



ผลของการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินใน
กล้ามเนื้อหัวใจหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่

**Effect of Estrogen Replacement on Levels of Parvalbumin in Ovariectomised
Female Rat Cardiac Myocytes**

วิมล wirเกียรติ

Wimon Wirakiat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University**

2553

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

(1)

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมิน
ในกล้ามเนื้อหัวใจหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่
ผู้เขียน นางสาววิมล วิจารณ์ดิ
สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ทวีพร ประถมพิภักญาจัน)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)

.....
(ดร.วันดี อุดมอักษร)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกสิทธิ์ กุมารสิทธิ์)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ทพ.สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์)

.....กรรมการ
(ดร.วันดี อุดมอักษร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

| | |
|-----------------|--|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | ผลของการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อหัวใจหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ |
| ผู้เขียน | นางสาววิมล วิรเกียรติ |
| สาขาวิชา | กายวิภาคศาสตร์ |
| ปีการศึกษา | 2552 |

บทคัดย่อ

โรคหัวใจล้มเหลวที่มีความบกพร่องในการคลายตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ เป็นโรคที่พบมากในสตรีวัยหมดประจำเดือน และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทำให้ประสิทธิภาพการคลายตัวของหัวใจในสตรีวัยหมดประจำเดือนดีขึ้น ผลดังกล่าวยังไม่มีการอธิบายถึง parvalbumin (PV) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่จับกับแคลเซียมและช่วยในการคลายตัวของหัวใจ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการตัดรังไข่ ซึ่งเป็นภาวะเสมือนการหมดประจำเดือน และผลของการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ PV ภายในกล้ามเนื้อหัวใจหนูเพศเมีย โดยศึกษาในหนู Wistar เพศเมีย อายุ 3 เดือน แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (sham) กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในขนาด 10 ไมโครกรัม/มล. (Es10), 20 ไมโครกรัม/มล. (Es20) และ 40 ไมโครกรัม/มล. (Es40) เป็นเวลา 10 สัปดาห์ โดยศึกษาระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด ปริมาณของ estrogen receptor (ERs) และ ระดับของ PV ในกล้ามเนื้อหัวใจ จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (18 ± 1.1 พิโคกรัม/มล.) ($p < 0.05$) กลุ่ม Es10 (41.9 ± 2.6 พิโคกรัม/มล.) มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนใกล้เคียงกลุ่ม sham (39.85 ± 4.7 พิโคกรัม/มล.) และกลุ่ม Es20 (71.84 ± 5.25 พิโคกรัม/มล.), Es40 (201.4 ± 20.8 พิโคกรัม/มล.) มีระดับเอสโตรเจนมากกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α (ER α) มากกว่าชนิด β (ER β) อย่างชัดเจนในกล้ามเนื้อหัวใจ กลุ่ม OVX มีการลดลงของปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ทั้ง 2 ชนิด ขณะที่กลุ่ม Es20, Es40 มีปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER α เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน และพบว่าระดับของ PV ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม OVX ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่ม Es10, Es20 และ Es40 มีระดับของ PV ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham โดยสรุปการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจน สัมพันธ์กับการลดลงของ ERs และ PV ในกล้ามเนื้อหัวใจ ขณะที่การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถเพิ่มปริมาณของ ER α และ PV ได้ ซึ่งอาจนำไปใช้อธิบายการเปลี่ยนแปลงการทำงานของหัวใจในสตรีวัยหมดประจำเดือน

Thesis Title Effect of estrogen replacement on levels of parvalbumin in ovariectomised female rat cardiac myocytes
Author Miss Wimon Wirakiat
Major Program Anatomy
Academic Year 2009

ABSTRACT

Diastolic heart failure is believed to be common in postmenopausal women and the estrogen hormone replacement therapy has been demonstrated to improve left ventricular diastolic function in postmenopausal women. PV was hypothesized to play an important role in a calcium binding protein which mediate relaxation in cardiac myocytes. Thus, this study aimed to investigate the effect of ovariectomy and different doses of estrogen replacements on cardiac myocyte PV level in rat. Adult female Wistar rats (12 weeks) were randomly divided into 5 groups (n=10/group); sham operated, ovariectomised (OVX), OVX groups that received 10 weeks estrogen replacement of 10 µg/kg (Es10), 20 µg/kg (Es20) and 40 µg/kg (Es40) for studying serum estrogen levels, estrogen receptors and PV levels in cardiac myocytes. Our data demonstrated that the estrogen level was significantly reduced in the OVX (18 ± 1.1 pg/ml), and not different in the Es10 group (41.9 ± 2.6 pg/ml) and significantly increased in the Es20 (71.84 ± 5.25 pg/ml) and the Es 40 (201.4 ± 20.8 pg/ml) groups compared to that of the sham operated group (39.85 ± 4.7 pg/ml) ($p < 0.05$). The results demonstrated a higher immunoreactivity of α -type estrogen receptor expression than β -type in cardiac myocytes. The α and β estrogen receptors immunoreactivity was decreased in the OVX groups and an increase of α type of estrogen receptors immunoreactivity was identified in the Es20 and Es40 groups. PV level was significantly reduced in the OVX groups ($p < 0.05$) and in the Es10, Es20 and Es40 there was no difference of the PV level compared to that of the sham group. In conclusion, our study has demonstrated that the decrease of estrogen level was correlated with a reduction of estrogen receptors and PV levels in the cardiac myocytes and estrogen replacement can increase the estrogen receptors and PV levels. This may be a useful information for explaining an alteration of heart function in menopausal women.

สารบัญ

| | หน้า |
|-----------------------------|------|
| รายการรูป | (7) |
| รายการตาราง | (9) |
| สัญลักษณ์คำย่อ และสัญลักษณ์ | (10) |
| 1. บทนำ | 1 |
| 2. วิธีการวิจัย | 25 |
| 3. ผลการทดลอง | 44 |
| 4. วิเคราะห์ผลการทดลอง | 57 |
| 5. บทสรุป และข้อเสนอแนะ | 61 |
| บรรณานุกรม | 63 |
| ภาคผนวก | 74 |
| ประวัติผู้เขียน | 120 |

รายการรูป

| รูปที่ | | หน้า |
|----------------|---|------|
| บทที่ 1 | | |
| 1-1 | กระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศที่มีสารตั้งต้นมาจากโคเลสเตอรอล | 3 |
| 1-2 | แสดงกลไกการทำงานของ estrogen receptor ทั้ง ER-dependent และ ER-independent | 8 |
| 1-3 | โครงสร้าง และ function domains ของ ER α และ ER β | 11 |
| 1-4 | แสดง ribbon diagram ของ parvalbumin ชนิด ER α และ ER β ในหนูขาว | 12 |
| 1-5 | แสดง Schematic diagram บริเวณ CD site ของ α -parvalbumin และ β -parvalbumin ในหนูขาว | 13 |
| 1-6 | กลไกการทำงานของ parvalbumin ในการช่วยในการคลายตัวของหัวใจ | 15 |
| 1-7 | แสดงส่วนต่าง ๆ ของหัวใจ | 16 |
| 1-8 | ตำแหน่งของหัวใจและอวัยวะใกล้เคียงในทรวงอกของหนูขาว | 17 |
| 1-9 | แสดงหัวใจของหนูทางด้านหน้า และทางด้านหลัง | 17 |
| 1-10 | แสดงหัวใจหนูที่ผ่าซีกเปรียบเทียบให้เห็นกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายที่หนากว่ากล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา | 18 |
| 1-11 | แสดงกลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ | 19 |
| 1-12 | แสดงเซลล์ที่พบใน estrous cycle ในแต่ละระยะ | 22 |
| บทที่ 2 | | |
| 2-1 | แสดงตำแหน่งการโกนขนบริเวณลำตัวหนูเพื่อเตรียมการผ่าตัด การผูกห้ามเลือดก่อนตัดรังไข่ การตัดรังไข่ออกจากตัว และ เย็บชั้นผิวหนังเพื่อปิดแผล | 32 |
| 2-2 | การให้ยาแก้ปวดหลังจากหนูตื่นจากสลบ | 32 |
| 2-3 | แสดงการฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยวิธีฉีดใต้ผิวหนัง | 34 |
| บทที่ 3 | | |
| 3-1 | แสดงระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดหนูของแต่ละกลุ่มการทดลอง | 46 |
| 3-2 | แสดง estrous cycle ของหนูทั้ง 4 ระยะ ย้อมโดยใช้วิธี PAP stain | 47 |
| 3-3 | แสดงค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสโตรเจนในแต่ละระยะของ estrous cycle ในหนูกลุ่มควบคุม | 48 |

รายการรูป (ต่อ)

| รูปที่ | | หน้า |
|---------|--|------|
| บทที่ 4 | | |
| 3-4 | แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจกลุ่ม sham, OVX, Es10, Es20 และ Es40 ด้วยการย้อมแบบ H&E | 49 |
| 3-5 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α ในรังไข่หนู | 50 |
| 3-6 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู | 51 |
| 3-7 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ในรังไข่หนู | 52 |
| 3-8 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู | 53 |
| 3-9 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ parvalbumin ในกล้ามเนื้อ EDL | 54 |
| 3-10 | แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ parvalbumin ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนู | 55 |
| 3-11 | ภาพถ่ายฟิล์มเอ็กซเรย์ของ parvalbumin กราฟแสดงค่าเฉลี่ย และค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของแถบ parvalbumin ในหัวใจหนู | 56 |

รายการตาราง

| ตารางที่ | หน้า |
|---|------|
| บทที่ 1 | |
| 1-1 แสดงปริมาณฮอร์โมนเพศในกลุ่ม steroid sex hormone ในเพศหญิง และ เพศชาย | 23 |
| บทที่ 3 | |
| 3-1 แสดง น้ำหนักตัว น้ำหนักมดลูก น้ำหนักหัวใจ น้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว และ น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว | 45 |
| 3-2 ระยะเวลา estrous cycle ของหนูแต่ละกลุ่ม | 48 |

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย

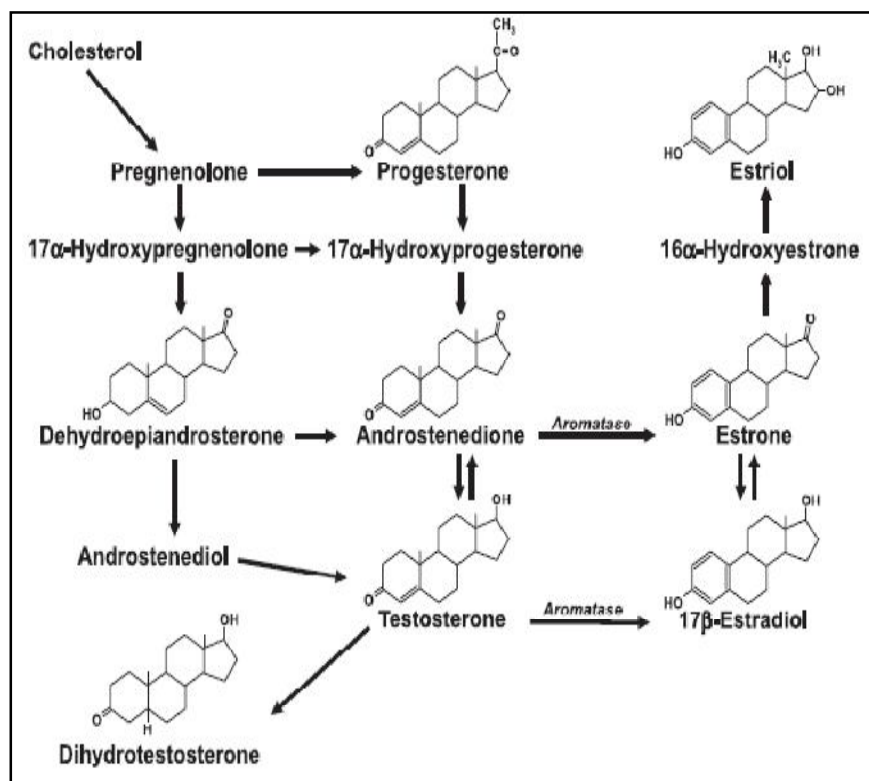
โรคหัวใจล้มเหลวมี 2 ชนิดได้แก่ชนิดซิสโตลิก (systolic heart failure) และชนิดไดแอสโตลิก (diastolic heart failure) ซึ่งชนิดซิสโตลิกเป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหัวใจเนื่องจากมีการบีบตัวที่น้อยกว่าปกติทำให้ปริมาณเลือดที่ส่งไปเลี้ยงยังปอดและอวัยวะต่างๆ ในร่างกายมีปริมาณที่ลดน้อยลง (Auigemma *et al.*, 1995) โรคหัวใจชนิดนี้สามารถรักษาได้โดยใช้ยาในกลุ่ม β -blocker (Senior, 2001) และโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิก ซึ่งเกิดขึ้นจากการคลายตัวของหัวใจที่ช้ากว่าปกติ ทำให้เลือดไหลกลับเข้ามาในหัวใจลดน้อยลง ส่งผลต่อปริมาณเลือดที่ส่งไปยังปอดและเลี้ยงร่างกายลดน้อยลง (Lorell, 1999; Mandinove *et al.*, 2000; Zile and Brutsaert, 2002a) โรคหัวใจชนิดนี้ในปัจจุบันยังไม่มียารักษา และพบว่าผู้หญิงป่วยเป็นโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกมากกว่าผู้ชายโดยเฉพาะผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน (Hayward *et al.*, 2000) จากการศึกษาเนื้อเยื่อหัวใจของผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกพบว่า มีการคลายตัวช้าเนื่องจากมีความบกพร่องในการดึงแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) กลับเข้าสู่ sarcoplasmic reticulum (SR) (Morgan, 1991) จึงนำมาสู่ความสนใจการศึกษาโปรตีนที่มีชื่อว่า parvalbumin (PV) โดย PV เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียม (Ca^{2+} binding protein) และเป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็ก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 11-12 kDa พบปริมาณมากในไซโทพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อลายชนิดหดและคลายตัวเร็ว (Fast-twitch skeletal muscle fiber) โดยที่ PV จะทำหน้าที่ดึง Ca^{2+} ออกจาก troponin C และส่งกลับเข้าสู่ SR ซึ่งมีผลทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว ดังนั้นการคลายตัวจึงขึ้นอยู่กับอัตราการจับของ Ca^{2+} กับ PV และเป็นกระบวนการที่ไม่ต้องใช้พลังงาน (Berchtold *et al.*, 2000) จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบ PV ในหัวใจหนูเพศผู้และหนูเพศเมีย (Vongvatcharanon and Vongvatcharanon, 2003; Vongvatcharanon *et al.*, 2006; Vongvatcharanon *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบ PV ในหัวใจของสัตว์ประเภทอื่น เช่น ไก่ กระจ่าง และหมู (Vongvatcharanon *et al.*, 2008) ซึ่ง Coutu และคณะ (2003) ได้เสนอแนะว่า PV ในหัวใจน่าจะทำหน้าที่ในการทำให้กล้ามเนื้อคลายตัวเช่นเดียวกับ PV ในกล้ามเนื้อลาย จากการศึกษาหนูเพศผู้ และหนูเพศเมียในแต่ละวัยพบปริมาณ PV ที่แตกต่างกัน โดยสัมพันธ์กับอัตราการทำงานของหัวใจ (Vongvatcharanon *et al.*, 2006; Vongvatcharanon *et al.*, 2008) แต่ยังไม่มีการศึกษาว่ามีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ PV ในหนูเพศเมียในระยะหมดประจำเดือน เทียบกับหนูวัยก่อนหมดประจำเดือน ดังนั้นจึงนำมาสู่ความสนใจที่จะศึกษาการแสดงออกของ PV ในหัวใจหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่เพื่อชักนำให้เกิดภาวะเหมือนหมดประจำเดือน (menopause) ซึ่งผลการศึกษาอาจนำไปอธิบายสาเหตุและพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน จากการศึกษา

ทั้งในมนุษย์ และสัตว์ทดลองพบว่า ภาวะหมดประจำเดือน หรือฮอร์โมนเพศลดลงนั้น ทำให้การทำงานของหัวใจมีประสิทธิภาพลดลง โดยหัวใจมีการลดปริมาณการสูบฉีดโลหิต (cardiac output) ความดันของหัวใจขณะบีบตัวสูงสุด (peak systolic pressure) มีค่าที่สูงขึ้น การทำงานของ myosin ATPase ลดลง การหดตัวของหัวใจและการคลายตัวของหัวใจแย่งลงเนื่องจากการลดและเพิ่มปริมาณของโปรตีนชนิดต่าง ๆ ในกลุ่ม Ca^{2+} -handling protein เช่น sarcoplasmic reticulum ATPase รวมถึง β -adrenergic receptor (Chu *et al.*, 2006; Capasso *et al.*, 1983; Scheure *et al.*, 1987) จากการศึกษาของ Chu และคณะ (2006) ด้วยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้ปริมาณ Ca^{2+} -handling protein คือ sodium calcium exchange (NCX) มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับในหนูที่ไม่ได้ตัดรังไข่ และจากการศึกษาที่ผ่านมาไม่ได้ศึกษาถึงโปรตีน PV ว่ามีการเปลี่ยนแปลงในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ และให้ฮอร์โมนทดแทน ดังนั้นจึงนำมาสู่ความสนใจที่จะศึกษาผลทำให้ฮอร์โมนทดแทนต่อการแสดงออกของ PV ซึ่งผลจากการศึกษาอาจนำมาสู่แนวทางในการรักษาโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน

2. การตรวจเอกสาร

2.1 ฮอริโมน

ฮอริโมนที่มีบทบาทต่อการทำงานของหัวใจเป็นฮอริโมนเพศในกลุ่มสเตียรอยด์ ซึ่งมี 3 ชนิด ได้แก่ estrogen, progesterone และ androgen โดยฮอริโมนทั้ง 3 ชนิดมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของลักษณะทางเพศทั้งเพศหญิงและเพศชาย การเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ การควบคุมรอบเดือน รวมทั้งการตั้งครรภ์ในเพศหญิง ซึ่งฮอริโมนทั้งสามชนิดมีสารตั้งต้นร่วมกันคือ โคลเลสเตอรอล



รูปที่ 1-1 กระบวนการสังเคราะห์ฮอริโมนเพศพวกสเตียรอยด์ที่มีสารตั้งต้นมาจากโคลเลสเตอรอล ซึ่งเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อหลายชนิดทั้งในร่างกายเพศชาย และเพศหญิง ได้แก่ อัณฑะ (testis) ต่อมหมวกไต (adrenal gland) และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) (Czubryt *et al.*, 2006)

2.1.1 เอสโตรเจน

ในมนุษย์เป็นชนิด 17 β -estradiol (E2) โดยทั่วไปเอสโตรเจนอาจจะหมายถึง E2 หรือ estron (E1) และ Estriol (E3) โดย E2 สร้างมาจากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนโดยเอนไซม์ aromatase ในขณะที่ E1 และ E2 สามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้ และ E3 เป็นผลผลิตที่ได้จากการเปลี่ยน E1 และ E2 ในผู้หญิงเอสโตรเจนจะถูกสังเคราะห์มาจาก ไขมัน และเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) (Burger, 2001) ในภาวะหมดประจำเดือน ไขมันจะหยุดการสร้างเอสโตรเจน ดังนั้นการทำงานของเอนไซม์ aromatase จาก peripheral tissue จะเปลี่ยนเทสโทสเตอโรนให้เป็นเอสโตรเจน (Purohit and Reed, 2002) เอสโตรเจน เป็นฮอร์โมนที่ช่วยให้การทำงานของหัวใจดีขึ้น และช่วยลดความรุนแรงของโรคในสัตว์ทดลอง โดยจากการศึกษาของ Gross และคณะ (2005) พบว่า E2 และ E3 สามารถที่จะทำให้ผลของพยาธิสภาพของหัวใจในหนูที่ถูกตัดรังไข่ลดน้อยลง โดยการเพิ่มความหนาแน่นของหลอดเลือดที่มาเลี้ยง และลด myocardial mass (Gross *et al.*, 2005) ในหนูถีบจักร เพศเมียที่ถูกตัดรังไข่กลุ่ม ischemia-reperfusion injury พบว่าการบีบตัวของหัวใจลดลง และเส้นผ่าศูนย์กลางของหัวใจห้องล่างเพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cavasin *et al.*, 2003) และการได้รับ E2 ในเพศเมียพบว่าทำให้การฟื้นตัวของภาวะ ischemia reperfusion ดีขึ้น การศึกษา E2 ในการป้องกัน ischemic injury นั้น ได้มีการอธิบายว่าเนื่องจาก E2 มีผลกระตุ้น heat shock protein ซึ่งเป็น cardioprotective ต่อ ischemic injury (Knowlton and Sun, 2001) นอกจากนี้จากการศึกษาพบว่า E2 สามารถยับยั้งการเกิด cardiomyocyte hypertrophy โดยการเหนี่ยวนำตัวยับยั้ง calcineurin (calcineurin antagonist) ซึ่งมีชื่อว่า Modulatory calcineurin-interacting protein 1 (MCIP1) (Pedram *et al.*, 2005) เนื่องจาก calcineurin เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของหัวใจ และ E2 ยังมีผลยับยั้งการตายของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจแบบ apoptosis ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* (Patten *et al.*, 2004) ดังนั้น เอสโตรเจน จึงมีผลในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของหัวใจโดยยับยั้งทั้ง hypertrophy และ apoptosis ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เฉพาะ E2 เท่านั้นที่ยับยั้งการสังเคราะห์ collagen โดย cardiac fibroblast และยับยั้งการ proliferation ของ fibroblast (Dubey *et al.*, 1998) ใน neonatal rat cardiac fibroblast พบการแสดงออกของ ER α , ER β , PR-A, PR-B (Mercier *et al.*, 2002)

ฤทธิ์ทางสรีรวิทยาและเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ที่สำคัญของเอสโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของท่อหน้าไข่ (fallopian tubes) มดลูก (uterus) ช่องคลอด (vagina) และอวัยวะเพศภายนอก (external genitalia) ในขณะที่เด็กผู้หญิงกำลังเจริญเข้าสู่วัยสาว อวัยวะย่อยของระบบสืบพันธุ์เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาโดยผลของเอสโตรเจนจะทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนและขยายขนาดของเยื่อบุ และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจนมีความสมบูรณ์ทางเพศอย่างเต็มที่เมื่อเข้าสู่

วัยสาว ในกรณีที่ขาดฮอร์โมนจากรังไข่จะทำให้อวัยวะในระบบสืบพันธุ์เกิดการฝ่อ (atrophy) เล็กลง

รังไข่ (ovaries) เอสโตรเจนมีฤทธิ์ควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลโดยออกฤทธิ์ร่วมกับฮอร์โมนโกนาโดโทรปินส์ และมีเอสโตรเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากคอร์ปัสลูเทียมในแต่ละรอบของการมีประจำเดือนมาเป็นตัวกระตุ้นเบื้องต้นต่อกลุ่มของฟอลลิเคิลที่จะเจริญขึ้นในการมีประจำเดือนครั้งต่อไป

ท่อนำไข่ (fallopian tubes, oviduct) ในคนมี 2 ท่อ อยู่บริเวณมดลูกส่วนบน มีลักษณะเป็นท่อนยาวต่ออยู่ระหว่างมดลูกและรังไข่ทั้งสองข้าง มีความยาวประมาณหลอดละ 12 เซนติเมตร ส่วนปลายที่ติดอยู่กับรังไข่จะเป็นปลายเปิดรูปกรวยที่เรียกว่า infundibulum โดยที่ปลายจะมีลักษณะคล้ายกับนิ้วมือ เรียกว่า fimbriae หลังจากไข่ตกแล้ว ไข่จะเคลื่อนเข้าไปในปลายเปิดของ infundibulum โดยอาศัยแรงกวาดซึ่งเกิดจากการโบกพัดของ cilia ของเยื่อบุผิวของท่อนำไข่ พบว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของ secretory cell และเซลล์ที่มี cilia อยู่บนเยื่อบุผนังของท่อนำไข่ และเพิ่มการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบอย่างเป็นจังหวะทำให้ไข่เดินทางเข้าสู่โพรงมดลูกได้เร็วขึ้น

มดลูก (uterus) การเพิ่มขึ้นของเอสโตรเจนทำให้เยื่อบุโพรงมดลูกมีความหนาเพิ่มมากขึ้นประมาณ 2-3 เท่า โดยจะไปมีผลทำให้จำนวน และความสูงของเซลล์ในเยื่อบุโพรงมดลูกเพิ่มขึ้น และยังส่งผลทำให้ต่อมในเยื่อบุโพรงมดลูกมีจำนวนต่อมที่เพิ่มขึ้น ยาวมากขึ้น และเพิ่มการสร้าง spiral arteries อย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้การสร้างโปรตีน actin และ myosin เพิ่มมากขึ้น กับทั้งยังทำให้มดลูกมีการหดตัวแบบ spontaneous contraction เกิดได้มากขึ้น และยังทำให้กล้ามเนื้อในมดลูกเพิ่มความไวต่อการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นโดยเฉพาะ oxytocin ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการคลอด อธิพลของเอสโตรเจนต่อคอมดลูก (cervix) จะขับน้ำเมือกใส ซึ่งหากนำมาป้ายลงบนแผ่นสไลด์แล้วปล่อยให้แห้ง จะเกิดการสร้างผลึกของโซเดียมคลอไรด์ เรียงตัวกันมีลักษณะคล้ายใบเฟิร์น เรียกว่า ferning จึงสามารถนำมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยการหลังเอสโตรเจนภายในร่างกายได้

ช่องคลอด (vagina) เอสโตรเจนทำให้เยื่อบุช่องคลอดหนาตัวขึ้นเกิด cornification ของเซลล์บุผิวชั้นนอก มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ชั้นล่างสุด รวมทั้งมีการเจริญเติบโตและเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในชั้นกลางและชั้นนอกสุดของเยื่อบุ นอกจากนี้ยังมีการสะสมของไกลโคเจน (glycogen) ในชั้นกลางและชั้นนอกสุดของเยื่อบุ ซึ่งมีความสำคัญต่อการรักษาระดับ pH ของการขับถ่ายสารในช่องคลอดให้มีค่า pH อยู่ที่ 4-5 ซึ่งค่าความเป็นกรดที่เกิดขึ้นเชื่อว่าสามารถป้องกันการติดเชื้อภายในช่องคลอดได้

อวัยวะเพศภายนอก (external genitalia) ในขณะที่เข้าสู่วัยสาว เอสโตรเจนจะกระตุ้นการเติบโตของ labia และ clitoris รวมทั้งกระตุ้นการเจริญและการทำหน้าที่ของ bartholin's gland

ต่อมน้ำนม (mammary gland) เอสโตรเจนกระตุ้นการเติบโตและการพัฒนาต่อมน้ำนม ในขณะที่ร่างกายกำลังเจริญเติบโตเต็มที่ รวมทั้งการเจริญและสะสมเม็ดสี (pigmentation) ของหัวนม (nipple) และลานหัวนม (areolar)

ผลต่อต่อมใต้สมอง ในวัฏจักรทางเพศ (sexual cycle) ในผู้หญิง follicle-stimulating hormone (FSH) มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ พร้อมทั้งกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลสังเคราะห์และหลั่งเอสโตรเจน ความเข้มข้นของเอสโตรเจนในเลือดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามการเจริญของฟอลลิเคิล การเพิ่มขึ้นของเอสโตรเจนทำให้การคัดหลั่ง gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ลดลง ทำให้การหลั่ง FSH ลดลง ภายใต้อิทธิพลของ FSH graffian follicle อาจคัดหลั่ง inhibin ซึ่งจะเกิดผลป้อนกลับไปที่ต่อมใต้สมอง ทำให้การหลั่ง FSH ลดลง เอสโตรเจนมีความสามารถในการกวดการคัดหลั่ง FSH แต่จะให้ผล biphasic effects ต่อ luteinizing hormone (LH) โดยการเพิ่มระดับของ LH ในช่วงกลางของรอบการมีประจำเดือน ซึ่งอาจเกิดจากการที่เอสโตรเจนไปกระตุ้นให้มีการหลั่ง GnRH และอาจชักนำให้ต่อมใต้สมองมีสภาพ sensitivity ต่อ GnRH มากขึ้น แต่หากได้รับเอสโตรเจนในขนาดที่สูงจะยับยั้งการหลั่ง GnRH และ LH ทำให้สามารถยับยั้งการตกไข่ได้ (กิจจา, 2533)

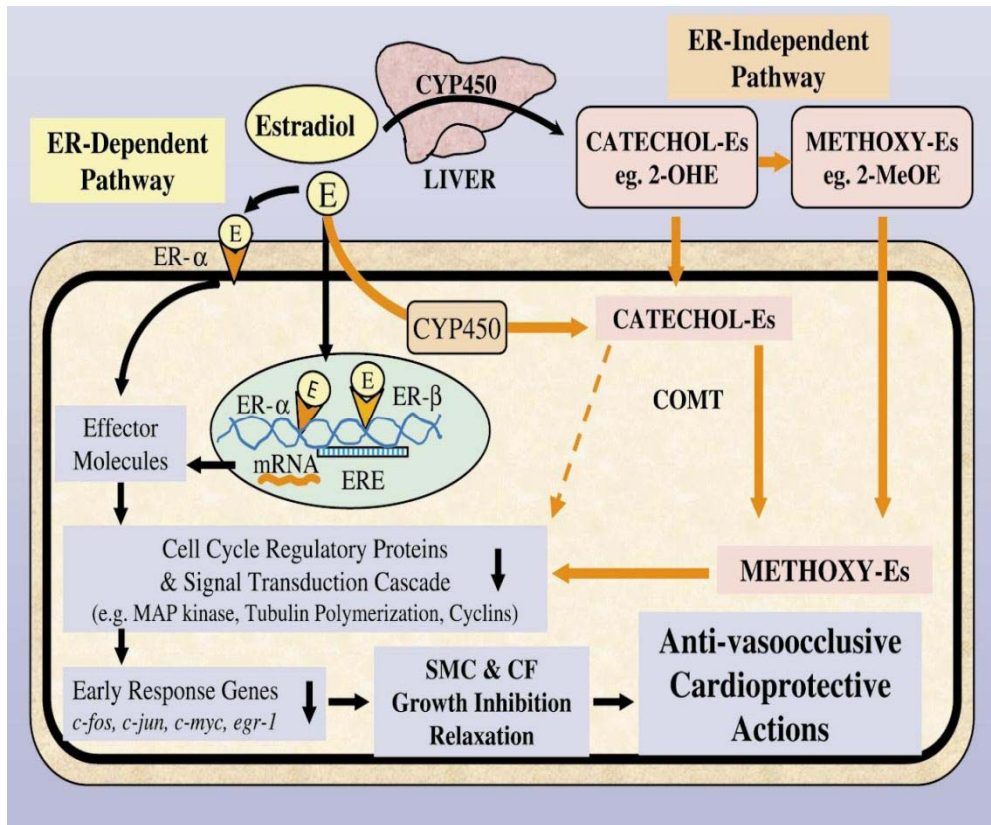
ผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม การได้รับเอสโตรเจนทำให้เกิดการคงไว้ของน้ำเกลือ ไนโตรเจน และธาตุอื่น ๆ ที่มีความสำคัญต่อการสร้าง protoplasm แต่การคงไว้ของเกลือและน้ำให้เกิดการบวมน้ำ (edema) แต่สามารถทำให้ทุเลาลงได้ด้วยการใช้ยาขับปัสสาวะ (diuretics) ส่วนผลต่อเมแทบอลิซึมของกลูโคส พบว่าไม่มีผลต่อระดับกลูโคสในพลาสมาของคนที่ยอดอาหาร (fasting plasma) แต่จะมีผลต่อการทดสอบ glucose tolerance test ในช่วงเวลาที่มีการได้รับเอสโตรเจนอาจทำให้ระดับไขมันในเลือดเปลี่ยนแปลงเนื่องจากทำให้ความเข้มข้นของ triglyceride ในเลือดเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของ cholesterol ลดลง นอกจากนี้ยังทำให้ low-density lipoprotein (LDL) ลดลง และทำให้ high-density lipoprotein (HDL) เพิ่มขึ้น LDL เป็นแหล่งของ cholesterol ที่เซลล์มีตัวรับของ lipoprotein นี้อยู่จึงสามารถนำเอา cholesterol จาก lipoprotein ตัวนี้ไปใช้ได้ ส่วน HDL เป็น lipoprotein ที่ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลของ cholesterol ของเซลล์ โดยที่ตัวมันสามารถดึงเอา cholesterol ที่มีอยู่มากออกจากเซลล์ และการเพิ่มขึ้นของ LDL สัมพันธ์กับการเกิดโรคของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจ (coronary artery disease) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิดโรค atherosclerosis ซึ่งมีสาเหตุจากการที่มี cholesterol ไปสะสมอยู่บนผนังของหลอดเลือดแดง ดังนั้น การที่เอสโตรเจนทำให้ระดับของ HDL เพิ่มขึ้นจะสามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจลงได้ และอาจมีส่วนร่วมในการลดอุบัติการณ์ของการเกิดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial infarction) ในผู้หญิงวัยก่อนหมดประจำเดือน

ผลต่อการเกิดโรคมะเร็ง (carcinogenic actions) จากการทดลองใช้เอสโตรเจนในสัตว์ทดลองสามารถชักนำให้เกิดเนื้องอกของเต้านม มดลูก อัณฑะ กระดุก ไต และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในสัตว์ทดลองได้หลายสปีชีส์ การได้รับเอสโตรเจนในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือนจะมี

ส่วนร่วมกับการเจริญของมะเร็งในเยื่อบุโพรงมดลูก (endometrial carcinoma) โดยที่การได้รับ เอสโตรเจนจะไปเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งชนิดนี้ประมาณ 5-15 เท่า และการเกิดมะเร็ง ชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับขนาดยา และระยะเวลาในการได้รับเอสโตรเจน แต่ความเสี่ยงจะหยุด ลงจนเป็นปกติหลังจากหยุดใช้เอสโตรเจนแล้วเป็นเวลาหลายปี อย่างไรก็ตามจากการศึกษาทาง ระบาดวิทยาพบว่า อุบัติการณ์ของการเกิดมะเร็งที่เยื่อบุมดลูกจะลดลงเมื่อมีการให้เอสโตรเจน แบบวัฏจักร หรือเมื่อมีการได้รับโปรเจสทินส์ร่วมด้วย

การดูดซึม การเปลี่ยนแปลง และการขับถ่าย เอสโตรเจนสามารถถูกดูดซึมได้ดี ทางผิวหนัง เยื่อเมือกและทางเดินอาหาร กระบวนการที่ทำให้เอสโตรเจนหมดฤทธิ์ส่วนใหญ่ เกิดขึ้นที่ตับ และบางส่วนที่ผ่านตับจะถูกขับออกทางน้ำดี และถูกดูดซึมน้ำที่ลำไส้ ตับและ เนื้อเยื่ออื่น ๆ จะทำให้ estradiol ถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น estron และขั้นตอนสุดท้ายเป็น estriol รวมทั้งพวก 2-hydroxyestron และ 2-hydroxyestradiol และเมแทบอลิท์อื่น ๆ ซึ่งมีฤทธิ์ของ เอสโตรเจนอย่างอ่อน ๆ หรือไม่มีฤทธิ์ของเอสโตรเจนเลย เอสโตรเจนบางส่วนอาจจะอยู่ร่วม (conjugate) กับกรดซัลฟูริก และกรดกลูคูโรนิก แล้วขับออกทางปัสสาวะ (กิจจา, 2533)

กลไกและการทำงานของเอสโตรเจนภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยเอสโตรเจน จับกับ membrane-bound estrogen receptor dimer มีผลกระตุ้น G-protein ชนิด $G_{s\alpha}$ และ $G_{q\alpha}$ ทำให้เกิดการกระตุ้น extracellular signal-regulate kinase (ERK), cAMP และ phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway (Razandi *et al.*, 2004) signaling ของ estrogen ต่อ ERK และ phosphatidylinositol 2-kinase กระตุ้นการสร้าง nitric oxide (NO) มีผล ทำให้หลอดเลือดขยายตัว (Guo *et al.*, 2005) ฮอโมน เอสโตรเจน จึงทำหน้าที่เป็น cardioprotective โดยผลดังกล่าวนี้ เอสโตรเจน จะออกฤทธิ์ได้ทั้ง 2 pathway ได้แก่ ER-dependent pathway และ ER-independent pathway โดย เอสโตรเจน จับกับ receptor ได้แก่ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ มีผลทำให้กระตุ้น estrogen response element (ERE) และ mRNA สำหรับการสังเคราะห์โมเลกุลเฉพาะที่เกิดจากผลการกระตุ้น เอสโตรเจนจะกระตุ้นกลไกของ signal transduction ส่งผลให้เกิด anti-mitogenic ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (SMC) และ cardiac fibroblast (CF) ทำให้เกิดการป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของระบบหัวใจและหลอดเลือด อีก pathway จะเป็นกระบวนการเมตาบอลิซึมของ estradiol โดยเอ็นไซม์ cytochrome P-450 (CYP450) ให้เป็น 2 และ 4-hydroxyestradiol และเปลี่ยนเป็น 2 และ 4-methoxyestradiol โดย เอ็นไซม์ catechol-O methyltransferase (COMT) ซึ่งจะมีผลกระตุ้นกระบวนการ antimitogenic effect โดยทำปฏิกิริยากับ signal transduction pathway โดยทาง ER-independent ผลของ ER-independent นั้นอาจถูกชักนำโดยการ metabolism estradiol ที่อยู่ในกระแสเลือดด้วย



รูปที่ 1-3 แสดงกลไกการทำงานของ estrogen receptor (ER-dependent และ ER-independent) โดยมี estradiol (E) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดกลไกทางชีวภาพส่งผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด การเข้าจับของ E ต่อ ER α และ ER β กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ mRNA และสร้าง specific effector molecules ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการ transduction ชักนำให้เกิด anti-mitogenic ต่อ smooth muscle cells (MSC) และ cardiac fibroblast (CF) ตลอดจนป้องกันการเกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด

2.1.2 Progesterin

Primary progesterin sex hormone คือ โปรเจสเทอโรน ซึ่งสร้างจากสารตั้งต้นที่ชื่อ pregnelone (รูปที่ 1-1) โปรเจสเทอโรน จับกับ receptor 2 ชนิด ได้แก่ progesterone receptor type A (PR-A) และ progesterone receptor type B (PR-B) (Hirata *et al.*, 2003) บทบาทของโปรเจสเทอโรน ต่อหัวใจนั้นมีน้อยกว่าเอสโตรเจน แต่ก็สามารถพบการแสดงออกของ PRs ที่เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ cardiac fibroblast (Goldstein *et al.*, 2004; Grohe *et al.*, 1997) โปรเจสเทอโรน ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ fibroblast และเหนี่ยวนำ TGF- β และ fibronectin ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนรูปของหัวใจ (cardiac remodeling) (Mercier *et al.*, 2002) โปรเจสเทอโรนมีบทบาทในการตอบสนองของกล้ามเนื้อหัวใจต่อภาวะกดดัน (stress)

โดยเพิ่มการแสดงออกในโปรตีน HSF-1 ซึ่งเป็นสมาชิกของ heat shock factor ของ transcription factor ซึ่งมีผลในการลดการทำลายเซลล์กล้ามเนื้อ

2.1.3 Androgen

Primary androgen ทั้งในเพศหญิงและเพศชายคือ testosterone, dihydrotestosterone และ weak androgen androstenedione ซึ่ง androgen สังเคราะห์จากอัตรหะในเพศชาย รังไข่ ในเพศหญิง และต่อมหมวกไตในปริมาณเล็กน้อยทั้งในเพศชายและเพศหญิง ฮอโมน testosterone สร้างมาจาก metabolism ของ cholesterol pathway โดยผ่าน androstenedione (รูปที่ 1-1) dihydrotestosterone สร้างโดยการกระตุ้น 5α reductase บน testosterone โดย testosterone สามารถจะเปลี่ยนเป็น estrogen โดยเอ็นไซม์ aromatase (Czubryt *et al.*, 2006) androgen มีความสำคัญในการควบคุมการทำงานของหัวใจและ hypertrophic response การตัดอัตรหะในหนูตัวผู้ที่มีผลทำให้น้ำหนักหัวใจลดลง และการทำงานของหัวใจบกพร่อง รวมทั้งลด cardiac output และ ejection fraction (Schaible *et al.*, 1984) ในทางตรงกันข้ามการตัดรังไข่ (ovariectomy) ในหนูเพศเมีย มีผลทำให้น้ำหนักหัวใจเพิ่มขึ้น และมีผลลดการทำงานของหัวใจ การตัดอัตรหะ (castration) มีผลลดการสร้าง testosterone ในหนู mice เพศผู้ที่มีผลทำให้มีการลดการแสดงออกของ L-type calcium channel, sodium-calcium exchanges และ β 1-adrenergic receptor ซึ่งมีผลต่อการหดและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจแต่ละเซลล์ (Golden *et al.*, 2002; Golden *et al.*, 2003) การให้ฮอโมน testosterone ทดแทนทำให้ปริมาณ channel ดังกล่าวข้างต้นลดลง นอกจากนี้พบว่า testosterone มีบทบาทสำคัญในการควบคุม calcium handling protein (Czubryt *et al.*, 2006) testosterone อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของหัวใจ โดยพบว่าในหนูถีบจักร กลุ่มที่มีภาวะ ischemia-reperfusion การตัดอัตรหะในหนูเพศผู้ พบว่าทำให้การทำงานของหัวใจบีบตัวดีกว่ากลุ่มควบคุม แต่ในหนูตัวเมียพบว่าผลการให้ testosterone ต่อการทำงานของหัวใจนั้นไม่ดีเท่ากับในตัวผู้ (Cavasin *et al.*, 2003)

Receptor

Receptor ของฮอโมนเพศดังกล่าวได้แก่ estrogen receptor α และ estrogen receptor β ($ER\alpha$ และ $ER\beta$) progesterone receptor A และ B (PR-A และ PR-B) และ androgen receptor (AR) ซึ่งทั้ง 3 ชนิดพบในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiomyocyte) กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ของหลอดเลือด และ เยื่อบุผิว (Goldstein *et al.*, 2004; Grohe *et al.*, 1997; Marsh *et al.*, 1998) จากการศึกษากอง Grohe และคณะ (1997) พบว่าการแสดงออกของ $ER\alpha$ และการทำงานของ $ER\alpha$ ในกล้ามเนื้อหัวใจเพศหญิงสูงกว่าในกล้ามเนื้อหัวใจของเพศชาย แสดงให้เห็นว่าในเพศหญิงมีความหนาแน่นของ $ER\alpha$ มากกว่า ในขณะที่ PR-A มีปริมาณใกล้เคียงกันทั้งในกล้ามเนื้อของเพศหญิงและเพศชาย ในกล้ามเนื้อหัวใจวัยหนุ่มสาว มีปริมาณ AR เท่ากันทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (Czubryt *et al.*, 2006) นอกจากนี้ยังพบเอ็นไซม์ใน

การสังเคราะห์ estrogen จาก dehydroepian drosterone-sulfate ที่หัวใจ (Martel *et al.*, 1994) และยังพบเอ็นไซม์ aromatase ในหัวใจด้วยเช่นกัน (Harada *et al.*, 1999) แต่เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ง่าเน้นเฉพาะฮอร์โมน estrogen จึงขอกล่าวเฉพาะ estrogen receptor เท่านั้น

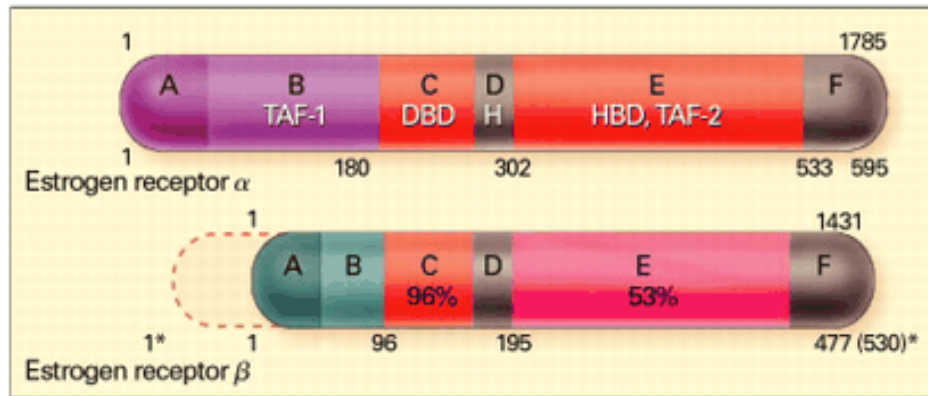
Molecular mechanism และ โครงสร้างของ estrogen receptor

เอสโตรเจนชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน และการเปลี่ยนแปลงทาง phenotype ของเซลล์โดยเอสโตรเจนเมื่อแพร่ผ่านเข้ามาในเซลล์และเข้าจับกับ ER ในนิวเคลียส และชักนำให้เกิดการเข้าคู่กัน (dimerization) ของ ER หลังจากนั้นจึงเข้าเกาะที่ promoter บริเวณ DNA ของ target gene ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อหรือยับยั้งการแสดงออกของยีน (กลไกนี้เป็น classical mechanism) โดยโครงสร้างทั้งสองชนิดของ ER จัดอยู่ในกลุ่ม super family ของ nuclear hormone receptors ทำหน้าที่เป็น transcription factors เมื่อมีการจับกับ respective ligands ประกอบด้วย functional domain ซึ่งมีตำแหน่งจาก A ถึง F สำหรับโครงสร้างของ ER α ประกอบด้วยกรดอะมิโน 595 ตัว มีบริเวณ central DNA-binding domain (DBD) ตามด้วย carboxy-terminal hormone-binding domain (HBD) (Kuiper *et al.*, 1996; Mosselman *et al.*, 1996) และในโครงสร้างของ ER β มีลักษณะสั้นกว่า ER α ประกอบด้วยกรดอะมิโน 530 ตัว (Ogawa *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังประกอบด้วยบริเวณ A, B, D และ E domain ซึ่งบริเวณเหล่านี้เป็นบริเวณที่สามารถเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ (less conservation) (รูปที่ 1-2) เมื่อดูเปอร์เซ็นต์ของความเหมือนระหว่าง ER α และ ER β พบว่ามีความเหมือนกันในบริเวณ DBD และบริเวณ HBD อยู่ที่ 96 และ 53 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงเชื่อว่าทำให้มีการตอบสนองต่อเอสโตรเจนที่ต่างกัน นั่นคือ ER β จะตอบสนองต่อสารพวกเอสโตรเจนจากพืช (phytoestrogen) ได้ดี (Barkhem *et al.*, 1998; Kuiper *et al.*, 1998)

ER เป็นตัวกลางที่ทำให้เกิดการถอดรหัสของยีน (gene transcription) โดยการกระตุ้นผ่านบริเวณของ transactivation domain ที่อยู่ใน amino-terminal A/B (เรียกว่า AF-1) และ carboxy-terminal E region ของ ER (เรียกว่า AF-2) (Kumar *et al.*, 1986; Kumar *et al.*, 1987; Tora *et al.*, 1986) โดยหน้าที่ของ AF-1 domain เป็น hormone-independent ในขณะที่ AF-2 domain เป็น hormone-dependent (Webster *et al.*, 1986) การทำงานของ AF-1 ใน ER β ทำงานด้อยกว่า AF-1 ใน ER α ในขณะที่ AF-2 ของทั้งคู่มีการทำงานที่ไม่แตกต่างกัน (Kumar *et al.*, 1986) เมื่อเปรียบเทียบการทำงาน พบว่า ER α ทำงานมากกว่า ER β

นอกจาก classical mechanism ของ ER แล้วนั้น ยังพบว่า ER ทั้ง 2 ชนิดสามารถทำงานได้โดยชักนำ pathway อื่น ๆ ได้เช่นกัน ได้แก่ AP-1 response elements โดยการชักนำแบบ indirectly ผ่านการทำงานระหว่าง ER และ AP-1 โดย transcription factor ได้แก่ c-fos และ c-jun (Webb *et al.*, 1995) ซึ่งเป็น transcription factors เกี่ยวข้องกับหลาย

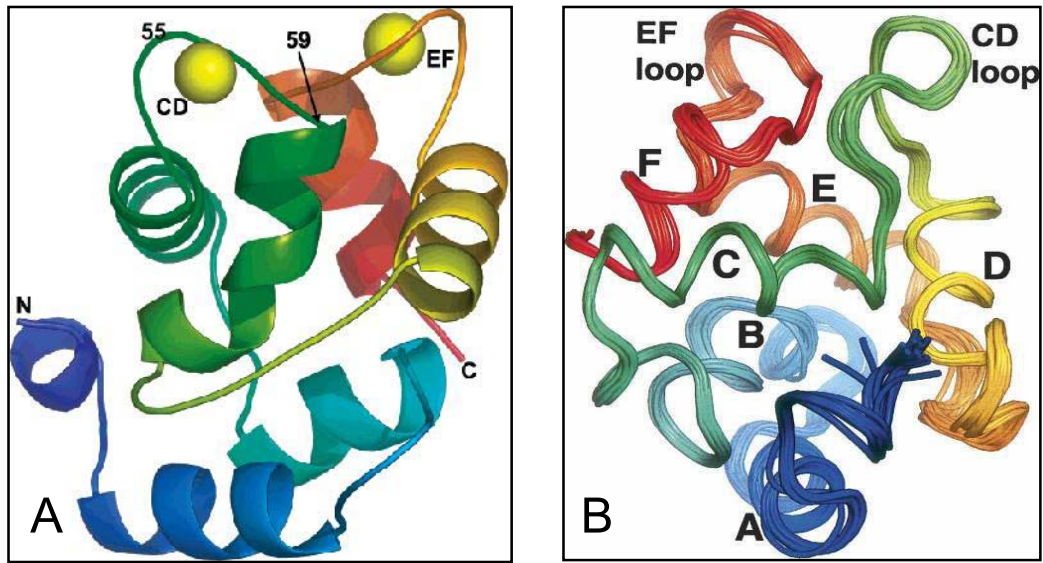
กระบวนการของ cellular processes เช่น ชักนำให้เกิดการเพิ่มจำนวน (proliferation) การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiation) การเคลื่อนที่ของเซลล์ (cell motility) และการตายของเซลล์ตามธรรมชาติ (apoptosis)



รูปที่ 1-2 โครงสร้าง และ function domains ของ ER α และ ER β โดย estrogen receptors บริเวณส่วนปลายจาก A-B เป็น amino-terminal อันประกอบด้วย ligand-independent transcriptional-activation function (TAF-1) บริเวณ C เป็นตำแหน่งของ DNA-binding domain (DBD) ซึ่งภายในประกอบด้วย 2 zinc fingers ซึ่งเป็น highly conserved ใน steroid hormone receptor บริเวณ domain D เป็น hinge region (H) ของ receptor และ domain E เป็น hormone-binding domain (HBD) และ hormone-dependent transcriptional-activation fraction (TAF-2) domain F เป็นตำแหน่ง variable region (Mendelsohn and Karas, 2008)

2.2 Parvalbumin

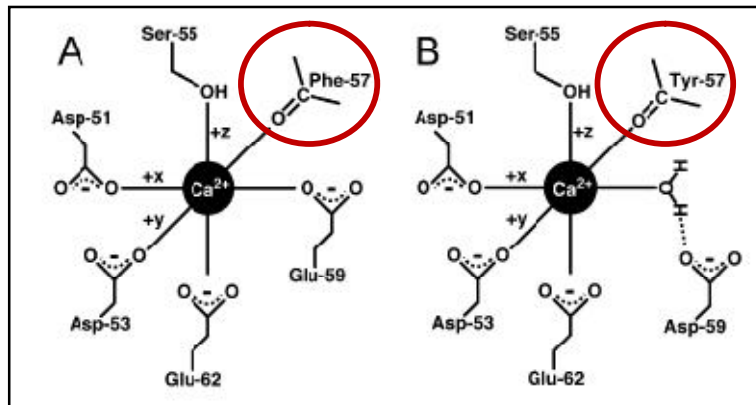
Parvalbumin (PV) เป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียม และแมกนีเซียม แต่มีคุณสมบัติจับกับแคลเซียมได้ดีกว่าแมกนีเซียม (Kretsinger, 1980) มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ 11-12 kDa โดยมีสูตรโครงสร้างจัดอยู่ในกลุ่มอีเอฟแฮนด์ (EF-hand) เชื่อมต่อกันขดเป็นวงกันหอย (helix loop helix) (Kretsinger, 1975; Kretsinger and Nelson, 1976) โดยมีการเรียงตัวของกรด อะมิโนที่สามารถจับได้กับแคลเซียมเป็นสองรูปแบบ คือแบบแอลฟา (α type) และแบบเบต้า (β type) (Nakayama *et al.*, 1992) ดังรูปที่ 1-4 และรูปที่ 1-5



รูปที่ 1-4 แสดง ribbon diagram ของ parvalbumin ชนิด α (A) ในหนูขาวใหญ่ (Lee *et al.*, 2004) และชนิด β (B) ในหนูขาวใหญ่ (DeLano, 2002).

รูป A (CD = parvalbumin metal ion-binding site flanked by the C and D helices, EF = parvalbumin metal ion-binding site flanked by the E and F helices, C = C terminal helix length และ N = N terminal)

รูป B (CD loop = parvalbumin metal ion-binding site flanked by the C and D helices, EF loop = parvalbumin metal ion-binding site flanked by the E and F helices, A, B และ F เป็นสาย apo-protein ที่เป็นองค์ประกอบหลัก และไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง สำหรับ C, D และ E เป็นสาย apo-protein ที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้)



รูปที่ 1-5 แสดง Schematic diagram ที่แตกต่างกันระหว่าง α -parvalbumin (A) และ β -parvalbumin (วงกลมสีแดง) บริเวณ CD site ในหนู (Lee *et al.*, 2004)

PV พบมากในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเนื้อที่มีการหดและคลายตัวเร็ว เช่นกระบังลมและลิ้น (Berchtold *et al.*, 1984; Heizmann *et al.*, 1982; Inguma *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังพบในเนื้อเยื่ออื่น ๆ เช่นต่อมไทรอยด์ (Endo *et al.*, 1985) เนื้อเยื่อในระบบประสาทส่วนกลาง ส่วนในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจพบ PV ในปริมาณที่น้อย (Inguma *et al.*, 1991) โปรตีน PV มีหน้าที่ช่วยในการหดและคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อลาย (Jiang and Narayonon, 1990) และควบคุมสมดุลแคลเซียม (calcium buffering) ในเซลล์ประสาท (Pauls, 1996)

กลไกการทำงานของ PV ในกล้ามเนื้อลายเริ่มจากในระยะพักความเข้มข้นของแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ภายใน cytoplasm ของกล้ามเนื้อลายจะอยู่ระหว่าง 10-100 nM ในขณะที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) จะเท่ากับ 1 mM ในระยะนี้ PV จะจับอยู่กับ Mg^{2+} เมื่อกล้ามเนื้อถูกกระตุ้น sarcoplasmic reticulum จะปล่อย Ca^{2+} ions ออกมาทำให้ Ca^{2+} ions มีปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 100 mM ทำให้ PV ปล่อย Mg^{2+} และหันมาจับกับ Ca^{2+} แทน แต่เนื่องจากการปล่อย Mg^{2+} เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลา จึงส่งผลให้ Ca^{2+} ที่หลังจาก SR ไปจับกับ troponin C จึงเกิดการหดตัวของกล้ามเนื้อขึ้น และหลังจาก PV ปล่อย Mg^{2+} ออก PV ก็จับกับ Ca^{2+} แทนโดยการดึง Ca^{2+} ออกมาจาก troponin C และมีผลทำให้กล้ามเนื้อเกิดการคลายตัว หลังจากนั้น Ca^{2+} จะถูกส่งกลับเข้าสู่ SR อีกครั้ง สำหรับกระบวนการดึง Ca^{2+} ส่งกลับเข้า SR นั้นเป็นกระบวนการที่ต้องอาศัยพลังงาน (ATP) ในการขนส่ง จากข้อมูลข้างต้นนำมาสู่แนวความคิดที่จะใช้ PV ในการรักษาผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิก ซึ่งจากการศึกษาในกล้ามเนื้อหัวใจ Morgan (1991) ได้พบว่าผู้ป่วยโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกมีการคลายตัวของหัวใจช้าเนื่องจากมีความบกพร่องในการดึง Ca^{2+} กลับเข้าสู่ SR จึงได้มีการศึกษาเทคนิคการถ่ายถอดยีน PV จากกล้ามเนื้อลายชนิด fast-twitch เข้าไปในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และพบว่าสามารถกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหดตัวได้มากขึ้น และส่งผลกระตุ้นอัตราการคลายตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มขึ้น (Wahr *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยัง

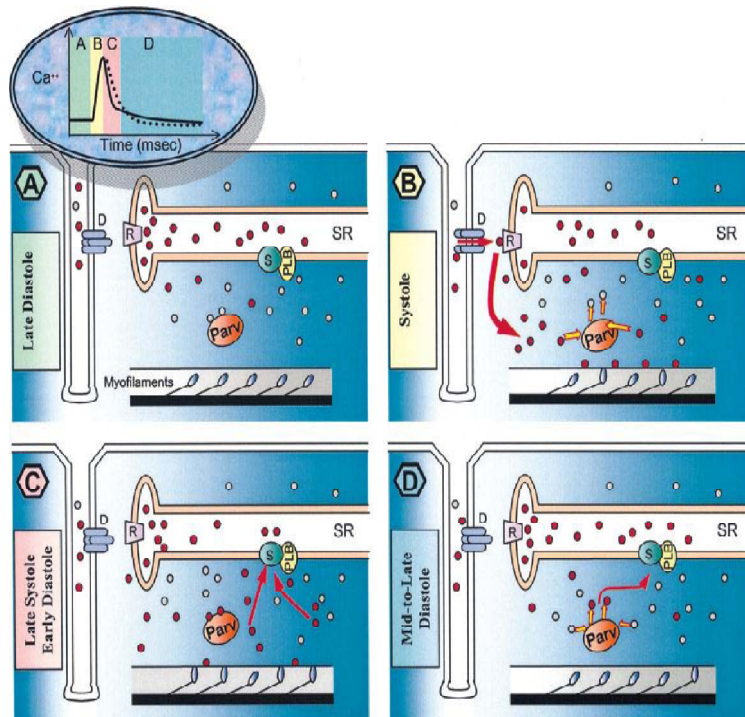
พบว่าการกระตุ้นการสร้าง PV ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในหนูที่มีอายุมากมีผลทำให้การทำงานของหัวใจในระยะไดแอสโตลิกดีขึ้น (Schmidt *et al.*, 2005) จึงทำให้เชื่อว่า PV น่าจะทำหน้าที่เป็นปัจจัยในการคลายตัวของหัวใจเช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อลาย โดย Coutu และคณะ (2003) ได้มีแนวคิดในการอธิบายกลไกการทำงานของ PV ในการช่วยให้เกิดการคลายตัวภายในกล้ามเนื้อหัวใจไว้ดังนี้

ระยะที่ 1 เป็นระยะท้ายในการคลายตัวของหัวใจ (late diastolic) ในระยะนี้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในไซโทพลาสซึม ของเซลล์อยู่ในระดับที่ต่ำ (~10-100 nM) ในระยะนี้ความเข้มข้นของ Mg^{2+} (~1mM) ในระยะนี้ PV จะจับกับ Mg^{2+}

ระยะที่ 2 เป็นระยะที่หัวใจบีบตัว (systole) ระยะนี้ความเข้มข้นของ Ca^{2+} เพิ่มขึ้นโดย Ca^{2+} เข้ามาภายในเซลล์โดยผ่านทาง Ca^{2+} channel และจากการกระตุ้นให้ SR หลั่ง Ca^{2+} ออกมา การเพิ่มขึ้นของ Ca^{2+} มีผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้ PV ปลดปล่อย Mg^{2+} ออกมาเพื่อจับกับ Ca^{2+} แต่เนื่องจากการปล่อย Mg^{2+} ออกนั้นเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลานาน จึงทำให้ระยะนี้ Ca^{2+} ไปจับกับ troponin C และทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

ระยะที่ 3 เป็นระยะท้ายของการบีบตัวของหัวใจ (late systolic and early diastole) เป็นระยะที่ PV จับกับ Ca^{2+} ซึ่งส่งผลให้ Ca^{2+} ถูกดึงออกจาก troponin C และทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ

ระยะที่ 4 เป็นระยะกลางจนถึงระยะท้ายของการคลายตัวของหัวใจ (mid-to-diastole) ซึ่งเป็นระยะ PV ที่ปล่อยจากการจับ Ca^{2+} กลับไปจับกับ Mg^{2+} อีกครั้ง

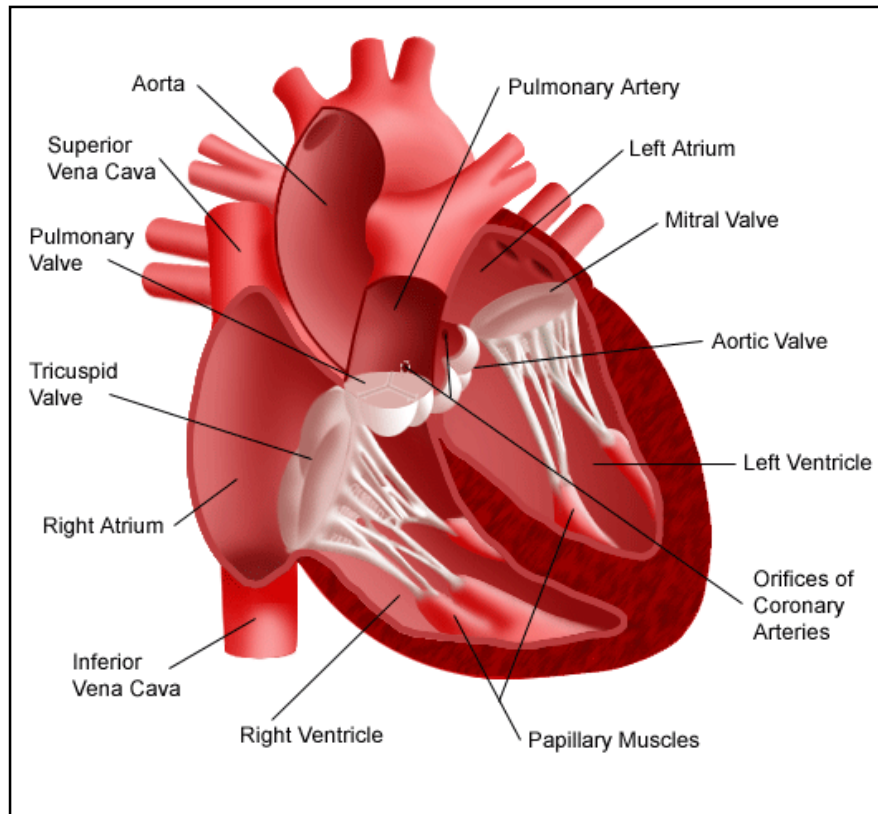


รูปที่ 1-6 กลไกการทำงานของ PV ในการช่วยในการคลายตัวของหัวใจ รูป A แสดงการทำงาน
 ของ PV ในระยะ late diastole รูป B แสดงการทำงานของ PV ในระยะ
 systole รูป C แสดงการทำงานของ PV ในระยะ late systole กับ early diastole และ
 D แสดงการทำงานของ PV ในระยะ mid-to-late diastole สัญลักษณ์ ในรูปมี
 ความหมายดังนี้ วงกลมสีขาวหมายถึง แมกนีเซียมไอออน วงกลมสีแดงหมายถึง
 แคลเซียมไอออน SR หมายถึง sarcoplasmic reticulum, R หมายถึง ryanodine
 receptor, S หมายถึง Ca^{2+} andrenosine triphosphate, PLB หมายถึง
 phospholamban

2.3 ลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ในหัวใจของคน

หัวใจของคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งหนูขาวแบ่งเป็น 4 ห้อง ผนังหัวใจ
 ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ (myocyte) หัวใจห้องล่าง (ventricle) ทั้งซ้ายและขวา ทำ
 หน้าที่ในการสูบฉีดโลหิต ส่วนหัวใจห้องบน (ventricle) ทั้งซ้าย และขวาทำหน้าที่รับเลือดเพื่อ
 ส่งมายังห้องล่าง ลักษณะของ atrium และ ventricle โดย atrium ทั้งสองข้างเป็นหัวใจที่มีผนัง
 บาง ทำหน้าที่เป็นทางผ่านของเลือดเข้าสู่ ventricle ในขณะที่ ventricle คลายตัว รวมถึงช่วย
 เพิ่มความแรงในการบีบตัวของ ventricle โดยเมื่อ atrium หดตัวบีบเลือดเข้าสู่ ventricle ในช่วง
 ปลายของระยะคลายตัวของ ventricle (จึงเรียกว่าเป็น booster pump) atrium ขวารับเลือดดำ
 (deoxygenated venous blood) จากหลอดเลือดดำใหญ่คือ inferior และ superior vena cava
 รวมทั้งเลือดดำที่มาจากหัวใจซึ่งผ่านมาทาง coronary sinus ด้วย ส่วน atrium ซ้ายรับเลือดแดง

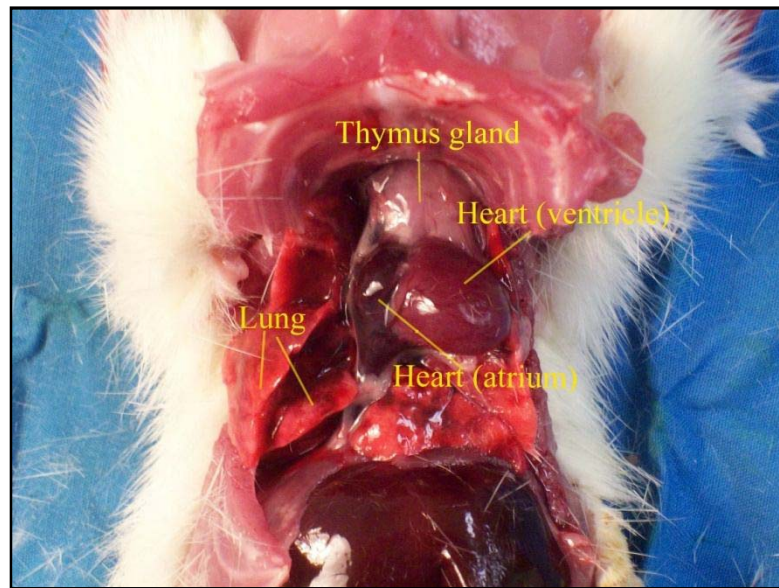
(oxygenated blood) จาก pulmonary sinus ventricle ทั้งสองมีหน้าที่สำคัญในการสูบฉีดเลือด จากหัวใจ ventricle ขวา สูบฉีดเลือดเข้าสู่ระบบ pulmonary circulation ซึ่งมีความดันต่ำ ดังนั้นจึงมีผนังบาง ในขณะที่ ventricle ซ้ายหนากว่า ventricle ขวา โดยที่ปริมาตรภายใน ventricle ทั้งสองเท่ากัน (อติสา, 2545) (ดังรูปที่ 1-7)



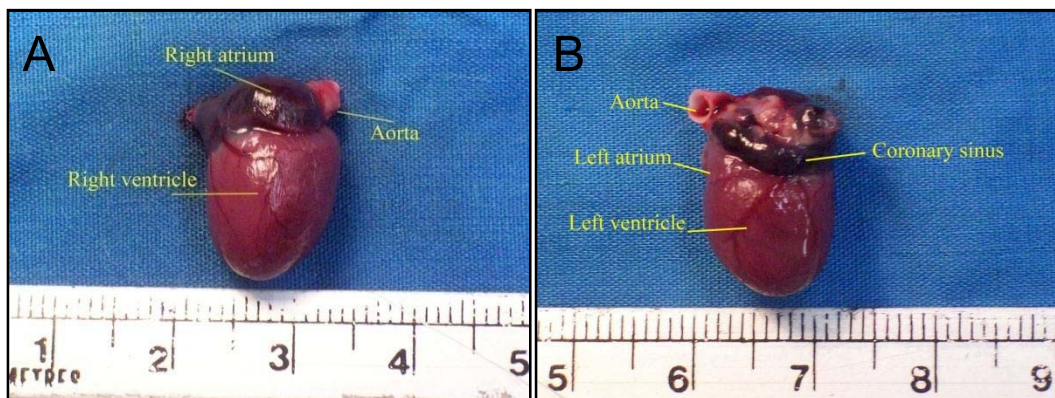
รูปที่ 1-7 แสดงส่วนต่าง ๆ ของหัวใจ (Spectrum Health, 2008)

2.4 ลักษณะโครงสร้างทางกายวิภาคศาสตร์ในหัวใจของหนู

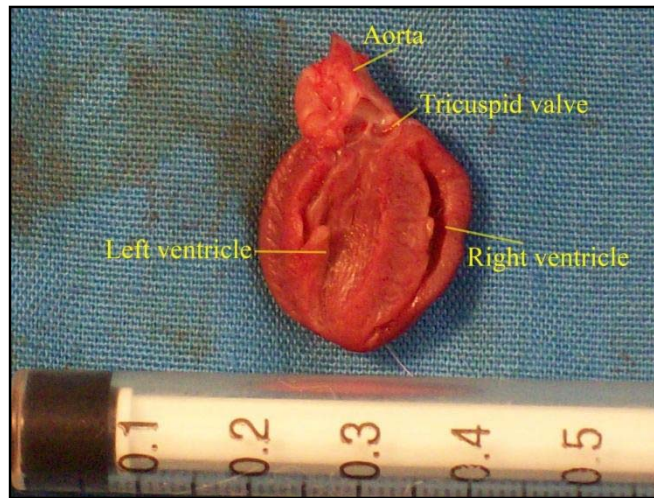
ตำแหน่งหัวใจของหนูตั้งอยู่ในทรวงอกกลางต่อต่อมไทมัส อยู่กลางต่อปอดซ้ายและปอดขวา (รูป 1-8) หนูขามีหัวใจ 4 ห้องเช่นเดียวกับมนุษย์ (รูปที่ 1-9) แบ่งเป็นห้องบนและห้องล่างทั้งซ้ายและขวา อย่างละ 2 ห้อง โดยหัวใจห้องบนทั้งซ้ายและขวาทำหน้าที่รับเลือด หัวใจห้องล่างทำหน้าที่สูบฉีดโลหิต ความหนาของหัวใจพบว่า ventricle ซ้ายหนากว่า ventricle ขวา (รูป 1-10)



รูปที่ 1-8 ตำแหน่งของหัวใจและอวัยวะใกล้เคียงในทรวงอกของหนูขาว



รูปที่ 1-9 แสดงหัวใจของหนูทางด้านหน้า (A) และทางด้านหลัง (B)



รูปที่ 1-10 แสดงหัวใจหนูที่ผ่าซีกเปรียบเทียบให้เห็นกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างซ้ายที่หนากว่ากล้ามเนื้อหัวใจห้องล่างขวา

กลไกการหดตัวและคุณสมบัติในการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ

Excitation-contraction coupling (E-C coupling)

E-C coupling คือกระบวนการที่เกิด depolarization ที่เยื่อหุ้มเซลล์นำไปสู่การหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ โดยเริ่มตั้งแต่เกิดการกระจายของ action potential ไปตาม sarcolemma ผ่านจากเซลล์ข้างหนึ่งไปทาง gap junction ที่ intercalated disc ในขณะที่เดียวกัน depolarization จะกระจายเข้าสู่ด้านในของเซลล์กล้ามเนื้อผ่านทาง T-tubule กระตุ้นให้เกิดการเพิ่มปริมาณ Ca^{2+} ภายใน cytoplasm มีผลให้กล้ามเนื้อหดตัวและตามด้วยการคลายตัวในเวลาต่อมา การกระจายสัญญาณไฟฟ้าจาก sarcolemma ผ่านเข้ามาภายในเซลล์ต้องอาศัย T-tubule เช่นเดียวกับในกล้ามเนื้อลาย โดย T-tubule เป็นตัวนำสัญญาณไฟฟ้าจาก sarcolemma เข้าสู่ด้านในของเซลล์ แล้วทำให้เกิด depolarization ของ SR ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ Ca^{2+} ภายในเซลล์ มีผลให้ SR หลั่ง Ca^{2+} เข้าสู่ cytoplasm ในขณะที่พักความเข้มข้นของ Ca^{2+} จะถูกเก็บรักษาในระดับต่ำ ประมาณ 10^{-8} - 10^{-7} โมลาร์ แต่ในขณะที่เซลล์กล้ามเนื้อหดตัว ระดับ Ca^{2+} ในเซลล์อาจสูงถึง 10^{-5} โมลาร์ มีกลไกหลายอันที่ช่วยรักษาระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ให้ต่ำในระหว่างที่ยังไม่มีการหดตัว ได้แก่ Na^+ - Ca^{2+} exchange mechanism ซึ่งอาศัย electrochemical gradient ของ โซเดียมไอออน (Na^+) เป็นพลังงานในการนำ Ca^{2+} หนึ่งโมเลกุลออกจากเซลล์กับการเข้าสู่เซลล์ของ Na^+ สามโมเลกุล และ Ca^{2+} ATPase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ Ca^{2+} ยังถูกเก็บเข้าสู่ SR โดยการทำงานของ Ca^{2+} ATPase ที่อยู่ที่เยื่อหุ้มของ SR ถ้าไม่มีกลไกเหล่านี้ทำงาน ในที่สุดเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะมี Ca^{2+} สะสมภายในเซลล์จำนวนมาก ซึ่งมีผลทำให้เกิดการหดตัวค้าง (contractor) และเซลล์ก็จะตายในที่สุด กลไกการหดตัวของ myofibrils เกิดจากการเพิ่มปริมาณของ Ca^{2+} จาก 10^{-7} โมลาร์ เป็น 10^{-5} โมลาร์ สำหรับกล้ามเนื้อหัวใจ การเพิ่ม

2.5 วงจรรอบประจำเดือน (menstrual cycle)

เป็นการเปลี่ยนแปลงเป็นวงจรของโครงสร้างมดลูกชั้น endometrium ในคนเกิดขึ้นเป็นรอบประมาณ 28 วัน (แต่รอบเดือนในสัตว์เรียกว่า estrous cycle) ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงชัดเจน โดยเริ่มตั้งแต่วัยสาวอายุ 12-15 ปี และดำเนินไปตลอดวัยเจริญพันธุ์จนถึงอายุประมาณ 45-50 ปี วงจรรอบเดือนเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนจากรังไข่ คือ เอสโตรเจน และ โปรเจสเทอโรน และมีการเปลี่ยนแปลงสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ในกระบวนการสร้างไข่ แบ่งเป็น 4 ระยะ โดยนับตั้งแต่วันที่แรกที่มีประจำเดือนได้แก่

1. Menstrual phase เป็นระยะที่มีการหลุดลอกของชั้น functionalis ของ endometrium นับตั้งแต่วันที่ 1-4 ของวงจร เมื่อไม่มีการปฏิสนธิเกิดขึ้น จึงไม่มีการฝังตัวของตัวอ่อนในผนังมดลูก corpus luteum จะเสื่อมไปภายใน 14 วัน ทำให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน และ โปรเจสเทอโรน ลดลงอย่างรวดเร็ว มีผลให้ spiral artery หดตัวชั่วคราว ต่อมาขยายตัวและแตกออกดันให้ชั้น functionalis หลุดออกมา และทำให้มีเลือดออกมากภายในโพรงมดลูกและออกทางช่องคลอดตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดระยะนี้ ชั้น endometrium ของมดลูกจะบางเหลือเป็นแถบบาง ๆ ของชั้น lamina propria ที่มีส่วนของ uterine gland เหลืออยู่ ประจำเดือนจึงมีทั้งเลือดแดงเลือดดำ เซลล์บุผิวมดลูก และสารที่สร้างจาก uterine gland

2. Proliferative phase นับตั้งแต่วันที่ 5-14 ของวงจร ตรงกับระยะการเจริญเติบโตของรังไข่ในรังไข่ จึงเรียกระยะนี้ว่า follicular phase ในรังไข่มีการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน ส่งผลให้ผนังมดลูกมีการเจริญขึ้นมาใหม่ทดแทน (regeneration) โดยการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนทั้งส่วนที่เป็นเยื่อบุผิว และ uterine gland ช่วงนี้ endometrial stroma เริ่มเจริญหนาขึ้น มีเลือดมาเลี้ยงมากขึ้น ต่อมาที่มีการเจริญจะสร้างสารสะสมภายในต่อม เมื่อสิ้นสุดระยะนี้ ต่อมมีลักษณะยาวตรง ช่องต่อมแคบ โดยจะสร้างสารมากขึ้นเมื่อมีการตกไข่ในช่วงท้ายของระยะนี้

3. Secretory phase เป็นช่วงหลังการตกไข่นับตั้งแต่วันที่ 15-26 ของวงจร ตรงกับการเกิด corpus luteum ในรังไข่และมีการสร้างฮอร์โมน โปรเจสเทอโรน จึงเรียกระยะนี้ว่า luteal phase ลักษณะของ endometrium ในระยะนี้จะมี endometrial stroma หนามากขึ้น ประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดโตขึ้น (hypertrophy) เรียกเซลล์เหล่านี้ว่า decidual cell ส่วน uterine gland เจริญมากขึ้นมีรูปร่างคดเคี้ยว ช่องของต่อมขยายกว้างภายในมีสารไกลโคโปรตีนที่สะสมอยู่เต็ม โดยอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน เซลล์ของต่อมมีไกลโคเจนสะสมอยู่ภายในไซโทพลาสซึม เมื่อสิ้นสุดระยะนี้ endometrium จะหนาสุด

4. Premenstrual phase นับตั้งแต่วันที่ 27-28 ของวงจรประมาณ 2 วันก่อนมีประจำเดือน เป็นระยะที่ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนลดลง ทำให้ spiral artery มีการบีบตัวเป็นระยะ ๆ endometrium จึงขาดเลือดมาเลี้ยง จึงเรียกระยะนี้ว่า ischemic phase ทำให้ผนังชั้น functionalis ตาย (necrosis) และส่วนของเส้นเลือดที่อยู่ถัดจากบริเวณที่หดตัวก็จะฉีกขาดเข้าสู่ระยะ menstrual phase ต่อไป หลังจาก menstrual phase แล้ว ในรังไข่จะมี growing follicle เกิดขึ้นใหม่พร้อมกับการสร้าง estrogen ออกมากระตุ้นให้ชั้น functionalis ของ endometrium

เจริญต่อไปเป็นระยะ proliferative phase และมีระยะต่อมาวนเวียนการเป็นวงจร แต่ถ้ามีการปฏิสนธิเกิดขึ้น corpus luteum จะคงอยู่ประมาณ 4 เดือนโดยอิทธิพลของฮอร์โมน human chorionic gonadotropin (HCG) ทำให้ระยะ secretory phase ยังคงอยู่ต่อไป เพื่อให้ตัวอ่อนฝังตัวและเจริญเติบโต พร้อมทั้งมีการสร้างรกเกิดขึ้น ทำให้ในช่วงตั้งครรภ์ไม่มีประจำเดือน (กนกธร, 2546)

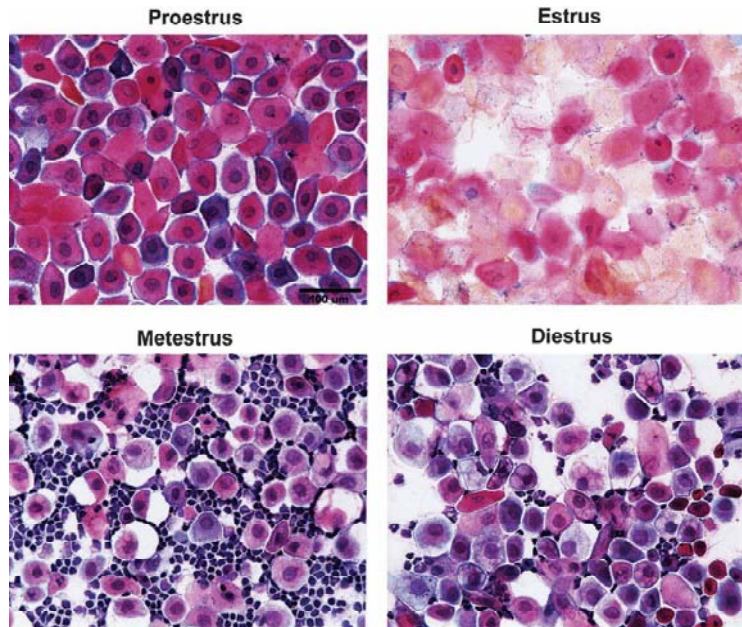
สำหรับ estrous cycle ในหนูพบว่าแต่ละรอบกินเวลา 5 วันต่อรอบ การตรวจสอบระยะของ estrous cycle สามารถทำได้โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ตรวจดูผิวเยื่อบุช่องคลอดตั้งรูป 1-12 (vaginal epithelium) (Feder, 1981; Freeman, 1994) ซึ่งเซลล์เยื่อบุนี้มีการเปลี่ยนแปลงไปตามแต่ละระยะย่อยของ estrous cycle ซึ่งมีด้วยกัน 4 ระยะย่อยดังนี้

1. Proestrus มีระยะเวลาในการเกิด 12-14 ชั่วโมง ลักษณะเด่นของระยะนี้คือการตรวจพบ round nucleated cell เป็นจำนวนมาก (Long and Evans, 1992; Freeman, 1994) เยื่อบุผิวช่องคลอดมีจำนวนชั้นอยู่ที่ 9-12 ชั้น เมื่อเข้าสู่ระยะท้ายของวงจรเซลล์เยื่อบุผิวที่เจริญเต็มที่ จะกลายเป็นชั้นของ stratum corneum (Long and Evans, 1992)

2. Estrus มีระยะเวลาในการเกิด 25-27 ชั่วโมง เซลล์ที่พบในช่วงนี้จะเป็นเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ไม่เห็นนิวเคลียส (un-nucleated cornified cell) (Long and Evans, 1992; Freeman 1994)

3. Metestrus มีระยะเวลาในการเกิด 6-8 ชั่วโมง เซลล์ที่ตรวจพบส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด leukocyte ผนังช่องคลอดในระยะนี้จะบางเนื่องจากการลดลงของปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เข้ามายังช่องคลอด (Montes and Luque, 1988) ในระยะนี้หากทำ vaginal smear จะพบว่าเมื่ออกจากเยื่อบุช่องคลอดมีสีขาวขุ่น (Long and Evans, 1992)

4. Diestrus มีระยะเวลาในการเกิด 55-57 ชั่วโมง ซึ่งกินเวลาเกือบครึ่งหนึ่งของ cycle (Freeman, 1994) จำนวนชั้นของเยื่อบุผิวมีจำนวนชั้นที่บางลงเหลือเพียง 4-7 ชั้น ตลอดเวลาของ diestrus กระบวนการ degeneration ของเยื่อบุผิวหยุดลง และเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ทำให้มีการเพิ่มจำนวนชั้นของเยื่อบุผิวอีกครั้ง (Long and Evans, 1992) เซลล์ที่พบมากในระยะนี้คือ leukocyte และ nucleated cell



รูปที่ 1-12 แสดงเซลล์ที่พบใน estrous cycle ในแต่ละระยะ (ย้อม PAP stain) (Hubscher *et al.*, 2005)

2.6 วัยหมดประจำเดือน

วัยหมดประจำเดือน หมายถึง วัยที่มีอายุอยู่ในช่วงที่ไม่สามารถมีประจำเดือนได้อีก โดยถือเอาการไม่มีประจำเดือนเป็นเวลา 6-12 เดือนเป็นตัวบ่งชี้ถึงวัยหมดประจำเดือน ซึ่งพบในหญิงที่มีอายุประมาณ 45-52 ปี ในผู้หญิงที่ถึงวัยหมดประจำเดือนตามธรรมชาติ การคัดหลั่งฮอร์โมนเอสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรน จากรังไข่จะลดลงอย่างช้า ๆ เป็นลำดับอย่างต่อเนื่องและอาจกินเวลานานหลายปีจากการมีประจำเดือนลดลงแล้ว (ตารางที่ 1-1) อาการของวัยหมดประจำเดือนจึงค่อยมีขึ้น แต่สำหรับในคนที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออกหมดทั้งสองข้างอาการของวัยหมดประจำเดือนเกิดขึ้นได้ทันที และมีความรุนแรงของอาการในวัยหมดประจำเดือนรุนแรงกว่าในหญิงที่หมดประจำเดือนตามธรรมชาติ (กิจจา, 2533) ส่งผลให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดตีบ (constrictor) ภาวะกระดูกพรุน (osteoporosis) และการเพิ่มขึ้นของความดันโลหิต (increased blood pressure) รวมทั้งเกิดการสะสมของไขมันในหลอดเลือด (atherosclerosis) (Haward *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการทางเส้นประสาทบังคับหลอดเลือด (vasomotor symptoms) ได้ประมาณ 85% โดยจะส่งผลให้เกิดอาการร้อนวูบวาบ (hot flashes) ตามหน้า คอ ตามตัว เหงื่อออกมาก (perspiration) ซึ่งเกิดมาจากการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilatation) อาการหนาวสั่น (chilliness) ซึ่งเป็นผลมาจากการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) เกิดตามหลังอาการร้อนวูบวาบ การรับความรู้สึกตามผิวหนังผิดปกติ (paresthesia) (กิจจา, 2533)

สำหรับในหนูพบว่าวัยหมดประจำเดือนพบในหนูที่มีอายุ 18 เดือนขึ้นไป (Rat health note, 2004) การศึกษาที่เกี่ยวกับสตรีวัยหมดประจำเดือน ศึกษาโดยใช้ในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (ovariectomised rat) ซึ่งเป็น animal model ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (Bosse and Paolo, 1995; McClung *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2007; Sotiriadou *et al.*, 2006) เนื่องจากให้ผลเหมือนกับการหมดประจำเดือน และยังสามารถใช้สำหรับศึกษาผลของการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนได้อีกด้วย

ตารางที่ 1-1 แสดงปริมาณฮอร์โมนเพศในกลุ่ม steroid sex hormone ในเพศหญิง และ เพศชาย (ดัดแปลงมาจาก Greenspan and Strewler, 1997)

| | Men | Women (premenopause) | Women (postmenopause) |
|---------------------|------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Estradiol (E2) | 73–184 pmol/L | 73–1285 pmol/L* | 37–110 pmol/L |
| Estrone (E1) | 37–185 pmol/L | 111–592 pmol/L* | 74–148 pmol/L |
| Estriol (E3) | <7 nmol/L | <7 nmol/L ^{†‡} | <7 nmol/L [†] |
| Progesterone | 0.3–0.9 nmol/L | 1–64 nmol/L [‡] | <4 nmol/L |
| Testosterone, total | 10.4–34.7 nmol/L | 1.04–2.43 nmol/L [†] | 1.04–2.43 nmol/L [†] |

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของโปรตีน parvalbumin
2. เพื่อศึกษาผลของการให้ฮอร์โมนทดแทนต่อการแสดงออกของโปรตีน parvalbumin

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถอธิบายสาเหตุ และพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้
2. อาจใช้เป็นแนวทางในการรักษาโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนในอนาคต

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสัต์ว์ทดลอง

- 1) Pentobarbital sodium solution for injection (Ceva santé animaie, Liboorne, France)
- 2) Betadine solution antiseptic microbicide (IDS manufacturing LTD., Pathumthani, Thailand)
- 3) Oestrogen Benzoate Injection (March Pharmaceutical CO., LTD, Bangkok, Thailand)
- 4) Absorbable surgical suture (United states surgical, Norwalk, Connecticut, USA)
- 5) 70% แอลกอฮอล์ (Siribuncha Co., LTD., Nonthaburi, Thailand)
- 6) ยาแก้ปวดพาราเซตามอลชนิดน้ำ (Continental-Pharm co., LTD., Bangkok, Thailand)
- 7) ยาฆ่าเชื้อสำหรับแช่อุปกรณ์ผ่าตัด (ปรูฟพี จำกัด, นนทบุรี, ประเทศไทย)
- 8) น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (อีโอส เต อิบาร์รา เอส เอ เมืองเซบิยา ประเทศสเปน)

1.1.2. สารเคมีทั่วไป

- 1) Ethanol (Mallinckrod Baker Sdn. Bhd. Salangor D.E., Malaysia)
- 2) Xylene (Lab-Scan, Bangkok, Thailand)
- 3) Permout (Fair Lawn, New Jersey, USA)
- 4) Formaldehyde solution (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- 5) Concentrate HCL (Riedel-de Haën AG, Seelze, Germany)

1.1.3. สารเคมีที่ใช้ย้อม PAP-stain

- 1) Hematoxylin solution according to Mayer (Fluka biochemical, Steinheim, Switzerland)
- 2) Working eosin solution (BDH, VWR international Ltd., Poole, BH 15 1ID, England)

- 3) 1% Orange G (BDH laboratory supplies, Poole, England)

1.1.4. สารเคมีที่ใช้ในการย้อม immunohistochemistry

- 1) Mouse anti-parvalbumin monoclonal antibody (Parv-19, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2) Biotinylated anti-mouse IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingham, USA)
- 3) Avidin-Biotin-peroxidase complex (Vector Laboratories, Burlingham, USA)
- 4) ACE kit (Vector Laboratories, Burlingham, USA)
- 5) 0.3% H₂O₂ in methanol (ภาคผนวก)
- 6) Normal horse serum (Vector Laboratories, Burlingham, USA)
- 7) Normal goat serum (Zymed, S. Sanfrancisco, California, USA)
- 8) 0.3% Triton X-100 in 0.1 M Tris phosphate buffer
- 9) MS X Estrogen receptor α (Chemicon Temecula, California, USA)
- 10) Mouse anti-Estrogen receptor β (Chemicon Temecula, California, USA)
- 11) Gelatin (BDH Laboratory Supplies, Poole, England)
- 12) Paraplast plus tissue embedding medium (Bio Optica Milano S.p.A, Millamo, Italy)

1.1.5 สารเคมีที่ใช้สำหรับ Western blot

สารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง

- 1) Sodium deoxycholic acid (3 α , 12 α -Dihydroxy-5 β -cholan-24-oic acid (sodium salt)) (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 2) Tetra sodium pyrophosphate (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3) Sodium fluoride (BDH laboratory supplies, Poole, UK)
- 4) EGTA 1, 2-Di (2-aminoethoxyethane- NNN'N'-tetra-acetic acid) (BDH laboratory supplied, Poole, UK)
- 5) Triton X-100 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
- 6) Tris pH 8.0 (ภาคผนวก)
- 7) Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (USB corporation, Cleveland, USA)
- 8) Magnesium chloride (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- 9) Sodium orthovanadate (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 10) Leupeptin (USB corporation, Cleveland, USA)
- 11) Aprotinin (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 12) BCATM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- 13) Liquid nitrogen (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

1.1.6 สารเคมีสำหรับการทำ SDS-PAGE

- 1) 30% Acrylamide/ Bis solution 37.5:1 (2.6% C)
(BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA)
- 2) Ammonium persulfate (APS) (Amersham bioscience AB, Uppsala, Sweden)
- 3) 1.5 M Tris-HCl buffer pH8.8 (ภาคผนวก)
- 4) 0.5 M Tris-HCl buffer pH6.8 ((ภาคผนวก)
- 5) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB corporation, Cleveland, USA)
- 6) TEMED (N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine)
(USB corporation, Cleveland, USA)
- 7) Glycine (Solon Ind, Pkwy. Solon, Ohio, USA)
- 8) Tris (Solon Ind, Pkwy. Solon, Ohio, USA)
- 9) Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
- 10) Mercaptoethanol (BME) Amersham bioscience AB, Uppsala, Sweden)
- 11) Methanol (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA)
- 12) Isopropanol (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 13) Ponceau's solution (Sima-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 14) Coomassie blue R-250 (USB corporation, Cleveland, USA)

1.1.7 สารเคมีสำหรับการทำ Immunoblotting

- 1) Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling, Danvers, USA)
- 2) Anti-parvalbumin mouse monoclonal antibody (Parv-19, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

1.1.8 สารเคมีสำหรับการทำ Autoradiography

- 1) Enhanced chemiluminescent reagent (ECL) (GE health care UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
- 2) Sodium chloride (Ajax finechem Pty Ltd, Auckland, New Zealand)
- 3) Triton x-100 (BDH laboratory supplied, Poole, UK)
- 4) Tween 20 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
- 5) Kodak developer and replenisher (Rayo Medical Product Company Limited, Shanghai, China)
- 6) Sterile milk 0% fat (Formost, Bangkok, Thailand)

1.1.9 สารเคมีสำหรับการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน

- 1) Chemiluminescent immuno assay (CLA) kit (LKE2 10261, DPC, Gwynedd, UK)

วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1.2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ทั่วไป

- 1) ข้อนตักสาร
- 2) กระจกชั่งสาร
- 3) กระจกกรอง
- 4) กรวยกรอง
- 5) ขวดเก็บตัวอย่าง
- 6) นาฬิกาจับเวลา
- 7) กล้องเก็บสไลด์
- 8) เครื่องมือผ่าตัด
- 9) จานรอง (Petri dish)
- 10) กระจกตวง (Cylinder)
- 11) ขวดเตรียมสาร (Flask)
- 12) เครื่องกวนสารอัตโนมัติ (Magnetic stirrer)
- 13) แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
- 14) เครื่องวัด pH (pH meter)
- 15) เครื่องช่วยผสม (Vertex)
- 16) กระจกปิดสไลด์ (Cover slips)
- 17) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

- 18) บีเกอร์ (Beager)
- 19) ปิเปต (Pipet)
- 20) ปิเปตทิว (Pipet tip)
- 21) แท่นให้ความร้อน (Hot plate)
- 22) หลอดทดลอง (Test tube)

1.2.2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการผ่าตัด

- 1) อุปกรณ์ผ่าตัด (Operating set)
- 2) เข็มเย็บแผล (Mani, Inc Utsunomiya, Tochigi, Japan)
- 3) โคมไฟส่องให้ความอบอุ่น (Royal Philips electronics, P.R.C., Holland)
- 4) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 5) ท่อป้อนอาหารสัตว์ทดลอง (Feeding tube)
- 6) สำลี (cotton)
- 7) ผ้าก๊อซ (Gauze)
- 8) กระบอกฉีดยา (บริษัทนิโพร จำกัด, พระนครศรีอยุธยา, ประเทศไทย)
- 9) เข็มฉีดยา (Nipro corporation, Ozaka, Japan)
- 10) ผ้าปลอดเชื้อปูพื้นรองผ่าตัด
- 11) มีดผ่าตัด (Blade)
- 12) บัตเตอร์เลี่ยน (Wahl Ltd., Kent, England)

1.2.3. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อและการย้อม

- 1) คีมจับชิ้นเนื้อตัวอย่าง (Forceps)
- 2) ตู้หลอมพาราพลาสติก (Paraplast oven)
- 3) เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (Tissue embedding center)
- 4) บล็อกชิ้นเนื้อ (Mold and Ring)
- 5) ภาชนะย้อมสไลด์พร้อมที่จับ (Rack and holder)
- 6) เครื่องช่วยเตรียมตัวอย่าง (Tissue processor)
- 7) เครื่องตัดบาง (Microtome)
- 8) อ่างน้ำอุ่น (Water bath)
- 9) เตาอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
- 10) พู่กัน (Brush)
- 11) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Blade)

1.2.4. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิคเวสเทอร์น บลอท

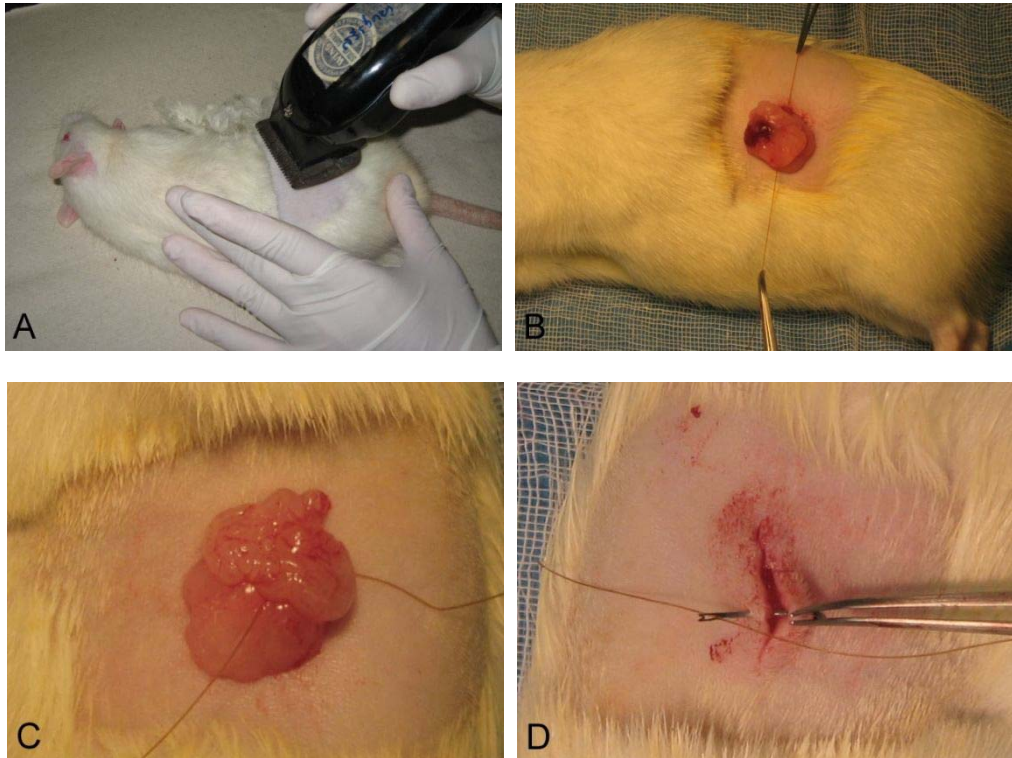
- 1) ชุดอิลีกโตรโพรซีสแบบ Mini protein 3 cell (BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA)
- 2) ชุดบล็อตโปรตีนแบบ Mini trans-blot cell (BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA)
- 3) Hyperfilm (GE health care UK Limited Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)
- 4) Hybond-ECL nitrocellulose membrane (Amersham bioscience, Little Chalfon, Germany)
- 5) Mini trans-blot filter paper (BIO RAD laboratories, Hercules, CA)
- 6) อุปกรณ์ประกอบกระจก (Gel cassette preparation) (BIO RAD laboratories, Hercules, CA, USA)
- 7) หลอดไฟแสงสีแดง (Red light) (Royal Philips electronics, P.R.C., Holland)
- 8) Homogenizer(Polytron-Aggregate)(Kinematica,Luzern, Switzerland)
- 9) Microwell plate (Nune. Roskilde, Denmark)
- 10) Perfectwrap (Masteragents, LTD, ELK, Grove Village, Illionosis, USA)
- 11) ขวด Sterilin (Barloworld Scientific Ltd. stone, Staffordshire., UK)
- 12) ตู้อบ (Oven)
- 13) ตู้ดูดควัน (Fumme hood)
- 14) เครื่องปั่นแยกชนิดควบคุมอุณหภูมิ
- 15) เครื่องสำรองไฟฟ้า
- 16) ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว
- 17) Hyper cassette (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK)

2. สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศเมีย น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุ 3 เดือน จากสถาน สัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 50 ตัว ระหว่าง การทดลองได้รับอาหารและน้ำตามปกติเพียงพอตลอดทั้งวัน มีการควบคุมเวลากลางวัน กลางคืนโดยเปิดและปิดไฟฟ้าทุก 12 ชั่วโมงและมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 24° C มีระบบไฟฟ้า และน้ำสำรอง วัสดุที่ใช้รองนอนเป็นขี้เลื่อยจากโรงงาน และเปลี่ยนทุก 2 วัน การทดลองนี้ได้ ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจริยบรรณสัตว์ทดลองเมื่อวันที่ 15 ตุลาคม 2551 ได้รับ เลขที่จริยบรรณ ศธ 0521.11/391

การผ่าตัดสัตว์ทดลอง

ซึ่งนำหนูก่อนการทดลองพร้อมทำสัญลักษณ์ไว้บริเวณหางของหนู จากนั้นจึงฉีด pentobarbital sodium ปริมาณ 40 มก./กก. บริเวณช่องท้อง (intraperitoneal) รอจนกระทั่งหนู สลบ นำมาโกนขนบริเวณด้านข้างลำตัวบริเวณใต้ต่อกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายทั้งสองข้างของ ลำตัว ใช้สำลีชุบเบตาดีนทาทั่วบริเวณที่จะผ่าตัด จากนั้นใช้ 70% แอลกอฮอล์ เช็ดซ้ำอีกครั้ง กำหนดแนวผ่าตัดโดยเลือกบริเวณตรงกลางของทางด้านข้างลำตัววัดจากซี่โครงซี่สุดท้าย ประมาณ 2.5 ซม. จากนั้นใช้มีดผ่าตัดร่วมกับกรรไกรผ่าตัดเปิดผนังด้านข้างลำตัวออกทีละชั้น เริ่มจากชั้นผิวหนัง ชั้นไขมัน และชั้นกล้ามเนื้อ ความกว้างของบาดแผลประมาณ 1 ซม. ใช้ ปากคีบปลายโค้งคีบเอารังไข่ออกมา จากนั้นใช้ไหมละลายผูกห้ามเลือด ดังรูปที่ 2-1 แล้วจึงตัด เอารังไข่ออกจากตัว ตรวจสอบการผูกห้ามเลือด เย็บบาดแผลโดยใช้ไหมละลาย ทีละชั้นจนครบ ทั้ง 3 ชั้น ใช้เบตาดีนทาที่บาดแผลอีกครั้ง การผ่าตัดจะตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างของร่างกาย ใช้ หนูจำนวน 40 ตัว หนูเหล่านี้จะเรียกว่าหนูกลุ่ม ovariectomy (OVX) สำหรับกลุ่มควบคุม (sham operate) หนูกลุ่มนี้ได้รับการผ่าตัดเปิดช่องท้องเช่นกันแต่จะไม่มี การผ่าตัดเอารังไข่ออก จากตัว ใช้ไฟส่องให้ความอบอุ่น รอจนหนูรู้สึกตัวดีแล้วจึงให้หลอดป้อนอาหารป้อนยาแก้ปวด ชนิดน้ำโดยให้ 300 มก./กก. ดังรูป 2-2 แล้วจึงย้ายหนูไปเลี้ยงซึ่งแยกเลี้ยงเดี่ยวกรงละ 1 ตัว เพื่อป้องกันหนูกัดกันในช่วงพักฟื้น



รูปที่ 2-1 แสดงตำแหน่งการโกนขนบริเวณลำตัวหนูเพื่อเตรียมการผ่าตัด (A) ผูกห้ามเลือดก่อนตัดรังไข่ (B) การตัดรังไข่ออกจากตัว (C) เย็บชั้นผิวหนังเพื่อปิดแผล (D)



รูปที่ 2-2 การให้ยาแก้ปวดหลังจากหนูตื่นจากสลบ

การให้ฮอร์โมน

หนูที่ได้รับการผ่าตัดจะได้รับการพักฟื้น 2 สัปดาห์ ทั้งนี้เพื่อให้แผลหายสนิท หลังจากนั้น หนูถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (sham operate) เป็นกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้ตัดรังไข่ออกจากตัว

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) เป็นกลุ่มที่ตัดเอารังไข่ออกและได้รับน้ำมันมะกอกฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ทุกวันหลังจากการผ่าตัด 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออก และได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 10 ไมโครกรัม/กก. (Es10) ฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ทุกวันหลังจากการผ่าตัด 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 20 ไมโครกรัม/กก. (Es20) ฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ทุกวันหลังจากการผ่าตัด 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 40 ไมโครกรัม/กก. (Es40) ฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous) ทุกวันหลังจากการผ่าตัด 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 10 สัปดาห์ (รูปที่ 2-3)

หลังจากครบกำหนดระยะเวลา นำหนูแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก และจดบันทึกค่าน้ำหนักที่ได้ จากนั้นทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital sodium 70 มก./กก. เข้าทางหน้าท้อง (intraperitoneal injection) เมื่อหนูสลบทำ vaginal smear เพื่อตรวจ estrous cycle การเก็บตัวอย่างซีรัมโดยเจาะเลือด 5 มล. จากเส้นเลือด abdominal aorta ที่งูไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ระหว่างนี้เก็บตัวอย่างมดลูกของหนูทดลองทุกตัวโดยตัดมดลูก แล้วล้างใน PBS buffer ใช้ผ้าก๊อชซับบัพเฟอริให้แห้ง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก พร้อมกับจดบันทึกค่าน้ำหนัก เมื่อเลือดแข็งตัวดีนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 5 นาที นำซีรัมไปตรวจระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดโดยทำทุกกลุ่มด้วยวิธี chemiluminescent immuno assay (CLA) ส่งตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์นิวเคลียร์โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ การวัดฮอร์โมนดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Radenahmad และคณะ (2006) ร่วมกับ Chu และคณะ (2006)



รูปที่ 2-3 แสดงการฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยวิธีฉีดใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection)

การเก็บหัวใจ

ผ่าตัดเปิดทรวงอกใช้กรรไกรตัดที่ซี่หัวใจ จากนั้นนำมาล้างใน PBS buffer เพื่อล้างเลือดออก ซับน้ำออก นำไปชั่งน้ำหนัก และบันทึกข้อมูล นำหัวใจมาตัดแบ่งเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกนำไปเก็บรักษาสภาพด้วย 10% ฟอर्मาลีน โดยนำไปผ่านกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับการศึกษาด้วยการย้อม H&E และการศึกษาโดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี (immunohistochemistry ตัวอย่างส่วนที่ 2 เก็บไว้ที่ -80°C เพื่อนำไปตรวจหาการแสดงออกของโปรตีน PV ด้วยวิธี Western blotting Analysis

การเก็บกล้ามเนื้อ Extensor digitorum longus (EDL)

เนื่องจากการศึกษาของ Heizmann และคณะ (1982) พบว่ากล้ามเนื้อ EDL มี PV ในปริมาณสูงดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้กล้ามเนื้อ EDL เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) โดยแบ่งกล้ามเนื้อ EDL เป็น 2 ส่วน ๆ ที่ 1 นำไปรักษาสภาพด้วย 10 % ฟอर्मาลีน แล้วนำไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาปฏิกิริยาของ PV (PV immunoreactivity) โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี ส่วนที่ 2 สำหรับการศึกษาปริมาณของ PV ด้วยวิธี Western blotting analysis

การเก็บรังไข่

เนื่องจากการศึกษาของ Hiroi และคณะ (1999) พบว่ารังไข่มี estrogen receptor (ER) ทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ α (ER α) และ β (ER β) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้รังไข่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) สำหรับการศึกษากิจกรรมอิมมูโนของ ER α และ ER β (ER α และ ER β immunoreactivity)

3.วิธีการศึกษา

การเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับฝังลงในซีรัม

1. รักษาสภาพเนื้อเยื่อด้วย 10% ฟอรัมาลิน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา
2. ดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยการแช่ลงในแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50%, 70%, 95% (2 ครั้ง), 100% (1 ครั้ง) เป็นเวลา 2, 11, 2, 2, 2 ชั่วโมง ตามลำดับ และแช่ไว้ในแอลกอฮอล์เข้มข้น 100% (2 ครั้ง) เป็นเวลา 13 ชั่วโมง
3. แช่ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ชั่วโมง
4. แช่เนื้อเยื่อในพาราฟลาสเหลว 2 ครั้ง ๆ ละ 2 ชั่วโมง เพื่อให้พาราฟลาสแทรกซึมเข้าไปในเนื้อเยื่อ
5. ฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาสเหลวและทิ้งไว้จนแข็งตัว
6. ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องมือไมโครทอม (microtome) ที่ความหนา 5 ไมโครเมตร และวางเนื้อเยื่อบน TESPA-coated slide

วิธีการของเทคนิค chemiluminescence immuno assay

หลักการของปฏิกิริยา chemiluminescence เกิดขึ้นเมื่อปฏิกิริยาทางเคมีได้รับการกระตุ้นจากปัจจัยภายนอกปฏิกิริยาทำให้อิเล็กตรอนถูกกระตุ้นจากภาวะ ground state ไปสู่ภาวะ excited state และเมื่อ electron กลับเข้าสู่ภาวะเดิมจะคายพลังงานออกมาในรูปของการเรืองแสง (emission of photo) อัตราการเกิดของปฏิกิริยาจะแปรผันตรงกับค่าของความเข้มข้นของสาร และปริมาณการเรืองแสงที่ตรวจจับโดยใช้วิธีอ่านผลจากสมการ intensity/time profile (Woodhead and Weeks, 1985)

ขั้นตอนการวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในซีรัม

1. ใส่ estradiol-specific biotinylated antibody ในซีรัมปริมาตร 35 ไมโครลิตร เพื่อให้เกิด immunocomplex
2. ใส่ streptavidin-coated microparticles และ estradiol derivative labeled ที่ผูกติดอยู่กับ ruthenium complex

ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (vaginal

epithelium) ด้วยวิธี papanicolaou stain (PAP stain)

การย้อมวิธีนี้ดัดแปลงมาจากการย้อม papanicolaou (PAP) stain ซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรคเพื่อคัดกรองมะเร็งปากมดลูกในเพศหญิง (Ducatman and Wang, 2002) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดของเซลล์เพื่อตรวจหาระยะของ estrous cycle ในหนู (Hubscher *et al.*, 2005)

1. แช่เนื้อเยื่อใน 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2. ล้างด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง ๆ ละ 10 จุ่ม
3. ย้อมเนื้อเยื่อด้วย Mayer 's hematoxylin นาน 2 นาที
4. ล้างออกด้วยน้ำประปา 2 ครั้ง ๆ ละ 10 จุ่ม
5. ล้างเนื้อเยื่อด้วย 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 10 จุ่ม
6. ย้อมด้วยสี Orange G เป็นเวลา 2 นาที
7. ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 10 จุ่ม
8. ย้อมด้วยสี Eosin 10 นาที
9. ล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 20 จุ่ม
10. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ๆ ละ 10 จุ่ม
11. แช่เนื้อเยื่อในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
12. หยด permount ลงบนเนื้อเยื่อ ปิดทับด้วย cover slip
13. ศึกษาระยะของ estrous cycle ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) บันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล DP50 (DP50, Olympus)

ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจด้วยการย้อมแบบ

H&E

การย้อมวิธีนี้เป็นการย้อมที่อาศัยการติดสีตามคุณสมบัติความเป็นกรดและต่างทางชีวเคมีขององค์ประกอบภายในเซลล์ โดยที่สี hematoxylin จะติดสีในส่วนที่มีคุณสมบัติของการติดต่าง (basophilic) เช่น nucleus chromatin ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินม่วง ส่วนสี eosin จะติดสีแดงในองค์ประกอบที่มีคุณสมบัติติดสีกรด (acidophilic) เช่น cytoplasm

1. ละลายพาราฟลาส (deparafinization) ในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2. ดึงน้ำเข้าสู่เซลล์ (rehydration) โดยการแช่ในแอลกอฮอล์ 100%, 95% อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
3. แช่ในน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที
4. ย้อมด้วยสี Mayer 's hematoxylin นาน 15 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา เป็นเวลานาน 10 นาที

5. ย้อมด้วยสี Eosin นาน 2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วย 95% แอลกอฮอล์ 1 ครั้ง โดยการยกขึ้นลง 20-30 ครั้ง
6. แช่ลงในแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
7. ตึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วยการแช่ลงในแอลกอฮอล์ 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
8. ทำให้เซลล์ใส (clearing) โดยการแช่เนื้อเยื่อในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
9. หยด permount ลงบนเนื้อเยื่อในแผ่นสไลด์ และปิดทับด้วย cover slip
10. ศึกษาพยาธิวิทยาของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล DP 50 (DP50, Olympus)

ศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ estrogen receptor (ER) ชนิด α และชนิด β ในรังไข่และกล้ามเนื้อหัวใจด้วยวิธี immunohistochemistry

การย้อมด้วยวิธีนี้อาศัยหลักปฏิกริยาของแอนติเจน และแอนติบอดี โดยแอนติบอดีที่ใช้เป็นแอนติบอดีที่ทราบชนิดซึ่งได้แก่ MS X Estrogen receptor α และ Mouse anti-Estrogen receptor β จะจับกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงกันในเนื้อเยื่อของรังไข่ และเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ได้แก่ ER α และ ER β แล้วใช้เอ็นไซม์พวก HRP (horse radish peroxidase) ซึ่งจะจับกับแอนติบอดี โดยเอ็นไซม์จะทำปฏิกริยากับสารตั้งต้น (Substrate) ทำให้เกิดสีตรงบริเวณที่เกิดปฏิกริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งมีขั้นตอนในการศึกษาดังนี้

1. ละลายพาราฟลาสด้วยไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2. เพิ่มน้ำเข้ามาในเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากสูงไปยังแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำได้แก่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 100%, 90%, 70%, 50% และน้ำประปา ตามลำดับ อย่างละ 5 นาที
3. แช่เนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer เป็นเวลา 5 นาที
4. แช่เนื้อเยื่อใน 0.01 M. citric buffer แล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ที่ 700 W นาน 10 นาที
5. วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
6. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
7. แช่เนื้อเยื่อในบล็อกกิ้งซีรัม (dilution 1:200) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
8. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีชนิดที่ 1 (Estrogen receptor α หรือ Mouse anti-Estrogen receptor β) อัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
9. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
10. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีชนิดที่ 2 (Biotinylated secondary antibody) อัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

11. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
12. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% H₂O₂ ในเมททานอล เป็นเวลา 40 นาที
13. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
14. แช่เนื้อเยื่อในอิวิดินไบโอตินเอ็นไซม์คอมเพล็กซ์ (Avidin-biotin enzyme complex) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 นาที
15. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
16. แช่เนื้อเยื่อใน 3-amino,9-ethyl-carbazole (AEC) เป็นเวลา 10 นาที
17. ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที
18. ย้อมด้วยสี Hematoxylin เป็นเวลา 3 นาที และล้างสีส่วนเกินในเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที
19. เข้าสู่กระบวนการ dehydration, clearing, permount และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
20. ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) มีขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับการย้อมข้างต้น แต่ไม่ใส่ primary antibody
21. ศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล (DP 50, Olympus)

ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อ EDL และกล้ามเนื้อหัวใจหนู ด้วยวิธี immunohistochemistry

การย้อมด้วยวิธีนี้จะอาศัยหลักปฏิกิริยาของแอนติเจน และแอนติบอดี โดยแอนติบอดีที่ใช้เป็น mouse anti-parvalbumin monoclonal antibody ซึ่งจับกับ parvalbumin ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และใช้เอ็นไซม์พวก HRP (horse radish peroxidase) มาจับกับแอนติบอดีทำให้เกิดสีตรงบริเวณที่เกิดปฏิกิริยา

1. ละลายพาราฟลาสด้วยไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
2. เพิ่มน้ำเข้ามาในเนื้อเยื่อด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นจากสูงไปยังแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นต่ำได้แก่แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 100%, 90%, 70%, 50% และน้ำประปา ตามลำดับ อย่างละ 5 นาที
3. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% Triton X-100 ใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer เป็นเวลา 30 นาที
4. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
5. แช่เนื้อเยื่อในบล็อกกิ้งซีรัม (dilution 1:200) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
6. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีชนิดที่ 1 (mouse anti parvalbumin primary antibody) อัตราส่วน 1:1,000 ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
7. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

8. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีชนิดที่ 2 (Biotinylated secondary antibody) อัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
9. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
10. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% H₂O₂ ในเมททานอล เป็นเวลา 40 นาที
11. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M. Tris-phosphate buffer 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
12. แช่เนื้อเยื่อในอวิดินไบโอตินเอ็นไซม์คอมเพล็กซ์ (Avidin-biotin enzyme complex) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 120 นาที
13. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1M Tris-phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
14. แช่เนื้อเยื่อใน 3-amino,9-ethyl-carbazole (AEC) เป็นเวลา 10 นาที
15. ล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที
16. ย้อมด้วยสี hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที และล้างสีส่วนเกินในเนื้อเยื่อด้วยน้ำประปา เป็นเวลา 10 นาที
17. เข้าสู่กระบวนการ dehydration, clearing, permount และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
18. ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) มีขั้นตอนการย้อมเช่นเดียวกับการย้อมข้างต้น แต่ไม่ใส่ primary antibody
19. ศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนของเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล (DP 50, Olympus)

วัดปริมาณการแสดงออกของโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อ EDL และกล้ามเนื้อหัวใจหนูด้วยวิธี Western blotting

เป็นวิธีการศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในเนื้อเยื่อ หรือเซลล์ของอวัยวะต่าง ๆ โดยอาศัยการแยกขนาดของโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล ด้วย SDS-Page หลังจากนั้นเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) และใช้วิธีทางอิมมูโนบลอตติ้ง (immunoblotting) เพื่อหาโปรตีนที่ต้องการ โดยนำแผ่น nitrocellulose ไปบ่มด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา และขยายสัญญาณของปฏิกิริยาด้วยแอนติบอดีชนิดที่ 2 ที่ผูกติดกับเอ็นไซม์ และสามารถทำปฏิกิริยากับ enhanced chemiluminescent reagent (ECL) บริเวณที่มีโปรตีนซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีทำให้เกิดการเรืองแสงขึ้น แล้วนำไปทำให้เกิดภาพแถบโปรตีน โดยการประกบกับแผ่น film X-ray

การสกัดโปรตีนจากกล้ามเนื้อ

1. นำกล้ามเนื้อหัวใจห้องล่าง และกล้ามเนื้อ EDL มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กภายใต้การควบคุมความเย็น โดยใช้ น้ำแข็ง

2. ใส่ complete lysis buffer (ภาคผนวก) ให้ท่วมเนื้อเยื่อ ใช้ homogenizer บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด โดยค่อย ๆ เพิ่มความเร็วในการบดจากต่ำสุดไปยังสูงสุด จนเนื้อเยื่อละเอียด แล้วปั่นต่อไปอีก 2 นาที
3. นำไปแช่แข็ง (freeze) ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เพื่อให้เซลล์แตก เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำมาวางที่อุณหภูมิห้องให้เป็นของเหลว (thawed) อีก 10 นาที ทำเช่นนี้ 2 รอบ
4. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 60 นาที
5. เก็บส่วนที่เป็นส่วนใสด้านบน (supernatant) โดยเก็บไว้ที่ -80°C ก่อนนำไปทดลองต่อไป

ขั้นตอนการวัดปริมาณโปรตีน

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นของโปรตีนโดยวิธีของ Lowry ประกอบด้วย reagent A และ reagent B โดยใช้ kit reagent ของบริษัท Thermo Scientific, Rockford, USA เปรียบเทียบกับ bovine serum albumin (BSA) ซึ่งใช้เป็นโปรตีนมาตรฐาน (standard) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำ ตัวอย่างมา dilute 10 เท่าด้วยน้ำ
2. ใส่ BSA ในถาดหลุมจากแถวที่ 1 จาก well A ถึง well H ใส่ well ละ 25 ไมโครลิตร
3. นำโปรตีนตัวอย่าง ที่ผ่านการ dilute แล้วใส่ well ละ 1 ไมโครลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำ 25 ไมโครลิตร
4. เตรียม working solution โดยเตรียมในอัตราส่วน solution A: solution B เท่ากับ 5 มล. ต่อ 100 มล. ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ใน well ทั้ง โปรตีนมาตรฐาน และ โปรตีนจากตัวอย่าง
5. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง shaker เป็นเวลา 2 นาที
6. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที
7. วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงไป plot กราฟเพื่อคำนวณหาสมการมาตรฐาน และคำนวณหาความเข้มข้นของตัวอย่างต่อไป

การเตรียมโปรตีนจากตัวอย่าง (sample)

1. นำสารสกัดที่ทราบค่าความเข้มข้นของโปรตีนไปผสมกับแซมเปิลบัฟเฟอร์ (sample buffer : laemmli sample buffer) อัตราส่วน 1:1
2. นำไปแช่ในอ่างที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 100°C เป็นเวลา 5 นาที

- นำตัวอย่างไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 1 นาที

การเตรียมเจลสำหรับ SDS-PAGE

การเตรียม separate gel

- เตรียมอุปกรณ์ชุด electrophoresis และประกอบกระจกสำหรับเตรียมเจล
- เตรียม 12 % sodium dodecyl sulfate polyacrylamide ชุดส่วนผสมใส่ลงในข้อ 1
- หยด isopropanol ปิดบนหน้าเจล (top up) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชัน
- เท isopropanol ออกแล้วล้างด้วยน้ำ 2 ครั้ง ทำขั้นตอนนี้หลังจากเตรียม stack gel แล้วเท่านั้น

การเตรียม stack gel

- เตรียม 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide stack gel (ภาคผนวก) วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25° C) เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรด์เซชัน
- ประกอบกระจกที่มีแผ่นเจลเข้ากับอุปกรณ์ชุด electrophoresis
- เติม 1x SDS running buffer (ภาคผนวก)
- หยอดโปรตีนจากตัวอย่างที่ผสมด้วย loading buffer จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน well
- ปล่อยกระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ ในขณะที่สีของ dye อยู่ในชั้นของ stack gel และเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ เมื่อสีของ dye อยู่ในชั้นของ separate gel ให้ความเย็นตลอดการทดลองโดยใช้กระบอกน้ำแข็งหล่อเย็น

การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส

- ประกอบเจลและแผ่นไนโตรเซลลูโลสลงใน Mini Trans-Blot ประกอบ cassette กับชุดอุปกรณ์ Mini trans-blot
- เติมทรานสเฟอร์บัฟเฟอร์ (transfer buffer) ลงในแชมเบอร์ (chamber) พร้อมใส่น้ำแข็ง
- ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 250 มิลลิแอมป์ constant amplify เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปแช่ใน 0.1% Ponceau' s solution (w/v) in 5% acetic acid เพื่อตรวจสอบการย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส
- ล้าง Ponceau' s solution ออกด้วย 0.1 M NaOH
- ล้าง 0.1 M NaOH ออกจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยน้ำกลั่น

การทำอิมมูโนบลอตติง (Immunoblotting)

1. บล็อกโปรตีนที่ไม่เกี่ยวข้อง (non specific binding protein) โดยการนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสมาแช่ใน 13.33% non fat sterile milk ใน TBS (TBS 26 ml + non fat sterile milk 4 ml) ที่อุณหภูมิ 4° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงครึ่ง และเขย่าแนวราบที่อุณหภูมิ 25° C อีก 30 นาที
2. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที
3. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในแอนติบอดีตัวที่ 1 ใน 10% non fat sterile milk in TBS อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37° C
4. ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST 3 ครั้ง ๆ ละ 4 นาที
5. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในแอนติบอดีตัวที่ 2 ใน 10% non fat sterile milk in TBS อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37° C
6. ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย TBST 3 ครั้ง นานครั้งละ 4 นาที และตามด้วย TBS 1 ครั้ง แล้วแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน TBS ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL

การทำให้เกิดภาพบนแถบโปรตีน (Detection)

1. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน enhance chemiluminescence reagent (ECL) เป็นเวลา 5 นาที
2. ทำให้แผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้งสนิท
3. ใช้ hyper film ประคบบนแผ่นไนโตรเซลลูโลส 5, 10, 15 และ 30 นาที
4. นำ hyper film ในข้อ 3 ไปล้างในน้ำยาดีวิลอบเพอร์ เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำยาดีวิลอบเพอร์ด้วยน้ำประปา แล้วตามด้วยน้ำยาฟิกเชอร์อีก 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาอีก 1 ครั้ง และทำให้ hyper film แห้งสนิท
5. นำแผ่น hyper film ที่เกิดภาพไปวัดความเข้มของแถบโปรตีนโดยนำไปสแกนด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์รุ่น G700 ของ BIO-RAD ด้วยโปรแกรม Microimage (Image analysis software v.4, Olympus)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (standard error of mean)
2. ระดับความเข้มข้นของแถบ parvalbumin ที่แสดงออกในแต่ละกลุ่มการทดลองเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับกลุ่มควบคุม
3. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล พบว่ามีการกระจายตัวไม่ได้เป็นแบบ normal distribution (รายละเอียดอยู่ในภาคผนวก) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ non-parametric (two independent sample test) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มโดยใช้ Mann Whitney test โดยกำหนดค่า $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลพื้นฐาน

1.1 อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มต่อเดือน

จากการศึกษาพบว่า หนูกลุ่ม sham มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว 5.07 ± 1.13 กรัมต่อเดือน กลุ่ม OVX มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว มากที่สุด คือ 18.19 ± 1.67 กรัมต่อเดือน และมากกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูกลุ่ม ที่ได้รับ ฮอร์โมนทดแทน Es10 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว 5.45 ± 1.12 กรัมต่อเดือน กลุ่ม Es 20 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว 9.35 ± 1.71 กรัมต่อเดือน และกลุ่ม Es 40 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว 8.88 ± 1.47 กรัมต่อเดือน ซึ่งทั้งกลุ่ม Es20 และ Es40 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham

1.2 น้ำหนักตัว (body weight)

หนูกลุ่ม OVX มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับ กลุ่ม sham หนูกลุ่มที่ได้รับ ฮอร์โมนทดแทน Es 10, Es 20 และกลุ่ม Es 40 มีน้ำหนักตัวที่ลดลงและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3-1)

1.3 น้ำหนักมดลูกของหนูแต่ละกลุ่ม (กรัม)

หนูกลุ่ม OVX มีน้ำหนักมดลูก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับ กลุ่ม sham หนูกลุ่มที่ได้รับ ฮอร์โมนทดแทน Es 10, Es 20 และกลุ่ม Es 40 มีน้ำหนักมดลูกใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3-1)

1.4 น้ำหนักหัวใจของหนูแต่ละกลุ่ม (กรัม)

หนู กลุ่ม sham, OVX, Es 10 และกลุ่ม Es 20 มีน้ำหนักหัวใจใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1)

1.5 น้ำหนักมดลูก / น้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม (Uw/Bw)

หนูกลุ่ม OVX มีน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัว น้อยกว่า หนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่กลุ่ม Es 40 มี น้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัว มากกว่าหนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) น้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัว ของหนูกลุ่ม sham, Es 10 และ Es 20 มีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3-1)

1.6 น้ำหนักหัวใจ / น้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม (Hw/Bw)

น้ำหนักหัวใจ/น้ำหนักตัวของหนู ทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน

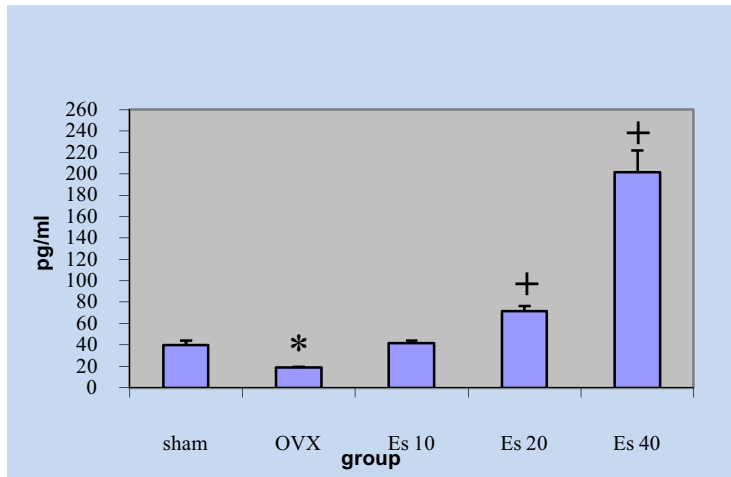
ตารางที่ 3-1 แสดง น้ำหนักตัว น้ำหนักมดลูก น้ำหนักหัวใจ น้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว และ น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว

| Group | sham | OVX | Es10 | Es20 | Es40 |
|---------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| Body weight | 269.22 ± 14.69 | 277.06 ± 7.47 | 239.22 ± 4.72 | 243.05 ± 6.23 | 240.13 ± 5.10 |
| Uterus weight | 0.73 ± 0.29 | 0.11 ± 0.03* | 0.67 ± 0.5 | 0.70 ± 0.10 | 0.80 ± 0.12 |
| Heart weight | 0.83 ± 0.20 | 0.80 ± 0.08 | 0.79 ± 0.07 | 0.76 ± 0.07 | 0.69 ± 0.05 |
| Uw/Bw(x100) | 0.27 ± 0.11 | 0.04 ± 0.01* | 0.28 ± 0.03 | 0.29 ± 0.04 | 0.34 ± 0.05 |
| Hw/Bw(x 100) | 0.31 ± 0.03 | 0.29 ± 0.03 | 0.33 ± 0.03 | 0.31 ± 0.02 | 0.29 ± 0.02 |

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham ที่ $p < 0.05$, $n = 10$

2. ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด

จากการศึกษาโดยการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนจากซีรัมของหนูในแต่ละกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม sham มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 39.85 ± 4.71 พิโคกรัม/มล. ในกลุ่ม OVX มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนน้อยที่สุด 18.8 ± 1.15 พิโคกรัม/มล. กลุ่ม Es 10 มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 41.97 ± 2.60 พิโคกรัม/มล. ใกล้เคียงกับ หนูกลุ่ม sham และหนูกลุ่ม Es 20 มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 71.84 ± 5.25 พิโคกรัม/มล. และหนูกลุ่ม Es 40 มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 201.47 ± 20.88 พิโคกรัม/มล. ซึ่งทั้งกลุ่ม Es 20 และกลุ่ม Es 40 มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน มากกว่าหนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังกราฟที่ 3-1



รูปที่ 3-1 แสดงระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดหนูของแต่ละกลุ่มการทดลอง

* มีปริมาณเอสโตรเจนในเลือดน้อยกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$, $n = 10$

+ มีปริมาณเอสโตรเจนในเลือดมากกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$, $n = 10$

3. การตรวจหาระยะของ estrous cycle

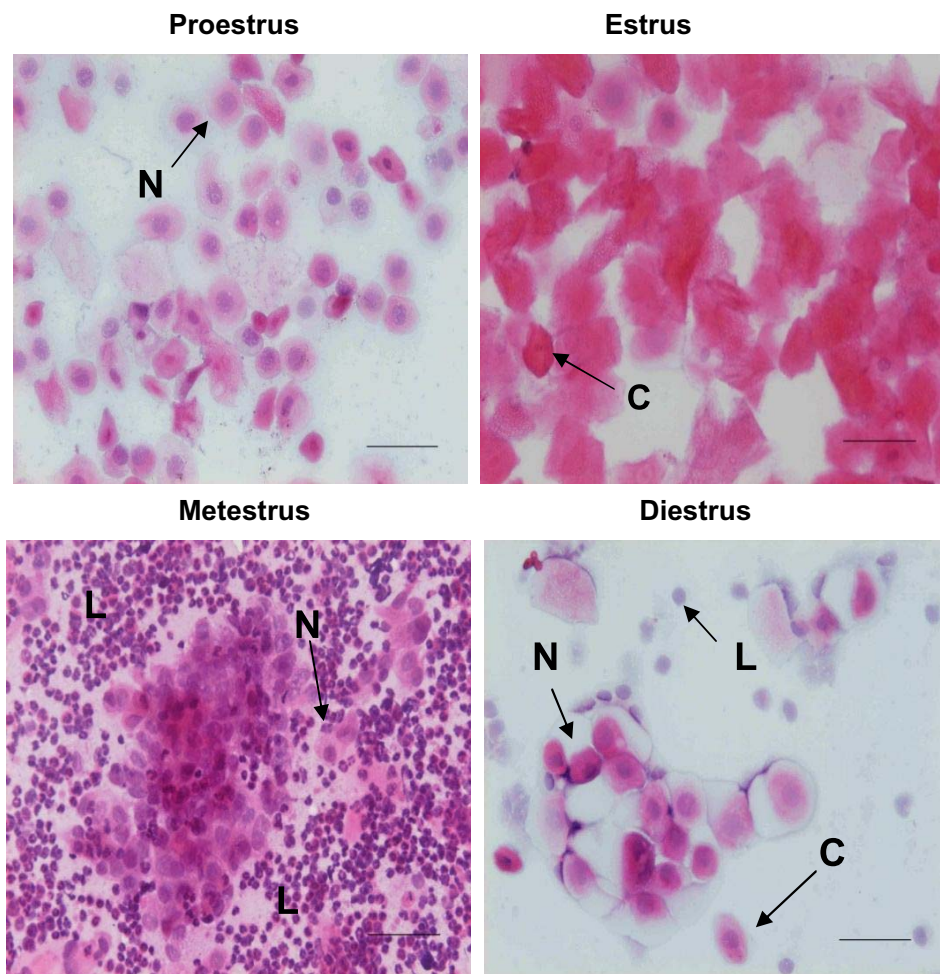
จากการทำ vaginal smear ย้อมโดยใช้ PAP stain พบว่า ระยะ estrous cycle ของหนู มี 4 ระยะ ได้แก่ proestrus, estrus, metestrus และ diestrus ดังแสดงในรูปที่ 3-2

ระยะ proestrus ซึ่งเซลล์ที่เห็นได้เด่นชัดในระยะนี้คือ nucleated cell (N) เซลล์มีลักษณะกลม ไฮโดพลาสซึม ย้อมติดสีชมพู และนิวเคลียส ย้อมติดสีน้ำเงินม่วง

ระยะ estrus เซลล์ที่เห็นได้เด่นชัดในระยะนี้คือ cornified cell (C) โดยลักษณะของเซลล์จะเป็นเหลี่ยม ไฮโดพลาสซึม ย้อมติดสีส้ม และมองไม่เห็นนิวเคลียส

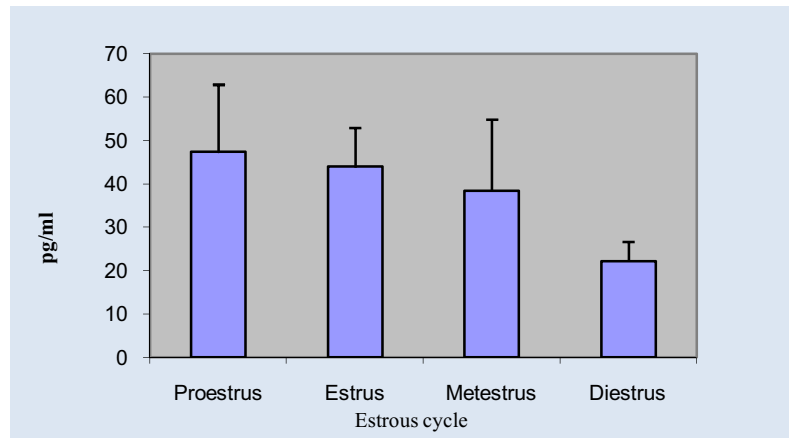
ระยะ metestrus เซลล์ที่เด่นและพบมากที่สุดคือเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด leukocyte (L) นิวเคลียส ย้อมติดสีน้ำเงินอมม่วง ซึ่งมักจะมีการรวมกลุ่มกันอยู่รอบ ๆ nucleated cell ซึ่งในระยะนี้ ไฮโดพลาสซึม ย้อมติดสีชมพูอ่อนนิวเคลียส อยู่ชิดขอบเซลล์

ระยะ diestrus เซลล์ ย้อมติดสีม่วง ไฮโดพลาสซึม ย้อมติดสีชมพู นิวเคลียส อยู่ชิดขอบเซลล์ สำหรับ นิวเคลียส ของ leukocyte จะย้อมติดสีม่วงอ่อน และ cornified cell บริเวณไฮโดพลาสซึม ย้อมติดสีชมพูอ่อน นิวเคลียส ย้อมติดสีม่วงอมชมพู และอยู่ตรงกลางเซลล์ในระยะนี้จะพบเซลล์ทั้ง 3 ชนิดในจำนวนน้อยกว่าระยะอื่น



รูปที่ 3-2 แสดง estrous cycle ของหนูทั้ง 4 ระยะ ย้อมโดยใช้วิธี PAP stain
(scale bar = 50 μ m)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจนในแต่ละระยะของ estrous cycle ปรากฏผลดังนี้ ในระยะ proestrus (47.34 ± 15.64 พิโคกรัม/มล.) ระยะ estrus (43.94 ± 9.04 พิโคกรัม/มล.) ระยะ metestrus (38.44 ± 16.52 พิโคกรัม/มล.) และระยะ diestrus (22.19 ± 4.50 พิโคกรัม/มล.) แสดงดังกราฟที่ 3-3



กราฟที่ 3-3 แสดงค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสโตรเจนในแต่ละระยะของ estrous cycle ในหนูกลุ่มควบคุม (sham operation)

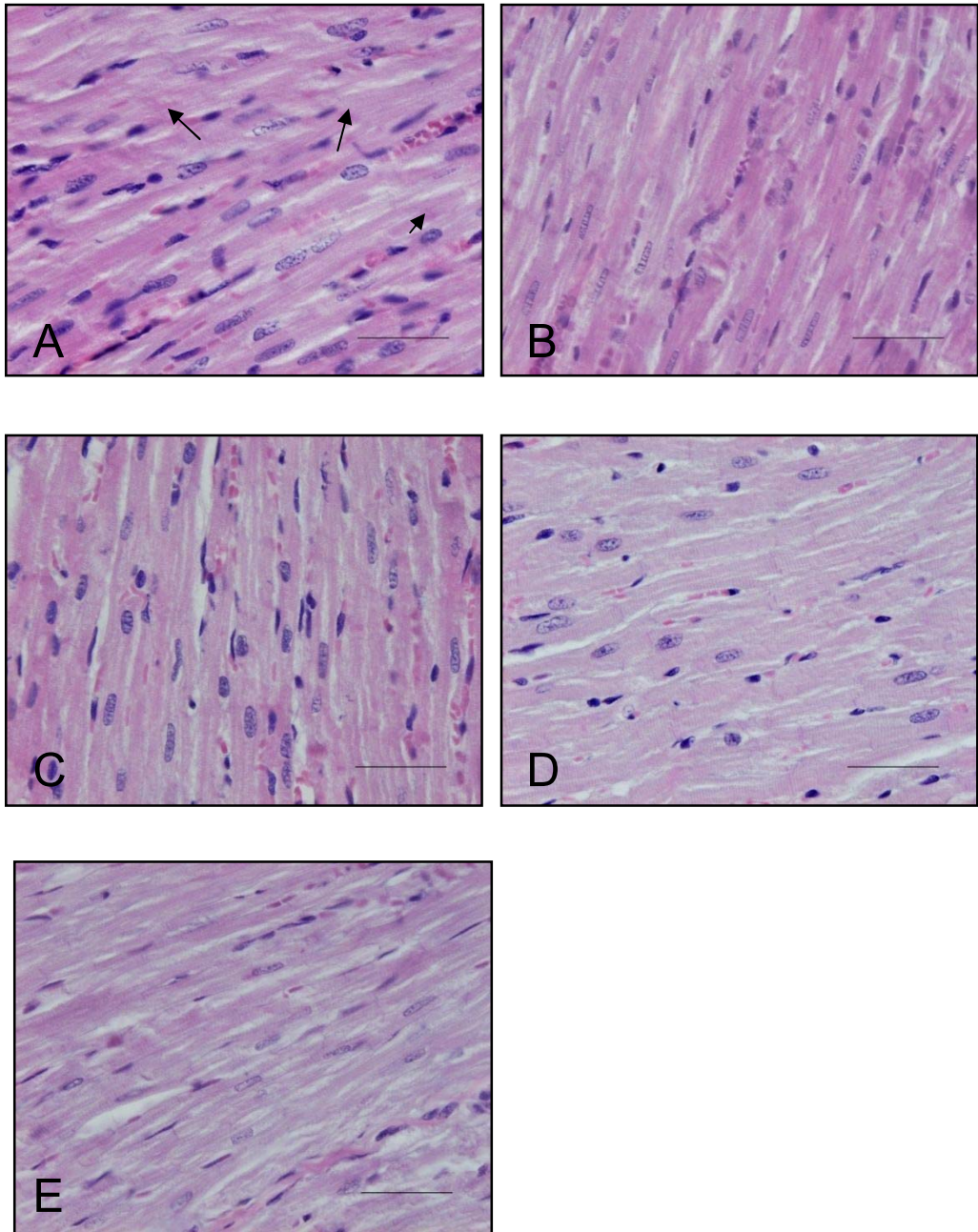
ระยะของ **estrous cycle** ของหนูแต่ละกลุ่ม

ตารางที่ 3-2 ระยะ estrous cycle ของหนูแต่ละกลุ่ม (ตัวเลขที่แสดง คือจำนวนตัวที่พบ)

| Group/ระยะ estrous cycle | Proestrus | Estrus | Metestrus | Diestrus |
|--------------------------|-----------|--------|-----------|----------|
| sham | 4 | 2 | 2 | 2 |
| OVX | - | - | - | 10 |
| Es 10 | 5 | 3 | - | 2 |
| Es 20 | 4 | 5 | - | 1 |
| Es 40 | 5 | 5 | - | - |

4. ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของกล้ามเนื้อหัวใจด้วยการย้อมแบบ H&E

เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ มีลักษณะเป็นทรงกระบอก มีการแตกกิ่งก้านสาขา แต่ละเซลล์มี 1 นิวเคลียส และนิวเคลียสมีรูปร่างอยู่กลางเซลล์ ย้อมติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพู มี fibroblast ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็กกว่า นิวเคลียสรูปร่างรี ย้อมติดสีม่วง มีไซโตพลาสซึมน้อยมากจึงมองเห็นไม่ชัด แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ มีหลอดเลือดแทรกอยู่ ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ และ fibroblast เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจในกลุ่ม OVX, Es10, Es20 และ Es40 มีลักษณะของเซลล์เหมือนกับกลุ่ม sham และไม่พบว่ามี การตายของเซลล์เพิ่มขึ้น

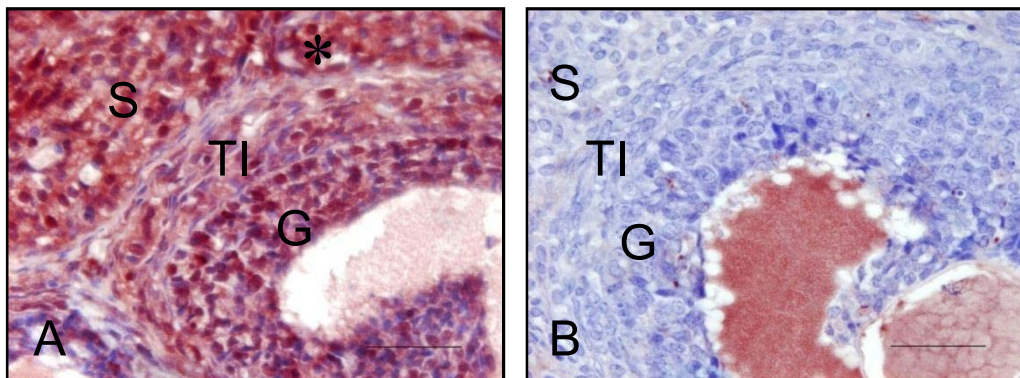


รูปที่ 3-4 แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจกลุ่ม sham (A), OVX (B), Es10 (C), Es20 (D) และ Es40 (E) ด้วยการย้อมแบบ H&E บริเวณที่ปลายศรีษะแสดงตำแหน่งของ intercalated disk (scale bar = 40 μ m)

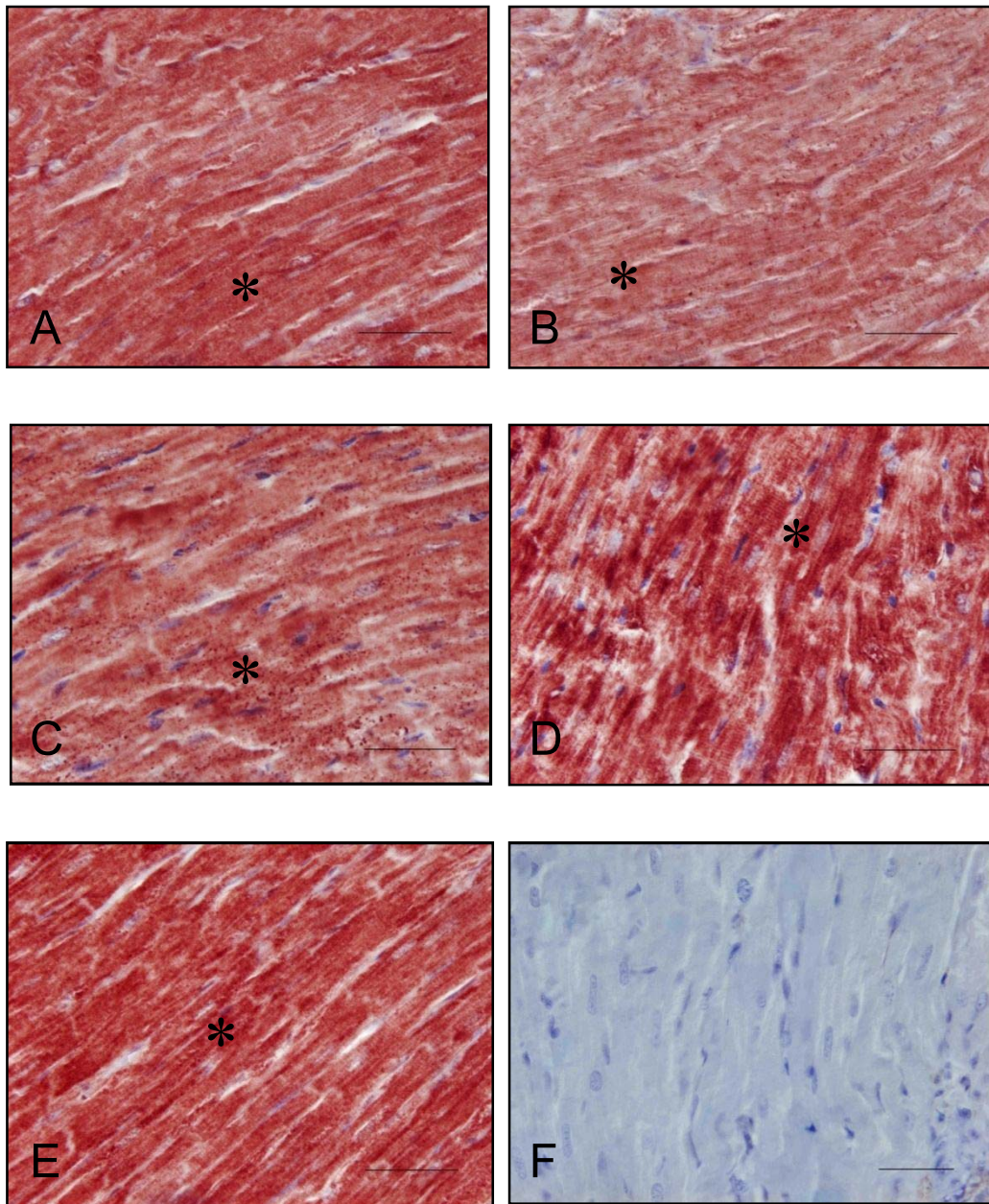
5. ปฏิกริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α (ER α) ในกล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิค อิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

จากการศึกษาพบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α (*, สีน้ำตาลแดง) ในชั้น stroma (S) ชั้น theca interna (TI) และชั้น granulosa cell (G) ในรังไข่ของหนู (รูปที่ 3-5A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α ในชั้น stroma ชั้น theca interna และชั้น granulosa cell ในรังไข่ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-5B)

จากการศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α (estrogen receptor immunoreactivity) ในกล้ามเนื้อหัวใจหนูกลุ่มควบคุม (sham) (รูปที่ 3-6A) เทียบกับหนูในกลุ่มที่มีการตัดรังไข่ (OVX) (รูปที่ 3-6B) พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนลดลง และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/กก. ในกลุ่ม Es10, Es20 และ Es40 (รูปที่ 3-6C-E) ตามลำดับ พบว่ามีการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α เพิ่มขึ้นโดยเฉพาะในกลุ่ม Es20 และ Es40 มีการแสดงออกของปฏิกริยาเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ในกลุ่มควบคุมเชิงลบไม่พบการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α (รูป 3-6F)



รูปที่ 3-5 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α (*, สีน้ำตาลแดง) (A) ที่พบในรังไข่หนูขาวที่เป็นตัวควบคุมเชิงบวก และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α ในรังไข่หนูขาวที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (B) (scale bar = 40 μ m)

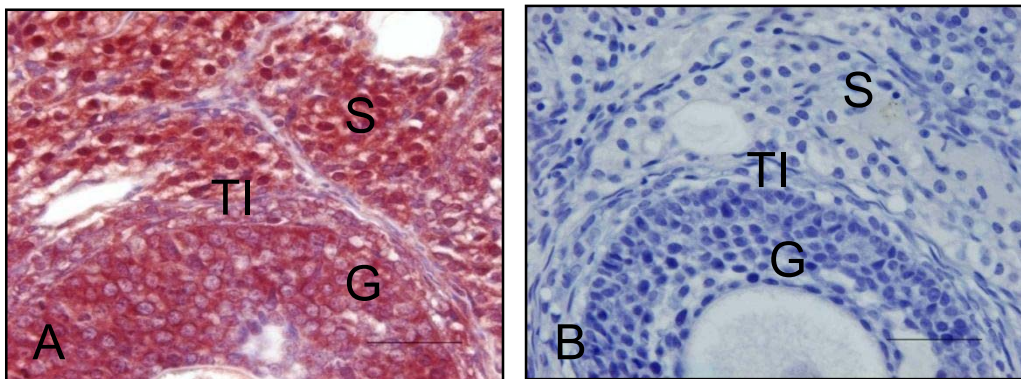


รูปที่ 3-6 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER α (*, สีสน้ำตาลแดง) ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ กล้ามเนื้อหัวใจหนูกลุ่ม sham (A), OVX (B), Es10 (C), Es20 (D) และ Es40 (E) ไม่พบปฏิกิริยาดังกล่าวในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (F) (scale bar = 40 μ m)

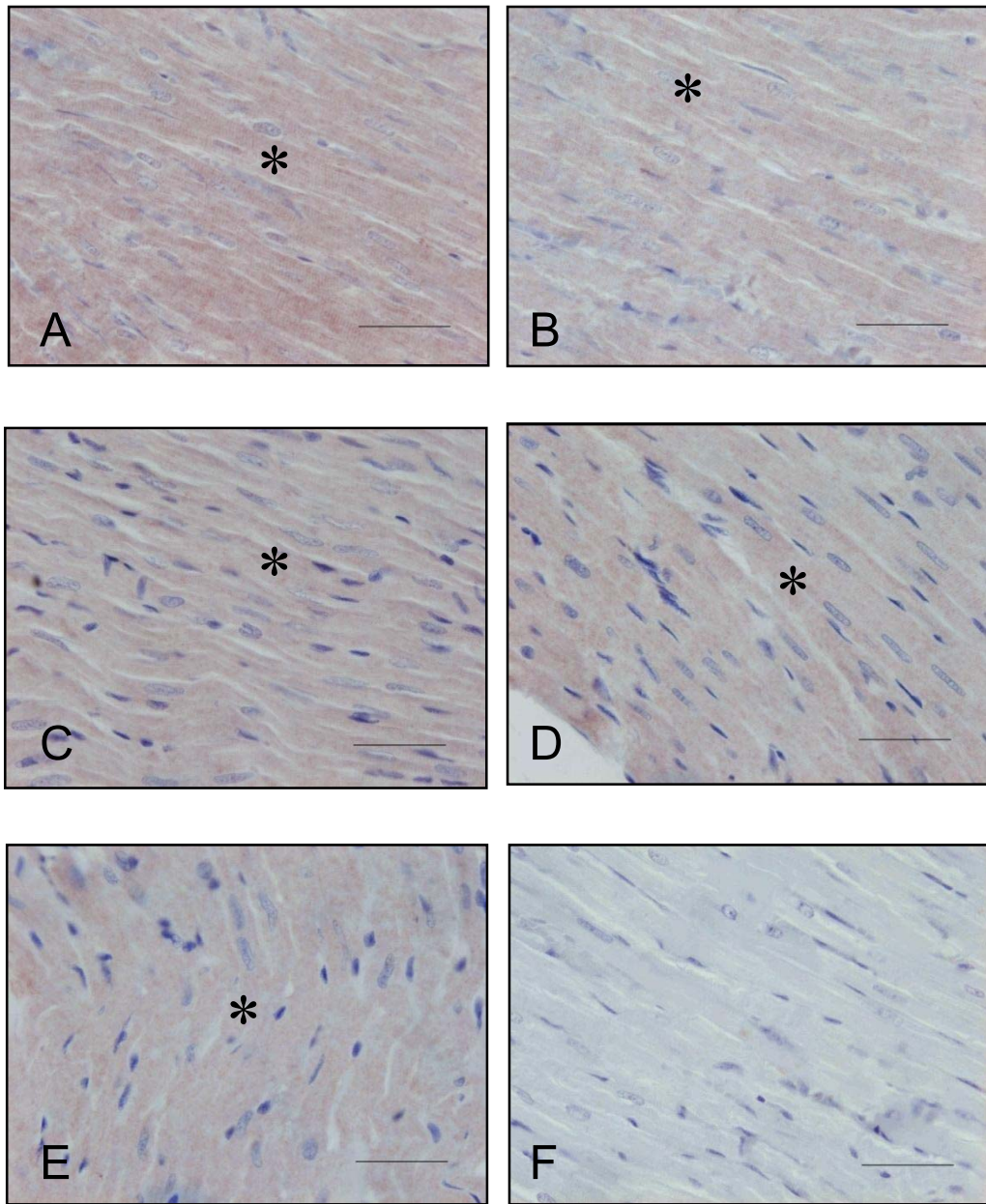
6. ปฏิกริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β (ER β) ในกล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

จากการศึกษาพบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β (*, สีน้ำตาลแดง) ในชั้น stroma (S) ชั้น theca interna (TI) และชั้น granulose cell (G) ในรังไข่ของหนู (รูปที่ 3-7A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β ในชั้น stroma ชั้น theca interna และชั้น granulose cell ในรังไข่ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-7B)

จากการศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β ในกล้ามเนื้อหัวใจหนูพบว่าทุกกลุ่มมีปฏิกริยาอิมมูโนน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) (รูปที่ 3-8A) เทียบกับหนูในกลุ่มที่มีการตัดรังไข่ (OVX) (รูปที่ 3-8B) พบว่ามีปฏิกริยาอิมมูโนที่ลดลง และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10, 20 และ 40 ไมโครกรัม/กก. ในกลุ่ม Es10, Es20 และ Es40 (รูปที่ 3-8 C-E) ตามลำดับ พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรีของ ER β มีสีของปฏิกริยาที่เข้มขึ้นเล็กน้อย สำหรับกลุ่มควบคุมเชิงลบไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β (รูป 3-8F)



รูปที่ 3-7 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β (*, สีน้ำตาลแดง) ที่พบในรังไข่ของหนู (A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER β ในรังไข่หนูที่เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (B) (scale bar = 40 μ m)

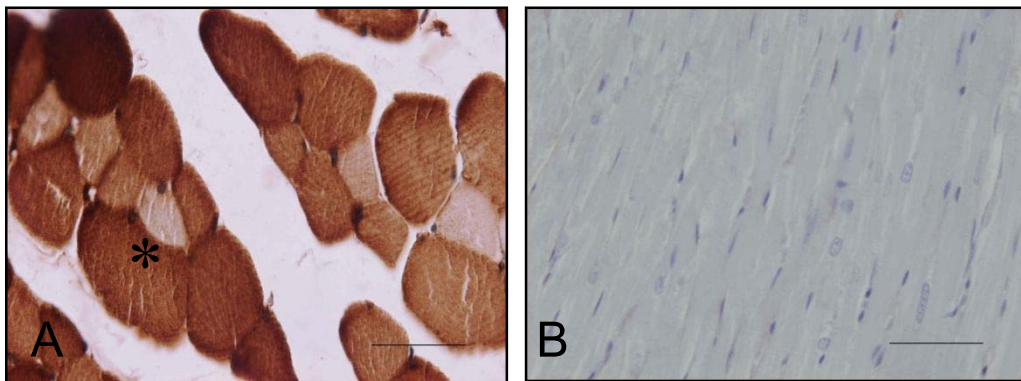


รูปที่ 3-8 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER β (*, สีนํ้าตาลแดง) ที่พบในไฮโปทาลามัสของเซลล์
กล้ามเนื้อหัวใจหนูกลุ่ม sham (A), OVX (B), Es10 (C), Es20 (D) และ Es40 (E) แต่
ไม่พบในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (F) (scale bar = 40 μ m)

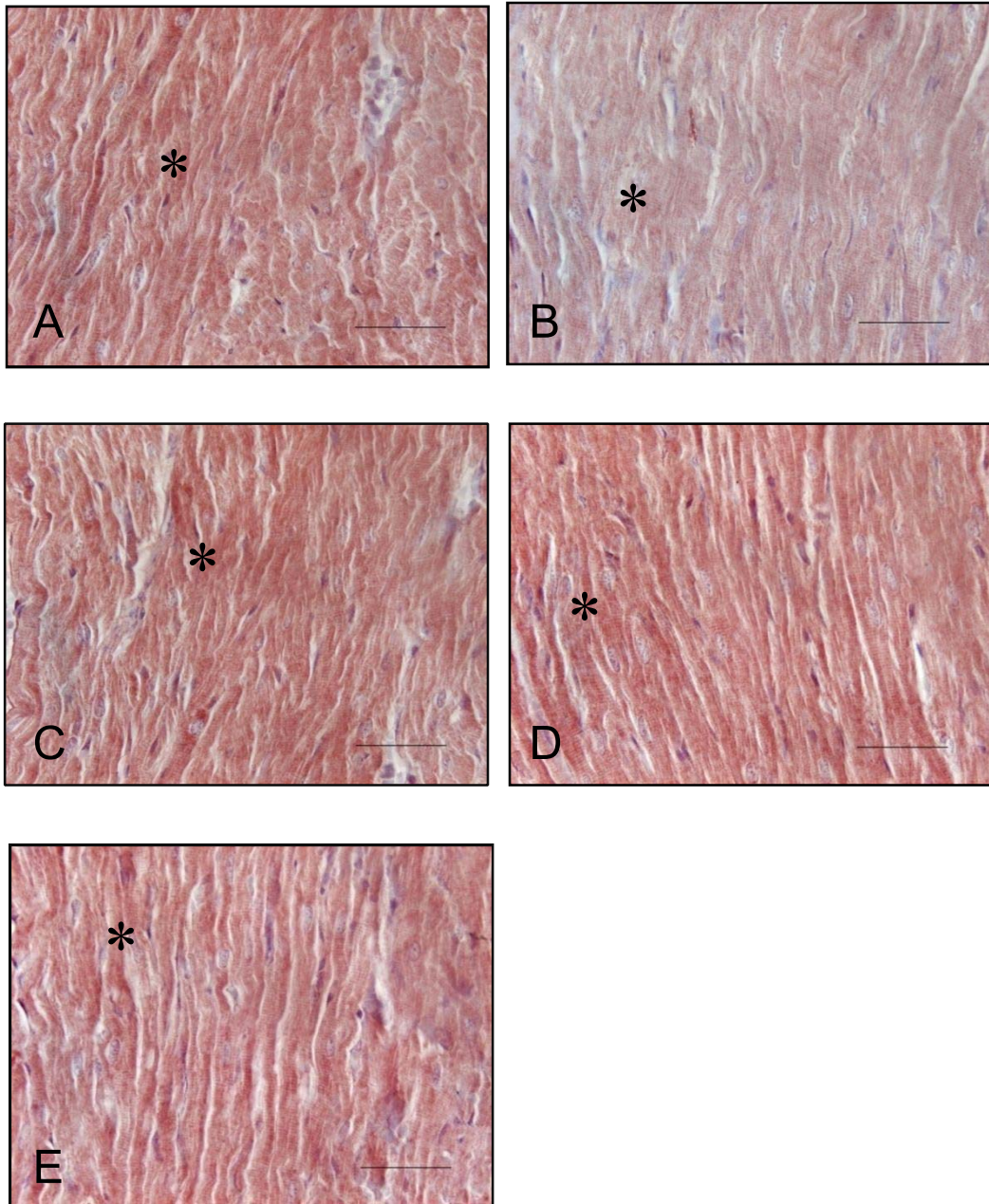
7. ปฏิกริยาอิมมูโนของโปรตีน parvalbumin (PV) ในกล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสทรี

จากการศึกษาพบว่าปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในกล้ามเนื้อ EDL ซึ่งติดสีน้ำตาล (*, สีน้ำตาลแดง) ไม่สม่ำเสมอ โดยบางเซลล์พบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV มาก และบางเซลล์พบได้น้อย (รูปที่ 3-9A) แต่ไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-9B)

และเมื่อเปรียบเทียบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจพบว่าการติดสีของปฏิกริยาดังกล่าวมีความสม่ำเสมอตลอดทั้งเซลล์ ในกลุ่ม OVX (รูปที่ 3-10B) พบว่าสีของปฏิกริยาอิมมูโนมีสีที่จางลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham (รูปที่ 3-10A) และเมื่อได้รับฮอร์โมนทดแทนในกลุ่ม Es10, Es20 และ Es40 (รูปที่ 3-10 C-E ตามลำดับ) พบว่าสีของปฏิกริยาอิมมูโนมีสีที่เข้มขึ้น โดยในกลุ่ม Es10 มีสีของปฏิกริยาอิมมูโนใกล้เคียงกับกลุ่ม sham ส่วนในกลุ่ม Es20 และ Es40 การติดสีของปฏิกริยาอิมมูโนมีสีที่เข้มกว่ากลุ่ม sham



รูปที่ 3-9 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ PV (*, สีน้ำตาลแดง) ในกล้ามเนื้อ EDL ซึ่งใช้เป็น ตัวควบคุมเชิงบวก (3-9A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในเนื้อเยื่อหัวใจหนูที่ใช้เป็นตัวควบคุมเชิงลบ (3-9B) (scale bar = 40 μ m)

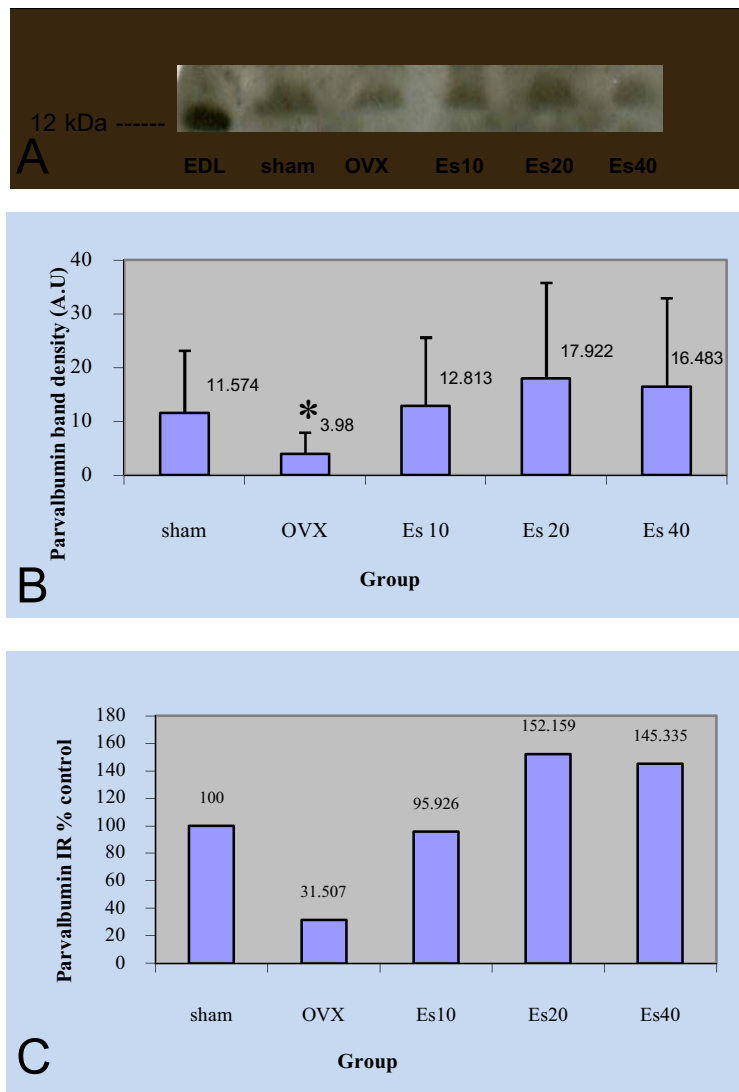


รูปที่ 3-10 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ PV (*, สีน้ำตาลแดง) ที่พบในไฮโดพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจหนูกลุ่ม sham (A), OVX (B), Es10 (C), Es20 (D) และ Es40 (E) ตามลำดับ ปฏิกิริยาอิมมูโนของ PV ลดลงในกลุ่ม OVX และ เพิ่มขึ้นใน Es10, Es20 และ Es40 (scale bar = 40 μ m)

8. การแสดงออกของโปรตีน parvalbumin (PV) ในกล้ามเนื้อหัวใจโดยเทคนิค

เวสเทิร์นบลอต

การวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการแสดงออกของ PV ทางสถิติ พบว่าหนูในกลุ่ม OVX ปริมาณของ PV มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และเมื่อได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน พบว่าปริมาณของ PV มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น (sham = 100%, OVX = 31.51%, Es10 = 95.93%, Es20 = 152.16% และ Es40 = 145.34%) ดังรูปที่ 3-11



รูปที่ 3-11 (A) ภาพเอกซเรย์แถบโปรตีน PV ในหัวใจหนู (B) แสดงความเข้มของแถบโปรตีน PV * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (C) แสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของ PV เทียบกับกลุ่ม sham (n=8)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาการเพิ่มของน้ำหนักตัว และอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวในสัตว์ทดลองพบว่า หนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และมีการเพิ่มขึ้นของอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (sham) โดยการเพิ่มนี้เกิดจากการสะสมของเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่ง Rosa และคณะ (2009) ได้อธิบายว่าหนูที่ได้รับการตัดรังไข่จะมีปริมาณของธาตุเหล็ก (iron) และ transferrin ion binding capacity ในซีรัมที่ลดต่ำลง ส่งผลให้ลด binding activity ของ iron regulatory proteins (IRP1) ใน peritoneal และ subcutaneous adipose tissue ทำให้ปริมาณไขมันใน adipose tissue เพิ่มจำนวนขึ้น ทั้งนี้เพื่อเป็นกลไกการป้องกันการเกิด iron-induce oxidative stress การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทำให้เพิ่มการทำงานของ IRP1 จึงลดการสะสมของไขมัน น้ำหนักตัวของหนูในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนในปริมาณ 10 ไมโครกรัม/กก. (Es10), 20 ไมโครกรัม/กก. (Es20) และ 40 ไมโครกรัม/กก. (Es40) จึงมีค่าที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (sham)

หนูในกลุ่ม OVX มีน้ำหนักมดลูกรวมทั้งน้ำหนักตัวลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ซึ่ง Hubscher และคณะ (2005) ได้อธิบายว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่ส่งผลให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถกระตุ้นให้ functional layer ของมดลูกเกิดการแบ่งเซลล์ให้หนาตัวขึ้นได้ จึงส่งผลให้น้ำหนักของมดลูกรวมทั้งน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวลดลง หนูในกลุ่ม OVX มีน้ำหนักหัวใจรวมทั้งน้ำหนักตัว/น้ำหนักตัว ที่ไม่แตกต่างกันทั้งนี้อาจจะเป็นเพราะมีการตัดรังไข่แต่จำนวนเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ยังไม่ลดลง มีเพียงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนบางชนิดที่ลดลง ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน มีน้ำหนักมดลูก รวมทั้งน้ำหนักตัวมดลูก/น้ำหนักตัว ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham เพราะยังมีการแบ่งเซลล์เหมือนธรรมชาติ

การทำ vaginal smear ในหนูกลุ่ม sham สามารถตรวจพบ estrous cycle ได้ครบทั้ง 4 ระยะ ได้แก่ proestrus, estrus, metestrus และ diestrus ในจำนวนตัวที่ใกล้เคียงกัน แต่ในกลุ่ม OVX ตรวจพบได้เพียงระยะเดียวคือ diestrus ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกันกับการทดลองของ Hubscher และคณะ (2005) ที่พบว่า การตัดรังไข่จะหยุดวงจรของ estrous cycle ไว้ที่ระยะ diestrus เนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนมาเหนี่ยวนำให้เกิด estrous cycle เยื่อบุผิวจึงไม่มีการเจริญ และเพิ่มขนาด (Koss, 1998) สำหรับหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในกลุ่ม Es10 และ Es20 ตรวจพบ estrous cycle ได้ 3 ระยะ ได้แก่ proestrus, estrus และ diestrus แต่ไม่พบระยะ metestrus ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนโดยการฉีดทุกวันทำให้มี กลไกการออกฤทธิ์ที่ไม่เหมือนกลไกตามธรรมชาติจึงทำให้ไม่สามารถตรวจพบระยะนี้ได้ อีกทั้งระยะ metestrus จะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยมีการลดลงของปริมาณฮอร์โมนเอสโตร

เจนในช่องคลอด ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด leukocyte เคลื่อนตัวเข้ามา (Montes and Luque, 1988) แต่การฉีดฮอร์โมนทดแทนทุกวันอาจเป็นการกระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุผิวมีการเจริญ อยู่ตลอดเวลาจึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ไม่มีการหลุดลอกของชั้นเยื่อบุผิว สำหรับกลุ่ม Es40 ตรวจ พบ 2 ระยะได้แก่ proestrus และ estrus ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์มีการเจริญและแบ่งเซลล์ ตลอดเวลา ทั้งนี้เป็นเพราะการได้รับฮอร์โมนในปริมาณที่สูงอยู่ตลอดเวลา ทำให้เกิดการกระตุ้นการ แบ่งเซลล์ของเยื่อบุผิว จึงทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดการเจริญที่ผิดปกติของเซลล์ ดังนั้นจึง ไม่ควรได้รับติดต่อกันเป็นเวลานาน

จากการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor (ER) พบทั้งชนิด α และ β ภายในกล้ามเนื้อหัวใจหนู ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jankowski และคณะ (2001) และ Grohe และคณะ (1998) นอกจากนี้ผลการศึกษายังพบว่า $ER\alpha$ น่าจะมีมากกว่า $ER\beta$ ซึ่งผล การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของของ Jankowski และคณะ (2001) ที่พบว่าในหัวใจหนูวัย หนูเพศผู้มีปริมาณ mRNA และโปรตีนของ $ER\alpha$ มากกว่า $ER\beta$

จากผลการศึกษาในครั้งนีพบว่าหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) มีปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER ลดลงมาก ซึ่งอาจจะมีสาเหตุมาจากการที่มีปริมาณของ ER ลดลง การที่ปริมาณฮอร์โมน เอสโตรเจนลดลงในหนูกลุ่ม OVX สัมพันธ์กับการลดลงของ estrogen receptor ทั้ง 2 ชนิด โดยเฉพาะชนิด α นั้น อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากกลไกการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้นมี 2 pathway ได้แก่ pathway ที่จับกับ estrogen receptor (ER-dependent pathway) ที่ผนังเซลล์ หรือภายในนิวเคลียส และ pathway ที่ไม่ได้ขึ้นอยู่กับ estrogen receptor (ER-independent pathway) โดยถูกเมตาบอลิซึมที่ตับโดยเอนไซม์ CYP450 แล้วจึงได้สารที่มีผลต่อการทำงานของ หัวใจ ดังนั้นเมื่อระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง จะมีกลไกการทำงานผ่าน ER-independent pathway ซึ่งจะส่งผลให้ estrogen receptor ลดลง แต่เมื่อได้รับฮอร์โมนทดแทน ทำให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้การทำงานของเอสโตรเจน ผ่าน pathway ชนิด ER-dependent pathway มากขึ้น จึงอาจจะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ estrogen receptor ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่าปฏิกิริยาอิมมูโนของ $ER\alpha$ เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับ ฮอร์โมนมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 20 และ 40 ไมโครกรัม/ กก. นั้นมีปฏิกิริยาอิมมูโนมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งการศึกษาในครั้งนีสอดคล้องกับ การศึกษาของ Jankowski และคณะ (2001) โดยพบว่า ทั้งโปรตีน และ mRNA ของ $ER\alpha$ ใน ส่วนของหัวใจห้องบนซ้าย และบนขวา เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ใน ขณะเดียวกันผลการศึกษาครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันกับ $ER\beta$ ด้วย แต่ เนื่องจากปริมาณ $ER\alpha$ มีมากกว่า $ER\beta$ อย่างชัดเจน จึงคิดว่าส่วนที่เกี่ยวข้องกับการ เปลี่ยนแปลงของ PV น่าจะผ่านการทำงานของ $ER\alpha$ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การศึกษาในอนาคตให้ลึก ลงไปถึงกลไกของการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการแสดงออกของ ER เช่นศึกษาถึงระดับ ของ mRNA ของ $ER\alpha$ และ $ER\beta$ ในหัวใจส่วน ventricle ทั้ง 2 ห้อง

จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนหลังจากมีการตัดรังไข่ไม่นาน จึงเห็นการเพิ่มขึ้นของ ER แต่หากถูกตัดรังไข่เป็นระยะเวลาสั้นแล้วให้ฮอร์โมนทดแทนในภายหลังจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเช่นใด จึงนำไปสู่ความน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปว่าการให้ฮอร์โมนทดแทนหลังจากตัดรังไข่ทิ้งไว้นานขึ้นว่าจะเกิดผลอย่างไรต่อ ER การให้ฮอร์โมนทดแทนในปริมาณที่สูงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของ ER α ได้มากขึ้นโดยอาจจะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของโปรตีนบางชนิด ซึ่งอาจจะเป็นผลที่ดีต่อการทำงานของหัวใจ แต่ทั้งนี้ต้องดูผลของการเปลี่ยนแปลงต่ออวัยวะอื่นเพิ่มขึ้นไปด้วย

ผลการศึกษาระดับของ parvalbumin (PV) ในกล้ามเนื้อหัวใจหนูที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) ซึ่งเปรียบได้กับสตรีในวัยหมดประจำเดือน (Bosse and Paolo, 1995) พบว่า ระดับของ PV ลดลงในกลุ่มที่ตัดรังไข่ และการได้รับฮอร์โมนทดแทนสามารถเพิ่มปริมาณของ PV ในกล้ามเนื้อหัวใจ ในการที่กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่แล้วส่งผลให้ PV ลดลงนั้นอาจจะมีสาเหตุมาจากการลดลงของ ER α เนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีน และการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยการแพร่เข้าสู่เซลล์และเข้าจับกับ ER แล้วเข้าจับที่บริเวณ promoter ใน DNA ของ target gene ซึ่งจะชักนำให้เกิดกระบวนการ transcription (Osborne et al., 2000) ซึ่งนำไปสู่การสร้างโปรตีน ดังนั้นเมื่อเอสโตรเจนและ ER α ลดลงอาจจะส่งผลให้กระบวนการดังกล่าวข้างต้นลดลง จึงอาจจะส่งผลให้การสร้าง PV ลดลงด้วย และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนส่งผลให้มี ER α เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจจะส่งผลให้มีการสร้างของ PV เพิ่มขึ้น โดยกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนในปริมาณที่สูง Es20 และ Es40 นั้นพบว่ามีเพิ่มของระดับ PV มากกว่ากลุ่มควบคุม และสัมพันธ์กับ ER α ที่เพิ่มมากในกลุ่ม Es20 และ Es40 เช่นเดียวกัน จึงอาจกล่าวได้ว่า การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในขนาดที่สูง อาจจะส่งผลดีต่อการทำงานของหัวใจ ดังนั้นอาจนำไปสู่ความสนใจในการศึกษาต่อไป ถึงผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการทำงานของหัวใจ ในหนูปกติที่ไม่ได้มีการตัดรังไข่ หรือไม่ได้เป็นวัยหมดประจำเดือน

จากการศึกษาในครั้งนี้พบการลดลงของ ER และ PV ในกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ ER และ PV ได้โดย Collins และคณะ (1993) กล่าวว่า การได้รับฮอร์โมนทดแทนทำให้การทำงานของหัวใจในช่วงการคลายตัวดีขึ้น โดยอาจเป็นผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อ calcium antagonistic ซึ่งนำผลการศึกษาในเรื่องของ PV ที่ได้ในครั้งนี้มาอธิบายค่ากล่าวข้างต้นได้ว่า ในภาวะที่หมดประจำเดือน หรือภาวะที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างของร่างกายทำให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน และ ER α ลดต่ำลงส่งผลให้ปริมาณการสร้าง PV ในกล้ามเนื้อหัวใจลดลง ซึ่งอาจจะส่งผลให้การคลายตัวในหัวใจห้องล่างลดลงด้วย และเมื่อได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน และ ER α เพิ่มขึ้นจนส่งผลให้การสร้าง PV เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นของ PV อาจมีผลทำให้การดึงแคลเซียม จาก troponin C เกิดได้ดีขึ้น ประสิทธิภาพในการคลายตัวของหัวใจจึงดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางคลินิก ในการศึกษาการทำงานของหัวใจในสตรีวัยหมด

ประจำเดือน ซึ่งพบว่าการบปกรองของการคลายตัวของหัวใจห้องล่าง (ventricle) (Tresh and McGough, 1995) และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทำให้การคลายตัวของหัวใจห้องล่างดีขึ้น (Yildirim et al., 2001) จึงอาจจะกล่าวได้ว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้การคลายตัวของหัวใจดีขึ้น ผ่านทางกลไกการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน PV และอาจช่วยลดการเกิดโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน

บทที่ 5

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในภาวะที่ร่างกายขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้ปริมาณของ estrogen receptor และโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อหัวใจลดลง ซึ่งอาจจะทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน โดยอธิบายได้ว่า เมื่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดลดลง ส่งผลให้เกิดการลดลงของ estrogen receptor ทำให้การสร้างโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อหัวใจลดลง ส่งผลให้การคลายตัวของหัวใจล่าช้าจนอาจทำให้เกิดโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิก ในขณะที่การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทำให้การแสดงออกของ estrogen receptor และโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อหัวใจเพิ่มมากขึ้น ทำให้การจับแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจดีขึ้น หัวใจจึงคลายตัวได้ดี ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้อาจจะใช้เป็นแนวทางในการรักษา หรือป้องกันโรคหัวใจล้มเหลวชนิดไดแอสโตลิกในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ โดยเลือกให้ฮอร์โมนทดแทนในปริมาณที่ต่ำ (low dose) เนื่องจากเมื่อพิจารณาถึงผลกระทบต่ออวัยวะอื่น เช่นมดลูก การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนในปริมาณที่สูงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ estrous cycle แบบไม่สอดคล้องกับธรรมชาติ ซึ่งอาจจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติของมดลูกได้โดยเห็นได้จากกลุ่ม Es40 ที่ตรวจพบ estrous cycle เพียงแค่ 2 ระยะเวลาคือ proestrus และ estrus ซึ่งทั้งสองระยะนี้เซลล์มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอยู่ตลอดเวลาจึงอาจเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งในมดลูก ดังนั้นการให้ฮอร์โมนทดแทนเพื่อช่วยการทำงานของหัวใจจึงต้องคำนึงถึงผลกระทบต่ออวัยวะอื่นด้วย แต่เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยดูปัจจัยของการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างเดียว ในขณะที่วัยหมดประจำเดือนจะมีปัจจัยเรื่องของอายุหรือความเสี่ยงจากอายุด้วย จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในกลุ่มที่มีอายุมาก รวมถึงการศึกษาการคลายตัวของหัวใจโดยตรง อีกทั้งการศึกษาในครั้งนี้ศึกษาโดยการตัดรังไข่ทิ้งไว้ 2 สัปดาห์ แล้วให้ฮอร์โมนทดแทน อาจทำให้การลดลงของฮอร์โมนในร่างกายยังไม่มากนัก ดังนั้นเมื่อให้ฮอร์โมนทดแทนเข้าไปอาจทำให้ร่างกายสามารถปรับตัวสู่ภาวะการทำงานที่ปกติได้เร็ว แต่หากในสภาวะที่ร่างกายขาดฮอร์โมนเป็นระยะเวลาเวลานานขึ้น เช่นการตัดรังไข่ทิ้งไว้ 12 สัปดาห์ขึ้นไป การได้รับฮอร์โมนทดแทนจะยังสามารถกระตุ้นการสร้าง parvalbumin ในหัวใจเพิ่มขึ้นได้อีกหรือไม่ จึงอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต และการศึกษาโดยการให้ฮอร์โมนในครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในขนาดเดียวกันทุกวัน ซึ่งอาจส่งผลให้กลไกการออกฤทธิ์ไม่เหมือนกันกับในธรรมชาติโดยเห็นได้จากการไม่พบระยะ metestrus ในหนูที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนในกลุ่ม Es10 และ Es20 ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปอาจจะต้องเปรียบเทียบการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในขนาดเดียวกันทุกวัน กับการให้ฮอร์โมนทดแทนในขนาดต่าง ๆ กันในแต่ละช่วงของ menstrual cycle

ซึ่งเป็นการให้ฮอร์โมนชนิดเลียนแบบธรรมชาติของร่างกาย ว่าการให้ฮอร์โมนแบบใดมี
ประสิทธิภาพสูงสุดต่อการทำงานของหัวใจ และต่ออวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย

บรรณานุกรม

กนกธร ปิยธำรงรัตน์. 2546. เนื้อเยื่อวิทยา. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ ๙. หน้า 333-334

กিজจา สว่างเจริญ. 2533. ฮอโมนเพศและการคุมกำเนิด. ภาควิชาเภสัชวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อลิสา สุวัฒน์ปุระ. 2545. สรีรวิทยา. สงขลา: ภาควิชาสรีรวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Auigemma, G.P., Gaasch, W.H., Mclaughlin M., Mcginn, R., Sweeney, A. and Meyer, T.E. 1995. Reduced left ventricular systolic pump performance and depressed myocardial contractile function in patients > 65 years of age with normal ejection fraction and high relative wall thickness. *Am J cardiol.* **76**: 702-705.

Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. and Nilsson, S. 1998. Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonist. *Mo Pharmacol.* **54**: 105-112.

Bers, D. M. 2002 Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature.* **415**: 198-205.

Berchtold, M. W., Celio, M. R., and Heizmann, C. W. 1984 Parvalbumin in nonmuscle tissues of the rat. Quantification and immunohistochemical localization. *J . Biol. Chem.* **259**: 5189-5196.

Berchtold, M.W., Brinkmeier, H. and Muntener, M. 2000. Calcium ion skeletal muscle: Its crecial role for muscle and function, plasticity and disease, *Physiology Rev.* **80**: 1216-1265.

Bosse, R., Paola, I.D.1995. Dopamine and GABA_A receptor imbalance after ovariectomy in rat model of menopause. *L Phychiaty Neurosci.* **20**: 271-364.

- Burger, H.G. 2001. Physiological principles of endocrine replacement: estrogen. *Horm. Res.* **56**: 82-85
- Capasso, J.M., Remily, R.M., Smith, R.H. and Sonnenblick, E.H. 1983. Sex differences in myocardial contractility in the rat. *Basic Res. Cardiol.* **78**: 156-171.
- Cavasin, M.A., Sankey, S.S., Yu, A.L., Mennon, S. and Yang, X.P. 2003. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **284**: 1560-1569.
- Chu, S.H., Goldspink, K., Kowalski, J., Beck, J., Schwertz, D.W. 2006. Effect of estrogen on calcium-handing protein, β -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Science.* **79**:1257-1267..
- Collin, P., Rosano, G.M.C., Jiang, C., Lindsay, D., Sarrel, P.M. and Poole-Wilson, P.A. 1993. Cardiovascular protection by estrogen a calcium antagonist effect?. *Lancet.* **341**: 1264-1265.
- Coutu, P., Hirsch, J.C., Szatkowski, M.L., Metzger, J.M. 2003. Targeting diastolic dysfunction by genetic engineering of calcium handing protein. *Trends Cardiovasc Med.* **13**: 63-67.
- Czubryt, MP., Espira, L., Lamoureux, L., Abrenica, B. 2006. The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiole Pharmacol.* **84**: 93-109.
- DeLano, W. 2002. The PyMol molecular graphics system DeLano Scientific. San Carlos. CA.
- Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Jackson, E.K. and Keller, P.J. 1998. 17 beta-estradiol, Its metabolites, and progesterone inhibit cardiac fibroblast growth. *Hypertension.* **31**: 522-528.

- Ducatman, B.S. and Wang, H.H. 2002. The Pap Smear: controversies in Practice. Arnold Publishers, London.
- Endo, T., Takazaw, K. and Onaya, T. 1985. Parvalbumin exists in rat endocrine glands. *Endocrinology*. **117**: 527-531.
- Feder, H.H. 1981. Estrous cyclicity in animals. In: Neuroendocrinology of Reproduction, Adler NT, Ed. Plenum Press. *New York*. 279-348.
- Freeman, M.E. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. In: The Physiology of reproduction. Knobil E, Neill JD, Eds. Raven Press. *Newyork*. 613-658.
- Golden, K.L., Marsh, J.D., and Jing, Y. 2002. Castration reduces mRNA levels for calcium regulatory proteins in rat heart. *Endocrine*, **19**: 339-344.
- Golden, K.L., Marsh, J.D., Jiang, Y., Brown, T., and Moulden, J. 2003. Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am. J. physiol. Endocrinol. Metab.* **285**: 449-453.
- Goldstein, J., Sites, C.K., and Toth, M.J. 2004. Progesterone stimulates cardiac muscle protein synthesis via receptor-dependent pathay. *Fertil. Steril.* **82**:430-436.
- Greenspan, F.S. and Strewler, G.J. 1997. Basic & clinical endocrinology. Lange Medical Publication, Los Altos, Calif.
- Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, K., Stimpel, M., Karas, R.H., Vetter, H., and Neyses, L. 1997. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett.* **416**: 107-112.
- Grohe, C., Kahlert, S., Lobbert, R. and Vetter, H. 1998. Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J. Endocrinol.* **156**: 1-7.

- Gross, M.L., Ritz, E., Korsch, M., Adamczak, M., Weckbach, M., Mall, G., et al. 2005. Effects of estrogens on cardiovascular structure in uninephrectomized SHRsp rats. *Kidney Int.* **67**:849-857.
- Guo, X., Razandi, M., Pedram, A., Kassab, G., and Levin, E.R. 2005. Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J. Biol. Chem.* **280**: 19704-19710.
- Harada, N., Sasano, H., Murakami, H., Ohkuma, T., Nagura, H., and Takagi, Y. 1999. Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ. Res.* **84**: 1285-1291.
- Haward, C.S., Webb, C.M. and Collins, P. 2001. Effect of sex hormones on cardiac mass. *The Lancet.* **357**: 1354-1356.
- Hayward, C.S., Kalnins, A.V., Kelly, R.P., 2000. Gender-related differences in left ventricular chamber function. *Cardiovasc Res.* **49**:340-350.
- Heizmann, C.W., Berchtold, M.W., Rowlerson, A.M. 1982. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscle. *Proc Natl Acad Sci USA.* **79**: 7243-7247.
- Hirata, S., Shoda, T., Kato, J., and Hoshi, K. 2003. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol. Metab.* **14**: 124-129.
- Hiroi, H., Inoue, S., Watanabe, T., Goto, W., Orimo, M., Momoeda, M., Tsutsumi, O., Taketani, Y. and Muramatsu, M. 1999. Differential immunolocalization of estrogen receptor α and β in rat ovary and uterus. *Jornal of Molec Endoc.* **22**. 37-44.
- Hubscher, CH., Brooks, DL. And Johnson, JD. 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech & Histochemistry.* **80(2)**: 79-86.

- Inguma, Y., Kurobe, N., Shinohara, H., Kato, K. 1991. Sensitive immunoassay for rat parvalbumin: tissue distribution and development changes. *Biochem Biophys Acta*. **235**: 67-73.
- Jankowski, M., Rachelska, G., Donghao, W., McCann, S.M. and Gutkowska, J. 2001. Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in rat heart. *PNAS*. **98**: 11765-11770.
- Jiang, M.T. and Narayonon, N. 1990. Effects of aging on phospholambar phosphorelation and calcium transport in rat cardiac sarcoplasmic reticulum. *Mech Aging Dev*. **54**: 87-101.
- Knowlton, A.A. and Sun, L. 2001. Heart-shock factor-1, steroid hormones, and regulation of heat-shock protein expression in the heart. *Am. J. Physiol. Heart. Am. J. Physiol.* **280**: 455-464.
- Koss, L.G. 1998. Gynecologic Cytopathology. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kretsinger, R. 1975. Hypothesis: calcium-modulated proteins contain EFhands. In *Calcium Transport in Contraction and Secretion* (ed. Carafoli) North Holland Publishing, Amsterdam. 469.
- Kretsinger, R.H. and Nelson, D.J. 1976. Calcium in biological systems. *Coord Chem Rev* **18**:29–124.
- Kretsinger, R.H. 1980. Structure and evolution of calcium-modulated proteins. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **8**: 119–174.
- Kuiper, G., Enmark, E., Pelo-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafson, J.A. 1996. Cloning of novel estrogen receptor expression in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 5925-5930.

- Kuiper, G., Lemmen, J., Carlsson, B., Carton, J.C., Safe, S.H., van der Saang, P.T., van de Burg, B. and Gustafsson, J.A. 1998. Interaction of estrogenic chemical and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. **139**: 4252-4263.
- Kumar, V., Green, S., Staub, A. and Chambon, P. 1986. Localization of the oestradiol binding and putative DNA-binding domains of the human oestrogen receptor. *EMBO J*. **5**: 2231-2236.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R. and Chambon, P. 1987. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. **51**: 941-951.
- Lee, Y.H., Tanner, J.J. and Larson, J.D. 2004. Crystal structure of a high-affinity variant of rat parvalbumin. *Biochemistry*. **43**: 1008-1017.
- Lorell, B.H. 1999. Significance of diastolic dysfunction of the heart. *Annu. Rev. Med.* **42**:411-436
- Long, J.A. and Evans, H.M. 1992. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Mem. Univ. California* **6**: 1-148.
- Mandinove, L., F. R., Seiler, C. and Hess, B.H. 2000. Diastolic heart failure. *Cardiovasc. Res.* **25**: 813-825
- Marsh, J.D., Lehmann, M.H., Ritchie, R.H., Gwathmey, J.K., Green, G.E. and Schiebinger, R.J. 1998. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*. **98**: 256-261.
- Martel, C., Melner, M.H., Gagne, D., Simard, J., and Labrie, F. 1994. Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 betaHSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey. *Mol. Cell. Endocrinol.* **104**: 103-111.

- McClung, J.M., Davis, J.M. Wilson, M.A., Goldsmith, E.C., Carson, J.A. 2006. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol.* **100**: 2012-2023.
- Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H. 2008. The protective effects of estrogen on the cardiovascular System. *Mechaniems of disease.* **340**: 1801-1811.
- Mercier, I., Colombo, F., Mander, S., and Calderone, A. 2002. Ovarian hormones induce TGF-beta(3) and fibronectin mRNAs but exhibit a disparate action on cardiac fibroblast proliferation. *Cardiovasc. Res.* **53**: 728-739.
- Montes, G.S. and Luque, E.H. 1988. Effect of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Act Anat. (Basel).* **133**: 192-199.
- Morgan, J.P. 1991. Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N Engl J Med.* **190**: 301-305.
- Morgan, A.L., Nelson, S.A., Landisch, R.M., Warren, G.L., Lowe, D.A. 2007. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol.* **102**:1378-1393.
- Mosselman, S., Polman, J., Kijkema, R.1996. Identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Letters.* **392**: 49-53.
- Nakayama, S., Moncrief, N. and Kretsinger, R.H. 1992. Evolution of EF-hand calcium-modulated proteins. II. Domains of several subfamilies have diverse evolutionary histories. *J. Mol. Evol.* **34**:416-448.
- Ogawa, S., Incue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. and Muramatsu, M. 1998. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER-beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commum.* **243**: 122-126.

- Osborne, C.K., Zhao, H. and Fuqua, S.A.W. 2000. Selective estrogen receptor modulators: structure, function and clinical use. *Journal of clinical oncology*. **18**: 3172-3186.
- Patten, R.D., Pourati. i., Aronovitz, M.J., Baur, J., Celestin, F., Chen, X., Michael, A., Haq, S., Nuedling, S., Grohe, G., Froce, T., Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H. 2004. 17beta-estradiol reduces cardiomyocyte apoptosis *in vivo* and *in vitro* via activation of phosphor-inositide-3 kinase/Akt signaling. *Circ. Res.* **95**: 692-699.
- Pauls, T.L. 1996. In guidebook to the calcium binding proteins (Celio, M., ed), Oxford University Press, Oxford, U.K.
- Pedram, A., Razandi, M., Aitkenhead, M., and Levin, E.R. 2005. Estrogen inhibites cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy though induction of MCIP1. *J. Biol. Chem.* **280**: 26339-26348.
- Purohit, A., and Reed M.J. 2002 Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroid*. **67**: 797-783.
- Radenahmad, N., Vongvatcharanon, U., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2006. Serum levels of 17 β -estradiol in ovariectomized rats fed yong-coconut-juice and its effect on wound healing. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **28**: 897-910.
- Rat health note. 2004. How old is a rat in human years?. Source. <http://www.ratbehavior.org>. (accessed 10/ 04/ 09)
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Geoffrey, LG. and Ellis, R.L. 2004. Plasma Membrane estrogen receptors exist and functions as dimer. *Mol Endocrinol.* **18**: 2854-2865.

- Rosa, G.M., Irace, C., Esposito, E., Maffettone, C., Iacono, A., Pascale, A.D., Santamaria, R., Colonna, A. and Meli, R. 2009. Ovariectomy and estrogen treatment modulate iron metabolism in rat adipose tissue. *Biochem Phar.* **78**: 1001-1007.
- Schaible, T.F., Malhotra, A., Ciambone, G., and Scheurer, J. 1984. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ. Res.* **54**:38-49.
- Schmidt, U., Zhu, X., Lebeche, D., Huq, F., Guerrero, J.L., Hajjar, R.J. 2005. *In vivo* gene transfer of parvalbumin improves diastolic function in aged rat hearts. *Cardiovascular Research.* **66**: 318-323.
- Scheure, J., Malhotra, A., Schaible, T.E. and Capasso, J. 1987. Effect of gonadectomy and hormonal replacement on rat heart. *Circ Res.* **61**: 12-19.
- Senior, K. 2001. Heart failure: running to the rescue. *DDT.* **6**: 275-276.
- Sotiriadou, S., Kyparos, A., Albani, M., Arsos, G., Clark, M.S.F., Sidiras, G., Angelopoulou, N., Matziari, C. 2006. Soleus muscle force following downhill running in ovariectomized rats treated with estrogen. *Appl Physiol Nutr Metach.* **31**: 449-459.
- Spectrum Health. 2008. Basic anatomy of heart. (online). Source. www.spectrum-health.org/cs/Satellite. (accessed 10/04/09)
- Tresh, D.D. and McGough, M.F. 1995. Heart failure with normal systolic function: a common disorder in older people. *J Am Geriatr Soc.* **43**: 1035-1042.
- Tora, L., White, J., Brou, G., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E. and Chambon, P. 1989. The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activations. *Cell.* **59**: 477-487.

Vongvatcharanon, U., Vongvatcharanon, S. 2003. Location of Parvalbumin Calcium binding protein in the rat heart. *Science Asia*. **29**: 319-325.

Vongvatcharanon, U., Imsonpang, S., Promwikorn, W., and Vongvatcharanon, S. 2006. Up-regulation of Parvalbumin expression in newborn and adult rat heart. *Acta histochemica*. **108**: 447-454.

Vongvatcharanon, U. and vongvatcharanon, S. and boonyang, P. 2008. Immunohistochemical localization of parvalbumin Calcium binding protein in the heart tissue of various species. *Acta histochemica*. **110**: 26-23.

Vongvatcharanon, U., Udomuksorn, W., vongvatcharanon, S. and Sobhon, P. 2010. Age-related changes in parvalbumin in the heart of female rats. *Acta histochem*. **112**: 96-100.

Wahr, P.A., Michele, D.E. and Metzger, J.M. 1999. Parvalbumin gene transfer corrects diastolic dysfunction in diastolic myocytes. *Proc Natl Acad Sci*. **96**: 11982-11985.

Webb, P., Lopes, G.N., Uht, R.M. and Kushner, P.J. 1995. Tamoxifen activation of the estrogen receptor / AP-1 pathway: Potential origin for the cell-specific estrogen-link effects of antiestrogen. *Mol Endocrinol*. **9**: 443-456.

Webster, N.J.G., Green, S., Tasset, D., Ponglikitmongkol. M., Chambon, P. 1989. The transcription activation function located in the hormone-binding domain of the human oestrogen receptor is not encoded by a single exon. *EMBO J*. **8**: 1441-1446.

Woodhead, J.S. and Weeks, I. 1985. Chemiluminescence immunoassay. *Pure & Appl. Chem*. **57**: 523-529.

Yildirim, A., Yarali, H., Kabakci, G., Aybar, F., Akgul, F. and Bukulmez, O. 2001. Hormone replacement therapy to improve left ventricular diastolic function in healthy postmenopausal women. *International J Gynecol Obs*. **75**: 273-278

Zile, M.R. and Brutsaert, D.L. 2002a. New concepts in diastolic dysfunction and diastolic function heart failure: part I: diagnosis and measurement of diastolic function. *Circulation*. **105**: 1387-1393.

ภาคผนวก

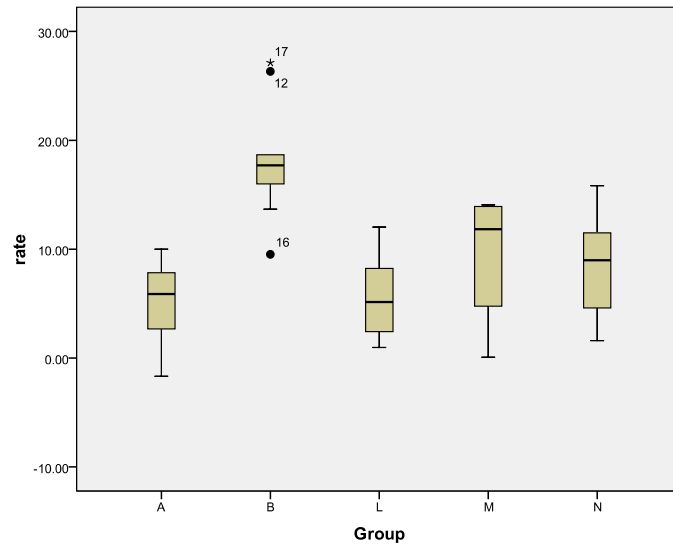
1. แสดงอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวเฉลี่ยต่อเดือน (rate) น้ำหนักหัวใจ (H.W.) น้ำหนักมดลูก (U.W.) น้ำหนักหัวใจต่อน้ำหนักตัว (Everage1) น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว (Everage 2) ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด (Estrogen) และน้ำหนักตัว (weight)

Report

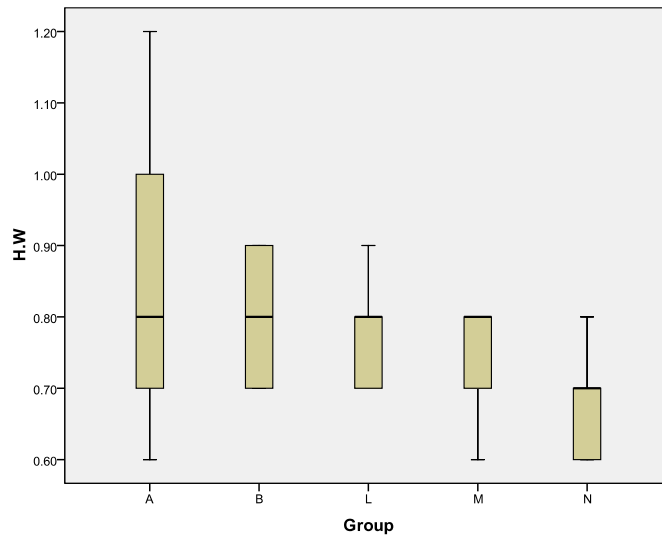
| Group | | rate | H.W | U.W | Everage1 | Everage2 | Estrogen | weight |
|-------|--------------------|---------|--------|--------|----------|----------|----------|----------|
| A | Mean | 5.0730 | .8300 | .7300 | .30540 | .27160 | 39.8520 | 269.2200 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Std. Deviation | 3.56736 | .20575 | .29078 | .032432 | .105295 | 14.88941 | 46.43875 |
| | Std. Error of Mean | 1.12810 | .06506 | .09195 | .010256 | .033297 | 4.70845 | 14.68522 |
| B | Mean | 18.1870 | .8000 | .1100 | .28930 | .03960 | 18.8010 | 277.0600 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Std. Deviation | 5.27557 | .08165 | .03162 | .027064 | .009009 | 3.62676 | 23.62128 |
| | Std. Error of Mean | 1.66828 | .02582 | .01000 | .008558 | .002849 | 1.14688 | 7.46970 |
| L | Mean | 5.4460 | .7900 | .6700 | .32970 | .28120 | 41.9660 | 239.2200 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Std. Deviation | 3.53924 | .07379 | .04830 | .033685 | .025429 | 8.20694 | 14.92409 |
| | Std. Error of Mean | 1.11921 | .02333 | .01528 | .010652 | .008041 | 2.59526 | 4.71941 |
| M | Mean | 9.3520 | .7600 | .7000 | .31310 | .28640 | 71.8370 | 243.0500 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Std. Deviation | 5.41010 | .06992 | .10541 | .022556 | .041312 | 16.61188 | 19.68571 |
| | Std. Error of Mean | 1.71082 | .02211 | .03333 | .007133 | .013064 | 5.25314 | 6.22517 |
| N | Mean | 8.8750 | .6900 | .8000 | .28740 | .34240 | 201.4700 | 240.1300 |
| | N | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| | Std. Deviation | 4.64438 | .07379 | .11547 | .023950 | .047803 | 66.03733 | 16.14284 |
| | Std. Error of Mean | 1.46868 | .02333 | .03651 | .007574 | .015117 | 20.88284 | 5.10481 |
| Total | Mean | 9.3866 | .7740 | .6020 | .30498 | .24424 | 74.7852 | 253.7360 |
| | N | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| | Std. Deviation | 6.47407 | .11920 | .29031 | .031407 | .119207 | 72.75142 | 30.37394 |
| | Std. Error of Mean | .91557 | .01686 | .04106 | .004442 | .016858 | 10.28860 | 4.29552 |

2. แสดงการกระจายตัวของข้อมูลที่มีการกระจายตัวไม่ปกติ

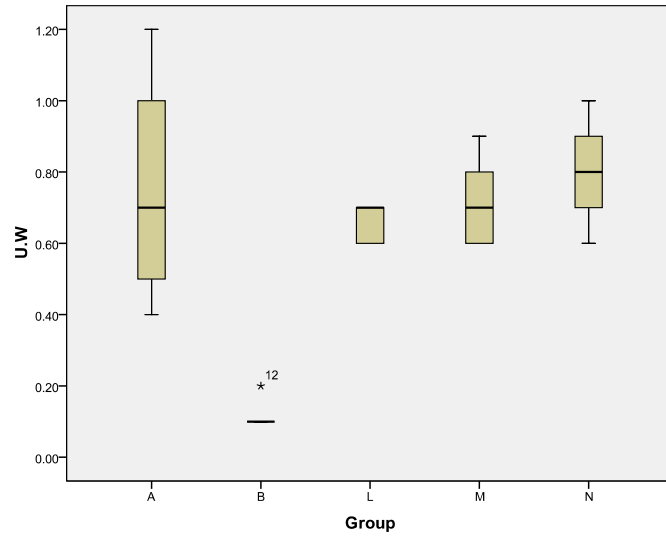
2.1 อัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัว



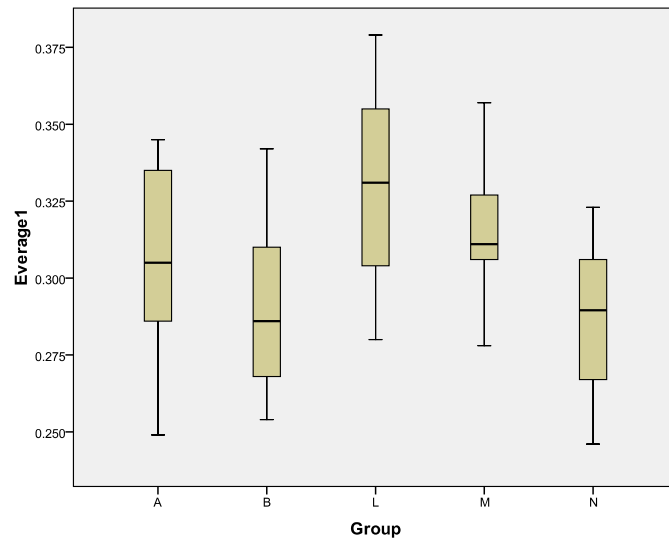
1.2 การกระจายตัวของค่าน้ำหนักหัวใจ



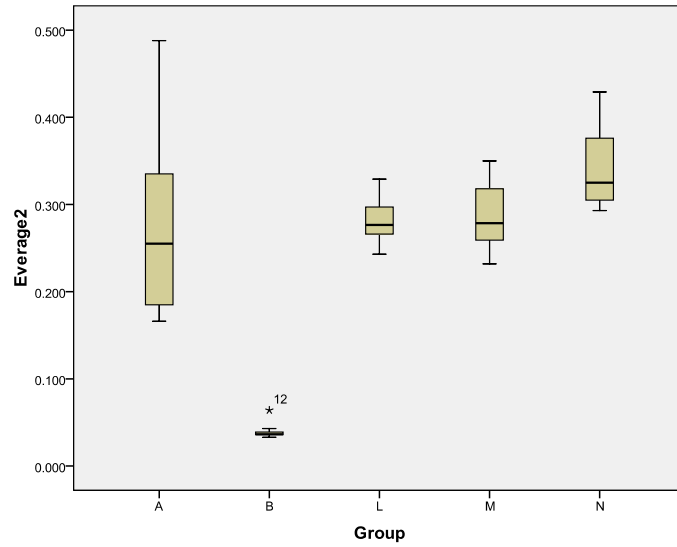
1.3 การกระจายตัวของค่าน้ำหนักมดลูก



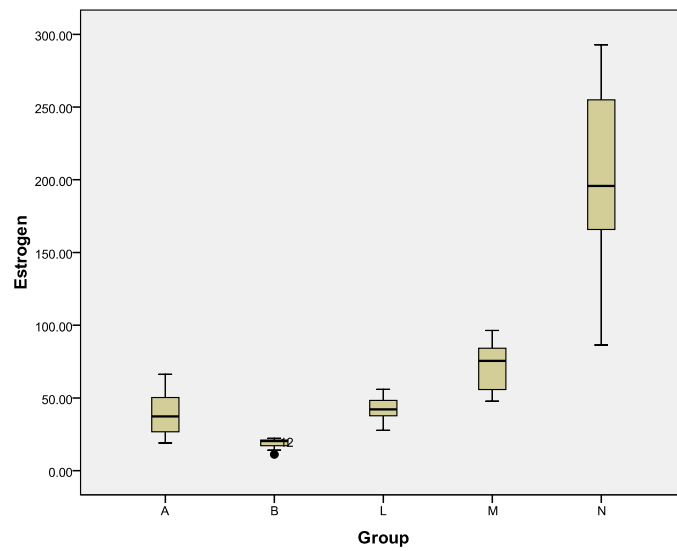
1.4 การกระจายตัวของค่าน้ำหนักหัวใจ/น้ำหนักตัว



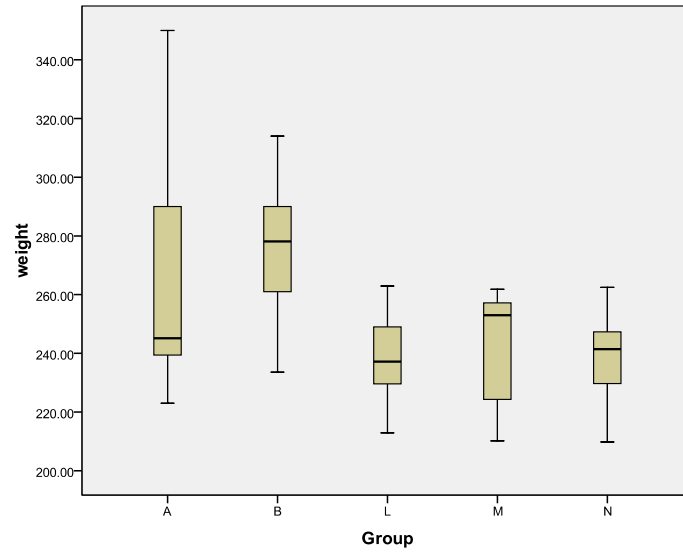
1.5 การกระจายตัวของน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัว



2.6 การกระจายตัวของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด



1.7 การกระจายตัวของน้ำหนักตัว



2. ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนของกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| rate | A | 10 | 5.60 | 56.00 |
| | B | 10 | 15.40 | 154.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | rate |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 1.000 |
| Wilcoxon W | | | 56.000 |
| Z | | | -3.704 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .000 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .000 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 2000000.

c. Grouping Variable: Group

3. ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนของกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| rate | A | 10 | 10.70 | 107.00 |
| | L | 10 | 10.30 | 103.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | rate |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| Mann-Whitney U | | | 48.000 |
| Wilcoxon W | | | 103.000 |
| Z | | | -.151 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .880 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .912 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | 1.000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .741 |
| | | Upper Bound | 1.000 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 299883525.

c. Grouping Variable: Group

4. ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนของกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

Ranks

| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|------|-------|----|-----------|--------------|
| rate | A | 10 | 8.00 | 80.00 |
| | M | 10 | 13.00 | 130.00 |
| | Total | 20 | | |

Test Statistics^c

| | | | rate | |
|--------------------------------|------|-------------------------|-------------------|------|
| Mann-Whitney U | | | 25.000 | |
| Wilcoxon W | | | 80.000 | |
| Z | | | -1.890 | |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .059 | |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .063 ^a | |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .100 ^b | |
| | | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | | Upper Bound | .286 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .000 ^b | |
| | | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | | Upper Bound | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 926214481.

c. Grouping Variable: Group

5. ทดสอบความแตกต่างของอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนของกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| rate | A | 10 | 8.30 | 83.00 |
| | N | 10 | 12.70 | 127.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | rate |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 28.000 |
| Wilcoxon W | | | 83.000 |
| Z | | | -1.664 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .096 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .105 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1314643744.

c. Grouping Variable: Group

6. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักหัวใจของกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| H.W | A | 10 | 10.30 | 103.00 |
| | B | 10 | 10.70 | 107.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | H.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 48.000 |
| Wilcoxon W | | | 103.000 |
| Z | | | -.156 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .876 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .912 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .700 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .416 |
| | | Upper Bound | .984 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 624387341.

c. Grouping Variable: Group

7. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรักหัวใจของกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| H.W | A | 10 | 10.45 | 104.50 |
| | L | 10 | 10.55 | 105.50 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | H.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| Mann-Whitney U | | | 49.500 |
| Wilcoxon W | | | 104.500 |
| Z | | | -.039 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .969 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .971 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | 1.000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .741 |
| | | Upper Bound | 1.000 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 334431365.

c. Grouping Variable: Group

8. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรักหัวใจของกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| H.W | A | 10 | 10.95 | 109.50 |
| | M | 10 | 10.05 | 100.50 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | H.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 45.500 |
| Wilcoxon W | | | 100.500 |
| Z | | | -.366 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .715 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .739 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1502173562.

c. Grouping Variable: Group

9. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรักหัวใจของกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| H.W | A | 10 | 12.60 | 126.00 |
| | N | 10 | 8.40 | 84.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | H.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 29.000 |
| Wilcoxon W | | | 84.000 |
| Z | | | -1.648 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .099 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .123 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 743671174.

c. Grouping Variable: Group

10. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักมดลูกของกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

Ranks

| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-----|-------|----|-----------|--------------|
| U.W | A | 10 | 15.50 | 155.00 |
| | B | 10 | 5.50 | 55.00 |
| | Total | 20 | | |

Test Statistics^c

| | | | H.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 29.000 |
| Wilcoxon W | | | 84.000 |
| Z | | | -1.648 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .099 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .123 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 743671174.

c. Grouping Variable: Group

11. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรวมของกล้ามเนื้อ Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| U.W | A | 10 | 10.80 | 108.00 |
| | L | 10 | 10.20 | 102.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | U.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| Mann-Whitney U | | | 47.000 |
| Wilcoxon W | | | 102.000 |
| Z | | | -.238 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .812 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .853 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | 1.000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .741 |
| | | Upper Bound | 1.000 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .700 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .416 |
| | | Upper Bound | .984 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 112562564.

c. Grouping Variable: Group

12. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรวมของกล้ามเนื้อ Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

Ranks

| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|-----|-------|----|-----------|--------------|
| U.W | A | 10 | 10.40 | 104.00 |
| | M | 10 | 10.60 | 106.00 |
| | Total | 20 | | |

Test Statistics^c

| | | | U.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--------------------|
| Mann-Whitney U | | | 49.000 |
| Wilcoxon W | | | 104.000 |
| Z | | | -.077 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .939 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .971 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | 1.000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .741 |
| | | Upper Bound | 1.000 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .600 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .296 |
| | | Upper Bound | .904 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 221623949.

c. Grouping Variable: Group

13. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรวมของกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|-------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| U.W | A | 10 | 9.35 | 93.50 |
| | N | 10 | 11.65 | 116.50 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | U.W |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 38.500 |
| Wilcoxon W | | | 93.500 |
| Z | | | -.881 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .379 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .393 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .600 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .296 |
| | | Upper Bound | .904 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 303130861.

c. Grouping Variable: Group

14. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรหัวใจ/น้ำหนักตัวของกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage1 | A | 10 | 12.30 | 123.00 |
| | B | 10 | 8.70 | 87.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage1 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 32.000 |
| Wilcoxon W | | | | 87.000 |
| Z | | | | -1.363 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .173 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .190 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .448 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1993510611.

c. Grouping Variable: Group

15. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรหัวใจ/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage1 | A | 10 | 8.60 | 86.00 |
| | L | 10 | 12.40 | 124.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage1 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 31.000 |
| Wilcoxon W | | | | 86.000 |
| Z | | | | -1.436 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .151 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .165 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .448 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1241531719.

c. Grouping Variable: Group

16. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรหัวใจ/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage1 | A | 10 | 10.10 | 101.00 |
| | M | 10 | 10.90 | 109.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage1 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 46.000 |
| Wilcoxon W | | | | 101.000 |
| Z | | | | -.302 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .762 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .796 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .800 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .552 |
| | | Upper Bound | | 1.000 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .300 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .016 |
| | | Upper Bound | | .584 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 562334227.

c. Grouping Variable: Group

17. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรหัวใจ/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage1 | A | 10 | 12.40 | 124.00 |
| | N | 10 | 8.60 | 86.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage1 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 31.000 |
| Wilcoxon W | | | | 86.000 |
| Z | | | | -1.439 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .150 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .165 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1556559737.

c. Grouping Variable: Group

18. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักรวมตลก/น้ำหนักตัวของกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage2 | A | 10 | 15.50 | 155.00 |
| | B | 10 | 5.50 | 55.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | Everage2 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | .000 |
| Wilcoxon W | | | 55.000 |
| Z | | | -3.787 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .000 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .000 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 79654295.

c. Grouping Variable: Group

19. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage2 | A | 10 | 9.70 | 97.00 |
| | L | 10 | 11.30 | 113.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage2 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 42.000 |
| Wilcoxon W | | | | 97.000 |
| Z | | | | -.605 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .545 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .579 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .600 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .296 |
| | | Upper Bound | | .904 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 215962969.

c. Grouping Variable: Group

20. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage2 | A | 10 | 9.40 | 94.00 |
| | M | 10 | 11.60 | 116.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage2 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 39.000 |
| Wilcoxon W | | | | 94.000 |
| Z | | | | -.832 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .405 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .436 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .400 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .096 |
| | | Upper Bound | | .704 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .448 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1573343031.

c. Grouping Variable: Group

21. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวของกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Everage2 | A | 10 | 7.90 | 79.00 |
| | N | 10 | 13.10 | 131.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Everage2 |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 24.000 |
| Wilcoxon W | | | | 79.000 |
| Z | | | | -1.966 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .049 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .052 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 484067124.

c. Grouping Variable: Group

22. ทดสอบความแตกต่างของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Estrogen | A | 10 | 14.80 | 148.00 |
| | B | 10 | 6.20 | 62.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Estrogen |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 7.000 |
| Wilcoxon W | | | | 62.000 |
| Z | | | | -3.250 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .001 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .000 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | | Sig. | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 475497203.

c. Grouping Variable: Group

23. ทดสอบความแตกต่างของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Estrogen | A | 10 | 9.70 | 97.00 |
| | L | 10 | 11.30 | 113.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Estrogen |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 42.000 |
| Wilcoxon W | | | | 97.000 |
| Z | | | | -.605 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .545 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .579 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .600 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .296 |
| | | Upper Bound | | .904 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .300 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .016 |
| | | Upper Bound | | .584 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1310155034.

c. Grouping Variable: Group

24. ทดสอบความแตกต่างของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Estrogen | A | 10 | 6.30 | 63.00 |
| | M | 10 | 14.70 | 147.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Estrogen |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 8.000 |
| Wilcoxon W | | | | 63.000 |
| Z | | | | -3.175 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .001 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .001 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 2048628469.

c. Grouping Variable: Group

25. ทดสอบความแตกต่างของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|----------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| Estrogen | A | 10 | 5.50 | 55.00 |
| | N | 10 | 15.50 | 155.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | Estrogen |
|--------------------------------|------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | .000 |
| Wilcoxon W | | | | 55.000 |
| Z | | | | -3.780 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .000 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .000 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | | Upper Bound | .259 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .000 ^b |
| | | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | | Upper Bound | .259 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 508741944.

c. Grouping Variable: Group

26. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักตัวในกลุ่ม OVX เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|--------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| weight | A | 10 | 9.05 | 90.50 |
| | B | 10 | 11.95 | 119.50 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | weight |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 35.500 |
| Wilcoxon W | | | 90.500 |
| Z | | | -1.097 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .273 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .280 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .500 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .190 |
| | | Upper Bound | .810 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .400 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .096 |
| | | Upper Bound | .704 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 726961337.

c. Grouping Variable: Group

27. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักตัวในกลุ่ม Es10 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|--------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| weight | A | 10 | 12.60 | 126.00 |
| | L | 10 | 8.40 | 84.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | weight |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 29.000 |
| Wilcoxon W | | | | 84.000 |
| Z | | | | -1.588 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .112 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .123 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .448 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .448 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 113410539.

c. Grouping Variable: Group

28. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักตัวในกลุ่ม Es20 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

| Ranks | | | | |
|--------|-------|----|-----------|--------------|
| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
| weight | A | 10 | 11.40 | 114.00 |
| | M | 10 | 9.60 | 96.00 |
| | Total | 20 | | |

| Test Statistics ^c | | | | weight |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|--|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | | 41.000 |
| Wilcoxon W | | | | 96.000 |
| Z | | | | -.681 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | | .496 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | | .529 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | | .400 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .096 |
| | | Upper Bound | | .704 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | | .100 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | | .000 |
| | | Upper Bound | | .286 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 1585587178.

c. Grouping Variable: Group

29. ทดสอบความแตกต่างของน้ำหนักตัวในกลุ่ม Es40 เทียบกับกลุ่ม sham

Mann-Whitney Test

Ranks

| | Group | N | Mean Rank | Sum of Ranks |
|--------|-------|----|-----------|--------------|
| weight | A | 10 | 12.20 | 122.00 |
| | N | 10 | 8.80 | 88.00 |
| | Total | 20 | | |

Test Statistics^c

| | | | weight |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|
| Mann-Whitney U | | | 33.000 |
| Wilcoxon W | | | 88.000 |
| Z | | | -1.286 |
| Asymp. Sig. (2-tailed) | | | .198 |
| Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)] | | | .218 ^a |
| Monte Carlo Sig. (2-tailed) | Sig. | | .300 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .016 |
| | | Upper Bound | .584 |
| Monte Carlo Sig. (1-tailed) | Sig. | | .200 ^b |
| | 95% Confidence Interval | Lower Bound | .000 |
| | | Upper Bound | .448 |

a. Not corrected for ties.

b. Based on 10 sampled tables with starting seed 257291219.

c. Grouping Variable: Group

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1.1 การเตรียม 10% paraformaldehyde

สารเคมี

| | |
|----------------------------------|----------|
| Paraformaldehyde | 25 g. |
| NaH ₂ PO ₄ | 5.315 g. |
| NaOH (50%) | 1.75 ml. |
| Distilled water for up to | 250 ml. |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่ง paraformaldehyde ปริมาณ 10 g. ใส่ปิกเกอร์
2. ตวงน้ำ 200 ml. ใส่ในข้อ 1 ใช้ magnetic stirrer ช่วยผสมสารที่อุณหภูมิ 60° C
3. เติม NaOH ขณะละลาย paraformaldehyde จนสารละลายมีลักษณะใส
4. ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.3 ปรับปริมาตรจนได้ 250 ml.
5. กรองสารละลายและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4° C

1.2 การเตรียม Tespa coated slide

สารเคมี

| | |
|-----------------|-----------|
| 70% alcohol | 500.0 ml. |
| Dry acetone | 500.0 ml. |
| Tespa | 2.0 ml. |
| Distilled water | 750 ml. |

ขั้นตอนการเตรียม

1. แช่สไลด์ใน 70% alcohol นานประมาณ 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเช็ดให้สะอาด แล้วอบให้แห้งในตู้อบ (oven) นาน 30 นาที
2. นำสไลด์ที่ได้มาแช่ใน 2% tespa นาน 2 นาที จากนั้นนำมาจุ่มลงใน dry acetone 2 ครั้ง นานครั้งละ 30 วินาที
3. นำมาจุ่มลงในน้ำกลั่น 2 ครั้ง นานครั้งละ 30 วินาที แล้วนำไปอบให้แห้งในตู้อบ นานประมาณ 12-15 ชั่วโมง
4. เก็บสไลด์ไว้ในที่แห้งปราศจากฝุ่นละอองพร้อมที่จะนำมาใช้

1.3 การเตรียม Stock solution 1% eosin

สารเคมี

Stock eosin solution

| | |
|-----------------|----------|
| Eosin yellowish | 10.0 g. |
| 95% ethanol | 80.0 ml. |
| Distilled water | 20.0 ml. |

Working eosin solution

| | |
|----------------|--------|
| 1% stock eosin | 1 ส่วน |
| 95% ethanol | 1 ส่วน |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ละลาย eosin yellowish ด้วยน้ำที่เล็กน้อย ใช้ magnetic stirrer ช่วยผสม
2. เมื่อผงสีละลายจนหมดจึงเติม 95% ethanol ผสมให้เข้ากัน
3. ก่อนใช้ working eosin solution ให้เติม glacial acetic acid ปริมาตร 0.5 ml ต่อ eosin 100 ml.

1.4 การเตรียม Mayer' s hematoxylin

สารเคมี

| | |
|------------------------------------|--------|
| Hematoxylin | 1 g. |
| Potassium alum | 50 g. |
| Sodium iodate | 0.2 g. |
| Citric acid | 1 g. |
| Chloral hydrate | 50 g. |
| Distilled water for up to 1000 ml. | |

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำ และเก็บไว้ใช้เมื่อต้องการ

1.5 การเตรียม 0.1 M Tris phosphate buffer

สารเคมี

| | |
|---|---------|
| Tris base | 25 g. |
| Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 6 g. |
| NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | 1.25 g. |
| NaCl | 35 g. |

Distilled water for up to 5000 ml.

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่น 4,500 ml ใช้ magnetic stirrer ช่วยผสมสารละลาย
2. ปรับค่า pH ให้ได้ 7.6 ด้วยกรด HCl
3. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวม 5000 ml. กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บที่ 4° C

1.6 การเตรียม 0.1 M Tris phosphate buffer containing 0.3% Triton X-100

สารเคมี

| | |
|-------------------------------|---------|
| Tris phosphate buffer (0.1 M) | 300 ml. |
| Triton X-100 | 900 µl. |

วิธีการเตรียม

เติม Triton X-100 จำนวน 900 µl. ใส่ใน 300 ml. ของ 0.1 M Tris phosphate buffer เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น

1.7 การเตรียม 0.3% Hydrogen peroxide (H₂O₂) in methanol

สารเคมี

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Methanol | 300 ml. |
| 30% H ₂ O ₂ | 10 ml. |

วิธีการเตรียม

เติม H₂O₂ ตามปริมาตรดังกล่าวใน methanol และควรเตรียมเมื่อต้องการใช้

1.8 การเตรียม 0.01 M Citric buffer pH 6

สารเคมี

Tri-sodium citrate 2.94 g.

วิธีการเตรียม

ชั่ง tri-sodium citrate 2.94 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 6.0

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีน

2.1 การเตรียม Lysis buffer

สารเคมี

| | | |
|----------------------------|-------|-----|
| 0.1 M Sodium pyrophosphate | 2 | ml. |
| 0.5 M Sodium fluoride | 0.5 | ml. |
| 10% Sodium deoxycholate | 0.025 | µl. |
| 1M Tris pH 8 | 100 | µl. |
| 0.5 M EGTA | 100 | µl. |
| Triton X-100 | 50 | µl. |
| 100mM PMSF | 50 | µl. |
| 1 M Magnesium chloride | 25 | µl. |
| 0.1 M Sodium vanadate | 5 | µl. |
| De-ionized water | 2.15 | ml. |
| Leupeptin | 2 | µl. |
| Apotinin | 10 | µl. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีทั้งหมด (ยกเว้น Leupeptin และ Apotinin) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้
ขึ้นต้นปริมาตร 1 ml. มาเติม Leupeptin และ Apotinin ตามปริมาณข้างต้น

2.2 การเตรียม Laemmli sample buffer

สารเคมี

| | |
|-------------------------|--------------|
| Laemmli Sample Buffer | 950 μ l. |
| β mercaptoethanol | 50 μ l. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100° C นาน 10 นาที

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับ Western blotting

3.1 การเตรียม 0.1 M Tris phosphate buffer

สารเคมี

| | |
|---|----------|
| Tris base | 25 g. |
| Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O | 6 g. |
| Na ₂ H ₂ PO ₄ .2H ₂ O | 1.25 g. |
| NaCl | 35 g. |
| Distilled water for up to | 5000 ml. |

วิธีการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาตร 5000 ml. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องช่วยผสม
2. ปรับ pH 7.6 แล้วกรองสารด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4° C พร้อมทั้งจะนำมาใช้

3.2 การเตรียม 0.1 M Tris phosphate buffer containing 0.3% Triton X-100

สารเคมี

| | |
|-------------------------------|--------------|
| Tris phosphate buffer (0.1 M) | 300 ml. |
| Triton X-100 | 900 μ l. |

วิธีการเตรียม

เติม Triton X-100 ตามปริมาตรข้างต้นลงใน 0.1 M Tris phosphate buffer และควรเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น

3.3 การเตรียม 1.5 M Tris - pH 8.8

สารเคมี

| | |
|-----------|----------|
| Tris-base | 18.17 g. |
| น้ำกลั่น | 60 ml. |

วิธีการเตรียม

ละลายสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ปรับ pH โดยใช้ 1N HCl จนได้ค่า pH 8.8 แล้วจึงปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4° C

3.4 การเตรียม Tris - pH 6.8

สารเคมี

| | |
|-----------|---------|
| Tris-base | 6.06 g. |
| น้ำกลั่น | 60 ml. |

วิธีการเตรียม

ละลายสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ปรับ pH โดยใช้ 1N HCl จนได้ค่า pH 6.8 แล้วจึงปรับปริมาตรโดยใช้น้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุทธิ 100 ml เก็บที่อุณหภูมิ 4° C

3.5 การเตรียม 1 N HCl

สารเคมี

| | |
|-----------------|--------|
| Concentrate HCl | 12 ml. |
| น้ำกลั่น | 90 ml. |

วิธีการเตรียม

ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 90 ml เติมกรด HCl ตามปริมาณข้างต้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเติมจนครบ 120 ml. (ข้อควรระวังในการเตรียมกรดที่มีความเข้มข้นสูงควรเทกรดใส่ในน้ำเพื่อความปลอดภัย)

3.6 การเตรียม 12% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide resolving gel

สารเคมี

| | |
|--------------------------|----------|
| 1.5 M Tris (HCl) | 2.5 ml. |
| 30% Acrylamide (37.5:1) | 4 µl. |
| 12% SDS solution | 100 µl. |
| 10% Ammonium persulphate | 100 µl. |
| TEMED | 25 µl. |
| Double-Deionized water | 3.03 µl. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้นเมื่อผสม 10% ammonium persulphate และ TEMED แล้ว ควรใช้เวลาให้น้อย เพราะเจลจะเริ่มเกิดพอลิเมอร์ไรต์เซชัน ที่เจลไว้นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 °C

3.7 การเตรียม 4% Sodium dodecyl sulfate poyacrylamide stack gel

สารเคมี

| | |
|---------------------------|-----------|
| 0.5 M Tris (HCl) | 1.008 ml. |
| 30% Acrylamide (37.5 : 1) | 528 µl. |
| 10% SDS solution | 40 µl. |
| 10% ammonium persulphate | 50 µl. |
| TEMED | 20 µl. |
| Double-Deionized water | 2.16 µl. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น เมื่อผสม 10% ammonium persulphate และ Temed แล้ว ควรใช้เวลาให้น้อย เพราะเจลจะเริ่มเกิดการโพรเมอร์ไรเซชันที่อุณหภูมิ 25° C นาน 60 นาที

3.8 การเตรียม Transferring buffer

สารเคมี

| | |
|----------------------------|----------|
| Tris base | 3.03 g. |
| Glycine 14.4 g.Methanol | 200 ml. |
| De-ionized water fpr up to | 1000 ml. |

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1000 ml.
ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องช่วยผสม

3.9 การเตรียม1xSDS running buffer

สารเคมี

| | |
|--------------------------------------|---------|
| Tris base | 3.02 g. |
| Glycine | 18.8 g. |
| Sodium dodecyl sulfate | 1 g. |
| De-ionized weter for up to 1000.0 ml | |

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1000 ml. ผสมให้เข้า
กันโดยใช้เครื่องช่วยผสม

3.10 การเตรียม Tris buffer saline with Tween 20 (TBST)

สารเคมี

| | |
|---------------------------------------|--------|
| 5M NaCl | 30 ml. |
| 1M Tris pH 8 | 10 ml. |
| Tween 20 | 1 ml. |
| De-ionized water for up to 1000.0 ml. | |

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1000 ml. ผสมให้เข้า
กัน

3.11 การเตรียม Tris buffer saline (TBS)

สารเคมี

| | |
|-------------------------------------|--------|
| 5M NaCl | 30 ml. |
| 1M Tris pH 8 | 10 ml. |
| De-ionized water for up to 1000 ml. | |

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาตร 1000 ml. ผสมให้เข้ากัน

3.12 การเตรียม 0.1% Coomassie Blue R 250 Staining solution

สารเคมี

| | |
|----------------------|---------|
| Coomassie Blue R 250 | 1 g. |
| Methanol | 400 ml. |
| Acetic acid | 100 ml. |
| De-ionized water | 500 ml. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น นำมาผสมให้เข้ากัน

3.13 การเตรียม Destaining solution

สารเคมี

| | |
|------------------|---------|
| Methanol | 400 ml. |
| Acetic acid | 100 ml. |
| De-ionized water | 500 ml. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น นำมาผสมให้เข้ากัน

3.14 การเตรียม 0.1 % Coomassie Blue R 250 Staining solution

สารเคมี

| | |
|----------------------|---------|
| Coomassie Blue R 250 | 1 g. |
| Methanol | 400 ml. |
| Acetic acid | 100 ml. |
| Di-ionized water | 500 ml. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น นำมาผสมให้เข้ากัน

3.15 การเตรียม Destaining solution

สารเคมี

| | |
|------------------|---------|
| Methanol | 400 ml. |
| Acetic acid | 100 ml. |
| De-ionized water | 500 ml. |

วิธีการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น นำมาผสมให้เข้ากัน

3.16 การเตรียม ECL

สารเคมี

| | |
|-----------|-------------|
| Reagent A | 1 ml. |
| Reagent B | 25 μ l. |

วิธีการเตรียม

ผสมสารเคมีทั้งสองชนิดตามสัดส่วนที่กำหนดในห้องมืดเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึง
ค่อยหยดบนแผ่น membrane

3.17 การเตรียมน้ำยา Developer

สารเคมี

| | |
|---------------------------------|---------|
| น้ำยา Developer and replenisher | 103 ml. |
| น้ำกลั่น | 345 ml. |

วิธีการเตรียม

ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นเข้าด้วยกันทำในที่มืดแสงสว่างน้อย

วิธีการเก็บรักษา

เก็บในขวดสีชา และแช่เย็นไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° C เปลี่ยนน้ำยาต่อเมื่อน้ำยาเปลี่ยนเป็นดำคล้ำ

3.18 การเตรียมน้ำยา Fixer

สารเคมี

| | |
|-----------------------------|---------|
| น้ำยา Fixer and replenisher | 103 ml. |
| น้ำกลั่น | 345 ml. |

วิธีการเตรียม

ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นเข้าด้วยกันทำในที่มืดแสงสว่างน้อย

วิธีการเก็บรักษา

เก็บในขวดสีชา และแช่เย็นไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° C เปลี่ยนเมื่อเกิดตะกอนขาว

3.19 การเตรียม phosphate buffer saline (PBS) for histochemistry

สารเคมี

| | |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl | 8 g. |
| KCl | 6 g. |
| KH ₂ PO ₄ | 0.2 g. |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.15 g. |
| Distilled water for up to | 1,000 ml. |

วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 ml. ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องช่วยผสม เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° C

