



การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศผู้

**Effects of Young Coconut Juice on the Cutaneous  
Healing of Male Rat Wounds**

มุฮัมมัดบาคอรี ยูโซ๊ะ

**Muhammadbakhoree Yusuh**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**Prince of Songkla University**

**2554**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศผู้  
ผู้เขียน นายมุฮัมมัดบาคอรี ยูโซ๊ะ  
สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิชาอุตะห์ ระเด่นอาหมัด) (รองศาสตราจารย์ ดร.เสมอ ถาน้อย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิชาอุตะห์ ระเด่นอาหมัด)

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัจจา สว่างเจริญ)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์)

.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จินดาพร ภูมิพัฒนางษ์) (ดร.จิตติมา รุจิราลัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาค  
ศาสตร์

.....  
(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์      การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศผู้  
ผู้เขียน                นายภูอำมตบาkori ยูไช้  
สาขาวิชา                กายวิภาคศาสตร์  
ปีการศึกษา              2553

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อน (Y□) ต่อการสมานแผลและความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ phytoestrogen (PE) ในน้ำมะพร้าวอ่อน โดยทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างสัตว์ทดลอง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว โดยหนู 30 ตัวได้รับ treatment เป็นเวลา 7 วัน (กลุ่ม 7 วัน) และที่เหลืออีก 30 ตัวได้รับ treatment เป็นเวลา 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้เอาอวัยวะออก และได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม sham) กลุ่มที่ 2 ได้รับการผ่าตัดเอาอวัยวะออก (orx) และได้รับน้ำกลั่น (กลุ่ม orx) กลุ่มที่ 3 ได้รับการผ่าตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ estradiol benzoate (EB) โดยฉีดเข้าทางหน้าท้อง (i.p.) ความเข้มข้น 2.5 µg/kgBW/day (กลุ่ม orx+EB) กลุ่มที่ 4 ได้รับการผ่าตัดเอาอวัยวะออกทั้งสองข้างและได้รับน้ำมะพร้าวอ่อน (Y□) ความเข้มข้น 100 mL/kgBW/day (กลุ่ม orx+Y□) กลุ่มที่ 5 ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ได้เอาอวัยวะออกและได้รับน้ำมะพร้าวอ่อน (Y□) ความเข้มข้น 100 mL/kgBW/day (กลุ่ม sham+Y□) ภายหลังจากทำ orx หรือ sham เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะทำแผลมาตรฐานบริเวณ 1 เซนติเมตรใต้ต่อกระดูกสะบักทั้งสองข้าง ยาว 1.5 เซนติเมตร และลึก 3 มิลลิเมตร แล้วจึงป้อนน้ำกลั่น น้ำมะพร้าวอ่อน หรือ ฉีด EB เป็นเวลา 7 วันหรือ 14 วัน เมื่อครบกำหนดจะทำการฆ่าหนูและเก็บผิวหนังบริเวณแผลและอวัยวะภายใน นำไปผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาจนได้เป็นบล็อกพาราฟินแล้วนำไปย้อมสีด้วย hematoxylin and eosin (H&E) และ immunohistochemistry และทำการเก็บชิ้นเนื้อเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมน estrogen และ testosterone ด้วยวิธี chemiluminescent immuno assays (□IA) ผลการทดลองของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย H&E ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบความแตกต่างทั้งความหนาของชั้น epidermis, dermis และ hypodermis ในแต่ละกลุ่มการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+Y□ และกลุ่ม sham+Y□ ไม่เพียงแต่มีการสมานแผลที่เร็วกว่าแต่ยังมีความหนาของผิวหนังชั้น epidermis, dermis, และ hypodermis เพิ่มขึ้นและเมื่อทำการวัดความลึกและความกว้างของแผลในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าในกลุ่ม 14 วัน หนูกลุ่ม orx+Y□ มีขนาดของแผลเล็กกว่ากลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การศึกษาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิด

ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี พบองค์ประกอบที่ติดสีย้อมดังกล่าวที่ epidermis, dermis, hypodermis, hair follicles, sebaceous glands, keratinocytes, fat cells, fibroblasts และ muscularis adipose (กล้ามเนื้อลาย) สำหรับจำนวนของ hair follicles ในชั้น dermis ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  พบมากที่สุดในกลุ่ม orx+Y $\square$  และ sham+Y $\square$  และพบ น้อยที่สุดในกลุ่ม sham จากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกลุ่ม orx+Y $\square$  มีขนาดใหญ่กว่า กลุ่ม sham และกลุ่ม orx และพบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ติดสีย้อมต่อ ER $\beta$  ของกลุ่ม orx+EB มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่ม sham สำหรับการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ใน กลุ่ม 14 วัน ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ไม่พบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มการทดลองอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles พบว่า ขึ้นกับฮอร์โมน estrogen กล่าวคือขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles จะเพิ่มขึ้นผ่านทาง ER $\beta$  และเส้นผ่าศูนย์กลางจะลดลงผ่านทาง ER $\alpha$  ในทางตรงข้ามฮอร์โมน testosterone มีผล ทำให้จำนวนและเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ลดลงโดยผ่านทาง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  จาก ข้อมูลต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า Y $\square$  มีฤทธิ์คล้ายสารในกลุ่ม SERM (selective estrogen receptor modulator) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของเอนไซม์ต่างๆ ในเลือดที่เป็นตัว บ่งชี้การทำงานของตับและไตซึ่งประกอบด้วย cholesterol, triglyceride, HDL และ LDL ของ กลุ่มทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และ กลุ่ม orx และพบว่าค่า cholesterol, triglyceride และ LDL ลดลงในกลุ่ม 14 วันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 7 วัน ในทางตรงข้ามค่า HDL ในกลุ่ม 14 วันจะเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 7 วัน สำหรับค่า AST, ALT, ALP, total protein, albumin, BUN และ creatinine ในกลุ่ม 7 วันของ กลุ่ม orx+Y $\square$  มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 14 วัน จากการ ทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การสมานแผลเริ่มปรากฏให้เห็นตั้งแต่ช่วงแรกและหายสนิท ภายใ้เวลา 14 วัน จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การบริโภคน้ำมะพร้าวอ่อนเป็นเวลา 14 วัน นอกจากจะช่วยเร่งการสมานแผลแล้ว ยังพบว่า มีความปลอดภัยต่ออวัยวะอื่น ๆ อีกด้วย โดยวิเคราะห์ผลจากค่าทางเคมีคลินิกของเลือดหนู

**Thesis Title** Effects of Young Coconut Juice on the Wound Healing of Male Rat Wounds  
**Author** Mr. Muhammadbakhoree Yusuh  
**Major Program** Anatomy  
**Academic Year** 2010

### ABSTRACT

This study aimed to evaluate the potential use of young coconut juice, assumed to contain phytoestrogens, with regard to its potential wound healing properties and its safety. Comparisons were made between control and experimental groups. There were five groups of rats (6 rats per group) included in this study. Thirty rats were treated for 7 days and another 30 rats for 14 days. Treatments were as follows: group 1 were sham-operated, group 2 were orchidectomized (orx), group 3 were orx then injected (i.p.) with 2.5 µg/kgBW of estradiol benzoate (EB) 5 days a week for one or two weeks, group 4 and 5 were orx and sham-operated then received YCJ (100 mL/kgBW/day). Two weeks after a sham-operation or orchidectomy, all animals were wounded by making an excision at their dorsal surface 1 cm below the scapula, 1.5 cm long and 3 mm deep and left to heal. Rats were force fed with deionized water, YCJ or given an injection of EB for another 7 or 14 days. After sacrifice, wounds were excised and bisected and internal organs were removed, fixed and paraffin embedded for routine H&E and immunohistochemical staining. Serum was collected for estradiol and testosterone measurements using chemiluminescent immuno assays (RIA). Routine H & E revealed that in the 7 day and 14 day treatments, epidermal, dermal and hypodermal thickness were different when each group was compared. Orx rats receiving EB or YCJ and sham+YCJ not only showed accelerating wound healing, but also an increased thickness of the epidermis, dermis, and hypodermis. When the depth and the width of wounds were measured, there were no significant differences between each group for the 7 day treatment. However, for the 14 day treatment, the wound area of orx rats receiving YCJ was significantly smaller, compared to both the sham and orx groups. Expression of both ER $\alpha$  and ER $\beta$  immunoreactivity was localized at the epidermis, dermis, hypodermis, hair follicles, sebaceous glands, keratinocytes, fat cells,

fibroblasts and muscularis adipose (skeletal muscles). In the orx+Y $\square$  and sham+Y $\square$  groups, the numbers of hair follicles stained with ER $\alpha$  and ER $\beta$  in the dermis was highest and that of sham group was lowest. In the orx+Y $\square$  group, for the 7 day treatment, the diameter of hair follicles stained for ER $\alpha$  and ER $\beta$  were larger than sham and orx groups, that of orx+EB group stained for ER $\beta$  was larger than sham group. For the 14 day treatment, however, the diameter of hair follicles stained for ER $\alpha$  and ER $\beta$  did not showed significant difference when each group was compared. The regression correlation between diameters of hair follicles and serum E2 levels showed that E2 increased hair follicle diameters via ER $\beta$  and decreased hair follicle diameters via ER $\alpha$ . In contrast, other correlations showed that serum testosterone decreased both hair follicle numbers and diameters via ER $\alpha$  and ER $\beta$ . These data altogether show novel tissue-specific differences of the effects of Y $\square$  on the skin and skin appendages after wounding and Y $\square$  might be categorized as a SERM (selective estrogen receptor modulator). Biochemical markers for liver and renal function tests including cholesterol, triglyceride, LDL and HDL of experimental groups were not significantly different from sham or orx groups. It is of interest to note that cholesterol, triglyceride and LDL levels were lower for the 14 day treatment compared with the 7 day treatment. In contrast, the HDL level was higher with the 14 day treatment compared with the 7 day treatment. The AST, ALT, ALP, total protein, albumin, BUN, creatinine levels in orx+Y $\square$  group showed significant differences when compared with the sham and orx groups for the 7 day treatment but not for the 14 day treatment. So initial wounding has effects but rats seem to be fully recovered after 14 days. The present study has clearly demonstrated beneficial effects of Y $\square$  on the cutaneous wound healing and the safety of Y $\square$  consumption for the period of 14 days by doing serum chemical analysis of various organs.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิชาอูตะห์ ระเด่นอาหมัด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทางและแก้ไขข้อบกพร่อง อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิจจา สว่างเจริญ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. จินดาพร ภูมิพัฒน์วณิช อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เสมอ ถาน้อย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. วิจิตติมา รุจิราลัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะและแก้ไขข้อบกพร่องของวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณสถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ และบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และคอยให้ความช่วยเหลือประสานงานในด้านต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองภาคใต้ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอำนวยความสะดวกในการเลี้ยงสัตว์ทดลองตลอดการศึกษารั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่จากภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน จากภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นกำลังใจอันดี ทำให้การทำวิทยานิพนธ์สำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัวและคนใกล้ชิดที่ส่งเสริมโอกาสทางการศึกษาและให้กำลังใจอันดีมาโดยตลอดจนกระทั่งประสบความสำเร็จในครั้งนี้

มุฮัมมัดบาคอรี ยูโซ๊ะ

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(3)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(5)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(11)
คำย่อและสัญลักษณ์	(15)
บทที่	
1 บทนำ	1
1. บทนำตั้งเรื่อง	1
2. การตรวจสอบเอกสาร	3
2.1. ผิวหนัง	3
2.2. การสมานแผล	13
2.3. เอสโตรเจน	23
2.4. แอนโดรเจน	31
2.5. ไฟโตเอสโตรเจน	36
2.6. มะพร้าว	39
2.7. น้ำมันมะพร้าว	40
3. วัตถุประสงค์	42
2 วิธีการวิจัย	43
1. สารเคมี	43
2. วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์	45
3. วิธีดำเนินการวิจัย	46
3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง	46
3.2 การเตรียมผงน้ำมันมะพร้าวอ่อน และน้ำมันมะพร้าวอ่อนเข้มข้น	48
3.3 การเตรียม $\beta$ -estradiol 3-benzoate (EB)	49
3.4 การเตรียมอัตราส่วนความเข้มข้นของ estrogen receptors	49
3.5 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ	51
3.6 การอ่านผลการสมานแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM	55
	(8)



3.7 การตรวจวิเคราะห์ค่า serum E2 และ testosterone	56
3.8 การตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกอื่นๆ	56
4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง	56
3 ผลการทดลอง	57
1. ค่า serum E2 (pg/ml) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	58
2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่างๆ	60
ก. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	60
1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล	60
2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ	64
ข. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	76
1. วิธีการอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยใช้ anti-ER $\alpha$ antibody	76
2. วิธีการอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\beta$ antibody	81
ค. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยสีย้อม Masson's trichome ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	101
3. ค่าทางเคมีคลินิกต่างๆ ในซีรัมของเลือดหนู	104
3.1 การวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน	104
3.2 การวิเคราะห์ค่า total protein, albumin, AST, ALT และ ALP ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน	106
3.3 การวิเคราะห์ค่า cholesterol, triglyceride, HDL และ LDL ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน	111
4 วิจัยรณัผลการทดลอง	118
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	126
รายการเอกสารอ้างอิง	129
ภาคผนวก	148
ประวัติผู้เขียน	208

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง	47

## รายการรูป

รูปที่		หน้า
1-1	แสดงชั้นต่างๆ และองค์ประกอบของผิวหนังชั้น epidermis และ dermis	12
1-2	แสดงโครงสร้างของผิวหนังชั้น epidermis และ keratin markers ในชั้นต่าง ๆ	12
1-3	แสดง keratinocyte (multipotent) stem cells ของ hair follicles และ sebaceous gland	13
1-4	แสดงกระบวนการสมานแผลในช่วงต่าง ๆ	17
1-5	แสดงการจับสิ่งแปลกปลอมของ leukocyte ชนิด neutrophil บริเวณแผล	18
1-6	แสดงองค์ประกอบและหน้าที่โดยพื้นฐานของกลุ่มเซลล์ต่าง ๆ ในกระบวนการอักเสบ	18
1-7	แสดงการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ในกระบวนการสมานแผล	19
1-8	แสดงกลไกของการสมานแผล	22
1-9	แสดงขบวนการสมานแผล	23
1-10	แสดงการสังเคราะห์ของเอสโตรเจนบริเวณ follicular cell ของรังไข่	27
1-11	แสดงชีวสังเคราะห์ของเอสโตรเจน	27
1-12	แสดงโครงสร้างของเอสโตรเจนตามธรรมชาติในมนุษย์	28
1-13	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ ER $\alpha$ และ ER $\beta$	30
1-14	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ERs	30
1-15	แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ ARs	35
1-16	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ARs	35
1-17	โครงสร้างทางเคมีของ estrogen และ phytoestrogen	38
1-18	แสดงต้นและผลมะพร้าวหอม	39
2-1	แสดงผงน้ำมะพร้าวอ่อน	49
3-1	กราฟแสดงค่า serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	59
3-2	กราฟแสดงค่า serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	59
3-3	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน	61
3-4	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 14 วัน	62
3-5	กราฟแสดงความลึกของบริเวณแผล ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	63
3-6	กราฟแสดงความกว้างของบริเวณแผล ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	63
3-7	แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน	65
3-8	แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 14 วัน	66

3-9	กราฟแสดงความหนาของชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	67
3-10	แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน	69
3-11	แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 14 วัน	70
3-12	กราฟแสดงความหนาของชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	71
3-13	แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน	73
3-14	แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 14 วัน	74
3-15	กราฟแสดงความหนาของชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	75
3-16	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ใน กลุ่ม 7 วัน	77
3-17	แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 7 วัน	78
3-18	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 14 วัน	79
3-19	แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 14 วัน	80
3-20	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ใน กลุ่ม 7 วัน	82
3-21	แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน	83
3-22	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	84
3-23	แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	85
3-24	กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติชั้น dermis ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	85
3-25	กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติชั้น hypodermis ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	87
3-26	กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติชั้น dermis ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	88

3-27	กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติชั้น hypodermis ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	88
3-28	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันที่ติดสีย้อม ER $\alpha$ และ ER $\beta$	90
3-29	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วันที่ติดสีย้อม ER $\alpha$ และ ER $\beta$	90
3-30	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วันที่ติดสีย้อม ER $\alpha$	91
3-31	กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วันที่ติดสีย้อม ER $\beta$	91
3-32	กราฟแสดงความเข้มของการติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	92
3-33	กราฟแสดงความเข้มของการติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน	92
3-34	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน	93
3-35	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	94
3-36	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน	95
3-37	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	96
3-38	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน	97
3-39	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	98

3-40	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน	99
3-41	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน	100
3-42	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมด้วย Masson's trichome ในกลุ่ม 7 วัน	102
3-43	แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมด้วย Masson's trichome ในกลุ่ม 14 วัน	103
3-44	กราฟแสดงค่า BUN ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	104
3-45	กราฟแสดงค่า creatinine ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	105
3-46	กราฟแสดงค่า total potein ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	106
3-47	กราฟแสดงค่า albumin ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	107
3-48	กราฟแสดงค่า AST ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	108
3-49	กราฟแสดงค่า ALT ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	109
3-50	กราฟแสดงค่า ALP ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	110
3-51	กราฟแสดงค่า cholesterol ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	111
3-52	กราฟแสดงค่า triglyceride ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	112
3-53	กราฟแสดงค่า HDL ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	113
3-54	กราฟแสดงค่า LDL ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน	114
3-55	กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลองและวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 7 วัน	115
3-56	กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลองและวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 14 วัน	116
3-57	กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลอง วันทำผลมาตรฐานและวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 7 วัน	117
3-58	กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลอง วันทำผลมาตรฐานและวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 14 วัน	117

## คำย่อและสัญลักษณ์

ALP	=	Alkaline phosphatase
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Aspartate aminotransferase
ARs	=	Androgen receptors
BUN	=	Blood urea nitrogen
EB	=	$\beta$ -estradiol 3-benzoate
ERs	=	Estrogen receptors
ER $\alpha$	=	Estrogen receptor $\alpha$ subtype
ER $\beta$	=	Estrogen receptor $\beta$ subtype
E2	=	17 $\beta$ -estradiol
HDL	=	High density lipoprotein
LDL	=	Low density lipoprotein
LM	=	Light microscope
Y $\square$ J	=	Young coconut juice

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. บทนำต้นเรื่อง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่อยู่นอกสุดและมีพื้นที่มากที่สุดของร่างกายมนุษย์ ทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะอื่นๆ ที่อยู่ข้างใต้จากการกระทบเหวี่ยง การสูญเสียความชุ่มชื้น การสัมผัสกับจุลชีพภายนอก ช่วยรักษาสมดุลอุณหภูมิของร่างกาย และช่วยสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น ผิวหนังประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด ได้แก่ epidermal keratinocytes, fibroblasts, Langerhans และ endothelial cells และมีความแตกต่างกันในเพศชายและเพศหญิง โดยที่ผิวหนังของเพศชายจะมีความหนามากกว่า (Seidenari *et al.*, 1994) แต่มีชั้นเนื้อเยื่อใต้ผิวหนังบางกว่า (Sjostrom *et al.*, 1972) มีรายงานว่าประชากรสูงอายुर้อยละ 40 ถึง 60 จะมีปัญหาเกี่ยวกับโรคทางผิวหนังอย่างน้อยหนึ่งชนิด (Dunn *et al.*, 1997) ซึ่งปัญหาทางผิวหนังจะมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของวัยนี้ (Beauregard *et al.*, 1987)

การสมานแผล (cutaneous wound healing) ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่ inflammation, angiogenesis, wound contraction, reepithelialization และ matrix deposition กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหลายชนิด ได้แก่ keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells และ infiltration inflammatory cells นอกจากนี้ยังมีตัวควบคุมกระบวนการสมานแผลประกอบด้วย mediators ต่าง ๆ เช่น cytokines, growth factors, proteinase และฮอร์โมนต่างๆ รวมทั้งฮอร์โมนเพศ สารตัวกลาง (cytokine) ที่สำคัญในกระบวนการสมานแผล ได้แก่ Interleukins (IL-1 และ IL-6) และ tumor necrosis factors (TNFs) ซึ่งส่วนใหญ่ถูกสร้างมาจากเม็ดเลือดขาวในกระบวนการอักเสบจากการติดเชื้อหรือปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันโดยมีผลต่อเม็ดเลือดขาว เซลล์บุผนังหลอดเลือดและมีผลต่อ fibroblast ทำให้ fibroblast แบ่งตัวเพิ่มจำนวนและสร้าง collagen fiber มากขึ้น มีผลในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่ออีกด้วย นอกจากนี้ platelet-derived growth factor (PDGF) และ transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) มีผลทำให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนเข้ามาในบริเวณที่ได้รับ injury และทำหน้าที่คล้ายกับ cytokine เช่นกัน

โดยทั่วไปฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันซึ่งมีความสำคัญต่อการเร่งการสมานแผลในกระบวนการอักเสบ ในขณะที่ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจะมีบทบาทในการยับยั้งกระบวนการดังกล่าว (Jarefors *et al.*, 2006) โดยมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบให้นานขึ้น (Seidenari *et al.*, 2000) ความผิดปกติของการ



สมานแผลในผู้สูงอายุก่อให้เกิดผลกระทบต่ออัตราการเกิด อัตราการตายและค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงขึ้น (Ashcroft and Mills, 2002) ส่งผลต่อวิกฤตเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย จากรายงานการวิจัยพบว่า การสมานแผลในบรูซจะเกิดช้ากว่าในสตรีและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการอักเสบ (Ashcroft *et al.*, 1998; Ashcroft *et al.*, 1999; Taylor *et al.*, 2002) จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยทำการตอนในหนูเพศผู้และทำให้ผิวหนังไหม้ พบว่ากระบวนการการอักเสบลดลง (Padgett *et al.*, 1998) และการลดลงของกระบวนการ steroidogenesis ทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่าง prooxidant และ antioxidant และส่งผลต่อการเสียสภาพของเซลล์ได้ (Vina *et al.*, 2005; Borrás *et al.*, 2005) ด้วยอายุที่เพิ่มขึ้นจะเกิดการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างและหน้าที่ของอวัยวะและเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยดับเป็นอวัยวะแรกๆ ของผลกระทบดังกล่าว (Anantharaju *et al.*, 2002) และเอสโตรเจนมีส่วนสำคัญต่อการรักษาสภาพหน้าที่ของตับได้ (Hamden *et al.*, 2007; Hamden *et al.*, 2008a) นอกจากนี้ความบกพร่องโดยการลดลงของแอนโดรเจนในช่วงอายุ andropause สัมพันธ์กับอัตราเสี่ยงของอุบัติการณ์การเกิดโรค coronary artery (English *et al.*, 2000) จากรายงานวิจัยพบว่า การได้รับ soy protein มีส่วนช่วยลดระดับความเข้มข้นของ cholesterol และ LDL ในเพศชาย (Teixeira *et al.*, 2000; Crouse *et al.*, 1999) และกลุ่มสัตว์ทดลองเพศผู้ (Fukui *et al.*, 2002; Potter *et al.*, 1996; Campbell *et al.*, 1995; Wagner *et al.*, 2000) ดังนั้นฮอร์โมนเพศจึงมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการต่าง ๆ ของร่างกาย รวมทั้งการสมานแผลในวัยผู้สูงอายุ (Hardman *et al.*, 2005)

สำหรับประเทศไทยพบว่าในปี พ.ศ. 2553 มีสถิติการเพิ่มจำนวนของผู้สูงอายุเพศชายถึงร้อยละ 10.40 หรือ 3.5 ล้านคน ทำให้มีการคาดการณ์กันว่าในปี พ.ศ. 2563 จะมีจำนวนผู้สูงอายุเพิ่มมากถึงร้อยละ 15.28 (กองวางแผนทรัพยากรมนุษย์. 2538) จากสถานการณ์ดังกล่าวอาจส่งผลให้เกิดปัญหาสุขภาพของผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นด้วย ปัจจุบันผู้ชายมีการใช้ฮอร์โมนทดแทน (hormone replacement therapy; HRT) อย่างกว้างขวางเพื่อการรักษาโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก แต่ในขณะเดียวกัน HRT ก็ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายอย่างเช่น น้ำหนักเพิ่มขึ้น ความต้องการทางเพศลดลง การแข็งตัวของเลือดและโรคหัวใจ เป็นต้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาพืชที่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen-like) โดยใช้น้ำมะพร้าวอ่อนมาทดแทน HRT เพื่อจะได้พัฒนาเป็นสารเสริมอาหาร (nutraceutical or functional food) หรือยา หรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

## 2. บทตรวจสอบเอกสาร

### 2.1 ระบบปกคลุมร่างกาย (Integumentary system)

หมายถึงระบบอวัยวะที่ปกคลุมอยู่นอกสุดของร่างกายได้แก่ ผิวหนัง (skin) และอวัยวะที่มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนัง เช่น เล็บ ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ ผมหงอก และรูขุมขน ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย โดยคิดเป็นน้ำหนักประมาณ 16% ของน้ำหนักตัว มีลักษณะแตกต่างกันตามแต่ละส่วนของร่างกาย ทั้งในโครงสร้าง ความหนา และสีผิว ผิวหนังตรงบริเวณที่ต่อเนื่องกับ mucous membrane เรียกว่า mucocutaneous junctions เช่น บริเวณริมฝีปาก ต่อเนื่องกับเยื่อช่องปาก (oral mucosa) บริเวณเปลือกตาที่ต่อเนื่องกับเยื่อบุตาขาว (conjunctiva) บริเวณจมูกที่ต่อเนื่องกับเยื่อโพรงจมูก (nasal mucosa) บริเวณแคมเล็กที่ต่อเนื่องกับเยื่อช่องคลอด (vaginal mucosa) บริเวณปลายอวัยวะเพศชายที่ต่อเนื่องกับเยื่อท่อน้ำอสุจิ (prepuce) และบริเวณทวารหนัก (anus) ที่ต่อเนื่องกับเยื่อบุลำไส้ใหญ่ (rectal mucosa) เป็นต้น และแบ่งกันอวัยวะภายในออกจากสิ่งแวดล้อมภายนอก มีหน้าที่ที่สำคัญดังนี้ (Haake *et al.*, 1999) คือ

**ป้องกัน (Protection)** เนื่องจากผิวหนังอยู่ชั้นนอกสุดของร่างกาย จึงมีหน้าที่เป็นด่านแรกในการเผชิญกับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น แสงแดด ความร้อน ความเย็น สารเคมี แรงกระแทกและเชื้อโรคต่างๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันการระเหยของน้ำออกจากร่างกายไม่ให้มากเกินไป

**รับความรู้สึก (Sensation)** ผิวหนังเป็นอวัยวะรับความรู้สึกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดของร่างกาย ประกอบด้วยอวัยวะรับความรู้สึกเจ็บปวด ความร้อน-เย็น รับสัมผัส และรับแรงกด เป็นต้น

**ควบคุมสมดุลความร้อนของร่างกาย (Thermoregulation)** โดยอาศัยการทำงานของ ต่อมเหงื่อ (eccrine sweat glands) ขน (hairs) กลุ่มร่างแหเส้นเลือดฝอยแดง-ดำในผิวหนัง และ ชั้นไขมันที่สะสมอยู่ใต้ผิวหนัง (subcutaneous adipose tissue) เช่น เวลาที่อุณหภูมิของร่างกายสูงเกินไป ร่างกายจะระบายความร้อนออกไป โดยการระเหยของเหงื่อจากต่อมเหงื่อและการขยายตัวของกลุ่มร่างแหเส้นเลือดฝอยแดง-ดำในผิวหนัง แต่ถ้าหากอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมต่ำกว่าร่างกายมาก ร่างกายจะรักษาระดับความร้อนในร่างกายให้คงที่โดยการหดตัวของกล้ามเนื้อ (arrector pili muscles) ที่เกาะอยู่กับรูขุมขน ทำให้เกิดภาวะขนลุกและการหดตัวของกลุ่มร่างแหเส้นเลือดฝอยรวมกับการเผาผลาญไขมันในชั้นใต้ผิวหนังให้เป็นพลังงานความร้อนเพื่อรักษาควบคุมอุณหภูมิในร่างกายให้คงที่

**ควบคุมระบบเมตาบอลิซึม (Metabolism)** ของร่างกาย โดยชั้นไขมันใต้ผิวหนังจะเป็นแหล่งสะสมพลังงานที่สำคัญของร่างกาย โดยเก็บสะสมไว้ในรูปของ triglyceride นอกจากนี้เซลล์ในชั้นหนังกำพร้ายังสามารถสร้างวิตามินดีให้กับร่างกาย

**ผิวหนังประกอบด้วย 3 ชั้น คือ (รูปที่ 1-1)**

1. ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) เป็นชั้นที่อยู่บนสุด
2. ชั้นหนังแท้ (Dermis หรือ corium) เป็นชั้นที่อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้า
3. ชั้นใต้ผิวหนังจะเป็นชั้น Hypodermis หรือ Subcutaneous tissues ซึ่งประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่กันอย่างหลวมๆ (loose connective tissues) และไขมัน (Adipose tissues) ซึ่งจะมีจำนวนมากน้อยแตกต่างกันในแต่ละส่วนของร่างกาย

### 2.1.1. ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)

Epidermis เป็นชั้นของผิวหนังที่ปกคลุมอยู่บนสุดมีต้นกำเนิดมาจาก surface ectoderm ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเซลล์ที่มีการเกิด เจริญเติบโตพัฒนาการและตายลอกหลุดออกไปจากร่างกายตลอดเวลา และเป็นชั้นที่ทำให้กำเนิดโครงสร้างต่างๆ (skin derivatives or appendages) ได้แก่ ขน รูขุมขน และต่อมไขมันรวมเรียกว่า pilosebaceous units ต่อมเหงื่อ (sweat gland) และเล็บ (nail)

ชั้น epidermis มีความหนาโดยเฉลี่ยประมาณ 0.4 ถึง 1.5 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับความหนาทั้งหมดของผิวหนัง (skin) ซึ่งมีความหนาเฉลี่ยโดยประมาณ 1.5-4.0 มิลลิเมตร แต่ความหนาของชั้น epidermis นี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละบริเวณของร่างกาย ทำให้สามารถแบ่งผิวหนังตามความหนาของ epidermis ออกได้เป็น 2 ชนิด คือ

**1. Thick skin** คือ ผิวหนังที่มีชั้น epidermis หนา โดยเฉพาะชั้น stratum corneum พบบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า (palms and soles) ซึ่ง thick skin นี้จะไม่มียข รูขุมขน และกล้ามเนื้อ arrector pili muscles อยู่ในบริเวณเหล่านี้ แต่จะมีต่อมเหงื่อ eccrine sweat glands เป็นจำนวนมาก ดังนั้นบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าของร่างกาย จึงไม่พบว่ามีเส้นขนหรือน้ำมันจากต่อมไขมัน (sebum) เหมือนบริเวณอื่นของร่างกาย เช่น ใบหน้า แต่จะมีเหงื่อออกมากบริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า

**2. Thin skin** คือ ผิวหนังที่มีชั้น epidermis บาง พบได้ทั่วร่างกาย ยกเว้นบริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า ซึ่งผิวหนังชนิดนี้จะมี skin derivatives ทุกชนิด คือ รูขุมขน ต่อมไขมัน ต่อมเหงื่อ และต่อม apocrine sweat gland

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของชั้น epidermis มากกว่า 80% คือ เซลล์ที่มีชื่อว่า keratinocytes และเซลล์ส่วนน้อยที่เรียกว่า dendritic cells เซลล์กลุ่มนี้คือกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายกันคือมี cytoplasm ยื่นออกไปจากตัวเหมือนแขนขา (dendritic processes) เซลล์กลุ่มนี้

จะเป็น cells ที่เดินทางมาจากตำแหน่งอื่นมาอาศัยอยู่ที่ผิวหนัง (immigrant cells) ประกอบด้วย เซลล์ 3 ชนิด คือ melanocytes, Merkel cells และ Langerhans cells ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

Keratinocyte เป็นเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบหลักของ epidermis ภายใน keratinocytes ทุกตัวมี keratin intermediate filaments อยู่ใน cytoplasm มีชื่อเรียกว่า tonofilament จัดเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ทำหน้าที่เหมือนเป็นกระดูกสันหลังของ keratinocytes ถ้าหากพบว่ามี keratin filaments อยู่ในเซลล์ใด สามารถบอกได้เลยว่าเซลล์นั้นคือ keratinocytes (epithelial cells) นอกจากนี้แล้ว keratin filaments ยังเป็นส่วนหนึ่งของ โครงสร้างที่ทำหน้าที่เชื่อมยึดติดระหว่าง keratinocytes แต่ละตัวให้ติดอยู่ด้วยกันโดยโครงสร้าง ดังกล่าวมีชื่อว่า desmosomes เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เห็นเหมือนสะพานเชื่อมระหว่าง เซลล์ที่เรียกว่า intercellular bridges เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญ หากมีความผิดปกติเกิดขึ้น จะทำให้เซลล์แต่ละตัวแยกจากกัน ทำให้เกิดโรคผิวหนังในกลุ่ม pemphigus ขึ้น

Keratinocytes เป็นเซลล์ที่มี nucleus ติดสีเข้ม เซลล์เหล่านี้เกิดจากการแบ่งตัวของ basal cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ชั้นล่างสุดของ epidermis เมื่อเซลล์เหล่านี้เจริญเติบโต (development) และมีพัฒนาการมากขึ้น (differentiation) ก็จะเคลื่อนตัวเองขึ้นไปยังชั้นบน ๆ และเซลล์จะมีการเพิ่มขนาดใหญ่ขึ้นและแบนราบลง มีการเปลี่ยนแปลงของระบบ metabolism ของเซลล์ มีการสร้างโปรตีนและไขมันที่มีลักษณะเฉพาะ มีการเปลี่ยนแปลงของ cell membrane มีการสลายตัวของ nucleus และมีการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ โดยการเปลี่ยนแปลงขั้นสุดท้าย (terminal differentiation) ทำให้ได้ keratinocytes ที่ตายแล้วที่มีชื่อใหม่ว่า corneocytes ซึ่ง corneocytes นี้จะมีเฉพาะ keratin filament และ matrix protein อยู่ในเซลล์ โดยมีโปรตีนและไขมันอยู่ที่ cell membrane เท่านั้น จะไม่มี nucleus หรือ organelles อื่นๆ หลังจากนั้น corneocytes ก็จะลอกหลุดออกไปกลายเป็นขี้ไคล (keratin) ขบวนการนี้ เรียกว่า keratinization หากมีความผิดปกติของขบวนการนี้ ก็ทำให้เกิดโรคผิวหนังได้เช่น กลุ่มโรค ichthyosis เป็นต้น เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนตัวออกมาชั้นบนเรื่อยๆ ทำให้สามารถแบ่ง epidermis ออกเป็นชั้นต่างๆ โดยแต่ละชั้นก็จะมี keratinocytes ที่อยู่ในระยะต่างๆ ของการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ดังนี้ (รูปที่ 1-2)

**1. Stratum germinativum** หรือชั้น basal cell layer ชั้นนี้จะอยู่ชั้นล่างสุด โดยมีโครงสร้างที่เรียกว่า basal lamina ยึดชั้นนี้ไว้ติดกับชั้น dermis ที่อยู่ข้างล่างตรงตำแหน่งที่เรียกว่า dermoepidermal junction ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันชั้นเดียวที่ชื่อว่า basal cells เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวตลอดเวลา (mitotically active) รูปร่างเซลล์เป็น columnar-shaped มี nucleus ขนาดใหญ่ keratin filaments ในชั้นนี้จะมีขนาดเล็ก

และจับกลุ่มอยู่รอบๆ nucleus และไปยึดติดกับ desmosome ซึ่งเป็นตัวยึดระหว่าง basal cells ไว้ด้วยกัน นอกจากนี้ยังไปยึดติดกับ hemidesmosome ซึ่งเป็นตัวยึดระหว่าง basal cells กับ dermis ข้างล่าง hemidesmosome นี้เป็นส่วนหนึ่งของ basal lamina ภายใน cytoplasm ของ cell มี ribosome จำนวนมาก แต่มี rough endoplasmic reticulum (RER) และ mitochondria น้อย ส่วน golgi apparatus มีขนาดเล็ก ในชั้น basal cell layer นี้จะมี keratin 5 คู่กับ keratin 14 (k5/k14) อยู่ในเซลล์ซึ่งการที่เซลล์ใดมี k5 จับคู่กับ k14 ในเซลล์ เป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์ที่มีหน้าที่แบ่งตัวให้กำเนิดลูกหลาน (stem cells) เช่น basal cells มีหน้าที่แบ่งตัวให้กำเนิด keratinocytes ระยะเวลาที่ basal cell แบ่งตัวให้กำเนิด keratinocytes และมีขบวนการ keratinization จนสมบูรณ์กลายเป็น corneocyte ใช้เวลาประมาณ 14 วัน และระยะเวลาที่ corneocytes หลุดลอกออกไปกลายเป็นขี้ไคล (keratin) ใช้เวลาอีกประมาณ 14 วัน เมื่อ basal cell แบ่งตัวให้กำเนิด keratinocyte และเคลื่อนที่ออกมาชั้นบนกว่ากลายเป็นชั้นที่มีชื่อเรียกว่า stratum spinosum ต่อไป

**2. Stratum spinosum** ประกอบไปด้วย keratinocyte ที่มีรูปร่างขนาดใหญ่ หลายเหลี่ยม คล้ายมีหนามยื่นออกมาจากผิวเซลล์ (spine) ทำให้ชั้นนี้ได้ชื่อตามรูปร่างของเซลล์ ชั้นนี้ประกอบไปด้วยเซลล์เรียงตัวกันหนาประมาณ 5-10 ชั้น โดยเซลล์ที่อยู่ติดกับชั้น basal cell มากที่สุด (suprabasal spinous cells) จะเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ชั้นบนขึ้นไป เซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมและ nucleus รูปร่างกลม ส่วนเซลล์ที่อยู่ชั้นบนๆ (upper spinous cell layer) จะมีขนาดใหญ่และแบนราบมากกว่า มีการสร้าง organelles ชนิดใหม่ที่เรียกว่า lamella granules หรือ membrane-coating granules (MCG) กระจายอยู่ทั่วไป พบมากบริเวณใกล้ golgi complex ส่วน nucleus ของเซลล์ในชั้นนี้ สามารถตรวจพบ Barr body ซึ่งเป็น basophilic planoconvex body ขนาด 1  $\mu\text{m}$  ได้โดยการทำ buccal smear หรือ scraping โดยปกติ X-chromatin ในเพศหญิงเป็น XX แต่จะมีเพียง X-chromatin เดียวที่ทำงานอีกตัวหนึ่งจะถูก inactivated และรวมเป็นก้อนทำให้เห็นเป็น Barr body ในเซลล์ keratin filaments ใน spinous cell layers นี้จะเป็น k1 คู่กับ k10 ซึ่ง keratin filaments คู่นี้แสดงว่าเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่กำลังพัฒนาการ (epidermal-type pattern of differentiation) และกำลังมีขบวนการ keratinization อยู่ (keratinization-specific keratins) ขอบของเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายหนาม (spine) นั่นคือ desmosome ที่มี keratin filament มายึดติดอยู่โดย desmosome จะเป็นตัวยึดระหว่าง cell ไว้ด้วยกันเหมือนสะพานเชื่อมระหว่างเซลล์ที่เรียกว่า intercellular bridges เซลล์ในชั้น stratum germinativum และ stratum spinosum รวมเรียกว่า stratum malpighi (Malpighian layer) ซึ่งจะเคลื่อนตัวขึ้นไปชั้นบนกว่ากลายเป็นชั้นที่มีชื่อเรียกว่า stratum granulosum

**3. Stratum granulosum** (Granular cell layer) ชั้นนี้ได้ชื่อตามลักษณะของเซลล์ คือ granular cells เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างแบน ภายใน cytoplasm บรรจุด้วย

basophilic granules จำนวนมาก granules นี้มีชื่อเฉพาะว่า keratohyaline granules ซึ่ง granular cell เป็นเซลล์ที่มี active synthetic metabolism granular cells ในชั้นนี้จะเรียงตัวกัน 3-5 ชั้น เมื่อมองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นเป็นจุดๆ สีน้ำเงินกระจายอยู่ในเซลล์ จนบดบังโครงสร้างอื่นภายในเซลล์ keratohyaline granules ประกอบไปด้วยโปรตีนที่ชื่อ profilaggrin keratin intermediate filaments และ loricrin ซึ่งสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับ ขบวนการ keratinization ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

Profilaggrin จะเริ่มสร้างในชั้น granular cell layer และถูกเปลี่ยนโดย ขบวนการ proteolysis เป็น filaggrin ตรงตำแหน่งที่เซลล์จะเปลี่ยนจาก granular cells ไปเป็น corneocytes (site-specific proteolysis) และได้เป็น filaggrin อยู่ในชั้น stratum corneum โดยทำหน้าที่เป็นเสมือนกาว (interfibrillary matrix) ยึดระหว่าง keratin filament ทำให้เกิดเป็น ร่างแหของ keratin ที่แข็งแรงสมบูรณ์ ขณะเดียวกัน keratin filaments ซึ่งเดิมเป็น k1 กับ k10 ก็จะถูก proteolysis และ phosphorylation ไปเป็น k2 จับกับ k11 แทน

ขณะเดียวกัน lamella granules หรือ membrane coating granules (MCG) หรือ Odland bodies หรือ keratinosomes ซึ่งเริ่มสร้างในชั้น stratum spinosum ชั้นบน เมื่อ เซลล์เคลื่อนมาอยู่ตรงตำแหน่งที่จะเปลี่ยนจาก granular cell ไปเป็น corneocyte จำนวน MCG จะเพิ่มมากขึ้นและเริ่มเชื่อมต่อกับ cell membrane แล้วปล่อยสารที่บรรจุอยู่ภายในออกมาอยู่ ระหว่างเซลล์ (intercellular space) ซึ่งสารนี้ประกอบไปด้วย glycolipid sterols และ phospholipids มีหน้าที่ไปเคลือบ corneocyte ไว้ (intercellular cementing substance) ช่วย ป้องกันการสูญเสียน้ำของเซลล์ (water barrier) ช่วยทำให้เซลล์ยึดติดกันอย่างมีประสิทธิภาพ และยังเป็นสิ่งที่มีผลต่อการดูดซึมยาที่ทาลงบนผิวหนังด้วย จะเห็นได้ว่า keratohyaline granules เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญ หากเกิดความผิดปกติขึ้นหรือว่าหายไป ก็จะทำให้เกิด โรคต่างๆ ในกลุ่มโรค ichthyosis เช่น ichthyosis vulgaris เป็นต้น ในสัตว์ทดลองที่พบว่าหาก เกิดภาวะ essential fatty acid deficiency จะทำให้มีจำนวน MCG ลดลง มีไขมันออกมา เคลือบระหว่างเซลล์ (barrier lipid) ลดลง ทำให้ water barrier เสียไป เซลล์จะเสียน้ำออกไป มาก ทำให้ผิวหนังสูญเสียน้ำ จึงเกิดความผิดปกติขึ้น หรือในคนที่ชอบล้างมือบ่อยๆ ด้วยสบู่ หรือน้ำยาต่างๆ ก็ล้างเอา barrier lipid เหล่านี้ออกไปหมด ทำให้ water barrier เสีย เกิดเป็น โรคผิวหนังขึ้น เมื่อเซลล์เคลื่อนตัวและเปลี่ยนแปลงมาจนถึงตำแหน่งรอยต่อระหว่าง granular cell กับ corneocyte (granular-cornified interface) เซลล์ก็จะเปลี่ยนกลายเป็น corneocytes ในชั้น stratum corneum

**4. Stratum corneum** (Horny layer or cornified layer) ชั้นนี้ประกอบด้วย เซลล์ที่ชื่อว่า corneocyte หรือ cornified cell ซึ่งเปลี่ยนมาจาก granular cell เมื่อเปลี่ยนเป็น corneocyte จะสูญเสียน้ำหนักตัวไปประมาณ 45-86% ทำให้เห็นขอบเขตของ cell ที่อยู่ติดๆ กันคล้ายร่างแหภายใน cell ไม่มี organelles ชนิดใด ยกเว้น keratin ที่สมบูรณ์แล้ว (mature

keratin) เซลล์ในชั้นนี้จะมีขนาดใหญ่ที่สุดใน epidermis เซลล์ในชั้นนี้มีหน้าที่ปกป้องผิวจาก ภัยอันตรายภายนอก (mechanical protection) ป้องกันการสูญเสียน้ำไปจากผิวหนัง (barrier to water loss) และเป็นด่านผ่านทางของยาหรือสารต่างๆ จากภายนอกในชั้นนี้ desmosome ซึ่งเป็นตัวยึดระหว่างเซลล์จะเริ่มถูกทำลาย ทำให้แต่ละเซลล์แยกจากกันเริ่ม ขบวนการที่เรียกว่า desquamation คือ การลอกหลุดของ corneocytes ออกไปเป็นขี้ไคล ถ้าหากขบวนการดังกล่าว ผิดปกติ ก็จะทำให้เกิดโรคในกลุ่ม ichthyosis ได้ เช่น X-linked Ichthyosis และ Harlequin fetus ชั้น stratum corneum นี้จะมีความหนาบางแตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย ผิวหนังที่จัดเป็น thick skin จะมีชั้น corneum หนา พบที่บริเวณฝ่ามือฝ่าเท้า โดยปกติถ้าชั้น corneum หนา ชั้น granular cell layer ก็จะมีขนาดตามไปด้วย ถ้าชั้น corneum หนา แต่ชั้น granular cell layer บาง ถือเป็นความผิดปกติ เช่น ใน ichthyosis vulgaris ส่วนบริเวณผิวหนัง ที่จัดเป็น thin skin จะมีชั้น corneum บาง ชั้น granular cell layer ก็จะมีบางไปด้วย บริเวณฝ่า มือฝ่าเท้าที่จัดเป็น thick skin นั้น จะมีชั้น stratum lucidum เพิ่มขึ้นมาอีก 1 ชั้น ซึ่งชั้นนี้จะไม่ พบใน thin skin ทั่วๆ ไป

**5. Stratum lucidum** เป็นชั้นบางๆ แทรกอยู่ระหว่างชั้น granular cell layers และ stratum corneum พบเฉพาะบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าเท่านั้น ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ธรรมดาจะเห็นเป็นแถบชั้นบางๆ สีชมพูจางๆ การที่เห็นชั้นนี้ได้เป็นผลจากสาร glycolipid ที่อยู่ใน MCG ถูกปล่อยออกมาอยู่ระหว่างเซลล์มากกว่าบริเวณอื่น จึงเห็นเป็นชั้นนี้ขึ้น ซึ่งชั้นนี้จะไม่ พบในผิวหนังบริเวณ thin skin

#### **Dendritic cells**

เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายดาว มี cytoplasm ยื่นออกไปจากตัวเป็นแขนขา ที่เรียกว่า dendritic processes ในชั้น epidermis นี้ ประกอบไปด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ

1. Melanocyte เป็นเซลล์สร้างเม็ดสี
2. Merkel cell เป็นเซลล์เกี่ยวกับการรับความรู้สึก
3. Langerhans cell เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง (skin immune cell)

#### **2.1.2 ชั้นหนังแท้ (Dermis)**

Dermis หรือชั้นหนังแท้ เป็นชั้นที่อยู่ใต้ต่อชั้นหนังกำพร้า (epidermis) มีความ หนาประมาณ 1-2 มิลลิเมตร แต่บริเวณ eyelids และ prepuce จะบางกว่านี้ ส่วนบริเวณฝ่ามือ และฝ่าเท้าจะหนามากกว่านี้ ตรงบริเวณที่ epidermis ต่อกับ dermis นั้น จะเป็นรอยหยักคล้าย ลูกคลื่นของ epidermis ที่ยื่นลงมาใน dermis (epidermal ridges) และส่วนของ dermis ที่ยื่นขึ้น ไปบน epidermis (dermal ridges) เพื่อยึดติดกันแน่นมากขึ้น และเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสมาก

ชั้นทำให้เส้นเลือดใน dermis ไปเลี้ยง epidermis ได้มากขึ้น โครงสร้างที่เรียกว่า rete ridges นี้ ทำให้เกิดร่องบนผิวหนัง เห็นชัดบริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้าที่เรียกว่าลายนิ้วมือ (finger print)

Dermis มีต้นกำเนิดจาก mesoderm ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ระบบเส้นเลือด (vascular network) และเส้นประสาท (nerve) เป็นที่อยู่ของ skin derivatives, เซลล์ fibroblasts, เซลล์ macrophages, mast cells และเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากเซลล์ของระบบเลือด (blood-borne cells) เช่น lymphocytes และ plasma cells เป็นต้น หน้าที่ของชั้น dermis คือ ทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น (elasticity) ทนแรงยืดผิวหนังได้ (tensile strength) ปกป้องร่างกายจากภยันตราย (mechanical injury) อุดมน้ำไว้ (binds water) เพื่อจุดประสงค์ในการควบคุมสมดุลความร้อนของร่างกาย (thermal regulation) และเป็นประสาทรับสัมผัสต่างๆ (receptor of sensory stimuli) เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue matrix) ของ dermis มีองค์ประกอบหลักคือ collagen tissues ส่วนน้อยเป็น elastic tissues ใน matrix ที่เป็น glycoprotein proteoglycans และ glycoaminoglycans รวมเรียกว่า ground substance สามารถแบ่ง dermis ออกได้เป็น 2 ชั้น ตามความแตกต่างของ connective tissues organizations, cell density และ nerve and vascular pattern ได้ดังนี้คือ

**Papillary dermis** เป็นชั้นที่อยู่ติดกับ epidermis ประกอบด้วย collagen ขนาดเล็กและเป็น collagen type III มากกว่า type I และ elastic tissue ชนิด oxytalan elastic fiber ที่เรียงตัวตั้งฉากกับ epidermis มีเซลล์ fibroblasts จำนวนมาก และมีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว และมี metabolic activity มาก เพื่อประโยชน์ในการซ่อมแซมผิวหนัง (wound healing) โดยปกติชั้นนี้จะเกิดโรคน้อยกว่าชั้น reticular dermis

**Reticular dermis** เป็นชั้นที่อยู่ติดกับ papillary dermis ติดต่อกับชั้น hypodermis ประกอบด้วย collagen ที่มีขนาดใหญ่เป็น type I มากกว่า type III elastic fiber ที่เจริญเต็มที่ (mature elastic fiber) และทั้ง collagen และ elastic fiber จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ เมื่อลึกลงไปใน dermis ต่อกับชั้น hypodermis เส้นเลือดจะน้อยกว่าชั้น papillary dermis

### 2.1.3 ชั้นใต้ผิวหนัง (Hypodermis)

เป็นชั้นที่อยู่ติดกับ dermis ประกอบไปด้วย loose connective tissue มีส่วนของต่อมเหงื่อ collagen และ elastic fibers ที่ต่อเนืองลงมาจากชั้น dermis และเซลล์ไขมัน (fat or adipose tissues) โดยผมหรือขนที่กำลังเจริญเติบโต (actively growing hair follicles) จะยื่นลงมาอยู่ในชั้นนี้ด้วย เซลล์ไขมันเป็นองค์ประกอบหลักของชั้นนี้ ซึ่งเซลล์ไขมันนี้จะอยู่รวมกันเป็น lobule ที่มีตัวแบ่งกันที่เรียกว่า fibrous septa ซึ่งจะมีเส้นเลือด เส้นประสาท หลอดน้ำเหลือง (lymphatic vessels) อยู่ใน septa ความหนาของชั้น hypodermis นี้ จะขึ้นกับความ



หนาของชั้นไขมัน และขึ้นกับตำแหน่งของร่างกายด้วย เช่น บริเวณหน้าท้องจะหนามาก แต่บริเวณเปลือกตาหรือ penis จะบางมาก หน้าที่ของชั้นนี้คือ ให้ความอบอุ่นและรักษาความร้อนของร่างกายไว้ (insulates the body) เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกาย (reserve energy supply) เป็นเสมือนหมอนรองกันกระแทก (cushion) และทำให้ผิวหนังเคลื่อนไหวได้ไม่ติดแน่นกับโครงสร้างข้างใต้ผิวหนัง (mobility over underlying structure) นอกจากนี้ชั้น hypodermis ยังมีผลในด้านความสวยงาม (cosmetic effect) เช่น บริเวณแก้ม หากไม่มีชั้นนี้รองรับจะทำให้รูปหน้าดูไม่สวยงาม

**2.2 Skin derivatives** (Skin appendages) หมายถึง อวัยวะที่กำเนิดมาจากผิวหนัง ได้แก่

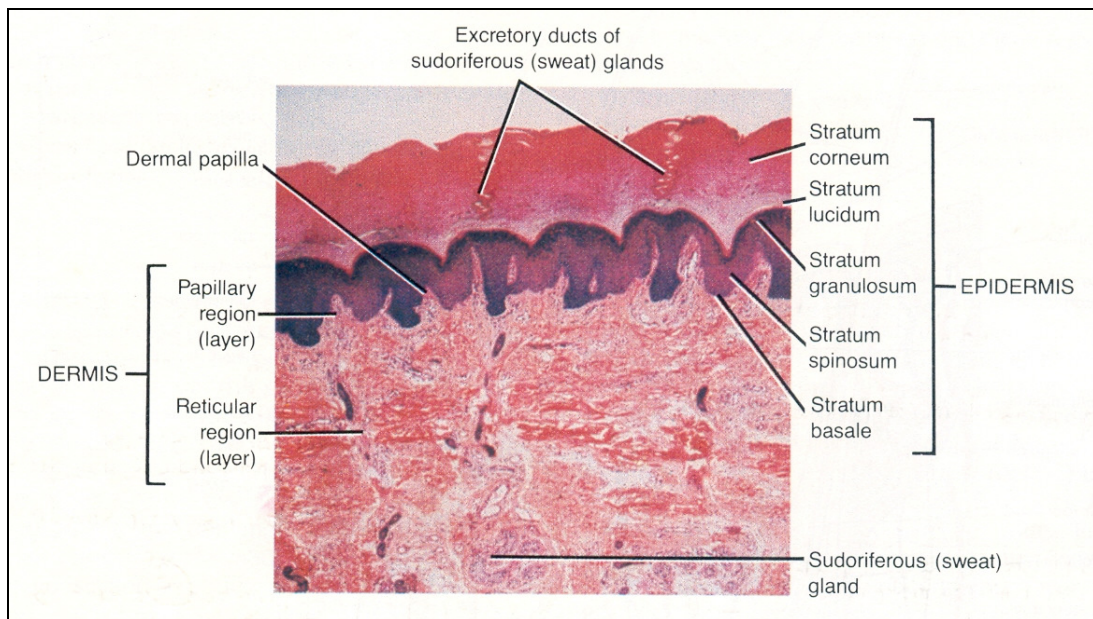
1. ผมหรือขน และรูขุมขน (Hairs and hair follicles)

Hair follicles (HF) มีลักษณะโครงสร้างเป็น tubular ซึ่งบริเวณฐานของ HF เรียกว่า hair bulb ล้อมรอบ hair papilla ที่ประกอบด้วย geminative cell เป็นบริเวณที่มีการเจริญของ keratin ต่อการสร้างเส้นผมหรือขน เรียกบริเวณดังกล่าวว่า hair matrix ซึ่งประกอบด้วย epithelial cell 5 ชั้นคือ 3 ชั้นในประกอบด้วยชั้น medulla, cortex และ cuticle เป็นบริเวณของ keratin ที่จะเจริญต่อเป็น hair shaft ส่วน 2 ชั้นนอกประกอบด้วย internal root sheath และ external root sheath เป็นบริเวณที่จะเจริญต่อเป็น epithelial sheath จากงานวิจัยพบว่าที่บริเวณของ hair follicle สามารถพบเซลล์หลายชนิดเช่น epithelial, mesenchymal, และ neural crest-derived cell และยังพบ pigmented keratin fiber อีกด้วย (Akamatsu *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2003; Zouboulis *et al.*, 2006) (รูปที่ 1-3) สำหรับวงจรชีวิตของเส้นผมแบ่งออกเป็น 3 ระยะคือ ระยะ anagen เป็นระยะการงอกและเจริญของเส้นผม ซึ่งในเด็กจะใช้เวลาประมาณ 2 ถึง 6 ปี และระยะดังกล่าวจะสั้นลงเมื่ออายุมากขึ้น ระยะที่ 2 คือระยะ catagen เป็นระยะหยุดงอกและขาดอาหารมาเลี้ยง ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3 สัปดาห์ และระยะที่ 3 คือระยะ telogen เป็นระยะพักและใช้เวลาประมาณ 3 เดือน ในระยะนี้ผมจะหลุดร่วงเป็นปกติและผลัดกันร่วง จากงานวิจัยพบว่าเอสโตรเจนมีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเจริญของ hair (Deplewski and Rosenfield, 2000) และพบการแสดงออกทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  อีกด้วย (Thornton *et al.*, 2003; Thornton *et al.*, 2006)

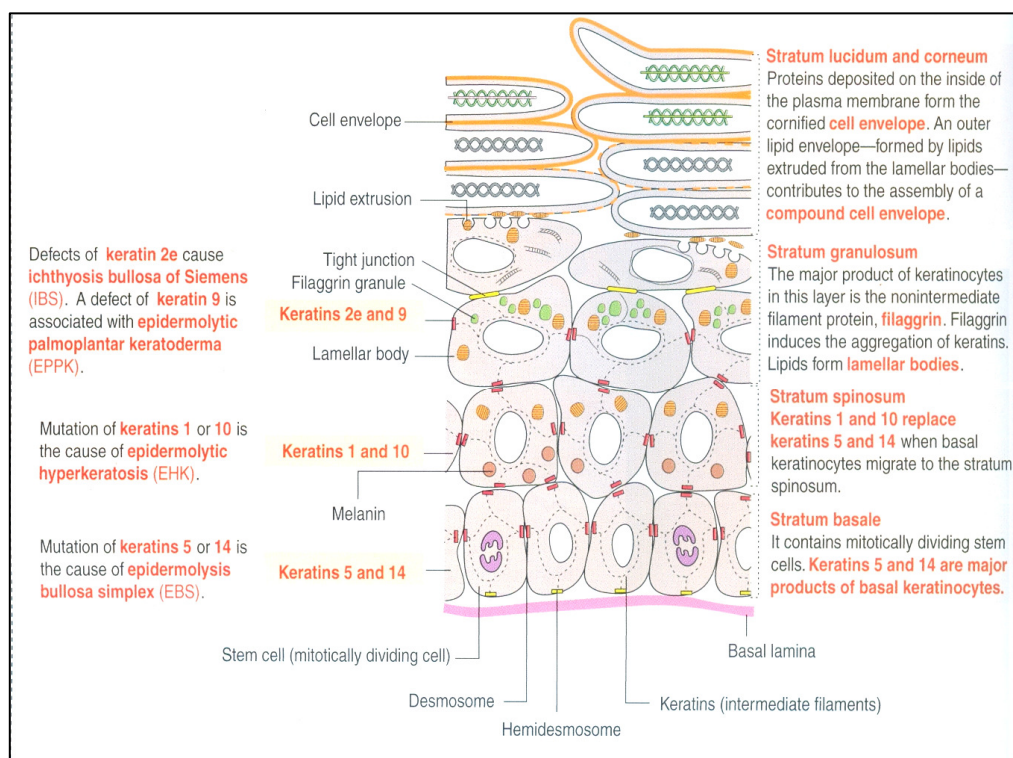
2. ต่อมไขมัน (Sebaceous glands)

พบอยู่ร่วมกับ hair follicle ทั่วร่างกาย ยกเว้นบริเวณฝ่ามือฝ่าเท้าซึ่งไม่มี hair follicle ก็จะไม่มีย่อมไขมัน พบอยู่ในชั้น dermis hair follicles ถือเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของ pilosebaceous unit (รูปที่ 1-3) จากงานวิจัยพบว่า เอสโตรเจนมีผลต่อการลดขนาดและการหลั่งของต่อมไขมันในทั้ง 2 เพศ (Plewig and Kligman, 2003) และยังพบการแสดงออกของ ER $\alpha$  เพียงชนิดเดียวอีกด้วย (Kariya *et al.*, 2005)

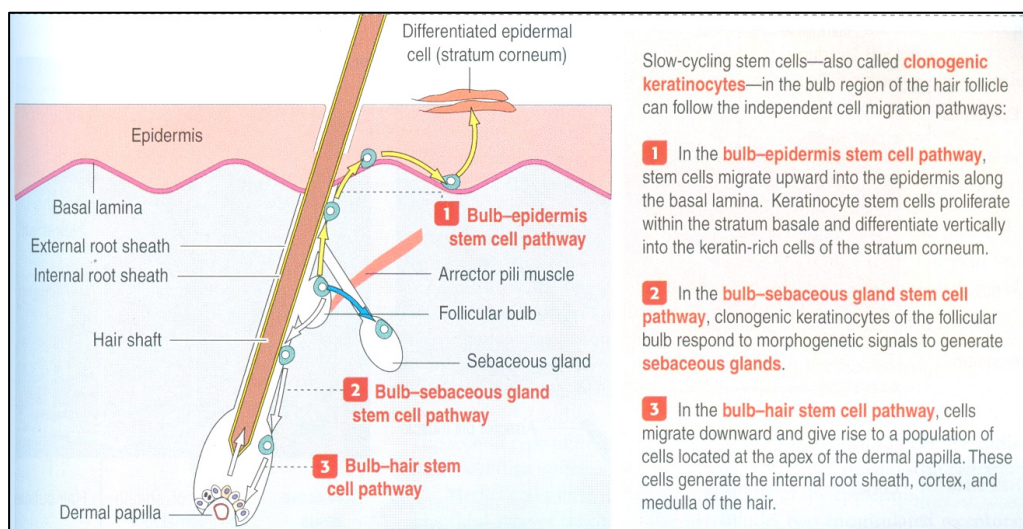
3. ต่อมเหงื่อ (Sweat glands) มี 3 ชนิด คือ
  - 3.1 Eccrine sweat gland
  - 3.2 Apoeccrine sweat gland
  - 3.3 Apocrine sweat gland
4. เล็บ (Nails)



รูปที่ 1-1 แสดงชั้นต่างๆ ของผิวหนังชั้น epidermis ชนิดหนา  
 ที่มา : Tortora and Anagnostakos, 1990



รูปที่ 1-2 แสดงโครงสร้างของผิวหนังชั้น epidermis และ keratin markers ในชั้นต่าง ๆ  
 ที่มา : Kierszenbaum, 2007



รูปที่ 1-3 แสดง keratinocyte (multipotent) stem cell ของ hair follicle และ sebaceous gland  
ที่มา : Kierszenbaum, 2007

## 2.2 การสมานแผล (Wound healing)

การสมานแผลเป็นกระบวนการที่ซับซ้อน สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะ inflammatory, ระยะ proliferative, และระยะ remodeling (รูปที่ 1-4) ซึ่งกระบวนการสมานแผลถูกควบคุมด้วย growth factors และ cytokines หลายชนิดที่หลั่งออกมาบริเวณแผล หากมีความผิดปกติอาจนำสู่ความเสียหายต่อเนื้อเยื่อและเวลาของการสมานแผลที่นานขึ้นด้วยเช่นกัน ระยะดังกล่าวสามารถอธิบายได้ดังนี้คือ (Li *et al.*, 2007)

### 2.2.1 ระยะ Inflammatory

หรือเรียกอีกชื่อว่า ระยะของการอักเสบ เป็นปฏิกิริยาแรกที่เกิดขึ้นหลังจากที่ร่างกายได้รับภยันตราย ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อบาดแผล สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ การตอบสนองของหลอดเลือดและการตอบสนองของเซลล์ กล่าวคือ ในช่วงแรกของการสมานแผลจะเกิดการขยายตัวของหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของเลือดและของเหลวไปยังด้านนอกของหลอดเลือด และทำให้การไหลเวียนของน้ำเหลืองหยุดชะงัก ทำให้มีอาการของการอักเสบดังนี้ คือ ผื่นแดง บวมและร้อนบริเวณแผล การอักเสบแบบเฉียบพลันโดยปกติใช้เวลาประมาณ 24 ถึง 48 ชั่วโมง และอาจนานถึง 2 สัปดาห์ เมื่อเกิดบาดแผลส่งผลให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดและรั่วไหลออกข้างนอก เกิดการเคลื่อนที่และการรวมตัวของ platelet

พร้อมทั้งมีการหลั่งสารสื่อต่าง ๆ ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการสมานแผล โดยการหลั่ง chemoattractants และ growth factor ต่าง ๆ ในขณะเดียวกันเกิดการแข็งตัวของเลือดและของเหลวอื่น ๆ เพื่อเป็นการกำจัดเซลล์ที่ตายออกจากบริเวณแผล นอกจากนี้ยังเกิดการตอบสนองของ mediator และ leukocyte อันประกอบด้วย neutrophil และ macrophage ซึ่งเป็นการทำความสะอาดและกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ บริเวณแผล โดยเฉพาะ macrophage ที่มีการหลั่ง growth factor และ cytokine ที่สำคัญ ทำให้เกิดการพัฒนาและเติบโตของ granulation tissue อีกด้วย (รูปที่ 1-8A)

1. การตอบสนองของหลอดเลือดและการห้ามเลือด (Vascular response and hemostasis)

เป็นการรั่วไหลของเลือดหลังจากที่เนื้อเยื่อเกิดบาดแผล ซึ่งขั้นแรกของการสมานแผลคือ การเกิดการห้ามเลือด (hemostasis) (Kirsner and Eagltein, 1993) ประกอบด้วย 2 กระบวนการหลัก ๆ ประการแรกคือ พัฒนาการของการแข็งตัวและการรวมตัวกันของ fibrin โดย platelet เป็นเซลล์แรกที่ปรากฏหลังจากเกิดแผลและเป็นศูนย์กลางของการเกิด hemostasis ซึ่งถูกกระตุ้นโดย extracellular matrix ที่ผนังของหลอดเลือด ตัวอย่างเช่น fibrillar collagen, fibronectin และ matrix protein อื่น ๆ ในขณะเดียวกัน platelet มีการหลั่งสารสื่อต่าง ๆ และเกิดการรวมตัวกันเป็น plug การเกิด plug ดังกล่าวมีผลทำให้การรั่วไหลของเลือดหยุดลง ประการที่สองเป็นการรวมตัวกันของ platelet โดยเอนไซม์จำเพาะที่พบได้ในเลือด เช่น Hageman factor XII ส่วนเนื้อเยื่อที่เสียหายยังมีการหลั่ง tissue factor (Grinnell *et al.*, 1981) ทำให้การทำงานของ platelet มีประสิทธิภาพมากขึ้น นอกจากนี้ platelet ยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการอื่นอีกด้วย เช่น reepithelialization, fibroplasia และ angiogenesis และยังกระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อชุดใหม่โดยการหลั่ง growth factor ต่าง ๆ เช่น transforming growth factor (TGF)- $\alpha$ , TGF- $\beta$  และ platelet derived growth factor (PDGF)

2. การตอบสนองของกลุ่มเซลล์และการอักเสบ (Cellular response and inflammation)

เป็นการรวมตัวของ leukocyte บริเวณแผล ในช่วงแรกของการอักเสบจะพบ neutrophil และ monocyte เป็นหลัก เกิดการเคลื่อนตัวของเซลล์ทั้งสองจากหลอดเลือดไปยังเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล แต่ในช่วงหลังของการอักเสบ จำนวนของ neutrophil จะลดลงและจะพบ monocyte เป็นหลัก การทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดดังกล่าวสัมพันธ์กับการหลั่ง chemotactic factor และ mast cell โดยที่บริเวณผิวเซลล์ของ neutrophil จะพบ integrin receptor ทำให้การทำงานของ neutrophil ดียิ่งขึ้น สำหรับหน้าที่หลักของ neutrophil คือ ทำลาย จับกินแบคทีเรียและ matrix protein ที่เสียหาย โดยใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน แต่หากมีการปนเปื้อนหรือติดเชื้อมาทำให้ระยะเวลาของการทำงานดังกล่าวยาวนานขึ้นได้ (รูปที่ 1-5)

นอกจากนี้ยังมีการเคลื่อนที่ของ monocyte ไปยังบริเวณเนื้อเยื่อแผลและเปลี่ยนรูปร่างเป็น macrophage ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น แสดงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะเด่นในช่วงปลายของกระบวนการอักเสบ การเคลื่อนที่ของ monocyte ไปยังบริเวณบาดแผลดังกล่าว อาศัยกลไกเช่นเดียวกับ neutrophil โดยมี chemoattractant เป็นตัวชักนำและมีการหลั่งสารออกมา เช่น monocyte chemoattractant protein 1 และ macrophage inflammatory protein 1 จากนั้นมีการย่อยสลายของ extracellular matrix กลายเป็นชิ้นเล็ก ๆ ของ collagen, fibronectin และ thrombin ซึ่งล้วนมีความจำเพาะต่อ monocyte attractant ส่วน macrophage จะทำหน้าที่จับกิน ย่อยสลาย ฆ่าจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำลาย neutrophil บางส่วน ผลผลิตดังกล่าวจะถูก enzyme และ active oxygen รับประทานทำลายต่อ ซึ่งสิ่งที่ได้กล่าวมาทั้งหมดนี้ถือเป็นกระบวนการสำคัญที่เกิดจากการทำงานของ monocyte และ macrophage นำไปสู่การเกิด angiogenesis และ granulation tissue

#### สารเคมีสื่อกลางในกระบวนการอักเสบ (Chemical mediators of inflammation)

สารเคมีสื่อกลางมีบทบาทในช่วงแรกและควบคุมกระบวนการอักเสบ เป็นได้ทั้ง agonist และ antagonist กับกระบวนการดังกล่าว ซึ่งสามารถแบ่งออกได้หลายกลุ่ม เช่น กลุ่ม vasoactive amine ของ histamine และ serotonin, plasma protease ของ kinin และ complement, plasma protein ใน coagulation system, arachidonic acid ซึ่งเป็น metabolite ของ prostaglandins (PGs) และ LTs, cytokine และ growth factor, free radical ของ nitric oxide และ oxygen derived free radical เป็นต้น (รูปที่ 1-6)

#### สารสื่อกลางจาก mast cell (Mast cell mediators)

สารสื่อหลักที่ถูกหลั่งจากแกรนูลของ mast cell ได้แก่ histamine แสดงออกโดยจับกับ histamine receptor 1 ทำให้เกิดการขยายตัวของ artery และเพิ่มความสามารถผ่านเข้า-ออก ของ venule องค์ประกอบสำคัญที่พบได้ในเม็ดแกรนูลของ mast cell คือ serotonin และ heparin โดย heparin ทำหน้าที่ในการต้านการแข็งตัวของเลือด โดยเฉพาะในช่วงแรกของกระบวนการอักเสบ

สำหรับระบบ kinin เกิดได้เมื่อเนื้อเยื่อได้รับอันตราย Hageman factor XII ในเลือดสัมผัสกับ collagen หรือ basement membrane ของหลอดเลือดแล้วจะถูกกระตุ้นให้กลายเป็น XIIa ไปเปลี่ยนสาร prekallikrein ในเลือดเป็น kallikrein ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อย high molecular weight kininogen (HMWK) ให้เป็น bradykinin ซึ่งเป็นตัวสำคัญในระบบ kinin bradykinin มีฤทธิ์ทำให้กล้ามเนื้อเรียบหดตัว หลอดเลือดแดงขนาดเล็กขยายตัว และเพิ่ม permeability ของหลอดเลือดดำขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดอาการเจ็บปวดบริเวณที่

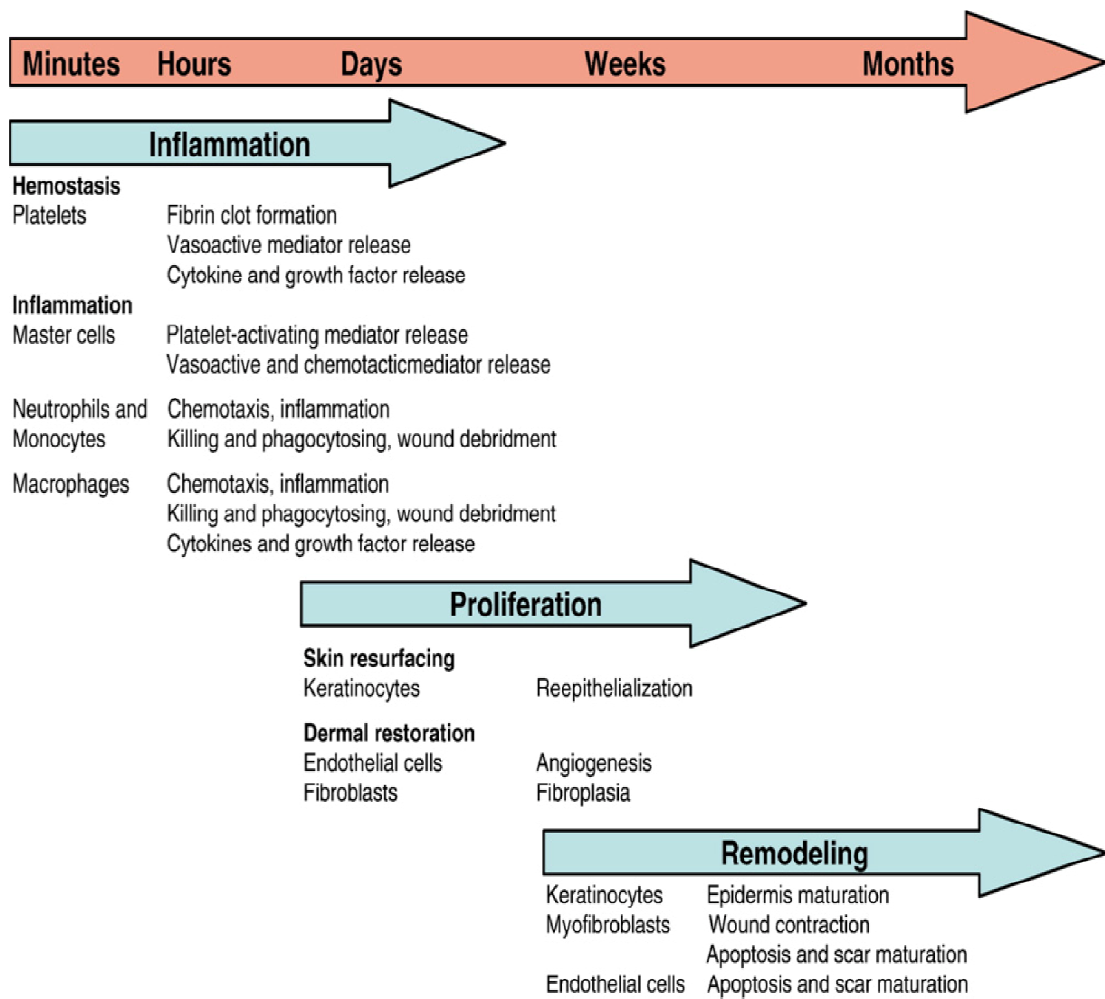
อักเสบอีกด้วย bradykinin มีผลในช่วงแรกของการอักเสบเท่านั้นและถูกทำลายด้วยเอนไซม์ kinase ซึ่งอยู่ในพลาสมาและเนื้อเยื่อ

#### **ระบบ complements**

เป็นกลุ่มของโปรตีนในพลาสมาที่ทำงานสัมพันธ์กันเป็นระบบ ปกติอยู่ในรูป inactive ทำหน้าที่สำคัญในเรื่องภูมิคุ้มกันและการอักเสบ ช่วงที่สำคัญคือการกระตุ้นชิ้นส่วน complement (C) ได้แก่ C3 ให้เปลี่ยนเป็น C3a และ C3b ตัวกระตุ้นอาจได้แก่ แอนติบอดี (IgM หรือ IgG) ที่จับกับแอนติเจน ทำให้ C1 เปลี่ยนไปกระตุ้น C3 หรืออาจเกิดจาก IgA หรือ endotoxin ของแบคทีเรีย ไปเปลี่ยน C3 โดยตรง เมื่อได้ C3b มาแล้ว มันจะไปกระตุ้น C5-C9 ตามลำดับ ได้สารหลายตัวที่มีผลต่อกระบวนการอักเสบและการทำลายเซลล์ที่มี antibody เกาะอยู่ บทบาทของ complement ในการอักเสบคือ ผลต่อหลอดเลือด, chemotaxis, phagocytosis และทำให้เซลล์ตาย เป็นต้น (รูปที่ 1-7)

#### **Growth factors**

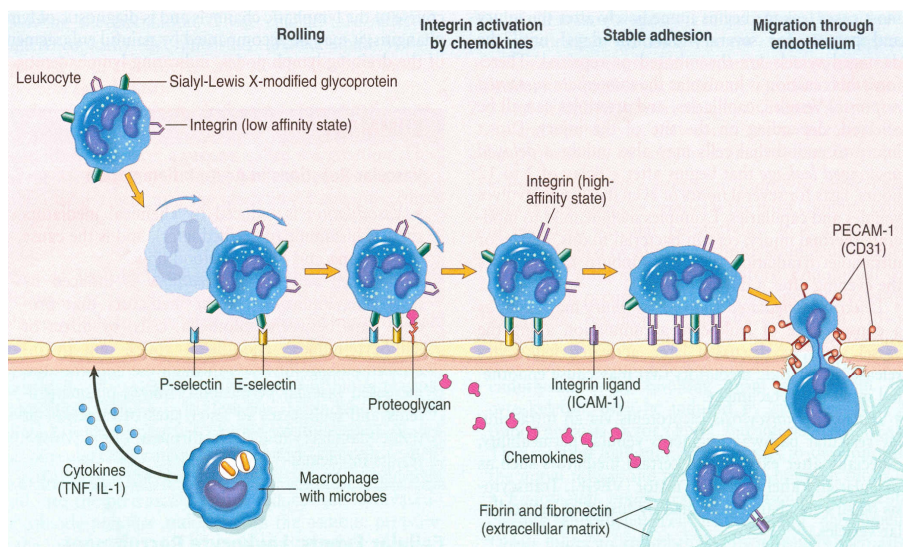
เป็นสารตัวกลางที่มีบทบาทหลายอย่างในกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ เช่น platelet derived growth factors (PDGF) มีบทบาทสำคัญในช่วงแรกของระยะการอักเสบ เป็น chemotactic ต่อ monocyte, macrophage และ neutrophil growth factor บางชนิดเกิดจากการหลั่งของ macrophage เช่น TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 และ TGF- $\beta$ 3 ซึ่งทั้งหมดมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของ keratinocyte และการสะสมของ extracellular matrix เป็นต้น (รูปที่ 1-8A)



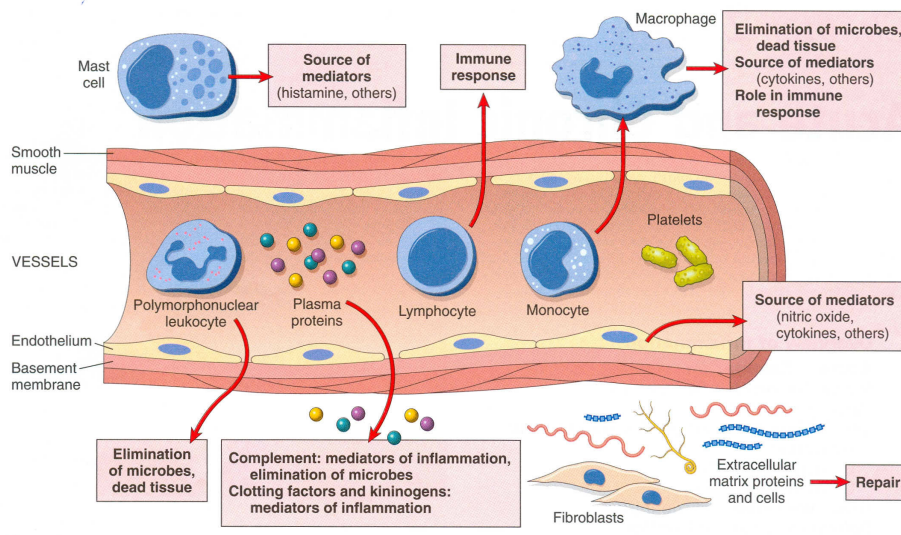
รูปที่ 1-4 แสดงกระบวนการสมานแผลในช่วงต่าง ๆ

ที่มา : Li *et al.*, 2007

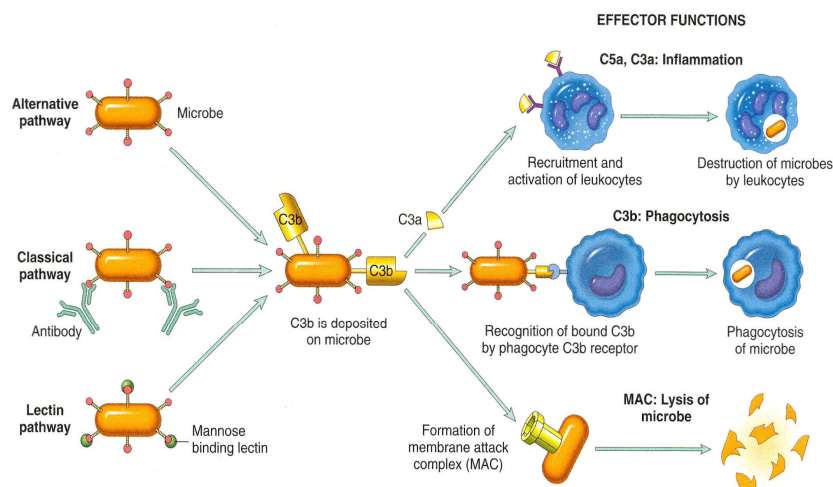




รูปที่ 1-5 แสดงกระบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมของ leukocyte ชนิด neutrophil บริเวณแผล  
ที่มา : Kumar et al., 2007



รูปที่ 1-6 แสดงองค์ประกอบและหน้าที่โดยพื้นฐานของกลุ่มเซลล์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องใน  
กระบวนการอักเสบ  
ที่มา : Kumar et al., 2007



รูปที่ 1-7 แสดงการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์ (complement cascades) ในกระบวนการ  
สมานแผล

ที่มา : Kumar *et al.*, 2007

### 2.2.2 ระยะเวลา Proliferative

เป็นช่วงของการสมานแผลที่เกิดหลังจากกระบวนการอักเสบ ซึ่งร่างกายจะพยายามซ่อมแซม โดยการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเรียกว่า regeneration และสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นมาแทนบริเวณที่ไม่สามารถแบ่งตัวทดแทนได้ทัน เป็นกระบวนการที่มีการแบ่งเซลล์ keratinocytes บริเวณขอบแผลแบบไมโทซิส (mitosis) โดยการกระตุ้นจาก growth factors ที่สร้างจากเกร็ดเลือด (platelet derived growth factors : PDGF), growth factors จาก macrophages dermal, parenchymal cells และรวมถึง growth factors จาก keratinocytes เองด้วย กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ถึง 72 ชั่วโมงหลังจากเกิดบาดแผล เมื่อแบ่งเซลล์แล้ว keratinocytes จะเคลื่อนที่ (migrate) จากขอบของบาดแผลเข้าปิดแผลในที่สุด เมื่อถึงขั้นตอนนี้จะมีการสร้าง basement membrane ขึ้นมาใหม่จึงเป็นการปิดกั้นการส่งสัญญาณ (signal) ระหว่าง keratinocytes กับองค์ประกอบที่อยู่ใน extracellular matrix ของผิวหนังชั้นหนังแท้ ทำให้ keratinocytes หยุดการเคลื่อนที่ และมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตามปกติต่อไป นอกจากนี้เซลล์ fibroblasts จะถูกกระตุ้นจาก macrophage-derived growth factors และ PDGF ให้มีการแบ่งเซลล์ เคลื่อนที่และมีการสร้าง extracellular matrix ซึ่ง extracellular matrix ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะเปลี่ยนแปลงเป็น neodermis พร้อมกับการสร้าง granulation tissue ซึ่งจะเกิดขึ้นภายใน 2 ถึง 4 วันหลังจากมีบาดแผล granulation tissue เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆ คือ macrophages, fibroblasts และ

หลอดเลือดเส้นใหม่จำนวนมากที่ฝังตัวอยู่ในโปรตีนโครงสร้างที่เป็น collagen, fibronectin, glycosaminoglycans และ glycoproteins นอกจากนี้ extracellular matrix ยังเป็นแหล่งของ cytokines ต่างๆ รวมถึง cytokines ที่มีหน้าที่ในการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย นอกจากนี้ fibroblasts จะทำหน้าที่สร้าง extracellular matrix ดังกล่าวแล้ว ยังพบว่า fibroblasts ที่เรียกชื่อเฉพาะว่า myofibroblasts ยังมีส่วนช่วยทำให้บริเวณแผลหดตัวเล็กลง โดย myofibroblasts จะสร้างมัดของเส้นใยแอกตินภายในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก (intracytoplasmic actin bundles) เพื่อเอื้อต่อการเคลื่อนที่และกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของบาดแผลดังกล่าว เมื่อ granulation tissue มีอายุมากขึ้น ก็จะมี collagen fibers มากขึ้น ในขณะที่ fibroblast และ หลอดเลือดมีจำนวนลดลง ในที่สุด granulation tissue จะกลายเป็น scar (รูปที่ 1-8B)

### Wound contraction

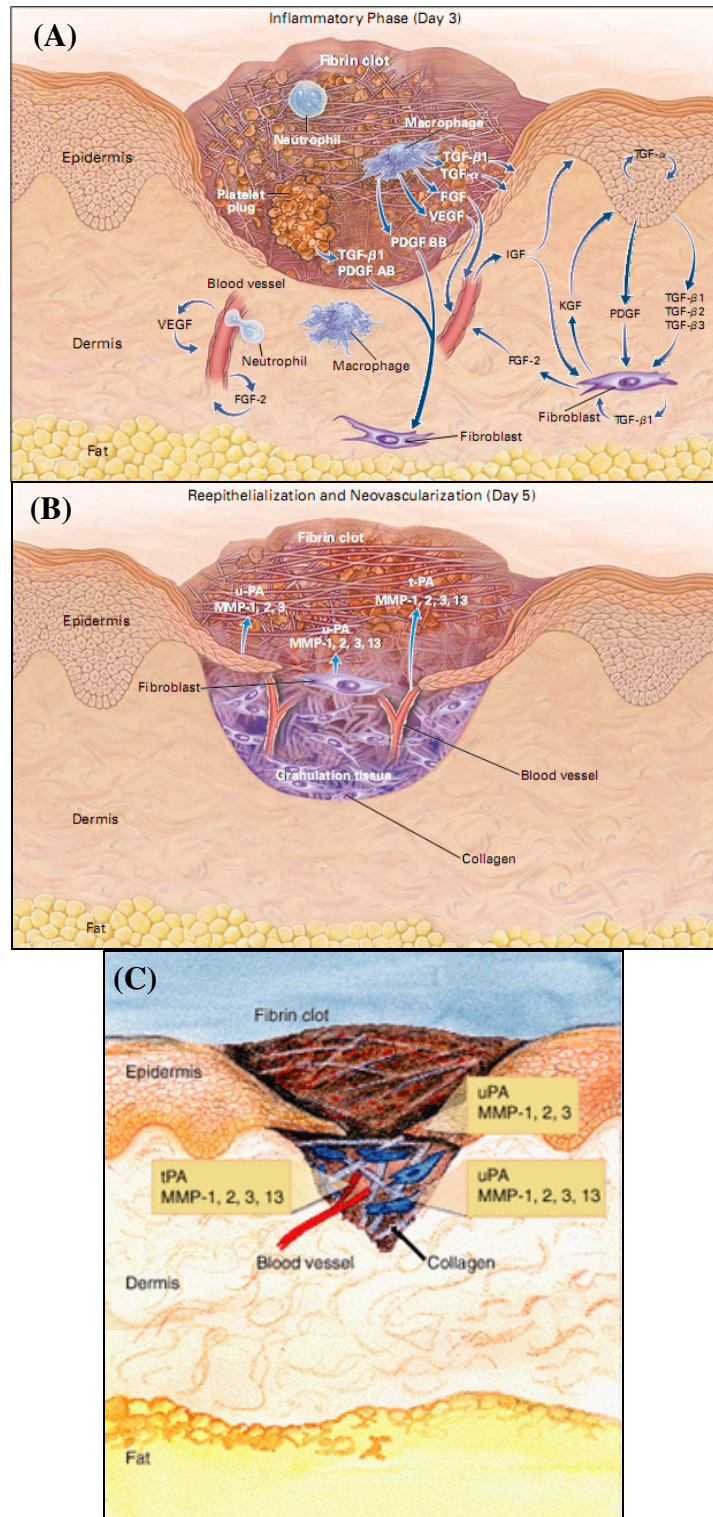
เมื่อเกิดบาดแผลและมีการ healing จะพบว่าขนาดของแผลเล็กลงเรื่อย ๆ ความสามารถในการหดเล็กลงนี้เกิดภายใน 2 ถึง 3 วัน หลังมีบาดแผล และคงอยู่ได้หลายสัปดาห์ กลไกในการหดตัวของแผล ปัจจุบันพบว่าเกิดจาก myofibroblast ใน granulation tissue ซึ่งเปลี่ยนแปลงรูปร่างมาจาก fibroblast และสร้างสารจำพวก actomyosin คล้ายกับเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ การหดเล็กลงของแผลช่วยทำให้เยื่อผิวหนังเข้ามาคลุมแผลได้เร็ว แผลจะหายเร็วขึ้น แต่ถ้าเป็นแผลขนาดใหญ่หรือเกิดบริเวณข้อพับ จะทำให้ข้อพับงอแข็ง ขยับไม่ได้ หรือบิดเบี้ยวเสียรูปร่าง เรียกว่า wound contracture (รูปที่ 1-8B)

### 2.2.3 ระยะเวลา Remodeling

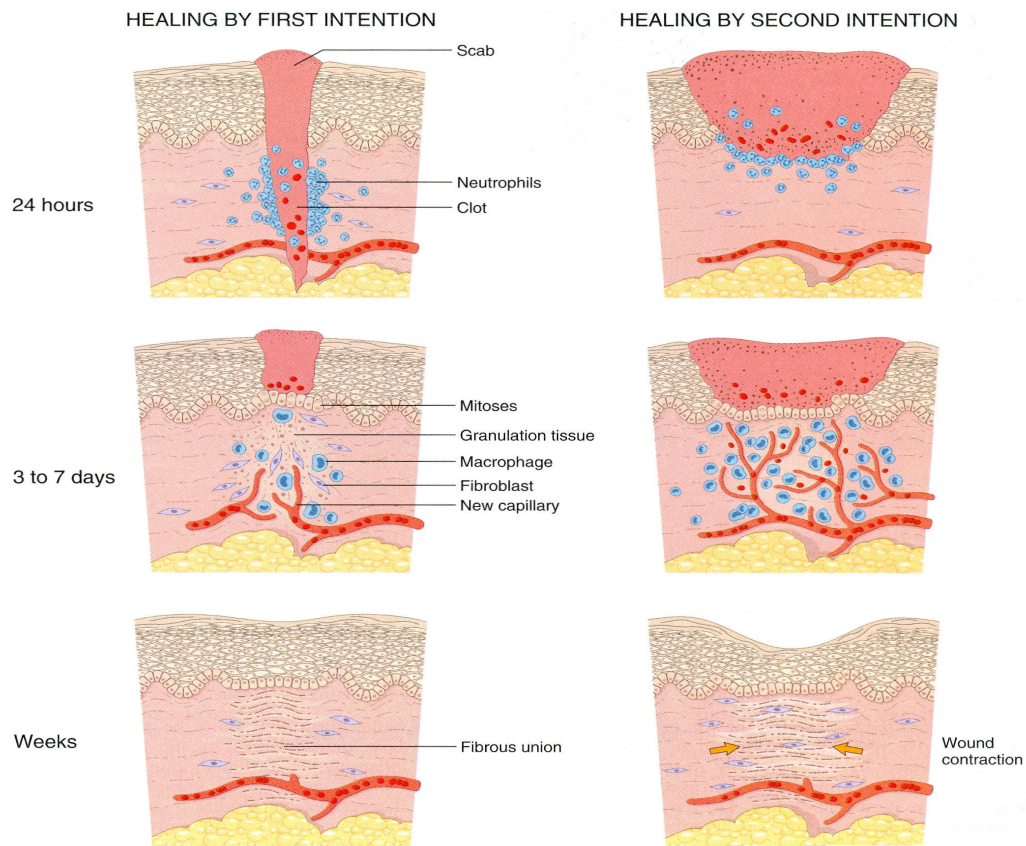
ระยะนี้ประกอบด้วยกระบวนการสะสมของ matrix ในบริเวณแผล เป็นการแทนที่การแข็งตัวของ fibrin ด้วย granulation tissue ซึ่งอุดมด้วย collagen type III และหลอดเลือด โดยการแทนที่ต่อ collagen type I ที่เกิดขึ้นในระยะ proliferative หนึ่งในคุณสมบัติของ remodeling คือ การสะสมของ extracellular matrix โดยเฉพาะ collagen fiber ที่มีมากถึง 80% ขององค์ประกอบในชั้น dermis และมีส่วนสำคัญต่อโครงสร้างของชั้นดังกล่าว โดยในคนปกติจะประกอบด้วย collagen type I 80% และ collagen type III 10% นอกจากนี้ในช่วงแรกของกระบวนการสมานแผลนั้นมีลักษณะคล้ายกันกับชั้น dermis ของทารก คือ ประกอบด้วย collagen type III เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสังเคราะห์โดยเซลล์ fibroblast โดยจะปรากฏเป็นกลุ่มแรกหลังจากเนื้อเยื่อได้รับภัยอันตราย 48 ถึง 72 ชั่วโมง และจะหลั่งออกมาเรื่อย ๆ จนกระทั่ง 5 ถึง 7 วัน และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง 2 ถึง 3 สัปดาห์ เมื่อเวลาผ่านไป 1 ปี collagen type III จะเริ่มแปรสภาพและปริมาณลดลงเรื่อย ๆ และมีการแทนที่เพิ่มขึ้นของ collagen type I ทำให้ชั้น dermis แข็งแรงขึ้น 40% ในช่วงเวลา 1 เดือน และอาจสูงถึง 70% ในระยะเวลา 1 ปี กระบวนการแทนที่ดังกล่าวถูกควบคุมโดยการสังเคราะห์ของ collagen ชุดใหม่ และการ

สลายตัวของ collagen ชุดเก่า ซึ่งทั้งหมดนี้เป็นการทำงานของเอนไซม์ matrix metallo proteinase (MMPs) และ inhibitor metalloproteinase เป็นหลัก (รูปที่ 1-8C)

การเกิดการสมานแผลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ primary intention เป็นการสมานแผลที่เกิดในแผลที่ได้รับการเย็บปิดแผล หรือปิดด้วย flap หรือ graft หลังจากเกิดแผลได้ไม่นาน ใช้ในกรณีที่แผลนั้นสะอาด หรือมีการปนเปื้อนไม่มาก และอีกประเภทคือ secondary intention หรือ spontaneous intention เป็นการหายของแผลที่สามารถหายเองได้ โดยกลไก contraction เป็นหลัก (พงศธร. 2544) (รูปที่ 1-9)



รูปที่ 1-8 แสดงกลไกของการสมานแผลซึ่งแบ่งเป็น 3 phases คือ (A) = inflammatory phase, (B) = proliferation phase และ (C) = remodeling phase  
 ที่มา : Singer and Clark, 1999



รูปที่ 1-9 แสดงขบวนการสมานแผลซึ่งแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ primary และ secondary intention  
ที่มา : Kumar *et al.*, 2007

### 2.3 เอสโตรเจน (Estrogens)

เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่พบได้มากในเพศหญิง และสามารถพบได้ในเพศชาย แต่ในปริมาณที่น้อย ในแต่ละโมเลกุลเป็น 18-carbon steroid ซึ่งมี phenolic A ring และ  $\beta$ -hydroxyl group หรือ ketone ที่ตำแหน่ง 17 ของ ring D ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภท โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและสมบัติทั่วไปดังนี้

1. เอสโตรเจนตามธรรมชาติ (natural estrogens) สารกลุ่มนี้เช่น estrone (E1), estradiol (E2) และ estriol (E3) เป็นต้น
2. เอสโตรเจนพวกสเตียรอยด์สังเคราะห์ (synthetic steroidal estrogens) สารกลุ่มนี้เช่น ester และอนุพันธ์ของ  $17\alpha$ -ethinyl derivative ของเอสโตรเจนตามธรรมชาติ
3. เอสโตรเจนพวกที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal estrogens) สารกลุ่มนี้เช่น diethylstilbestrol และ phytoestrogens เป็นต้น

### 2.3.1 ชีวสังเคราะห์และลักษณะทางเคมีของเอสโตรเจน

การสังเคราะห์เอสโตรเจนต้องใช้โคเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้น (รูปที่ 1-10) แหล่งสำคัญของรังไข่ที่มีการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนได้แก่ เซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และเซลล์ธีกาอินเทอร์นา (theca interna) ของฟอลลิเคิลของรังไข่ (ovarian follicle) เซลล์เหล่านี้สามารถสังเคราะห์ cholesterol ได้เองโดยอาศัยอะซิเตท (acetate) เป็นสารตั้งต้น หรืออาศัย cholesterol จากไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein, LDL) cholesterol บางส่วนที่เซลล์ยังไม่ได้ใช้จะถูกนำไปสะสมไว้ในแกรนูโลไซม์ (lipid granules) ในรูปคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) เมื่อ granulosa cell ได้รับการกระตุ้นจาก follicle stimulating hormone (FSH) ซึ่งเป็นโกนาโดโทรปินที่หลังจากต่อมใต้สมอง FSH จะจับกับตัวรับ (receptor) บน granulosa cells ผลของการจับกันทำให้มีการสร้างอะดีโนซีน 3', 5'-โมโนฟอสเฟต (adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) จากนั้น cAMP จะออกฤทธิ์ทำให้เกิดการแตกออกของโซ่ข้าง (side chain) ของ cholesterol ทำให้ได้เป็นเพรกนีโนโลน (pregnenolone) เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นที่ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของ granulosa cell จากนั้น pregnenolone จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นโปรเจสเตอโรน (progesterone) progesterone จะถูกส่งไปยัง theca interna เพื่อเปลี่ยนเป็นแอนโดรสทีนไดโอน (androstenedione) และ เทสโทสเตอโรน (testosterone) เอสโตรเจนถูกสร้างขึ้นได้จากสารตั้งต้น 2 ตัว คือ androstenedione หรือ testosterone โดยอาศัยปฏิกิริยาที่สำคัญคือ การแอโรมาไทเซชัน (aromatization) ของวงแหวน เอ (ring A) ของสารตั้งต้นดังกล่าว ขั้นตอนแรกของกระบวนการนี้คือ มีการไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) ของกลุ่มเมทิล (methyl group) ที่อยู่ตรงคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 19 ทำให้ได้กลุ่มไฮดรอกซีเมทิล (hydroxymethyl group) เกาะอยู่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ต่อจากนั้น hydroxymethyl group จะหลุดออกจากนิวเคลียส และ A ring จะถูกแอโรมาไทซ์ทำให้ได้ฟีโนลิกไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 (รูปที่ 1-11) ในบรรดาเอสโตรเจนหลักทั้ง 3 ชนิด 17-เบตาเอสตราไดออล (17 $\beta$ -estradiol, E2) มีฤทธิ์แรงที่สุด และเป็นสารคัดหลั่งส่วนใหญ่ของรังไข่ estradiol จะถูกออกซิไดซ์ (oxidized) เป็น estrone (E1) โดยที่ estradiol และ estrone สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ ส่วน estrone จะถูกไฮดรอกซีเลต (hydroxylate) ต่อไปเป็น estriol (E3) (รูปที่ 1-12) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ นอกจากรังไข่แล้วอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ รก ต่อมหมวกไต ตับ เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อลาย และ hair follicles ก็สามารถสร้างเอสโตรเจนในปริมาณที่มีนัยสำคัญได้เช่นกัน เอสโตรเจนที่สร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อดังกล่าวส่วนใหญ่เป็น estrone ซึ่งอาศัย androstenedione และ testosterone เป็นสารตั้งต้น เอสโตรเจนที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะเป็นแหล่งสำคัญของเอสโตรเจนในผู้ชายและผู้หญิงวัยหลังหมดระดู (postmenopause) นอกจากเอสโตรเจนตามธรรมชาติในร่างกายแล้ว ยังมีสารกลุ่มสเตียรอยด์สังเคราะห์และสารที่ไม่ใช่สเตียรอยด์อีกหลาย

ชนิดที่มี estrogenic activity โดยในบรรดาเอสโตรเจนที่ไม่ใช่สเตียรอยด์พบว่า diethylstilbrol มีฤทธิ์แรงที่สุด นอกจากนี้สารที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ที่มี estrogenic activity บางชนิดอาจพบได้ในพืชหลายชนิดเรียกว่า phytoestrogens เช่น เจนิสทีน (genistein) คูเมสทรอล (coumestrol) และเดดซีน (daidzein) อีกทั้งยังสามารถใช้ในการรักษา (replacement therapy) แทนการใช้เอสโตรเจนสังเคราะห์ได้อีกด้วย

### 2.3.2 ฤทธิ์ทางสรีระวิทยาและเภสัชวิทยา

#### ก. การพัฒนาเต็บโตของสตรี

เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของสตรี กระตุ้นการเติบโตของช่องคลอด มดลูก ท่อนำไข่ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของร่างกายที่บ่งบอกถึงภาวะเพศ เอสโตรเจนจะกระตุ้นให้มีการเติบโตของเต้านม และเร่งการเติบโตของกระดูก และเกี่ยวข้องกับการปิดของ epiphysis ด้วย นอกจากนี้ เอสโตรเจนทำให้มีการเจริญของขนที่รักแร้และขนที่อวัยวะสืบพันธุ์ รวมทั้งการมีสีผิวเข้มขึ้นที่แคมบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์และหัวนมสตรี รวมทั้งควบคุมการเกิดวงจรรอบประจำเดือน ส่วนฮอร์โมนแอนโดรเจนพบว่า มีส่วนร่วมเล็กน้อยในฤทธิ์เหล่านี้

#### ข. ผลทางเมตาบอลิซึม

เอสโตรเจนมีผลต่ออวัยวะสืบพันธุ์สตรีเป็นส่วนใหญ่ แต่ในอวัยวะอื่น ๆ เช่น กระดูก หลอดเลือด ตับ ระบบประสาท และหัวใจ ก็มี receptor ของเอสโตรเจนแต่ปริมาณน้อย ซึ่งผลของเอสโตรเจนต่ออวัยวะเหล่านี้มีดังนี้

##### 1. ผลต่อกระดูก

เอสโตรเจนยังช่วยเพิ่มมวล ความหนาและยับยั้งการสลายของกระดูกได้ (Yusuh *et al.*, 2010; Suwanpal *et al.*, 2009) มีผลต่อเมตาบอลิซึมของเกลือแร่เพื่อควบคุมให้เกิดความสมดุลของแคลเซียม โดยเพิ่มการดูดซึมในลำไส้และมีผลต่อการสร้างวิตามินดี 3 ในไต

##### 2. ผลต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน

เอสโตรเจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเมตาบอลิซึมของไขมัน โดยจะเพิ่ม high density lipoprotein (HDL) ลด low density lipoprotein (LDL) และมีการลดระดับของ cholesterol แต่จะเพิ่มระดับ triglycerides ในเลือด การเปลี่ยนแปลงนี้จะลดความเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจขาดเลือดได้ (myocardial ischemia)

##### 3. ผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต

เอสโตรเจนอย่างเดี่ยวจะลดระดับกลูโคสในเลือดในระยะที่อดอาหาร และลด insulin ลงเล็กน้อย ซึ่งไม่มีผลต่อเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตแต่อย่างใด



#### 4. ผลต่อโปรตีนในเลือด

เอสโตรเจนมีผลต่อโปรตีนในเลือดหลายชนิด ซึ่งเกี่ยวกับการจับกับฮอร์โมน และเกี่ยวกับการแข็งตัวของเลือด ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มระดับของ protein binding ต่าง ๆ ได้แก่ cortisol-binding globulin, thyroxine-binding globulin, sex hormone-binding globulin, transferrin, rennin substrate และ fibrinogen ผลของการเพิ่มโปรตีนเหล่านี้ ทำให้เพิ่มระดับของฮอร์โมนนั้น ๆ ในเลือด ได้แก่ thyroxine, estrogen, androgen, เหล็กและทองแดง

#### 5. ผลต่อการแข็งตัวของเลือด

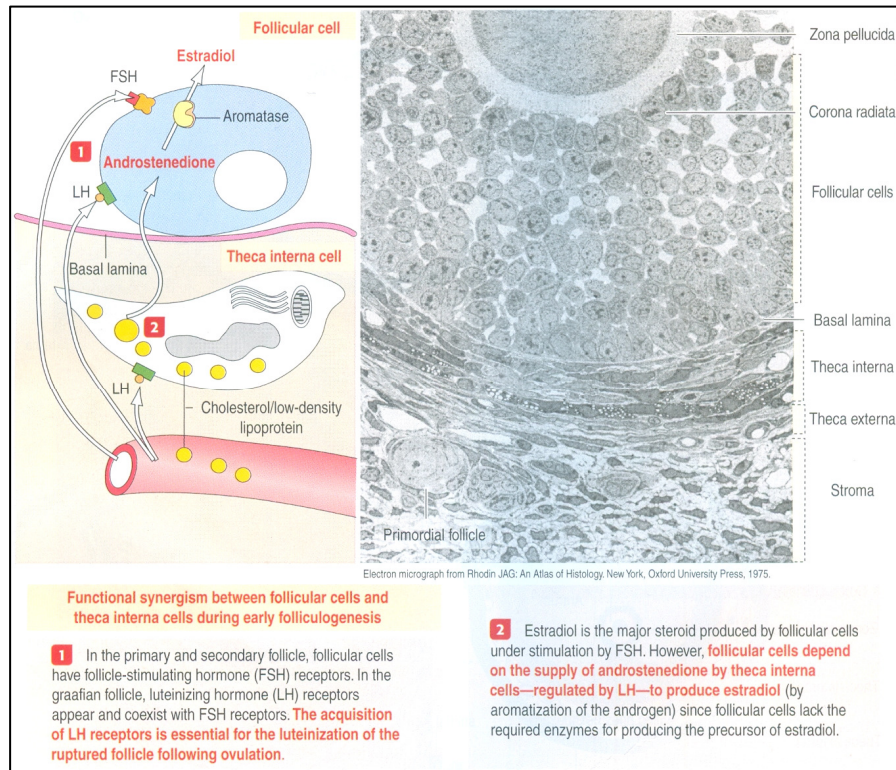
ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ก็มีรายงานผลต่อการแข็งตัวของเลือด เช่น เอสโตรเจนทำให้มีการเพิ่มของ coagulation factors VII, VIII, IX และ X แต่ทำให้มีการลดของ antithrombin III เป็นต้น

#### 6. ผลอื่น ๆ

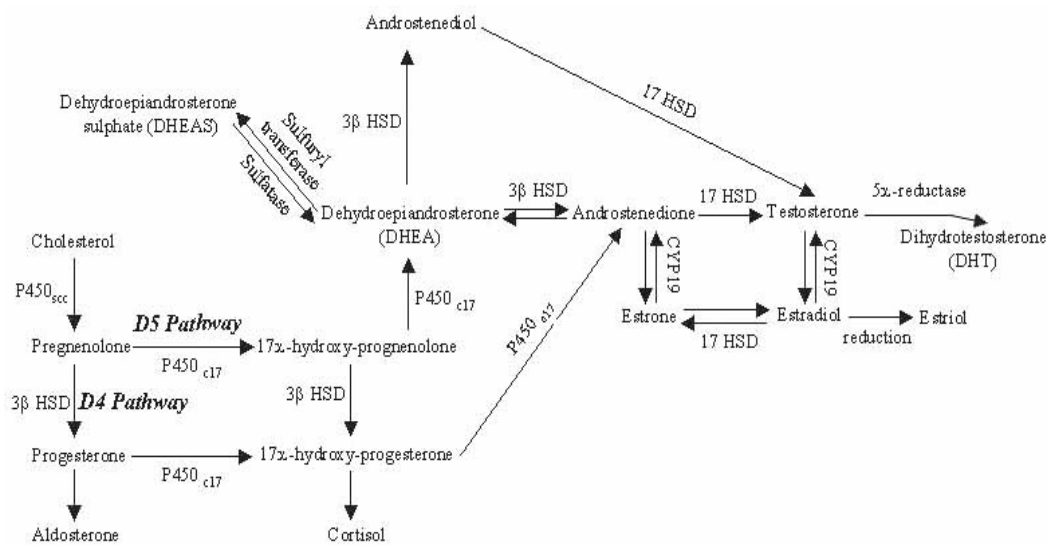
เอสโตรเจนและแอนโดรเจนทำให้เกิดการบวมขึ้นได้ ถ้าใช้เอสโตรเจนขนาดสูง ๆ จะมีการคั่งของน้ำและเกลือโซเดียมจนเกิดการบวมขึ้น ซึ่งพบว่าตอบสนองได้ดีกับยาขับปัสสาวะ นอกจากนี้เอสโตรเจนจะควบคุมระบบประสาทเกี่ยวกับการทำงานของกล้ามเนื้อเรียบ และยังช่วยทำให้ผิวหนังและหลอดเลือดของสตรีอยู่ในภาวะโครงสร้างปกติ

##### ค. ผลของเอสโตรเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของผิวหนัง

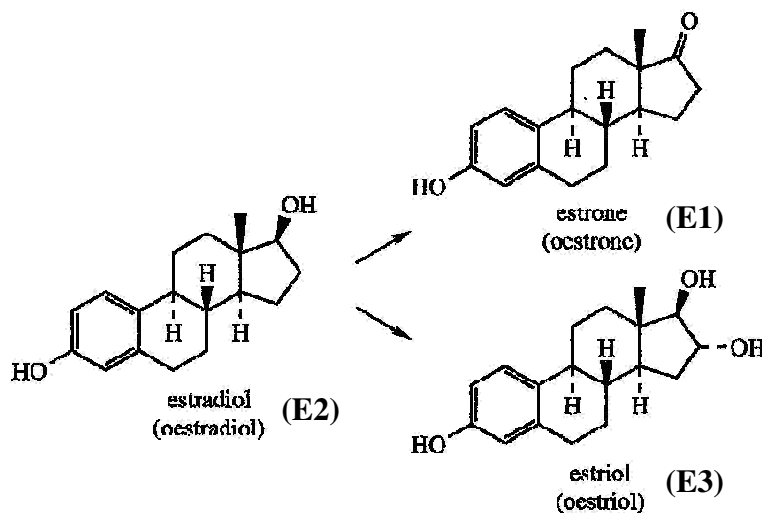
เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการป้องกันและประโยชน์ทางสรีรวิทยาของผิวหนัง (Thornton, 2002; Thornton, 2005) และยังช่วยเร่งการสมานแผล (Ashcroft and Ashworth, 2003) นอกจากนี้เอสโตรเจนยังมีบทบาทต่อความหนาของชั้นผิวหนังโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ และพบว่าความหนาของชั้นผิวหนังลดลงสัมพันธ์กับระดับของเอสโตรเจนที่ลดลงเช่นกัน และเมื่อได้รับเอสโตรเจนทดแทนยังช่วยคงรักษาความหนาของชั้นผิวหนังในหนู mice ที่ถูกตัดเอาอวัยวะและรังไข่ออกทั้งสองเพศ (Azzi *et al.*, 2005) จากการศึกษาพบว่า การได้รับฮอร์โมนทดแทนดังกล่าวยังช่วยเพิ่มความชุ่มชื้น ความยืดหยุ่น ความหนาของชั้นผิวหนัง (Sator *et al.*, 2001) และยังช่วยลดริ้วรอย (Phillips *et al.*, 2001) นอกจากนี้ยังรักษาองค์ประกอบและคุณภาพของ collagen รวมทั้งเพิ่ม vascularization อีกด้วย (Brincat *et al.*, 1987)



รูปที่ 1-10 แสดงการสังเคราะห์เอสโตรเจนบริเวณ follicular cell ของรังไข่  
ที่มา : Kierszenbaum, 2007



รูปที่ 1-11 แสดงชีวสังเคราะห์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน  
ที่มา : Meehan and Sadar, 2003

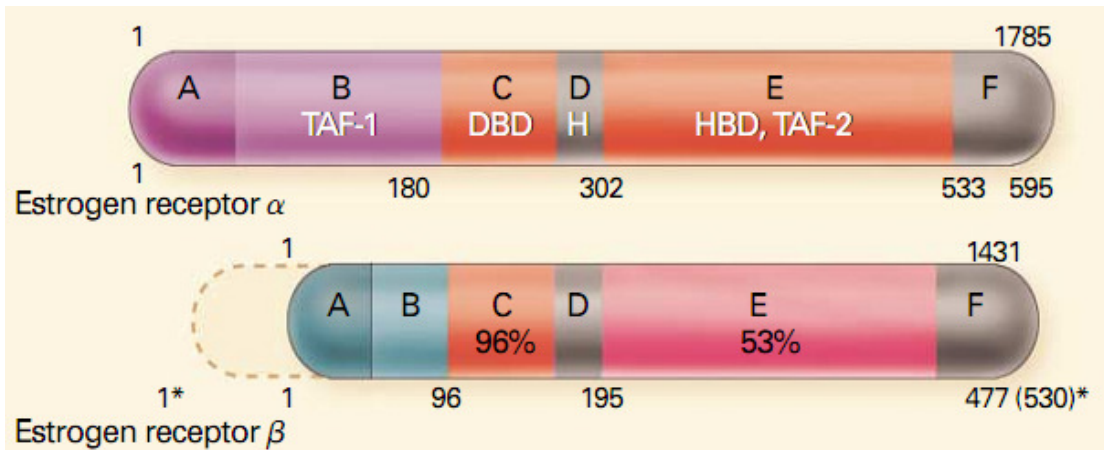


รูปที่ 1-12 แสดงโครงสร้างของเอสโตรเจนตามธรรมชาติ (natural estrogen) ในมนุษย์  
ที่มา : Dewick, 2001

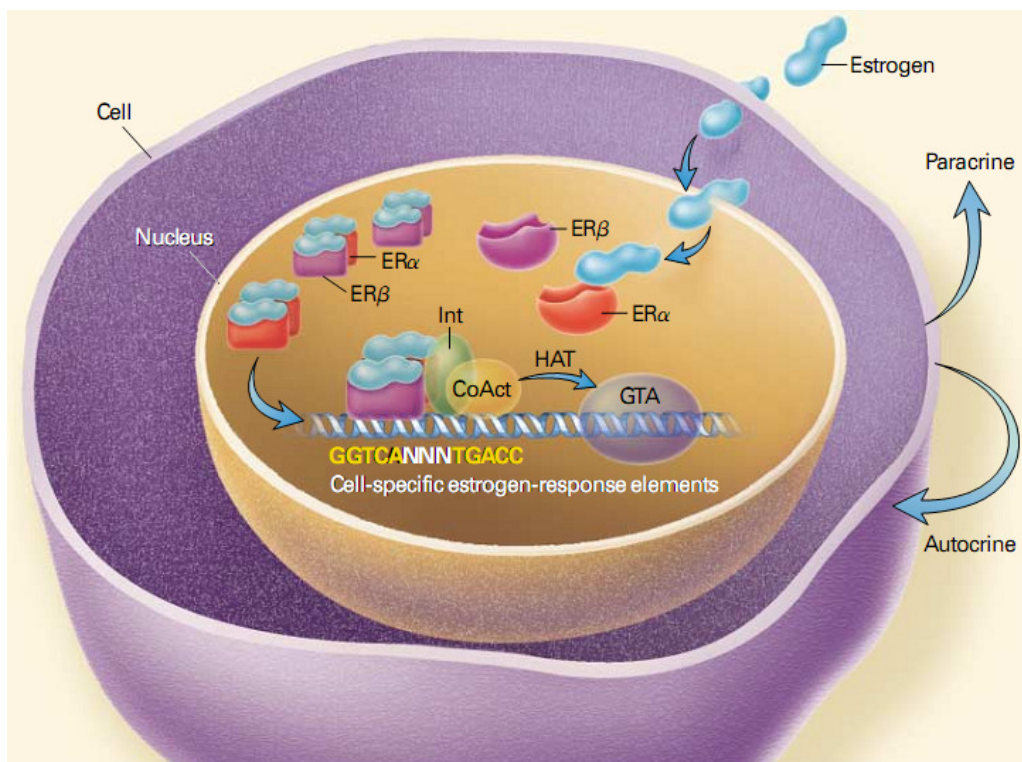
### 2.3.3 ตัวรับเอสโตรเจน (Estrogen receptors, ERs)

เป็นสารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนที่อยู่ทั้งในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ ขนาดโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน ถูกกระตุ้นการทำงานโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน มีหน้าที่หลักเป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) ERs สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท (รูปที่ 1-13) โดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและยีนที่ควบคุมการแสดงออกที่ต่างกัน คือ ตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา (estrogen receptor alpha : ER $\alpha$ ) มีครึ่งชีวิตสั้นเพียง 4-7 ชั่วโมง ถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่บนแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 6 และอีกชนิดคือ ตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้า (estrogen receptor beta : ER $\beta$ ) ค้นพบเมื่อปี ค.ศ. 1996 ถูกกำหนดโดยยีนที่อยู่บนแขนยาวของโครโมโซมคู่ที่ 14 ใกล้กับยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิด Alzheimer's disease ER $\alpha$  และ ER $\beta$  มีความเหมือนกัน 96% และ 53% ในส่วนของ DNA-binding domain (DBD) และ hormone binding domain (LBD) ตามลำดับ แต่ปลายด้าน NH<sub>2</sub> แทบจะไม่เหมือนกันเลย เอสโตรเจนอาจจับกับ ER $\alpha$  หรือ ER $\beta$  ก็ได้ หลังจากนั้น hormone receptor complex ทั้ง 2 ตัวจึงมาจับกันเป็น dimer ซึ่งถ้าเป็นการจับระหว่าง ER $\alpha$  กับ ER $\alpha$  หรือ ER $\beta$  กับ ER $\beta$  ก็เรียกว่า homodimer แต่ถ้าเป็นการจับระหว่าง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ก็เรียกว่าเป็น

heterodimer วิธีนี้จะทำให้เกิดความหลากหลายในการแสดงออกของเอสโตรเจน ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ โครงสร้างและ function domains ของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โดย estrogen receptors บริเวณส่วนปลายจาก A-B เป็น amino-terminal อันประกอบด้วย ligand-independent transcriptional activation function (TAF-1) บริเวณ C เป็นตำแหน่งของ DBD ซึ่งภายในประกอบด้วย 2 zinc fingers ซึ่งเป็น highly conserved ใน steroid hormone receptor บริเวณ domain D เป็น hinge region (H) ของ receptor นี้ และ domain E เป็น HBD และ hormone dependent transcriptional activation function (TAF2) domain F เป็นตำแหน่ง variable region ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 12 sequence ในสาย helix ซึ่งมีความสำคัญมากต่อการตอบสนองของ estrogen receptor ต่อ estradiol (รูปที่ 1-14)



รูปที่ 1-13 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โดย A/B domains = NH<sub>2</sub> terminal, C domain = DNA-binding domain (DBD) ขณะที่ D/E/F = ligand-binding domain (LBD). AF-1 และ AF-2 = activation units ของ DNA-binding and ligand-binding domains ตามลำดับ  
ที่มา : Mendelsohn and Karas, 1999



รูปที่ 1-14 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ERs  
ที่มา : Mendelsohn and Karas, 1999

## 2.4 แอนโดรเจน (Androgen)

แอนโดรเจนเป็นฮอร์โมนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากอวัยวะ รังไข่ และต่อมหมวกไต ส่วนนอก แอนโดรเจนที่สำคัญในผู้ชาย ได้แก่ เทสโทสเตอโรน (testosterone) ซึ่งถูกสังเคราะห์และหลังจาก Leydig cells ของอวัยวะ แอนโดรเจนตามธรรมชาติในร่างกายนอกจากจะออกฤทธิ์ตามคุณสมบัติของมันแล้วยังทำหน้าที่เป็นโปรฮอร์โมน (prohormone) สำหรับการสร้างฮอร์โมน 2 ชนิด คือ (กิจจา. 2533)

1. 5 แอลฟา-รีดิวซ์แอนโดรเจน (5-reduced androgen) เป็นสารตัวกลางภายในเซลล์ ได้แก่ ไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน (dihydrotestosterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ได้จากการรีดิวซ์ตรงคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 5 ของเทสโทสเตอโรน

2. เอสโตรเจน ในการสังเคราะห์เอสโตรเจน เช่น เอสตราไดออล ต้องอาศัยเทสโทสเตอโรนเป็นสารตั้งต้น เอสโตรเจนที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะมีฤทธิ์เสริมกับฤทธิ์ของแอนโดรเจนหรือฤทธิ์ต้าน

ผลจากการที่แอนโดรเจนสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นฮอร์โมนชนิดอื่นได้อีก ทำให้ฤทธิ์ของแอนโดรเจนในร่างกายเกิดขึ้นจากผลรวมของฤทธิ์จากทั้งฮอร์โมนที่ถูกหลั่งจากร่างกายตามปกติเช่น เทสโทสเตอโรนและอนุพันธ์ที่เป็นเอสโตรเจนของมัน เช่น เอสตราไดออล ฤทธิ์ของแอนโดรเจนและเมทาโบไลต์ของมันสามารถจำแนกออกตามแหล่งที่ออกฤทธิ์ได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ฤทธิ์แอนโดรเจนิก (androgenic actions) เป็นฤทธิ์ทั้งหมดของแอนโดรเจนที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชายและการเจริญของลักษณะทางเพศแบบทุติยภูมิของเพศชาย

2. ฤทธิ์แอนาโบลิก (anabolic actions) เป็นฤทธิ์ของแอนโดรเจนที่มีต่อเนื้อเยื่อโซมาติก (somatic tissues) ทั่ว ๆ ไป

### 2.4.1 ชีวสังเคราะห์และลักษณะทางเคมีของแอนโดรเจน

เทสโทสเตอโรนเป็นแอนโดรเจนที่สำคัญที่ถูกหลั่งจากอวัยวะและยังเป็นแอนโดรเจนหลักที่พบได้มากที่สุดในพลาสมาของผู้ชาย ส่วนในผู้หญิงเทสโทสเตอโรนจะถูกสังเคราะห์ได้ที่รังไข่และต่อมหมวกไตแต่จะมีปริมาณที่น้อยกว่าในผู้ชาย ในเนื้อเยื่อเป้าหมายของแอนโดรเจนบางตำแหน่งพบว่า เทสโทสเตอโรนจะถูกรีดิวซ์ที่ตำแหน่ง 5 แอลฟา กลายเป็นไดไฮโดรเทสโทสเตอโรน ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารตัวกลางภายในเซลล์ สำหรับการออกฤทธิ์ ส่วนใหญ่ของเทสโทสเตอโรน ทั้งเทสโทสเตอโรนและไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนต่างก็สามารถจับกับโปรตีนที่เป็นตัวรับของแอนโดรเจนในไซโทพลาสซึม แต่ไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนจะสามารถ

จับได้แน่นอนกว่าเทสโทสเตอโรนประมาณ 10 เท่า และสารประกอบเชิงซ้อนของไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนกับตัวรับจะกระตุ้นการทำงานของ DNA ได้ดีกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของเทสโทสเตอโรนกับตัวรับ นอกเหนือจากแอนโดรเจนทั้ง 2 ชนิดนี้แล้ว ตามธรรมชาติในร่างกายยังมีแอนโดรเจนที่ออกฤทธิ์อย่างอ่อน ๆ อีก ได้แก่ แอนโดรสทีนไดโอน (androstenedione) เป็นสารตั้งต้นของเทสโทสเตอโรนและดีไฮโดรเอพิแอนโดรสเทอโรน (dehydroepiandrosterone) เป็นแอนโดรเจนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมหมวกไต

ผู้ชายสามารถผลิตฮอร์โมน testosterone ออกมาประมาณ 4-9 มก./วัน การผลิตมีลักษณะไม่สม่ำเสมอมากบ้างน้อยบ้างเป็นลูกคลื่นต่อเนื่องกันไป นอกจากนี้อัตราการผลิตยังไม่เท่ากันทั้งวัน โดยผลิตออกมาสูงสุดในตอนเช้าประมาณ 8.00 น. และต่ำสุดช่วงกลางคืนประมาณ 22.00 น. ดังนั้นการเจาะเลือดวัดระดับเทสโทสเตอโรนจึงควรคำนึงถึงปัจจัยเหล่านี้ด้วย ระดับฮอร์โมนนี้ในพลาสมา (ส่วนของเลือดที่แยกเอาเม็ดเลือดออกไป) มีค่าประมาณ 0.3-1.0 ไมโครกรัม/100 มิลลิลิตร ระดับนี้จะค่อย ๆ ลดลงในผู้สูงอายุจนเมื่ออายุ 80 ปีก็จะเหลือประมาณครึ่งหนึ่งของวัยหนุ่ม

#### 2.4.2 ฤทธิ์ทางสรีระวิทยาและเภสัชวิทยา

เทสโทสเตอโรนที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่จะถูกหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดไปออกฤทธิ์ตามที่ต่าง ๆ ส่วนน้อยจะหลั่งออกมาอยู่รอบ ๆ กลุ่มเซลล์ที่สร้างอสุจิในอัณฑะเพื่อช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างอสุจิ เทสโทสเตอโรนมีวิธีการออกฤทธิ์ในร่างกายหลายอย่างที่สำคัญคือ

1. จับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์และออกฤทธิ์ต่อเซลล์นั้นโดยตรง
2. ถูกเปลี่ยนเป็น dihydrotestosterone (DHT) ก่อนแล้วจึงไปจับกับ receptor บนเซลล์แล้วออกฤทธิ์
3. ส่วนหนึ่งประมาณเล็กน้อยประมาณ 0.2% จะถูกเปลี่ยนเป็นเอสโตรเจนซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศหญิงแล้วออกฤทธิ์การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นที่หลายแห่งในร่างกาย ที่สำคัญคือตับ เนื้อเยื่อไขมัน เต้านมและผิวหนัง ยิ่งอายุมากขึ้นหรือยังมีเนื้อเยื่อไขมันมาก การเปลี่ยนมาเป็นเอสโตรเจนนี้ก็ยิ่งมาก

ฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรนมีหลายอย่างดังนี้

1. Anabolic effects คือฤทธิ์ที่ทำให้ร่างกายเติบโตแข็งแรงขึ้นโดยมีการสังสมไนโตรเจนและแร่ธาตุอื่น ๆ เกิดการสร้างและสะสมโปรตีนมากขึ้นรวมทั้งทำลายโปรตีนน้อยลง ทำให้กล้ามเนื้อ เอ็น และกระดูกแข็งแรงขึ้น ความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงมากขึ้น ผู้ชายจึงมีร่างกายที่แข็งแรงและความเข้มข้นของเลือดมากกว่าผู้หญิง
2. Androgenic effects คือฤทธิ์ที่ทำให้ร่างกายแสดงลักษณะเพศชายเช่นเสียงห้าว มีหนวดเครา ขนขึ้นตามตัว การทำงานของต่อมไขมันตามผิวหนังเพิ่มขึ้นทำให้

ผิวหนังมันและเป็นสีม่วงาย ศีรษะล้านแบบผู้ชาย และกระตุ้นให้มีอารมณ์และพฤติกรรมต่าง ๆ แบบบุรุษเพศ

3. Spermatogenic effects คือฤทธิ์ในการสร้างอสุจิ การสร้างอสุจิต้องอาศัยความเข้มข้นของฮอร์โมนเพศชายในระดับสูงรอบ ๆ เซลล์ที่สร้างอสุจิในอัณฑะ ในภาวะปกติความเข้มข้นของฮอร์โมนเพศชายในระดับสูงนี้เกิดขึ้นได้เพราะเซลล์ที่หลังฮอร์โมนเพศชายอยู่ติดกับเซลล์ที่ผลิตอสุจิ จึงหลังฮอร์โมนออกมาสัมผัสเซลล์ที่ผลิตอสุจิได้มากโดยตรง แต่ในผู้ใช้สเตียรอยด์ทั้งชนิดกินหรือฉีด แม้ระดับฮอร์โมนเพศชายในเลือดสูงมากแต่ความเข้มข้นของฮอร์โมนเพศชายรอบเซลล์ที่สร้างอสุจิลดลงทำให้การผลิตอสุจิลดลง ทั้งนี้เพราะเนื้อเยื่อในอัณฑะมีกำแพงขวางกั้นไม่ให้สารบางชนิดซึ่งรวมทั้งสเตียรอยด์ซึมเข้ามาจากกระแสเลือดได้

4. Estrogenic effects คือฤทธิ์ที่ทำให้แสดงลักษณะเพศหญิง ฤทธิ์นี้ไม่ใช่ฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรนโดยตรง แต่เกิดจากเทสโทสเตอโรนถูกเปลี่ยนเป็นเอสโตรเจนที่อวัยวะบางแห่งนอกอัณฑะดังกล่าวข้างต้นแล้ว จากนั้นเอสโตรเจนออกฤทธิ์ฮอร์โมนเพศหญิงอีกต่อหนึ่ง ทำให้เนื้อเยื่อเต้านมขยายตัวขึ้นและมีไขมันมาสะสมบริเวณเต้านมมากขึ้น ทำให้เส้นเลือดแดงฝอยที่ผิวหนังขยายตัว ลดระดับโคเลสเตอรอลในเลือดและลดการอุดตันในผนังเส้นเลือด ในผู้ชายปกติระดับของเอสโตรเจนต่ำจึงไม่มีลักษณะเพศหญิงปรากฏ แต่ในผู้หญิงที่กินหรือฉีดสเตียรอยด์ สเตียรอยด์เหล่านั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นเอสโตรเจนด้วย ยิ่งใช้ในขนาดที่สูงมากเท่าไรก็ยิ่งทำให้ระดับของเอสโตรเจนสูงขึ้นมากเท่านั้น จึงอาจแสดงลักษณะเพศหญิงเช่น หัวนมสาว (gynecomastia) ให้เห็นได้

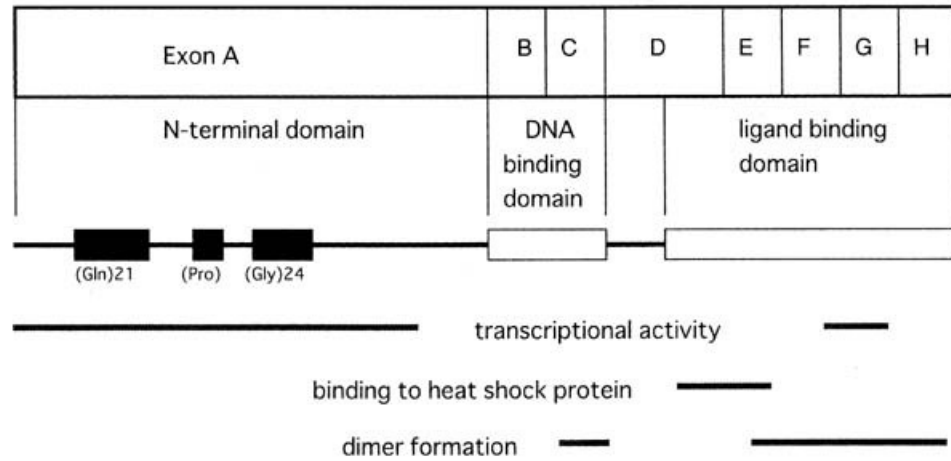
5. Feed-back effects คือฤทธิ์ที่เทสโทสเตอโรนกลับไปออกฤทธิ์ยับยั้งต่อมใต้สมองไม่ให้หลั่ง LH มากกระตุ้นอัณฑะให้สร้างเทสโทสเตอโรนมากเกินไป และออกฤทธิ์ยับยั้งไฮโปธาลามัสไม่ให้หลั่งฮอร์โมนมากกระตุ้นต่อมใต้สมองมากเกินไป ผลรวมทั้งหมดในคนปกติเกิดเป็นวงจรระบบฮอร์โมนเพศชายที่สมบูรณ์ ทำให้การสร้างและหลังเทสโทสเตอโรนอยู่ในภาวะสมดุลสำหรับผู้ชายปกติ แต่ในผู้ชายที่ใช้สเตียรอยด์ในขนาดสูง การกดไฮโปธาลามัสและต่อมใต้สมองจะมีมากและนาน ทำให้ไม่มีฮอร์โมนมากกระตุ้นอัณฑะ อัณฑะจึงฝ่อเล็กลง การผลิตอสุจิลดลงและรูปร่างอสุจิผิดปกติไป การกดวงจรนี้จะคงอยู่นาน บางคนเมื่อหยุดใช้สเตียรอยด์แล้วอาจต้องใช้เวลาหลายเดือนกว่าวงจรระบบฮอร์โมนเพศชายนี้จะกลับมาทำงานได้ตามปกติ

6. ฤทธิ์อื่น ๆ ของเทสโทสเตอโรน คือทำให้มีการคั่งของเกลือแร่และน้ำในร่างกาย และไขมันดีในเลือด (HDL-C) ลดลง ผู้ที่ใช้สเตียรอยด์ในขนาดสูงจะมีปัญหาดังกล่าวมากขึ้น โดยอาจเกิดภาวะบวม น้ำ ความดันโลหิตขึ้นสูง ไขมันดีลดลง และไขมันไม่ดี (LDL-C) เพิ่มขึ้นได้



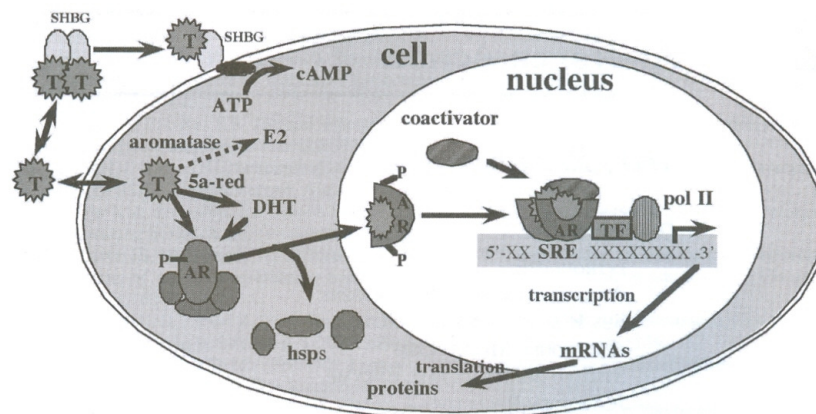
### 2.4.3 ตัวรับแอนโดรเจน (Androgen receptors, ARs)

Androgen receptors จัดเป็นกลุ่มของ nuclear receptor superfamily ซึ่งเป็น ligand activated transcription factors (รูปที่ 1-15) โดย receptors จะอยู่ในนิวเคลียสหรือไซโตพลาสซึม (Hipakka *et al.*, 1998; Evan, 1998) ซึ่งจะมีผลทำให้กัมมันตภาพ RNA-polymerase เพิ่มขึ้นและมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น ฤทธิ์ของ testosterone ที่เกิดจากการจับกับ intracellular receptors หรือที่เรียกว่า classical genomic effects นั้นจะใช้เวลานานประมาณ 1-2 ชั่วโมง และถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งของ androgen receptors, gene transcription และ translation ในทางตรงกันข้าม ฤทธิ์ของ testosterone ที่เกิดขึ้นอย่างเฉียบพลัน (acute effects) โดยใช้เวลาเพียงไม่กี่วินาทีหรือนาที และไม่ถูกยับยั้งโดยตัวยับยั้งดังกล่าว เรียกว่า non genomic effects ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับ classical androgen receptors แต่เกิดจาก testosterone มีผลต่อ membrane proteins เช่น ion channels (O'malley *et al.*, 1992; Falkenstein *et al.*, 2000) (รูปที่ 1-16)



รูปที่ 1-15 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ Androgen receptors (ARs) โดย Exon A = NH<sub>2</sub> terminal domain, B-C = DNA-binding domain (DBD) ขณะที่ D-H = ligand-binding domain (LBD).

ที่มา : Suzuki and Ito, 1999



รูปที่ 1-16 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ARs โดย SHBG = sex hormone binding globulin, T = testosterone, DHT = dihydrotestosterone, hsps = heat shock proteins, AR = androgen receptor, pol II = RNA polymerase II

ที่มา : Bagatell and Bremner, 200

## 2.5 ไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen)

Phytoestrogen เป็นสารอินทรีย์ซึ่งสร้างขึ้นโดยพืช เป็นกลุ่ม nonsteroidal plant compounds โดยถูกพบครั้งแรกว่ามี estrogenic activity ในปี 1926 (Murkies *et al.*, 1998) เนื่องจากมี phenolic ring ทำให้สามารถจับกับ estrogen receptors ได้ (Shutt & Cox, 1972) สารเหล่านี้พบได้ทั้งในส่วนเมล็ด ลำต้น รากหรือดอก โดยในพืช สารนี้จะทำหน้าที่เป็นสารฆ่าเชื้อรา (fungicide) หรือเป็น phytoalexin หมายความว่า เป็นสารเคมีที่พืชสร้างขึ้นมาเพื่อป้องกันตนเองเมื่อถูกรุกรานโดยจุลินทรีย์ ในช่วงแรกๆ ความสนใจในเรื่องของ phytoestrogen มักจะมุ่งประเด็นไปที่ปัญหาในแง่ปศุสัตว์ เมื่อพบว่ามีสัตว์ที่ไปกินพืชซึ่งมีสารเหล่านี้อยู่แล้วเกิดเป็นหมันขึ้นมา แต่มาในระยะหลังมีงานวิจัยมากมายที่แสดงให้เห็นว่าสารกลุ่มนี้อาจจะมีความสำคัญต่อสุขภาพของคนเราอย่างมากก็ได้เนื่องจากเราพบ phytoestrogen ในธรรมชาติเป็นส่วนประกอบอยู่ในอาหารที่มนุษย์เรารับประทานเข้าไป ตามปกติในแต่ละวันอยู่แล้วและสารเหล่านี้อาจเข้าไปมีผลป้องกันหรือปรับเปลี่ยนภาวะความผิดปกติของร่างกายหรือการเกิดโรคต่างๆ เช่น มะเร็ง โรคหัวใจ รวมทั้งปัญหาที่เกี่ยวข้องกับภาวะการหมัดประจำเดือนได้อีกด้วย

### 2.5.1 แหล่งของไฟโตเอสโตรเจนในอาหาร

ไฟโตเอสโตรเจน มี 3 ชนิดหลัก คือ ไอโซฟลาโวน (isoflavones), ลิกแนน (lignans), และ คิวเมสแทน (coumestans)(Murkies *et al.*, 1998) (รูปที่ 1-17)

**ไอโซฟลาโวน** เช่น daidzein, genistein และ biochanin A (Yildiz, 2006) พบมากในไม้จำพวกที่มีฝัก ถั่ว (ถั่ว ชนิดเมล็ดแบน เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเล็กรูปกลมคล้ายไต ถั่วแขกชนิดเมล็ดแดง และเหลือง) และในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง (รวมทั้งนม เต้าหู้)

**ลิกแนน** เช่น lariciresinol และ secoisolariciresinol (Yildiz, 2006) พบในผลไม้ ฝัก ถั่ว และ เมล็ดข้าว แต่พบมากที่สุด ใน oilseeds โดยเฉพาะอย่างยิ่ง linseed (เมล็ดต้น Flaxseed)

**คิวเมสแทน** เช่น coumestrol และ 4-metaxycoumestrol (Yildiz, 2006) พบได้ในอาหารจำพวกเดียวกับลิกแนน แต่พบมากที่สุด ในเมล็ดอ่อน (sprouting seeds)

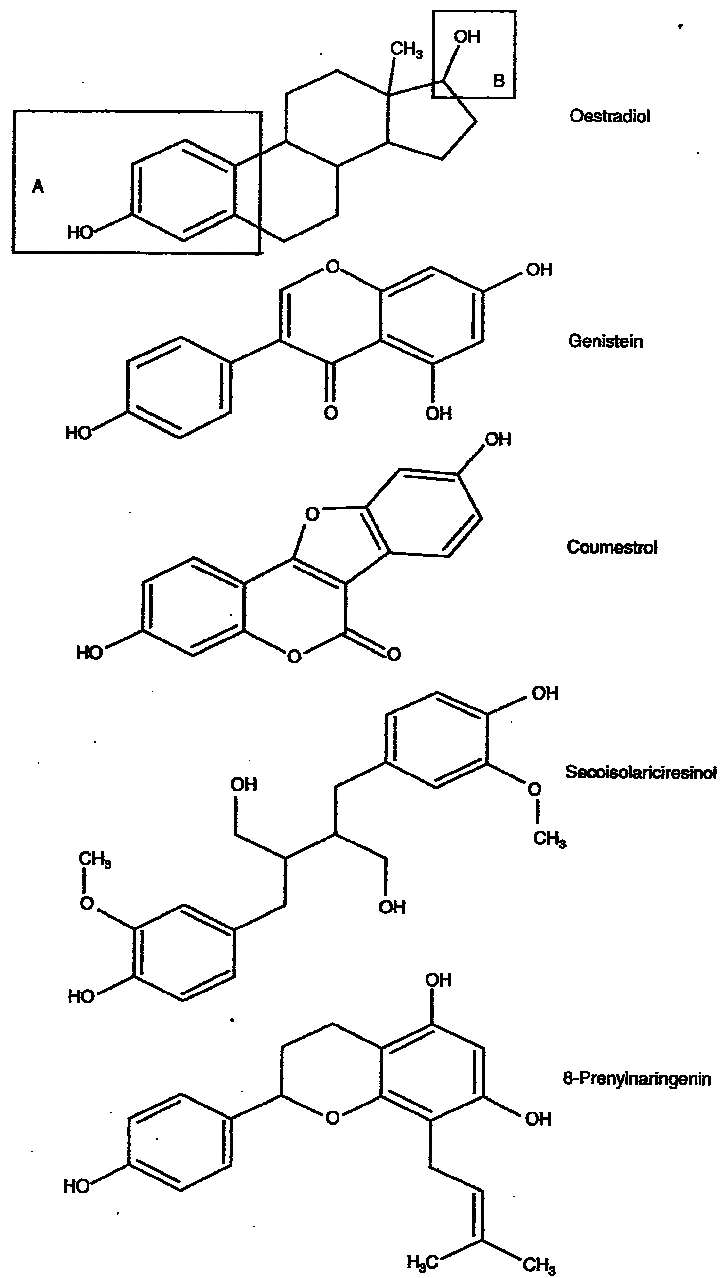
### 2.5.2 การออกฤทธิ์ของไฟโตเอสโตรเจน

ไฟโตเอสโตรเจนออกฤทธิ์ได้ทั้งเสริมและต้านเอสโตรเจน โดยขึ้นอยู่กับระดับของ endogenous estrogens ในเลือด ชนิดและจำนวนของ estrogen receptors ของแต่ละบุคคล (Cassidy *et al.*, 1993; Cassidy *et al.*, 1994) ในกรณีที่มีเอสโตรเจนในร่างกายมากเกินไป ไฟโตเอสโตรเจนจะไปจับกับตัวรับของเซลล์ (receptor) ของเอสโตรเจนเกิดการยับยั้งการทำงานและต้านการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน (anti-oestrogenic effect) ในขณะที่เมื่อร่างกายเกิดการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น ในหญิงวัยหมดประจำเดือน ไฟโตเอสโตรเจน

จะไปจับกับตัวรับของเซลล์เอสโตรเจน และออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน (Trickey, 1998) สารในกลุ่ม phytoestrogen นี้จะมีสูตรโครงสร้างบางส่วนคล้ายคลึงกับ estradiol (Dixon, 2003) ซึ่งเป็นเอสโตรเจนที่พบในธรรมชาติจึงอาจมีฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนอย่างอ่อน หรืออาจออกฤทธิ์ต่อต้านฤทธิ์ของ estrogen คล้าย raloxifene และ tomoxifen ได้ สาร phytoestrogen นี้สามารถจับกับ estrogen receptor (ER) ได้ทั้งชนิด ER $\alpha$  และ ER $\beta$  แต่จะมี potency ต่ำกว่า estradiol ขึ้นอยู่กับชนิดของ receptor ชนิดของ phytoestrogens และเนื้อเยื่อนั้น ๆ เช่น isoflavones จะมีความสามารถจับกับ ER $\alpha$  ซึ่งพบมากในเซลล์เต้านมและกระดูกได้ดีกว่า estradiol ประมาณ 1/50,000 ถึง 1/100,000 แต่จะมีความสามารถในการจับกับ ER $\beta$  ซึ่งพบมากที่ไขมัน กระดูก และสมอง ได้ใกล้เคียงกับ estradiol (David, 2004) โดย Geniestein จะมีความสามารถจับกับ receptor ได้ดีกว่า Daidzein เป็นต้น นอกจากนี้ phytoestrogen ยังออกฤทธิ์ยับยั้ง เอสโตรเจนโดยผ่านการกระตุ้นการสร้าง sex hormone-binding globulin (SHBG) ที่ตับ ระดับ SHBG ที่สูงขึ้นจะจับกับ estradiol ทำให้จำนวน estradiol ในรูปอิสระที่จะสามารถจับกับ estrogen receptor ได้น้อยลง (Messina *et al.*, 1994) และ phytoestrogens ยังแย่งจับกับ estrogen receptor กับเอสโตรเจนในร่างกายอีกด้วย (Molteni *et al.*, 1995) ซึ่งจากกลไกทั้งหมดนี้ทำให้ฤทธิ์เป็นเอสโตรเจนอย่างอ่อน (น้อยกว่า 0.1% ของ estradiol) และต่อต้านฤทธิ์เอสโตรเจนดังกล่าว ในปัจจุบันจึงมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำสารนี้มาใช้ประโยชน์ในด้านการป้องกันโรคต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น มะเร็งบางชนิด ความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการหมดประจำเดือน ระบบหัวใจ หลอดเลือดและกระดูก เป็นต้น

### 2.5.3 การนำมาใช้ทางคลินิก

มีการศึกษาทางระบาดวิทยาของผล phytoestrogen อย่างกว้างขวางในการรักษา ป้องกันและลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคต่าง ๆ เช่น มะเร็งเต้านม (Dai *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2000; Shu *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 1995) มะเร็งปากมดลูก (Horn-Ross *et al.*, 2003; Goodman *et al.*, 1997) อาการ menopausal syndromes (Washburn *et al.*, 1999; Albertazzi *et al.*, 1998; Upmalis *et al.*, 2000) โรคระบบหัวใจและหลอดเลือดเช่น coronary heart disease เป็นต้น (Anderson *et al.*, 1995; Duane *et al.*, 1999) กระดูกพรุน (osteoporosis) (Tsutsumi, 1995; Sugimoto *et al.*, 2000; Setchell *et al.*, 2003; Lydeking-Olsen *et al.*, 2002) มะเร็งต่อมลูกหมาก (Brawley *et al.*, 1998; Greenwald *et al.*, 2004) การเจริญเติบโตในเด็ก (Zung *et al.*, 2001; Steichen *et al.*, 1987; Venketaraman *et al.*, 1992; Greim, 2004) และการสมานแผล (Radenahmad *et al.*, 2006; Sayoh *et al.*, 2008) เป็นต้น



รูปที่ 1-17 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ estrogen และ phytoestrogen ดังนี้ Oestrogen (E2), Genistein (Isoflavone), Coumestrol (Coumestan), Saccosolaricresinol (Lignan) และ 8-Prenylnaringenin (Prenyl flavonoid)  
ที่มา : Yildiz, 2006

## 2.6 มะพร้าว (Coconut)

มะพร้าวหรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในอันดับ (Order) Palmales วงศ์ (Family) Palmae หรือ Arecaceae (palm) เผ่า (Tribe) Cocoideae สกุล (Genus) *Cocos* คำระบุชนิด (specific epithet) *nucifera* ลักษณะโดยทั่วไปมีลำต้นตรง รูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-30 เซนติเมตร สูงประมาณ 20-25 เมตรแล้วแต่สายพันธุ์ ระบบรากเหมือนกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ไม่มีรากแก้ว แต่มีระบบรากฝอย (fibrous root system) กระจายรอบๆ ลำต้นประมาณ 2000-3000 เส้น ยาวประมาณ 6-10 เมตร ทำหน้าที่ดูดและลำเลียงน้ำ ธาตุอาหาร และยึดลำต้นไม่ให้ล้ม มีใบประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ก้านทาง (rachis หรือ leaf stalk หรือ petiole) ยาวประมาณ 4-7 เมตร และใบย่อยซึ่งอยู่ 2 ข้างของก้านทางเรียงเป็นแผงจำนวน 200-250 ใบย่อย ใบย่อยยาว 50-100 เซนติเมตรขึ้นไป กว้าง 2.5 เซนติเมตร (รูปที่ 1-18)(สุพจน์. 2543)



รูปที่ 1-18 แสดงต้นและผลมะพร้าวน้ำหอม

## 2.7 น้ำมะพร้าวอ่อน (Young coconut juice)

มีการนำส่วนต่างๆ ของมะพร้าวมาใช้ประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะน้ำมะพร้าวอ่อนมักนิยมทำเป็นเครื่องดื่ม ทั้งนี้เพราะน้ำมะพร้าวอ่อนมีคุณค่าทางสารอาหารสูงมีทั้งวิตามิน ได้แก่ วิตามิน บี3 (niacin), วิตามิน บี7 (biotin), วิตามิน บี2 (riboflavin), กรดโฟลิก (folic acid), วิตามิน บี1 (thiamin), วิตามิน บี6 (pyridoxine) และเกลือแร่ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ทองแดง ฟอสฟอรัส จนเป็นที่รู้จักกันดีในนามน้ำเกลือแร่จากธรรมชาติ ซึ่งปัจจุบันทางองค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ (FAO) ได้ส่งเสริมให้มีการพัฒนาน้ำมะพร้าวอ่อนเป็นเครื่องดื่มสำหรับนักกีฬา (sport drinks) เนื่องจากมีปริมาณเกลือแร่สูงและยังพบ Ascorbic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

ในทางการแพทย์โดยเฉพาะการแพทย์แผนไทยจะใช้น้ำมะพร้าวอ่อนในการรักษาผู้ป่วยที่อาเจียนท้องร่วง ผู้ป่วยอหิวาตกโรค ผู้ป่วยที่มีภาวะความเป็นกรดในเลือดสูง ผู้ป่วยโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ และช่วยขับปัสสาวะในผู้ป่วยโรคหัวใจ รวมทั้งรักษาผู้ป่วยโรคตับและโรคไตด้วย สำหรับสตรีหลังคลอดบุตรนั้นมีรายงานการใช้น้ำมะพร้าวอ่อนเพื่อเสริมให้น้ำนมเพราะมีความบริสุทธิ์สูง ไม่มีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเจือปนอยู่

จากการค้นจากฐานข้อมูล Napalert พบสารที่เป็นองค์ประกอบใน coconut milk ที่มีผู้ศึกษาแล้วได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid ชื่อ 2-(3-methyl-but-2-enyl-purin-6-one และ Zeatin riboside (Trans:14-O-[3-O-[3-O-[β-D-Galactopyranosyl(1-2)-α-D-Galactopyranosyl(1-3)-α-L-arabinofuranosyl]-4-O-(α-L-arabinoguranosyl)-β-D-Galactopyranosyl] (Kobayashi *et al.*, 1997) พบสารในกลุ่ม phytosterol ชื่อ β-sitosterol, stigmasterol, stigmastatrienol, fucosterol และ α-spinasterol (โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร 2524) นอกจากนี้ยังพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าวอ่อนประกอบด้วยสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน วิตามิน และเกลือแร่ (Santoso *et al.*, 1996) แต่ทั้งนี้องค์ประกอบทางเคมีดังกล่าวมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ สิ่งแวดล้อม อายุ และขนาด เป็นต้น

จากการศึกษาด้วยวิธี thin-layer chromatography พบว่าน้ำมะพร้าวอ่อนมีสาร estrone, 17β-estradiol และ β-sitosterol และจากงานวิจัยของบุษกร (Punghmatharith, 1988) ด้วยวิธี radioimmunoassay พบว่าสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนมีสารซึ่งมีคุณสมบัติทาง immunology สามารถจับกับแอนติบอดี estrone-3-glucuronide (280 pg/mL) รองลงมาเป็นสารซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดี pregnanediol-3α-glucuronide (263 pg/mL) progesterone (27 pg/mL) 17β-estradiol (2.45 pg/mL) testosterone (1.58 pg/mL) และ estrone (0.75 pg/mL) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนในปริมาณที่เทียบเท่ากับ

น้ำมะพร้าวอ่อน 7,500 mL/kgBW/day ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ทำให้น้ำหนักมดลูกของหนูขาว (rats) อายุ 23 วัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากงานวิจัยของนิซาอูต๊ะห์ ที่มีการผ่าตัดบริเวณสี่ข้างทั้งสองข้างของหนูขาวเพื่อตัดรังไข่ออกพบว่ากลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับน้ำมะพร้าวอ่อนทุกวันในปริมาณ 100 mL/kgBW มีการสมานแผลเร็วกว่ากลุ่มอื่นๆ รวมทั้งกลุ่มที่หนูถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับฮอร์โมน E2 ทุกวัน นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมะพร้าวอ่อนมีผิวหนังหนวลกว่า ขนนุ่มกว่าและไม่มีแผลเป็น (scar) (Radenahmad *et al.*, 2006; Sayoh *et al.*, 2008) จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนมีฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen like hormone) โดยฮอร์โมนดังกล่าวพบในพืชจึงเรียกว่า ไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens)



### 3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศผู้ในระดับจุลพยาธิวิทยา (histopathology)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors, ERs) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry)
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของขนาดและจำนวนของรากขน (hair follicles)
4. เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาและการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ที่เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของตับ ไตและระดับไขมันในเลือด
5. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาน้ำมะพร้าวอ่อนให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (nutraceutical or functional food) เครื่องสำอางหรือยาต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### 1. สารเคมี

##### 1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

- 1.1.1 young coconut juice (YCJ)
- 1.1.2 distilled water
- 1.1.3 normal saline
- 1.1.4 pentobarbital sodium salt (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)
- 1.1.5  $\beta$ -estradiol 3-benzoate (E8515, EB, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)
- 1.1.6 10% และ 20% buffered formalin
- 1.1.7 olive oil
- 1.1.8 deionized water (DI)
- 1.1.9 0.1 M PBS pH 7.2

##### 1.2 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการย้อมสีเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope (LM))

- 1.2.1 50%, 70%, 80%, 95% และ 100% alcohol
- 1.2.2 xylene
- 1.2.3 melt paraplant
- 1.2.4 gelatin
- 1.2.5 Mayer's hematoxylin
- 1.2.6 working eosin
- 1.2.7 0.4% aniline blue
- 1.2.8 0.6% phosphotungstic acid
- 1.2.9 1% glacial acetic acid
- 1.2.10 1% acid fuchsin
- 1.2.11 1% ponceau xyloidine red
- 1.2.12 2% orange G
- 1.2.13 2.5% phosphotungstic acid

- 1.2.14 5% potassium dichromate
- 1.2.15 0.1 M TBS pH 7.2
- 1.2.16 hydrogen peroxide
- 1.2.17 methanol
- 1.2.18 Triton-X100
- 1.2.19 Mouse anti-estrogen receptor alpha (alpha, amino acid 120-170) monoclonal antibody (MAB447, Chemicon international, Temecula, CA)
- 1.2.20 Rabbit anti-estrogen receptor beta (MYEB) polyclonal antibody (AB1410, Chemicon international, Temecula, CA)
- 1.2.21 Vectastain ABC kit (PK6100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- 1.2.22 DAB substrate kit (SK4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- 1.2.23 permount
- 1.2.24 deionized water (DI)
- 1.2.25 Testosterone (ECLIA, Modular E170C, testosterone 11776061 122, Roche, Germany)
- 1.2.26 E2 (ECLIA, Modular E170C, Estradiol II 03000079 122, Roche, Germany)

## 2. วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

### 2.1 วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

- 2.1.1 อุปกรณ์ผ่าตัด (operating set)
- 2.1.2 ท่อป้อนอาหารสัตว์ทดลอง (feeding tube)
- 2.1.3 แผ่นรองพลาสติกสำหรับทำแผลมาตรฐาน
- 2.1.4 กิโยติน (kiyotin)
- 2.1.5 ขวดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ (sample container)
- 2.1.6 หลอดทดลอง (test tube)
- 2.1.7 เครื่องชั่ง (digital balance)
- 2.1.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- 2.1.9 เครื่องทำสารให้แห้ง (freeze dryer)
- 2.1.10 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- 2.1.11 เข็ม และ ไหมเย็บแผลชนิดละลายได้เอง (catgut)
- 2.1.12 สำลี ผ้าก๊อช มีดผ่าตัด (cotton, gauze, blade)
- 2.1.13 กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา (syringe and needle)

### 2.2 วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อและการย้อมสีเพื่อศึกษาด้วย LM

- 2.2.1 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
- 2.2.2 เครื่องฝังเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (embedding center)
- 2.2.3 ไมโครโทม (microtome)
- 2.2.4 อ่างน้ำ (water bath)
- 2.2.5 เตาอุ่นสไลด์ (slide warmer)
- 2.2.6 พู่กัน (brush)
- 2.2.7 ตู้เย็น (refrigerator)
- 2.2.8 ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (blade)
- 2.2.9 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope (LM))
- 2.2.10 สไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์ (slide and cover slip)

### 3. วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

##### 3.1.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูขาว (Wistar rats) เพศผู้อายุ 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ผ่านการรับรองการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการควบคุมจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ (ดูรายละเอียดภาคผนวกหน้า 149)

##### 3.1.2 การทำให้สลบ

ก่อนทำหัตถการใด ๆ จะสลบสัตว์ทดลองด้วย Pentobarbital sodium salt ขนาดความเข้มข้น 35 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection: i.p.) รอจนสัตว์ทดลองสลบดี จึงดำเนินการขั้นตอนต่อไป

##### 3.1.3 การผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเอาอัณฑะออก (orchidectomy: orx) หรือไม่เอาอัณฑะออก (sham-operation: sham)

หลังจากการทำให้สลบแล้ว ที่ตำแหน่งรอยต่อของถุงอัณฑะคือตำแหน่งที่จะเปิดแผลขนาดความยาว 1-2 เซนติเมตรและมีความลึกผ่านชั้นผิวหนัง ชั้นใต้ผิวหนัง เพื่อเข้าสู่อัณฑะ และเอาอัณฑะออก (orx) หรือไม่เอาออก (sham) ต่อไป หลังจากนั้นจึงเย็บปิดแผลด้วยไหมเย็บแผลชนิดละลายได้เอง ทุกขั้นตอนที่ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองจะใช้เทคนิคปลอดเชื้อทั้งหมด

##### 3.1.4 การผ่าตัดเพื่อให้เกิดแผลมาตรฐาน

หลังจากแผลที่เกิดจากการผ่าตัดเปิดช่องท้องหายสนิท จะผ่าตัดเพื่อให้เกิดแผลมาตรฐาน โดยโกนขนบริเวณแผ่นหลังสัตว์ทดลอง ใช้ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 22 สอดในร่องแผ่นพลาสติกเพื่อให้สามารถควบคุมความลึกได้กรีดให้เกิดแผลขนาดยาว 1.0 เซนติเมตร และลึก 3.0 มิลลิเมตรบริเวณใต้ต่อกระดูกสะบัก 2.0 เซนติเมตร ระดับความลึกดังกล่าวทำให้เกิดแผลผ่านชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) ชั้นใต้หนังแท้ (hypodermis) ซึ่งเป็นชั้นที่มีเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ทั่วไป และไม่ต้องเย็บแผล เพราะจะทำให้แผลมีการฉีกขาดและทำให้การอ่านผลทางเนื้อเยื่อวิทยามีโอกาสผิดพลาดมากยิ่งขึ้น (มณฑา จำเริญรักษ์. 2544) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ มณฑา จำเริญรักษ์ (2544) พบว่าการป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อหลังการผ่าตัดและทุก ๆ วันหลังจากนั้นอาจเป็นตัวแปรสำคัญต่อผลการทดลอง ดังนั้นในการทดลองจริงจึงไม่ควรป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อหลังการผ่าตัดในทุกกรณี

### 3.1.5 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเพื่อให้สารต่าง ๆ

การทดลองครั้งนี้จะแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

#### I กลุ่มควบคุม (Control group)

กลุ่มที่ 1 Sham operation หมายถึง หนูขาวเพศผู้ที่ไม่ได้ตัดอัณฑะออก แต่ทำการผ่าตัดเปิดแผลที่อัณฑะเหมือนอีก 4 กลุ่ม กลุ่มนี้ให้น้ำกลั่นทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

กลุ่มที่ 2 Orchidectomy (orx) หมายถึง หนูขาวเพศผู้ที่ตัดอัณฑะออกทั้งสองข้าง และให้น้ำกลั่นทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 และ 14 วัน

กลุ่มที่ 3 Orchidectomy และฉีด estradiol benzoate (EB) 2.5 µg/kgBW/day 5 วัน ต่อสัปดาห์ เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน

#### II กลุ่มทดลองให้น้ำมะพร้าวอ่อน (Experimental group)

กลุ่มที่ 1 หนูขาวเพศผู้ได้รับการตัดเอาอัณฑะออกทั้งสองข้าง (orchidectomy) หนูทุกตัวจะได้รับน้ำมะพร้าวอ่อน 100mL/kgBW ตามลำดับ โดยการให้ทางท่อป้อนอาหาร (feeding tube) วันละหนึ่งครั้ง เวลาเดียวกันทุกวัน เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

กลุ่มที่ 2 Sham operation และให้น้ำมะพร้าวอ่อน 100mL/kgBW โดยการให้ทางท่อป้อนอาหาร (feeding tube) วันละหนึ่งครั้ง เวลาเดียวกันทุกวัน เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน

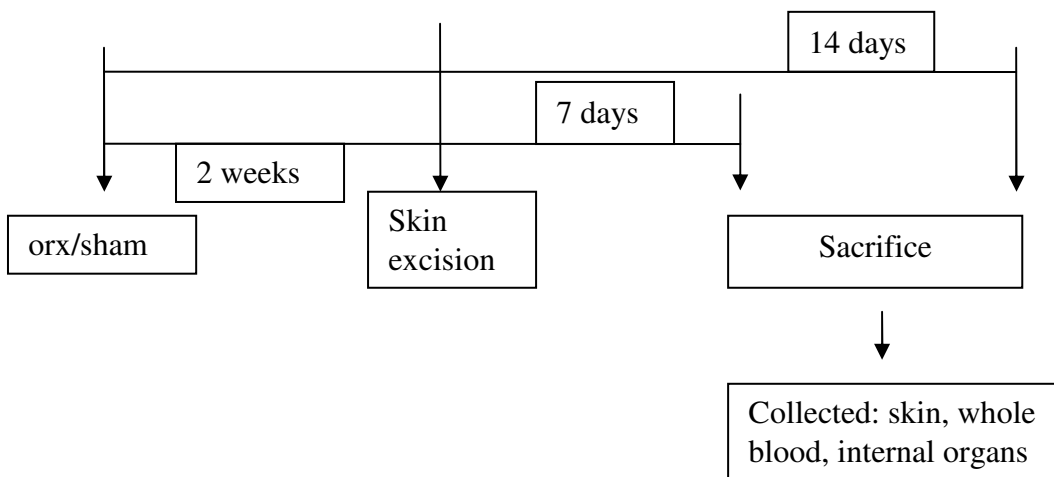
#### ตั้งตารางและไดอะแกรมที่สรุปข้างล่างนี้

Groups (orx/sham on 1 <sup>st</sup> day)*	14 <sup>th</sup> day start	21 <sup>st</sup> day (กลุ่ม 7 วัน)	28 <sup>th</sup> day (กลุ่ม 14 วัน)
1.sham	Feed DI	Sacrificed (6 rats)	Sacrificed (6 rats)
2.orx	Feed DI	Sacrificed (6 rats)	Sacrificed (6 rats)
3.orx+EB**	Inject EB	Sacrificed (6 rats)	Sacrificed (6 rats)
4.orx+YCJ	Feed YCJ	Sacrificed (6 rats)	Sacrificed (6 rats)
5. sham+YCJ	Feed YCJ	Sacrificed (6 rats)	Sacrificed (6 rats)

#### ตารางที่ 2.1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

\*หนูที่ผ่านการผ่าตัดอัณฑะเพื่อเอาอัณฑะออกหรือไม่เอาอัณฑะออก จะถูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน ก่อนจะทำแผลมาตรฐาน (จะตัดกล่าวในรายละเอียดต่อไป) และให้ treatment ต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น (Sayoh *et al.*, 2008)

\*\*EB = Estradiol benzoate เป็นยามาตรฐาน สำหรับ 17 $\beta$ -estradiol (E2)



ในวันที่ฆ่าหนูจะเก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณแผลมาตรฐานและบริเวณที่ไม่มีแผล ก่อนจะรักษาสภาพไว้ใน 20% buffered formalin เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในระดับ light microscope และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจนที่ผิวหนัง และนำเลือดไปตรวจหาค่า E2, testosterone, และค่าต่าง ๆ ทางเคมีคลินิกด้วย โดยการประเมินผลในระดับ light microscope นั้นจะทำการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังรายละเอียด 3.5

### 3.1.6 การฆ่าสัตว์ทดลอง

เมื่อให้สารต่าง ๆ ครบตามเวลาที่กำหนด จะฆ่าสัตว์ทดลองโดยการทำให้สลบก่อนด้วยวิธีการตั้งคอ เมื่อสัตว์ทดลองสลบดีแล้วทำการโกนขนหนูบริเวณที่ต้องการเก็บผิวหนัง แล้วจึงใช้กิโยตินสำหรับตัดคอเพื่อปลิดชีวิตและเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษต่อไป

## 3.2 การเตรียมผงน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวอ่อนเข้มข้น

### 3.2.1 น้ำมะพร้าวอ่อน (YCJ)

น้ำมะพร้าวอ่อนที่ใช้ตลอดการทดลองคือ น้ำมะพร้าวอ่อนพันธุ์น้ำหอม อายุเก็บเกี่ยว 6 เดือน ช่วงการเก็บเกี่ยวตั้งแต่เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2550 ถึงเดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2551 จากสวนมะพร้าวพันธุ์น้ำหอมเลขที่ 81/1 หมู่บ้านคลองบัว ตำบลพิจิตร อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา

### 3.2.2 การเตรียมผงน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวอ่อนเข้มข้น (รูปที่ 2-1)

นำน้ำมะพร้าวอ่อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผ่านเครื่อง freeze dryer จนได้ผงน้ำมะพร้าวอ่อนน้ำหนัก 5.5 กรัม เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในการทดลองครั้งนี้ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของสัตว์ทดลอง (100 mL/kgBW) ตลอดจนการทดลอง โดยเตรียมจากการนำผงน้ำมะพร้าวอ่อนน้ำหนัก 5.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน (Deionized water = DI) จนได้สารละลายปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ทุกวัน)



รูปที่ 2-1 แสดงผงน้ำมะพร้าวอ่อนที่ผ่านเครื่อง freeze dryer

### 3.3 การเตรียม $\beta$ -estradiol 3-benzoate (EB)

#### 3.3.1 การเตรียมขนาดความเข้มข้นเริ่มต้น (3,000 $\mu\text{g/mL}$ )

ซึ่ง EB ปริมาณ 15 มิลลิกรัม ละลายในน้ำมันมะกอก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและฉีดบริเวณหน้าท้อง (i.p.)

#### 3.3.2 การเตรียมขนาดความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

นำ EB ขนาดความเข้มข้นเริ่มต้น (3000  $\mu\text{g/mL}$ ) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ละลายด้วยน้ำมันมะกอก ปริมาตร 19.95 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อฉีดให้สัตว์ทดลองต่อไป

### 3.4 การเตรียมอัตราส่วนความเข้มข้นของ estrogen receptors (ERs)

#### 3.4.1 ER $\alpha$

ทำการ trial เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ER $\alpha$  ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 1:100, 1:200 และ 1:400 และพบว่าที่อัตราส่วน 1:200 เป็นอัตราส่วนการติดสีย้อมที่เหมาะสมต่อการทดลองในครั้งนี้



### 3.4.2 ERβ

ทำการ trial เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ERβ ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ดังนี้ 1:1,000, 1:2,000 และ 1:4,000 พบว่าที่อัตราส่วน 1:1,000 เป็นอัตราส่วนการติดสีย้อมเข้มกว่าปกติและที่อัตราส่วน 1:2,000 การติดสีย้อมจางกว่าปกติ ดังนั้นจึงตัดสินใจทดลองที่ความเข้มข้น 1:1,500 และพบว่าเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการทดลองในครั้งนี้

### 3.5 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM (ปิยากร. 2550)

นำตัวอย่างผิวหนังที่รักษาภาพไว้แล้วใน 20% buffered formalin ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. Dehydration โดยแช่ในแอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมากตามลำดับดังนี้

50% alcohol	2 ชั่วโมง
70% alcohol	2 ชั่วโมง
95% alcohol I	3 ชั่วโมง
95% alcohol II	3 ชั่วโมง
100% alcohol I	4 ชั่วโมง
100% alcohol II	5 ชั่วโมง
100% alcohol III	6 ชั่วโมง

2. Clearing โดยแช่ใน xylene ตามลำดับดังนี้

Xylene I	4 ชั่วโมง
Xylene II	5 ชั่วโมง
Xylene III	6 ชั่วโมง

3. Infiltration โดยแช่ใน melt paraplast

Paraplast I	3 ชั่วโมง
Paraplast II	4 ชั่วโมง

4. Embedding โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อดังกล่าวข้างต้นแล้ว ฝังใน melt paraplast โดยอาศัยเครื่อง embedding centre

5. Sectioning โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ฝังใน paraplast แล้ว มาตัดให้บางด้วยเครื่อง microtome ด้วยความหนา 5 ไมโครเมตร ก่อนจะวางไว้บน tespa coated slide ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า section

### การย้อมสีตัวอย่างเนื้อเยื่อ

#### 3.5.1 เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM

##### 3.5.1.1 การย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin และ eosin (H&E)

นำ section มาย้อมสี H&E เพื่อศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไปตามขั้นตอนดังนี้

1. xylene I	5 นาที
2. xylene II	5 นาที
3. 100% alcohol I	5 นาที
4. 100% alcohol II	5 นาที
5. 95% alcohol I	5 นาที
6. 95% alcohol II	5 นาที
7. tap water	5 นาที
8. Mayer's hematoxylin	20 นาที
9. tap water	10 นาที
10. working solution	2-3 นาที
11. 95% alcohol I	3-5 dips
12. 95% alcohol II	3-5 dips
13. 95% alcohol III	3-5 dips
14. 100% alcohol I	5 นาที
15. 100% alcohol II	5 นาที
16. xylene I	5 นาที
17. xylene II	5 นาที
18. permount	

### 3.5.1.2 การย้อมด้วยสีย้อม Masson's trichrome

นำ section มาย้อมด้วยสี Masson's trichrome เพื่อศึกษาการเรียงตัวของเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อเยื่อผิวหนังตามขั้นตอนดังนี้

1. xylene I	5 นาที
2. xylene II	5 นาที
3. 100% ethyl alcohol I	5 นาที
4. 100% ethyl alcohol I	5 นาที
5. 95% ethy alcohol I	5 นาที
6. 95% ethy alcohol I	5 นาที
7. tap water	5 นาที
8. potassium dichromate	60 นาที
9. tap water	5 นาที
10. Mayer's hematoxylin	15 นาที
11. tap water	10 นาที
12. warm water	1 นาที
13. 0.6% phosphotungstic acid	1 นาที
14. tap water	1 นาที
15. mixture solution	10 นาที
16. 1% acetic acid I	8-10 dips
17. 1% acetic acid II	8-10 dips
18. tap water	1 นาที
19. 2.5% phosphotungstic acid	20 นาที
20. tap water	1 นาที
21. 0.4% aniline blue	15 นาที
22. 1% acetic acid I	8-10 dips
23. 1% acetic acid II	8-10 dips
24. tap water	1 นาที
25. 95% ethyl alcohol I	5 นาที
26. 95% ethyl alcohol II	5 นาที
27. 100% ethyl alcohol I	5 นาที
28. 100% ethyl alcohol II	5 นาที
29. xylene I	5 นาที

30. xylene II

5 นาที

31. permount

### 3.5.1.3 การย้อมสีด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (Immunohistochemistry) (Sayoh *et al.*, 2008)

นำ section มาย้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ เพื่อศึกษาดำแหน่งของ ERs ทั้งชนิด ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในเนื้อเยื่อตามขั้นตอนดังนี้

1. Deparaffinization ใน xylene 10 นาที
2. Rehydration โดยใช้แอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นมากไปยังความเข้มข้นน้อยตามลำดับดังนี้
 

100% alcohol	2 นาที
95% alcohol	2 นาที
80% alcohol	2 นาที
70% alcohol	2 นาที
50% alcohol	2 นาที
Distilled water	2 นาที
3. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
4. Incubate ใน 0.3% Triton-X100 ใน 0.1 M TBS pH 7.2 นาน 30 นาที
5. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
6. Incubate ใน 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol นาน 20 นาที
7. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
8. Incubate ใน non-specific protein blocking serum ใน moistured chamber นาน 90 นาที
9. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
10. Incubate ใน primary antibody ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 คืน
11. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
12. Incubate ใน secondary antibody นาน 90 นาที
13. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
14. Incubate ใน ABC ที่อุณหภูมิห้อง นาน 90 นาที
15. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที

16. Incubate ใน DAB นาน 3-5 นาที
17. ล้างด้วย distilled water
18. Dehydration โดยใช้แอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมากตามลำดับดังนี้
 

50% alcohol	10 นาที
70% alcohol	10 นาที
80% alcohol	10 นาที
95% alcohol	10 นาที
100% alcohol	10 นาที
19. Clearing ใน xylene นาน 10 นาที
20. Mounting ด้วย permount

3.6 การอ่านผลการสแกนแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM ใช้โปรแกรม Microimage (Image analysis software V.4, Olympus) วัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ต่อไปนี้

#### 3.6.1 การวัดความลึกของบริเวณแผล

วัดความลึก 3 บริเวณ โดยวัดจากชั้น epidermis ตั้งฉากกับบริเวณที่ลึกที่สุดของแผลที่ยังพบมี granulation tissue แล้วหาค่าเฉลี่ยของความลึกที่วัดได้

#### 3.6.2 การวัดความกว้างของบริเวณแผล

วัดความกว้าง 3 บริเวณ คือ บริเวณปากแผล บริเวณกึ่งกลางแผล และบริเวณขอบล่างของแผล โดยวัดจากขอบแผลทั้งสองข้างที่ยังพบมี granulation tissue แล้วหาค่าเฉลี่ยของความกว้างที่วัดได้

#### 3.6.3 การวัดความหนาของชั้น epidermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้น stratum granulosum จนถึงชั้น stratum basale แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

#### 3.6.4 การวัดความหนาของชั้น dermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้นใต้ต่อ stratum basale จนถึงชั้นเหนือต่อชั้น hypodermis แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

#### 3.6.5 การวัดความหนาของชั้น hypodermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้นใต้ต่อชั้น dermis จนถึงชั้นเหนือต่อชั้น muscularis adiposa แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

### 3.6.6 การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของรากขน (hair follicles)

วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของรากขนที่ใหญ่ที่สุดจำนวน 10 hair follicles โดยวัดในชั้น dermis และชั้น hypodermis ตามลำดับแล้วหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่าศูนย์กลางของรากขนในแต่ละชั้นที่วัดได้

### 3.6.7 การนับจำนวนของ hair follicles

นับจำนวนของ hair follicles ในพื้นที่ 5 ตารางมิลลิเมตร โดยนับแยกจำนวน hair follicles ที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  และจำนวน hair follicles ที่ย้อมไม่ติดสีดังกล่าวตามลำดับ แล้วหาค่าเฉลี่ยของจำนวน hair follicles ในพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร

## 3.7 การตรวจวิเคราะห์ค่า serum E2 และ testosterone

ใช้ตัวอย่างเลือดหนูทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน หลังจากตัดคอหนูแล้ว นำ test tube รองเลือดจากคอหนูและปิด test tube ด้วย parafilm แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้ให้เลือดตกตะกอน แยกชั้นในตู้เย็นที่ 4 °C แล้วจึงนำไปปั่นที่ความเร็ว 3,000 rpm 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำ serum ที่ได้ ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อตรวจวิเคราะห์หาค่า serum E2 และ testosterone ด้วยหลักการทาง electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

## 3.8 การตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกอื่นๆ

ใช้ตัวอย่างซีรัมจากเลือดหนูทั้งในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ส่งตรวจ ณ คลินิก เซนทรัลแล็บ ถนนนิพัทธ์อุทิศ 1 อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อตรวจวิเคราะห์หาค่า BUN (Blood urea nitrogen), creatinine, total protein, albumin, ALP (Alkaline phosphatase), AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), cholesterol, triglyceride, HDL (High density lipoprotein) และ LDL (low density lipoprotein)

## 4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ใช้โปรแกรม Microimage และทดสอบความถูกต้องแม่นยำของข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft EXCEL version 2003 และ SPSS version 12 ข้อมูลผลการทดลองแสดงเป็นค่า means  $\pm$  SEM โดยทดสอบการกระจายตัวของข้อมูล พบว่ามี การกระจายตัวแบบ non-normal distribution ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงใช้ non-parametric: two-independent sample test และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Mann-Whitney U test โดยกำหนดให้ค่า p value น้อยกว่า 0.05 ( $p < 0.05$ ) ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

##### การทดสอบผลการทดลองทางสถิติ

ทดสอบความถูกต้องแม่นยำของข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft EXCEL version 2003 และ SPSS version 12 ค่าทางสถิติทุกค่าแสดงเป็นค่า mean±SEM หากค่าดังกล่าวมี p value น้อยกว่า 0.05 จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และใช้สัญลักษณ์ต่อไปนี้ตลอดผลการทดลอง เพื่อแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

\* และ \*\* คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม sham โดยมีค่า p value ที่  $p<0.05$  และ  $p<0.01$  ตามลำดับ

+ และ ++ คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม orx โดยมีค่า p value ที่  $p<0.05$  และ  $p<0.01$  ตามลำดับ

† และ †† คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองใน treatment เดียวกัน ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน โดยมีค่า p value ที่  $p<0.05$  และ  $p<0.01$  ตามลำดับ

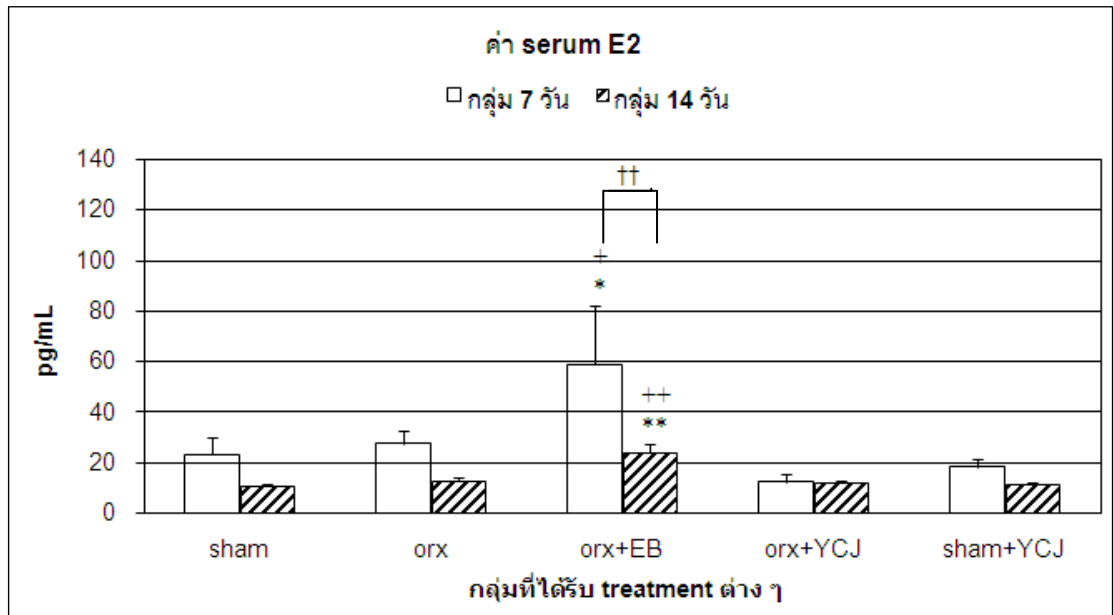
สำหรับค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ นั้น จะไม่มีสัญลักษณ์แสดงบนกราฟ



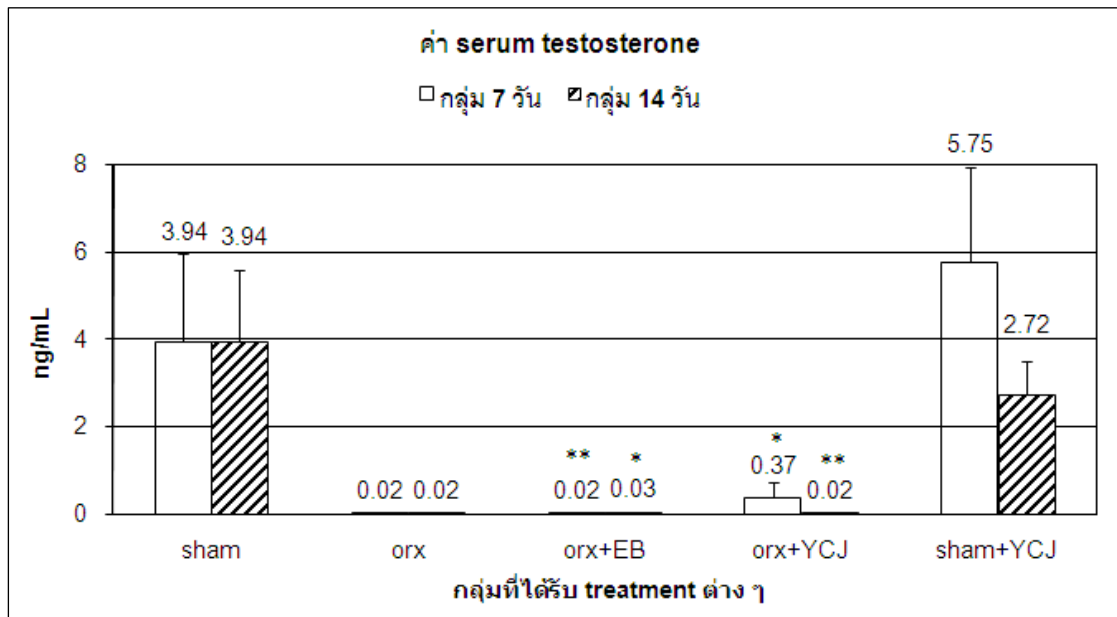
### 1. ค่า serum E2 (pg/mL) และ testosterone (ng/mL) ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน

การเปรียบเทียบค่า serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $23.08 \pm 6.4$ ) และกลุ่ม orx ( $27.36 \pm 5.3$ ) มีค่า serum E2 ต่ำกว่ากลุ่ม orx+EB ( $58.73 \pm 23.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และกลุ่ม orx+EB มีค่า serum E2 สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $11.94 \pm 3.2$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $18.08 \pm 2.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และเมื่อเปรียบเทียบค่า serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $10.83 \pm 0.5$ ) และกลุ่ม orx ( $12.71 \pm 1.2$ ) มีค่า serum E2 ต่ำกว่ากลุ่ม orx+EB ( $24.08 \pm 2.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และกลุ่ม orx+EB มีค่า serum E2 สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $11.67 \pm 0.8$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $11.11 \pm 1.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม sham กลุ่ม orx กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ พบความแตกต่างดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่ม orx+EB ( $p < 0.01$ ) (รูปที่ 3-1)

สำหรับการเปรียบเทียบค่า serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $3.94 \pm 2.0$ ) มีค่า serum testosterone สูงกว่ากลุ่ม orx ( $0.02 \pm 0.0$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $0.02 \pm 0.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และกลุ่ม orx มีค่า serum testosterone ต่ำกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $5.75 \pm 2.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) นอกจากนี้กลุ่ม sham+YCJ มีค่า serum testosterone สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $0.37 \pm 0.3$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และสูงกว่ากลุ่ม orx+EB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) เช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบค่า serum testosterone ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $3.94 \pm 1.6$ ) มีค่า serum testosterone สูงกว่ากลุ่ม orx ( $0.02 \pm 0.0$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $0.03 \pm 0.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และสูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $0.02 \pm 0.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และกลุ่ม orx มีค่า serum testosterone ต่ำกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $2.72 \pm 0.8$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) นอกจากนี้กลุ่ม sham+YCJ มีค่า serum testosterone สูงกว่ากลุ่ม orx+EB และกลุ่ม orx+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม sham กลุ่ม orx กลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ (รูปที่ 3-2)



รูปที่ 3-1 กราฟแสดงค่า serum E2 (pg/mL) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน



รูปที่ 3-2 กราฟแสดงค่า serum testosterone (ng/mL) ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน

2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่าง ๆ โดยใช้โปรแกรม **image analyzer** และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม **EXCEL** และโปรแกรม **SPSS** ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้
- ก. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน
1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล (wounded skin)

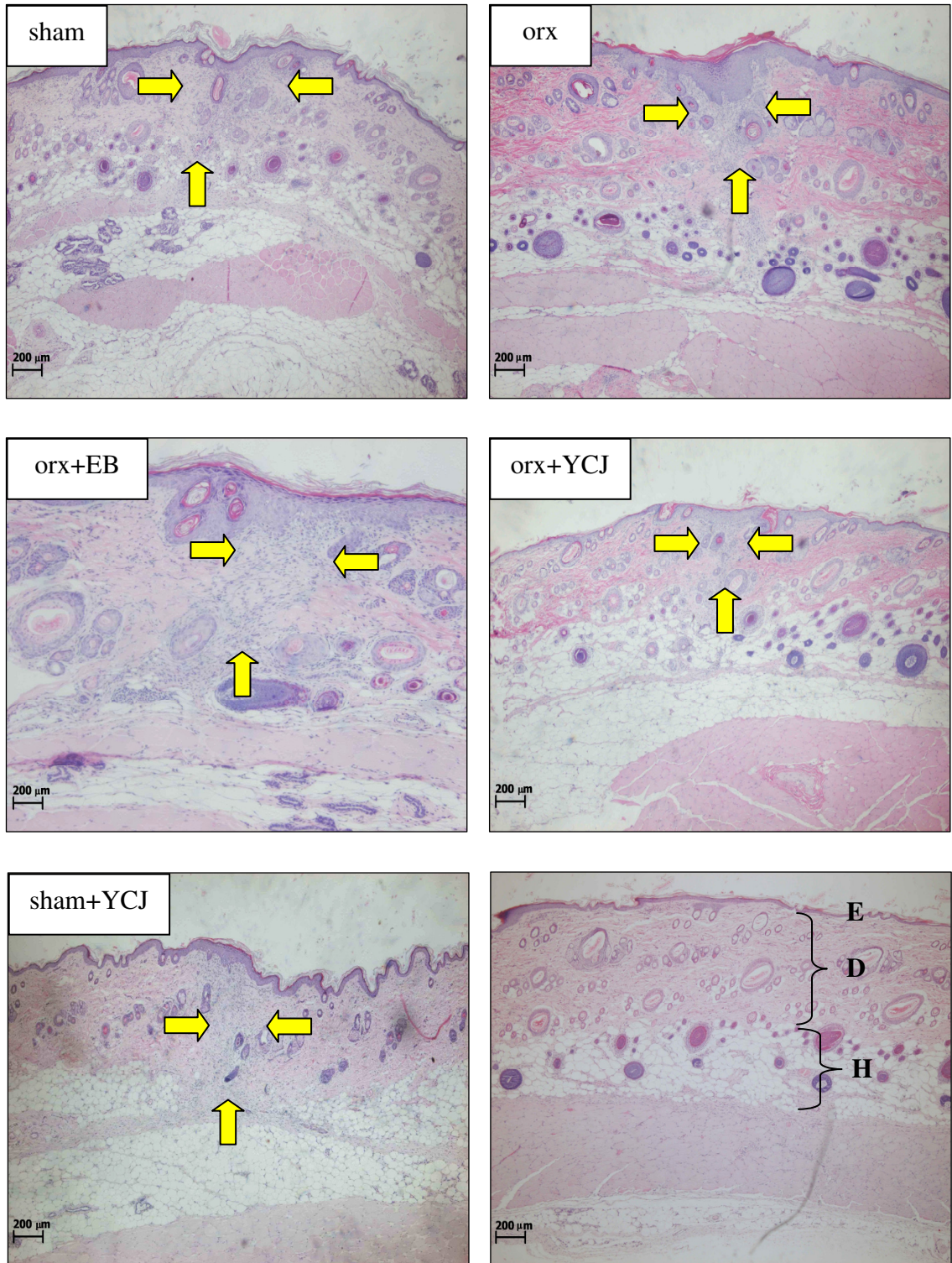
ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม sham+YCJ มีความหนามากกว่าและมีการเรียงตัวของ keratinocytes หลายชั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อกลุ่ม orx ในชั้น dermis พบ granulation tissue ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ fibroblast เส้นเลือดเส้นใหม่ และ extracellular matrix (ECM) ขอบเขตของแผลในกลุ่ม orx+YCJ เล็กที่สุด ในขณะที่กลุ่ม sham มีขนาดของแผลใหญ่ที่สุด (รูปที่ 3-3 และ 3-4)

#### 1.1 ความลึกของแผล

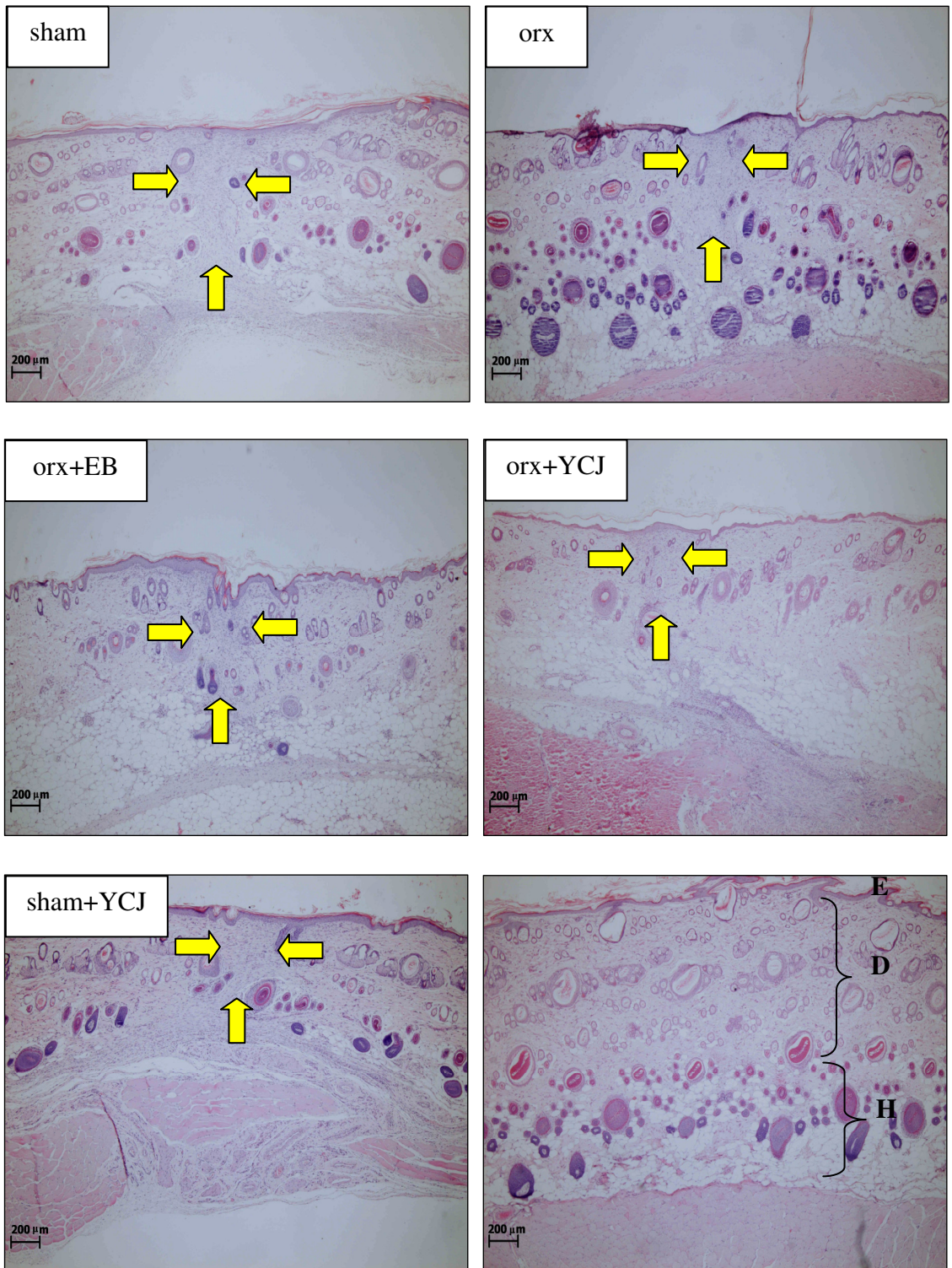
เมื่อวัดความลึกของแผล ( $\mu\text{m}$ ) ในกลุ่ม 7 วัน ด้วยโปรแกรม image analyzer พบว่าความลึกของแผลในกลุ่ม sham ( $468.46 \pm 17.2$ ) กลุ่ม orx ( $449.44 \pm 14.1$ ) กลุ่ม orx+EB ( $442.66 \pm 29.9$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $446.00 \pm 11.3$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $433.60 \pm 15.8$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-5) สำหรับการวัดความลึกของแผลในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $438.15 \pm 17.2$ ) และกลุ่ม orx ( $404.16 \pm 12.4$ ) มีความลึกของแผลมากกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $304.67 \pm 22.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม orx+YCJ ( $p < 0.01$ ) กลุ่ม orx และกลุ่ม sham+YCJ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-5)

#### 1.2 ความกว้างของแผล

สำหรับการวัดความกว้างของแผลในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $351.60 \pm 17.9$ ) มีความกว้างของแผลมากกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $284.28 \pm 9.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม orx ( $315.39 \pm 12.5$ ) กลุ่ม orx+EB ( $309.70 \pm 13.9$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $310.46 \pm 11.8$ ) โดยสรุปกลุ่ม orx+YCJ มีความกว้างของแผลน้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ ในขณะที่กลุ่ม sham มีความกว้างของแผลมากที่สุด แต่เมื่อวัดความกว้างของแผลในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $243.51 \pm 6.2$ ) มีความกว้างน้อยกว่ากลุ่ม sham ( $350.79 \pm 23.1$ ) และกลุ่ม orx ( $292.53 \pm 12.6$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม orx+YCJ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-6)



รูปที่ 3-3 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผล E=epidermis, D=dermis และ H=hypodermis



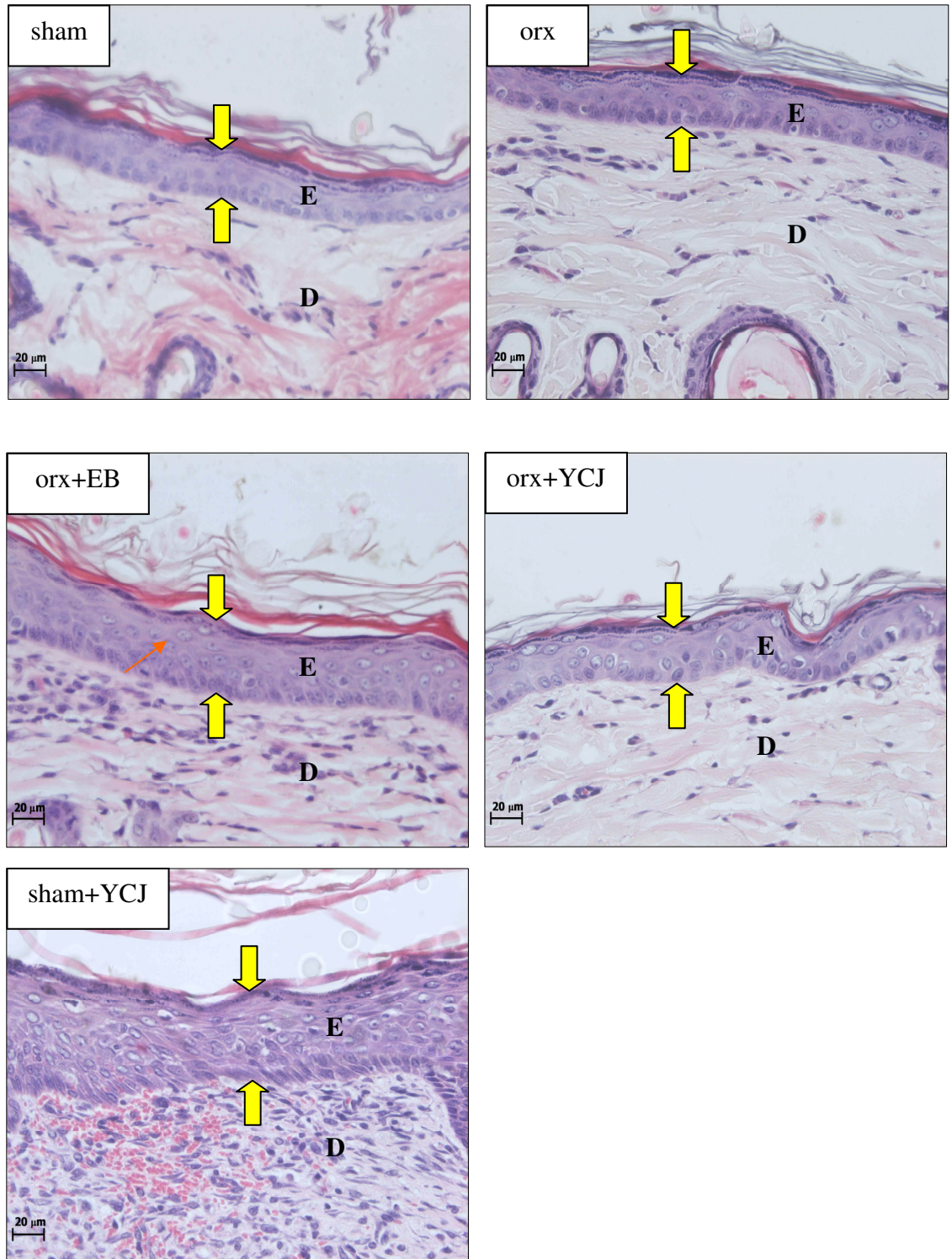
รูปที่ 3-4 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผล E=epidermis, D=dermis และ H=hypodermis



2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ (normal skin) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

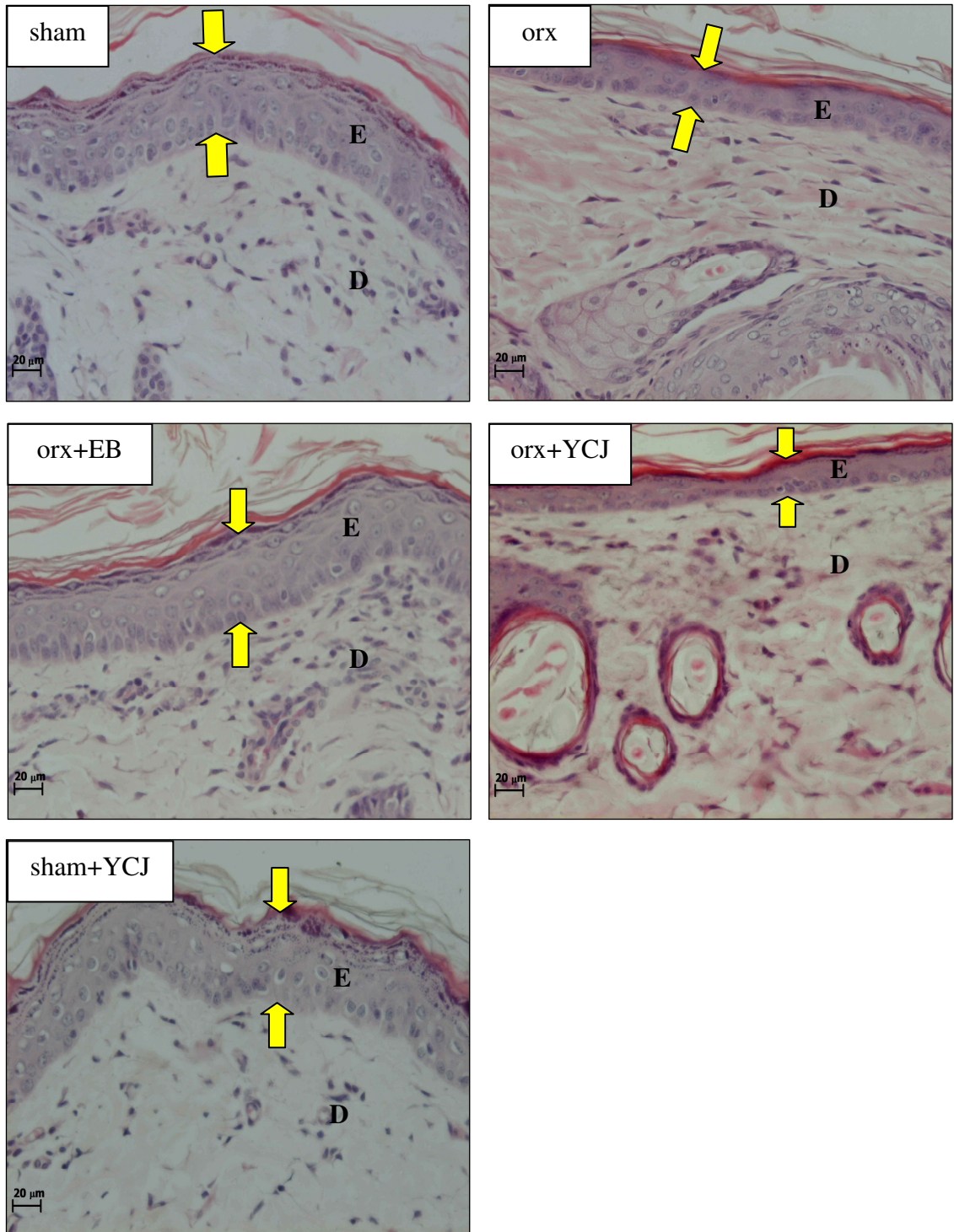
**ชั้น Epidermis**

การตรวจสอบชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes เรียงตัวเป็นชั้น ๆ โดย keratinocytes ที่อยู่ชั้นล่างสุดมีรูปร่างทรงสูงที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแทนที่เซลล์ชั้นบนที่เสื่อมสภาพแล้ว ขนาดของ keratinocytes ในกลุ่ม sham กลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YJC และกลุ่ม sham+YJC มีขนาดใหญ่และกลมมนมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม orx ซึ่งมี keratinocytes ขนาดเล็กและลีบแบน การวัดความหนาของชั้น epidermis ( $\mu\text{m}$ ) ในกลุ่ม 7 วัน ด้วยโปรแกรม image analyzer พบว่ากลุ่ม sham ( $281.85 \pm 2.4$ ) และกลุ่ม orx ( $282.60 \pm 3.7$ ) มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม orx+EB ( $309.96 \pm 3.1$ ) และกลุ่ม sham+YJC ( $327.33 \pm 2.7$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม sham มีความหนามากกว่ากลุ่ม orx+YJC ( $257.72 \pm 6.3$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม sham และกลุ่ม orx (กราฟรูปที่ 3-9) ส่วนความหนาของชั้น epidermis ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $350.72 \pm 5.7$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่มอื่น คือ กลุ่ม orx ( $275.65 \pm 3.9$ ) กลุ่ม orx+EB ( $271.57 \pm 2.0$ ) กลุ่ม orx+YJC ( $289.11 \pm 5.7$ ) และกลุ่ม sham+YJC ( $314.58 \pm 3.6$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีความหนามากกว่ากลุ่ม orx+EB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม sham+YJC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-9) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม sham และกลุ่ม orx+EB ( $p < 0.01$ ) และกลุ่ม sham+YJC ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-9)

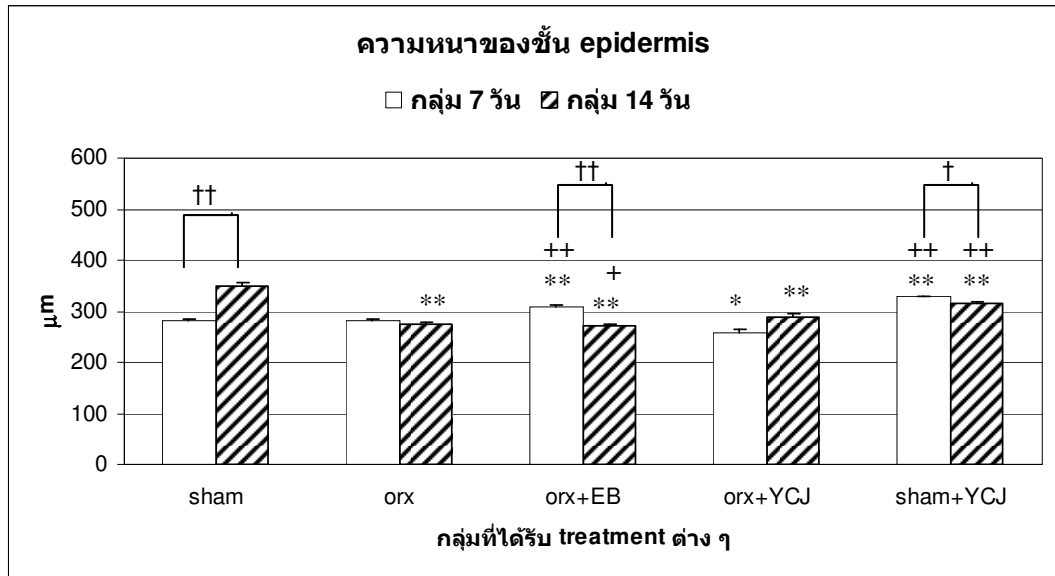


รูปที่ 3-7 แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (40x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น epidermis ลูกศรสีแดงแสดงเซลล์ keratinocytes E=epidermis และ D=dermis





รูปที่ 3-8 แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (40x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น epidermis E=epidermis และ D=dermis



**รูปที่ 3-9** กราฟแสดงความกว้างของชั้น epidermis ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน

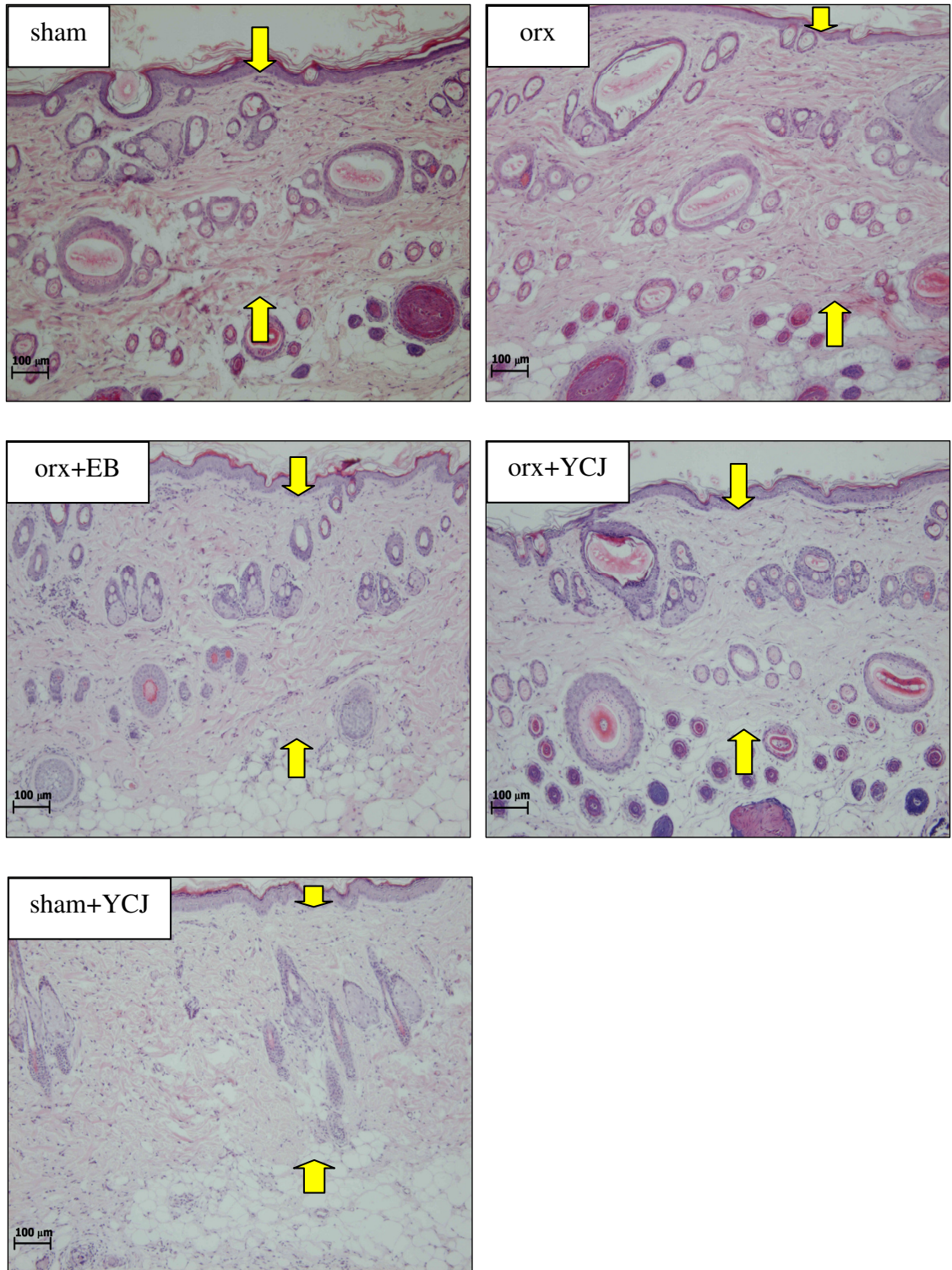
### ชั้น Dermis

การตรวจสอบชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วย fibroblasts แทรกอยู่ระหว่างคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชั้นนี้ นอกจากนี้ยังพบ sebaceous gland, hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ในชั้นนี้ด้วย ลักษณะการเรียงตัวของคอลลาเจน ในกลุ่ม sham พบว่ามีการเรียงตัวอย่างหลวม ๆ ทำให้เห็นเป็นช่องว่างในชั้น dermis มากกว่าเมื่อเทียบกับอีกสี่กลุ่มคือ กลุ่ม orx กลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ (รูปที่ 3-10 และ 3-11)

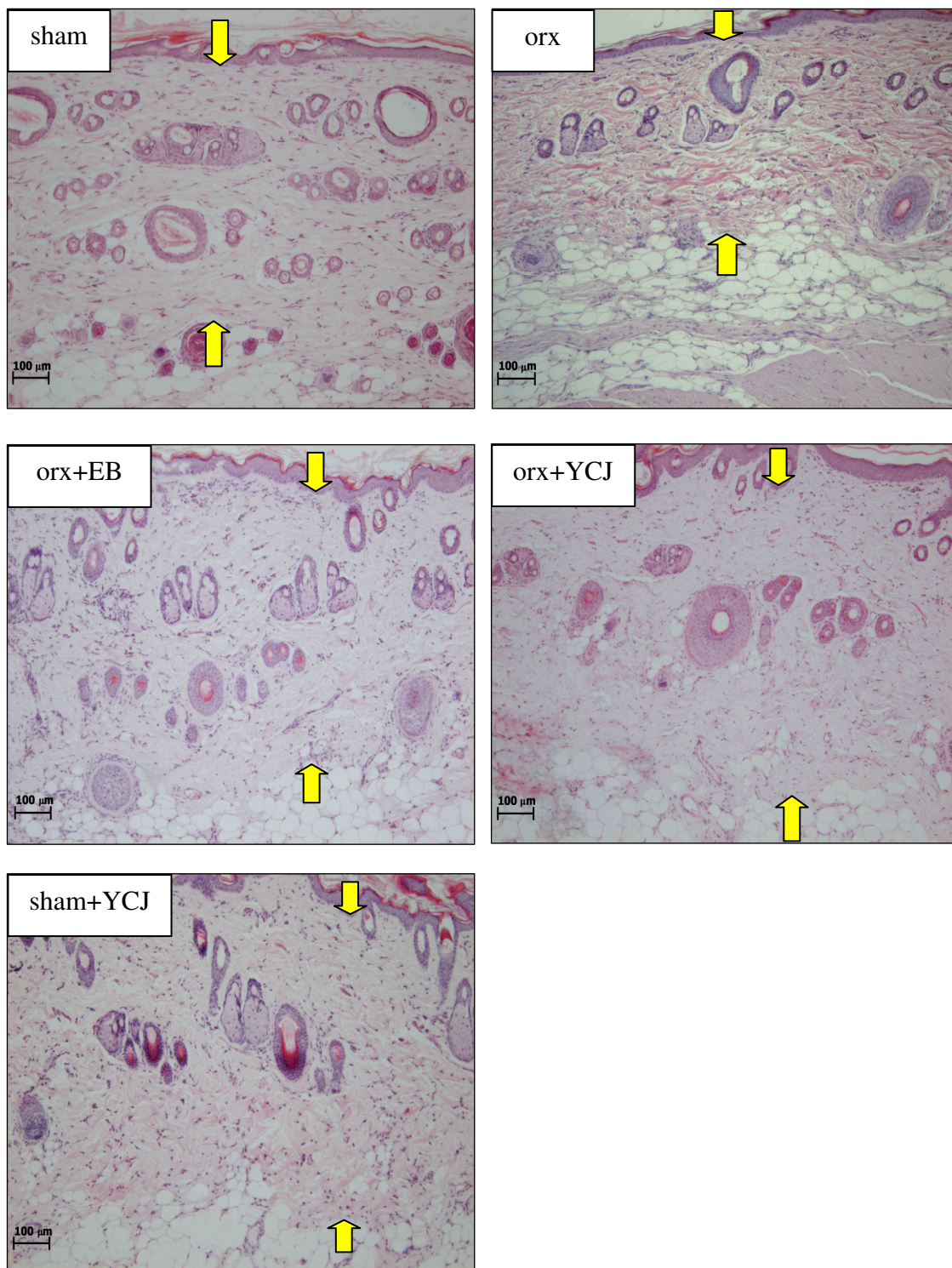
การวัดความหนาของชั้น dermis ( $\mu\text{m}$ ) ในกลุ่ม 7 วัน ด้วยโปรแกรม image analyzer พบว่าความหนาของชั้น dermis ในกลุ่ม sham ( $1,136.02 \pm 0.7$ ) มีความหนาน้อยกว่า กลุ่ม orx ( $1,300.85 \pm 9.0$ ) กลุ่ม orx+EB ( $1,467.66 \pm 3.5$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $1,316.26 \pm 8.1$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $1,254.59 \pm 6.4$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม orx+EB แต่มากกว่ากลุ่ม sham+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-12)

สำหรับการวัดความหนาของชั้น dermis ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $1,351.83 \pm 5.8$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่ม orx ( $1,327.97 \pm 6.1$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $1,281.87 \pm 6.8$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม orx+EB ( $1,405.07 \pm 6.2$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $1,370.89 \pm 9.2$ ) แต่มากกว่ากลุ่ม sham+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-12)

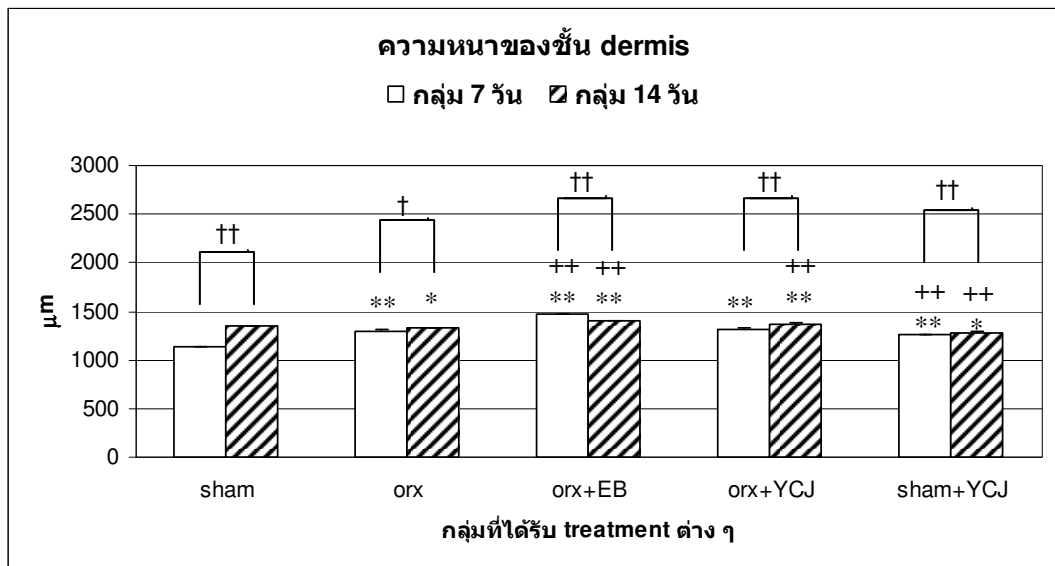
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกัน พบว่ากลุ่ม sham กลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  ส่วนกลุ่ม orx มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  (กราฟรูปที่ 3-12)



รูปที่ 3-10 แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น dermis



รูปที่ 3-11 แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น dermis



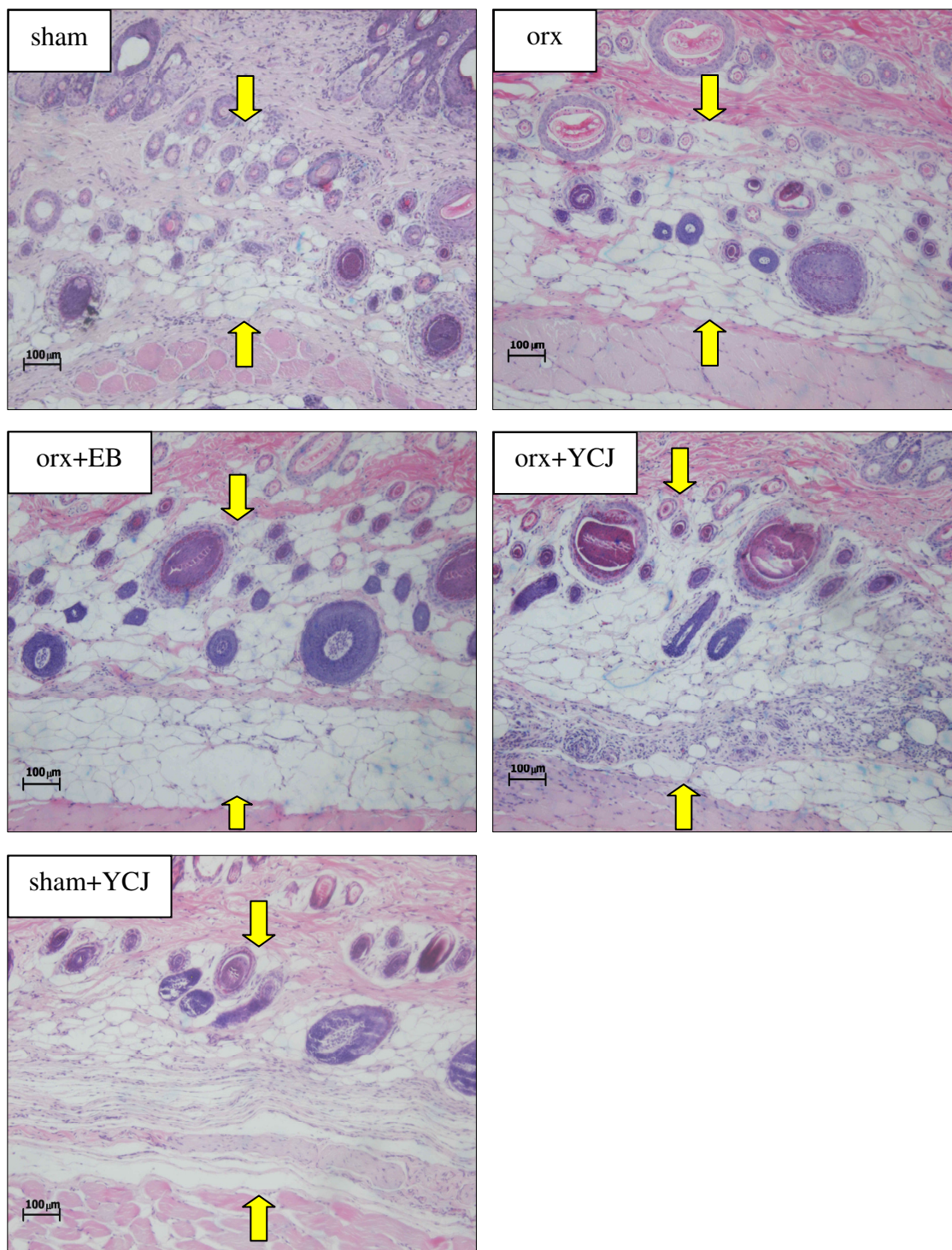
**รูปที่ 3-12** กราฟแสดงความกว้างของชั้น dermis ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน

### ชั้น Hypodermis

การตรวจสอบชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติกายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบ hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายตัวในชั้นนี้ด้วย จากการวัดความหนาของชั้น hypodermis ( $\mu\text{m}$ ) ด้วยโปรแกรม image analyzer ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าความหนาของชั้น hypodermis ในกลุ่ม sham ( $745.64 \pm 15.2$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่ม orx ( $402.13 \pm 6.8$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม orx+EB ( $711.79 \pm 19.5$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $775.51 \pm 25.8$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $776.44 \pm 5.7$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (รูปที่ 3-13 และกราฟรูปที่ 3-15)

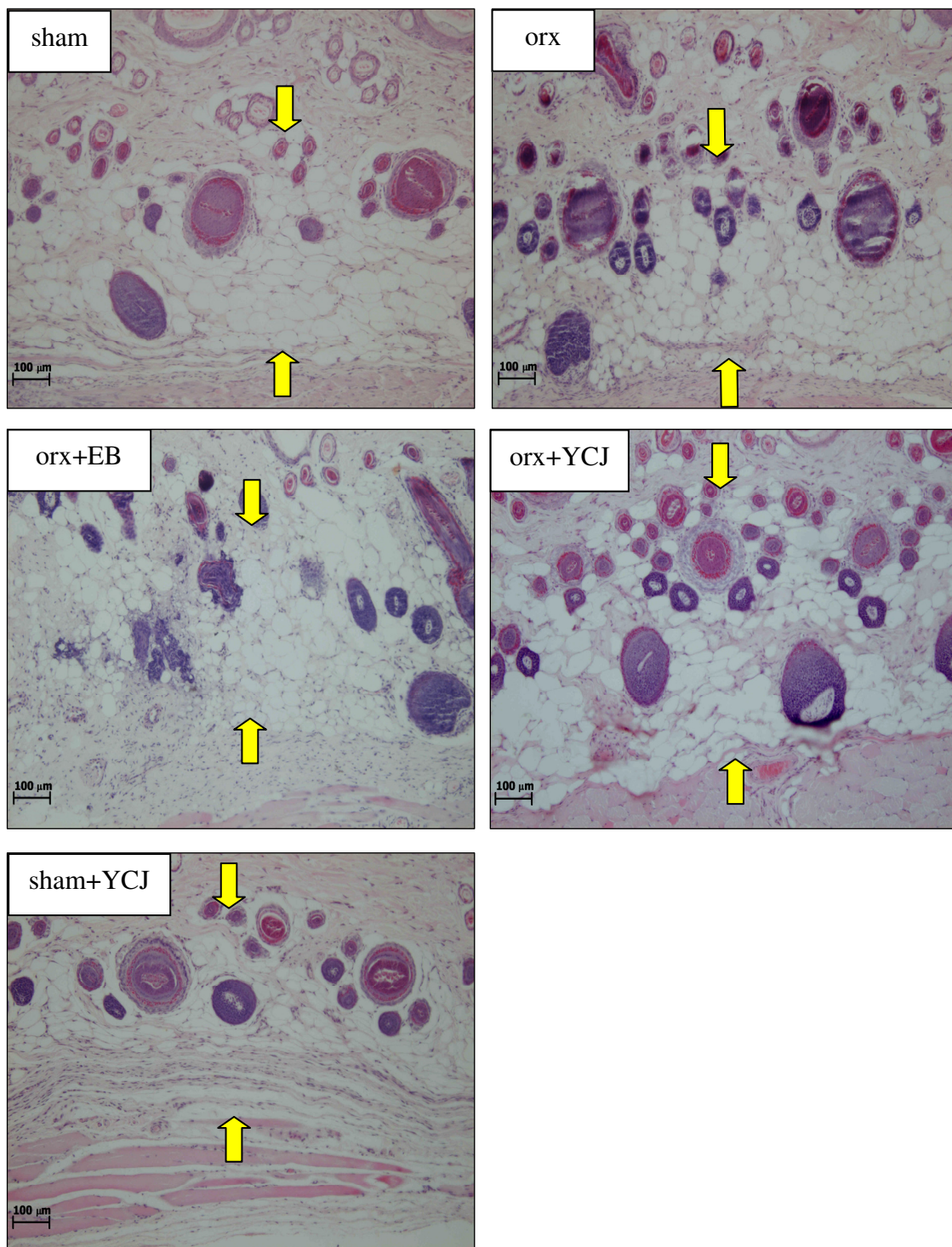
ส่วนความหนาของชั้น hypodermis ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าความหนาของชั้น hypodermis ในกลุ่ม sham ( $795.93 \pm 16.0$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่ม orx ( $440.35 \pm 9.6$ ) กลุ่ม orx+EB ( $670.88 \pm 22.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และมีความหนามากกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $749.80 \pm 9.6$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่น้อยกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $974.53 \pm 34.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีความหนาน้อยกว่ากลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (รูปที่ 3-14 และกราฟรูปที่ 3-15)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันพบว่า กลุ่ม orx และกลุ่ม orx+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  ส่วนกลุ่ม sham และกลุ่ม orx+EB มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  (กราฟรูปที่ 3-15)

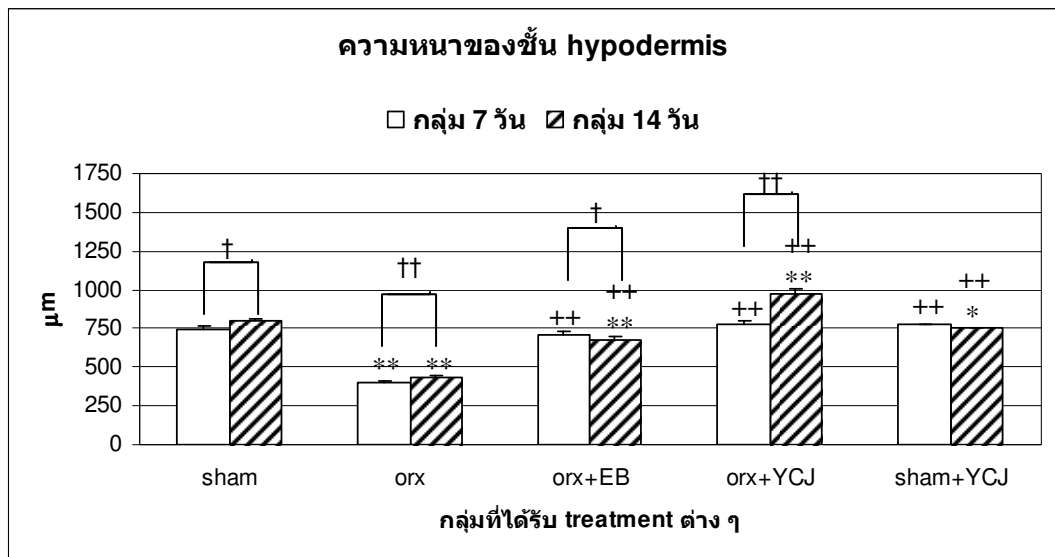


รูปที่ 3-13 แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น hypodermis





รูปที่ 3-14 แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น hypodermis



รูปที่ 3-15 กราฟแสดงความกว้างของชั้น hypodermis ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน

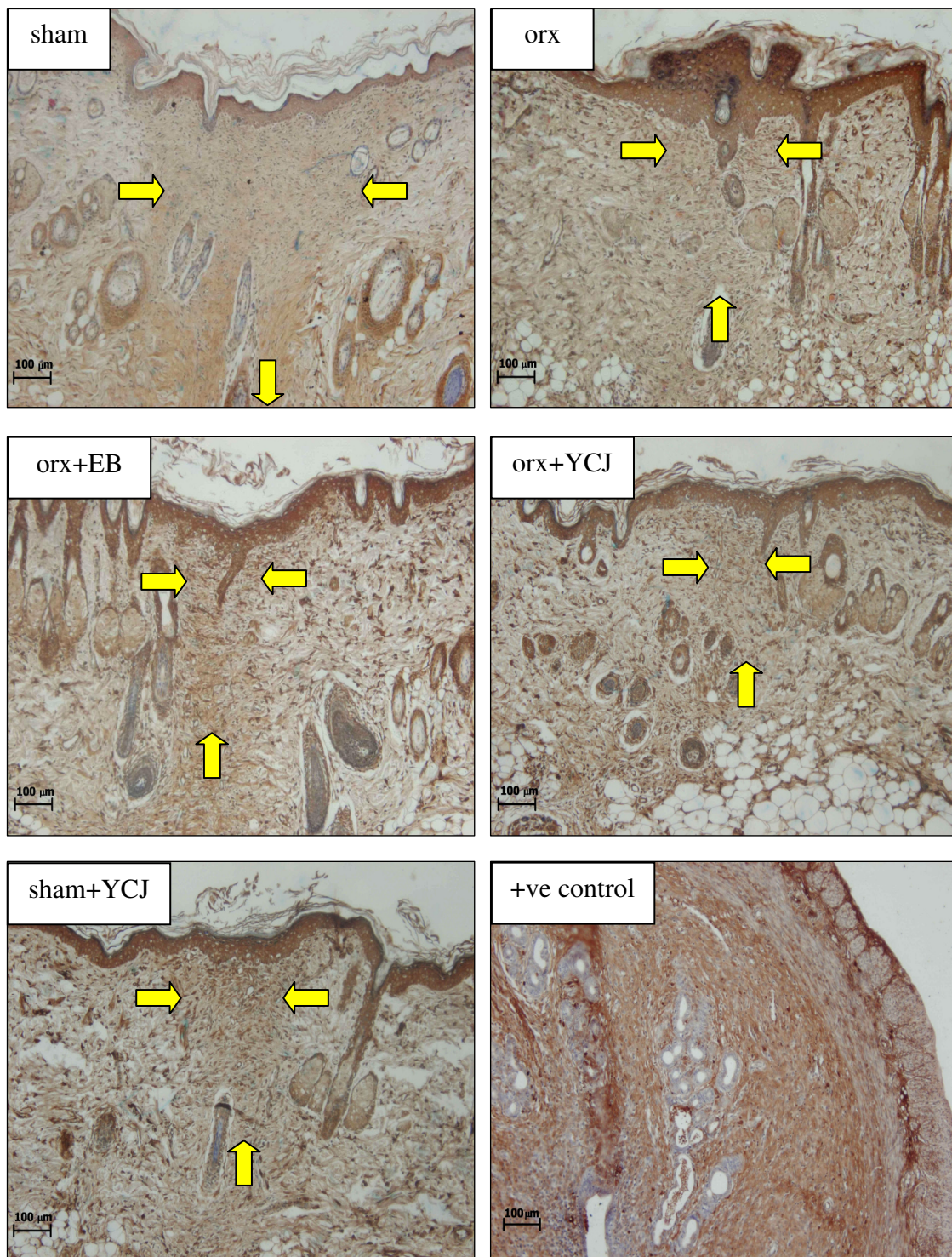
ข. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากการย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

1. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\alpha$  antibody

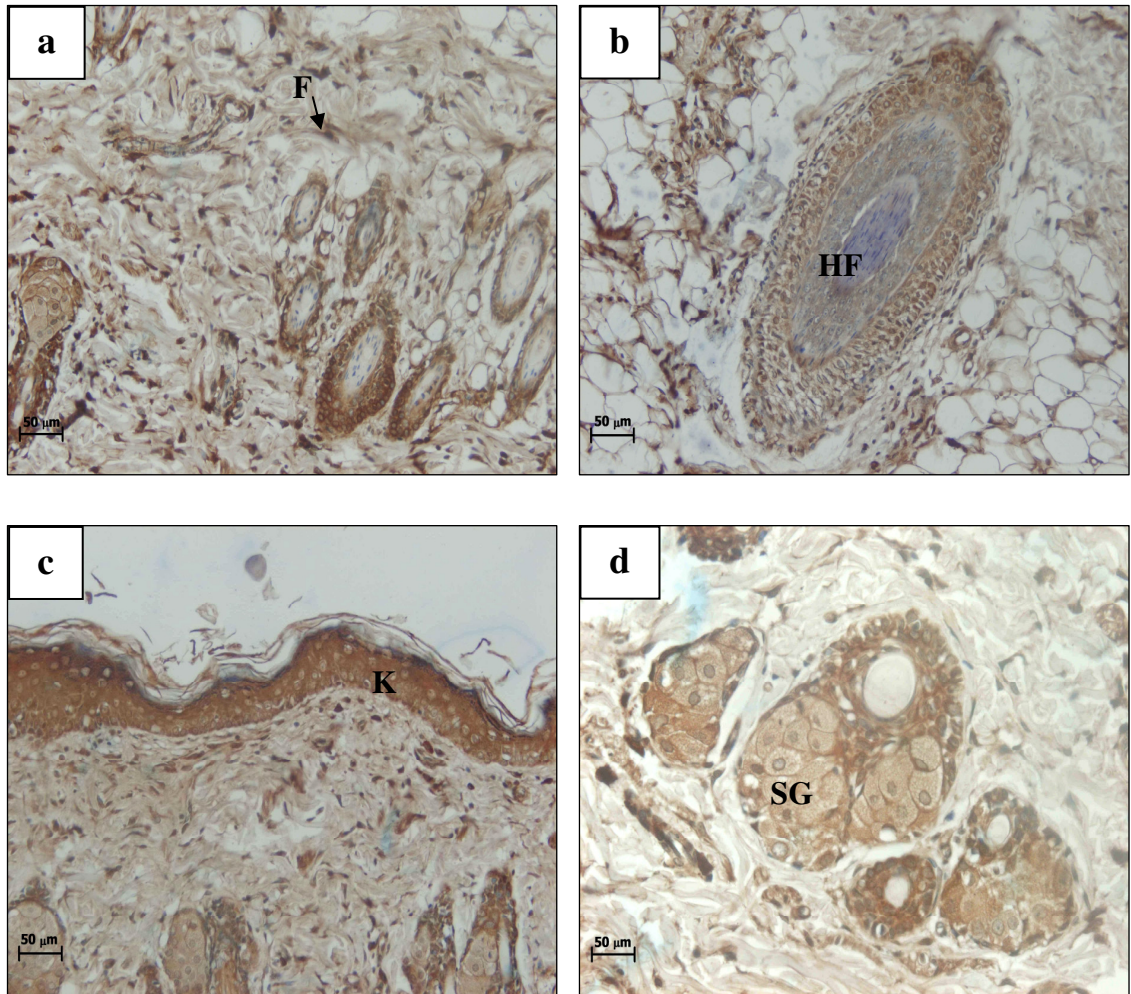
ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม sham หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ immunoreactive (ir+) keratinocytes หลายชั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างดังกล่าว ในชั้น dermis พบ granulation tissue (ir+) ติดสีน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วยกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้สังเกตเห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม orx+YcJ น้อยที่สุด ในขณะที่กลุ่ม sham มีขอบเขตของแผลมากที่สุด (รูปที่ 3-16 และ 3-18) นอกจากนี้พบ keratinocytes และ granulation tissue ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  แล้วยังพบ hair follicles, keratinocytes และ sebaceous gland ที่ย้อมติดสีดังกล่าวเช่นกัน (รูปที่ 3-17 และ 3-19)

จากการนับจำนวน hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทั้งกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ของกลุ่ม sham มีจำนวนของน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ (กราฟรูปที่ 3-24 และ 3-25) และยังพบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  มีจำนวนน้อยมาก (รายละเอียดจะได้อธิบายถึงในหน้า 86)

สำหรับความเข้มของการติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-32)



**รูปที่ 3-16** แสดงเนื้อเยื่อผนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  (10x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยลูกครีสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผลและ +ve control = positive control (uterus) (10x)



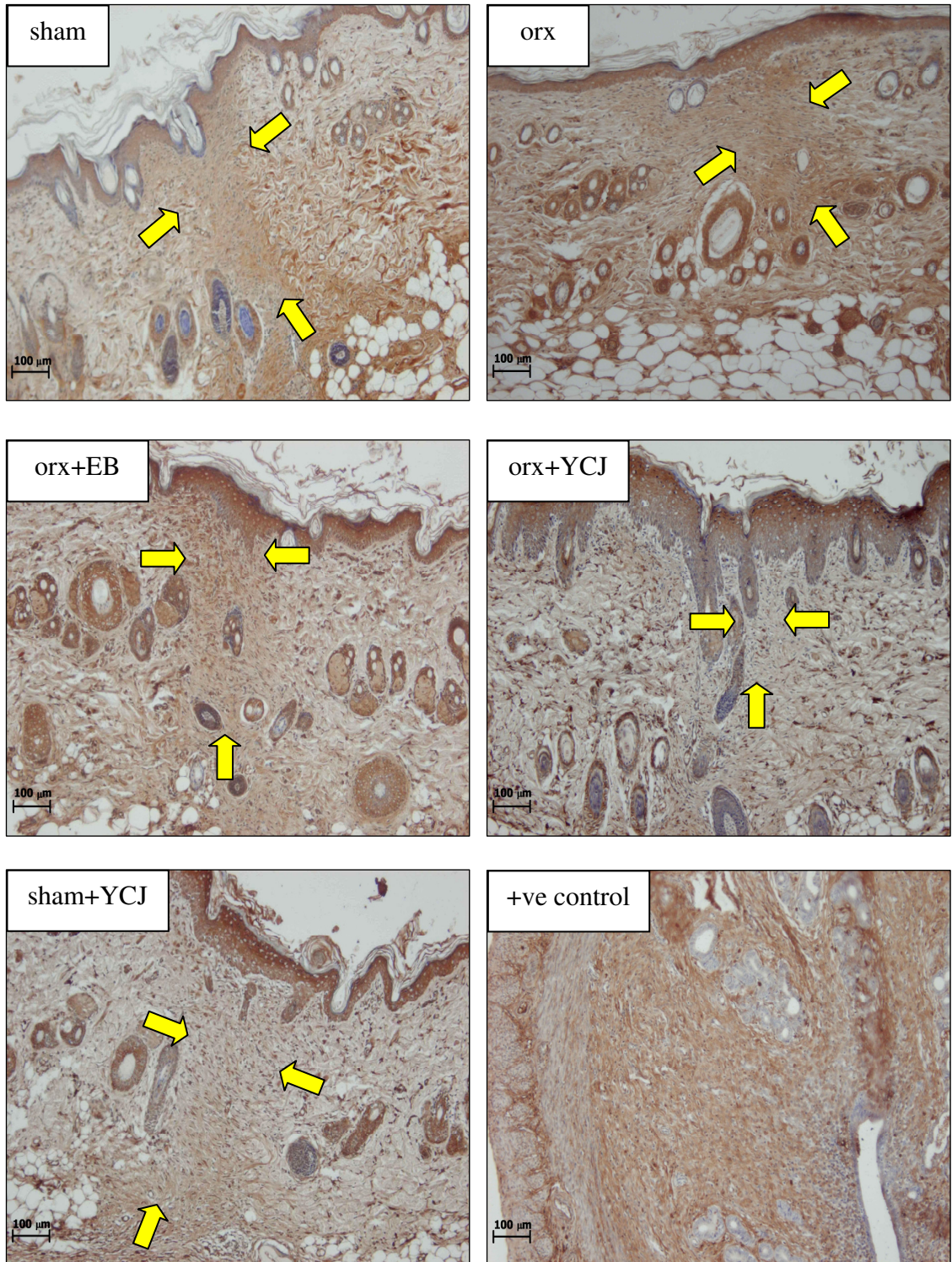
รูปที่ 3-17 แสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 7 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป a แสดงเซลล์ fibroblast (F) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

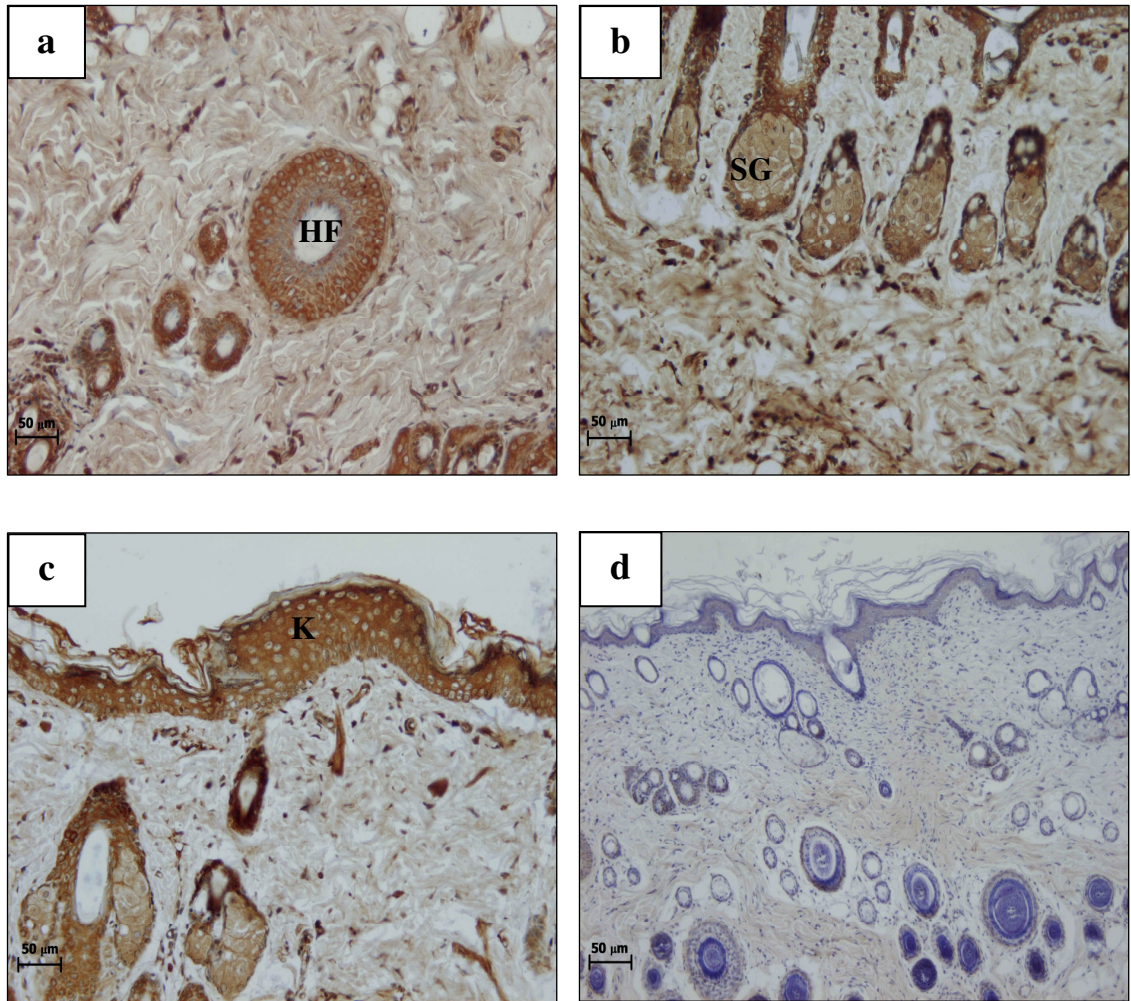
รูป b แสดง hair follicles (HF) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป c แสดง keratinocytes (K) ในชั้น epidermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป d แสดง sebaceous glands (SG) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)



รูปที่ 3-18 แสดงเนื้อเยื่อผนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  (10x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผลและ +ve control = positive control (uterus) (10x)



รูปที่ 3-19 แสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 14 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป a แสดง hair follicles (HF) ในชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป b แสดง sebaceous glands (SG) ในชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป c แสดง keratinocytes (K) ของชั้น epidermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป d แสดง hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x) โดยส่วนใหญ่ติดสี counter stain ของ hematoxylin (สีน้ำเงิน)

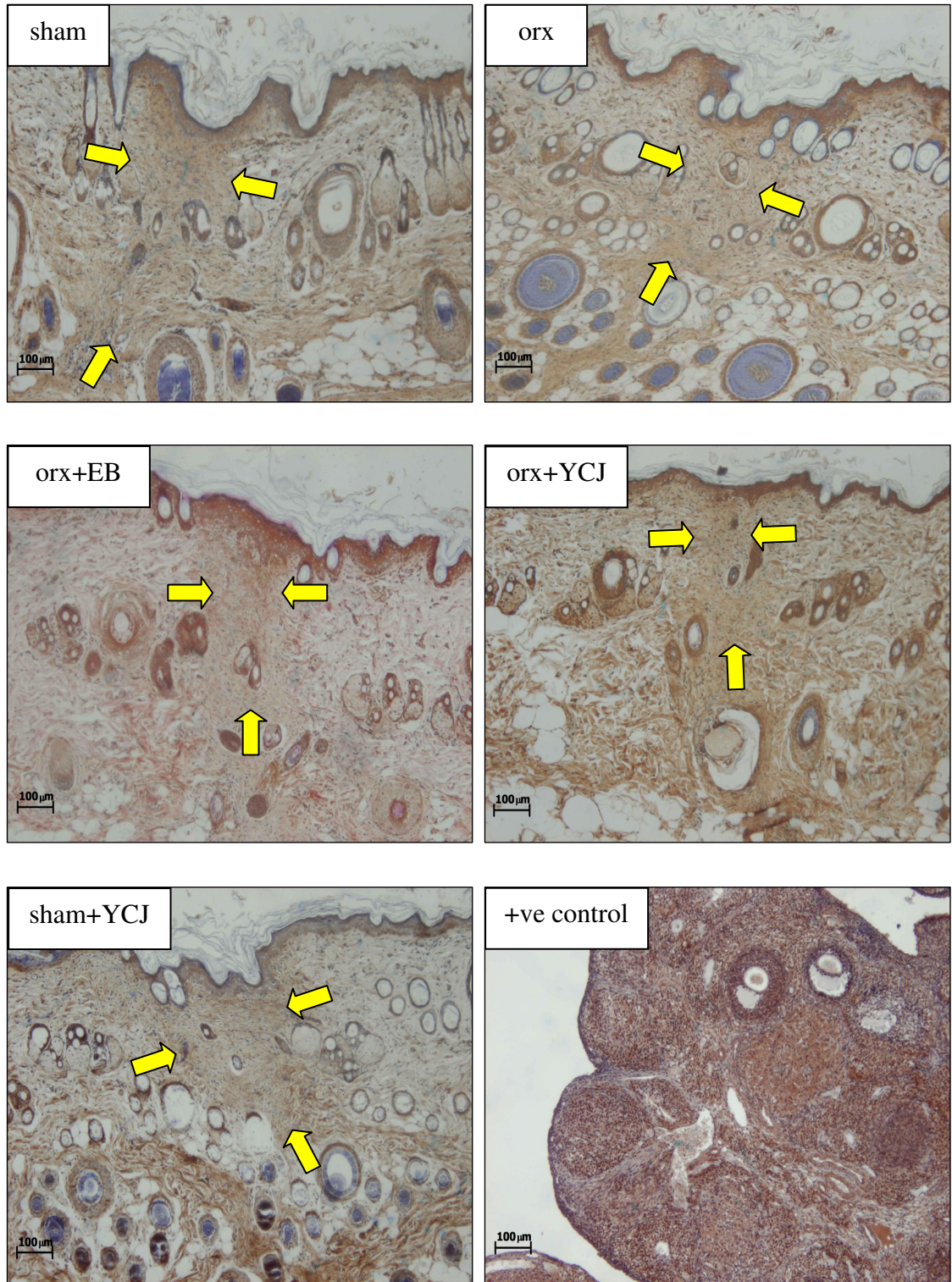
## 2. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\beta$ antibody

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม orx+EB หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes (I $r$ +) หลายชั้นกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างดังกล่าว ในชั้น dermis พบ granulation tissue (I $r$ +) ติดสีน้ำตาล ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้สังเกตเห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม orx+YCJ น้อยที่สุดในขณะที่กลุ่ม sham มีขอบเขตของแผลมากที่สุด (รูปที่ 3-20 และ 3-22) นอกจากเซลล์ keratinocytes และ granulation tissue ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  แล้ว ยังพบ hair follicles, keratinocytes และ sebaceous gland ที่ย้อมติดสีดังกล่าวเช่นกัน (รูปที่ 3-21 และ 3-23)

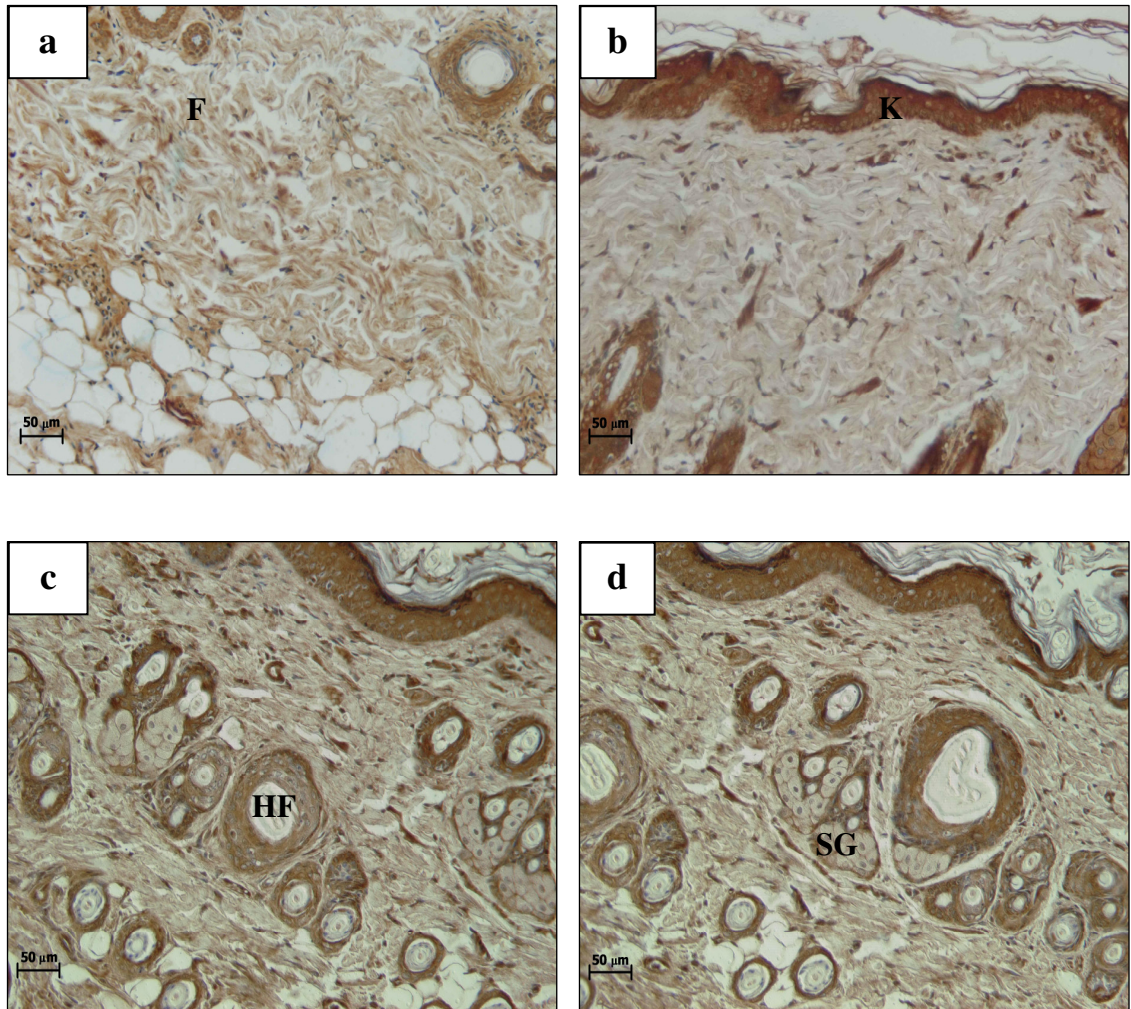
การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ของกลุ่ม sham และกลุ่ม sham+YCJ น้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น ๆ (กราฟรูปที่ 3-26 และ 3-27) และยังพบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  มีจำนวนน้อยมาก (รายละเอียดจะได้กล่าวถึงในหน้า 86)

สำหรับความเข้มของการติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-33)





รูปที่ 3-20 แสดงเนื้อเยื่อผนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERβ (10x) ในกลุ่ม 7 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผลและ +ve control = positive control (ovary) (10x)



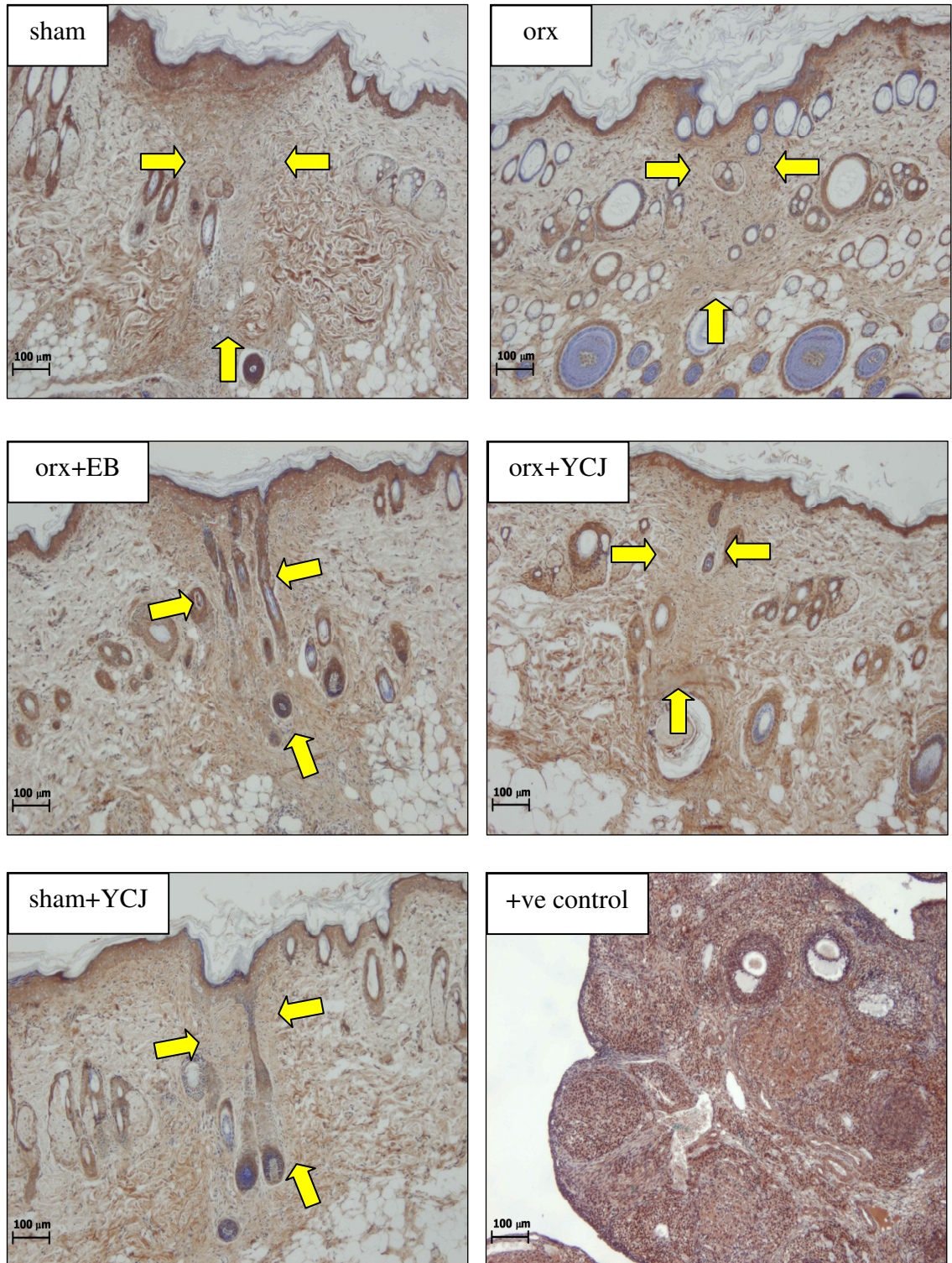
**รูปที่ 3-21** แสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป a แสดงเซลล์ fibroblast (F) ในชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

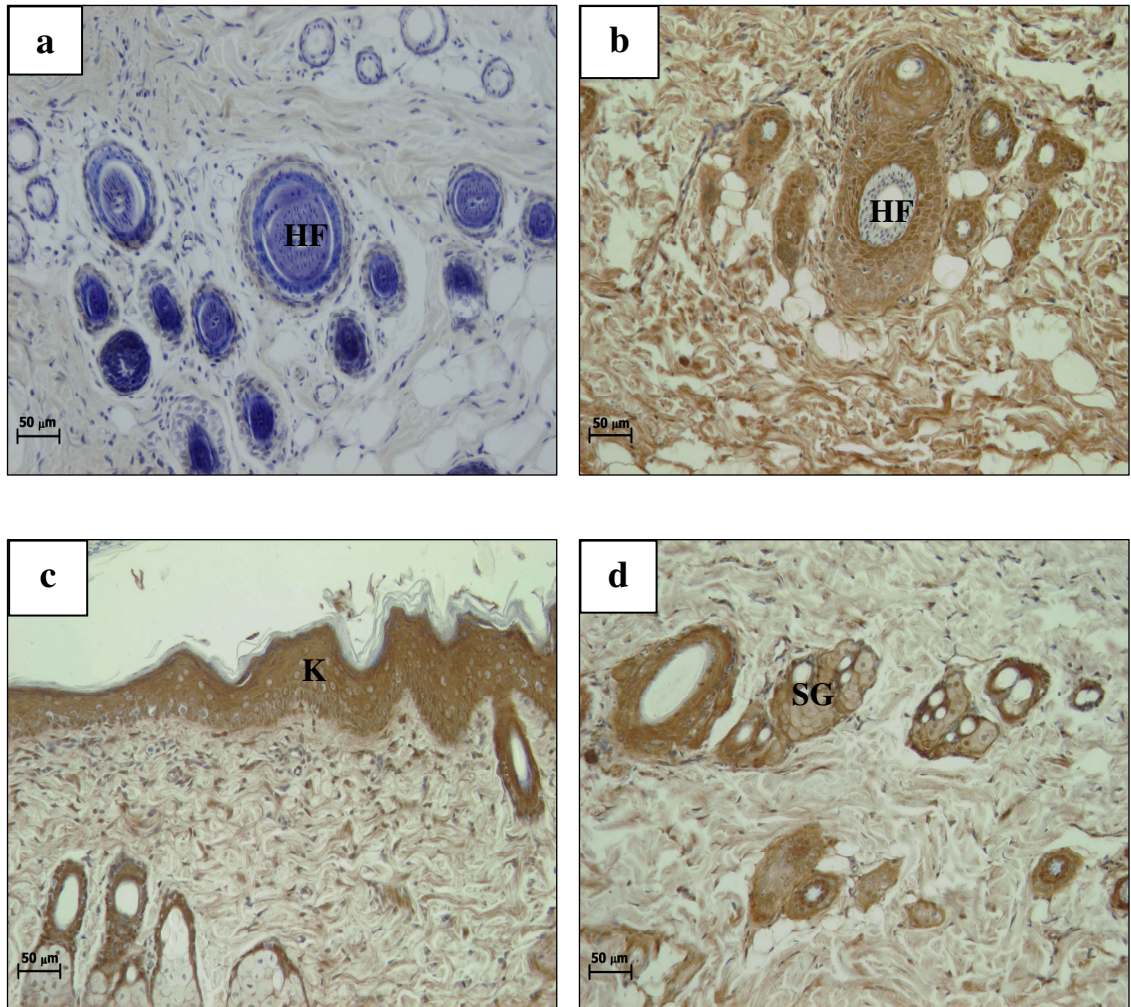
รูป b แสดง keratinocytes (K) ของชั้น epidermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป c แสดง hair follicles (HF) ของชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป d แสดง sebaceous glands (SG) ของชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)



รูปที่ 3-22 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ข้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERβ (10x) ในกลุ่ม 14 วัน โดยลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผลและ +ve control = positive control (ovary) (10x)



**รูปที่ 3-23** แสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป a แสดง hair follicles (HF) ในชั้น dermis ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x) โดยส่วนใหญ่ติดสี counter stain ของ hematoxylin (สีน้ำเงิน)

รูป b แสดง hair follicles (HF) ในชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป c แสดง keratinocytes (K) ของชั้น epidermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

รูป d แสดง sebaceous glands (SG) ของชั้น dermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ (20x)

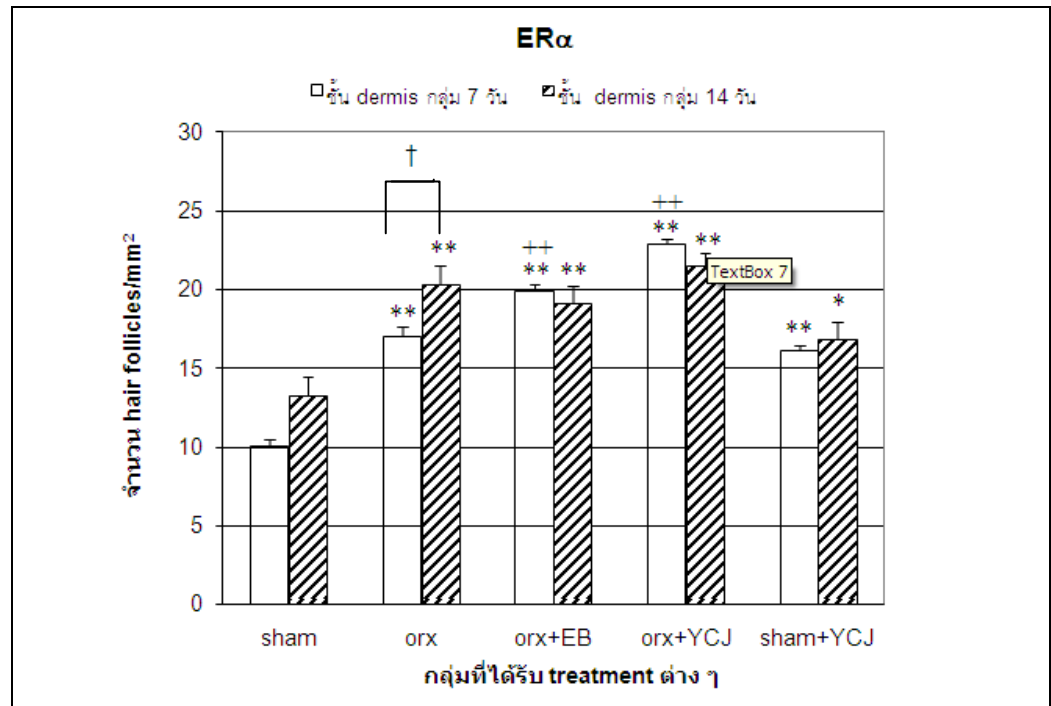
จากการนับจำนวน hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้จะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis ของกลุ่ม 7 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\alpha$  ของกลุ่ม sham (10.00 $\pm$ 0.4) น้อยกว่ากลุ่ม orx (17.03 $\pm$ 0.6) กลุ่ม orx+EB (19.90 $\pm$ 0.4) กลุ่ม orx+YCJ (22.87 $\pm$ 0.3) และกลุ่ม sham+YCJ (16.10 $\pm$ 0.3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่าจำนวน hair follicles กลุ่ม orx น้อยกว่ากลุ่ม orx+EB และกลุ่ม orx+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-24) เช่นเดียวกับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis ของกลุ่ม 14 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\alpha$  ของกลุ่ม sham (13.23 $\pm$ 1.2) น้อยกว่ากลุ่ม orx (20.37 $\pm$ 1.1) กลุ่ม orx+EB (19.13 $\pm$ 1.1) และกลุ่ม orx+YCJ (21.53 $\pm$ 0.8) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และน้อยกว่ากลุ่ม sham+YCJ (16.87 $\pm$ 1.1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-24)

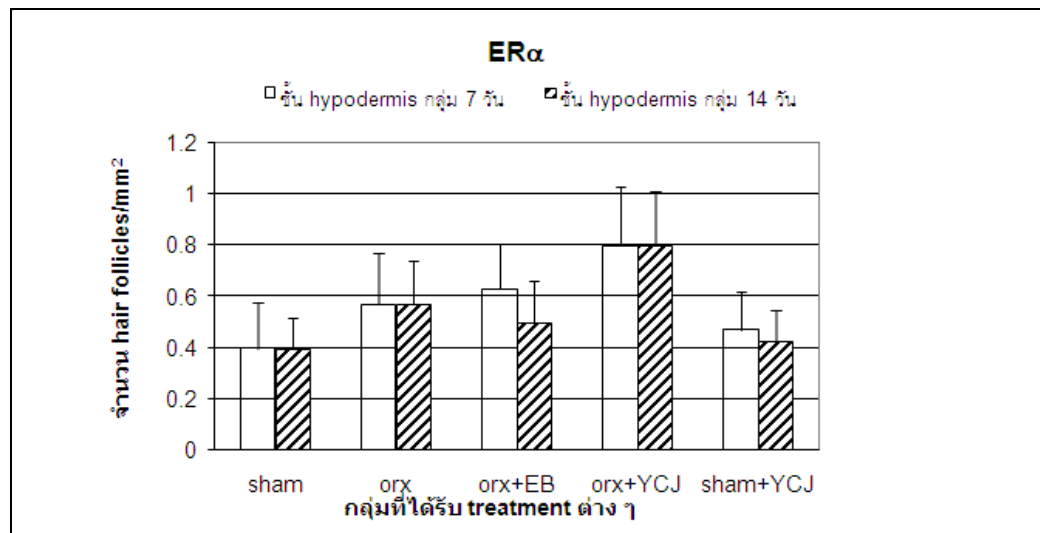
การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น dermis 7 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\beta$  ของกลุ่ม sham (11.43 $\pm$ 0.4) น้อยกว่ากลุ่ม orx (19.80 $\pm$ 0.4) กลุ่ม orx+EB (18.47 $\pm$ 0.7) และกลุ่ม orx+YCJ (21.60 $\pm$ 0.4) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่าจำนวน hair follicles กลุ่ม orx น้อยกว่ากลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ (11.43 $\pm$ 0.3) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-26) เช่นเดียวกับในกลุ่มที่ติดสีย้อม ER $\beta$  ในชั้น dermis ของกลุ่ม 14 วัน พบว่าจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมต่อ ER $\beta$  ของกลุ่ม sham (15.47 $\pm$ 1.3) น้อยกว่ากลุ่ม orx (23.93 $\pm$ 2.6) และกลุ่ม orx+YCJ (21.83 $\pm$ 1.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และ ( $p < 0.01$ ) ตามลำดับ (กราฟรูปที่ 3-26)

สำหรับการนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในชั้น hypodermis ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-25 และ 3-27)

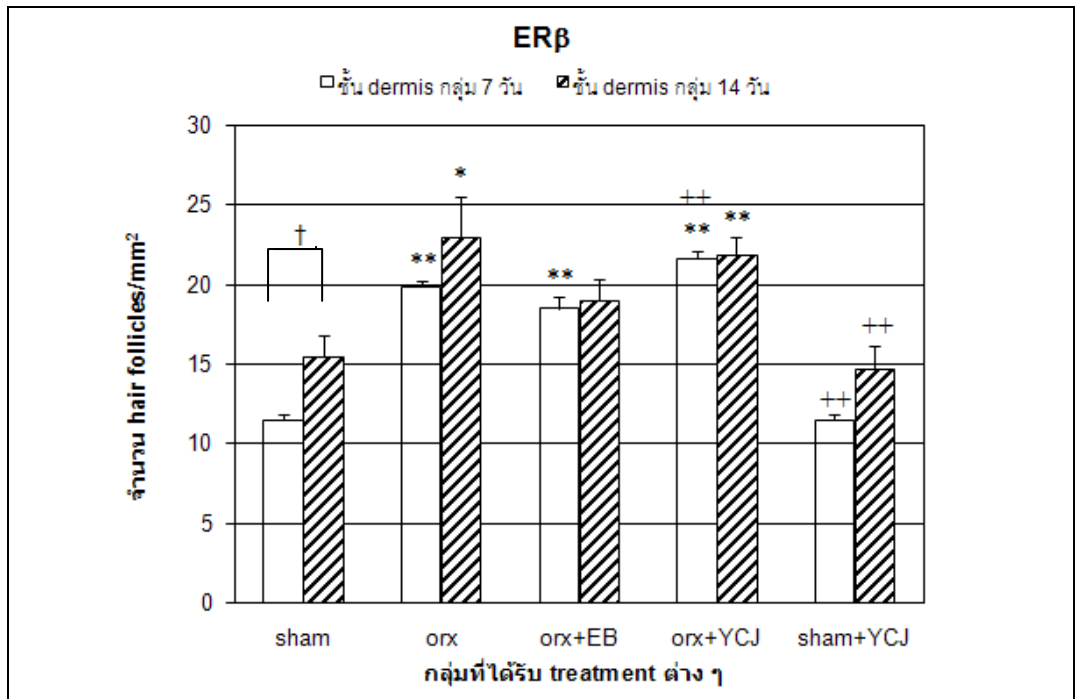
เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันพบว่าจำนวน hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis ของกลุ่ม orx มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-25) สำหรับจำนวน hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น dermis พบว่าจำนวน hair follicles ของกลุ่ม sham มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-24)



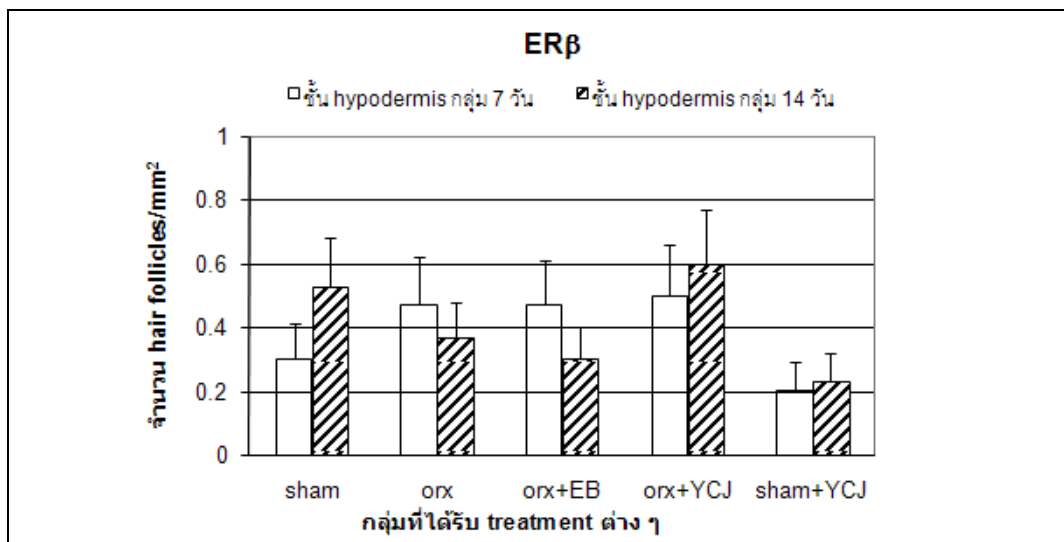
รูปที่ 3-24 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ในชั้น dermis ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\alpha$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน



รูปที่ 3-25 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ในชั้น hypodermis ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\alpha$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน



รูปที่ 3-26 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ในชั้น dermis ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\beta$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน



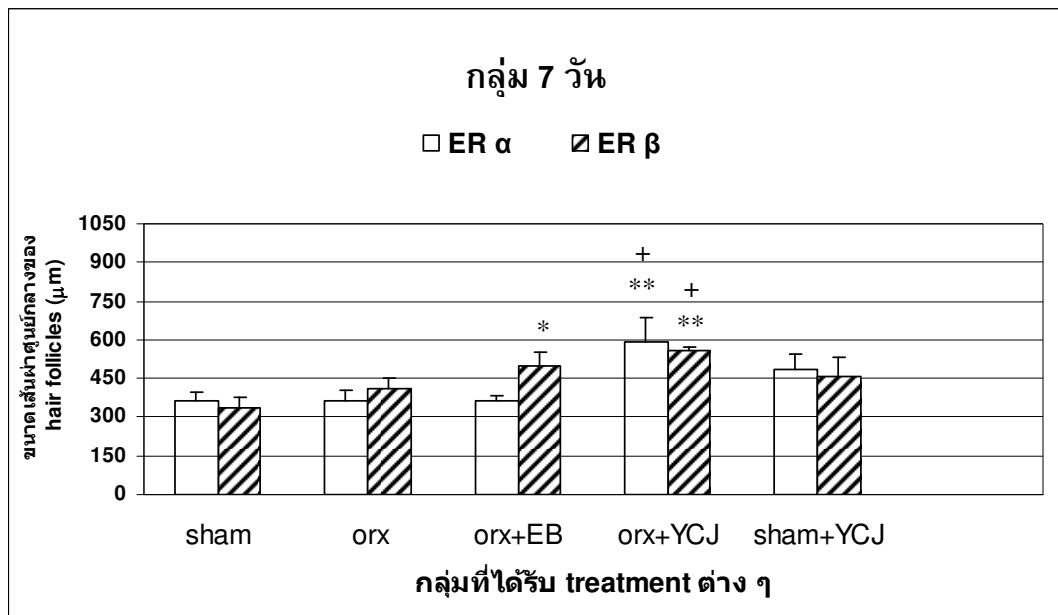
รูปที่ 3-27 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ในชั้น hypodermis ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์ต่อ ER $\beta$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน เพื่อสังเกตการติดสีย้อม ER $\alpha$  และ ER $\beta$  พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles จะแตกต่างกันในกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดดังนี้

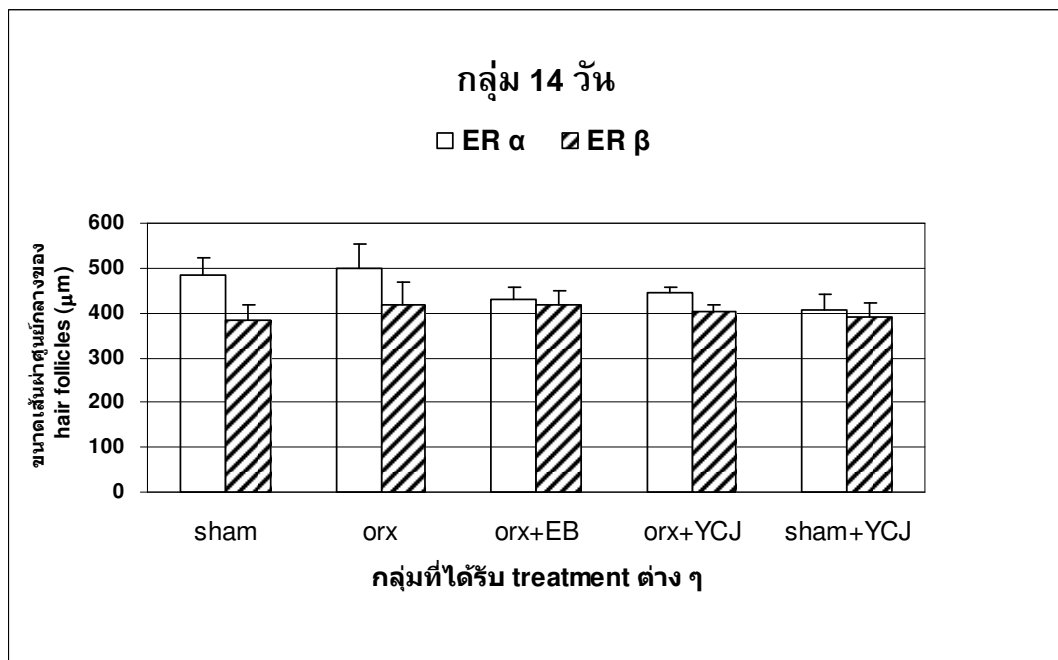
ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ในกลุ่ม orx+YJC มีขนาดใหญ่กว่ากลุ่มอื่น ๆ โดยในกลุ่ม 7 วัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  ของกลุ่ม sham (363.07 $\pm$ 35.2) และกลุ่ม orx+EB มีขนาดเล็กกว่ากลุ่ม orx+YJC (594.58 $\pm$ 93.8) (361.42 $\pm$ 23.2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และกลุ่ม orx (362.23 $\pm$ 42.7) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่ากลุ่ม orx+YJC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-28) แต่ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ sham (482.33 $\pm$ 39.6) กลุ่ม orx (499.48 $\pm$ 52.8) กลุ่ม orx+EB (429.32 $\pm$ 28.3) กลุ่ม orx+YJC (444.80 $\pm$ 13.8) และกลุ่ม sham+YJC (405.00 $\pm$ 35.7) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-29) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม sham กลุ่ม orx กลุ่ม orx+EB และกลุ่ม sham+YJC พบความแตกต่างดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่ม orx+YJC ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-30)

สำหรับการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ติดสีย้อม ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน ของกลุ่ม sham (339.17 $\pm$ 35.6) มีขนาดเล็กกว่ากลุ่ม orx+EB (499.97 $\pm$ 50.8) และกลุ่ม orx+YJC (556.95 $\pm$ 12.0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และ ( $p < 0.01$ ) ตามลำดับ นอกจากนี้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ sham (382.15 $\pm$ 37.8) กลุ่ม orx (416.45 $\pm$ 53.8) กลุ่ม orx+EB (418.52 $\pm$ 31.0) กลุ่ม orx+YJC (401.00 $\pm$ 16.9) และกลุ่ม sham+YJC (389.73 $\pm$ 31.4) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (กราฟรูปที่ 3-29) และไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน ของ treatment เดียวกันในกลุ่ม sham กลุ่ม orx กลุ่ม orx+EB และกลุ่ม sham+YJC พบความแตกต่างดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในกลุ่ม orx+YJC ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-31)

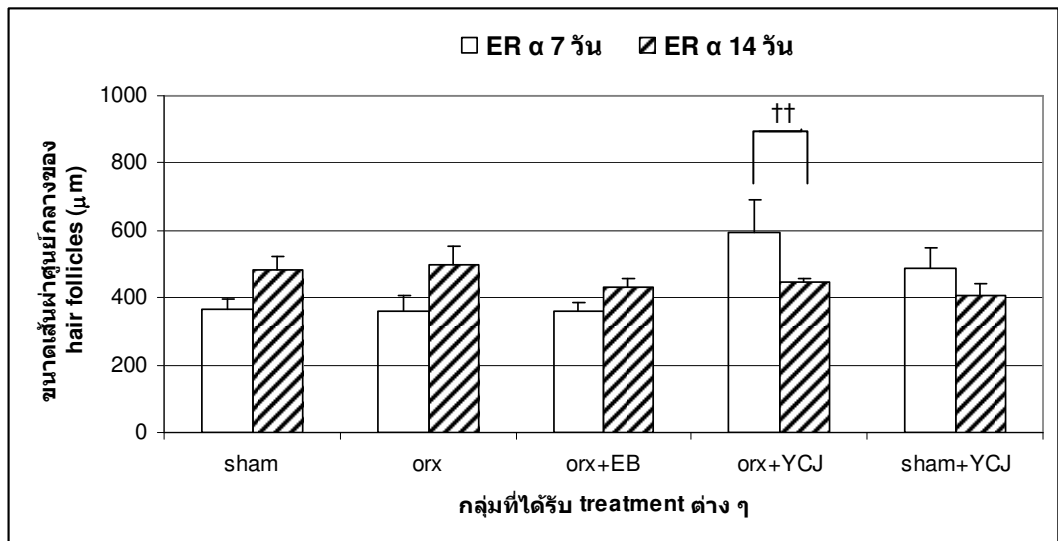




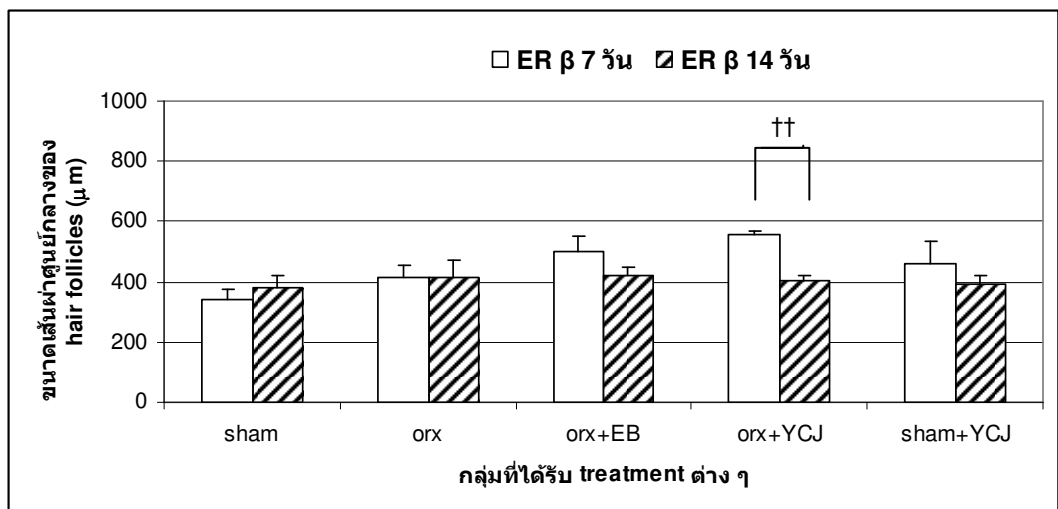
**รูปที่ 3-28** กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติใน กลุ่ม 7 วัน ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$



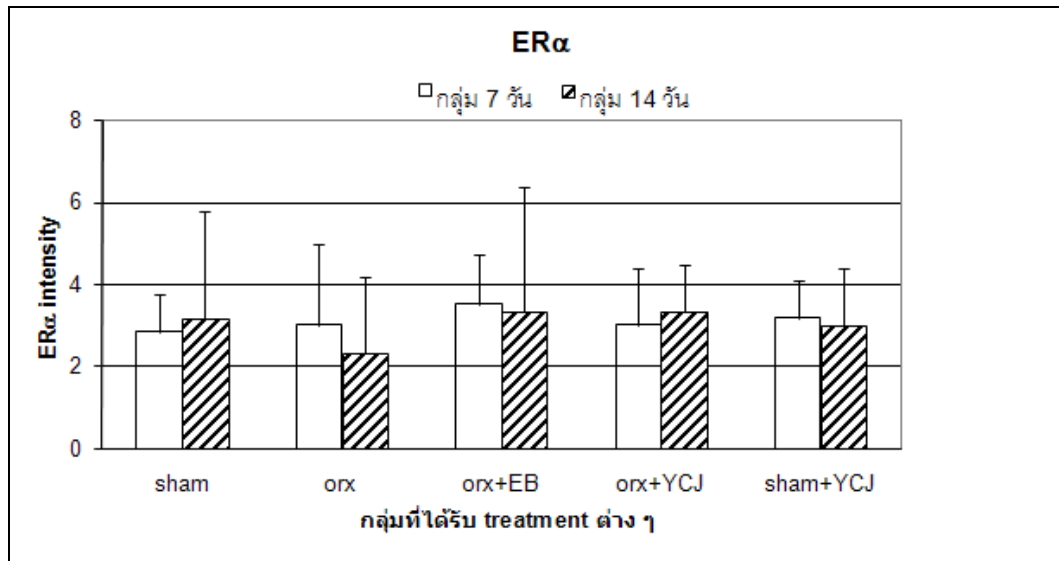
**รูปที่ 3-29** กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติใน กลุ่ม 14 วัน ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$



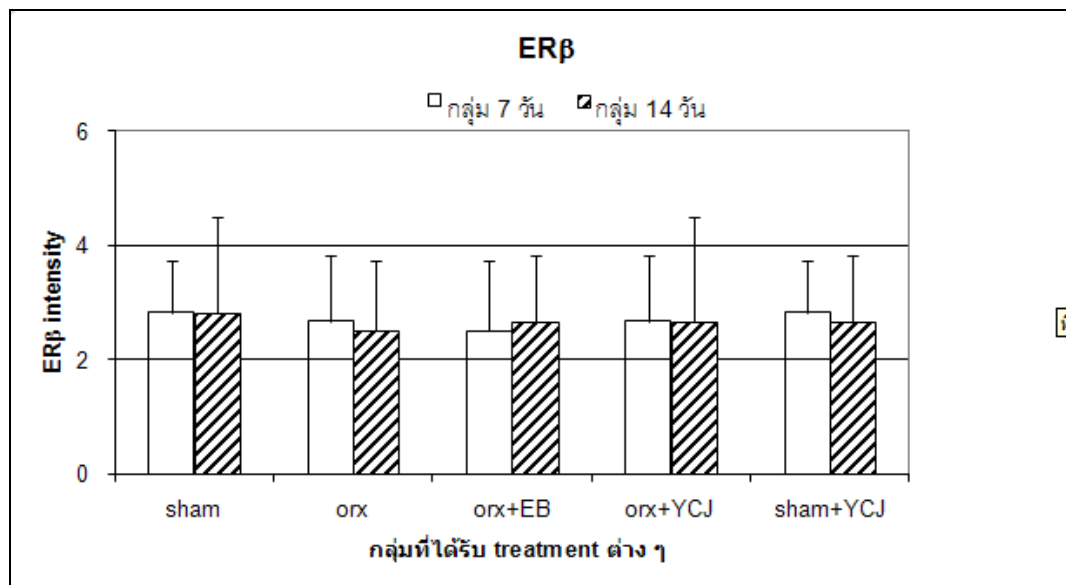
รูปที่ 3-30 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$



รูปที่ 3-31 กราฟแสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ( $\mu\text{m}$ ) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$

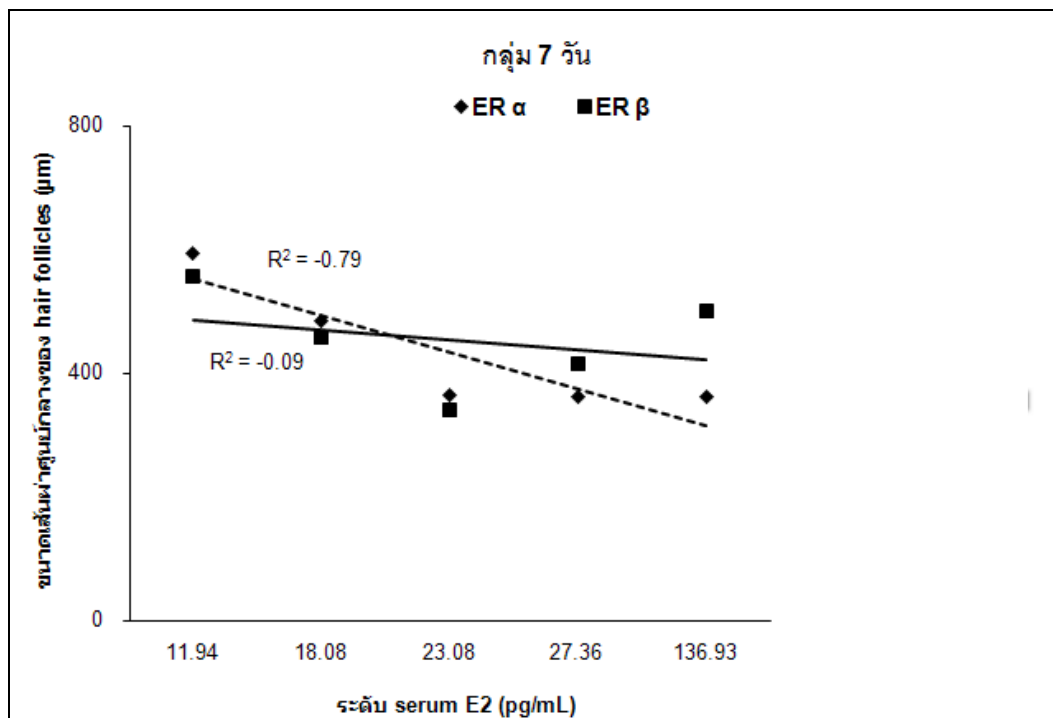


**รูปที่ 3-32** กราฟแสดงความเข้มของการติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน โดย 5 = ความเข้มของการติดสีย้อม ER $\alpha$  มากที่สุด และ 1 = ความเข้มของการติดสีย้อม ER $\alpha$  น้อยที่สุด



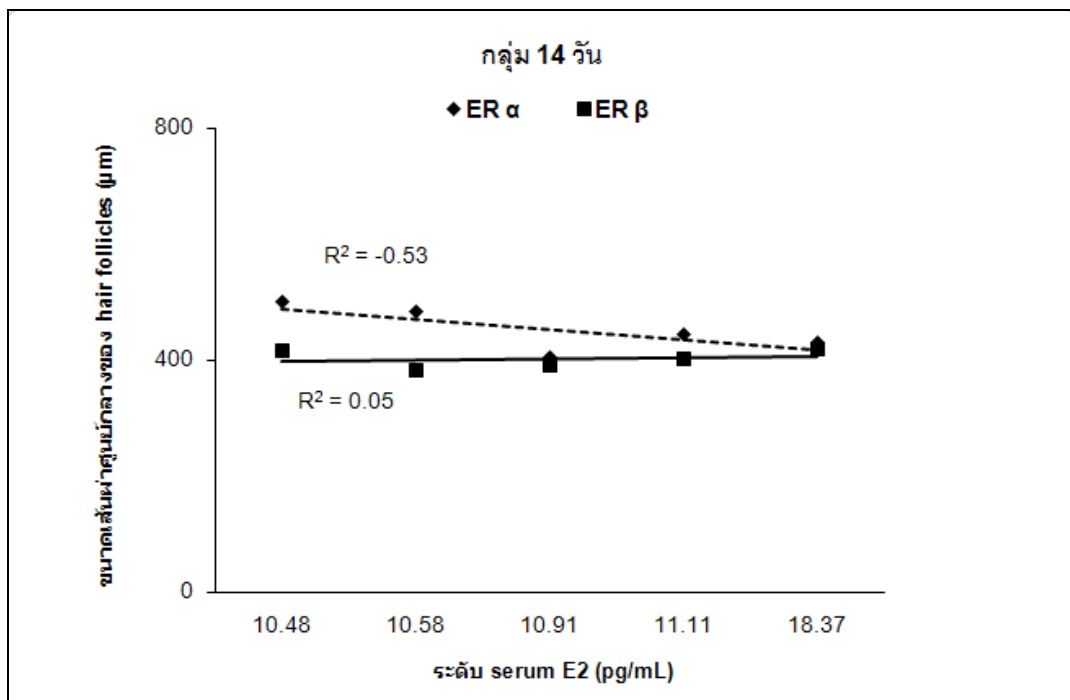
**รูปที่ 3-33** กราฟแสดงความเข้มของการติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน โดย 5 = ความเข้มของการติดสีย้อม ER $\beta$  มากที่สุด และ 1 = ความเข้มของการติดสีย้อม ER $\beta$  น้อยที่สุด

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.79$ ) เช่นเดียวกันกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.09$ ) (กราฟรูปที่ 3-34)



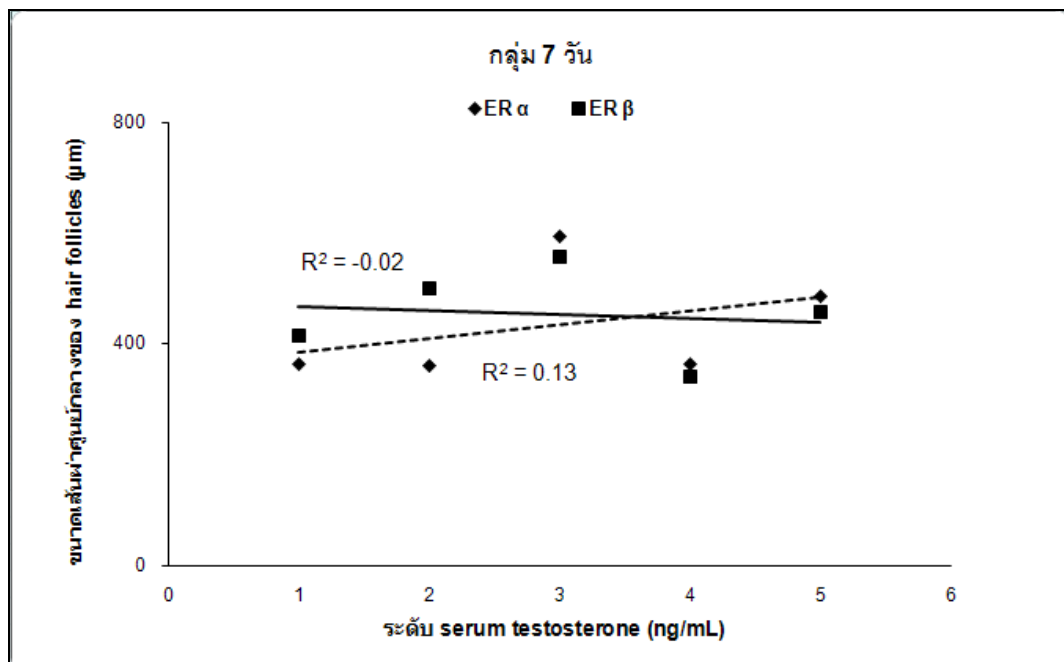
รูปที่ 3-34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.53$ ) ในขณะที่ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ามีความสัมพันธ์แบบตามกันโดยเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวเพิ่มขึ้น ( $R^2 = 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-35)



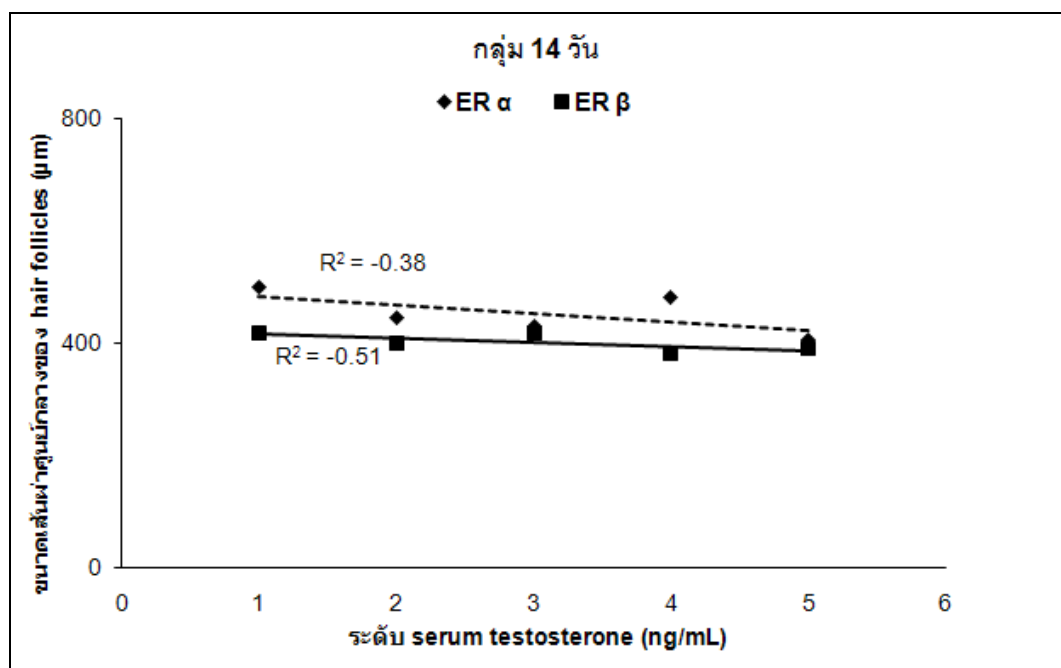
รูปที่ 3-35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวใหญ่ขึ้น โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตามกัน ( $R^2 = 0.13$ ) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.02$ ) (กราฟรูปที่ 3-36)



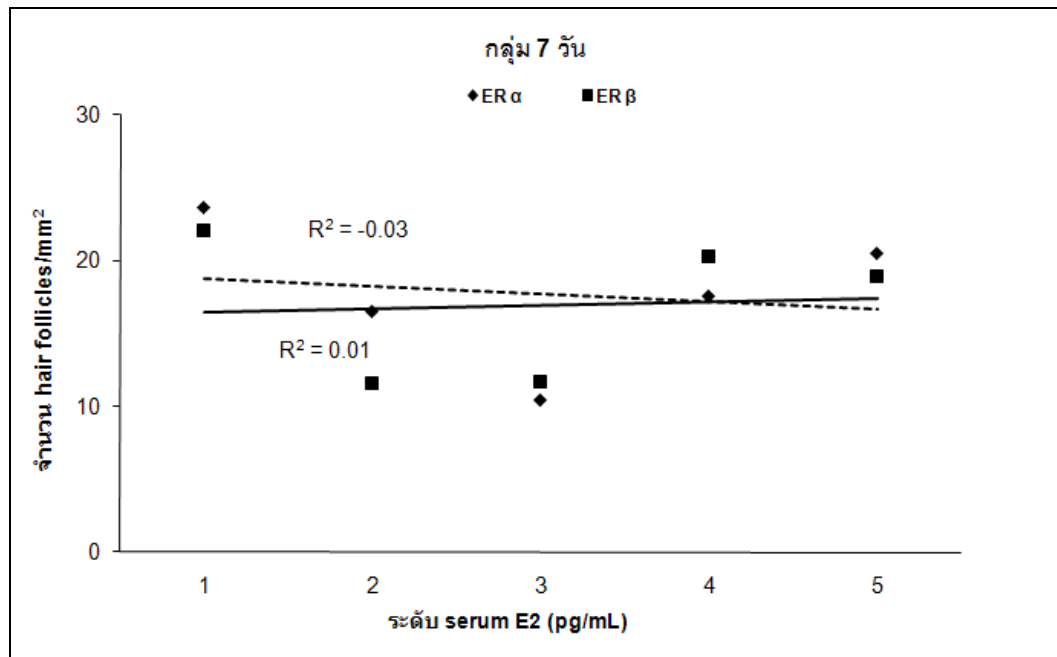
รูปที่ 3-36 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.38$ ) เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 14 วัน มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกันโดยเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.51$ ) เช่นกัน (กราฟรูปที่ 3-37)



รูปที่ 3-37 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน

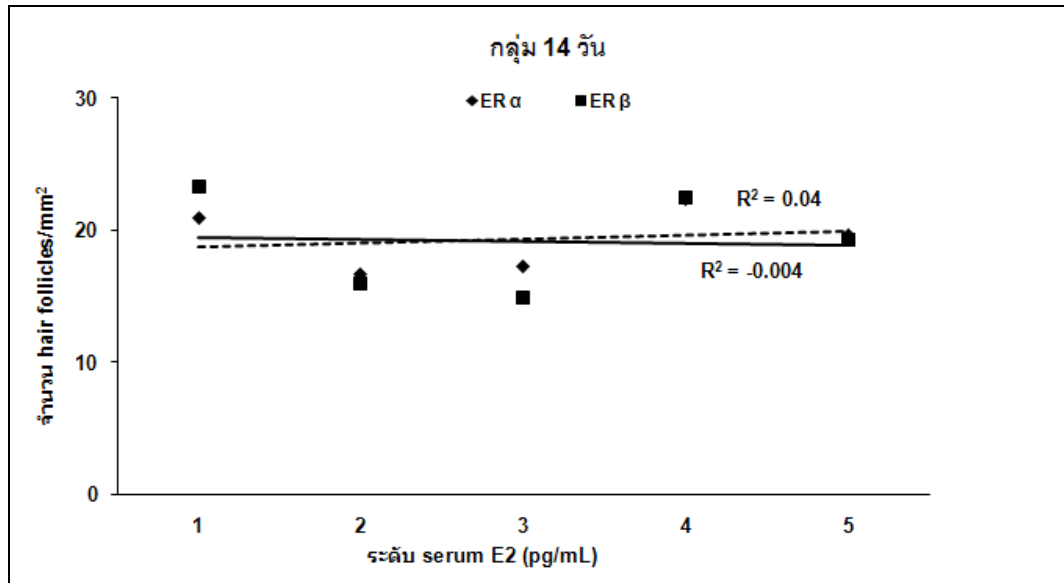
การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.03$ ) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวเพิ่มขึ้น ( $R^2 = 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-38)



รูปที่ 3-38 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน

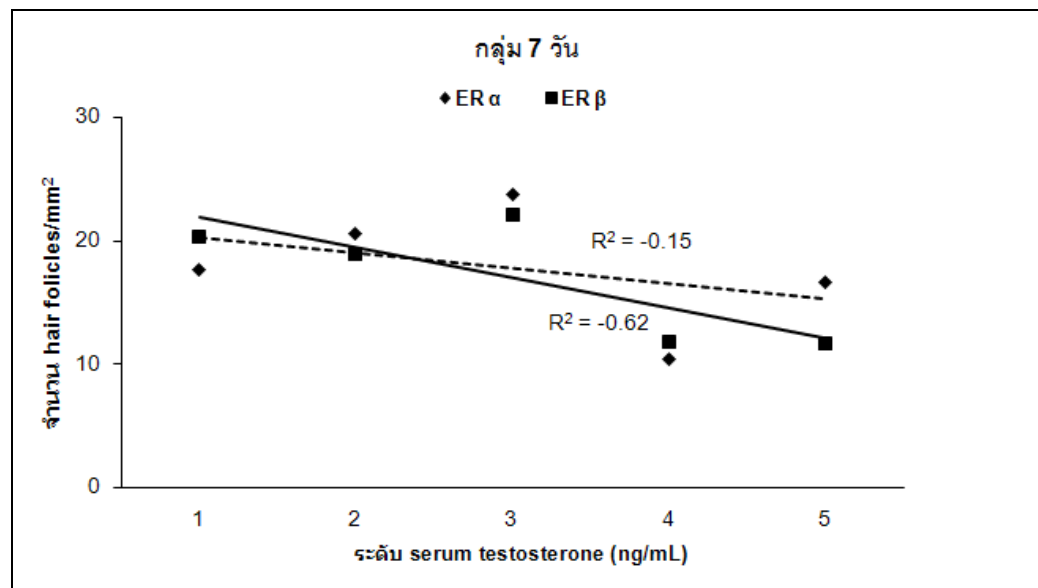


การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวเพิ่มขึ้น โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผันตาม ( $R^2 = 0.04$ ) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum E2 สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.004$ ) (กราฟรูปที่ 3-39)



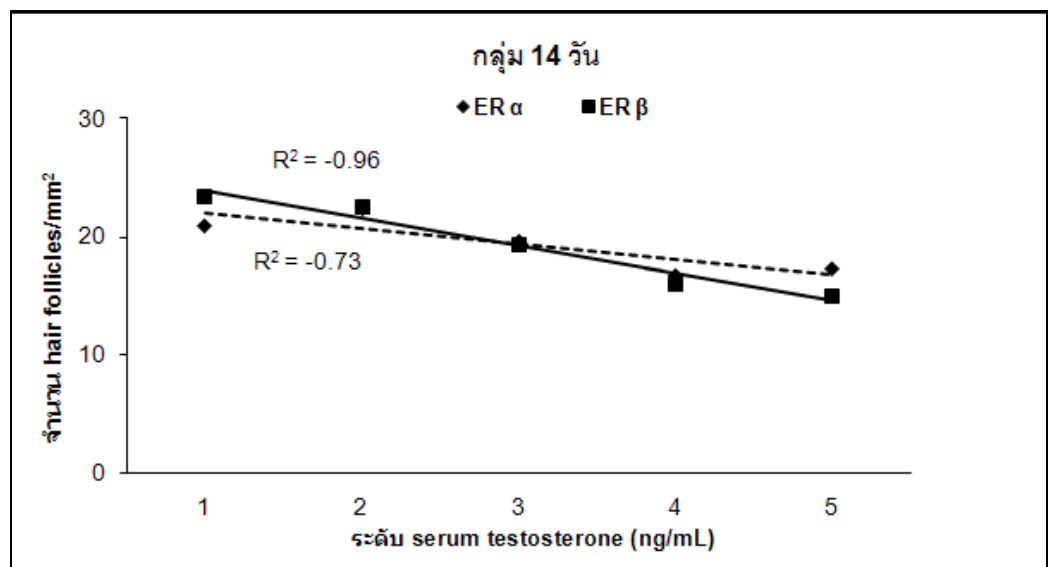
รูปที่ 3-39 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน

การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.15$ ) เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 7 วัน มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกันโดยเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.62$ ) เช่นกัน (กราฟรูปที่ 3-40)



รูปที่ 3-40 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน

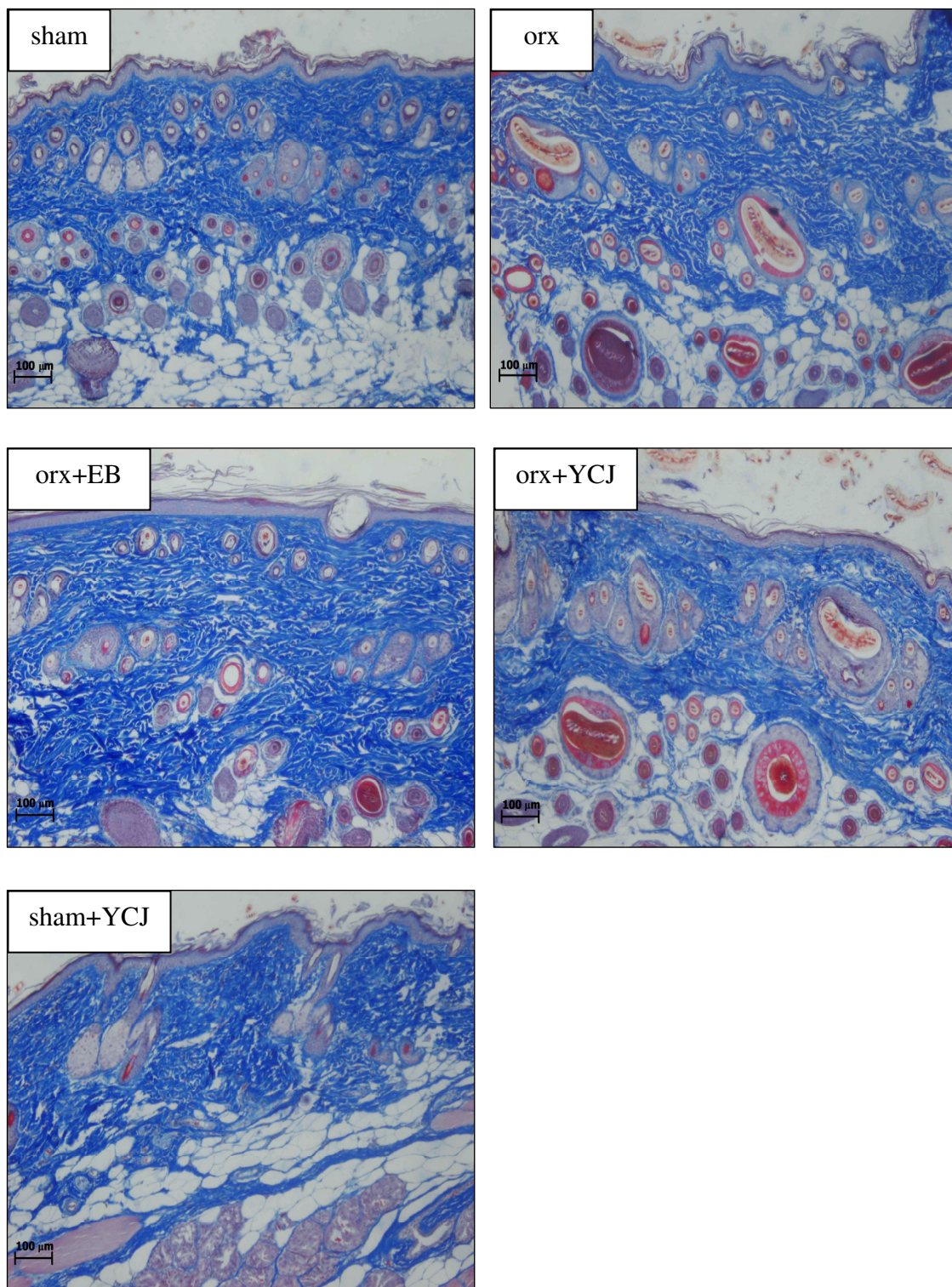
การทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 14 วัน พบว่าเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง โดยมีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกัน ( $R^2 = -0.96$ ) เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\beta$  กับระดับ serum testosterone ในกลุ่ม 14 วัน มีความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกันโดยเมื่อระดับ serum testosterone สูงขึ้น จำนวนของ hair follicles ดังกล่าวลดลง ( $R^2 = -0.73$ ) เช่นกัน (กราฟรูปที่ 3-41)



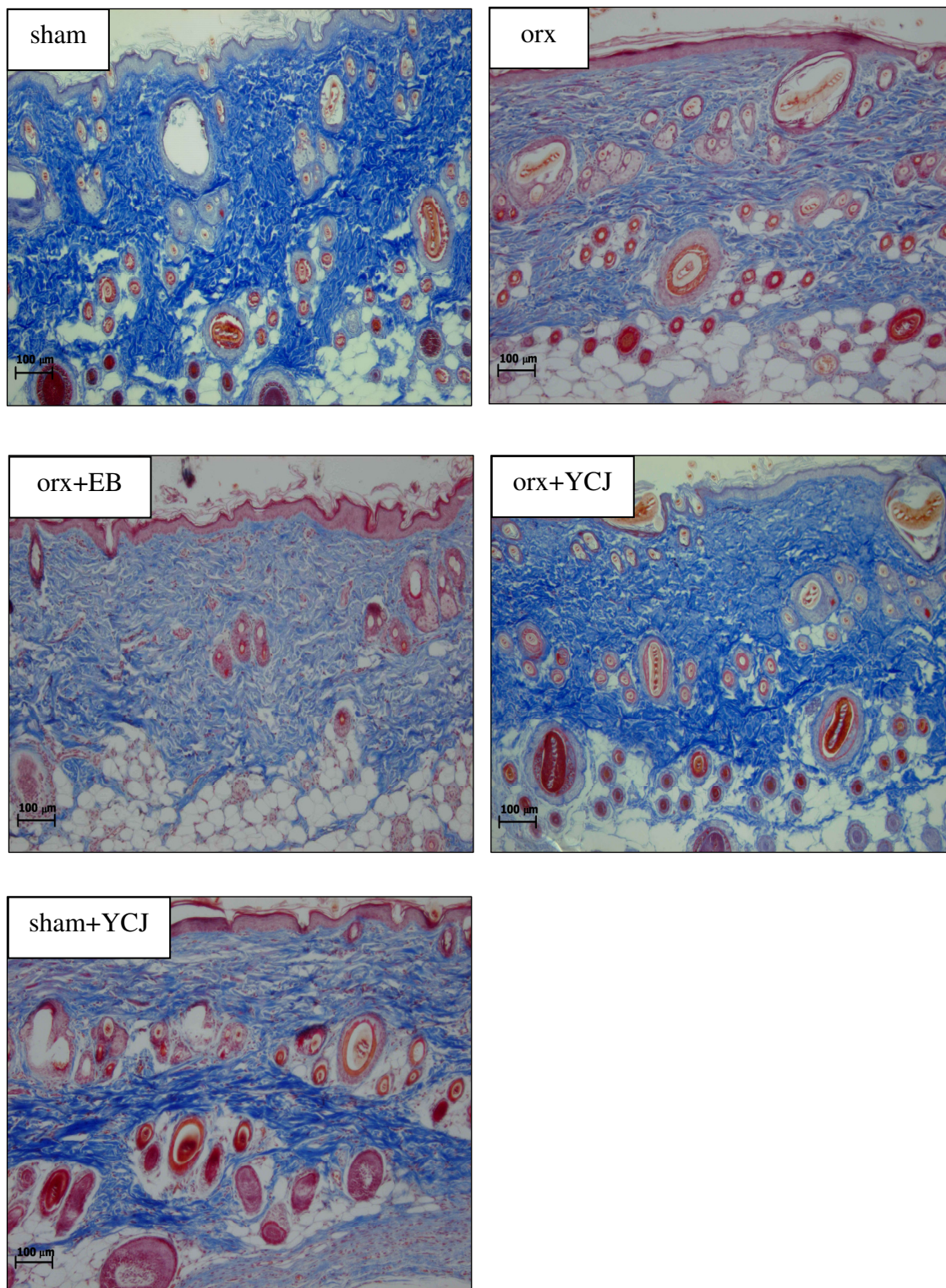
รูปที่ 3-41 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน

- ค. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณแผลที่ย้อมด้วย Masson's trichrome ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าคอลลาเจนมีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบในทุกกลุ่มการทดลอง ส่วนการเรียงตัวของคอลลาเจนในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx+YCJ มีการเรียงตัวของคอลลาเจนที่หนาแน่นและเป็นระเบียบกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (รูปที่ 3-42 และ 3-43)



รูปที่ 3-42 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมด้วย Masson's trichrome (10x) ในกลุ่ม 7 วัน

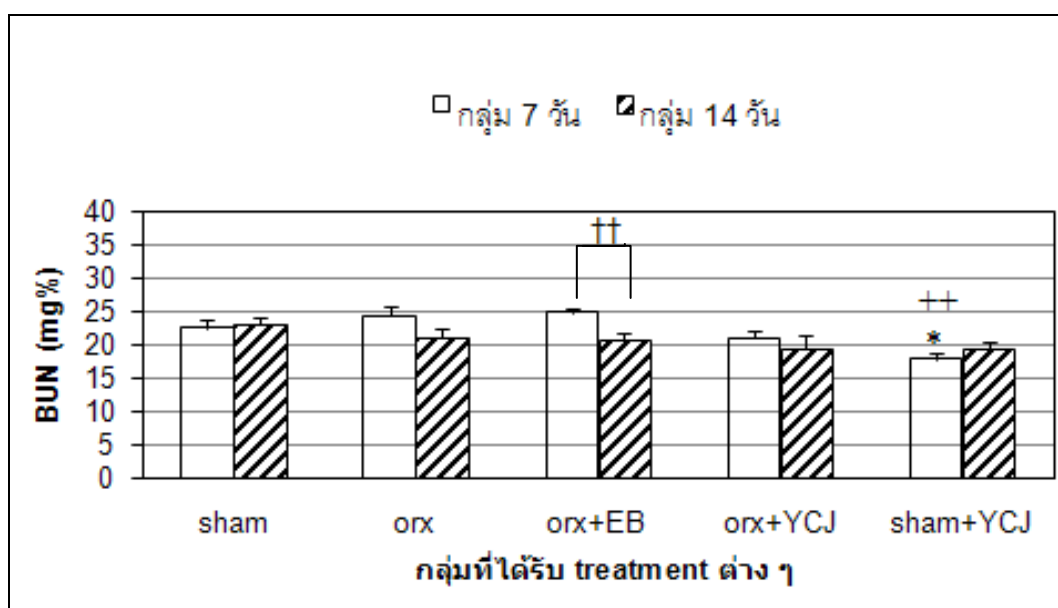


รูปที่ 3-43 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมด้วย Masson's trichrome (10x) ในกลุ่ม 14 วัน

### 3. ค่าทางเคมีคลินิกต่าง ๆ ในซีรัมของเลือดหนู

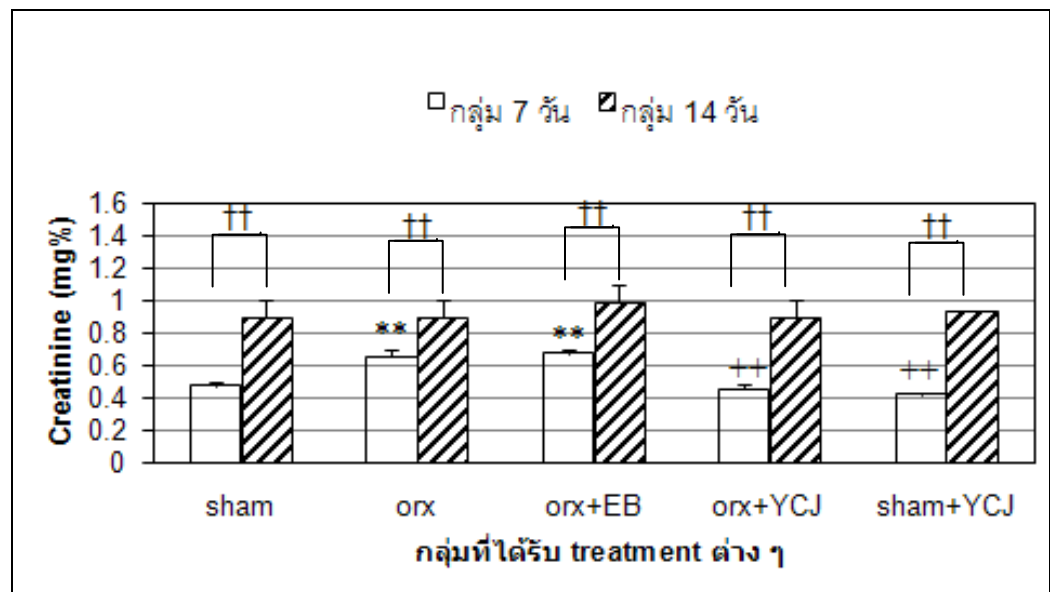
#### 3.1 การวิเคราะห์ค่า BUN (mg%) และ creatinine (mg%) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า BUN ในซีรัมของเลือดหนูกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $22.50 \pm 1.3$ ) มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $17.83 \pm 1.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และพบว่ากลุ่ม orx ( $24.33 \pm 1.2$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $24.67 \pm 0.8$ ) มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า BUN ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $22.90 \pm 1.2$ ) กลุ่ม orx ( $21.10 \pm 1.1$ ) กลุ่ม orx+EB ( $20.70 \pm 1.1$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $18.50 \pm 2.1$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $19.27 \pm 1.1$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า BUN ของกลุ่ม orx+EB มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-44)



รูปที่ 3-44 กราฟแสดงค่า BUN (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine ในซีรัมของเลือดหนูด้วยวิธีทางเคมีคลินิกในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $0.47 \pm 0.0$ ) มีค่า creatinine ต่ำกว่ากลุ่ม orx ( $0.65 \pm 0.0$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $0.67 \pm 0.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีค่า creatinine สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $0.45 \pm 0.0$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $0.42 \pm 0.0$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $0.90 \pm 0.1$ ) กลุ่ม orx ( $0.90 \pm 0.1$ ) กลุ่ม orx+EB ( $0.99 \pm 0.1$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $0.90 \pm 0.1$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $0.94 \pm 0.0$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า creatinine ของทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-45)

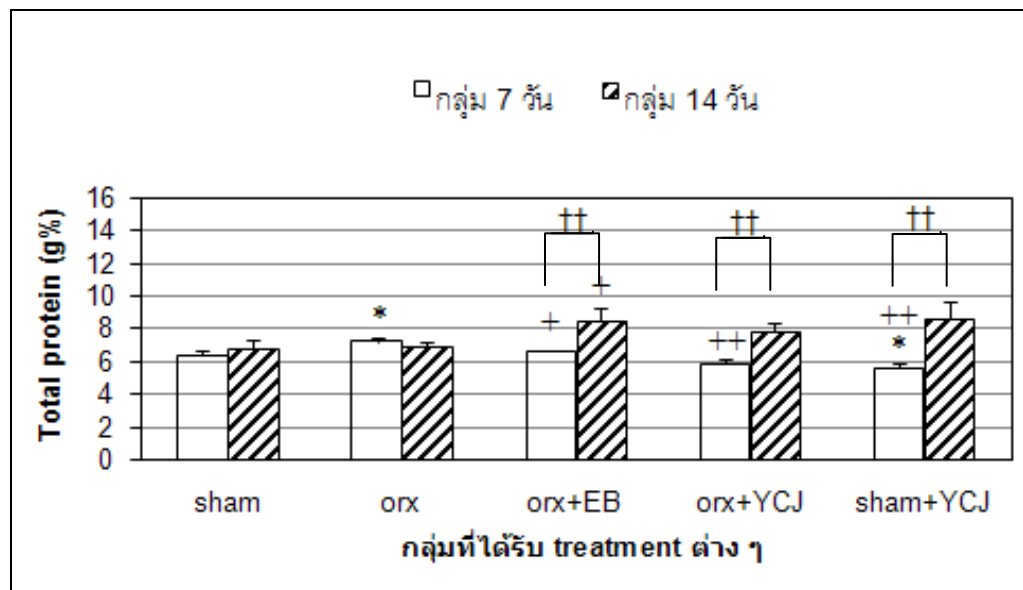


รูปที่ 3-45 กราฟแสดงค่า creatinine (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน



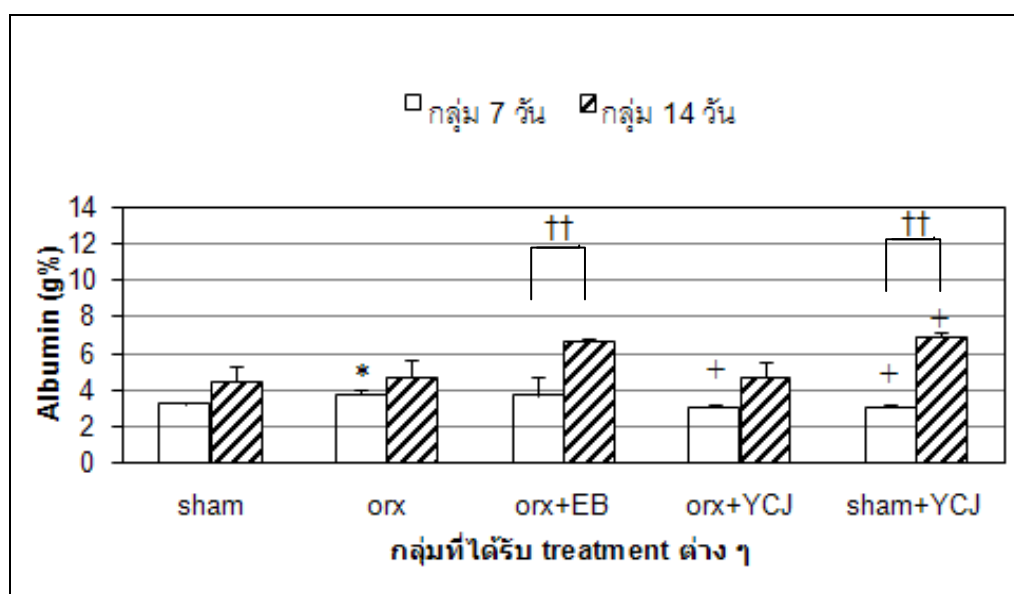
### 3.2 การวิเคราะห์ค่า total protein (g%) albumin (g%) AST (U/L) ALT (U/L) และ ALP (U/L) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า total protein ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $6.37 \pm 0.2$ ) มีค่า total protein ต่ำกว่ากลุ่ม orx ( $7.20 \pm 0.2$ ) แต่สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $5.58 \pm 0.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และพบว่ากลุ่ม orx มีค่า total protein สูงกว่ากลุ่ม orx+EB ( $6.60 \pm 0.1$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และสูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $5.85 \pm 0.2$ ) และกลุ่ม sham+YCJ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า total protein ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $6.90 \pm 0.2$ ) มีค่า total protein ต่ำกว่ากลุ่ม orx+EB ( $8.47 \pm 0.7$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $8.60 \pm 1.1$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า total protein ของกลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-46)



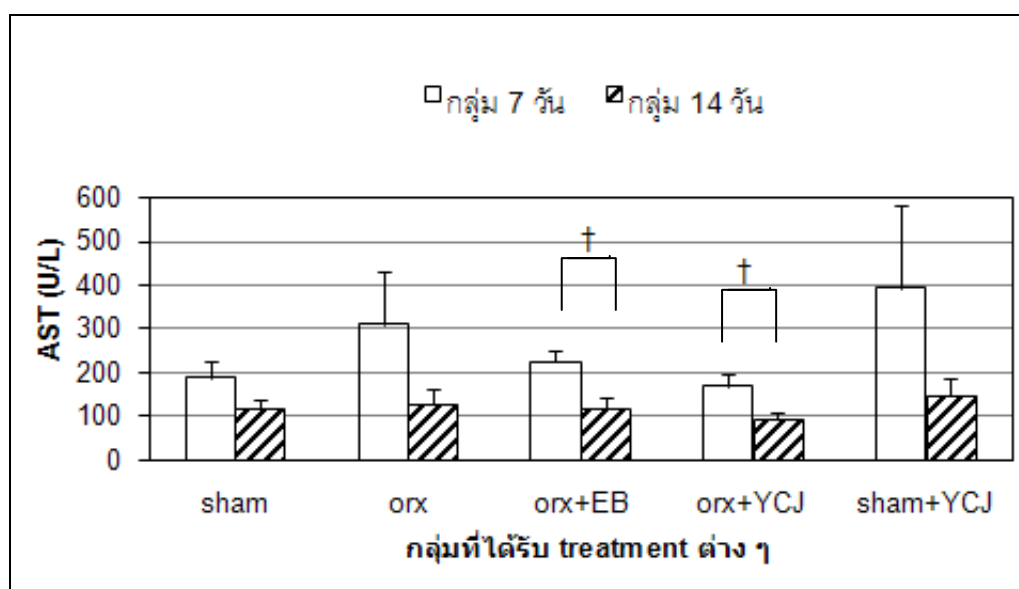
รูปที่ 3-46 กราฟแสดงค่า total protein (g%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า albumin ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $3.20 \pm 0.1$ ) มีค่า albumin ต่ำกว่ากลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และพบว่ากลุ่ม orx ( $3.72 \pm 0.2$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $3.62 \pm 1.1$ ) มีค่า albumin สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $3.00 \pm 0.2$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $3.00 \pm 0.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า albumin ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $4.50 \pm 0.9$ ) มีค่า albumin ต่ำกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $6.90 \pm 0.2$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า albumin ของกลุ่ม orx+EB และกลุ่ม sham+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-47)



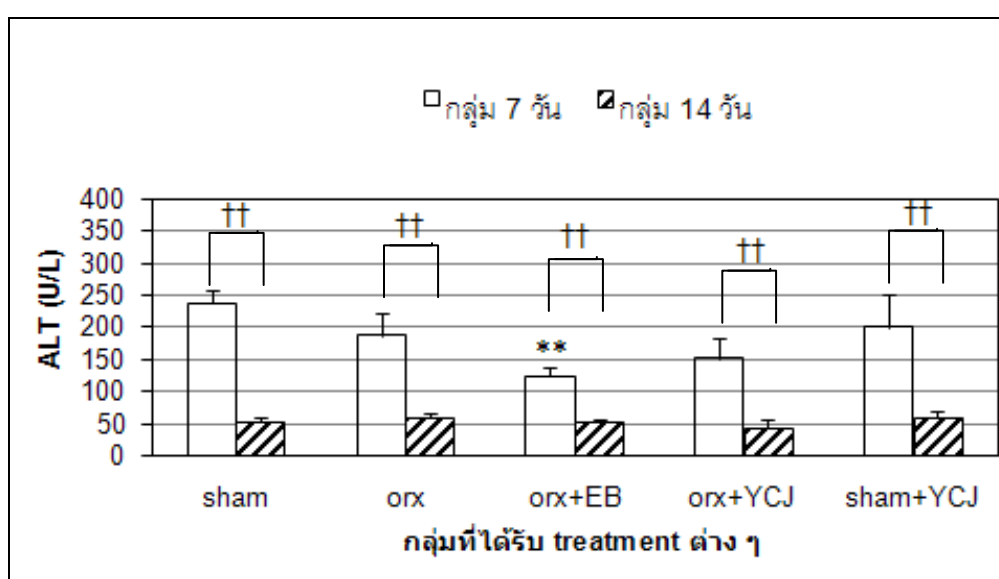
รูปที่ 3-47 กราฟแสดงค่า albumin (g%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า AST ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $187.00 \pm 36.7$ ) กลุ่ม orx ( $307.67 \pm 123.5$ ) กลุ่ม orx+EB ( $224.17 \pm 27.1$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $167.83 \pm 28.6$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $391.2 \pm 191.0$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า AST ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $116.80 \pm 21.6$ ) กลุ่ม orx ( $125.70 \pm 33.1$ ) กลุ่ม orx+EB ( $118.33 \pm 24.5$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $80.80 \pm 16.9$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $144.17 \pm 40.0$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า AST ของกลุ่ม orx+EB และกลุ่ม orx+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-48)



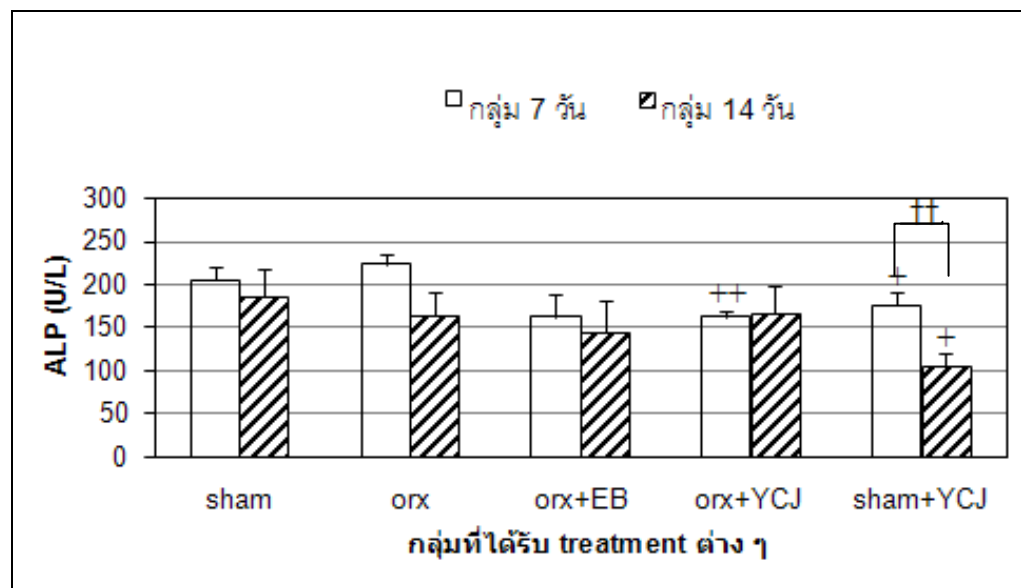
รูปที่ 3-48 กราฟแสดงค่า AST (U/L) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า ALT ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $237.00 \pm 20.3$ ) มีค่า ALT สูงกว่ากลุ่ม orx+EB ( $123.00 \pm 14.5$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า ALT ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $53.50 \pm 4.5$ ) กลุ่ม orx ( $58.70 \pm 6.3$ ) กลุ่ม orx+EB ( $51.17 \pm 2.8$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $53.70 \pm 11.4$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $59.00 \pm 8.9$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกันพบว่าค่า ALT ของทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-49)



รูปที่ 3-49 กราฟแสดงค่า ALT (U/L) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

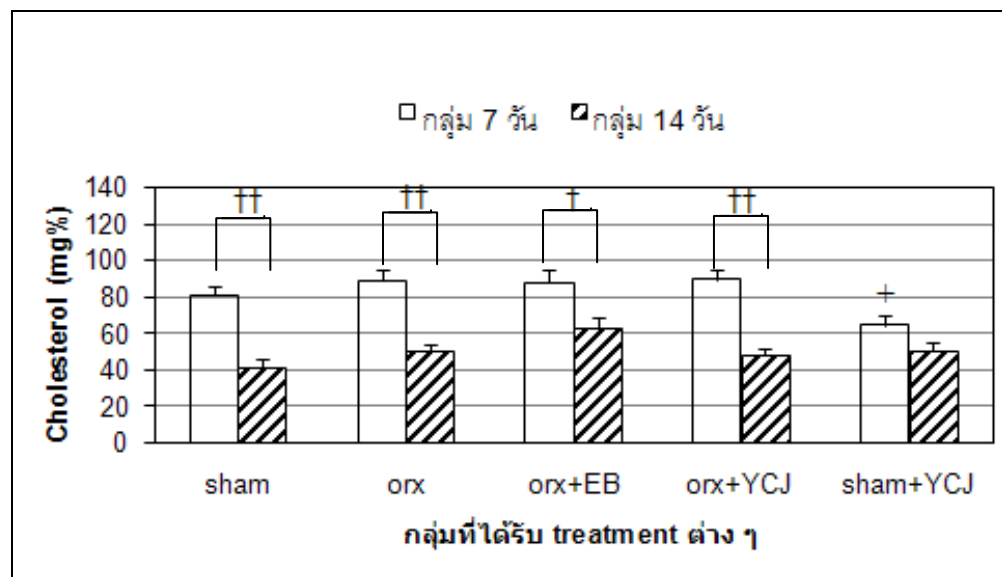
การเปลี่ยนแปลงของค่า ALP ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $223.17 \pm 10.9$ ) มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $161.50 \pm 7.9$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $175.17 \pm 14.5$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และ ( $p < 0.05$ ) ตามลำดับ สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า ALP ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $163.00 \pm 27.5$ ) มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $104.50 \pm 15.6$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า ALP ของกลุ่ม sham+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-50)



รูปที่ 3-50 กราฟแสดงค่า ALP (U/L) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

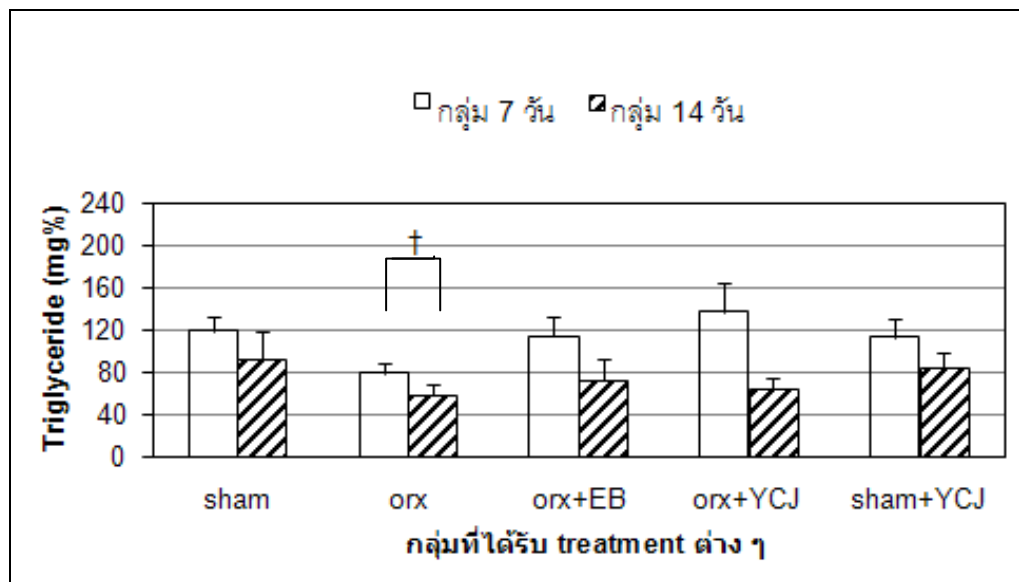
### 3.3 การวิเคราะห์ค่า cholesterol (mg%) triglyceride (mg%) HDL (mg%) และ LDL (mg%) ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การเปลี่ยนแปลงของค่า cholesterol ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $88.83 \pm 6.2$ ) กลุ่ม orx+EB ( $88.00 \pm 6.6$ ) และกลุ่ม orx+YCJ ( $89.17 \pm 6.1$ ) มีค่า cholesterol สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $64.50 \pm 4.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า cholesterol ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx+EB ( $63.33 \pm 5.1$ ) มีค่า cholesterol สูงกว่ากลุ่ม orx+YCJ ( $48.00 \pm 3.5$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า cholesterol ของกลุ่ม sham กลุ่ม orx และกลุ่ม orx+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) และกลุ่ม orx+EB ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-51)



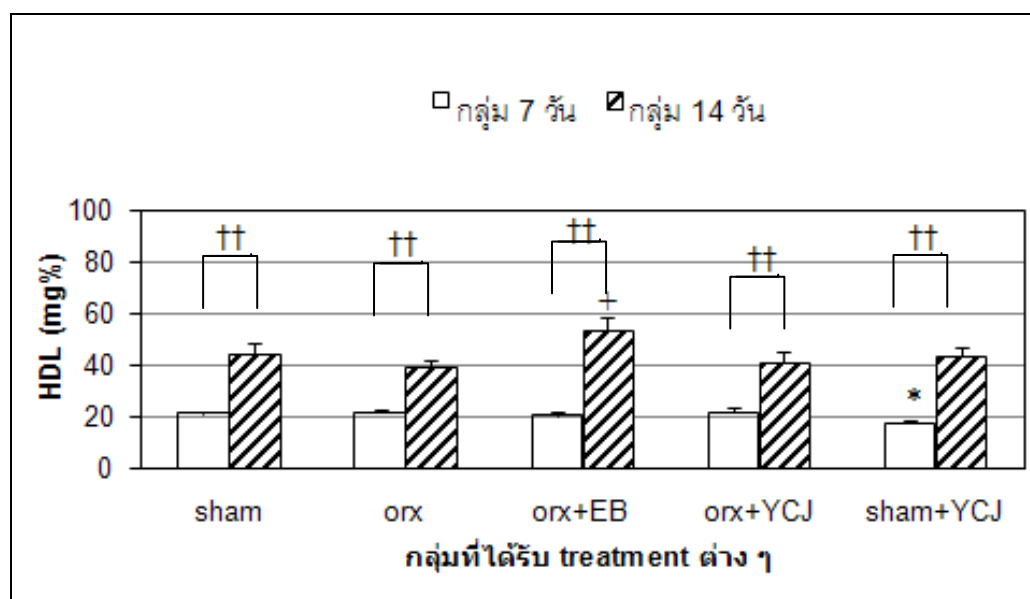
รูปที่ 3-51 กราฟแสดงค่า cholesterol (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า triglyceride ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $119.00 \pm 13.6$ ) กลุ่ม orx ( $78.50 \pm 9.5$ ) กลุ่ม orx+EB ( $113.83 \pm 19.1$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $137.00 \pm 26.2$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $112.83 \pm 16.6$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า triglyceride ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $92.17 \pm 26.3$ ) กลุ่ม orx ( $58.83 \pm 9.2$ ) กลุ่ม orx+EB ( $72.67 \pm 18.8$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $65.00 \pm 8.5$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $83.17 \pm 15.0$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า triglyceride ของกลุ่ม orx มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-52)



รูปที่ 3-52 กราฟแสดงค่า triglyceride (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

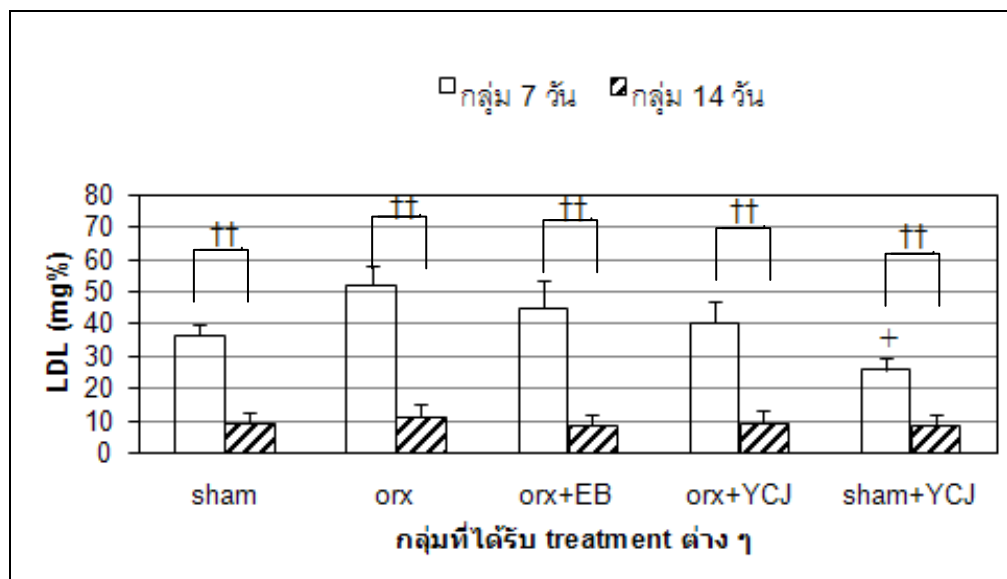
การเปลี่ยนแปลงของค่า HDL ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $21.00 \pm 1.1$ ) มีค่า HDL สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $17.33 \pm 1.3$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า HDL ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $39.00 \pm 2.4$ ) มีค่า HDL ต่ำกว่ากลุ่ม orx+EB ( $53.17 \pm 5.5$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า HDL ของทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-53)



รูปที่ 3-53 กราฟแสดงค่า HDL (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

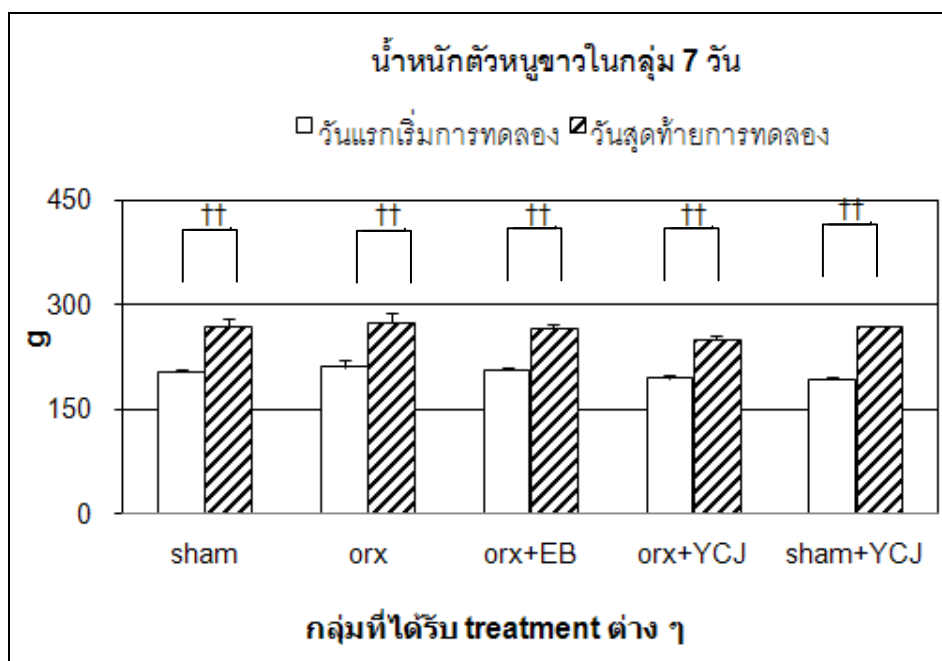


การวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า LDL ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม orx ( $51.83 \pm 6.0$ ) มีค่า LDL สูงกว่ากลุ่ม sham+YCJ ( $24.50 \pm 3.9$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า LDL ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $8.83 \pm 0.9$ ) กลุ่ม orx ( $10.83 \pm 2.1$ ) กลุ่ม orx+EB ( $8.33 \pm 0.7$ ) กลุ่ม orx+YCJ ( $9.33 \pm 1.6$ ) และกลุ่ม sham+YCJ ( $8.17 \pm 0.8$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วันของ treatment เดียวกัน พบว่าค่า LDL ของทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-54)



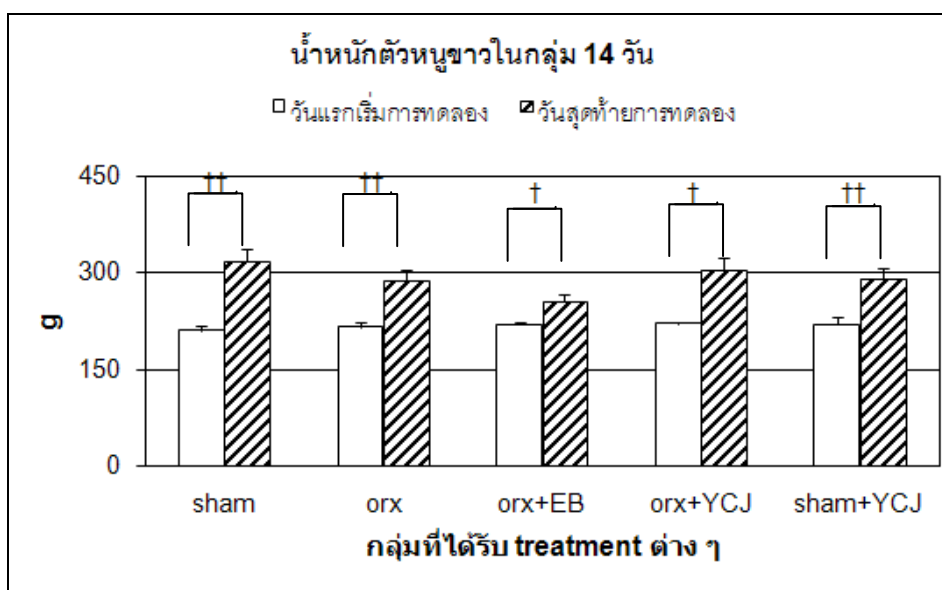
รูปที่ 3-54 กราฟแสดงค่า LDL (mg%) ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

การชั่งน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ treatment ต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างวันแรกเริ่มการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 7 วัน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองในวันสุดท้ายของการทดลองเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูทดลองในวันแรกเริ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) (กราฟรูปที่ 3-55)



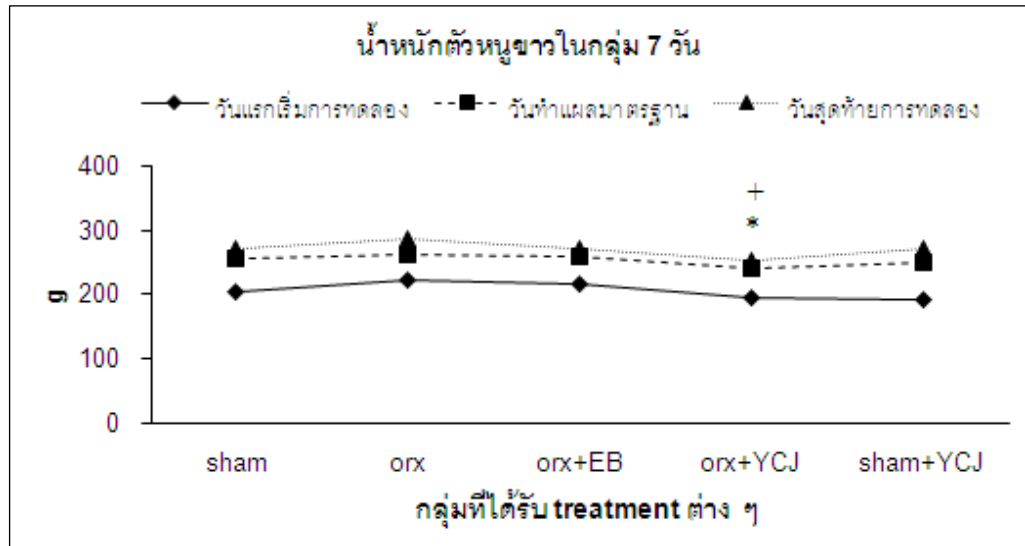
รูปที่ 3-55 กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลองและวันสุดท้ายของการทดลองของกลุ่ม 7 วัน

การชั่งน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ treatment ต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่างวันแรกเริ่มการทดลองกับวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 14 วัน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองในวันสุดท้ายของการทดลองเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของหนูทดลองในวันแรกเริ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ กลุ่ม sham กลุ่ม orx และกลุ่ม sham+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ ) สำหรับกลุ่ม orx+EB และกลุ่ม orx+YCJ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) (กราฟรูปที่ 3-56)

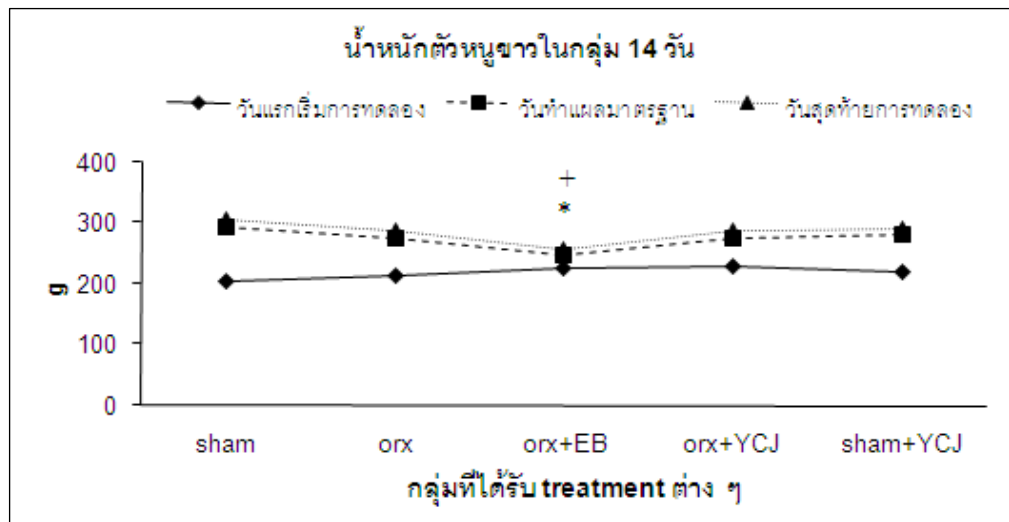


**รูปที่ 3-56** กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลองและวันสุดท้ายของการทดลองของ กลุ่ม 14 วัน

การชั่งน้ำหนักตัวของหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ treatment ต่าง ๆ ระหว่างวันแรกเริ่มการทดลอง วันทำแผลมาตรฐานและวันสุดท้ายของการทดลองในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองเพิ่มขึ้นนับตั้งแต่วันแรกจนกระทั่งถึงวันสุดท้ายของการทดลอง (กราฟรูปที่ 3-57 และ 3-58)



**รูปที่ 3-57** กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลอง วันทำแผลมาตรฐานและวันสุดท้ายการทดลองของกลุ่ม 7 วัน โดยน้ำหนักในวันสุดท้ายของกลุ่ม orx+YCJ น้อยกว่ากลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



**รูปที่ 3-58** กราฟแสดงน้ำหนักตัวหนูขาววันแรกเริ่มการทดลอง วันทำแผลมาตรฐานและวันสุดท้ายการทดลองของกลุ่ม 14 วัน โดยน้ำหนักในวันสุดท้ายของกลุ่ม orx+EB น้อยกว่ากลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

จากงานวิจัยครั้งนี้สามารถสรุปได้ดังนี้คือ จากการตรวจวัดค่า serum E2 พบว่ากลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ มีค่าเฉลี่ยของ serum E2 ต่ำเช่นเดียวกับกลุ่ม sham และกลุ่ม orx และยังพบว่ากลุ่ม orx+EB มีค่า serum E2 สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Mcneill และคณะ (Mcneill *et al.*, 1999) ว่า การได้รับ 17 $\beta$ -estradiol ในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกตัดเอาอวัยวะออกนาน 4 สัปดาห์ ทำให้ระดับ serum E2 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม orx สำหรับค่าเฉลี่ย serum testosterone (T) ในกลุ่ม sham และกลุ่ม sham+YCJ สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากหนูกลุ่มดังกล่าวยังมีอวัยวะและอวัยวะอื่น ๆ ที่สามารถสร้างฮอร์โมนดังกล่าวอยู่ แต่เมื่อได้รับ YCJ ในระยะเวลาสั้นขึ้น (14 วัน) พบว่า ค่า serum T ลดลงในกลุ่ม sham+YCJ ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่ YCJ ที่คาดว่ามีส่วนประกอบที่เป็น (phytoestrogen : PE) มีฤทธิ์ antagonist กับ T จึงทำให้ค่า serum T ในกลุ่มดังกล่าวลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานวิจัยของ Goodin และคณะ (Goodin *et al.*, 2007) โดยพบว่าการได้รับ soy protein powder เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ในอาสาสมัครชายอายุ 18 ปี มีผลทำให้ค่า serum T ลดลงเรื่อย ๆ และสอดคล้องกับการลดลงของ serum LH ด้วย เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Weber และคณะ (Weber *et al.*, 2001) ที่กล่าวว่า หนู Sprague Dawley เพศผู้ อายุ 50 วันที่ได้รับ PE (304.3 $\pm$ 2.7g) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ ทำให้ค่า serum T ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ PE การลดลงดังกล่าวอาจเป็นไปได้ที่ PE (equol, daidzein และ genistein) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีผลต่อ biosynthesis pathway ของกระบวนการผลิตแอนโดรเจน แต่ไม่ทราบกลไกดังกล่าวที่ชัดเจน นอกจากนี้ยังพบว่า T มีผลชะลอการสมานแผลทำให้แผลหายช้า โดยทำให้ระยะเวลาของกระบวนการอักเสบนานขึ้น นั่นคือการเพิ่มการสร้าง pro-inflammatory mediator, TNF- $\alpha$  และ macrophage inhibitory factor (MIF) ผ่านทางตัวรับแอนโดรเจน (AR) (Gilliver *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าช่วงการสมานแผลสามารถพบการแสดงออกของ AR ได้ที่ keratinocytes inflammatory cell และ fibroblasts แสดงให้เห็นว่าแอนโดรเจนอาจมีส่วนกระตุ้นกระบวนการอักเสบ ทำให้ระยะเวลาของกระบวนการอักเสบนานขึ้น (Ashcroft *et al.*, 2002; McCrudden and Stimson, 1991; Giglio *et al.*, 1994) และ T ยังมีส่วนในการกระตุ้นการเกิด angiogenesis (Frank-Lissbrant *et al.*, 1998; Sordello *et al.*, 1998; Colombel *et al.*, 2005) ซึ่งการแสดงออกของ angiogenesis และการผลิต growth factor บางชนิด มีส่วนต่อการชะลอการสมานแผลอีกด้วย (Broadley *et al.*, 1989; Ortega *et al.*, 1998; Dovi *et al.*, 2004)

การวิเคราะห์บริเวณแผลในกลุ่ม 7 วันของทุกกลุ่มการทดลองพบว่า ชั้น epidermis บางกว่าบริเวณเนื้อเยื่อปกติ และยังมีพบ granulation tissues ซึ่งเป็นโครงสร้างในชั้น dermis ที่ประกอบด้วย fibroblasts และ extracellular matrix (ECM) ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณดังกล่าว มีการสมานแผลยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ยังอยู่ในขั้นตอน proliferative phase และไม่พบความแตกต่างของขนาดของแผลในกลุ่มต่าง ๆ ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระยะเวลาที่ไม่นานพอที่จะทำให้การสมานแผลเกิดอย่างสมบูรณ์ได้ สำหรับในกลุ่ม 14 วัน กลุ่ม orx+YCJ มีความหนาของชั้น epidermis บริเวณแผลใกล้เคียงกับบริเวณเนื้อเยื่อปกติ และยังมีพบ granulation tissues เป็นบริเวณแคบ ขอบเขตของแผลในกลุ่มนี้จึงน้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ อาจเนื่องจากผลของ YCJ ที่ช่วยเร่งการสมานแผลให้เกิดในอัตราที่เร็วกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่พบว่า  $17\beta$ -estradiol ยังช่วยยับยั้งการสร้าง proinflammatory cytokine เช่น macrophage migration inhibitory factor (MIF) (เสาวรส. 2551) และ tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ashcroft *et al.*, 2003) จึงลดการเคลื่อนที่ของ inflammatory cells เช่น neutrophil, lymphocyte และ macrophages มายังบริเวณแผลทำให้ระยะเวลาของการอักเสบลดลง (Ashcroft *et al.*, 1999; Mills *et al.*, 2005) เมื่อ neutrophil ลดลง การสร้างเอนไซม์ elastase (neutrophil-derived elastase) จึงลดลง ทำให้ extracellular matrix (ECM) ถูกทำลายน้อยลง แผลจึงมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ estradiol ยังกระตุ้นอัตราการเกิด reepithelialization เป็นการส่งเสริมการลดขนาดแผลเช่นกัน (Ashcroft *et al.*, 1999) ในขณะที่กลุ่ม sham มีความหนาของชั้น epidermis มากกว่ากลุ่ม orx+EB ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) พบว่าหนู mice เพศผู้อายุ 3-15 สัปดาห์กลุ่ม sham และกลุ่มที่ถูกตัดอัณฑะออกที่ได้รับ E2 0.025 mg/mouse เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีความหนาของชั้น epidermis ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ากลุ่ม sham มีขนาดของแผลมากกว่ากลุ่มอื่น ๆ และการสมานแผลที่เกิดซ้ำเป็นผลจากการเพิ่มการสร้าง proinflammatory mediator, TNF- $\alpha$  และ macrophage inhibitory factor (MIF) ผ่านทางตัวรับแอนโดรเจน (androgen receptor, AR) (Gilliver *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังพบว่า หนู mice เพศผู้อายุ 8-12 สัปดาห์เลี้ยงนาน 21 วัน พบการแสดงออกของ AR ได้ที่ keratinocytes inflammatory cell และ fibroblasts แสดงให้เห็นว่าแอนโดรเจนอาจมีส่วนกระตุ้นกระบวนการอักเสบให้เกิดขึ้น (Ashcroft *et al.*, 2002) และเมื่อเปรียบเทียบในกลุ่ม orx และกลุ่ม orx+YCJ โดยเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx+YCJ มีการสมานแผลเร็วกว่า ทั้งจากการวัดความลึกและความกว้างของแผล แสดงว่าการให้ YCJ ที่ความเข้มข้นเท่าเดิม (100 mL/KgBW) ด้วยระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) ทำให้การสมานแผลในกลุ่มนี้ดีขึ้น อาจกล่าวได้ว่าสารใน YCJ มีผลทำให้การสมานแผลดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ YCJ และสารดังกล่าวน่าจะเป็น PE ชนิด isoflavone เนื่องจากงานวิจัยของ Salas และคณะ (Salas *et al.*, 2007) พบว่า หนู Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200 กรัม ที่ได้รับ genistein (ซึ่งอยู่ในกลุ่ม isoflavone) ขนาด 5  $\mu$ g/rat เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีการสมานแผลเร็วขึ้น และจากรายงาน

วิจัยของ Benassayag และคณะ (Benassayag *et al.*, 2002) ยังพบว่า genistein มีผลต่อการสมานแผลหลายประการ เช่น proliferation, differentiation และการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์เป้าหมาย (target cells) ขนาดความเข้มข้น ชนิดของ PE และการมีหรือไม่มี endogenous E2 นอกจากนี้ Rao และคณะ (Rao *et al.*, 1997) ยังพบว่าหนู rat เพศผู้ อายุ 5 สัปดาห์ ที่ได้รับ genistein ขนาด 250 ppm เป็นเวลา 61 วัน มีระยะเวลาการอักเสบที่สั้นกว่า ซึ่งผลดังกล่าวของ genistein ล้วนเป็นปัจจัยที่ช่วยให้การสมานแผลเกิดได้เร็วขึ้น ส่วนการวัดความหนาของชั้น dermis ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ของกลุ่ม orx+EB และกลุ่ม orx+YCJ พบว่ามีชั้น dermis หนากว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องจาก E2 และ YCJ ที่ให้ทดแทนในกลุ่มนี้อาจมีผลกระตุ้นให้มี proliferation และ differentiation ของเซลล์ fibroblasts ที่อยู่ในชั้น dermis เช่นเดียวกับกรณีของเซลล์ keratinocytes ของชั้น epidermis ดังกล่าวข้างต้น ทำให้มีการสร้างคอลลาเจนในปริมาณที่มากขึ้น และทำให้ความหนาของชั้น dermis ของกลุ่ม YCJ มากขึ้นด้วย โดย Brincat และคณะ (1987) พบว่า estradiol gel ช่วยคงความหนาของชั้น dermis ปริมาณของ extracellular matrix collagen และรักษาความแข็งแรงของโครงสร้างของผิวหนังอีกด้วย (Brincat *et al.*, 1987) และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Brincat และคณะ (Brincat *et al.*, 1983) พบว่าอาสาสมัคร postmenopausal ได้รับการฝัง (implant) oestradiol 50 mg และ testosterone 100 mg เป็นเวลา 2-10 ปี มีปริมาณของคอลลาเจนแปรผันโดยตรงกับความหนาของชั้น dermis (จากการวัดด้วยหลักการทางรังสีวิทยา) และเมื่อเปรียบเทียบความหนาของชั้น dermis ของกลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่ากลุ่ม orx+YCJ ทั้งในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน มีความหนาของชั้น dermis มากกว่ากลุ่ม sham+YCJ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของ serum T ที่สูงในกลุ่ม sham+YCJ มีฤทธิ์ต้าน (antagonist) กับสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนใน YCJ ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวอาจเป็นไปได้ที่ YCJ มีผลต่อ biosynthesis pathway ของกระบวนการผลิตแอนโดรเจน ซึ่งจะได้ทำวิจัยต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ยังพบว่า T มีผลชะลอการสมานแผลให้หายช้าลง โดยการเพิ่มระยะเวลาของกระบวนการอักเสบให้นานขึ้น คือการเพิ่มการสร้าง pro-inflammatory mediator, TNF- $\alpha$  และ macrophage inhibitory factor (MIF) ผ่านทางตัวรับแอนโดรเจน (AR) (Gilliver *et al.*, 2003) สำหรับการวัดความหนาของชั้น hypodermis ของกลุ่ม orx ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่ามีความหนาของชั้น hypodermis น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) ที่กล่าวว่า หนู mice เพศผู้ อายุ 13-15 สัปดาห์ ที่ได้รับการผ่าตัดเอาอวัยวะออกและเลี้ยงเป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ จะทำให้ความหนาของชั้น hypodermis ลดลงและทำให้ความหนาชั้นนี้เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ E2 ทดแทน

สำหรับโครงสร้างที่ติดสปีมมูโนอริสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ของทุกกลุ่ม การทดลองทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน ได้แก่ keratinocytes, fibroblasts, hair follicles,

sebaceous gland, ECM และ muscularis adiposus สอดคล้องกับงานวิจัยของ Moverare และคณะ (Moverare *et al.*, 2002) พบว่าหนู mice เพศผู้ที่ถูกตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ E2 ขนาด 0.7  $\mu\text{g}/\text{วัน}$  เป็นเวลา 5 วัน/สัปดาห์ นาน 3 สัปดาห์ มีการแสดงออกของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ที่บริเวณ hair follicles และงานวิจัยของ Brandenberger และคณะ (Brandenberger *et al.*, 1997) คือ human fetal tissue อายุ 16-23 สัปดาห์ พบการแสดงออกของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ที่บริเวณอวัยวะ รังไข่ ผิวหนัง ต่อมหมวกไต ไข้มัส ปอด ไต ต่อมใต้สมอง ม้ามและ brain cortex แสดงว่า endogenous E2, exogenous E2 และ YCJ ที่ให้กับกลุ่มทดลองต่างๆ อาจเป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อโครงสร้างดังกล่าวผ่านทาง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โดยลักษณะการแสดงผลจะแตกต่างกันในแต่ละโครงสร้าง และจากการวัดขนาดของ hair follicles พบว่าเมื่อกลุ่มทดลองได้รับ EB และ YCJ นาน 14 วัน ขนาดของ hair follicles กลับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ treatment 7 วัน โดยพบลักษณะดังกล่าวในกลุ่ม orx+EB (เฉพาะ ER $\beta$ ) กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ ตรงข้ามกับรายงานวิจัยของ Moverare และคณะ (Moverare *et al.*, 2002) ที่ไม่พบความแตกต่างของขนาด hair follicles เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle oil ในขนาดและระยะเวลาเดียวกัน และจากการศึกษาพบว่า เอสโตรเจนมีบทบาทในการกระตุ้นการเจริญและความยาวของเส้นขนบริเวณ fronto-temporal ในผู้ชายปกติ (Deplewski *et al.*, 2000; Conrad and Paus, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moverare และคณะ (Moverare *et al.*, 2002) พบว่า เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเจริญของ hair follicles ซึ่งการเจริญของ hair follicles นั้นขึ้นอยู่กับการทำงานร่วมกันของเซลล์ mesenchymal ใน dermal papilla และเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในชั้น follicular epithelium (Hardy, 1992) สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างกับงานวิจัยข้างต้น อาจเป็นเพราะปัจจัยบางประการ เช่น การวิจัยในครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของ E2 (2.5  $\mu\text{g}/\text{kgBW}/\text{day}$ ) เป็นเวลา 5 วัน/สัปดาห์ ซึ่งน้อยกว่างานวิจัยของ Moverare (0.7  $\mu\text{g}/\text{วัน}$  เป็นเวลา 5 วัน/สัปดาห์ นาน 3 สัปดาห์) ความเข้มข้นของ YCJ (100 mL/kgBW/day) ระยะเวลาของการทดลอง (7 วันและ 14 วัน) และชนิดของสัตว์ทดลอง (หนู Wistar เพศผู้) เป็นต้น จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป จากผลต่างๆ ดังกล่าวของ YCJ ต่อโครงสร้างของผิวหนังกล่าวได้ว่า YCJ อาจมีบทบาทเป็น selective estrogen receptor modulators (SERMs) ชนิดหนึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McNamara และคณะ (McNamara *et al.*, 2002) พบว่า หนู adult Sprague-Dawley เพศผู้ที่ได้รับ tamoxifen (TAM) ซึ่งเป็น SERMs ขนาด 20 mg/mL arachis oil/day เป็นเวลา 1 สัปดาห์ มีบทบาทช่วยเร่งการสลายไขมัน โดยลดระยะเวลาในกระบวนการอักเสบ ลดการแสดงออกของ proinflammatory cytokines และเพิ่มกระบวนการ reepithelialization จากรายงานการวิจัยของ Surazynski และคณะ (Surazynski *et al.*, 2003) พบว่า กลุ่มที่ได้รับ raloxifene (RAL) มีผลทำให้ cell culture ของ human skin fibroblast cells มีการสังเคราะห์ collagen ได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับ estrogen ซึ่งการสังเคราะห์และการสะสม collagen มีบทบาทสำคัญในการเร่งการสลาย



แผล และจากรายงานวิจัยของ Haczynski และคณะ (Haczynski *et al.*, 2004) คือ cultured human skin fibroblasts ที่ treat ด้วย estradiol 2  $\mu\text{mol/l}$ , tamoxifen 4  $\mu\text{mol/l}$  และ raloxifene 4  $\mu\text{mol/l}$  เป็นเวลา 32 ชั่วโมง พบว่า estrogen และ TAM สามารถชักนำการแสดงออกทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในทางกลับกัน RAL จะชักนำการแสดงออกของ ER $\beta$  เพียงชนิดเดียว

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles พบว่า E2 มีแนวโน้มทำให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles เพิ่มขึ้นผ่านทาง ER $\beta$  และมีแนวโน้มทำให้ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ hair follicles ลดลงผ่านทาง ER $\alpha$  จากงานวิจัยพบว่า ที่บริเวณของ hair follicle สามารถพบเซลล์หลายชนิด เช่น epithelial, mesenchymal, neural crest-derived cell และพบ pigmented keratin fiber (Akamatsu *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 2003; Zouboulis *et al.*, 2006) พบการแสดงออกของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  บริเวณ hair follicles ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Thornton และคณะ (Thornton *et al.*, 2003, 2006) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum E2 กับจำนวนของ hair follicles พบว่าในกลุ่ม 7 วัน E2 มีแนวโน้มทำให้จำนวนของ hair follicles เพิ่มขึ้นผ่านทาง ER $\beta$  และมีแนวโน้มลดลงผ่านทาง ER $\alpha$  ในทางกลับกันกับกลุ่ม 14 วัน พบว่า E2 มีแนวโน้มทำให้จำนวนของ hair follicles เพิ่มขึ้นผ่านทาง ER $\alpha$  และมีแนวโน้มลดลงผ่านทาง ER $\beta$  และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับ serum testosterone กับจำนวนของ hair follicles พบว่า testosterone มีผลทำให้จำนวนของ hair follicles ลดลงผ่านทั้ง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  จึงสรุปได้ว่า ฮอโมนเอสโตรเจนทำให้จำนวนและขนาดของ hair follicles เพิ่มขึ้น ในทางตรงข้าม T ทำให้จำนวนและขนาดของ hair follicles ลดลง นอกจากนี้ยังพบ sebaceous gland อยู่ร่วมกับ hair follicle ในชั้น dermis และเป็นหนึ่งในองค์ประกอบของ pilosebaceous unit จากงานวิจัย benign tumor ในอาสาสมัครชายและหญิงอายุเฉลี่ย 44.8 ปีที่มีปัญหาเกี่ยวกับ skin appendage tumors พบการแสดงออกของ ER $\alpha$  (Kariya *et al.*, 2005) และ keratinocytes ที่บริเวณ sebaceous gland (Kierszenbaum, 2007) ซึ่ง keratinocytes บริเวณ sebaceous gland มีส่วนเกี่ยวข้องกับการ proliferation และ differentiation ในกระบวนการสมานแผล ทำให้สมานแผลดีขึ้นและเร็วขึ้นอีกด้วย ดังนั้นการสมานแผลที่เกิดเร็วขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับ YCJ ในการศึกษาครั้งนี้จึงอาจเกิดจากกระตุ้นของ PE (YCJ) ผ่าน keratinocytes ที่ hair follicles และ sebaceous gland ตามทฤษฎีของ Kierszenbaum (2007)

การวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกต่างๆ ในซีรัมหนู พบว่าค่า BUN ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วันของกลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ แสดงว่าการให้ YCJ ในกลุ่มดังกล่าว ไม่ทำให้ค่า BUN ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ อรัญญา และคณะ (อรัญญา, 2544) ที่พบว่า การได้รับ กวาวเครือแดงขนาด 100 มก./แคปซูล ของหนู Wistar เพศผู้เป็นเวลา 6 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่า creatinine ของกลุ่ม orx+YCJ

และกลุ่ม sham+YJC ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ไม่พบความแตกต่างของค่าดังกล่าวเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham แสดงว่าการได้รับ YCJ ความเข้มข้น 100 mL/kgBW ทั้งในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน ไม่มีผลต่อไตในการรักษาสมดุลของ creatinine โดยอาจทำให้การขับออกของ creatinine ที่ไตมากขึ้น ส่งผลให้พบค่า creatinine ในกระแสเลือดลดลงหรือปกติ ซึ่งตรงกับงานวิจัยของ อรัญญา และคณะ (อรัญญา, 2544) ที่พบว่า การได้รับกวาวเครือแดงขนาด 100 มก./แคปซูล ของหนู Wistar เพศผู้เป็นเวลา 6 เดือน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นการได้รับ YCJ เป็นเวลา 14 วัน ไม่ทำให้ค่า BUN และ creatinine ในกลุ่ม orx+YJC และกลุ่ม sham+YJC สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham ซึ่งค่า BUN และ creatinine เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของไต แสดงว่าการบริโภค YCJ ในหนูตัวผู้ปกติ และหนูที่ถูกตัดอัณฑะออกเป็นเวลา 14 วัน ยังมีความปลอดภัย

การวิเคราะห์ค่า liver function tests (total protein, albumin, AST, ALT และ ALP) ในกลุ่ม 14 วันของทุกกลุ่มการทดลองพบว่า การได้รับ YCJ ไม่ทำให้ค่าดังกล่าวมีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ อรัญญา และคณะ (อรัญญา, 2544) ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า liver function test ดังกล่าว แต่ตรงข้ามกับงานวิจัยของ Hamden และคณะ (Hamden *et al.*, 2009) ที่พบว่าหนู Wistar เพศผู้อายุ 12 เดือนที่ได้รับ EB ขนาด 1 µg/kgBW/day และสารสกัดจาก *Peganum harmala* ซึ่งเป็นไฟโตเอสโตรเจนกลุ่ม isoflavone ขนาด 50 mg/kgBW/day เป็นเวลา 6 เดือน มีผลทำให้ค่า AST, ALT และ ALP ต่ำกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่า albumin ของกลุ่ม orx+EB ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าสูงกว่ากลุ่ม sham และเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) ค่า albumin มีแนวโน้มที่สูงขึ้นแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าระดับ serum E2 ที่สูงขึ้นอาจทำให้มีการสังเคราะห์ albumin ที่ตับเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบค่า ALP ของกลุ่ม orx+YJC ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าค่า ALP ลดลงเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham แสดงว่าการได้รับ YCJ ในระยะเวลาที่นานขึ้น อาจทำให้มีการสร้าง ALP จากตับลดลง ดังนั้นการได้รับ YCJ อาจช่วยลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรกระบบน้ำดีในตับได้ เพราะ ALP เป็น marker ของการทำงานของระบบน้ำดี สำหรับค่า AST และ ALT ในกลุ่ม 14 วันมีค่าต่ำกว่ากลุ่ม 7 วัน แม้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง แสดงว่าการได้รับ EB และ YCJ ไม่น่าจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการถูกทำลายของเซลล์ตับ (hepatocyte)(ค่า AST และ ALT เป็น markers ของการทำงานของตับ) จากโครงการวิจัย (มาซีเต๊ะและวารางคณา, 2010) โดยการย้อมสีเนื้อเยื่อตับด้วยวิธี Periodic acid schiff's (PAS) ของหนูขาว Wistar เพศผู้ที่ได้รับ YCJ เป็นเวลา 14 วัน พบว่าการสะสมของไกลโคเจนในเซลล์ตับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ และจากการศึกษาในครั้งนี้อย่างพบว่ามีน้ำหนักร่างกายของหนูที่ได้รับ YCJ ทั้งกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกเริ่มการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการบริโภค YCJ

ปริมาตร 100 mL/kgBW เป็นเวลา 14 วัน ยังคงมีความปลอดภัยแม้ว่าจะมีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น

สำหรับการวิเคราะห์ค่า cholesterol ของกลุ่ม orx+EB ในกลุ่ม 14 วัน มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Sosic-Jurjevic และคณะ (Sosic-Jurjevic *et al.*, 2007) ที่พบว่าหนู Wistar ที่ทำการผ่าตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ EB ขนาด 0.6 mg/kgBW/day เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีผลทำให้ค่า cholesterol สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และกลุ่ม orx แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน และเมื่อเปรียบเทียบค่า cholesterol ของกลุ่ม orx+EB กลุ่ม orx+YCJ และกลุ่ม sham+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน พบว่าค่า cholesterol ของทั้ง 3 กลุ่ม ในกลุ่ม 14 วันต่ำกว่ากลุ่ม 7 วัน เช่นเดียวกับค่า serum testosterone ในกลุ่ม 14 วันต่ำกว่ากลุ่ม 7 วัน ในทางตรงข้ามค่า HDL กลับสูงขึ้น ดังนั้นการสังเคราะห์ HDL ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะช่วยกระตุ้นการนำพา cholesterol ที่มีปริมาณสูงในกระแสเลือดให้เกิดเมทาบอลิซึมที่เซลล์ตับได้มากขึ้น จึงอาจเป็นปัจจัยในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดพยาธิสภาพเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจจากการมีระดับ cholesterol ที่สูงข้างต้นได้และอาจมีส่วนทำให้ค่า serum testosterone ลดลง เนื่องจาก cholesterol เป็น precursor ในการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศทั้ง estrogen และ testosterone ส่วนค่า triglyceride ของกลุ่ม orx+YCJ ในกลุ่ม 7 วัน สูงกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่กลุ่ม 14 วัน ค่า triglyceride มีแนวโน้มต่ำกว่ากลุ่ม sham แม้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Sosic-Jurjevic และคณะ (Sosic-Jurjevic *et al.*, 2007) ที่พบว่าหนู Wistar ที่ทำการผ่าตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ EB ขนาด 0.6 mg/kgBW/day, daidzein และ genistein ขนาด 10 หรือ 30 mg/kgBW/day เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีผลทำให้ค่า triglyceride สูงกว่ากลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งตรงข้ามกับงานวิจัยในครั้งใหม่ที่พบว่าการได้รับ EB 2.5 µg/kgBW และ YCJ 100 mL/kgBW เป็นเวลา 14 วัน ทำให้มีค่า triglyceride ลดลง สำหรับค่า LDL ซึ่งเป็นไขมันที่ทำให้เกิด lipid peroxidation ได้ง่าย และอาจชักนำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจ (Tapiero *et al.*, 2002) การทดลองในครั้งนีพบว่า ค่า LDL ของทุกกลุ่มการทดลองในกลุ่ม 14 วัน มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม 7 วัน ซึ่งตรงข้ามกับงานวิจัยของ Sosic-Jurjevic และคณะ (Sosic-Jurjevic *et al.*, 2007) ที่พบว่าหนู Wistar ที่ทำการผ่าตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ EB ขนาด 0.6 mg/kgBW/day, daidzein และ genistein ขนาด 10 หรือ 30 mg/kgBW/day เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีค่า LDL ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม orx ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของการให้ YCJ ในระยะเวลาที่นานกว่า 14 วันต่อไป จากงานวิจัยของ Ruiz-Larrea และคณะ (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997; Kapiotis *et al.*, 1997) พบว่า PE ชนิด isoflavone มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ช่วยป้องกันการเกิด

lipid peroxidation ข้างต้นได้ ดังนั้นปัจจัยดังกล่าวจึงน่าจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจ เป็นต้น

จากงานวิจัยในครั้งนี้นำแสดงให้เห็นว่า การได้รับ YCJ เป็นเวลา 14 วัน นอกจากจะช่วยเร่งการสมานแผลแล้ว ยังมีความปลอดภัยต่ออวัยวะอื่น ๆ อีกด้วย โดยวิเคราะห์ผลจากค่าทางเคมีคลินิกของเลือดหนูที่เป็นตัวบ่งชี้ต่อการทำงานของตับ ไตและระดับไขมันในเลือด และเมื่อเปรียบเทียบกับ PE ชนิดอื่น ๆ ที่มีผู้ทำวิจัยก่อนหน้านี้ YCJ มีฤทธิ์ในทางบวกมากกว่า และทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อตับ ไต และระดับไขมันในเลือดน้อยกว่า YCJ จึงมีแนวโน้มที่ดีในการนำมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนฮอร์โมนสังเคราะห์ซึ่งมีผลข้างเคียงมากกว่า

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลองและข้อเสนอนะ

จากงานวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่า การได้รับ YCJ ความเข้มข้น 100 mL/kgBW/day เป็นเวลา 14 วัน ในหนูที่ทำ orx (แบบจำลองสำหรับผู้ชายวัยทอง) ไม่ทำให้ระดับ serum E2 สูงเท่ากับกลุ่ม orx+EB แต่ทำให้การสมานแผลดีกว่าคือ มีขนาดของแผลที่เล็กลง โดยสารออกฤทธิ์ใน YCJ น่าจะส่งผลระยะเวลาในกระบวนการอักเสบ กระตุ้นการเกิด reepithelialization และกระตุ้น fibroblasts ให้มีการสังเคราะห์คอลลาเจนได้มากขึ้น ทำให้แผลหดเล็กลง (wound contraction) เร็วขึ้น ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อปกติ YCJ ทำให้ความหนาของชั้น epidermis และ dermis เพิ่มขึ้น แต่ทำให้ความหนาของชั้น hypodermis ลดลงเช่นเดียวกับผลในหนูชาวเพศเมีย (Sayoh *et al.*, 2008) นอกจากนี้ YCJ อาจมีผลในการกระตุ้น keratinocyte stem cells บริเวณ follicular bulb ของ hair follicles ทำให้ stem cells เจริญเป็นเซลล์ของชั้น epidermis มากขึ้น จึงทำให้การสมานแผลเกิดเร็วขึ้น โดย YCJ น่าจะมีฤทธิ์ดังกล่าวผ่านตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิด ER $\alpha$  และ ER $\beta$  และสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งแบบ agonist และ antagonist ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดขององค์ประกอบของผิวหนัง โดยฤทธิ์ต่างๆ ดังกล่าวของ YCJ ทำให้ YCJ มีคุณสมบัติคล้าย selective estrogen receptor modulators (SERMs) ซึ่งยังต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป สำหรับการศึกษาความปลอดภัยในการบริโภค YCJ เป็นระยะเวลา 7 วันและ 14 วัน พบว่า การได้รับ YCJ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า BUN แต่ส่งผลให้ค่า creatinine สูงได้ในระยะแรก อย่างไรก็ตามในระยะเวลาที่นานขึ้น (14 วัน) มีผลทำให้ค่า BUN และ creatinine ลดลง ดังนั้น YCJ น่าจะไม่มีผลต่อการทำงานของไต ส่วนผลของ YCJ ต่อค่า liver function test (LFT) พบว่า การได้รับ YCJ เป็นเวลา 14 วันทำให้ค่า LFT โดยส่วนใหญ่ (AST, ALT และ ALP) ลดลงยังทำให้ค่า total protein ไม่เปลี่ยนแปลง ยกเว้นค่า albumin ที่สูงขึ้น นอกจากนี้ YCJ มีผลทำให้ระดับของ cholesterol, triglyceride และ LDL ลดลง แต่ค่า HDL เพิ่มขึ้น ซึ่งสันนิษฐานได้ว่า การได้รับ YCJ อาจช่วยลดอัตราเสี่ยงของระดับไขมันในเลือดได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของ YCJ ต่อการสมานแผลในอวัยวะอื่นๆ ผลต่อโรคกระดูกพรุน และผลต่อโรคเมเร็งต่างๆ ตลอดจนการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในน้ำมะพร้าวอ่อน ยังคงต้องทำการวิจัยเพิ่มเติมต่อไป

ผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิกสำหรับผู้ป่วยเพศชายที่มีอุบัติการณ์แผลหายช้า (chronic wound) และรักษาผู้ป่วยไขมันในเลือดสูง เป็นต้น อย่างไรก็ตามการนำไปใช้จริงในมนุษย์ยังคงต้องการการศึกษาทางคลินิกในอีกหลายประเด็น เช่น ความเข้มข้นต่างๆ ของ YCJ ระยะเวลาของการบริโภค ลักษณะการบริโภค ตลอดจนผลข้างเคียงในระดับโมเลกุลต่อไป

สำหรับงานวิจัยในอนาคต จะทำการศึกษาดังต่อไปนี้

1. บทบาทความสำคัญของ YCJ ต่อ epidermal differentiation ซึ่งอาจมีผลต่อการแสดงออกของ keratin markers (K) ต่าง ๆ ในชั้น epidermis คือ K1, K5, K6, K10, K14, และ filaggrin

2. ศึกษาผลของ YCJ ต่อ keratinocyte growth factors และ epidermal growth factors ซึ่ง growth factor ทั้งสองชนิดดังกล่าวมีส่วนเกี่ยวข้องในการกระตุ้นกระบวนการ proliferation และ differentiation ของ keratinocyte โดยการกระตุ้นของ estrogen (Werner *et al.*, 1998; Gibbs *et al.*, 2000) จากงานวิจัยของ Moverare และคณะ (Moverare *et al.*, 2002) พบว่า หนู mice ที่ถูกตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ  $17\beta$ -estradiol ขนาด 0.7  $\mu\text{g}/\text{วัน}$  เป็นเวลา 3 สัปดาห์ มีความหนาของชั้น epidermis และอัตราการเกิด proliferative ของ keratinocytes เพิ่มขึ้นและพบการแสดงออกของ growth factor ทั้งสองชนิดดังกล่าวผ่านทาง  $\text{ER}\alpha$

3. ศึกษาผลของ YCJ กับ cytokines ต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องต่อกระบวนการสมานแผล เช่น MIF, nitric oxide (NO), tumor necrosis factors (TNFs) และ interleukins (ILs) เป็นต้น จากการศึกษาพบว่า แอนโดรเจนมีผลต่อการกดการทำงานของ cytokines ต่าง ๆ ข้างต้น ในขณะที่เอสโตรเจนสามารถกระตุ้นการทำงานของ cytokines ดังกล่าวได้ (Nikolaevich *et al.*, 1991)

4. ทำการวิเคราะห์บทบาทของ YCJ ต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ collagen และกระบวนการ fibrillogenesis จากงานวิจัยของ Markiewicz และคณะ (Markiewicz *et al.*, 2007) พบว่า หนู mice ที่ถูกตัดเอาอวัยวะออกมีปริมาณของ collagen และความหนาของชั้นผิวหนังชั้น dermis ลดลง และยังพบว่า การแสดงออกของ mRNA ของยีน fibrillar collagen ที่ประกอบด้วย collagen type I, type III, และ type IV ลดลงเช่นกัน ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับเอสโตรเจนและแอนโดรเจน โดยใช้วิธีการทดสอบต่าง ๆ ดังนี้คือ

4.1 ศึกษาองค์ประกอบและปริมาณของ collagen ด้วยวิธีวิเคราะห์ปริมาณ hydroxyproline (Bradshaw *et al.*, 2002)

4.2 การสกัด collagen ด้วย acetic acid (Bradshaw *et al.*, 2003; Miller and Rhodes, 1982)

4.3 ศึกษาการแสดงออกของ mRNA ของ fibrillar collagen และ enzymes ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ fibrillogenesis ด้วยวิธีวิเคราะห์ Quantitative real-time RT-PCR

4.4 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน decorin, lumican และ fibromodulin ด้วยวิธี immunohistochemistry

5. ศึกษาผลของ YCJ ต่ออุบัติการณ์การเกิด osteoporosis ในผู้ชายที่สูงอายุ จากงานวิจัยแบบจำลองเดียวกันพบว่า หนูขาว Wistar เพศผู้ที่ได้รับ YCJ ในขนาดเดียวกันกับการทดลองในครั้งนี้ มีความหนาของ condyle cartilage มากกว่ากลุ่ม sham และกลุ่ม orx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yusuh *et al.*, 2010) และจากงานวิจัยแบบจำลองเดียวกันของ Suwanpal และคณะ (Suwanpal *et al.*, 2009) พบว่า หนู Wistar เพศผู้ที่ได้รับการตัดอวัยวะออกและได้รับ E2 และ YCJ หรือกลุ่ม sham+YCJ มี %bone volume สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ treatment ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าการได้รับ E2 และ YCJ สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกและเพิ่ม %bone volume ในผู้ชายวัยทองและผู้ชายปกติได้ดี จากงานวิจัยของ Broulik และคณะ (Broulik *et al.*, 2007) พบว่า หนู mice เพศผู้ที่ถูกตัดเอาอวัยวะออกและได้รับ raloxifene ซึ่งเป็น SERM ขนาด 5.0 mg/kg/day เป็นเวลา 3 เดือน สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ treatment ดังกล่าว เนื่องจากมวลกระดูก (bone mass) ในผู้ชายที่สูงอายุมีความสัมพันธ์กับระดับของ serum E2 มากกว่า serum T (Slemenda *et al.*, 1997; Szulc *et al.*, 2001) และการได้รับเอสโตรเจนทดแทนสามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกได้ดีทั้งในเพศชายและเพศหญิง (Rochira *et al.*, 2000; Ockrim *et al.*, 2003)

6. ศึกษาผลของ YCJ ต่ออวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ โดยการนับจำนวนและดูลักษณะโครงสร้างของอสุจิ โดย Toyama และคณะ (Toyama *et al.*, 2004) และ Anahara และคณะ (Anahara *et al.*, 2006) พบว่า  $17\beta$ -estradiol (E2) มีผลทำให้จำนวนอสุจิลดลงและลักษณะโครงสร้างของอสุจิผิดปกติไป

7. ศึกษาผลของ YCJ ต่อการชะลอพยาธิสภาพโรคอัลไซเมอร์ เนื่องจากในสมองหนูเพศผู้และผู้ชายมีการแสดงออกของ ER ทั้งชนิด  $\alpha$  และ  $\beta$  (Kritzer, 2002; Kruijver *et al.*, 2003) จากงานวิจัยของ Moffat และคณะ พบว่าการลดลงของระดับ serum T ในผู้ชายมีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคอัลไซเมอร์ (Moffat *et al.*, 2004) และสามารถลดอัตราเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าวได้โดยการให้ E2 ทดแทน (Zhang *et al.*, 1998; Shughue and Merchethaler, 2003; Bran *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับรายงานวิจัยของ Radenahmad และคณะ (Radenahmad *et al.*, 2009; 2011) พบว่า หนูขาวเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับ EB และ YCJ สามารถชะลอพยาธิสภาพการเกิดโรคอัลไซเมอร์ได้

## รายการเอกสารอ้างอิง

- กิจจา สว่างเจริญ. 2533. ฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนคุมกำเนิด. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ปิยากร บุญยัง. 2550. การเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ. ภาควิชากายวิศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พงศธร สงวนเชื้อ. 2544. Wound Healing Process and Principle of Wound management. ในการดูแลบาดแผลและทวารเทียม. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: 5-11.
- มาชีเตาะห์ อาบูวะ และ วรางคณา ราชชารอง. 2553. การเปลี่ยนแปลงการสะสมไกลโคเจนใน เซลล์ตับของหนูขาวเพศผู้ที่ถูกตัดอวัยวะออกและได้รับน้ำมะพร้าวอ่อนทดแทนเป็นเวลา 14 วัน. (senior project).
- สุพจน์ ตั้งจตุพร. 2543. มะพร้าวน้ำหอม เอกสารประกอบการเรียนการสอน. วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีชลบุรี.
- เสาวรส สุวรรณสะอาด. 2551. ผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศเมียผ่าน กลไกที่เกี่ยวข้องกับ macrophage migration inhibitory factor (MIF). (senior project).
- อรัญญา มโนสร้อย. 2544. การศึกษาความเป็นพิษเรื้อรังเบื้องต้นของตำรับผลิตภัณฑ์ที่มี ส่วนผสมของกวาวเครือแดง (*Butea superba*, Roxb) และกวาวเครือขาว (*Pueraria mrfifica*, Airy Shaw and Suvatabandhu) ในหนู, การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 27, สงขลา, 2544.
2524. โครงการวิจัยสมุนไพร สมุนไพรอันดับที่ 2 การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 156-165.



2538. กองวางแผนทรัพยากรมนุษย์. การคาดประมาณประชากรของประเทศไทย 2533-2563. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาการเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ.
2004. The Pacific Islands food composition tables. Rome: Food and agriculture organization of the united nations (FAO). 135 pp.
- Albertazzi, P., Pansini, F., Bonaccosi, G., Zanotti, L., Forini, E. and De Aloysio, D. 1998. The effect of dietary soy supplementation on hot flushes. *Am J Obstet Gynecol.* **91**: 6-11.
- Akamatsu, H., Zouboulis, C.C. and Orfanos, C.E. 1992. Control of human sebocyte proliferation in vitro by testosterone and 5-alpha-dihydrotestosterone is dependent on the localization of the sebaceous glands. *J Invest Dermatol.* **99**: 509-511.
- Anahara, R., Yoshida, M., Toyama, Y., Maekawa, M., Kai, M., Ishino, F., Toshimori, K. and Mori, C. 2006. Estrogen agonists, 17 $\beta$ -estradiol, biophenol A, and diethyl stilbestrol, decrease cortactin expression in the mouse testis. *Arch Histol Cytol.* **69**: 101-107.
- Anantharaju, A., Feller, A. and Chedid, A. 2002. Aging liver. A review. *Gerontology.* **48**: 343-353
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M. and Cook-Newell, M. 1995. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med.* **333**: 276-282.
- Ashcroft, G.S., Greenwell-Wild, T., Horan, M.A., Wahl, S.M. and Ferguson, M.W. 1999. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. *Am J Pathol.* **155**: 1137-1146.
- Ashcroft, G.S. and Mills, S.J. 2002. Androgen receptor mediated inhibition of cutaneous wound healing. *J Clin Invest.* **110**: 615-624.

- Ashcroft, G.S. and Ashworth, J.J. 2003. Potential role of estrogens in wound healing. *Am J Clin Dermatol.* **4**: 737-743.
- Ashcroft, G.S., Mills, S.J., Lei, K., Gibbons, L., Jeong, M.J., Taniguchi, M., Burow, M., Horan, M.A., Wahl, S.M. and Nakayama, T. 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest.* **111**: 1309-1318.
- Azzi, L., El-Alfy, M., Martel, C. and Labrie, F. 2005. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol.* **124**: 22-27.
- Bagatell, C.J. and Bremner, W.J. 2003. Androgens in Health and Disease. Humana Press: New Jersey.
- Beauregard, S. and Gilchrest, B.A. 1987. A survey of skin problems and skin care regimens in the elderly. *Arch Dermatol.* **123**: 1638-1643.
- Benassayag, C., Perrot-Applanat, M. and Ferre, F. 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **777**: 233-248.
- Borras, C., Gambini, J., Gomez-Cabrera, M.C., Sastre, J., Pallardo, F.V., Mann, G.E. and Vina, J. 2005. 17 beta-estradiol up-regulates longevity-related, antioxidant enzyme expression via the ERK1 and ERK2 [MAPK]/NF KappaB cascade. *Aging cell.* **4**: 113-118.
- Bradshaw, A.D., Reed, M.J. and Sage, E.H. 2002 . SPARC-null mice exhibit accelerated Cutaneous wornel closure. *J Hist Cytol.* **50**: 1-10.

- Bradshaw, A.D., Puolakainen, P., Dasgupta, J., Davidson, J.M., Wight, T.N., Sage, E.H. 2003. SPARC null mice display abnormalities in the dermis characterized by Decreased collagen fibril diameter and reduced tensile strength. *J Invest Dermatol.* **120**: 949-955.
- Brandenberger, A.W., Tee, M.K., Lee, J.Y., Chao, V. and Jaffe, R.B. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *Journal Clin Endocrinol Metab.* **82**: 3509-3512.
- Brann, D.W., Dhandapani, K., Wakade, C., Mahesh, V.B. and Khan, M.M. 2007. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogen: basic mechanisms and clinical implications. *Steroids.* **72**: 381-405.
- Brawley, O., Knopf, K. and Thompson, I. 1998. The epidemiology of prostate cancer part II: the risk factors. *Semin Urol Oncol.* **16**: 193-201.
- Brincat, M., Moniz, C.F., Studd, J.W., Darby, A.J., Magos, A. and Cooper, D. 1983. Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women. *BMJ.* **287**: 1337-1338.
- Brincat, M., Versi, E., Moniz, C.F., Magos, A., De Trafford, J. and Studd, J.W. 1987. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol.* **70**: 123-127.
- Broadley, K.N., Aquino, A.M., Woodward, S.C., Buckley-Sturrock, A., Sato, Y., Rifkin, D.B. and Davidson, J.M. 1989. Monospecific antibodies implicate basic fibroblast growth factor in normal wound repair. *Lab Invest.* **61**: 571-575.
- Broulik, P.D. and Broulikova, K. 2007. Raloxifen prevents bone loss in castrated male mice. *Physiol Res.* **56**: 443-447.

- Campbell, K.L., Czernecki-Maulden, G.L. and Schaeffer, D.J. 1995. Effects of animal and soy fats and proteins in the diet on fatty acid concentrations in the serum and skin of dogs. *Am J Vet Res.* **56**: 1465-1469.
- Cassidy, A., Bingham, S. and Setchell, K. 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr.* **60**: 333-340.
- Cassidy, A., Bingham, S., Carlson, J. and Setchell, K.D.R. 1993. Biological effects of plant estrogens in premenopausal women. *FASEB.* A866 (abstract).
- Chanda, S., Robinette, C.L., Couse, J.F. and Smart, R.C. 2000. 17 beta-estradiol and ICI-182780 regulate the hair follicle cycle in mice through an estrogen Receptor-alpha pathway. *Am J Endocrinol Metab.* **278**: 202-201.
- Chen, W., Yang, C.C., Shen, H.M., Seltmann, H. and Zouboulis, C.C. 2003. Expression of peroxisome proliferator-activated receptor and CCAAT/enhancer binding protein transcription factors in cultured human sebocytes. *J Invest Dermatol.* **121**: 441-447.
- Colombel, M., Filleur, S., Fournier, P., Merle, C., Guglielmi, J., Courtin, A., Degeorges, A., Serre, C.E., Bouvier, R., Clezardin, P. and Cabon, F. 2005. Androgens repress the neoplastic prostate. *Cancer Res.* **65**: 300-308.
- Conrad, F. and Paus, R. 2004. The role of estrogens in hair biology. *J Dtsch Dermatol Ges.* **2**: 412-423.
- Crouse, J.R., Morgan, T., Terry, J.G., Ellis, J., Vitolins, M. and Burke, G.L. 1999. A randomized trial comparing the effect of caseine with that of soy protein containing : varying amount of isoflavones on plasma concentration of lipid and lipoproteins. *Arch Intern Med.* **159**: 2070-2076.

- Dai, Q.S.X., Jin, F., Potter, J.D., Kushi, L.H., Teas, J., Gao, Y.T. and Zheng, W. 2001. Population based case control study of soyfood intake and breast cancer risk in Shanghai. *Br J Cancer*. **85**: 11372-11378.
- David, H. 2004. Vegetables, fruits and phytoestrogens in the prevention of disease. *J Postgrad Med*. **50**: 145-149.
- Deplewski, D. and Rosenfield, R.L. 2000. Role of hormones in pilosebaceous unit development. *Endocr Rev*. **21**: 363-392.
- Dewick, P.M. 2001. Medicinal Natural Products, 2<sup>nd</sup> Ed. John Wiley & Sons: England.
- Diegelmann, R.F. and Evans, M.C. 2004. Wound healing: An overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Frontier Biosci*. **9**: 283-289.
- Dixon RA, S.L. 2003. Legume natural products: Understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *J Plant Physiol*. **131**: 878-875.
- Dovi, J.V., Szpaderska, A.M. and Dipietro, L.A. 2004. Neutrophil function in the healing wound: adding insult to injury? *Thromb Haemost*. **92**: 275-280.
- Duane, W. 1999. Effects of soybean protein and very low dietary cholesterol on serum lipids, biliary lipids, and fecal sterols in humans. *Metab*. **48**: 489-494.
- Dunn, L.B., Damesyn, M., Moore, A.A., Reuben, D.B. and Greendale, G.A. 1997. Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Arch Dermatol*. **133**: 339-342.
- English, K.M., Manolour, O., Steeds, R.P., Diver, M.J., Jones, T.H. and Channer, K.S. 2000. Men with normal coronary angiograms. *Eur Heart J*. **21**: 890-894.

- Evan, G. and Littlewood, T. 1998. A matter of life and cell death. *Science (New York, N.Y.)*. **28**: 1317-1322.
- Falkenstein, E., Tillmann, H-C., Christ, M., Feuring, M. and Wehling, M. 2000. Multiple actions of steroid hormones a focus on rapid, non-genomic effects. *Pharm Rev.* **52**: 513-555.
- Frank-Lissbrant, I., Hagsstrom, S., Damber, J.E. and Bergh, A. 1998. Testosterone stimulates angiogenesis and vascular growth in the ventral prostate in castrated adult rats. *Endocrinology*. **139**: 451-456.
- Fukui, K., Tachibana, N., Wanezaki, S., Takamatsu, k., Yamamoto, T., Hashimoto, Y. and Shimoda, T. 2002. Isoflavone-free soy protein prepared by column chromatography reduces plasma cholesterol in rats. *J Agric food chem.* **50**: 5717-5721.
- Gibbs, S., Saliva Pinto, A.N., Murli, S., Huber, M., Hohl, D. and Ponec, M. 2000. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen.* **8**: 192-203.
- Giglio, T., Imro, M., Filaci, G., Scudeletti, M., Puppo, F., De Cecco, L., Indiveri, F. and Costantini, S. 1994. Immune cell circulating subsets are affected by gonadal function. *Life Sci.* **54**: 1305-1312.
- Gilliver, S.C., Wu, F. and Ashcroft, G.S. 2003. Regulatory roles of androgens in cutaneous wound healing. *Thromb Haemost.* **84**: 61-68.
- Goodin, S., Shen, F., Shih, W.J., Dave, N., Kane, M.P., Medina, P., Lambert, G.H., Aisner, J., Gallo, M. and Dipaola, R.S. 2007. Clinical and biological activity of soy protein powder supplementation in healthy male volunteers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **16**: 829-833.

- Goodman M, W.L., Hankin, J.H., Lyu, L.C., Wu, A.H. and Kolonel, L.N. 1997. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. *Am J Epidemiol.* **146**: 294-306.
- Greenwald, P. 2004. Clinical trials in cancer prevention: current results and perspectives for the future. *J Nutr.* **134**: 3507-3512.
- Greim, H. 2004. The endocrine and reproductive system: adverse effects of hormonally active substances. *Pediatr.* **113**: 1070-1075.
- Grinnell, F., Billingham, R.E. and Burgess, L. 1981. Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. *J Invest Dermatol.* **76**: 181-189.
- Haake, R.A. and Holbrook, K. 1999. The structure and development of skin. In: Freedberg M.I., Eisen, Z.A., Wolff, K., Austen, F.K., Goldsmith, A.L., Katz, I.S. and Fitzpatrick, B.T. *Dermatology in General medicine.* 5<sup>th</sup> international ed. Vol 1. New York McGraw-Hill. 70-108.
- Haczynski, J., Tarkowski, R., Jarzabek, K., Wolczynski, S., Magoffin, D.A., Czarnocki, K.J., Ziegert, M., Jakowicki, J. and Jakimiuk, A.J. 2002. Differential effects of estradiol, raloxifene and tamoxifen on estrogen receptor expression in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med.* **13**: 903-908.
- Hamden, K., Carreau, S., Ellouz, F., Masmoudi, H. and El Feki, A. 2007. Protective effect of 17 $\beta$ -estradiol on oxidative stress and liver dysfunction in aged male rats. *J Physiol Biochem.* **63**: 195-202.
- Hamden, K., Carreau, S., Boujbiha, M.A., Lajmi, S., Aloulou, D., Kchaou, D. and El Feki, A. 2008. Hyperglycemia, stress oxidant, liver dysfunction and histological changes in diabetic male rat pancreas and liver : protective effect of 17 beta-estradiol. *Steroids.* **73**: 495-501.

- Hamden, K., Carreau, S., Ayadi, F., Masmoudi, H. and El Feki, A. 2009. Inhibitory effect of estrogens, phytoestrogens, and caloric restriction on oxidative stress and hepato-toxicity in aged rats. *Biomed Environ Sci.* **22**: 381-387.
- Hardman, M.J., Waite, A., Zeef, L., et al. 2005. Macrophage migration inhibitory factor: central regulator of wound healing. *Am J Pathol.* **167**: 1561-1574.
- Hardy, M.H. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet.* **8**: 55-61.
- Hipakka, R.A. and Liao, S. 1998. Molecular mechanism of androgen action. *TEM.* **9**: 317-324.
- Hirose, K., Tajima, K., Hamajima, N., Inoue, M., Takezaki, T., Kuroishi, T., Yoshida, M. and Todudome, S. 1995. A large-scale, hospital-based case-control study of risk factors of breast cancer according to menopausal status. *J Cancer Res.* **86**: 146-154.
- Horn-Ross, P.L., John, E.M., Canchola, A.J., Stewart, S.L. and Lee, M.M. 2003. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* **95**: 1158-1164.
- Jarefors, S., Bennet, L., You, E., Forsberg, P., Ekerfelt, C., Berglund, J. and Ernerrudh, J. 2006. reinfection: might it be explained by a gender difference in immune response?. *Immunol.* **118**: 224-232.
- Kapiotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H. and Gmeiner, B.M. 1997. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **17**: 2868-2874.



- Kariya, Y., Moriya, T., Suzuki, T., Chiba, M., Ishida, K., Takeyama, J., Endoh, M., Watanabe, M. and Sasano, H. 2005. Sex steroid hormone receptors in human skin appendage and its neoplasm. *Endocr.* **52**: 317-325.
- Kierszenbaum, A.L. 2007. Histology and cell biology: An introduction to pathology. 2<sup>nd</sup> Ed. Mosby Elsevier: Philadelphia.
- Kirsner, R.S. and Eaglstein, W.H. 1993. The wound healing process. *Dermatol Clin.* **11**: 629-640.
- Kobayashi, H., Morisaki, N., Tago, Y., Hashimoto, Y., Iwasaki, S., Kawachi, E., Nagata, R. and Shudo, K. 1997. Structural identification of a major cytokinin in coconut milk as 14-O-(3-O-[beta-D-galactopyranosyl-(1-->2)-alpha-D-galactopyranosyl-(1-->3)-alpha-L-arabinofuranosyl]-4-O-(alpha-L-arabinofuranosyl)-beta-d-galactopyranosyl)-trans-zeatin riboside. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. **45**: 260-264.
- Kritzer, M.F. 2002. Regional, laminar, and cellular distribution of immunoreactivity for ER alpha and ER beta in the cerebral cortex of hormonally intact, adult male and female rats. *Cereb Cortex*. **12**: 116-128.
- Kruijver, F.P., Balesar, R., Espila, A.M., Unmehopa, U.A. and Sawaab, D.F. 2003. Estrogen receptor-beta distribution in the human hypothalamus: similarities and differences ER alpha distribution. *J Comp Neurol*. **466**: 251-277.
- Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., and Mitchell, R.N. 2007. Robbins Basic Pathology, 8<sup>th</sup> Ed. Saunders: Philadelphia.
- Li, J., Chen, J. and Kirsner, R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol*. **25**: 9-18.
- Lydeking-olsen, E., Jensen, J.B., Setchell, K., Damhus, M. and Jensen, T.H. 2002. Isoflavone-rich soy milk prevents bone-loss in the lumbar spine of postmenopausal women: a 2 year study. *J Nutr*. **132**: 591S.

- Markiewicz, M., Asano, Y., Znoyko, S., Gong, Y., Watson, D.K. and Trojanowska, M. 2007. Distinct effects of gonadectomy in male and female mice on collagen fibrillogenesis in the skin. *J Dermatol Sci.* **47**: 217-226.
- McCrudden, A.B. and Stimson, W.H. 1991. Sex hormones and immune function. In : Ader, R. (Ed). *Psyconeuroimmunology*. Academic Press, New York, pp. 475-681.
- McNamara, D.A., Walsh, T.N., Kay, E. and Bouchier-Hayes, D. J. 2002. Neoadjuvant antiangiogenic therapy with tamoxifen does not impair gastrointestinal anastomotic repair in the rat. *Colorectal dis.* **5**: 335-341.
- Mcneill, A.M., Kim, N., Duckles, S.P., Krause, D.N. and Hermes, A. 1999. Chronic estrogen treatment increases levels of endothelial nitric oxide synthase protein in rat cerebral microvessels (editorial comment). *Stroke.* **30**: 2186-2190.
- Meehan, K.L. and Sadar, M.D. 2003. Androgens and androgen receptor in prostate and ovarian malignancies. *Front Biosci.* **1**: 780-800.
- Meissina, M.J., Persky, V., Setchell, K.D.R. and Barnes, S. 1994. Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer.* **21**: 113-131.
- Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H. 2008. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *Mechanisms of disease.* **340**: 1801-1811.
- Miller, E.J. and Rhodes, R.K. 1982. Preparation and characterization of the different types of collagen. *Methods Enzymol.* **82**: 33-64.
- Mills, S.J., Ashworth, J.J., Gilliver, S.C., Hardman, M.J. and Ashcroft, G.S. 2005. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol.* **125**: 1053-1062.

- Moffat, S.D., Zonderderman, A.B., Metter, E.J., Kawas, C., Blackman, M.R., Harman, S.M. and Resnick, S.M. 2004. Free testosterone and risk for Alzheimer disease in older men. *Neurol.* **62**: 188-193.
- Molteni, A., Brizio-Molteni, L. and Persky, V. 1995. In vitro hormonal effects of soybean isoflavones. *J Nutr.* **125**: 751-756.
- Moverare, S., Lindberg, M.K., Faergemann, J., Gustafsson, J.A. and Ohlsson, C. 2002. Estrogen receptor  $\alpha$ , but not estrogen receptor  $\beta$ , is involved in the regulation of the hair follicle cycling as well as the thickness of epidermis in male mice. *J Invest Dermatol.* **119**: 1053-1058.
- Murkies, A.L., Wilcox, G. and Davis, S.R. 1998. Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab.* **83**: 297-303.
- Nikoaevich, K.N., Ivanovich, S.J. and Victorovich, S.S. 1991. Major reproduction hormones as regulators of cell-to-cell interactions in humoral immune responses. *Brain Behav Immun.* **5**: 146-161.
- Ohnemus, U., Uenalan, M., Inzunza, J., Gustafsson, J.A. and Paus, R. 2006. The hair follicles as an estrogen target and source. *Endocr Rev.* **27**: 677-706.
- Okrim, J.L., Lalani, E.N., Laniado, M.E., Carter, S.S. and Abel, D.D. 2003. Transdermal estradiol therapy for advanced prostate cancer forward to the past. *J Urol.* **169**: 1735-1737.
- O'malley, J.P. and Illingworth, D.R. 1992. Apolipoprotein epsilon 4 and coronary artery disease. *Lancet.* **28**: 1350-1351.
- Ortega, S., Ittmann, M., Tsang, S.H., Ehrlich, M. and Basilico, C. 1998. Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* **95**: 5672-5677.

- Padgett, D.A. and Loria, R.M. 1998. Endocrine regulation of murine macrophage function: Effects of dihydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenediol. *J Neuroimmunol.* **84**: 61-68.
- Phillips, T.J., Demircay, Z. and Sahu, M. 2001. Hormonal effects on skin aging. *Clin Geriatr Med.* **17**: 661-672.
- Plewig, G. and Kligman, A.M. 2003. Acne and Rosacea 3rd ed. Berlin : Springer.
- Potter, S.M., Pertile, J. and Berber-Jimenez, M.D. 1996. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr.* **126**: 2007-2011.
- Punghmatharith, B. 1988. Sex hormone-like substances in young coconut juice and their effects on uterine growth in rats. *Songkhlanakarin J Sci Technol.* **10**: 221-226.
- Punnonen, R. 1972. Effect of castration and peroral estrogen therapy on the skin. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica.* **21**: 3-44.
- Radenahmad, N., Vongvatcharanon, U., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2006. Serum levels of 17beta-estradiol in ovariectomized rats fed young-coconut-juice and its effect on wound healing. *Songkhlanakarin J Sci Technol.* **28**: 897-910.
- Radenahmad, N., Saleh, F., Sawangjaroen, K., Rundorn, W., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2010. Young coconut juice significantly reduces histopathological changes in the brain that are induced by hormonal imbalance: a possible implication to postmenopausal women. *Histol Histopathol.* **24**: 667-674.

- Radenahmad, N., Saleh, F., Sawangjaroen, K., Vongvatcharanon, U., Subhadhirasakul, P., Rundorn, W., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2011. Young coconut juice, a potential therapeutic agent that could significantly reduce some pathologies associated with Alzheimer's disease: novel finding. *Br J Nutr.* **105**: 736-746.
- Rao, C.V., Wang, C.X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. and Reddy, B.S. 1997. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res.* **57**: 3717-3722.
- Rochira, V., Faustini-Fustini, M., Balestrieri, A. and Carani, C. 2000. Estrogen replacement therapy in a man with congenital aromatase deficiency: effect of different doses of transdermal estradiol on bone mineral density and hormonal parameter. *J Chin Endocr Metab*, **85**: 1841-1845.
- Ruiz-Larrea, M.B., Mohan, A.R., Paganga, G., Miller, N.J., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C.A. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* **26**: 63-70.
- Sator, P.G., Schmidt, J.B., Sator, M.O. Huber, J.C. and Honigsmann, H. 2001. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study. *Mituritas.* **39**: 43-55.
- Santoso, U., Kubo, K., Ota, T., Tadokoro, T. and Maekawa, A. 1996. Nutrient composition of *Kopyor* coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chem.* **57**: 299-304.
- Salas, A.L., Ocampo, G., Farina, G.G., Reyes-Esparza, J. and Rodriguez-Fragoso, L. 2007. Genistein decrease liver fibrosis and cholestasis induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Ann Hepatol.* **6**: 41-47.

- Sayoh, I., Radenahmad, N., Sawangjaroen, K., Subhadhirasakul, P., Boonyang, P., Rundurm, W. and Mitranun, W. 2008. Histopathological assessment of young coconut juice on cutaneous wound healing of ovariectomized rats. Proceeding of 31th Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand 2008. Pethburi, Thailand, April 30-May 2, 2008, 62-66.
- Seidenari, S., Pagnoni, A., Di Nardo, A. and Giannetti, A. 1994. Echographic evaluation with image analysis of normal skin: Variations according to age and sex. *Skin Pharmacol.* **7**: 201-209.
- Seidenari, S., Giusti, G., Bertoni, L., Magnoni, C. and Pellacani, G. 2000. Thickness and Echogenicity of the skin in children as assessed by 20-MHz ultrasound. *Dermatol.* **201**: 218-222.
- Setchell, K.D.R. and Lydeking-Olsen, E. 2003. Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observation, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr.* **78**: 593-609.
- Shu, X., Jin, F., Dai, Q., Wen, W., Potter, J.D., Kushi, L.H., Ruan, Z., Gao, Y.T. and Zhen, W. 2001. Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **10**: 483-488.
- Shughrue, P.J. and Merchenthaler, I. 2003. Estrogen prevents the loss of CA1 hippocampal neurons in gerbils after ischemic injury. *Neuroscience.* **116**: 851-861.
- Shutt, D.A. and Cox, R.I. 1972. Steroid and phyto-estrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J Endocrinol.* **52**: 299-310.
- Singer, A.J. and Clark, R.A.F. 1999. Cutaneous wound healing. *New Engl J Med.* **341**: 738-746.

- Sjostrom, L., Smith, U., Krotkiewski, M. and Bjorntorp, P. 1972. Cellularity in different regions of adipose tissue in young men and women. *Metabolis*. **21**: 1143-1153.
- Slemenda CW, Long cope C, Zhou L ,Hui SL, Peacock M and Johnaton , 1997. Sex steroids and bone mass in older man. *J Chin Invest*. **100**: 1755-1759.
- Sordello, S., Bertrand, N. and Plouet, J. 1998. Vascular endothelial growth factor is upregulated in vitro and in vivo by androgens. *Biochem Biophys Res Commun*. **251**: 287-290.
- Sosic-Juejevic, B., Filipopovic, B., Ajdzanivic, V., Brkic, D., Ristic, N., Stojanoski, M.M., Nestorovic, N., Trifunovic, S. and Sekulic, M. 2007. Subcutaneously administered genistein and daidzein decrease serum cholesterol and increase triglyceride levels in male middle-age rats. *Exp Biol Med*. **232**: 1222-1227.
- Steichen, J. and Tsang, R. 1987. Bone mineralization and growth in term infants fed soy-based or cow milk-based formula. *J pediatr Endocrinol*. **110**: 687-692.
- Sugimoto, E. and Yamaguchi, M. 2000. Effect of genistein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Int J Mol Med*. **5**: 515-520.
- Surazynski, A., Jarzabek, K., Haczynski, J., Laudanski, P., Palka, J. and Wolczynski, S. 2003. Differential effects of estradiol and raloxifene on collagen biosynthesis in cultured human skin fibroblasts. *Int J Mol Med*. **12**: 803-809.
- Suwanpal, P., Radenahmad, N., Yusuh, M., Eksomtramate, M., Ruangsri, P. and Chantanasuksilpa, A. 2011. Effects of young coconut juice on increasing mandibular cancellous bone in orchidectomized rats: novel preliminary findings. (submitted).
- Suzuki, H. and Ito, H. 1999. Role of androgen receptor in prostate cancer. *Asian J Androl*. **1**: 81-85.

- Szulc, P., Munoz, F., Claustrat, B., Garuero, P., Marchand, F., Duboeuf, F. and Delmar, P.D. 2001. Bioavailable estradiol may be an important determinant of osteoporosis In men : the MiNOS study . *J Clin Endocr Metab.* **86**: 192-199.
- Tapiero, H., Ba, G.N. and Tew, K.D. 2002. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharm.* **56**: 36-44.
- Taylor, R.J., Taylor, R.D. and Smyth, J.V. 2002. Using an artificial network to predict healing time and risk factors for venous leg ulcers. *J Wound Care.* **11**: 101-105.
- Thornton, M.J., Taylor, A.H., Mulligan, K., Al-Azzawi, F., Lyon, C.C., O'Driscoll, J. and Messenger, A.G. 2003. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol.* **12**: 181-190.
- Thornton, M.J. 2005. Oestrogen functions in skin and appendages. *Expert Opin Ther Targets.* **9**: 617-629.
- Thornton, M.J., Nelson, L.D., Taylor, A.M., Birch, M.P., Laing, T. and Messenger, A.G. 2006. The modulation of aromatase and estrogen receptor  $\alpha$  in cultured human dermal papilla cells by dexamethasone: a novel mechanism for selective action of estrogen via estrogen receptor  $\beta$ . *J Invest Dermatol.* **12**: 2010-2018.
- Tortora, G.J., and Anagnostakos, N.P. 1990. Principles of Anatomy and Physiology, 6<sup>th</sup> Ed. Harper & Row Publishers: New York.
- Toyama, Y. and Yuasa, S. 2004. Effects of neonatal administration of 17 $\beta$ -estradiol,  $\beta$ -estradiol 3-benzoate or bisphenol A on mouse and rat spermatogenesis. *Reprod Toxicol.* **19**: 181-188.
- Trickey, H., Harvey, I., Wilcock, G. and Sharp, D. 1998. Formal consensus and consultation : a qualitative method for development of a guideline for dementia. *Qual Health Care.* **7**: 192-199.



- Tsutsumi, N. 1995. Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. *Biol Pharm Bull.* **18**: 1012-1015.
- Upmalis, D.H., Lobo, R., Bradley, L., Warren, M., Cone, F.L. and Lamia, C.A. 2000. Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause.* **7**: 236-242.
- Vina, J., Borrás, C., Gambini, J., Sastre, J. and Pallardo, F.V. 2005. Why female live longer than male? Importance of the upregulation of longevity-associated genes by Oestrogenic compounds. *FEBS Lett.* **579**: 2541-2545.
- Wagner, J.D., Zhang, L., Greaves, K.A., Shadoan, M.K. and Schwenke, D.C. 2000. Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. *Metabolism.* **49**: 1188-1196.
- Washburn, S., Burke, G.L., Morgan, T. and Anthony, M. 1999. Effect of soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause.* **6**: 7-13.
- Weber, K.S., Setchell, K.D.R., Stocco, D.M. and Lephart, E.D. 2001. Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 $\alpha$ -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol.* **170**: 591-599.
- Werner, S. 1998. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* **9**: 153-165.
- Wu, A.H. 2000. Diet and breast carcinoma in multiethnic populations. *Cancer* **2000**. **88**: 1239-1244.

Yildiz, F. 2006. Phytoestrogens in Functional Foods. Taylor & Francis: Boca Raton.

Yusuh, M., Prochanukoon, N., Radenahmad, N., Eksomtramate, M., Ruangsri, P., Chantanasuksilpa, A. and Nitiruangjaras, A. 2010. Changes of condyle cartilage in orchidectomized rats fed with young coconut juice: novel preliminary findings. *Songklanakarin J Sci Technol*, **32**: 333-339.

Zhang, Y.Q., Shi, J., Rajakumar, G., Day, A.L. and Simpkins, J.W. 1998. Effects of gender and estradiol treatment on focal brain ischemia. *Brain Res.* **784**: 321-324.

Zhang, Q.G., Wang, R., Khan, M., Mahesh, V. and Brann, D.W. 2008. Role of Dickkopf1, an antagonist of the Wnt/beta-catenin signaling pathway, in estrogen-induced neuroprotection and attenuation of tau phosphorylation. *J Neurosci.* **28**: 8430-8441.

Zouboulis, C.C., Chen, W.C., Thorton, M.J., Qin, K. and Rosenfield, R. 2007. Sexual hormones in human skin. *Horm Metab Res.* **39**: 85-95.

Zung, A., Reifen, R., Kerem, Z. and Zadik, Z. 2001. Phytoestrogen: the pediatric perspective. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **33**: 112-118.

**ภาคผนวก**

## การเตรียมสารเคมีเพื่อ凍ตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย LM

### การเตรียม 20% buffered formalin solution

#### สารเคมีที่ใช้

37-40% formaldehyde		19.3	mL
sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )		3.3	g
disodium hydrogen phosphate ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )		12.6	g
distilled water	up to	1000.0	mL

#### วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 800.0 mL ใส่ในขวดเก็บสาร ค่อยๆ เติม  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  จำนวน 3.3 g และ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  จำนวน 12.6 g ลงไป ผสมเข้าด้วยกันโดยใช้เครื่องช่วยผสม
2. เติม 37-40% formaldehyde ปริมาตร 19.3 mL ลงไปในสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 1 ผสมให้เข้ากันดี
3. นำสารละลายที่เตรียมได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000.0 mL วางเก็บไว้ในตู้ดูดควัน พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

### การเตรียม normal saline (0.9% NaCl)

#### สารเคมีที่ใช้

sodium chloride (NaCl)		9.0	g
distilled water		1000.0	mL

#### วิธีการเตรียม

1. ชั่งสาร NaCl จำนวน 9.0 g ใส่ในบีกเกอร์
2. เติมน้ำกลั่นเพื่อช่วยในการละลาย โดยใช้เครื่องช่วยผสม เมื่อละลายเข้ากันดี นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000.0 mL
3. นำสารละลายที่เตรียมได้ มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดเก็บสาร วางเก็บไว้ในชั้นวางสารละลาย พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

**การเตรียม 50% ethyl alcohol****สารเคมีที่ใช้**

95% ethyl alcohol	500.0 mL
distilled water	450.0 mL

**วิธีการเตรียม**

1. ตวง 95% ethyl alcohol ปริมาตร 500.0 mL ใส่ในขวดเก็บสาร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 450.0 mL เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 950.0 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

**การเตรียม 70% ethyl alcohol****สารเคมีที่ใช้**

95% ethyl alcohol	700.0 mL
distilled water	250.0 mL

**วิธีการเตรียม**

1. ตวง 95% ethyl alcohol ปริมาตร 700.0 mL ใส่ในขวดเก็บสาร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 250.0 mL เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 950.0 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

**การเตรียม 80% ethyl alcohol****สารเคมีที่ใช้**

95% ethyl alcohol	800.0 mL
distilled water	150.0 mL

**วิธีการเตรียม**

1. ตวง 95% ethyl alcohol ปริมาตร 800.0 mL ใส่ในขวดเก็บสาร
2. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 150.0 mL เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 950.0 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

## การเตรียมสารเคมีเพื่อย้อมสี hematoxylin & eosin

### การเตรียม Mayer's hematoxylin

#### สารเคมีที่ใช้

hematoxylin	1.0	g
potassium alum	50.0	g
sodium iodate	0.2	g
citric acid	1.0	g
chloral hydrate	50.0	g
distilled water	1000.0	mL

#### วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 900.0 mL ใส่ในบีกเกอร์
2. ค่อยๆ เติม potassium alum จำนวน 50.0 g citric acid จำนวน 1.0 g chloral hydrate จำนวน 50.0 g และ sodium iodate จำนวน 0.2 g. ลงไปตามลำดับ ผสมสารเข้าด้วยกัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม
3. ค่อยๆ เติม hematoxylin จำนวน 1.0 g ลงไปในสารละลายที่เตรียมได้ในข้อ 2 ผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม จะได้สารละลายสีมีสีม่วงแดง
4. นำสารละลายสีที่เตรียมได้มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000.0 mL และเก็บสารละลายสีในขวดเก็บสารสีชา และต้องบ่มให้สุกก่อนนำมาใช้ 2-3 วัน และกรองสารละลายสีก่อนนำมาใช้

### การเตรียม stock eosin solution

#### สารเคมีที่ใช้

eosin Y	10.0	g
95% ethyl alcohol	800.0	mL
distilled water	200.0	mL

#### วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่น ปริมาตร 200.0 mL ใส่ในบีกเกอร์
2. ค่อยๆ เติม eosin จำนวน 10.0 g ลงไป ผสมสารให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม
3. นำสารละลายสีที่เตรียมได้มาปรับปริมาตรด้วย 95% ethyl alcohol ให้ได้ 1000.0 mL
4. นำสารละลายสีที่เตรียมได้มากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดเก็บสาร วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะนำมาใช้

### การเตรียม working eosin solution

#### สารเคมีที่ใช้

stock 1% eosin	1 ส่วน
95% ethyl alcohol	1 ส่วน
acetic acid	0.5 mL/working eosin sol <sup>n</sup> 100 mL

#### วิธีการเตรียม

1. ตวง stock 1% eosin solution ปริมาตร 125.0 mL ใส่ในภาชนะย้อมสี (staining jar)
2. เติม 95 % ethyl alcohol ปริมาตร 125.0 mL ลงไป ผสมให้เข้ากัน
3. ค่อยๆ เติม acetic acid ปริมาตร 1.25 mL ลงไป ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

### การเตรียมสารเคมีเพื่อย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี

#### การเตรียม 0.1 M Tris phosphate buffer

Tris	30	g
NaCl	42	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	7.2	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5	g
Distilled water	6	L
Adjust pH 7.6 with concentrated HCl		

#### การเตรียม 3.0% hydrogen peroxide ใน methanol

##### สารเคมี

Methanol	250	mL
30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	750	μL

##### วิธีการเตรียม

เติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ตามปริมาตรข้างต้นลงใน Methanol และควรเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น

#### การเตรียม 0.3% triton-X100 ใน 0.1 M PBS pH 7.2

##### สารเคมี

0.1 M PBS pH 7.2	250	mL
Triton X-100	750	μL

##### วิธีการเตรียม

เติม Triton X-100 ตามปริมาตรข้างต้นลงใน 0.1 M PBS pH 7.2 และควรเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น



**ข้อมูลเปรียบเทียบ serum E2 และ testosterone ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham/orx

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	13.500	3.500	9.000	4.500
Wilcoxon W	34.500	24.500	24.000	25.500
Z	-.722	-2.478	-1.095	-2.308
Asymp. Sig. (2-tailed)	.470	.013	.273	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.329 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>

sham/orx+EB

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	4.000	3.000	.000	4.500
Wilcoxon W	25.000	24.000	15.000	25.500
Z	-2.242	-2.678	-2.739	-2.308
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.007	.006	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.004 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>

sham/orx+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	9.000	6.500	9.000	3.000
Wilcoxon W	30.000	27.500	24.000	24.000
Z	-1.451	-1.966	-1.095	-2.678
Asymp. Sig. (2-tailed)	.147	.049	.273	.007
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.329 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>

sham/sham+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	15.000	13.500	13.000	17.000
Wilcoxon W	36.000	34.500	28.000	38.000
Z	-.480	-.722	-.365	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.631	.470	.715	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.792 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>

orx/orx+EB

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	4.000	15.000	1.000	17.500
Wilcoxon W	25.000	36.000	22.000	38.500
Z	-2.242	-1.000	-2.722	-.123
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.317	.006	.902
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.004 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>

orx/orx+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	6.000	17.500	13.000	15.000
Wilcoxon W	27.000	38.500	34.000	36.000
Z	-1.925	-.123	-.801	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.054	.902	.423	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>

## orx/sham+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	9.000	3.500	13.000	.000
Wilcoxon W	30.000	24.500	34.000	21.000
Z	-1.441	-2.478	-.801	-2.989
Asymp. Sig. (2-tailed)	.150	.013	.423	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>

## orx+EB/orx+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	.000	15.000	.000	15.000
Wilcoxon W	21.000	36.000	21.000	36.000
Z	-2.887	-1.000	-2.882	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.317	.004	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>

## orx+EB/sham+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	.000	3.000	.000	.000
Wilcoxon W	21.000	24.000	21.000	21.000
Z	-2.882	-2.678	-2.882	-2.989
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.007	.004	.003
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>

orx+YCJ/sham+YCJ

	E7	T7	E14	T14
Mann-Whitney U	9.000	4.500	15.000	.000
Wilcoxon W	30.000	25.500	36.000	21.000
Z	-1.444	-2.308	-.480	-3.077
Asymp. Sig. (2-tailed)	.149	.021	.631	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>

หมายเหตุ

E = Estrogen

T = Testosterone

7 = 7 days

14 = 14 days

a = not corrected for ties

**ข้อมูลเปรียบเทียบ serum E2 และ testosterone ที่ได้รับ treatment เดียวกันระหว่าง  
กลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham7/sham14

	E	T
Mann-Whitney U	10.000	16.500
Wilcoxon W	25.000	37.500
Z	-.913	-.241
Asymp. Sig. (2-tailed)	.361	.810
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.429(a)	.818(a)

orx7/orx14

	E	T
Mann-Whitney U	6.000	17.500
Wilcoxon W	27.000	38.500
Z	-1.922	-.123
Asymp. Sig. (2-tailed)	.055	.902
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065(a)	.937(a)

orx+EB7/orx+EB14

	E	T
Mann-Whitney U	1.000	15.000
Wilcoxon W	22.000	36.000
Z	-2.722	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004(a)	.699(a)

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	E	T
Mann-Whitney U	13.000	15.000
Wilcoxon W	34.000	36.000
Z	-.802	-1.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423	.317
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485(a)	.699(a)

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	E	T
Mann-Whitney U	7.000	13.000
Wilcoxon W	28.000	34.000
Z	-1.761	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.078	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093(a)	.485(a)

**ข้อมูลเปรียบเทียบขนาดของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ERO และ ERβ  
ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham/orx

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	18.000	10.000	16.000	14.000
Wilcoxon W	39.000	31.000	37.000	35.000
Z	.000	-1.281	-.320	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.200	.749	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

sham/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	17.000	4.000	14.000	14.000
Wilcoxon W	38.000	25.000	35.000	35.000
Z	-.160	-2.242	-.641	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.873	.025	.522	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

sham/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	2.000	.000	16.000	12.000
Wilcoxon W	23.000	21.000	37.000	33.000
Z	-2.562	-2.882	-.320	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.010	.004	.749	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.009 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>

sham/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	11.000	11.000	10.000	16.000
Wilcoxon W	32.000	32.000	31.000	37.000
Z	-1.121	-1.121	-1.281	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.262	.262	.200	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>

orx/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	18.000	8.000	13.000	14.000
Wilcoxon W	39.000	29.000	34.000	35.000
Z	.000	-1.601	-.801	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.109	.423	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

orx/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	18.000	8.000	13.000	14.000
Wilcoxon W	39.000	29.000	34.000	35.000
Z	.000	-1.601	-.801	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.109	.423	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>



orx/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	4.000	5.000	16.000	14.000
Wilcoxon W	25.000	26.000	37.000	35.000
Z	-2.242	-2.082	-.320	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.037	.749	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

orx+EB/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	.000	12.000	14.000	14.000
Wilcoxon W	21.000	33.000	35.000	35.000
Z	-2.882	-.961	-.641	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.337	.522	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

orx+EB/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	9.000	14.000	13.000	14.000
Wilcoxon W	30.000	35.000	34.000	35.000
Z	-1.441	-.641	-.801	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.150	.522	.423	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

orx+YCJ/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	14.000	12.000	8.000	16.000
Wilcoxon W	35.000	33.000	29.000	37.000
Z	-.641	-.961	-1.601	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522	.337	.109	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>

Alpha = estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

Beta = estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ )

**ข้อมูลเปรียบเทียบขนาดของ hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  และ ER $\beta$   
ที่ได้รับ treatment เดียวกันระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham7/sham14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	7.000	13.000
Wilcoxon W	28.000	34.000
Z	-1.761	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.078	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093(a)	.485(a)

orx7/orx14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	8.000	17.000
Wilcoxon W	29.000	38.000
Z	-1.601	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132(a)	.937(a)

orx+EB7/orx+EB14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	8.000	12.000
Wilcoxon W	29.000	33.000
Z	-1.601	-.961
Asymp. Sig. (2-tailed)	.109	.337
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.132(a)	.394(a)

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	6.000	.000
Wilcoxon W	27.000	21.000
Z	-1.922	-2.882
Asymp. Sig. (2-tailed)	.055	.004
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065(a)	.002(a)

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	13.000	16.000
Wilcoxon W	34.000	37.000
Z	-.801	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.423	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485(a)	.818(a)

**ข้อมูลเปรียบเทียบจำนวน hair follicles ที่ติดสีย้อม ER $\alpha$  และ ER $\beta$**   
**ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham/orx

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	12.000	.000	187.500	294.500
Wilcoxon W	477.000	465.000	652.500	759.500
Z	-6.493	-6.673	-3.889	-2.303
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.021

sham/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	.000	52.500	227.500	331.500
Wilcoxon W	465.000	517.500	692.500	796.500
Z	-6.670	-5.897	-3.296	-1.755
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.001	.079

sham/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	.000	.000	144.500	233.500
Wilcoxon W	465.000	465.000	609.500	698.500
Z	-6.690	-6.677	-4.528	-3.208
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.001

sham/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	11.000	442.000	289.000	409.000
Wilcoxon W	476.000	907.000	754.000	874.000
Z	-6.513	-.120	-2.387	-.607
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.904	.017	.544

orx/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	200.000	366.500	405.500	407.500
Wilcoxon W	665.000	831.500	870.500	872.500
Z	-3.718	-1.242	-.660	-.629
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.214	.509	.529

orx/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	16.500	245.500	377.500	401.000
Wilcoxon W	481.500	710.500	842.500	866.000
Z	-6.451	-3.049	-1.077	-.726
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.002	.282	.468

orx/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	370.500	.000	308.500	259.000
Wilcoxon W	835.500	465.000	773.500	724.000
Z	-1.185	-6.674	-2.097	-2.827
Asymp. Sig. (2-tailed)	.236	.000	.036	.005

orx+EB/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	101.500	218.000	335.000	316.000
Wilcoxon W	566.500	683.000	800.000	781.000
Z	-5.210	-3.454	-1.708	-1.985
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.001	.088	.047

orx+EB/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	62.000	49.000	339.500	292.000
Wilcoxon W	527.000	514.000	804.500	757.000
Z	-5.774	-5.951	-1.637	-2.339
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.102	.019

orx+YCJ/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	.000	.000	226.000	209.500
Wilcoxon W	465.000	465.000	691.000	674.500
Z	-6.693	-6.679	-3.323	-3.561
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.001	.000

Alpha = estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

Beta = estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ )

**ข้อมูลเปรียบเทียบจำนวน hair follicles ที่ติดสีย้อม  $ER\alpha$  และ  $ER\beta$   
ที่ได้รับ treatment เดียวกันระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham7/sham14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	345.500	271.500
Wilcoxon W	810.500	736.500
Z	-.503	-1.756
Asymp. Sig. (2-tailed)	.615	.079

orx7/orx14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	316.000	350.000
Wilcoxon W	641.000	675.000
Z	-1.001	-.424
Asymp. Sig. (2-tailed)	.317	.672

orx+EB7/orx+EB14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	292.500	333.500
Wilcoxon W	757.500	798.500
Z	-1.400	-.703
Asymp. Sig. (2-tailed)	.162	.482



orx+YCJ7/orx+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	161.500	266.500
Wilcoxon W	486.500	591.500
Z	-3.660	-1.843
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.065

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	461.500	387.000
Wilcoxon W	926.500	852.000
Z	-2.875	-3.615
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.000

ข้อมูลเปรียบเทียบความหนาของผิวหนังชั้นต่าง ๆ ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham7/sham14

	epidermis	dermis	hypodermis
Mann-Whitney U	4802.500	430.000	9530.500
Wilcoxon W	1.613E4	1.176E4	20855.500
Z	-8.582	-14.403	-2.289
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.022

orx7/orx14

	epidermis	dermis	hypodermis
Mann-Whitney U	1.021E4	9.604E3	8276.500
Wilcoxon W	2.154E4	2.093E4	19601.500
Z	-1.381	-2.191	-3.958
Asymp. Sig. (2-tailed)	.167	.028	.000

orx+EB7/orx+EB14

	epidermis	dermis	hypodermis
Mann-Whitney U	4144.500	5.286E3	9548.500
Wilcoxon W	1.547E4	1.661E4	20873.500
Z	-9.458	-7.938	-2.265
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.024

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	epidermis	dermis	hypodermis
Mann-Whitney U	1.008E4	6.568E3	6863.500
Wilcoxon W	2.140E4	1.789E4	18188.500
Z	-1.561	-6.232	-5.839
Asymp. Sig. (2-tailed)	.118	.000	.000

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	epidermis	dermis	hypodermis
Mann-Whitney U	9736.500	8.786E3	10296.500
Wilcoxon W	2.106E4	2.011E4	21621.500
Z	-2.015	-3.281	-1.269
Asymp. Sig. (2-tailed)	.044	.001	.204

ข้อมูลเปรียบเทียบความหนาของผิวหนังชั้นต่าง ๆ ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham/orx

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	10272.500	1368.000	2131.500	4860.500	9338.500	2281.000
Wilcoxon W	21597.500	12693.000	13456.500	16185.500	20663.500	13606.000
Z	-1.301	-13.154	-12.138	-8.505	-2.544	-11.939
Asymp. Sig. (2-tailed)	.193	.000	.000	.000	.011	.000

sham/orx+EB

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	6052.500	.000	10979.500	4327.000	6098.000	8284.000
Wilcoxon W	17377.500	11325.000	22304.500	15652.000	17423.000	19609.000
Z	-6.919	-14.975	-.360	-9.215	-6.858	-3.948
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.719	.000	.000	.000

sham/orx+YCJ

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	9451.500	306.000	10000.000	6683.500	7232.000	9375.000
Wilcoxon W	20776.500	11631.000	21325.000	18008.500	18557.000	20700.000
Z	-2.394	-14.568	-1.664	-6.079	-5.348	-2.496
Asymp. Sig. (2-tailed)	.017	.000	.096	.000	.000	.013

sham/sham+YCJ

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	3548.500	2907.000	10780.500	7798.500	7256.000	9510.000
Wilcoxon W	14873.500	14232.000	22105.500	19123.500	18581.000	20835.000
Z	-10.252	-11.106	-.625	-4.594	-5.316	-2.316
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.532	.000	.000	.021

## orx/orx+EB

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	7039.000	1766.000	1306.000	9745.000	5193.000	6909.000
Wilcoxon W	18364.000	13091.000	12631.000	21070.000	16518.000	18234.000
Z	-5.605	-12.624	-13.237	-2.003	-8.063	-5.778
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.045	.000	.000

## orx/orx+YCJ

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	10306.500	10655.000	1444.500	10742.000	6841.500	1779.500
Wilcoxon W	21631.500	21980.000	12769.500	22067.000	18166.500	13104.500
Z	-1.256	-.792	-13.052	-.676	-5.868	-12.606
Asymp. Sig. (2-tailed)	.209	.428	.000	.499	.000	.000

## orx/sham+YCJ

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	5426.500	8128.000	.000	6292.000	8366.500	182.000
Wilcoxon W	16751.500	19453.000	11325.000	17617.000	19691.500	11507.000
Z	-7.752	-4.156	-14.975	-6.600	-3.838	-14.733
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.000	.000

## orx+EB/orx+YCJ

	epidermis7	dermis7	hypodermis7	epidermis14	dermis14	hypodermis14
Mann-Whitney U	7417.500	1607.500	9866.000	10206.000	9737.000	4554.000
Wilcoxon W	18742.500	12932.500	21191.000	21531.000	21062.000	15879.000
Z	-5.102	-12.835	-1.842	-1.390	-2.014	-8.913
Asymp. Sig. (2-tailed)	.000	.000	.065	.165	.044	.000



ข้อมูลเปรียบเทียบความถี่และความกว้างของแผลของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham7/sham14

	WW	WD
Mann-Whitney U	155.000	129.000
Wilcoxon W	326.000	300.000
Z	-.221	-1.044
Asymp. Sig. (2-tailed)	.825	.296
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.839 <sup>a</sup>	.308 <sup>a</sup>

orx7/orx14

	WW	WD
Mann-Whitney U	127.000	98.000
Wilcoxon W	298.000	269.000
Z	-1.107	-2.025
Asymp. Sig. (2-tailed)	.268	.043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.279 <sup>a</sup>	.044 <sup>a</sup>

orx+EB7/orx+EB14

	WW	WD
Mann-Whitney U	156.000	158.000
Wilcoxon W	327.000	329.000
Z	-.190	-.127
Asymp. Sig. (2-tailed)	.849	.899
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.864 <sup>a</sup>	.913 <sup>a</sup>

## orx+YCJ7/orx+YCJ14

	WW	WD
Mann-Whitney U	57.000	29.000
Wilcoxon W	228.000	200.000
Z	-3.322	-4.208
Asymp. Sig. (2-tailed)	.001	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.001 <sup>a</sup>	.000 <sup>a</sup>

## sham+YCJ7/sham+YCJ14

	WW	WD
Mann-Whitney U	139.000	91.000
Wilcoxon W	310.000	262.000
Z	-.728	-2.246
Asymp. Sig. (2-tailed)	.467	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.481 <sup>a</sup>	.024 <sup>a</sup>

WD = wound depth

WW = wound width

ข้อมูลเปรียบเทียบความลึกและความกว้างของแผลของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham/orx

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	143.500	117.500	118.000	105.500
Wilcoxon W	314.500	288.500	289.000	276.500
Z	-.585	-1.408	-1.392	-1.788
Asymp. Sig. (2-tailed)	.558	.159	.164	.074
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.563 <sup>a</sup>	.161 <sup>a</sup>	.171 <sup>a</sup>	.074 <sup>a</sup>

sham/orx+EB

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	119.000	108.000	153.000	133.000
Wilcoxon W	290.000	279.000	324.000	304.000
Z	-1.360	-1.708	-.285	-.918
Asymp. Sig. (2-tailed)	.174	.088	.776	.359
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.181 <sup>a</sup>	.091 <sup>a</sup>	.791 <sup>a</sup>	.372 <sup>a</sup>

sham/orx+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	141.000	71.000	43.000	56.500
Wilcoxon W	312.000	242.000	214.000	227.500
Z	-.664	-2.879	-3.765	-3.338
Asymp. Sig. (2-tailed)	.506	.004	.000	.001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.521 <sup>a</sup>	.003 <sup>a</sup>	.000 <sup>a</sup>	.001 <sup>a</sup>



## sham/sham+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	125.000	106.500	92.500	122.000
Wilcoxon W	296.000	277.500	263.500	293.000
Z	-1.171	-1.756	-2.199	-1.266
Asymp. Sig. (2-tailed)	.242	.079	.028	.206
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.252 <sup>a</sup>	.079 <sup>a</sup>	.027 <sup>a</sup>	.214 <sup>a</sup>

## orx/orx+EB

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	132.000	151.000	145.000	139.000
Wilcoxon W	303.000	322.000	316.000	310.000
Z	-.949	-.348	-.538	-.728
Asymp. Sig. (2-tailed)	.343	.728	.591	.467
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.355 <sup>a</sup>	.743 <sup>a</sup>	.606 <sup>a</sup>	.481 <sup>a</sup>

## orx/orx+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	155.000	104.000	56.000	66.000
Wilcoxon W	326.000	275.000	227.000	237.000
Z	-.221	-1.835	-3.354	-3.037
Asymp. Sig. (2-tailed)	.825	.066	.001	.002
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.839 <sup>a</sup>	.068 <sup>a</sup>	.001 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>

## orx/sham+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	141.500	149.000	119.000	123.000
Wilcoxon W	312.500	320.000	290.000	294.000
Z	-.649	-.411	-1.360	-1.234
Asymp. Sig. (2-tailed)	.517	.681	.174	.217
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.521 <sup>a</sup>	.696 <sup>a</sup>	.181 <sup>a</sup>	.226 <sup>a</sup>

## orx+EB/orx+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	140.000	125.000	60.500	95.000
Wilcoxon W	311.000	296.000	231.500	266.000
Z	-.696	-1.171	-3.212	-2.120
Asymp. Sig. (2-tailed)	.486	.242	.001	.034
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.501 <sup>a</sup>	.252 <sup>a</sup>	.001 <sup>a</sup>	.034 <sup>a</sup>

## orx+EB/sham+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	148.000	162.000	108.500	143.000
Wilcoxon W	319.000	333.000	279.500	314.000
Z	-.443	.000	-1.693	-.601
Asymp. Sig. (2-tailed)	.658	1.000	.090	.548
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.673 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.091 <sup>a</sup>	.563 <sup>a</sup>

## orx+YCJ/sham+YCJ

	WD7	WW7	WD14	WW14
Mann-Whitney U	134.000	118.000	81.000	15.000
Wilcoxon W	305.000	289.000	252.000	186.000
Z	-.886	-1.392	-2.563	-4.651
Asymp. Sig. (2-tailed)	.376	.164	.010	.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.389 <sup>a</sup>	.171 <sup>a</sup>	.010 <sup>a</sup>	.000 <sup>a</sup>

WD7 = wound depth 7 days

WW7 = wound width 7 days

WD14 = wound depth 14 days

WW14 = wound width 14 days

**ข้อมูลเปรียบเทียบความเข้มของการติดสีย้อม ER $\alpha$  และ ER $\beta$**   
**ของกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham/orx

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	16.000	15.000	11.000	13.500
Wilcoxon W	37.000	36.000	32.000	34.500
Z	-.361	-.638	-1.185	-.802
Asymp. Sig. (2-tailed)	.718	.523	.236	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818(a)	.699(a)	.310(a)	.485(a)

sham/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	7.500	12.000	15.500	16.000
Wilcoxon W	28.500	33.000	36.500	37.000
Z	-2.021	-1.173	-.412	-.365
Asymp. Sig. (2-tailed)	.043	.241	.680	.715
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.093(a)	.394(a)	.699(a)	.818(a)

sham/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	15.500	15.000	15.000	15.500
Wilcoxon W	36.500	36.000	36.000	36.500
Z	-.527	-.638	-.518	-.433
Asymp. Sig. (2-tailed)	.598	.523	.604	.665
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699(a)	.699(a)	.699(a)	.699(a)

sham/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	12.500	18.000	17.500	16.000
Wilcoxon W	33.500	39.000	38.500	37.000
Z	-1.354	.000	-.086	-.365
Asymp. Sig. (2-tailed)	.176	1.000	.931	.715
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394(a)	1.000(a)	.937(a)	.818(a)

orx/orx+EB

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	12.000	15.000	8.500	15.000
Wilcoxon W	33.000	36.000	29.500	36.000
Z	-1.038	-.561	-1.586	-.561
Asymp. Sig. (2-tailed)	.299	.575	.113	.575
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394(a)	.699(a)	.132(a)	.699(a)

orx/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	18.000	18.000	6.000	16.500
Wilcoxon W	39.000	39.000	27.000	37.500
Z	.000	.000	-2.152	-.267
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	1.000	.031	.789
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)	1.000(a)	.065(a)	.818(a)

orx/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	16.000	15.000	10.000	15.000
Wilcoxon W	37.000	36.000	31.000	36.000
Z	-.361	-.638	-1.441	-.561
Asymp. Sig. (2-tailed)	.718	.523	.150	.575
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818(a)	.699(a)	.240(a)	.699(a)

orx+EB/orx+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	10.500	15.000	16.000	17.000
Wilcoxon W	31.500	36.000	37.000	38.000
Z	-1.369	-.561	-.349	-.178
Asymp. Sig. (2-tailed)	.171	.575	.727	.859
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240(a)	.699(a)	.818(a)	.937(a)

orx+EB/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	12.000	12.000	13.000	18.000
Wilcoxon W	33.000	33.000	34.000	39.000
Z	-1.173	-1.173	-.862	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.241	.241	.389	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394(a)	.394(a)	.485(a)	1.000(a)

orx+YCJ/sham+YCJ

	alpha7	beta7	alpha14	beta14
Mann-Whitney U	15.500	15.000	13.000	17.000
Wilcoxon W	36.500	36.000	34.000	38.000
Z	-.527	-.638	-.962	-.178
Asymp. Sig. (2-tailed)	.598	.523	.336	.859
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699(a)	.699(a)	.485(a)	.937(a)

Alpha = estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )

Beta = estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ )

(a) = not corrected for ties

**ข้อมูลเปรียบเทียบความเข้มของการติดสีย้อม  $ER\alpha$  และ  $ER\beta$  ที่ได้รับ treatment**  
**เดียวกันระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham7/sham14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	16.000	17.500
Wilcoxon W	37.000	38.500
Z	-.360	-.096
Asymp. Sig. (2-tailed)	.719	.923
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818(a)	.937(a)

orx7/orx14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	11.000	15.000
Wilcoxon W	32.000	36.000
Z	-1.187	-.561
Asymp. Sig. (2-tailed)	.235	.575
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310(a)	.699(a)

orx+EB7/orx+EB14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	18.000	15.000
Wilcoxon W	39.000	36.000
Z	.000	-.561
Asymp. Sig. (2-tailed)	1.000	.575
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	1.000(a)	.699(a)

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	13.000	17.000
Wilcoxon W	34.000	38.000
Z	-.962	-.178
Asymp. Sig. (2-tailed)	.336	.859
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485(a)	.937(a)

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	alpha	beta
Mann-Whitney U	15.500	15.000
Wilcoxon W	36.500	36.000
Z	-.527	-.638
Asymp. Sig. (2-tailed)	.598	.523
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699(a)	.699(a)



ข้อมูลเปรียบเทียบน้ำหนักหนูขาววันแรกและวันสุดท้ายของการทดลอง  
ในกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham/orx

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	6.000	11.500	10.500	11.500
Wilcoxon W	27.000	32.500	31.500	32.500
Z	-1.328	-.107	-1.203	-1.043
Asymp. Sig. (2-tailed)	.184	.915	.229	.297
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.257(a)	.914(a)	.240(a)	.310(a)

sham/orx+EB

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	15.000	18.000	5.000	7.500
Wilcoxon W	36.000	39.000	26.000	28.500
Z	-.489	.000	-2.096	-1.687
Asymp. Sig. (2-tailed)	.625	1.000	.036	.092
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699(a)	1.000(a)	.041(a)	.093(a)

sham/orx+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	11.000	9.500	4.500	13.000
Wilcoxon W	32.000	30.500	25.500	34.000
Z	-1.141	-1.373	-2.169	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.254	.170	.030	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310(a)	.180(a)	.026(a)	.485(a)

## sham/sham+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	5.500	16.500	13.000	14.000
Wilcoxon W	26.500	37.500	34.000	35.000
Z	-2.056	-.241	-.801	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.040	.810	.423	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.041(a)	.818(a)	.485(a)	.589(a)

## orx/orx+EB

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	11.000	11.500	13.000	8.500
Wilcoxon W	21.000	21.500	34.000	29.500
Z	-.213	-.107	-.806	-1.527
Asymp. Sig. (2-tailed)	.831	.915	.420	.127
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.914(a)	.914(a)	.485(a)	.132(a)

## orx/orx+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	7.000	4.500	10.500	16.000
Wilcoxon W	28.000	25.500	31.500	37.000
Z	-1.066	-1.609	-1.212	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.286	.108	.226	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.352(a)	.114(a)	.240(a)	.818(a)

## orx/sham+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	5.500	8.000	15.500	17.000
Wilcoxon W	26.500	18.000	36.500	38.000
Z	-1.407	-.858	-.401	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.159	.391	.688	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.171(a)	.476(a)	.699(a)	.937(a)

## orx+EB/orx+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	4.000	7.000	13.500	10.000
Wilcoxon W	25.000	28.000	34.500	31.000
Z	-2.242	-1.771	-.728	-1.290
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.077	.466	.197
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026(a)	.093(a)	.485(a)	.240(a)

## orx+EB/sham+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	3.000	16.000	17.500	9.000
Wilcoxon W	24.000	37.000	38.500	30.000
Z	-2.419	-.321	-.081	-1.444
Asymp. Sig. (2-tailed)	.016	.748	.936	.149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015(a)	.818(a)	.937(a)	.180(a)

orx+YCJ/sham+YCJ

	started7	killed7	started14	killed14
Mann-Whitney U	17.500	1.500	14.500	16.500
Wilcoxon W	38.500	22.500	35.500	37.500
Z	-.081	-2.651	-.565	-.241
Asymp. Sig. (2-tailed)	.936	.008	.572	.810
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937(a)	.004(a)	.589(a)	.818(a)

Started = วันแรกเริ่มของการทดลอง

Killed = วันสุดท้ายของการทดลอง (วันฆ่าหนู)

ข้อมูลเปรียบเทียบน้ำหนักหนูขาววันแรกและวันสุดท้ายของการทดลองที่ได้รับ  
treatment เดียวกันระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน

sham7/sham14

	started	wounded	killed
Mann-Whitney U	15.500	8.000	9.500
Wilcoxon W	36.500	29.000	30.500
Z	-.408	-1.601	-1.363
Asymp. Sig. (2-tailed)	.683	.109	.173
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.699(a)	.132(a)	.180(a)

orx7/orx14

	started	wounded	killed
Mann-Whitney U	10.500	7.000	12.000
Wilcoxon W	20.500	17.000	33.000
Z	-.321	-1.066	.000
Asymp. Sig. (2-tailed)	.748	.286	1.000
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.762(a)	.352(a)	1.000(a)

orx+EB7/orx+EB14

	started	wounded	killed
Mann-Whitney U	9.500	10.000	11.000
Wilcoxon W	30.500	31.000	32.000
Z	-1.373	-1.283	-1.123
Asymp. Sig. (2-tailed)	.170	.199	.261
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180(a)	.240(a)	.310(a)

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	started	wounded	killed
Mann-Whitney U	1.000	7.000	11.000
Wilcoxon W	22.000	28.000	32.000
Z	-2.727	-1.764	-1.123
Asymp. Sig. (2-tailed)	.006	.078	.261
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.004(a)	.093(a)	.310(a)

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	started	wounded	killed
Mann-Whitney U	6.000	8.000	11.500
Wilcoxon W	27.000	29.000	32.500
Z	-1.935	-1.601	-1.043
Asymp. Sig. (2-tailed)	.053	.109	.297
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065(a)	.132(a)	.310(a)

Started = วันแรกเริ่มของการทดลอง

Wounded = วันทำแผลมาตรฐาน

Killed = วันสุดท้ายของการทดลอง (วันฆ่าหนู)

(a) = not corrected for ties

ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเคมีคลินิกของหนูขาวเพศผู้ที่ได้รับ treatment กลุ่ม 7 วัน

sham/orx

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	12.500	6.000	17.000	8.000	10.500	2.000	3.500	5.000	9.000	10.000	14.000
Wilcoxon W	33.500	27.000	38.000	29.000	31.500	23.000	24.500	26.000	30.000	31.000	35.000
Z	-.882	-1.922	-.162	-1.604	-1.225	-2.672	-2.330	-2.100	-.640	-1.281	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.378	.055	.871	.109	.221	.008	.020	.036	.522	.200	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.394 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.009 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.610 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>

sham/orx+EB

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	13.500	16.000	15.000	17.500	9.000	.000	13.500	6.500	14.000	.000	10.500
Wilcoxon W	34.500	37.000	36.000	38.500	30.000	21.000	34.500	27.500	35.000	21.000	31.500
Z	-.722	-.320	-.484	-.080	-1.454	-2.966	-.727	-1.851	-.641	-2.882	-1.203
Asymp. Sig. (2-tailed)	.470	.749	.629	.936	.146	.003	.467	.064	.522	.004	.229
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.485 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>

sham/orx+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	9.500	14.000	16.000	12.000	13.500	17.000	8.500	12.000	16.500	6.000	6.000
Wilcoxon W	30.500	35.000	37.000	33.000	34.500	38.000	29.500	33.000	37.500	27.000	27.000
Z	-1.363	-.641	-.321	-.966	-.730	-.192	-1.527	-.964	-.241	-1.922	-1.922
Asymp. Sig. (2-tailed)	.173	.522	.748	.334	.466	.847	.127	.335	.810	.055	.055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.180 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>

sham/sham+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	6.000	15.500	5.000	8.000	3.000	9.000	5.500	10.000	13.000	6.000	10.000
Wilcoxon W	27.000	36.500	26.000	29.000	24.000	30.000	26.500	31.000	34.000	21.000	31.000
Z	-1.922	-.401	-2.093	-1.610	-2.428	-1.682	-2.009	-1.297	-.365	-1.643	-1.281
Asymp. Sig. (2-tailed)	.055	.688	.036	.107	.015	.093	.045	.195	.715	.100	.200
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.792 <sup>a</sup>	.126 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>



orx/orx+EB

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	17.500	9.000	15.500	13.500	13.500	16.500	4.000	15.500	10.000	8.000	8.500
Wilcoxon W	38.500	30.000	36.500	34.500	34.500	37.500	25.000	36.500	20.000	29.000	29.500
Z	-.080	-1.441	-.404	-.722	-.732	-.254	-2.262	-.407	-.426	-1.601	-1.524
Asymp. Sig. (2-tailed)	.936	.150	.686	.470	.464	.799	.024	.684	.670	.109	.128
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.762 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>

orx/orx+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	17.500	6.000	16.500	13.000	7.000	2.000	1.000	4.000	6.000	12.000	1.000
Wilcoxon W	38.500	27.000	37.500	34.000	28.000	23.000	22.000	25.000	27.000	33.000	22.000
Z	-.080	-1.922	-.241	-.801	-1.780	-2.667	-2.732	-2.250	-1.279	-.961	-2.722
Asymp. Sig. (2-tailed)	.936	.055	.810	.423	.075	.008	.006	.024	.201	.337	.006
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.009 <sup>a</sup>	.004 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.257 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.004 <sup>a</sup>

orx/sham+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	4.000	7.000	6.500	2.000	.000	.500	.000	4.500	9.000	11.000	4.000
Wilcoxon W	25.000	28.000	27.500	23.000	21.000	21.500	21.000	25.500	24.000	26.000	25.000
Z	-2.242	-1.761	-1.851	-2.562	-2.898	-2.922	-2.892	-2.185	-.245	-.730	-2.242
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.078	.064	.010	.004	.003	.004	.029	.806	.465	.025
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.009 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.905 <sup>a</sup>	.537 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>

orx+EB/orx+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	16.500	14.000	14.000	16.500	4.000	.000	5.000	4.000	10.000	13.500	17.000
Wilcoxon W	37.500	35.000	35.000	37.500	25.000	21.000	26.000	25.000	31.000	34.500	38.000
Z	-.241	-.641	-.643	-.241	-2.254	-2.961	-2.089	-2.250	-1.281	-.722	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.810	.522	.520	.810	.024	.003	.037	.024	.200	.470	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>

orx+EB/sham+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	3.500	17.500	7.500	7.500	.000	.000	.500	4.500	13.500	15.000	17.000
Wilcoxon W	24.500	38.500	28.500	28.500	21.000	21.000	21.500	25.500	28.500	30.000	38.000
Z	-2.326	-.080	-1.696	-1.684	-2.898	-3.017	-2.817	-2.185	-.274	.000	-.160
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020	.936	.090	.092	.004	.003	.005	.029	.784	1.000	.873
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.002 <sup>a</sup>	.026 <sup>a</sup>	.792 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>

orx+YCJ/sham+YCJ

	cholesterol	triglyceride	HDL	LDL	BUN	creatinine	Total protein	albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	3.500	12.000	7.500	7.500	6.000	11.500	14.000	17.000	10.000	15.000	13.000
Wilcoxon W	24.500	33.000	28.500	28.500	27.000	32.500	35.000	38.000	31.000	30.000	34.000
Z	-2.326	-.961	-1.687	-1.684	-1.939	-1.158	-.643	-.162	-.913	.000	-.801
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020	.337	.092	.092	.053	.247	.520	.872	.361	1.000	.423
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.015 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.429 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>

**ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเคมีคลินิกของหนูชาวเพศผู้ที่ได้รับ treatment กลุ่ม 14 วัน**

sham/orx

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	11.000	15.000	17.000	15.500	16.000	11.000	11.000	16.500	15.000	15.500	17.000
Wilcoxon W	32.000	36.000	38.000	36.500	37.000	32.000	32.000	37.500	36.000	36.500	38.000
Z	-1.121	-.481	-.160	-.408	-.320	-1.129	-1.125	-.241	-.485	-.401	-.161
Asymp. Sig. (2-tailed)	.262	.630	.873	.684	.749	.259	.261	.810	.628	.688	.872
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.310 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>

sham/orx+EB

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	10.500	12.000	17.500	12.000	12.000	6.000	16.500	10.000	14.500	7.500	7.000
Wilcoxon W	31.500	33.000	38.500	33.000	33.000	27.000	37.500	31.000	35.500	28.500	28.000
Z	-1.212	-.961	-.080	-.969	-.961	-1.928	-.241	-1.290	-.587	-1.684	-1.761
Asymp. Sig. (2-tailed)	.226	.337	.936	.332	.337	.054	.810	.197	.557	.092	.078
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>

sham/orx+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	10.000	16.000	11.000	14.500	17.000	11.000	15.000	15.500	16.500	9.000	16.000
Wilcoxon W	31.000	37.000	32.000	35.500	38.000	32.000	36.000	36.500	37.500	30.000	37.000
Z	-1.281	-.320	-1.121	-.571	-.160	-1.125	-.480	-.401	-.247	-1.441	-.321
Asymp. Sig. (2-tailed)	.200	.749	.262	.568	.873	.261	.631	.688	.805	.150	.748
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>

sham/sham+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	6.000	15.000	16.000	15.500	6.500	8.500	18.000	13.500	15.500	8.000	6.000
Wilcoxon W	27.000	36.000	37.000	36.500	27.500	29.500	39.000	34.500	36.500	29.000	27.000
Z	-1.922	-.480	-.320	-.404	-1.845	-1.535	.000	-.727	-.406	-1.607	-1.922
Asymp. Sig. (2-tailed)	.055	.631	.749	.686	.065	.125	1.000	.467	.685	.108	.055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.132 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>

orx/orx+EB

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	16.000	14.000	18.000	14.000	15.000	6.500	12.500	5.000	14.000	5.500	7.000
Wilcoxon W	37.000	35.000	39.000	35.000	36.000	27.500	33.500	26.000	35.000	26.500	28.000
Z	-.321	-.645	.000	-.642	-.480	-1.848	-.884	-2.100	-.653	-2.012	-1.768
Asymp. Sig. (2-tailed)	.748	.519	1.000	.521	.631	.065	.377	.036	.514	.044	.077
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.093 <sup>a</sup>

orx/orx+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	14.000	14.000	11.000	13.000	16.000	14.000	10.000	18.000	14.500	12.500	16.500
Wilcoxon W	35.000	35.000	32.000	34.000	37.000	35.000	31.000	39.000	35.500	33.500	37.500
Z	-.641	-.642	-1.121	-.803	-.320	-.642	-1.281	.000	-.565	-.882	-.241
Asymp. Sig. (2-tailed)	.522	.521	.262	.422	.749	.521	.200	1.000	.572	.378	.810
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.589 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	1.000 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>

orx/sham+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	10.000	16.500	16.500	16.500	5.000	16.500	9.000	9.000	13.000	5.500	5.000
Wilcoxon W	31.000	37.500	37.500	37.500	26.000	37.500	30.000	30.000	34.000	26.500	26.000
Z	-1.281	-.241	-.241	-.241	-2.082	-.241	-1.441	-1.454	-.808	-2.012	-2.082
Asymp. Sig. (2-tailed)	.200	.810	.810	.810	.037	.810	.150	.146	.419	.044	.037
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>	.041 <sup>a</sup>

orx+EB/orx+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	17.500	17.000	11.000	15.000	10.000	3.000	16.000	9.000	17.500	12.500	9.500
Wilcoxon W	38.500	38.000	32.000	36.000	31.000	24.000	37.000	30.000	38.500	33.500	30.500
Z	-.080	-.161	-1.121	-.481	-1.281	-2.410	-.321	-1.449	-.083	-.882	-1.363
Asymp. Sig. (2-tailed)	.936	.872	.262	.630	.200	.016	.748	.147	.934	.378	.173
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.937 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.240 <sup>a</sup>	.015 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>

orx+EB/sham+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	10.000	14.000	16.000	12.000	15.000	9.000	15.000	9.500	17.000	17.500	11.500
Wilcoxon W	31.000	35.000	37.000	33.000	36.000	30.000	36.000	30.500	38.000	38.500	32.500
Z	-1.283	-.641	-.320	-.962	-.480	-1.444	-.481	-1.388	-.162	-.080	-1.043
Asymp. Sig. (2-tailed)	.199	.522	.749	.336	.631	.149	.630	.165	.871	.936	.297
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.240 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.180 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.937 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>

orx+YCJ/sham+YCJ

	BUN	Creatinine	AST	ALT	ALP	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	Total protein	Albumin
Mann-Whitney U	16.000	16.000	11.000	14.000	6.000	16.500	13.500	12.500	16.500	15.000	6.500
Wilcoxon W	37.000	37.000	32.000	35.000	27.000	37.500	34.500	33.500	37.500	36.000	27.500
Z	-.320	-.320	-1.121	-.641	-1.922	-.241	-.722	-.884	-.243	-.482	-1.845
Asymp. Sig. (2-tailed)	.749	.749	.262	.522	.055	.810	.470	.377	.808	.630	.065
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.818 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.310 <sup>a</sup>	.589 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.485 <sup>a</sup>	.394 <sup>a</sup>	.818 <sup>a</sup>	.699 <sup>a</sup>	.065 <sup>a</sup>



**ข้อมูลเปรียบเทียบค่าเคมีคลินิกของหนูขาวที่ได้รับ treatment เดียวกันระหว่างกลุ่ม 7 วันและ 14 วัน**

sham7/sham14

	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	BUN	Creatinine	Total protein	Albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	.000	11.500	.000	.000	16.000	.000	14.500	14.500	9.500	.000	15.000
Wilcoxon W	21.000	32.500	21.000	21.000	37.000	21.000	35.500	35.500	30.500	21.000	36.000
Z	-2.887	-1.043	-2.882	-2.898	-.321	-2.939	-.561	-.562	-1.363	-2.903	-.480
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.297	.004	.004	.748	.003	.575	.574	.173	.004	.631
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002(a)	.310(a)	.002(a)	.002(a)	.818(a)	.002(a)	.589(a)	.589(a)	.180(a)	.002(a)	.699(a)

orx7/orx14

	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	BUN	Creatinine	Total protein	Albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	.000	5.000	.000	.000	6.000	1.500	11.500	18.000	10.000	1.000	6.000
Wilcoxon W	21.000	26.000	21.000	21.000	27.000	22.500	32.500	39.000	31.000	22.000	27.000
Z	-2.882	-2.082	-2.892	-2.882	-1.925	-2.661	-1.048	.000	-1.281	-2.722	-1.922
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.037	.004	.004	.054	.008	.295	1.000	.200	.006	.055
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002(a)	.041(a)	.002(a)	.002(a)	.065(a)	.004(a)	.310(a)	1.000(a)	.240(a)	.004(a)	.065(a)

orx+EB7/orx+EB14

	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	BUN	Creatinine	Total protein	Albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	4.000	7.000	.000	.000	2.000	.000	.500	.000	4.000	.000	14.000
Wilcoxon W	25.000	28.000	21.000	21.000	23.000	21.000	21.500	21.000	25.000	21.000	35.000
Z	-2.246	-1.764	-2.887	-2.903	-2.571	-2.908	-2.812	-2.887	-2.242	-2.887	-.641
Asymp. Sig. (2-tailed)	.025	.078	.004	.004	.010	.004	.005	.004	.025	.004	.522
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.026(a)	.093(a)	.002(a)	.002(a)	.009(a)	.002(a)	.002(a)	.002(a)	.026(a)	.002(a)	.589(a)

orx+YCJ7/orx+YCJ14

	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	BUN	Creatinine	Total protein	Albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	.000	6.000	.000	2.000	13.500	.000	2.000	9.500	5.000	2.500	16.000
Wilcoxon W	21.000	27.000	21.000	23.000	34.500	21.000	23.000	30.500	26.000	23.500	37.000
Z	-2.887	-1.922	-2.882	-2.567	-.722	-2.934	-2.567	-1.366	-2.082	-2.486	-.320
Asymp. Sig. (2-tailed)	.004	.055	.004	.010	.470	.003	.010	.172	.037	.013	.749
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.002(a)	.065(a)	.002(a)	.009(a)	.485(a)	.002(a)	.009(a)	.180(a)	.041(a)	.009(a)	.818(a)

sham+YCJ7/sham+YCJ14

	Cholesterol	Triglyceride	HDL	LDL	BUN	Creatinine	Total protein	Albumin	AST	ALT	ALP
Mann-Whitney U	6.500	11.000	.000	.000	11.000	.000	.000	.000	8.500	1.000	1.500
Wilcoxon W	27.500	32.000	21.000	21.000	32.000	21.000	21.000	21.000	29.500	22.000	22.500
Z	-1.845	-1.121	-2.892	-2.892	-1.125	-2.989	-2.898	-2.903	-1.524	-2.722	-2.647
Asymp. Sig. (2-tailed)	.065	.262	.004	.004	.261	.003	.004	.004	.128	.006	.008
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.065(a)	.310(a)	.002(a)	.002(a)	.310(a)	.002(a)	.002(a)	.002(a)	.132(a)	.004(a)	.004(a)

**ตารางแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกของเลือดในหนูที่ได้รับ treatment 7 วัน**

	ผลการวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกของเลือดหนูในกลุ่ม 7 วัน				
	sham	orx	orx+EB	orx+YCJ	sham+YCJ
Cholesterol (mg%)	81.00±4.4	88.83±6.2	88.00±6.6	89.17±6.1	64.50±4.9 <sup>+</sup>
Triglyceride (mg%)	119.00±13.6	78.50±9.5	113.83±19.1	137.00±26.2	112.83±16.6
HDL (mg%)	21.00±1.1	21.33±1.6	20.33±1.2	21.50±1.8	17.33±1.3*
LDL (mg%)	36.17±3.8	51.83±6.0	44.83±8.7	40.50±6.7	24.50±3.9 <sup>+</sup>
AST (U/L)	187.00±36.7	307.67±123.5	224.17±27.1	167.83±28.6	391.17±191.0
ALT (U/L)	237.00±20.3	186.67±33.7	123.00±14.5**	150.50±30.2	198.83±51.8
ALP (U/L)	204.50±15.9	223.17±10.9	162.00±26.4	161.50±7.9 <sup>++</sup>	175.17±14.5 <sup>+</sup>
Total protein (g%)	6.37±0.2	7.20±0.2*	6.60±0.1 <sup>+</sup>	5.85±0.2 <sup>++</sup>	5.58±0.2 <sup>*,++</sup>
Albumin (g%)	3.20±0.1	3.72±1.2*	3.62±0.1	3.00±0.2 <sup>+</sup>	3.00±0.2 <sup>+</sup>
BUN (mg%)	22.50±1.3	24.33±1.2	24.67±0.8	21.00±1.0	17.83±1.0 <sup>*,++</sup>
Creatinine (mg%)	0.47±0.0	0.65±0.0**	0.67±0.0**	0.45±0.0 <sup>++</sup>	0.42±0.0 <sup>++</sup>

หมายเหตุ แสดงเป็นค่า mean±SEM และค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตั้งสัญลักษณ์ต่อไปนี้  
 \* และ \*\* คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม sham โดยมีค่า p value ที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ  
 + และ ++ คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม orx โดยมีค่า p value ที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ

**ตารางแสดงผลการตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกของเลือดในหนูที่ได้รับ treatment 14 วัน**

	ผลการวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกของเลือดหนูในกลุ่ม 14 วัน				
	sham	orx	orx+EB	orx+YCJ	sham+YCJ
Cholesterol (mg%)	41.50±5.0	50.00±3.5	63.33±5.1	48.00±3.5	50.83±4.0
Triglyceride (mg%)	92.17±26.3	58.83±9.2	72.67±18.8	65.00±8.5	83.17±15.0
HDL (mg%)	44.17±6.4	39.00±2.4	53.17±5.5 <sup>+</sup>	40.67±4.8	43.67±2.5
LDL (mg%)	8.83±0.9	10.83±2.1	8.33±0.7	9.33±1.6	8.17±0.8
AST (U/L)	116.80±21.62	125.70±33.1	118.33±24.5	92.60±16.9	144.17±39.9
ALT (U/L)	53.50±4.5	58.70±6.3	51.17±2.8	43.40±11.4	59.00±8.9
ALP (U/L)	186.20±31.9	163.00±27.5	144.17±35.7	167.00±31.5	104.50±15.6 <sup>+</sup>
Total protein (g%)	6.80±0.4	6.90±0.2	8.47±0.7 <sup>+</sup>	7.80±0.5	8.60±1.1 <sup>+</sup>
Albumin (g%)	4.40±0.8	4.50±0.9	6.60±0.2	4.80±0.8	6.90±0.2 <sup>+</sup>
BUN (mg%)	22.90±1.2	21.10±1.1	20.70±1.1	18.50±2.1	19.27±1.1
Creatinine (mg%)	0.90±0.1	0.90±0.1	0.99±0.1	0.90±0.1	0.94±0.0

หมายเหตุ แสดงเป็นค่า mean±SEM และค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญตั้งสัญลักษณ์ต่อไปนี้

\* และ \*\* คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม sham โดยมีค่า p value ที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ

+ และ ++ คือ การเปรียบเทียบผลการทดลองกับกลุ่ม orx โดยมีค่า p value ที่ p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นายมุฮัมมัดบาคอรี ยูโซ๊ะ	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5010220103	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วท.บ. (จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการการศึกษา)

สถานวิจัยผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและอาหารเพื่อสุขภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
ปีการศึกษา 2551-2553

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Yusuh, M., Radenahmad, N., Sawangjaroen, K., Kirirat, P. and Boonyang, P. Effects of Young Coconut Juice on the Cutaneous Healing of Orchidectomized Rat Wounds. Proceedings of the 33<sup>rd</sup> Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand 2010. Khao Yai, Nakhornratchasima, Thailand, April 28-30, 2010.

Yusuh, M., Phochanukoon, N., Radenahmad, N., Eksomtramate, M., Ruangsri, P., Chantanasuksilpa, A. and Nitiruangjaras, A. 2010. Changes of condyle cartilage in orchidectomized rats fed with young coconut juice: novel preliminary findings. *Songklanakarin J Sci Technol.* **32**: 333-339.

Suwanpal, P., Radenahmad, N., Yusuh, M., Eksomtramate, M., Ruangsri, P. and Chantanasuksilpa, A. 2011. Effects of young coconut juice on increasing mandibular cancellous bone in orchidectomized rats: novel preliminary findings. (submitted).