิ่มระดับโปรตีนของ SERCA2 การศึกษาในทางคลินิกยืนยันว่าทั้ง ARB และ β -blocker ให้ผลใกล้เคียงกันในการช่วย

ปรับให้หัวใจของผู้ป่วยทำงานดีขึ้นในช่วงหัวใจคลายตัว (diastolic function) (Muller-Brunotte et al, 2005) แม้ว่าการศึกษานี้ไม่ได้ทำการเปรียบเทียบกับผลจากการให้ ARB อย่างเดียว แต่ผลการศึกษาทำให้เห็นแนวโน้มว่าการให้ ARB พร้อมกับ β -blocker ในขนาดยาที่ต่ำกว่ากลุ่ม BB สามารถช่วยปรับให้การทำงานของหัวใจดีขึ้นทั้งในช่วงบีบตัวและช่วงคลายตัวเมื่อหัวใจต้องทำงานเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามถ้าหากหัวใจต้องทำงานหนักมากๆ ก็จะพบการเสื่อมในหน้าที่ของหัวใจได้

ผลการทดลองยังพบว่าเมื่อให้ Iso แก่หัวใจหนูของกลุ่มควบคุม ค่า VEDP มีแนวโน้มลดลง ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อ VEDP คือ ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ใน cytoplasm ขณะหัวใจคลายตัว (diastolic calcium concentration) หากมีระดับเพิ่มขึ้นก็จะทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวได้น้อย และ VEDP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น การให้ Iso นอกจากจะมีผลกระตุ้นให้ปล่อย Ca^{2+} จาก SR แล้วยังมีผลเร่ง SERCA2 นำ Ca^{2+} กลับเข้า SR อีกด้วย (Konrad et al, 2003) ดังนั้นหัวใจกลุ่มควบคุมเมื่อให้ Iso จะเร่งการทำงานของ SERCA2 จนอาจทำให้ระดับ diastolic calcium ต่ำลง จึงทำให้ VEDP มีแนวโน้มลดลง ส่วนหัวใจกลุ่ม NE นั้นค่า VEDP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับผลการประเมินโครงสร้างที่พบว่ามี การสะสมของ collagen เพิ่มขึ้น จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้หัวใจคลายตัวได้น้อยลง นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากลดการทำงานของ SERCA2 ตามที่มีรายงานจากการศึกษาอื่น (Tokuhisa et al, 2006) จนอาจเป็นผลให้ระดับ diastolic calcium และ VEDP สูงกว่ากลุ่มควบคุมในขณะให้ Iso ผลการศึกษายังพบว่า การให้ β -blocker อย่างเดียวหรือให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีแนวโน้มช่วยให้หัวใจคลายตัวได้ดีขึ้น ดังจะเห็นได้จากค่า VEDP มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม NE (รูปที่ 4A และ 6A) ซึ่งสอดคล้องกับผลที่พบว่าในหัวใจของหนูทั้ง 2 กลุ่มนี้มีการสะสมของ collagen ต่ำกว่าเช่นกัน ในการศึกษาอื่นๆก็พบว่าทั้ง β -blocker และ ARB มีผลลด VEDP ในภาวะหัวใจล้มเหลว (Mori et al, 2005; Nishio, 2006; Soga et al, 2006) ผลของยาต่อ VEDP นั้นในขณะที่กระตุ้นหัวใจในระดับต่ำพบว่า การให้ ARB ร่วมกับ β -blocker มีแนวโน้มดีกว่าการให้ β -blocker อย่างเดียว แต่เมื่อกระตุ้นอย่างแรงค่า VEDP ของทั้งสองกลุ่มใกล้เคียงกัน ซึ่งอาจเนื่องจากเมื่อกระตุ้นอย่างแรงหัวใจกลุ่ม ARB+BB อาจไม่สามารถเพิ่มความสามารถของ SERCA2 ในการนำ Ca^{2+} กลับเข้า SR จึงทำให้ VEDP มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น

สรุปและเสนอแนะ

การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นผลของการให้ยา 2 แบบ คือ การให้ β -blocker ในขนาดยาที่สูง และการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker ต่อการเกิด cardiac hypertrophy, cardiac fibrosis และการทำงานของหัวใจ โดยศึกษาในหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้หัวใจเกิดพยาธิสภาพคล้ายภาวะหัวใจล้มเหลวด้วย NE infusion การให้ยาทั้ง 2 แบบสามารถลด cardiac mass index, LV mass index, ขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และการสะสม collagen ในผนังหัวใจได้ แสดงว่าการให้ยาทั้ง 2 แบบสามารถป้องกันการเกิด cardiac hypertrophy และ cardiac fibrosis ได้ แต่การให้ยาร่วมมีแนวโน้มลด

hypertrophy mass index และการสะสม collagen ได้มากกว่า ในขณะที่การให้ β -blocker มีแนวโน้มลดขนาดของเซลล์ได้มากกว่า ผลของยาต่อการทำงานของหัวใจนั้นพบว่า การให้ β -blocker ไม่สามารถปรับการทำงานของหัวใจให้ดีขึ้นทั้งในช่วงบีบตัวและคลายตัวเมื่อหัวใจถูกกระตุ้น แต่การให้ ARB ร่วมกับ β -blocker สามารถช่วยให้การทำงานของหัวใจดีขึ้นบางส่วนทั้งในช่วงบีบตัวและช่วงคลายตัวเมื่อหัวใจถูกกระตุ้นในระดับต่ำ แต่ถ้ากระตุ้นอย่างแรงหัวใจก็ไม่สามารถเพิ่มการทำงานให้มากขึ้นได้

ในภาวะหัวใจล้มเหลวซึ่งมีการกระตุ้นทั้งประสาทซิมพาเทติกและระบบ RAAS จนทำให้มีระดับ NE และ AngII ในเลือดสูงขึ้นและมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดพยาธิสภาพของหัวใจ ข้อมูลจากการศึกษานี้สามารถช่วยเสนอแนะแนวทางในการรักษาภาวะหัวใจล้มเหลว โดยการให้ยาไปปิดกั้นการออกฤทธิ์ของ NE และ AngII พร้อมกันน่าจะให้ผลดีต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของหัวใจ ส่วนการรักษาโดยการให้ nonselective β -blocker ในขนาดยาที่สูงไม่น่าจะให้ผลดีต่อการทำงานของหัวใจ โดยเฉพาะเมื่อหัวใจต้องเผชิญต่อภาวะเครียดที่มีการกระตุ้นประสาทซิมพาเทติกมากขึ้น เช่น ตื่นเต้น ตกใจ ออกกำลังกาย เป็นต้น การศึกษานี้ยังนำไปสู่การเสนอแนะสำหรับการศึกษาต่อไปในอนาคต ดังนี้

1. ควรทำการศึกษาผลของ ARB ร่วมกับ β -blocker ในภาวะหัวใจล้มเหลวในสัตว์ทดลองที่เหนียวทำให้เกิดในรูปแบบอื่น เช่น myocardial infarction และควรเลือก β -blocker ในกลุ่ม selective β_1 -blocker สำหรับศึกษา เพราะจากข้อสันนิษฐานของการศึกษานี้ เชื่อว่า selective β_1 -blocker น่าจะให้ผลต่อการดำเนินโรคได้ดีกว่ากลุ่ม nonselective β -blocker ที่ใช้ในการศึกษานี้
2. จากผลการศึกษานี้ที่พบว่า การให้ nonselective β -blocker ในขนาดยาที่สูงให้ผลเสียต่อการทำงานของหัวใจมากกว่าผลดี ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาคูผลของ β -blocker กลุ่มต่างๆ และในขนาดยาที่แตกต่างกันต่อการดำเนินโรคในภาวะหัวใจล้มเหลว ซึ่งจะช่วยให้ข้อเสนอแนะในการเลือกใช้ β -blocker ในทางคลินิกเพื่อให้ได้ยาที่มีประสิทธิผลดีที่สุดในการรักษา
3. ควรมีการศึกษาวิจัยทางคลินิกเพื่อประเมินผลของการให้ ARB ร่วมกับ β -blocker ต่อการทำงานของหัวใจผู้ป่วยภาวะหัวใจล้มเหลว อีกทั้งติดตามในระยะยาวเพื่อประเมินว่ายาสามารถลดอัตราการป่วย ลดอัตราการตาย และทำให้การพยากรณ์โรคดีขึ้นได้หรือไม่

เอกสารอ้างอิง
(References)

1. Armoudas AA., Rose J., Aggarwal R., Stuyvers BD., O'rourke B., Kass DA., Marban E., Shorofsky SR., Tomaselli GF., & William B. Cellular and molecular determinants of altered Ca^{2+} handling in the failing rabbit heart: primary defects in SR Ca^{2+} uptake and release mechanism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 2007; 292(3):H1607-18.
2. Barth W., Deten A., Bauer M., Reinohs M., Leicht M., & Zimmer H-G. Dfferential remodeling of the left and right heart after norepinephrine treatment in rats: studies on cytokines and collagen. *J Mol Cell Cardiol.*, 2000; 32:273-284.
3. Bonnefont -Rousselot D., Mahmoudi A., Mougnot N., Varaquaux O., Le Nahour G., Fouret P., & Lechat P. Catecholamine effects on cardiac remodelling : oxidative stress and fibrosis in experimental heart Failure. *Redox Resp.* 2002; 7(3) : 145 – 51.
4. Booz GW., & Baker KM . Role of type 1 and type 2 angiotensin receptors in angiotensin II-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Hypertension.* 1996; 28 : 635 - 640.
5. Bowling N.,Wyss VL., Gengo PJ., Utterback B., Kauffman RF., & Scott Hayes J. Cardiac inotropic responses to calcium and forskolin are not altered by prolonged isoproterenol infusion. *Eur J Pharmacol.* 1990; 187(2):155-164.
6. Braunwald E. *Heart Failure* in Harrison's Principles of Internal Medicine. 15th ed., Mc Graw Hill , New York , 2001.
7. Briest W., Holzl A., Raßler B., Deten A., Leicht M., Baba HA., & Zimmer H-G. Cardiac remodeling after long term norepinephrine treatment in rats. *Cardiovasc Res.*, 2001; 52:265-273.
8. Bristow MR. Mechanistic and clinical rationales for using beta-blockers in heart failure. *J Card Fail.*, 2000; 6 (2 Suppl 1):8-14.
9. Brodde OE., Hillemann S., Kunde K., Vogelsang M., & Zerkowski HR. Receptor system affecting force of contraction in human heart and their alterations in chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant.*, 1992; 11(4 Pt 2):S164-74.
10. Campbell DJ., Aggrawal A., Esler M., & Kaye D. β -blockers, Angiotensin , and ACE inhibitors in patients with heart failure. *Lancet.* 2001; 358 (9293) : 1609 -1610.
11. Carson P. Pharmacologic treatment of congestive heart failure. *Clin Cardiol.*, 1996; 19(4) : 271-281.

12. Chiba M., shida M., Miyazaki Y., Koga Y., & Toshima H. Role of adrenergic receptor systems in canine left ventricular hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* , 1989 ; 21 (Suppl 5): 39 - 47.
13. Colucci WS., Sawayer DB., Singh K., & communal C. Adrenergic overload and appoptosis in heart Failure : implications for therapy. *J Card Fail.* 2000; 6(2 Suppl 1):1-7.
14. Conrad CH. , Brooks WW., Robinson KG., & Bing OHL. Impaired myocardial function in spontaneously hypertensive rats with heart failure. *Am. J. Physiol.* 1991; 260(29):H136 - H145.
15. Cruz N., Arocho L., Rosario L., & Crespo MJ. Chronic administration of carvedilol improves cardiac function in 6-month-old Syrian cardiomyopathic hamsters. *Pharmacology*, 2007; 80(2-3):144-150.
16. de Teresa E., Alzeuta J., Jimnez - Navarro M. Profailing risk from arrhythmia or hemodynamic death. *Am J Cardiol.* 2000; 86 (9 Suppl 1): K126 - K132.
17. Del Monte F., Jhoson CM., Stepanek AC., Doye AA., & Gwathmey JK. Defects in calcium control. *J Card Fail.*, 2002; 8(6 Pt 2):S421-S431.
18. Dhein S., Titzer S., Wallstein M., Mu"ller A., Gerwin R/, Panzner B., Klaus W. Celiprolol exerts microvascular dilatation by activation of β_2 -adrenoceptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1992;346: 27-31.
19. Dominguez LJ. , Parrinello G., Amato P., & Licata G. Trends of congestive heart failure epidemiology : contrast with clinical trial results. *Cardiologia.* 1999; 44 (9):801- 8.
20. Dostal DE., & Baker KM. The cardiac renin - angiotensin system : Conceptual , or a regulator of cardiac function ? *Circ. Res.* 1999; 85 : 643 - 650.
21. Frams H , Leenen H., White R. , & Yuan B. Isoproterenol - induced Cardiac hypertrophy : role of circulatory versus cardiac renin - angiotensin system. *Am J Physiol.*, 2001; 281 (6) : H2410 -H2416.
22. Francis GS. Pathophysiology of chronic heart failure. *Am J Med.*, 2001; 110(7A):37S-46S.
23. Granger CB., McMurray JJ., Yusuf S., Held P., Michelson EL., Olofsson B., Ostergren J., Pfeffer MA., & Swedberg K. Effects of candasartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function intolerant to angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM Alternative trial. *Lancet*, 2003; 362(9386):772-6.
24. Greenberg B. Treatment of heart failure: state of the art and prospective. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 2001; 38(Suppl 2):S59-63.

25. Jessup M., & Brozena S. Heart failure. *New Eng J Med.*, 2003; 348(20):2007-2018.
26. Kajstura J., Crigola E., Malhotra A., Li F., Cheng W., Meggs LG., & Anversa F. Angiotensin induces apoptosis of adult ventricular myocytes in vitro. *J Mol Cell Cardiol.* 1997; 29 : 859 - 870.
27. Katz AM. Pathophysiology of heart failure: identifying targets for pharmacotherapy. *Med Clin North Am.*, 2003; 87(2):303-16.
28. Khatrar RS. Effects of ACE-inhibitors and beta-blockers on left ventricular remodeling in chronic heart failure. *Minerva Cardioangiol.*, 2003; 51(2):143-54.
29. Kiss E., Ball NA., Kranias EG., & Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca²⁺-ATPase protein levels. Effects on Ca²⁺ transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res.*, 1995; 77(4):759-64.
30. Konrad FF., Bolck B., Erdmann E., & Schwinger G. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc Res.*, 2003; 57(1):20-27.
31. Laycock SK., McMurray J., Kane KA., & Parratt JR. Effects of chronic norepinephrine administration on cardiac function in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.*, 1995; 26(4):584-9.
32. Lee DS., & Vasan RS. Goals and guideline for treating hypertension in patient with heart failure. *Curr Treat Options Cardiovasc Med.*, 2006; 8(4):334-44.
33. Liao X., He J., Tao J., Chen W., Leng X., Mai W., Zhen W., Lui J., & Wang L. Angiotensin-converting enzyme inhibitor improves force and Ca²⁺-frequency relationships in myocytes from rats with heart failure. *Acta Cardiol.*, 2007; 62(2):157-62.
34. Lui Y-H., Yang X-P., Sharow VG., Wass O., Sabbah HN., Peterson E., & Carretero OA. Effects of aniotensin - converting enzyme inhibitors and angiotensin type 1 receptor antagonists in rat with heart failure. *J Clin Invest.* 1997; 99:1926 -1935.
35. McMurray JJ., Ostergren J., Swedberg K., Granger CB., Held P., Michelson EL., Olofsson B., Yusuf S., & Pfeffer MA. Effects of candasartan in patients with chronic heart failure and reduced left-ventricular systolic function taking angiotensin-converting-enzyme inhibitors: the CHARM-Added trial. *Lancet*, 2003; 362(9386):767-71.
36. McMurray JJ., Young JB., Dunlap ME., Granger CB., Swedberg K., & Pfeffer MA. Relationship of dose of background angiotensin-converting enzyme inhibitor to the benefits of candesartan in the candesartan in heart failure: Assessment of reduction in mortality and morbidity (CHARM)-Added trial. *Am Heart J.*, 2006; 151(5):985-991.

37. Mori T., Hayashi T., Sohmiya K., Okuda N., Shimomura H., Ohkita M., Matsumura Y., Yoshiyama M., Yoshikawa J., & Kitaura Y. Mechanisms of combined treatment with celiprolol and candesartan for ventricular remodeling in experimental heart failure. *Circ J.*, 2005; 69(5):596-602.
38. Muller-Brunotte R., Edner M., Malmqvist K., & Kahan T. Irbesartan and atenolol improve diastolic function in patients with hypertensive left ventricular hypertrophy. *J Hypertens.*, 2005; 23(3):633-40.
39. Naga Prasad SV., Nienaber J., & Howard A. β -adrenergic axis and heart disease. *Trends in Genetics*, 2001; 17(10): 344 -349.
40. Nishio M. Beneficial effects of angiotensin II type 1 receptor blocker at an advanced stage of hypertensive diastolic heart failure. *J Card Fail.*, 2006; 12(8):S165.
41. Packer M. Current role of beta-adrenergic blockers in the management of chronic heart failure. *Am J Med.*, 2001; 110(Suppl 7A):81S-94S.
42. Peterson RC., & Dunlap ME. Angiotensin II receptor blockers in the treatment of heart failure. *Congest Heart Fail.* 2002; 8(5): 246 -50.
43. Pfeffer MA., Swedberg k., Granger CB., Held P., McMurray JJ., Michelson EL., Olofsson B., Ostergren J., Yusuf S., & Pocock S. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet*, 2003; 362(9386):759-66.
44. Pitt B., Segal R., Mastinez FA., Meurers G. Randomised trial of losartan versus captopril in patients over 65 with heart failure (Evaluation of losartan in The Elderly Study, ELITE). *Lancet.* 1997; 349 (9054): 747 -52.
45. Roig E., Perez -Villa F., & Merales M. Clinical implications of increased plasma angiotensin despite ACE inhibitor therapy in patients with congestive heart failure. *Eur Heart J.*, 2000; 21: 53-57.
46. Ruzicka M., & Leenen FHH. Effects of ACE inhibitors on circulating versus cardiac Ang II in volume overload-induced cardiac hypertrophy in rats. *Circulation*, 1995; 92: 3568 -3573.
47. Sabbah HN. The cellular and physiologic effects of beta blocker in heart failure. *Clin Cardiol.*, 1999; 22 (Suppl 5):V16-20.
48. Soga M., Kamal FA., Watanabe K., Ma M., Palaniyandi S., Kodama M., Aizawa Y. Effects of angiotensin II receptor blocker (candesartan) in daunorubicin-induced cardiomyopathic rats. *Int J Cardiol.*, 2006; 110(3):378-85.

49. Tokuhiya T., Yano M., Obayashi M., Noma T., Mochizuki M., Oda T., Okuda S., Doi M., Liu J., Ikeda Y., Yamamoto T., Ohkusa T., & Matsuzaki M. AT₁ receptor antagonist restores cardiac ryanodine receptor function, rendering isoproterenol-induced failing heart less susceptible to Ca²⁺ leak induced by oxidative stress. *Circ J.*, 2006; 70(6): 777-86.
50. Trongtorsak P., Morgan TO., & Delbridge LM. Combined renin-angiotensin system blockade and dietary sodium restriction impairs cardiomyocyte contractility. *JRAAS.*, 2003; 4(4): 213-219.
51. Weber KT., Janicki JS., Shroff SG., Pick R., Chen RM., & Bashey RI. Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Cir Res.*, 1988; 62:757-765.
52. Yusuf S., Pfeffer MA., Swedberg K., Granger CB., McMurray JJ., Michelson EL., Olofsson B., & Ostergren J. Effects of candesartan in patients with chronic heart failure and preserved left-ventricular ejection fraction: the CHARM Preserved Trial. *Lancet*, 2003; 362(9386):777-81.
53. Zarain-Herzberg A., Afzal N., Elimban V., Dhalla NS. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem.*, 1996; 163-164:285-90.
54. Zevitz ME. Heart failure. Retrieved from <http://www.emedicine.com/med/topic3552.htm>. 2006.
55. Zhao M., Hagler HK., & Muntz KH. Regulation of alpha 1-, beta 1-, and beta 2-adrenergic receptors in rat heart by norepinephrine. *Am J Physiol.* 1996; 271(5 Pt 2): H1762-8.
56. Zheng M., Zhu W., Han Q., & Xiao R-P. Emerging concepts and therapeutic implications of beta-adrenergic receptor subtype signaling. *Pharmacol & Therap.*, 2005; 108(3):257-68.
57. Zimmer HG., Kolbeck-Ruhmkor FTC. , & Zierhut W. Cardiac hypertrophy induced by alpha- and beta- adrenergic receptor stimulation . *Cardioscience.* 1995; 6(1): 47-57.