



2.1 กระแต (Treeshrews)

กระแตเป็นสัตว์ที่อยู่ใน Family Tupaiidae ซึ่งใน Family นี้จะประกอบไปด้วย 5 genera และมีสัตว์ทั้งหมด 17 species พบมีการกระจายโดยทั่วไป ตั้งแต่ประเทศอินเดีย จนถึงฟิลิปปินส์ และทางตอนใต้ของประเทศจีนจนถึงอินโดนีเซีย (บุญส่ง เลขะกุล และ Mcneely, 1977)

"Tupaia" เป็นคำมาจากภาษามาลาเลย์เซีย คือคำว่า "Tupai" ซึ่งมีความหมายว่า สัตว์ซึ่งคล้ายกระรอก กระแตมีลักษณะซึ่งแตกต่างจากกระรอกออกไป คือ กระแตจะมีปากที่ยาวและค่อนข้างแหลม ซึ่งมีปากสั้นและกลม ส่วนทางด้านพฤติกรรมนั้น กระแตจะมีการเคลื่อนไหวที่สุขุมกว่า และกระแตไม่สามารถกัมศิระให้ติดกับลำต้นของต้นไม้ได้เช่นเดียวกับกระรอก นักวิจัยยังได้พบว่า กระแตไม่สามารถที่จะกระโดด จากต้นไม้ต้นหนึ่งข้ามไปยังอีกต้นหนึ่งได้ แต่กระรอกสามารถที่จะทำเช่นนั้นได้

จากการศึกษาโดย Napier (1967) ได้ให้ข้อสรุปว่า กระแตจัดว่าเป็น primitive primates อยู่ใน Order Insectivora และ Suborder Menotypha ในระยะแรกๆ ได้มีการถกเถียงกันมากเกี่ยวกับการจัดกระแตเข้าในกลุ่มของ primate ซึ่งนักวิจัยบางกลุ่มได้ให้ข้อเสนอว่ากระแตเป็นเพียงสัตว์ที่มีลักษณะคล้าย primate มากที่สุดเท่านั้น แต่ในบางรายงาน ได้กล่าวว่ากระแตเป็นสัตว์ในช่วงแรกในวิวัฒนาการของ primate อย่างไรก็ตามไม่มีการค้นพบ Fossil ของ Family นี้เลย พบแต่เพียง fossil ของ Anagalidae ที่ประเทศมองโกเลีย ซึ่งอยู่ใน Superfamily เดียวกันกับ Tupaiidae

2.1.1 ลักษณะโดยทั่วไปของกระแต (Characteristics of treeshrews)

1. มือและเท้า (hands and feet) พบว่าแต่ละมือและเท้าจะมีนิ้ว 5 นิ้ว ซึ่งนิ้วแต่ละนิ้วค่อนข้างที่จะมีความยาวเท่ากัน ทั้งมือและเท้าพบว่ามีความยืดหยุ่นและงอได้ดี ทำให้กระแต

สามารถเคลื่อนไหวได้อย่างคล่องตัว และสามารถเกาะกิ่งไม้ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจากคุณสมบัตินี้ จะพิจารณาได้ว่า เป็นระยะเริ่มต้นในการพัฒนาการใช้มือในการทำ ซึ่งเป็นคุณสมบัติอย่างหนึ่งของ primate และกระแตยังสามารถใช้มือในการกินอาหาร เช่นเดียวกับ primate เช่นในบาง species สามารถใช้มือกำแมลงได้

2. การมองเห็น (vision) ถึงแม้ว่าการมองเห็นของกระแตยังไม่สมบูรณ์เท่ามนุษย์นัก แต่ก็พบว่าระดับของการมองเห็นค่อนข้างสูงโดยมีความแตกต่างไปจากมนุษย์ คือไม่พบมี เส้นเลือดที่บริเวณ เรตินา ตรงบริเวณของ central region ("Macula") และเข้าตาจะมีลักษณะอยู่ในกลุ่มของ primate คือ จะมีกระดูกล้อมโดยรอบ

3. กะโหลกศีรษะ (cranium) พบว่ากะโหลกมีลักษณะกลมเหมือน primate และสมองยังพบว่ามีลักษณะซับซ้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ visual centers มีการพัฒนาที่ค่อนข้างสูงเช่นเดียวกับ primate และที่บริเวณ olfactory (smell) centers มีขนาดเล็ก ลงกว่าสัตว์อื่นๆ ใน order เดียวกันมาก ในบริเวณ cerebral cortex ก็มีความซับซ้อนขึ้นเช่นกัน จะเห็นว่าสมองที่พัฒนาขึ้นเป็นลักษณะของ primate ที่ต้องอาศัยการมองเห็นและการเคลื่อนไหวอย่างว่องไว แต่ก็ยังมีข้อแตกต่างบางอย่างซึ่งต่างไปจาก primate บ้างเช่นกัน

4. ลักษณะของฟัน (dentition) ลักษณะไม่เหมือนฟันพวกสัตว์แทะอื่นๆ พบว่าฟันของกระแตมีลักษณะค่อนข้างครบถ้วน (dental formula $\frac{2}{3} \frac{1}{1} \frac{3}{3} \frac{3}{3} \times 2 = 38$) โดยมี incisors 3 ซี่ล่างซึ่งมีลักษณะเหมือนของ primate มาก

5. ลักษณะทางกายวิภาค (anatomy) พบว่ากระแตมีกล้ามเนื้ออย่างน้อย 7 มัด ที่ไม่พบใน Order เดียวกัน นอกจากนี้ยังพบกระดูกอ่อนบางๆ อยู่บริเวณผิวหนังล่างของลำตัว

6. พฤติกรรม (behavior) การกินอาหารของกระแตมีลักษณะต่างไปจากสัตว์ใน Order เดียวกัน (Insectivora) อย่างมาก โดยกระแตมีการเปลี่ยนไปกินอาหารชนิดอื่นมากมายเช่นผลไม้ต่างๆ ได้มีผู้ศึกษาถึงพฤติกรรมของการผสมพันธุ์ก็มีลักษณะคล้าย mammals เช่นกัน พบว่าตัวผู้จะสร้างรัง ("maternal nest") ไว้ให้ตัวเมียเพื่อคลอดลูกและจะหายไปโดยจะกลับมาเมื่อตัวอ่อนอายุประมาณ 1 เดือน ลูกกระแตจะถูกคลอดในรังนั้นและจะอดนมทันทีที่เกิด (Martin, 1966)

2.1.2 กระแตที่พบในประเทศไทย (Treeshrews in Thailand)

ใน Family Tupaiidae นี้พบว่ามีทั้งหมด 5 genera แต่สามารถพบในประเทศไทยเพียง 3 genera เท่านั้นคือ

1. Genus *Tupaia*

2. Genus *Dendrogale*

3. Genus *Ptilocercus*

ใน Genus *Tupaia* พบว่ามีถึง 12 species แต่ที่พบบ่อยโดยทั่วไปคือ *T. glis* ส่วนใน Genus *Dendrogale* พบเพียง 2 species เท่านั้น และ Genus *Ptilocercus* พบเพียง 1 species การแยกกระต๊อออกเป็น genus และ species ต่างๆ จะอาศัยลักษณะทางกายวิภาคของกระต๊อ เช่น ความยาวขน, ความยาวหาง, ความยาวลำตัว เป็นต้น ดังตัวอย่างการจำแนกคือ

KEY TO THE THAI TUPAIIDAE

1. Tail covered with long hairs
 - a. Larger, HB: 150-205; tail nearly equal to HB *Tupaia glis*
 - b. Smaller, HB: 110-140; tail longer than HB *Tupaia minor*
2. Tail covered with short hairs *Dendrogale murina*
3. Tail scaly except for feather-like tip *Ptilocercus lowi*

DIMENSIONS OF THAI TUPAIIDAE

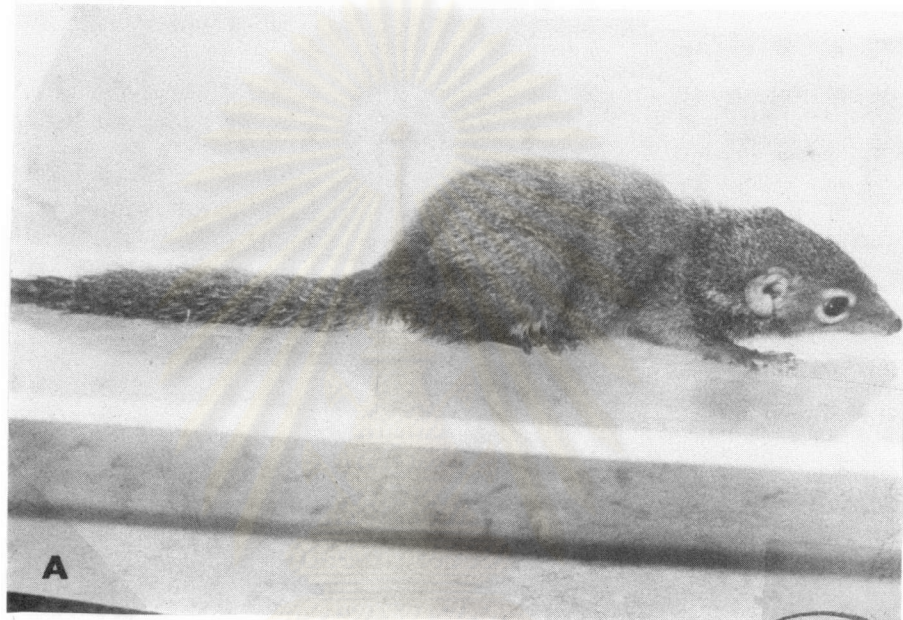
Species	HB	T	E	HF	W	Skull L	Zygomatic	Palate	Maxillary
<i>T. glis</i>	160-230	148-198	16-17	38-45	85-185	50.8-53.8	25.5-27.4	27.4-29.6	17.0-20.0
<i>T. minor</i>	110-140	130-160	10-14	28-34	30-60	34.2-37.3	18.0-21.0	17.0-18.5	12.0-13.0
<i>D. murina</i>	115-135	105-130	10-18	26-30	35-55	32.7-36.5	16.0-17.0	17.2-19.5	11.5-12.0
<i>P. lowi</i>	120-140	165-190	19-21	28-30	25-60	36.8-38.0	20.0-22.5	17.0-18.0	12.5-13.0

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการแยกชนิดต่างๆ ของกระต๊อ และลักษณะทางกายวิภาคของกระต๊อซึ่งพบในประเทศไทย (บุญส่ง เลขะกุล และ Mcneely, 1977)

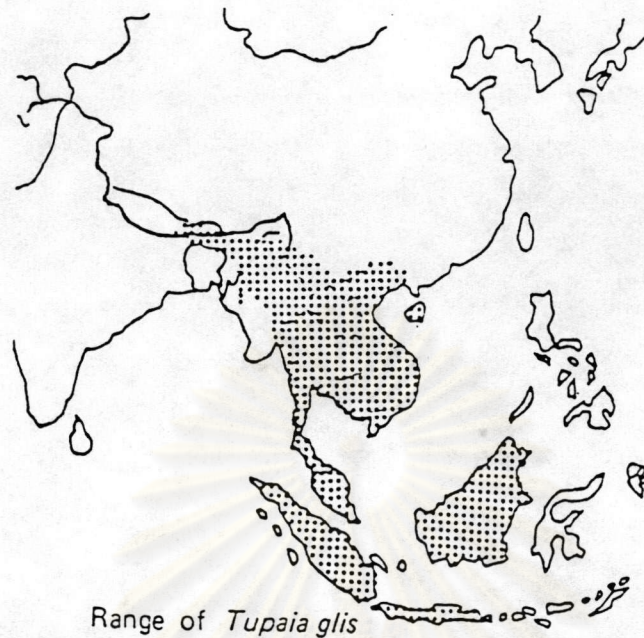
2.1.8 กระต่ายธรรมดา (common treeshrew)

Tupaia glis

พบว่ากระต่ายใน species นี้มีขนาดที่ค่อนข้างใหญ่ หางมีขนาดยาว และมีขนซึ่งยาวจึงทำให้ดูเหมือนแปรงล้างขวด ความยาวของหางมีความยาวเท่ากับ ความยาวจากหัวถึงลำตัว (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงรูปร่างของ Tupaia glis ทางด้านข้าง (A) และด้านหน้า (B)



รูปที่ 2 แสดงการกระจายของ Tupaia glis ในประเทศไทย

การกระจายของ T. glis มีการกระจายตั้งแต่ทางตะวันออกของประเทศเนปาลและสิกขิม เข้าไปยังตอนใต้ของประเทศจีน ผ่านลงมายังเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จนถึงประเทศอินโดนีเซีย แต่ไม่พบในประเทศฟิลิปปินส์ (รูปที่ 2)

T. glis ที่พบในประเทศไทยยังแยกออกได้เป็นอีกหลาย subspecies ทั้งนี้พบว่าแต่ละ subspecies นั้นมีลักษณะที่แตกต่างกันไปอีกเล็กน้อย ตามลักษณะภูมิประเทศที่มันอาศัยอยู่ เช่น ลักษณะของสีขนที่เข้มหรือจาง เช่น subspecies ที่พบทางทิศใต้มักพบมีสีขนที่สว่างและแดงกว่าที่พบทางทิศเหนือ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสีขนคาดว่าอาจจะมี ความเกี่ยวข้องกับ ปริมาณน้ำฝน อุณหภูมิ และความชื้นก็เป็นได้ โดยพบว่าขนสีเทาหรือเทาน้ำตาลมักพบในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำ และความชื้นต่ำส่วนสีที่ค่อนข้างแดงมักพบในแถบที่มีอุณหภูมิและความชื้นสูง ส่วนพวกที่อยู่บริเวณเกาะต่างๆ ทางด้านตะวันตกมักจะมีสีที่เข้มกว่าบริเวณอื่นๆ

T. glis ซึ่งพบในประเทศไทยพอจะจำแนกเป็น subspecies และบริเวณต่างๆ ที่พบดังต่อไปนี้คือ

1. T. g. ferruginea พบทางภาคใต้
2. T. g. wilkensoni พบแถบจังหวัดตรัง
3. T. g. clarissa พบแถบจังหวัดพังงา ระนอง และชุมพร

4. T. g. belangeri พบแถบจังหวัดประจวบคีรีขันธ์
5. T. g. chinensis พบแถบจังหวัดเชียงใหม่ และทิศเหนือด้านตะวันออก
6. T. g. loatum พบแถบจังหวัดน่าน และทางใต้ลงมาจนถึง กรุงเทพมหานคร
7. T. g. olivacea พบในภาคกลางและกรุงเทพมหานคร
8. T. g. concolor พบแถบตะวันตกเฉียงใต้ จนถึงประเทศกัมพูชา

Subspecies ที่พบตามเกาะต่างๆ เช่น

T. g. lacernata พบมากที่เกาะตะรุเตา

T. g. cognata พบมากที่เกาะในเขตจังหวัดตรัง และกระบี่

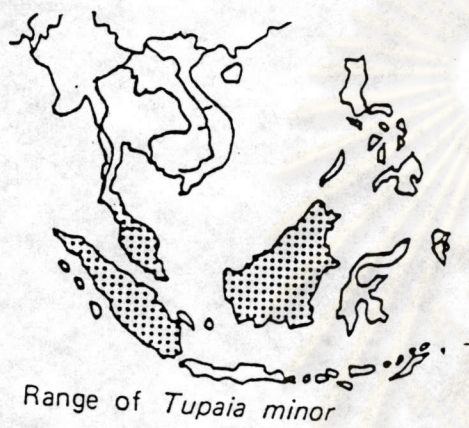
T. g. operosa พบมากที่เกาะสมุย

กระแตธรรมดาหรือ Tupaia glis นี้ ถูกนำมาใช้ศึกษากันมาก ในทางการแพทย์ กระแตชนิดนี้ใช้เวลาส่วนใหญ่อยู่บนพื้นดิน และกินอาหารเกือบทุกชนิด เช่น มด ปลวก แมลงปีกแข็ง ผลไม้ เมล็ดพืช กิ่งก่า และพวกสัตว์แทะขนาดเล็ก มันมักจะปีนกิ่งไม้ที่เตี้ยๆ และเมื่อมีภัยมันจะกระโดดลงพื้นอย่างรวดเร็วและหนีไป

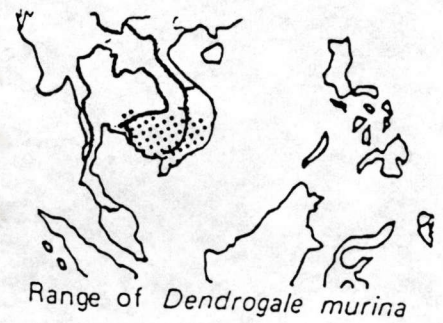
กระแตจัดเป็นสัตว์ที่ค่อนข้าง " nervous " และค่อนข้างก้าวร้าว เนื่องจากตัวผู้มักจะมี การต่อสู้กันอยู่เสมอ นอกจากนี้กระแตชอบน้ำมาก เพราะมันมักจะลงอาบน้ำในบริเวณที่เป็นแอ่งน้ำ ตามต้นไม้เสมอ

ยังไม่สามารถทราบอย่างแน่ชัดว่า ฤดูผสมพันธุ์ของมันคือฤดูใด เพราะพบว่า กระแตซึ่งตั้งท้องจะพบได้ตลอดทั้งปี รังของกระแตจะพบตามรูของต้นไม้ต่างๆ เช่น กอไม้ กระตอกกลุ่กรอก หนึ่งประมาณ 1-3 ตัว แต่ส่วนใหญ่จะพบ 2 ตัว ตัวอ่อนที่เกิดใหม่ จะยังไม่ลืมตา และไม่มีขนตามตัว ดังนั้นจะเห็นลำตัวเป็นสีชมพู และพบว่า วันที่ 4 หลังจากคลอดลำตัวจะเริ่มมีสีเกิดขึ้น และวันที่ 5 จะเริ่มมีขนขึ้นตามตัว ฟันจะเริ่มขึ้นในวันที่ 11 และตาจะลืมในวันที่ 25 ลูกกระแตจะส่งเสียงร้องดัง เมื่อมีสิ่งมารบกวนที่รังของมัน กระแตมีช่วงชีวิตประมาณ 2-3 ปี และอาจมีอายุและมากที่สุดถึง 5 ปี

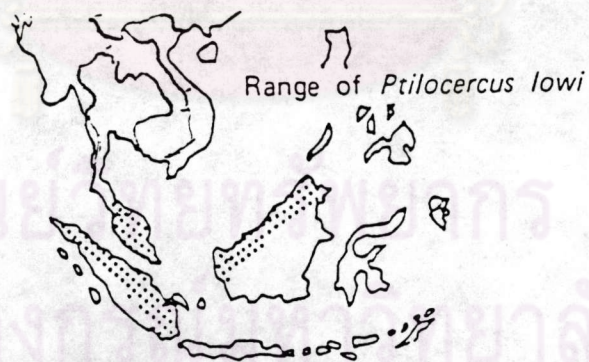
นอกจาก Tupaia glis แล้วยังพบ Tupaia minor ซึ่งเป็นกระแตขนาดเล็ก แต่พบมากทางใต้สุดของประเทศไทย, มาเลเซีย, เกาะสุมาตรา และ เกาะเบอร์เนียว (รูปที่ 2 A) และ Dendrogale murina หรือเรียกว่า กระแตหางหนู เพราะพบว่าหางของมันค่อนข้างยาว และมีขนสั้นๆ ปกคลุมจึงทำให้คล้ายกับหางของหนู พบมากแถบ ประเทศอินโดนีเซีย, กัมพูชา และทางตะวันออกของประเทศไทย (รูปที่ 3 B) นอกจากนี้ยังพบ Ptilocercus lowi หรือกระแตหางนก โดยพบว่าลักษณะหางมีลักษณะเหมือนกับหางนก เพราะมีขนที่ยาวและแบน พบมากแถบจังหวัดยะลา, สตูล, นราธิวาส และประเทศมาเลเซียไปยังเกาะสุมาตรา และเบอร์เนียว (รูปที่ 3 C)



A



B



C

รูปที่ 3 แสดงการกระจายของกระต่ายชนิดต่างๆ ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

- A แสดงการกระจายของ *Tupaia minor*
- B แสดงการกระจายของ *Dendrogale murina*
- C แสดงการกระจายของ *Ptilocercus lowi*



2.2 Calcium ions

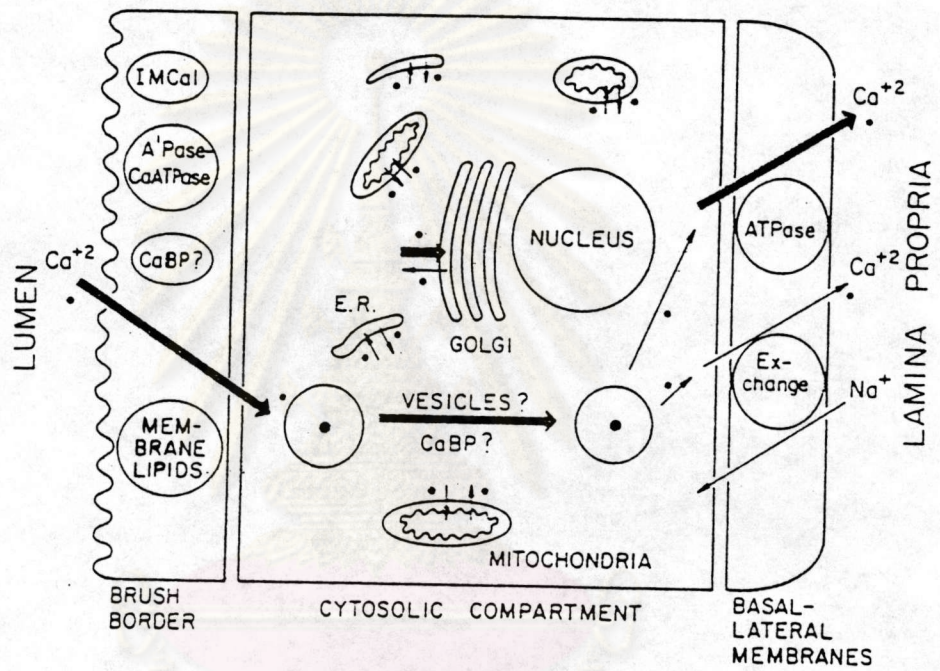
หน้าที่หลักของ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) พบว่ามีมากมาย ซึ่งทำหน้าที่เป็น "secondary messenger" โดยทำการกระตุ้นและควบคุมปฏิกิริยาต่างๆ Kretsinger (1981) ได้สรุปสภาวะที่เหมาะสมในการควบคุม ปริมาณของ Ca^{2+} โดยพบว่าความเข้มข้นทั้ง intracellular และ ภายนอกเซลล์ จะมีการเปลี่ยนแปลงคือ

- 1) ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ extracellular ionic มีค่าเท่ากับ 10^{-3} M หรืออาจน้อยกว่านั้น
- 2) ในสภาวะพัก (resting state) พบว่ามี intracellular ionic Ca^{2+} ที่ 10^{-7} M หรืออาจน้อยกว่านั้น
- 3) จะพบว่ามีปริมาณ Ca^{2+} เข้าไปในไซโทพลาสซึม ในระหว่างการกระตุ้น จนทำให้ cytosolic ionic Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้นถึง 10^{-6} - 10^{-5} M อาจเรียกว่าเป็น stimulated state
- 4) พบว่า intracellular calcium-binding receptor จะมีค่า K_a ประมาณ 10^{-6} M
- 5) ภายหลังจากกระตุ้น (post stimulatory phase) พบว่าจะมี ระดับของ cytosolic ionic Ca^{2+} กลับสู่ 10^{-7} M หรือน้อยกว่านั้นอย่างรวดเร็ว โดยจะมีการปลดปล่อย Ca^{2+} จาก receptor

การศึกษาเกี่ยวกับระดับของความเข้มข้นนี้มีการศึกษาในกล้ามเนื้อค่อนข้างมากโดยมักเกี่ยวข้องกับ calcium binding protein 3 ชนิดคือ parvalbumin, troponin C, calmodulin (Kretsinger, 1980) การที่ระดับของ Ca^{2+} จะอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและพอเหมาะนั้นก็ขึ้นอยู่กับ การควบคุมต่างๆ ของร่างกาย โดยเฉพาะระดับของ Ca^{2+} ใน ซีรัม ก็ควรอยู่ในสภาวะที่ปกติเช่นกัน คือในระดับประมาณ 10^{-3} M ซึ่งเป็นความเข้มข้นของ extracellular ionic Ca^{2+} นั้นเอง การควบคุม ระดับของ Ca^{2+} ที่เด่นชัดได้แก่ บริเวณลำไส้พบว่าจะมีการดูดซึม Ca^{2+} จากอาหารที่รับประทานเข้าไปในบริเวณนี้ในปริมาณมากดังนั้นจะเห็นว่าการศึกษาคalcium binding protein ในระยะแรกๆ จะศึกษากันมากในบริเวณลำไส้เป็นส่วนใหญ่ นอกจากลำไส้แล้วก็พบว่าบริเวณไต มี reabsorption ของ Ca^{2+} ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ปริมาณ Ca^{2+} ใน ซีรัม ก็ยังถูกควบคุมจากฮอร์โมนต่างๆ เช่น parathyroid hormone และ calcitonin โดยเกี่ยวข้องกับควบคุมปริมาณ Ca^{2+} ใน serum และกระดูก

ในการดูดซึม Ca^{2+} ที่บริเวณลำไส้พบว่าถ้าระดับของ Ca^{2+} อยู่ในปริมาณที่น้อย ($<5 \text{ mM}$) จะมีการนำ Ca^{2+} เข้าเซลล์โดยวิธี active transport และถ้าปริมาณ Ca^{2+} มีมากก็จะเข้าสู่เซลล์โดยวิธีการของ diffusion นอกจากนี้ในการส่ง Ca^{2+} ผ่านเซลล์นั้น พบว่าจะมีความเกี่ยวข้องกับ calcium binding protein หรืออาจอยู่ในรูปของ vesicles ก็เป็นไปได้ (รูปที่ 4) นอกจากนี้ปริมาณของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ ยังเก็บอยู่ใน ออร์แกเนลล์ ต่างๆ หลายชนิด โดยจะมีการถ่ายเท Ca^{2+} เข้าออกใน ไซโตพลาสซึม อย่างสม่ำเสมอโดย ออร์แกเนลล์ ที่พบว่ามี Ca^{2+} เก็บไว้ เช่น mitochondria, endoplasmic reticulum เป็นต้น และยังอยู่ใน binding protein ต่างๆ เพื่อควบคุม cytosolic Ca^{2+} ด้วย อีกวิธีหนึ่งในการส่งผ่าน Ca^{2+} เข้าออกจากเซลล์คือจะมีการใช้พลังงานเข้ามาเกี่ยวข้อง โดยอาศัย thermodynamic gradient และ high affinity Ca-activated ATPase หรือจากการใช้วิธี $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange และที่บริเวณ membrane อาจส่งผ่านโดยมี binding protein เป็นตัวรับ Ca^{2+} ด้วยอีกวิธีหนึ่ง (รูปที่ 4)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 แสดงวิธีการส่งผ่าน Ca^{2+} เข้าสู่ lamina propria ในบริเวณ brush border ของลำไส้โดยวิธีต่างๆ (Wasserman and Fullmer, 1983)

- Ca^{2+}
 - IMCaI = intestinal membrane calcium-binding protein
 - A'Pase-Ca ATPase = alkaline phosphatase = low-affinity Ca-activated ATPase complex
 - CaBP = vitamin D-dependent calcium-binding protein
 - E.R. = endoplasmic reticulum
 - ATPase = Ca-activated ATPase
- ลูกศรเข้มแสดงถึงกลไกซึ่งเกี่ยวข้องกับ vitamin-D

2.2.1 สัญญาณของ Ca^{2+} ในเซลล์ประสาท

Ca^{2+} มีหน้าที่สำคัญ ในอวัยวะต่างๆ อย่างมากมาย การศึกษาเท่าที่ผ่านมาในเนื้อเยื่อบางชนิด ก็พอที่จะทราบหน้าที่ ได้อย่างแน่นอน เช่นในกล้ามเนื้อลาย เป็นต้น แต่ในบางเนื้อเยื่อหน้าที่และบทบาทของ Ca^{2+} ยังต้องมีการศึกษาอีกมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อเยื่อของระบบประสาท มีการศึกษาอย่างกว้างขวางเนื้อเยื่อนี้ และได้มีการพัฒนาวิธีการต่างๆ เพื่อศึกษาบทบาทที่แน่นอนของ Ca^{2+} วิธีหนึ่งที่ใช้กันมากได้แก่วิธีการทาง biophysical techniques เช่นวิธี patch-clamp techniques นอกจากนี้ยังมีการวัดปริมาณของ Ca^{2+} โดยตรงโดยใช้ dyes ชนิดต่างๆ เช่น fura-2 และ quin-2 เป็นต้น

ความสำคัญของ Ca^{2+} ในระบบประสาทรุนั้น นอกจากจะเกี่ยวข้องกับการหลั่ง neurotransmitter และ axoplasmic transport แล้ว หน้าที่อื่นยังไม่ทราบอย่างแน่นอนนักจึงมีการศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับ Ca^{2+} ภายในสมอง ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาถึงกลไกของการตายของเซลล์ประสาทในสภาวะของ cerebral ischemia โดยพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับ calcium channels และปริมาณ Ca^{2+} ที่เปลี่ยนแปลงไป (Choi, 1988) นอกจากนี้ยังมีผู้พบว่า Ca^{2+} มีบทบาทเกี่ยวกับการเรียนรู้ (Lynch and Baudry, 1984) และเกี่ยวข้องกับความจำโดยปริมาณของ Ca^{2+} จะแตกต่างกันใน short และ long term memory (Kandel, 1981)

พบว่าในสภาวะปกติ ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ มีค่าประมาณ 10^{-7} M และจะเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว เมื่อมีการส่งสัญญาณประสาทขึ้น หลังจากนั้นปริมาณ Ca^{2+} จะลดลงสู่ระดับปกติ ซึ่งกลไกต่างๆ ในการควบคุมนี้ นับว่าได้รับความสนใจอย่างมากจาก neuroscientist ซึ่งเขาคาดว่า กลไก ดังกล่าว คงมีความแตกต่างไปจากเซลล์ชนิดอื่นๆ และจากการศึกษาโดยวิธี imaging techniques ก็พบว่าการกระจายของ Ca^{2+} ในสมองบริเวณต่างๆ ไม่เท่าเทียมกัน (Tsien, 1988)

2.2.2 Calcium channels

ได้มีการแบ่งชนิดของ calcium signal โดยอาศัยการแยกตาม voltage-sensitive และ receptor-operated Ca^{2+} channel ซึ่ง channels เหล่านี้ จะควบคุมการนำเข้าของ Ca^{2+} ผ่านเข้าสู่เซลล์ประสาท โดยขึ้นอยู่กับ electrical activity การแยกชนิดของ channels นอกจากจะแยกโดย ionic conductance แล้ว ยังสามารถแยกโดยทาง

เภสัชวิทยา เช่นโดยการใช้ dihydropyridine เป็นต้น ลักษณะของ calcium channels จะแตกต่างกันออกไป ในเซลล์ต่างชนิดกัน เพราะฉะนั้นปฏิกิริยาของการตอบสนอง ซึ่งเกิดจาก membrane depolarization จะไม่เท่ากันในเซลล์แต่ละชนิด เช่นในการเกิด pace maker depolarization ในกล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น

การศึกษาชนิดต่างๆของ calcium channels ได้ทำการทดลองโดยวิธี voltage clamp เป็นส่วนใหญ่จึงเรียก channels นี้ว่าเป็น voltage-gated calcium channels ในระยะแรกได้มีการศึกษาทดลองในเซลล์ต่างๆ หลายชนิดเช่น ไช้ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Hagiwara, 1975) เซลล์ของหัวใจ (Bean, 1985) และ GH₃ pituitary tumor cells เป็นต้น (Armstrong, 1985)

2.2.3 ชนิดของ calcium channels

การแยกชนิดของ calcium channels นั้นในปัจจุบันยังไม่สามารถที่จะแยกได้อย่างแน่ชัด นักแต่ก็มีการจำแนกตาม voltage dependent จากการศึกษาโดยการใช้ patch clamp techniques ดังกล่าวแล้วพบว่า calcium channels พบแตกต่างกันใน เนื้อเยื่อต่างชนิดกัน เช่นในกล้ามเนื้อหัวใจ จะพบเพียง 2 ชนิด แต่ในเนื้อเยื่อประสาทจะพบ 3 ชนิด (Triggle, 1990)

2.2.4 Calcium channels ใน กล้ามเนื้อหัวใจ

ได้มีการศึกษากล้ามเนื้อหัวใจของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น ventricle ของหนูตะเภา, atrium ของสุนัข, atrium ของกบ และ sinoatrial cells ของกระต่าย ได้มีการแบ่ง calcium channels ออกได้เป็น 2 ชนิด (Triggle, 1990) คือ

1) T channels พบว่า channel ชนิดนี้มี small depolarizations (low threshold) และมี rapidly inactivating (low threshold and fast)

T channels ยังพบในเนื้อเยื่อต่างๆได้อีกมาก เช่น กล้ามเนื้อเรียบ ต่อมใต้สมอง, secretory cells, fibroblasts, osteoblasts, astrocytes และในเซลล์ประสาท

T channels พบว่าไม่ถูกยับยั้ง จากยาพวก dihydropyridines และถูกยับยั้งได้เล็กน้อยจาก ω -conotoxin

คุณสมบัติของ T channels ในการที่มี low-threshold ทำให้เหมาะสมในการเกิด pacemaking ได้ดี ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของกล้ามเนื้อหัวใจนั่นเอง

2) L channels พบว่า channels ชนิดนี้มี large depolarization (high threshold) และมี slowly inactivation (high threshold and slowly) L channels พบว่าสามารถที่จะถูกยับยั้งได้จาก dihydropyridine และยาที่เป็น calcium channel blocker เช่นพวก nifedipine และ nitrodipine

2.2.5 Calcium channels ในเซลล์ประสาท

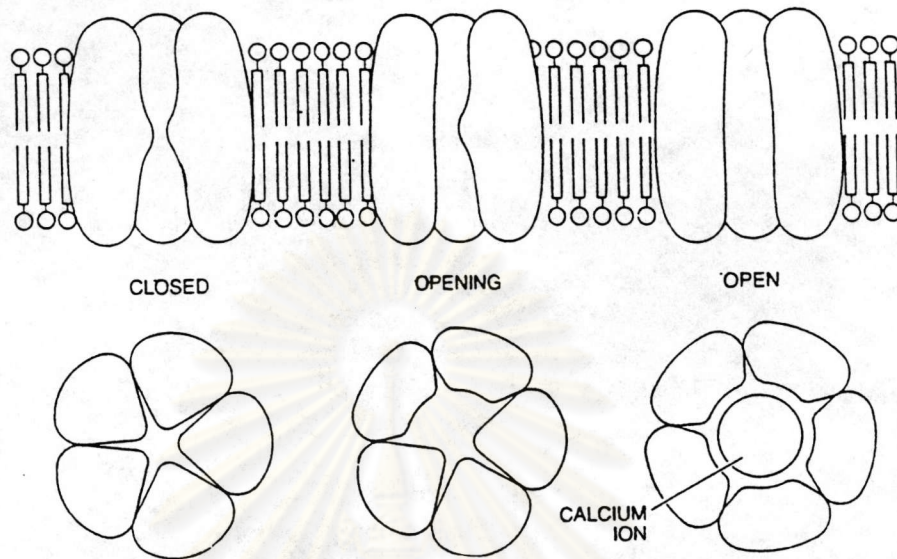
ในระยะแรกการศึกษาในเซลล์ประสาทนั้น ก็ได้มีการแบ่ง calcium channels ออกเป็น 2 ชนิด เช่นเดียวกับ เนื้อเยื่ออื่นๆ คือ T และ L type calcium channels

Fox และคณะ (1989) ได้ศึกษาชนิดของ Ca^{2+} channels ใน chick sensory neurons และได้แบ่ง calcium channels ในเซลล์ประสาทออกเป็น 3 ชนิด คือ

T type, L type และ N type โดยพบว่า ชนิด N type นี้ พบมี intermediate depolarization และ intermediate inactivating โดยอยู่ระหว่าง T และ L type calcium channels

ได้มีการศึกษาในเซลล์ประสาทอีกหลายชนิดและพบว่ามี ชนิดของ channels ที่เหมือนกับ การศึกษาของ Fox เช่น ศึกษาใน hippocampal neurons, neocortical neurons, cerebellar Purkinje cells และใน motoneurons เป็นต้น ลักษณะของ Ca^{2+} channels ใน เซลล์ประสาท พบว่าประกอบไปด้วย โปรตีน 5 โมเลกุล เรียงตัวกันคล้ายกับ ดอกกุหลาบและจะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไป เมื่อมี voltage เกิดขึ้น ทำให้โมเลกุลของ Ca^{2+} ผ่านเข้าไปได้ (รูปที่ 5)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 ภาพแสดงลักษณะของ calcium channels ที่บริเวณ membrane ของเซลล์ประสาท พบว่าจะมีการเปิดของ channels ขึ้น เมื่อมีการเปลี่ยนแปลง voltage ทำให้ Ca^{2+} ผ่านเข้าไปได้ แต่ละ channels จะประกอบไปด้วย โปรตีน 5 โมเลกุล มาประกอบกัน จึงทำให้คล้ายกับ ดอกกุหลาบ และลักษณะของโปรตีน จะเปลี่ยนแปลง ไปเมื่อ channel เปิดบริเวณ membrane ของเซลล์ประสาท จากรูปจะเห็นว่า ประกอบไปด้วย ไลปิด 2 ชั้น (Llinas, 1982)

2.2.6 บทบาทของ Ca^{2+} ต่อการเกิด neurotoxicity และ ischemic damage

Choi (1988) พบว่าเมื่อมีปริมาณของ extracellular Ca^{2+} เข้าไปมากภายใน เซลล์ประสาท เป็นผลทำให้เกิด overload ของ Ca^{2+} ซึ่งเป็นเหตุทำให้เกิดมีการตายของ เซลล์เกิดขึ้น เช่นเดียวกับการเกิด hypoxic-ischemic neuronal injury ยังพบว่าการ เกิด injury ชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับ การกระตุ้น postsynaptic glutamate receptors มากเกินไป และมีความเกี่ยวข้องกับการที่ Ca^{2+} ผ่าน membrane channels มากอย่างขาดการควบคุม โดยคาดว่า channels ที่ Ca^{2+} ผ่านเข้าไปมากได้แก่ L และ N type channels และโดยทาง $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange รวมถึง non-specific membrane leak การที่ Ca^{2+} สูงขึ้นนั้น นอกจากจะมีแหล่งจาก ภายนอกเซลล์ แล้วยัง

พบว่า มาจากภายใน ออร์แกนเนล ต่างๆ ภายในเซลล์เองซึ่งเป็น Ca^{2+} stores ที่สำคัญภายในเซลล์

การที่มี Ca^{2+} มากเกินไปภายในเซลล์พบว่าทำให้เกิดมีการตายแบบต่างๆ กัน เช่น ปรากฏการณ์ของ calcium paradox phenomenon ในชั้น myocardium ซึ่งเกิดจาก cardiac cells มีการ expose กับ Ca^{2+} -free solution อย่างรวดเร็ว ในการเกิด excess intracellular Ca^{2+} จะทำให้เกิด การกระตุ้น protease และ lipase เป็นผลทำให้เกิด free radicals ขึ้น และเกิดการกระตุ้น Ca^{2+} -ATPase ทำให้มีความผิดปกติของ mitochondrial oxidative phosphorylation

พบว่าใน hypoxic-ischemic neuronal injury มีความเกี่ยวข้องกับปริมาณ Ca^{2+} แต่ในเซลล์ชนิดอื่น พบว่าอาจไม่มีความเกี่ยวข้อง เช่นการศึกษาใน hepatocytes เมื่อมี cytosolic free Ca^{2+} มากก็ไม่เกิด injury ขึ้น (Lemaster, 1987)

ในการศึกษาเกี่ยวกับ hypoxic-ischemic neuronal injury ได้พบความเปลี่ยนแปลงต่างๆ ดังนี้

- 1) Hypoxia ใน cerebral cortex พบว่ามีปริมาณของ extracellular Ca^{2+} ลดลงประมาณ 10% จากระดับของ control (Nicholson, 1978)
- 2) ในระยะแรกของการเกิด neuronal hypoxia พบว่ามี transmitter และ free fatty acids มากขึ้น ทำให้มีปริมาณ intracellular Ca^{2+} เพิ่มมากขึ้น
- 3) ปริมาณ Ca^{2+} ที่มีมากขึ้น จนถึงระดับของ cellular levels ที่ทำให้เกิด hypoxic injury อาจเกิดขึ้นก่อนที่เซลล์ประสาทม์ necrotic
- 4) การศึกษา in vitro ในกรณี hypoxic neuronal injury สภาวะที่มีความเข้มข้นของ Na^+ น้อยลงจะพบมี Ca^{2+} -dependent และ organic blockers ของ voltage-dependent Ca^{2+} channels มากขึ้น



2.3 Calcium binding protein ใน ระบบประสาท

จากการศึกษาที่ผ่านมา ในระบบประสาท พบว่ามี calcium binding protein อยู่หลายชนิด โดยโปรตีนเหล่านี้ สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้อย่างหนาแน่น และทำให้เกิด calcium signals ขึ้นได้ ตัวอย่างของโปรตีนเหล่านี้ ดัง Christakos และคณะ (1987) ได้สรุปคือ

1. Calmodulin พบว่ามี น้ำหนักโมเลกุล 17,000 daltons พบใน eucaryotic cells ทุกชนิด มีบทบาทสำคัญภายในสมอง มันจะเป็นตัวกระตุ้น calcium dependent enzymes หลายชนิด รวมทั้ง phosphodiesterase, adenylate cyclase, Mg^{2+} -ATPase และ protein kinase และยังมีรายงานว่า calmodulin มีความเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ และการหลั่ง neurotransmitter ด้วย
2. S100 protein พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 20,000 daltons เป็น acidic protein คาดว่าโปรตีนชนิดนี้ จะอยู่ในเซลล์บางชนิดภายในสมองเท่านั้น เช่น ในพวก glial cells โดย มีความเกี่ยวข้องกับการเติบโตของ glial cells ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่ามีเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นให้เกิด aldolase activity ภายในสมอง
3. Parvalbumin มีน้ำหนักโมเลกุล 12,000 daltons พบมากในกล้ามเนื้อ และสมอง การกระจายของ parvalbumin มีความใกล้เคียงกันกับ GABAergic neurons ส่วนบทบาทและหน้าที่ภายในสมอง ยังคงไม่ทราบแน่ชัดนัก
4. Calbindin-D28K มีน้ำหนักโมเลกุล 28,000 daltons พบมากในสมองโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน สมองน้อย โดยพบมากใน Purkinje cells และยังมีมากในเซลล์อื่นอีกหลายชนิด

ในระยะต่อมามีการค้นพบ calcium binding protein เพิ่มขึ้นอีกหลายชนิด โดยมักจะตั้งชื่อตามน้ำหนักโมเลกุลที่พบ เช่น calbindin-D9K และ 10K protein เป็นต้น การศึกษาโปรตีนเหล่านี้ ได้มีวิธีต่างๆ กันในการศึกษา เช่น radioimmunoassy, chromatography และ อิมมูโนฮิสโตเคมี เป็นต้น เพื่อที่จะศึกษาหาปริมาณโปรตีน และตำแหน่งที่แน่นอน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาโดยวิธีที่ต่างกันออกไป อาจทำให้มีผลที่แตกต่างกันไปบ้าง เช่น อาจจะทำให้ค่าของน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน ในโปรตีนชนิดเดียวกัน เป็นต้น

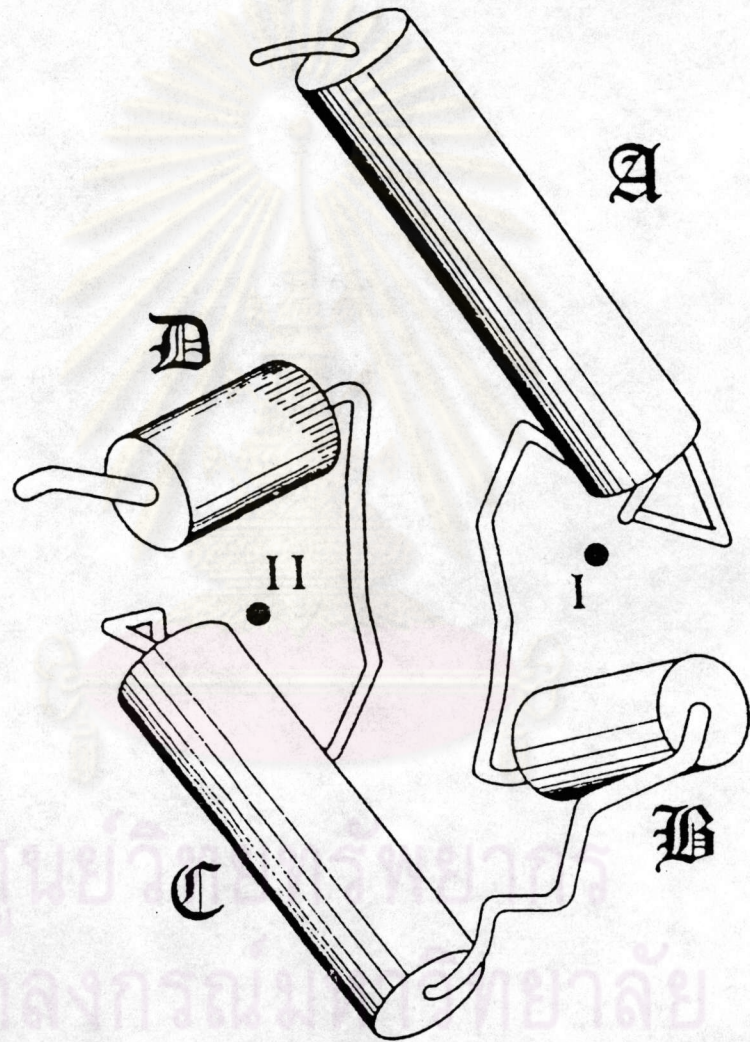
ได้มีการศึกษาต่อมาพบว่า โปรตีนเหล่านี้ ยังมีความเกี่ยวข้องกับ วิตามิน ดี (1,25 dihydroxy vitamin D3) ด้วย โดยเฉพาะโปรตีนซึ่งพบในบริเวณลำไส้ และบริเวณอื่นซึ่งไม่ใช่สมอง เช่น กระจก, ตับอ่อน และรก เป็นต้น โดยได้ทำการศึกษาในสัตว์ต่างๆ หลาย species แต่อย่างไรก็ตามคำตอบซึ่งเกี่ยวข้องกับหน้าที่ของโปรตีนเหล่านี้ก็ยังไม่ทราบเด่นชัดนัก การศึกษาเกี่ยวกับโครงสร้างของ calcium binding protein ได้เกิดขึ้นอย่างกว้างขวาง จุดประสงค์เพื่อจะหารูปปร่างและองค์ประกอบที่แท้จริงของโปรตีน เพื่อนำไปสู่หน้าที่ของมันนั่นเอง ได้มีการหาชนิดและการจัดเรียงตัวของ amino acid และพบว่าโปรตีนเหล่านี้ทุกตัวในบริเวณของ N-terminal จะมีความยาวต่างกันออกไปเช่น พบว่า troponin C มี 15 residues, calmodulin มี 5 residues, parvalbumin มี 39 residues และ calbindin พบมี 2 residues เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึง crystal structure ของโปรตีนเหล่านี้ โดยวิธี crystallography พบว่าโปรตีนมีลักษณะเป็น globular molecule และมีรูปปร่าง octahedral ซึ่งเกิดจากการจัดเรียงตัวของ helix-loop-helix conformation ของ polypeptide chain (รูปที่ 6) และจะจับกับ Ca^{2+} ในบริเวณที่เรียกว่า "EF hand region" ซึ่งเป็นบริเวณที่เป็น calcium binding site โปรตีนแต่ละชนิดจะมีปริมาณของ calcium binding site แตกต่างกันไปและเมื่อมีการจับกับ Ca^{2+} แล้วรูปปร่างของโปรตีนจะเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมด้วย พบว่า parvalbumin และ calbindin-D9K มี 2 EF hand , calmodulin และ troponin C มี 4 EF hands

โปรตีนเหล่านี้ เป็น transcellular calcium transport พบมากใน เนื้อเยื่อ ที่มี plasma membrane calcium pump เช่น distal tubule ของ ไต และ รก เป็นต้น

ในการศึกษาเกี่ยวกับ vitamin D-dependent calcium binding protein โดยวิธีทางชีวเคมี ได้พบ 2 subclass ของ โปรตีน นี้คือ

1. โปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 9,000 daltons คือ calbindin-D9K และพบว่า มี 2 calcium binding domains โปรตีนนี้พบเฉพาะใน ลำไส้ของ mammal เท่านั้น
2. โปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 28,000 daltons คือ calbindin-D28K นั้นเอง พบว่ามี 4 calcium domains มีปริมาณสูงใน ลำไส้ของ avian ต่อมาจึงพบว่า มีมากใน เนื้อเยื่อ อื่นๆ ด้วย เช่น ไต ตับอ่อน และสมอง มีรายงานว่า calbindin-D28K ที่พบในลำไส้และไต เท่านั้นที่เป็น vitamin D dependent

การศึกษาเกี่ยวกับ vitamin-D dependent calcium binding protein พบว่า วิตามินดี มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดการดูดซึม Ca^{2+} และการสังเคราะห์ โปรตีนขึ้นมาใหม่ และเป็นกลไกที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว



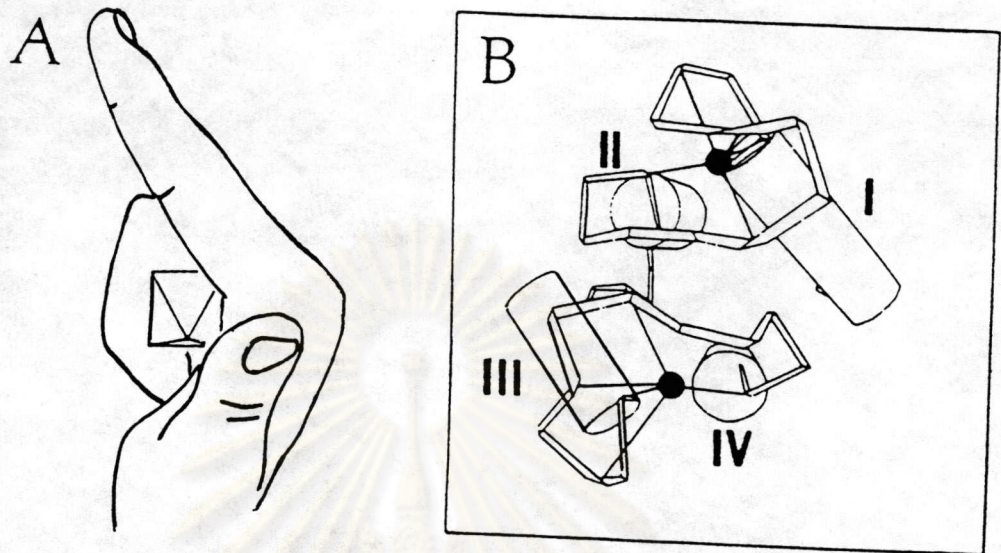
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของ helix-loop-helix (HLH) Ca^{2+} -binding domain จากภาพแสดงถึง 2 HLH structural units (helix A - loop I - helix B และ helix C - loop II - helix D)
 . = Ca^{2+} (Moews and Kretsinger, 1975)

2.4 Calbindin - D28K

Gross และ Kumar (1990) ได้สรุปลักษณะและหน้าที่ของ calbindin-D28K ไว้ดังนี้คือ Calbindin-D28K เป็นสมาชิกของ troponin C superfamily จะพบมากในบริเวณของ calcium-transporting tissues เช่น ลำไส้, distal tubule ของไต และรก นอกจากนี้ยังพบในบริเวณสมองในปริมาณมากอีกด้วย ในปี 1966 Wasserman และ Taylor ทำการแยก calbindin-D28K ได้ครั้งแรกในลำไส้ของลูกไก่ ต่อมาพบว่ามีการกระจายในเนื้อเยื่อต่างๆ อย่างมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งใน สมอง โดยคาดว่าเป็น neuronal marker ที่สำคัญ และอาจทำหน้าที่เกี่ยวกับ synaptic transmission และ axonal transport

2.4.1 โครงสร้าง calbindin-D28K

จากการศึกษาโดยวิธีต่างๆ เช่น โดยการใช้ x-ray crystal structure และ amino acid sequencing techniques พบว่า calbindin-D28K ประกอบไปด้วย กรดอะมิโน 261 ตัว มี 6 calcium binding sites ซึ่งสามารถ จับ กับ Ca^{2+} ได้ และพบว่ามี 1 NH_2 -terminus น้ำหนักโมเลกุลคือ 30.167 kilodaltons โดยวิธี sodium dodecyl sulfate (SDS) และ 28.0 kilodaltons โดยวิธี gel electrophoresis พบว่า 6 binding site จะมี 2 binding site ที่มี low affinity ดังนั้นจึงสามารถจับ กับ Ca^{2+} ได้เพียง 4 โมเลกุล/1 โมล ของโปรตีน ส่วน calbindin-D9K ประกอบไปด้วย 2 EF hands และประกอบไปด้วย 4 main helices โดยมี calcium binding loop อยู่ระหว่าง helices (รูปที่ 7)



รูปที่ 7 สัญลักษณ์แสดง ลักษณะของ EF hand ใน calbindin - D9K

- A. แสดงการเปรียบเทียบโครงสร้างกับการกำมือ โดยนิ้วชี้และนิ้วหัวแม่มือแสดงลักษณะของ helices ส่วนนิ้วกลางแสดงถึง loop ซึ่งจับกับ Ca^{2+}
- B. แสดงลักษณะ carbon backbone และ แคลเซียมไอออน ของ calbindin-D9K โดยประกอบไปด้วย 4 helices (I, II, III, IV) โดยมี loops อยู่ระหว่าง helices I และ II และ ระหว่าง helices III และ IV โดยรูปทรงกระบอกใช้แทน helices ลักษณะแผ่นเรียบใช้แทน polypeptide chains

. = Calcium ions

(Szebenyi et al, 1981)

การจับกับ Ca^{2+} ของ calbindin-D28K พบว่ามี high affinity มาก โดยมีค่า dissociation constant (K_d) = 10^{-8} - 10^{-6} รูปร่างของ โปรตีนนี้ตั้งกล่าวแล้วว่า มีลักษณะเป็น octahedral calcium binding structure ซึ่งเกิดจากการรวมกันของ helix-loop-helix conformation ที่เป็น polypeptide chain ในบริเวณซึ่งเป็น loop จะประกอบไปด้วย side chain ซึ่งมี ออกซิเจน และสามารถที่จะ มีการจับกับ Ca^{2+} จึงเป็นไปได้ว่า ความแตกต่างของ calcium binding protein แต่ละชนิดอันเกี่ยวข้องกับหน้าที่นั้นขึ้นอยู่กับ conformation ของ calcium binding loop นั้นเอง พบว่าบริเวณที่

เป็น "EF hand" ประกอบไปด้วย c-terminal domain และเป็น regulatory site ซึ่งจะ จับ หรือปลดปล่อย Ca^{2+} เมื่อ Ca^{2+} มีความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงไป

Calbindin-D28K พบว่าเป็น acidic protein และทนต่อความร้อน มี isoelectric point (PI) ประมาณ 4.7 ความสามารถในการ จับ กับ ions ต่างๆ พบ เรียงตามลำดับจากมากไปน้อยคือ $Ca > Cd > Sr > Mn > Zn > Ba > Co > Mg$ และยังพบว่ามัน สามารถจับกับตะกั่วได้ด้วย โดยมี high affinity ซึ่งมากกว่า Ca^{2+} นอกจาก calbindin-D28K แล้ว พบว่า ตัวอื่นเช่น troponin C, calmodulin และ oncomodulin ก็สามารถ จับตะกั่วได้เช่นกัน การศึกษาในระยะต่อมาจึงให้ความสนใจเกี่ยวกับ lead binding properties ของ intestinal calbindin มากขึ้น (Christakos et al, 1989)

2.4.2 การกระจายของ calbindin-D28K

Calbindin-D28K นอกจากจะพบใน ลำไส้, โต และตับอ่อน แล้ว ยังพบได้ในเนื้อเยื่อ ต่างๆ อีกมากมายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสมอง จากการศึกษาโดยวิธีทาง immunological พบว่ามีปริมาณมากในบริเวณ sensory pathway ของสมองรวมทั้ง cochlear และ vestibular hair cell ของ หูชั้นใน ด้วย จากการศึกษาของ Christakos และคณะ ในปี 1987 จากระบบประสาทของหนูแสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนนี้มากที่บริเวณ forebrain areas, cerebral cortex, hippocampus, hypothalamus, basal ganglia และ cerebellum และพบ ในปริมาณน้อยที่บริเวณ brain stem ส่วนเซลล์ที่พบมีปริมาณมากได้แก่ Purkinje neurons ของ cerebellum, granule cells ของ dentate gyrus และ pyramidal neurons ของ hippocampus โดยเฉพาะในบริเวณ CA1

Celio ได้ศึกษาการกระจายของ calbindin-D28K และ parvalbumin ในสมองของ หนูในปี 1990 พบว่า calbindin-D28K จะพบปริมาณมากใน long axons (Golgi type I cells) เช่นในบริเวณ thalamic projection neurons, striatonigral neurons, nucleus basalis Meynart neurons, cerebellar Purkinje cells และ vestibular ganglion cell เป็นต้น และยังพบมากใน pathway หลักๆ ใน limbic system ยกเว้นใน fornix แต่ก็สามารถพบได้บ้างใน short axon cells (Golgi type II) เช่น ในไซลันหลัง interneurons ใน layer II และใน interneurons ของ cerebral cortex การกระจายของ calbindin-D28K จะมีการกระจายคล้ายกับของ dihydropyridine subtype ของ Ca^{2+} channels ด้วย

การกระจายของ calbindin - D28k พบว่าโปรตีนชนิดนี้จะกระจายอยู่ทุกส่วนของเซลล์ประสาท คือ cell body, dendrites และ axon โดย โปรตีนนี้ถูกสร้างขึ้นที่ cell body และขนส่งไปตาม axon

Calbindin-D28K ในสมอง พบมีปริมาณ 0.1-1.5% ของ โปรตีนทั้งหมด และมี 1-2% ใน cerebellum คืออยู่ใน Purkinje cells ดังกล่าวแล้ว นอกจากนี้ยังพบว่ามีอยู่ใน peripheral nerve cells ด้วย โดยไม่ทราบหน้าที่แน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่า อาจเกี่ยวข้องกับการหดตัวของกล้ามเนื้อ และ ควบคุมการไหลเวียนโลหิต

จากการศึกษาใน หนู และ ลิง พบว่า calbindin-D28K มีมากใน dopaminergic neurons ของ substantia nigra ในบริเวณ pars compacta และ dopaminergic neurons ใน ventral tegmental area (Gerfen et al., 1985)

2.4.3 ความเกี่ยวข้องระหว่าง calbindin-D28K และโรคทางสมอง

จากการศึกษาความเกี่ยวข้องระหว่าง calbindin-D28K กับโรคที่เกิดขึ้นทางสมอง พบว่าในบางโรคมักมีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ calbindin-D28K ในบางบริเวณ เช่นคนที่ เป็น epilepsy โดย Miller และคณะ (1983) ได้ศึกษาถึงปริมาณ calbindin-D28K พบว่ามีจำนวนลดลงใน dentate granule cells ของ hippocampus และเขาได้อธิบายว่าสาเหตุเกิดจากการที่ calcium buffering capacity ลดลง ซึ่งนำไปสู่ rapid inactivation ของ calcium channels จึงทำให้เกิดอาการชักขึ้นได้

การศึกษาในคนที่ เป็น Huntington's disease พบว่า มีการลดลงของ calbindin-D28K immunoreactive neurons ใน substantia nigra, caudate nucleus และ putamen (Kiyama et al., 1980) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในระดับ gene ปรากฏว่า calbindin mRNA levels และ protein levels ลดลงถึง 60-80% ในสมองของ aging rat ในบริเวณ cerebellum, corpus striatum และ brain stem แต่ไม่พบเปลี่ยนแปลงใน cerebral cortex และ hippocampus

การศึกษาใน aging human พบลดลงถึง 50-88% ในบริเวณ cerebellum, corpus striatum และ nucleus basalis แต่ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลงใน neocortex, hippocampus, amygdala, locus ceruleus และ nucleus raphe dorsalis (Iacopino and Christakos, 1990) นอกจากนี้ ยังพบว่าในโรคของ neurodegenerative อื่นๆ ก็พบว่ามีปริมาณของ calbindin-28K ลดลงเช่นกัน เช่น Parkinsonism พบลดลงที่

substantia nigra และใน Alzheimer's disease พบว่ามีปริมาณ calbindin-D28K และ calmodulin ลดลงที่บริเวณ cortex และ white matter โดยลดลงถึงประมาณ 66% (McLachlan, 1987)

ได้มีการศึกษาถึง calcium binding protein ควบคู่กับ neurotransmitter พบว่า บริเวณที่มี calbindin-D28K immunoreactivity จะเป็นบริเวณที่ให้ผลบวกต่อการยอม acetylcholine ด้วย (Graybiel, 1981)

2.5 Parvalbumin

Parvalbumin เป็น calcium binding protein ชนิดหนึ่ง พบว่าเป็น muscle-specific protein (Heizmann and Celio, 1987) แยกได้มากใน amphibians และ fishes muscle โดยจากการศึกษาในระยะแรกได้ทำการทดลองใน frog white muscle โดยวิธี immunohistochemical ต่อมาพบว่า parvalbumin มีการกระจายค่อนข้างสูง ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในกล้ามเนื้อชนิด fast-twitch skeletal fibers และเซลล์บางกลุ่มของระบบประสาท นอกจากนี้ยังพบมากใน Leydig cells ใน testis อีกด้วย Celio ในปี 1990 ได้ศึกษาการกระจายของ parvalbumin ในระบบประสาทส่วนกลางของหนู พบว่าส่วนมากจะให้ผลบวกในเซลล์ประสาทชนิด long axons cells (Golgi type I) ซึ่งหน้าที่ของโปรตีนนี้ ยังทราบไม่แน่ชัดนัก แต่ก็ได้มีความพยายามในการศึกษาถึงปริมาณและการกระจายในอวัยวะต่างๆ อย่างกว้างขวาง เพื่อจะชี้ทางไปสู่หน้าที่ที่แท้จริงนั่นเอง อย่างไรก็ตามคาดได้ว่า มันมีบทบาทในการควบคุมปริมาณ Ca^{2+} และการหดตัวของกล้ามเนื้อเป็นสำคัญ

Kretsinger และคณะในปี 1980 ได้ศึกษาพบว่าปริมาณของโปรตีนชนิดนี้มีความเกี่ยวข้องกับ วิวัฒนาการ และได้กล่าวถึงหน้าที่ของมันว่ามีความเกี่ยวข้องกับ intracellular calcium mobilization ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pechere ในปี 1968 ที่ได้ให้ข้อเสนอว่า parvalbumin เป็น basic molecule และ แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ ϵ และ δ parvalbumin

ได้มีการศึกษาโปรตีนชนิดนี้ในระบบประสาท ส่วนกลางและส่วนปลายพบว่า parvalbumin มีความเกี่ยวข้องกับ axonal flow จากการศึกษานี้ในเส้นประสาทหลายชนิด Celio ในปี 1990 ได้สรุปว่า parvalbumin positive neurons เป็นเซลล์เดียวกับ γ -aminobutyric acid (GABA) positive neurons อีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน basket และ stellate cell

ใน cerebellum, basket cells ใน hippocampus และ periglomerular cells ใน olfactory bulb

การศึกษาโดยวิธีทาง kinetic และ equilibrium Ca^{2+}/Mg^{2+} -binding ซึ่งให้เห็นว่า parvalbumin มีความสำคัญในขบวนการ คลายตัวของกล้ามเนื้อ ภายหลังการเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Pechère et al., 1977) และปริมาณ parvalbumin จะค่อนข้างสูงในกล้ามเนื้อที่มี fast relaxation โดยมีสัดส่วนที่แปรตามกันระหว่างปริมาณของ parvalbumin และความเร็วของ relaxation นอกจากนี้ Natalei ในปี 1989 ได้ให้ข้อสรุปว่าในการเกิดการคลายประสาท นั้น parvalbumin จะไม่จับกับ Ca^{2+} ทันทีแต่มันจะจับกับ Mg^{2+} ก่อนเป็นลำดับแรก ส่วน Ca^{2+} จะจับกับ troponin C และ calmodulin ก่อนเช่นกันหลังจากนั้น troponin-C และ calmodulin จะปล่อย Ca^{2+} ออกมาในขณะเดียวกันกับ Mg^{2+} ถูกปล่อยออกจาก parvalbumin ต่อมา parvalbumin จึงจับกับ Ca^{2+} เป็นผลให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อขึ้น

2.5.1 โครงสร้างของ parvalbumin

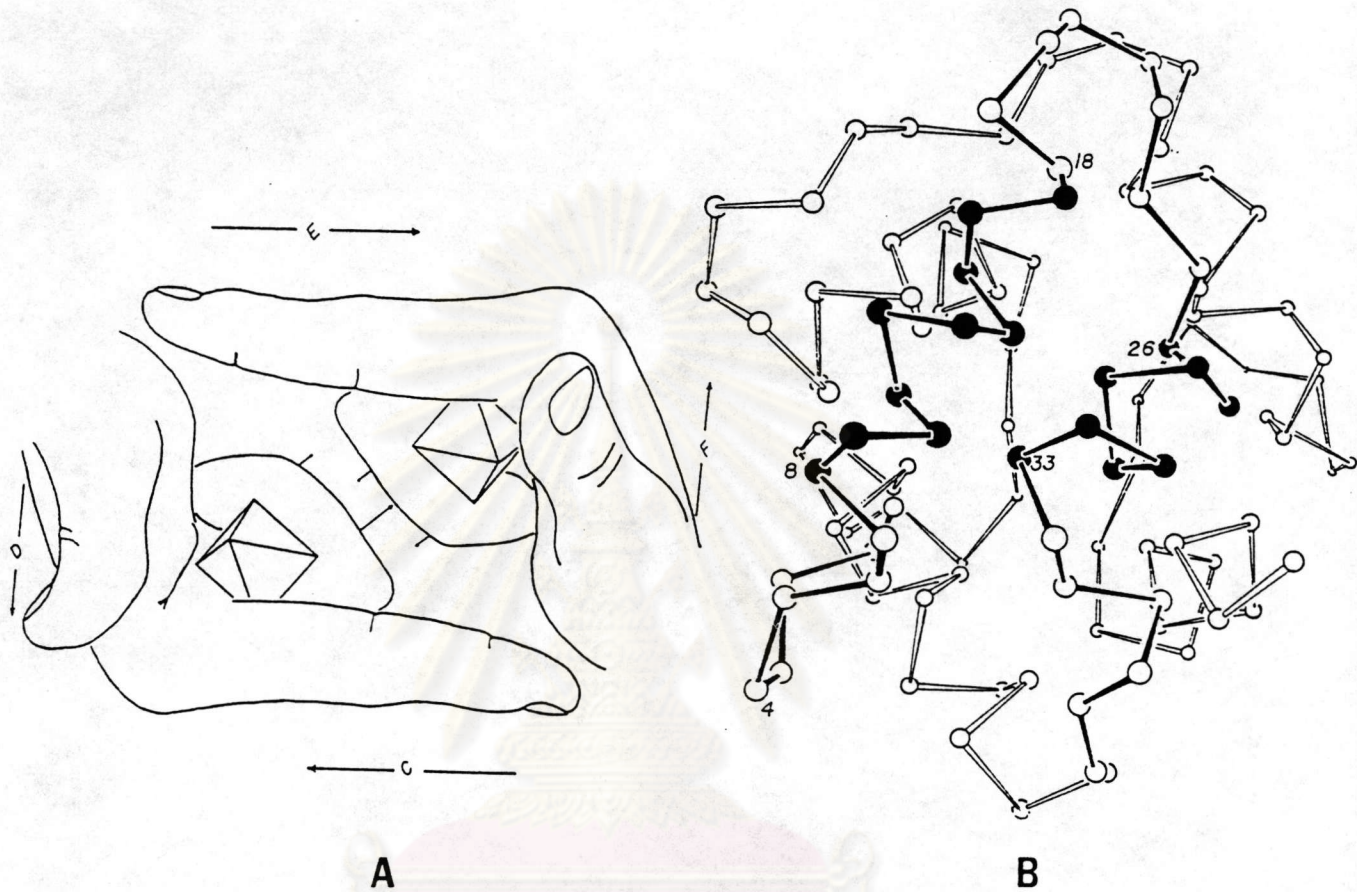
Heizmann และ Celio ในปี 1987 ได้สรุปถึง parvalbumin ว่าเป็น calcium binding protein ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และเป็น acidic protein ซึ่งสามารถละลายน้ำได้ดี (high-water solubility) มี isoelectric point (PI) ~ 5 น้ำหนักโมเลกุลมีประมาณ 12,000 daltons การศึกษาโครงสร้างของ parvalbumin ได้มีการศึกษากันมากในพวก lower vertebrate โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน carp muscle ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นเกี่ยวกับ concept ของ "EF hand" นั้นเอง จากการศึกษาโดยวิธี x-ray crystallography พบโมเลกุลมีลักษณะเป็น three-dimensional structure การเรียงตัวของกรดอะมิโนมีลักษณะเป็น "helix-loop-helix" เช่นเดียวกับ calcium binding protein อื่นๆ เช่น calbindin-D28K, calmodulin และ troponin C เป็นต้น ส่วนรูปร่างของ parvalbumin พบว่ามีลักษณะเป็น globular molecule ซึ่งมีความแตกต่างจาก troponin C และ calmodulin ที่มีรูปร่างเป็น dumb-bell shaped โมเลกุลของ parvalbumin ประกอบไปด้วย 3 regions ที่มีลักษณะเหมือนกัน โดยแต่ละ region จะประกอบไปด้วย calcium binding loop โดยมีประมาณ 10-12 amino acids และขนานข้างด้วย helical sequences ที่มีกรดอะมิโนประมาณ 10 ตัว และในแต่ละ calcium binding loops จะมี oxygen atom ที่บริเวณ side chain ของโปรตีน

โดยพบว่าจะมี 1 loop ที่ inactive ดังนั้นจะเห็นว่าโครงสร้างของ parvalbumin จะประกอบไปด้วย 2 คู่ของ "EF hand" (รูปที่ 8) CD และ EF region จะมีคล้ายคลึงกัน และมี helices ทั้งหมด 6 helices คือ A-F โดยมี loops อยู่ระหว่าง helices เหล่านั้น parvalbumin พบว่าประกอบไปด้วย 3 calcium binding domains แต่สามารถจับกับ Ca^{2+} ได้ 2 domains เท่านั้น เนื่องจาก 1 domain มี low affinity (Carafoli and Penniston, 1985)

การศึกษา ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน และ physiochemical properties ซึ่งให้เห็นว่า parvalbumin ที่สกัดได้จาก lower และ higher vertebrates ต่างๆ จะมีโครงสร้างที่ใกล้เคียงกับ carp parvalbumin ซึ่งนับว่าเป็น isostructural กัน การศึกษา โดยวิธี spectroscopic และ chemical ก็ยังพบว่า parvalbumin ในรูปของ solution จะมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับในรูปของ crystal ด้วย นอกจากนี้จากการหา ลำดับการเรียงตัวของกรดอะมิโน ในหนู และกระดาษพบว่าโครงสร้างของ parvalbumin ในสัตว์ต่าง species จะแตกต่างกัน ในชนิดของ กรดอะมิโน ในบางตำแหน่งเท่านั้น และยังพบว่า โครงสร้างส่วนใหญ่ของโมเลกุลเป็น กรดอะมิโน ชนิด alanine, phenylalanine และ lysine (Kumar et al., 1990)

2.5.2 การกระจายของ parvalbumin

Parvalbumin พบว่ามีปริมาณมากใน กล้ามเนื้อลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน fast twitch muscle fibers ซึ่งได้จากการศึกษาในสัตว์หลาย species พบว่าให้ผลการทดลองที่คล้ายกัน เช่นใน extensor digitorum longus muscle ซึ่งกล้ามเนื้อชนิดนี้มีลักษณะเป็น fast contracting และ fast relaxing muscle ปรากฏว่าให้ผลบวกอย่างเด่นชัด การศึกษาต่อมาได้มีการยืนยันว่ากล้ามเนื้อชนิด type IIB จะให้ strong immunoreactivity, type II A พบมี moderately stained และ type I พบว่า nonreactive ต่อการย้อม parvalbumin ส่วนการศึกษาในพวก slow tonic fibers เช่นใน external eye muscles ก็ไม่พบว่าให้ผลบวก นอกจากนี้ใน กล้ามเนื้อลาย แล้วยังมีการศึกษาใน กล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อเรียบ ปรากฏว่าไม่ให้ผลบวกต่อการย้อมโปรตีนนี้ นั่นเป็นการแสดง ให้เห็นว่า parvalbumin เป็น องค์ประกอบ ที่สำคัญตัวหนึ่งที่มีบทบาท ในการหดตัว และคลายตัวของกล้ามเนื้อลายนั่นเอง Berchtold และคณะในปี 1984 ทำการศึกษาในชั้น skin epidermis พบว่า parvalbumin มักมีการกระจายอยู่ในชั้นของ dermal layer และเขาพบว่ามี parvalbumin ที่แตกต่างกันถึง 2 ชนิด ในบริเวณนี้ด้วย



รูปที่ 8 A แสดง calcium-binding regions ของ parvalbumin โดยเปรียบเทียบ โมเลกุลของ parvalbumin โดยมีชื่อว่า 2 ข้าง บริเวณ CD และ EF loops แทนด้วยน้ำกลางซึ่งจะมี โมเลกุลของ Ca^{2+} จับอยู่
 B แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ parvalbumin ให้เห็น ϵ -carbon ซึ่งแสดงด้วย วงกลมทึบ จะเห็นว่าอยู่ทางด้านในของโปรตีน
 (Moews and Kretsinger, 1975)

การศึกษาในเนื้อเยื่อต่างๆ ชี้ให้เห็นว่า parvalbumin มีการกระจายไม่เฉพาะใน contractile cells เท่านั้น แต่ยังพบใน สมอง, ม้าม, ไต และรังไข่ เป็นต้น ใน ไต นั้นพบว่า parvalbumin มีมากในบริเวณ distal tubule และ proximal collecting duct เป็นส่วนใหญ่ ส่วนบริเวณ calcification center ของกระดูก และ ameloblasts ในฟัน ก็พบว่าให้ผลบวกในปริมาณมาก ซึ่งตรงข้ามกับใน ม้าม , ต่อมไทรอยด์ , ต่อมน้ำนม, ต่อมน้ำตา, เอ็น และเนื้อเยื่อไขมัน พบให้ผลบวกในปริมาณเล็กน้อยเท่านั้น พบ parvalbumin มีชนิดที่แตกต่างกันออกไปบ้างเช่นในปลาพบ parvalbumin มากกว่า 5 ชนิดขึ้นไป ส่วนใน mammal นั้นพบเพียง 1 ชนิดเท่านั้น และในสัตว์ซึ่งต่าง species กัน ก็มี primary structure ที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน แต่ก็ไม่ identical กันทีเดียว (Heizmann and Celio, 1988)

การกระจายของ parvalbumin ในระบบประสาท พบว่ามีเพียงบางกลุ่มของเซลล์ประสาทเท่านั้น ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อมโปรตีนชนิดนี้ ได้มีการศึกษาในสัตว์หลาย species เช่นใน หนู แมว และ ลิง เป็นต้น และยังมีการศึกษาใน มนุษย์ ซึ่งให้ผลที่คล้ายคลึงกันด้วย นอกจากนี้พบว่าใน glial cells ไม่ให้ผลบวกต่อการย้อม ส่วนเซลล์ที่ให้ผลบวกก็มีความเข้มของ immunostaining แตกต่างกันในเซลล์ประสาทที่ต่างชนิดกัน เช่นความเข้มของ Purkinje cells ใน cerebellum จะเข้มกว่าพวก basket และ stellate cells เป็นต้น

Celio ในปี 1990 ได้ศึกษาการกระจายของทั้ง calbindin - D28K และ parvalbumin ในทุกบริเวณของสมองพบว่าเซลล์ซึ่งให้ผลบวกต่อการย้อม parvalbumin ส่วนใหญ่จะเป็นพวก long axon cells (Golgi type I cells) และ interneurons นอกจากนี้ Celio ในปี 1986 ได้ศึกษาในบริเวณ cortical area ของสมอง พบว่าบางส่วนของ T-amino butyric acid (GABA) - containing cells เป็นเซลล์เดียวกันกับเซลล์ที่มี parvalbumin-immunoreactive ด้วย

ได้มีศึกษาใน auditory, vocal motor และ visual system ของ adult zebra finches โดยศึกษาการกระจายของ parvalbumin ใน nuclei ต่างๆ พบว่าบริเวณที่ให้ผลบวกของ parvalbumin จะมีความสัมพันธ์กับ cytochrome oxidase activity (Braun et al., 1991) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของ parvalbumin จะมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณในระยะต่างๆ ของการเติบโต

Heizmann ในปี 1984 ได้ทำการศึกษาการกระจายของ parvalbumin ในสมอง จากผลการทดลอง พบว่า ให้ผลบวกมากบริเวณ neocortex (ยกเว้น layer I) ส่วนบริเวณ olfactory bulb ในชั้นของ glomerular layers พบว่ามีเพียง periglomerular cells

เท่านั้นที่ให้ผลบวก และบริเวณ hippocampus ในชั้น pyramidal layer มีบางเซลล์ที่ให้ผลบวกเช่นกัน ส่วนบริเวณ cerebellum เซลล์ที่ให้ผลบวก เด่นชัดคือ Purkinje cells และในชั้น molecular layer นั้น basket และ stellate cells ให้ผลบวกเพียงเล็กน้อย ส่วน granular layer ไม่พบให้ผลบวกในชั้นนี้ บริเวณ hypothalamus พบมี immunoreactive neurons กระจายโดยทั่วไป ยกเว้น บางกลุ่มของ preoptic area และ premamillary nuclei และบริเวณ thalamus โดยเฉพาะใน specific thalamic nuclei ไม่พบว่าให้ผลบวก ยกเว้นบริเวณ reticularis

ความแตกต่างของปริมาณ parvalbumin ในแต่ละบริเวณของระบบประสาทส่วนกลางซึ่งให้เห็นว่า parvalbumin เป็น neuronal marker ที่สำคัญในระบบประสาทโดย Celio และ Heizman (1981) ได้ศึกษาและสรุปถึงหน้าที่ของ parvalbumin และกล่าวว่า parvalbumin มีความเกี่ยวข้องกับ neuronal functions ที่สำคัญ โดยทำหน้าที่เป็น Ca^{2+} transport protein และเป็น early neuronal marker ด้วย คือพบเพียงบางช่วงของ neuronal differentiation เท่านั้น

2.5.3 ความเกี่ยวข้องระหว่าง parvalbumin และโรคทางสมอง

การศึกษา parvalbumin ซึ่งเกี่ยวข้องกับโรคต่างๆพบบ่อยได้ในระยะไม่นานนี้ โดย Heizman และคณะ (1987) ได้ทำการศึกษาปริมาณของ parvalbumin ใน tumor cells และพบว่าปริมาณค่อนข้างสูงในเซลล์ชนิดนี้ นั้นแสดงว่า parvalbumin อาจมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งก็เป็นได้นอกจากนี้ Viragh และคณะ (1989) ได้ศึกษาพบว่าปริมาณ parvalbumin จะเพิ่มสูงขึ้น เมื่อให้สัตว์ทดลองได้รับ vitamin D ที่มากเกินไป ส่วน calmodulin, calbiuchin-D28K และ S-100 protein ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลง ซึ่งบริเวณที่ปริมาณ parvalbumin เพิ่มขึ้น คือ caudate nucleus และ putamen ส่วนบริเวณ cerebral cortex, hippocampus และใน ไต ไม่พบว่ามีเปลี่ยนแปลง ซึ่งการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่า metabolism ของ parvalbumin ใน caudate nucleus และ putamen ได้รับอิทธิพลจาก steroid hormone

ได้มีการศึกษาใน Alzheimer's disease (Sato et al., 1991) และ epileptic (Sloviter et al., 1991) ในระบบประสาทส่วนกลางพบว่า parvalbumin immunoreactive neurons มีปริมาณและขนาดที่ลดลงในบริเวณต่างๆ ส่วนการศึกษาใน murine muscle dystrophy พบว่าปริมาณ parvalbumin ก็ลดลงเช่นกัน โดยคาดว่ามีความ

เกี่ยวข้องกับ progression ของโรค (Greaves et al., 1991) ด้วย นอกจากนี้ Kobayashi และคณะ (1990) ได้ศึกษาปริมาณของ calbindin-D28K และ parvalbumin ใน Down's syndrome และได้พบว่า ทั้ง calbindin-D28K และ parvalbumin immunoreactive neurons มีปริมาณลดลงค่อนข้างมากใน cerebral cortex อีกด้วย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย