



ผลของการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อโครงสร้างและการทำงานของ
กล้ามเนื้อลายของหนูขาวใหญ่ที่ถูกตัดรังไข่
**Effects of Estrogen Replacement on Morphology and Function of
Skeletal Muscles of Ovariectomized Rat**

ศุจิรัตน์ บุญรัมย์

Suchirat Bunratsami

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**

2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลายของหนูขาวใหญ่ที่ถูกตัดรังไข่

ผู้เขียน นางสาวศุจิรัตน์ บุญรัมย์

สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์) (รองศาสตราจารย์ทวีพร ประลัมภ์กาญจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

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

.....กรรมการ
(ดร.วันดี อุดมอักษร)

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

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

.....กรรมการ
(ดร.วันดี อุดมอักษร)
.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.ทพ.สุรพงษ์ วงศ์วัชรานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

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

ชื่อวิทยานิพนธ์	ผลของการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลายของหนูขาวใหญ่ที่ถูกตัดรังไข่
ผู้เขียน	นางสาวศุภิณี บุณรัตน์
สาขาวิชา	กายวิภาคศาสตร์
ปีการศึกษา	2554

บทคัดย่อ

ในสตรีวัยหมดประจำเดือน ซึ่งเป็นภาวะที่รังไข่ทำงานลดลง มักพบภาวะที่มีการสูญเสียมวลและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (sarcopenia) การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนส่งผลให้ความแข็งแรงและประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อลดลง ซึ่งกลไกในการทำให้เกิด sarcopenia ในสตรีวัยหมดประจำเดือนนั้นยังไม่มี การอธิบาย การศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลของการตัดรังไข่ และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อ พื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ การเปลี่ยนแปลงของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ และโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius โดยศึกษาในหนูขาวใหญ่ พันธุ์ Wistar เพศเมีย อายุ 12 สัปดาห์ แบ่งเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (Sham) กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในขนาด 10 มคก./กก. (E10) , 20 มคก./กก. (E20) และ 40 มคก./กก. (E40) เป็นเวลา 10 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน พื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ แรงหดตัวของกล้ามเนื้อ และความทนทานของกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทั้งสามกลุ่ม มีพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ แรงหดตัวของกล้ามเนื้อ ความเร็วในการคลายตัว และความทนทานของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นใกล้เคียงปกติ นอกจากนี้ กลุ่ม OVX พบปฏิกิริยาอิมมูโนของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ชนิดแอลฟา และเบต้า และระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินลดลง ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนทั้งสามกลุ่ม มีปฏิกิริยาอิมมูโนของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ทั้งสองชนิด และระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับปกติ อธิบายได้ว่า การลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนและเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง อาจส่งผลให้การสร้างโปรตีนต่างๆ ภายในกล้ามเนื้อลดลง ทำให้ขนาดของกล้ามเนื้อ และโปรตีนพาร์วัลบูมินลดลง การลดลงของพาร์วัลบูมินส่งผลให้ประสิทธิภาพการคลายตัวของกล้ามเนื้อลดลง ทำให้การหดตัวครั้งใหม่ลดลงด้วย จึงทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อลดลง ซึ่งอาจจะนำมาใช้ในการอธิบายกลไกของการเกิด sarcopenia ในสตรีวัยหมดประจำเดือน ในขณะที่การ

ให้ออร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณสูง (20 และ 40 มกก./กก.) ทำให้ขนาดพื้นที่หน้าตัด
ประสิทธิภาพการทำงาน และปริมาณโปรตีนพาร์วัลบูมิน ของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น

Thesis Title Effects of Estrogen Replacement on Morphology and Function of Skeletal Muscles of Ovariectomized Rat

Author Miss Suchirat Bunratsami

Major Program Anatomy

Academic Year 2011

ABSTRACT

Menopause is a result of ovarian hypofunction, believed to underlie muscle weakness and loss of muscle mass because of estrogen deprivation. This loss may contribute to a decrease of muscle strength and muscle function. The mechanism of sarcopenia in menopause remains unclear. The aim of this study was to investigate the effect of ovariectomy and various doses of estrogen replacements on estrogen and estrogen receptors levels, muscle size, muscle function and parvalbumin levels of EDL and gastrocnemius muscles. Twelve-week old female Wistar rats were randomly divided into 5 groups ; sham operated, ovariectomized (OVX), OVX groups that received 10 weeks estrogen replacement of 10 µg/kg (E10), 20 µg/kg (E20) and 40 µg/kg (E40). The results showed that the estrogen levels, myofiber cross-sectional areas, force and fatigue resistance were significantly reduced in the OVX group compared to those of the sham group ($p<0.05$). Estrogen replacements tended to increase myofiber cross-sectional areas, improve the muscle functions and relaxation time. Moreover the results demonstrated that the α and β estrogen receptors immunoreactivity was decreased in the OVX groups and restored in the estrogen replacement groups. Parvalbumin levels was significantly reduced in the OVX group ($p<0.05$) whereas in the estrogen replacement groups there was significantly increase of parvalbumin levels compared to that of the OVX group ($p<0.05$) and similar to that of the sham group. The results demonstrated that a decrease of estrogen levels may lead to a reduction of estrogen receptors. A decline of both estrogen and estrogen receptors may result in a decrease of gene expression leading to a decline in muscle protein synthesis that cause a reduction of muscle size and parvalbumin levels. A decrease of parvalbumin levels results in a decrease of relaxation efficiency which leads to slow contraction. This cause a decrease of muscle function. This may be used to explain the

mechanism of sarcopenia in menopause whereas high dose of estrogen replacements (20 and 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$) restored muscle size, muscle function and parvalbumin levels.

สารบัญ

	หน้า
รายการรูป	(9)
รายการตาราง	(12)
คำย่อ และสัญลักษณ์	(13)
1. บทนำ	1
2. วิธีการวิจัย	22
3. ผลการทดลอง	43
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	68
5. บทสรุป และข้อเสนอแนะ	74
บรรณานุกรม	76
ภาคผนวก ก	86
ภาคผนวก ข	93
ประวัติผู้เขียน	102

รายการรูป

รูปที่		หน้า
บทที่ 1		
1-1	กระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่	7
1-2	ปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ	8
1-3	กลไกการทำงานของเอสโตรเจนต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ	10
1-4	แผนผังโครงสร้างของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์	12
1-5	กลไกการทำงานของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์วิถีต่างๆ	14
1-6	แสดงลักษณะของ thick และ thin filament	16
1-7	กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อ	16
1-8	โครงสร้างของพาร์วัลบูมิน	18
1-9	การทำงานของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลาย	19
1-10	จลนศาสตร์ของการจับและปล่อยแมกนีเซียมและแคลเซียมของพาร์วัลบูมิน	20
บทที่ 2		
2-1	แสดงการฉีดยาสลบทางช่องท้อง การผูกไหมห้ามเลือดก่อนตัดรังไข่ การตัดรังไข่ออกจากตัว และการเย็บปิดแผล	30
2-2	แสดงการดูดเสมหะหลังผ่าตัด และการให้ยาแก้ปวดหลังจากหนูรู้สึกตัว	30
2-3	แสดงการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยฉีดใต้ผิวหนัง	31
2-4	แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ	34
2-5	แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius โดยกระตุ้น radial nerve, sciatic nerve และกล้ามเนื้อโดยตรง	34
2-6	แสดงการวัดขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อลาย	36
บทที่ 3		
3-1	แสดงระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม	46
3-2	แสดงเส้นบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเดี่ยวในกลุ่ม Sham, OVX และ E20	47
3-3	แสดงเส้นบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นต่อเนื่องในกลุ่ม Sham, OVX และ E20	47

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-4	แสดงแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) ของกล้ามเนื้อ EDL ของหนูแต่ละกลุ่ม	48
3-5	แสดงแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) ของกล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	49
3-6	แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัว (contraction time) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	50
3-7	แสดงเวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง (one-half relaxation time) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	50
3-8	แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง (time to peak tension) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	51
3-9	แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนล้าเหลือ 25% ของแรงสูงสุด (time to fatigue) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	52
3-10	แสดงความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่องของกล้ามเนื้อ EDL ของหนูแต่ละกลุ่ม	53
3-11	แสดงความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่องของกล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	53
3-12	แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม	54
3-13	แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40 ด้วยการย้อมแบบ H&E	55
3-14	แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40 ด้วยการย้อมแบบ H&E	56
3-15	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลาย	57
3-16	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3-17	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α ที่พบในนิวเคลียสของ เซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	59
3-18	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ที่พบในนิวเคลียสของ เซลล์กล้ามเนื้อลาย	60
3-19	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ที่พบในนิวเคลียสของ เซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	61
3-20	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ที่พบในนิวเคลียสของ เซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	62
3-21	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ parvalbumin ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ กล้ามเนื้อลาย	63
3-22	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ parvalbumin ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	64
3-23	แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ parvalbumin ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham, OVX, E10, E20 และ E40	65
3-24	ภาพแถบโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อ EDL แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ย ความเข้มของแถบโปรตีน parvalbumin และแผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์ของ ความเข้มเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham	66
3-25	ภาพแถบโปรตีน parvalbumin ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius แผนภูมิแสดง ค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีน parvalbumin และแผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์ ของความเข้มเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham	67

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
บทที่ 1		
1-1	แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆ ในกระแสเลือดในสตรีวัย หมดระดูเปรียบเทียบกับวัยเจริญพันธุ์	5
1-2	แสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อ 3 ชนิด	17
บทที่ 3		
3-1	แสดงน้ำหนักตัว อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือน น้ำหนักมดลูก น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius และน้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัว ของหนู แต่ละกลุ่ม	45

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

สตรีวัยหมดประจำเดือน (menopause) คือสตรีที่เข้าสู่ระยะสิ้นสุดการมีระดูอย่างถาวร เนื่องจากรังไข่หยุดทำงาน ซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาหนึ่งในกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาซึ่งเป็นไปตามธรรมชาติ จากสตรีในวัยเจริญพันธุ์เข้าสู่วัยซึ่งรังไข่หมดความสามารถในการเจริญพันธุ์ และการสร้างฮอร์โมนเพศลดลง (กอบจิตต์, 2543) ช่วงวัยหมดประจำเดือนจะมีฮอร์โมนเอสโตรเจนน้อยลง ร่วมกับระดับฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่สูงขึ้น และระดับฮอร์โมนแอนโดรเจนลดลง (Brys et al., 2009) อายุเฉลี่ยของสตรีที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือนอยู่ระหว่าง 47-50 ปี ในปัจจุบันมีสตรีที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจำนวนมากขึ้น เป็นผลมาจากอายุขัยของประชากรที่เพิ่มมากขึ้น จึงมีแนวโน้มที่สตรีต้องใช้ชีวิตในช่วงวัยหมดประจำเดือนยาวนานขึ้น (นิมิต, 2543) จากการประมาณการณ์อายุขัยเฉลี่ยของประชากรสตรีในประเทศไทยพบว่า เพิ่มจาก 68.05 ปี ในปี พ.ศ. 2523-2528 มาเป็น 73.55 ปี ในปี พ.ศ. 2548-2553 (Alpha Research, 1994) และจากประมาณการณ์ขององค์การสหประชาชาติพบว่า สัดส่วนของผู้สูงอายุทั่วโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยคาดว่าสัดส่วนของผู้สูงอายุในประเทศไทยจะเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 3.3 ในปี พ.ศ. 2528 ไปเป็นร้อยละ 4.5 และ 9.1 ในปี พ.ศ. 2543 และ 2568 ตามลำดับ (United Nations Department for International Economic and Social Affairs, 1985) ซึ่งการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือนนั้น ทำให้ร่างกายมีการเปลี่ยนแปลงในทางเสื่อมถอยหลายระบบ ในระบบกล้ามเนื้อพบว่า การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนมีความสัมพันธ์กับการถดถอยของกล้ามเนื้อในสตรีวัยหมดประจำเดือน โดยจากการศึกษาของ Phillips และคณะ (1993) พบว่าความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ adductor pollicis ในสตรีวัยหมดประจำเดือนลดลงเป็นอย่างมาก สาเหตุอาจเกิดจากการลดลงของมวลกล้ามเนื้อ หรือที่เรียกว่า sarcopenia ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อได้ (Kjaer, 2001) และภาวะนี้พบมากในผู้สูงอายุ ส่งผลให้การเคลื่อนไหวต่างๆ ทำได้ลำบากขึ้น ความคล่องตัวลดลง และเสี่ยงต่อการหกล้ม ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุลดลง (Baumgartner et al., 1998) และมีการศึกษาพบว่า สตรีวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนนั้น มีความแข็งแรงของกล้ามเนื้อมากกว่าสตรีที่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทน (Phillips et al., 1993; Heikkinen et al., 1997) และจากการศึกษาความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อของหนูเพศเมียพบว่า กล้ามเนื้อลายของหนูที่ถูกตัดรังไข่มีแรงในการหดตัวน้อยกว่าหนูที่ไม่ถูกตัดรังไข่ และในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่แล้วได้ฮอร์โมนทดแทนจะมีแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อมากขึ้น (Moran et

al., 2007) และจากการศึกษาการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อที่ฝ่อในหนูพบว่า ในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ มีการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อที่ฝ่อช้ากว่ากลุ่มหนูที่ไม่ถูกตัดรังไข่ แสดงว่าฮอร์โมนเพศมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างมวลกล้ามเนื้อ (Fisher et al., 1998; Brown et al., 2005; Sitnick et al., 2006) และพบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนมีการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อที่ฝ่อเร็วกว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่แต่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทน (McClung et al., 2006a) นอกจากนี้ จากการศึกษาซึ่งพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ที่นิวเคลียสในเซลล์กล้ามเนื้อลายของคน ทั้งชนิดแอลฟา และเบต้า ซึ่งพบทั้งในเพศหญิงและเพศชาย (Wiik et al., 2009) และนอกจากนี้ กล้ามเนื้อลายยังมีเอสโตรเจน รีเซพเตอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ในไซโตพลาสซึม และบนเยื่อหุ้ม นิวเคลียสด้วย และเชื่อว่าเอสโตรเจนมีผลโดยตรงต่อกล้ามเนื้อผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ชนิดแอลฟา (Brown, 2008) และมีการศึกษาพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ในกล้ามเนื้อลายในหนู (Dahlberg, 1982; Lemoine et al., 2002) หมู (Kalbe et al., 2007) แกะ (Frey et al., 1990) กระต่าย (Gustafsson et al., 1984; Saartok, 1984) วัว (Pfaffl et al., 2001) และไก่ (Cooke et al., 2003) จึงนำไปสู่การตั้งสมมติฐานว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ในการอธิบายว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อลายลดลงนั้นได้มีการอธิบายว่า การลดลงของเอสโตรเจน ทำให้การทำปฏิกิริยาระหว่างแอกตินกับไมโอซินลดลง แต่ปริมาณของแอกตินและไมโอซินไม่เปลี่ยนแปลง (Moran et al., 2006) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Lexell (1995) พบว่า ในสตรีวัยสูงอายุมีขนาดของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) เล็กลง ในขณะที่เส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) ได้รับผลกระทบจากอายุน้อยกว่า และมีจำนวนของเส้นใยกล้ามเนื้อลดลง โดยเฉพาะเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) และจากการศึกษาของ Brown (2008) พบว่า เส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) มีเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ชนิดแอลฟา มาก และพบว่ามันจะเริ่มฝ่อตั้งแต่อายุ 50 ปี ขณะที่เส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) ยังมีจำนวนมาก จึงบอกได้ว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจทำให้มีการสูญเสียเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) และจากการศึกษาของ Kadi และคณะ (2002) พบว่า การตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย ทำให้ myosin heavy chain ชนิดหดตัวเร็วเปลี่ยนไปเป็น myosin heavy chain ชนิดหดตัวช้า ทั้งในกล้ามเนื้อ extensor digitorum longus ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่หดตัวเร็ว และ soleus ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่หดตัวช้า แต่เมื่อนำหนูที่ถูกตัดรังไข่มาวิ่งและให้ฮอร์โมนทดแทน กล้ามเนื้อทั้งสองมัดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว การลดจำนวนลงของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) ทำให้กล้ามเนื้อมีคุณสมบัติของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) เด่นขึ้น ทำให้การหดตัวของกล้ามเนื้อช้าลงตามมา การเกิดแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อลดลง และความสามารถในการเคลื่อนไหวลดลง (Lee et al., 2007) ซึ่งจากการศึกษาของ McCormick และคณะ (2004) ได้เสนอแนะว่าการที่ประสิทธิภาพการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อ

เปลี่ยนแปลง จากผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหรือโครงสร้างอื่นๆ ภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแคลเซียม (calcium transport) ซึ่ง พาร์วัลบูมิน (parvalbumin) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียม (Ca^{2+} binding protein) โดยที่พาร์วัลบูมินจะทำหน้าที่ดึงแคลเซียมไอออนออกจากโทรโปนินซี (troponin C) และส่งแคลเซียมกลับเข้าสู่ซาร์โคพลาสมิก เรติคูลัม (sarcoplasmic reticulum) ซึ่งมีผลทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว ดังนั้นการคลายตัวจึงขึ้นอยู่กับอัตราการจับของแคลเซียมไอออนกับพาร์วัลบูมิน และเป็นกระบวนการที่ไม่ต้องใช้พลังงาน (Berchtold et al., 2000) การคลายตัวเร็วจะทำให้การหดตัวครั้งใหม่เร็วขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพาร์วัลบูมิน จึงส่งผลโดยตรงกับประสิทธิภาพการหดตัวและการคลายตัวของกล้ามเนื้อ และจากการศึกษาของ Schmitt และ Pette (1991) ได้เปรียบเทียบปริมาณพาร์วัลบูมินในเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละชนิด พบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) มีปริมาณพาร์วัลบูมินน้อย ส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) มีปริมาณพาร์วัลบูมินมาก ซึ่งถ้าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้ขนาดและจำนวนของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) ลดลง น่าจะมีผลทำให้ปริมาณพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลดลงเช่นกัน มีการศึกษาผลของอายุต่อปริมาณพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ extensor digitorum longus (EDL) พบว่าปริมาณพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อจะลดลง เมื่อหนูมีอายุมากขึ้น (Cai et al., 2001) ซึ่งยังไม่มีการศึกษาว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจน จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของพาร์วัลบูมินด้วยหรือไม่ ดังนั้นจึงนำไปสู่ความสนใจที่จะศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อการทำงานของกล้ามเนื้อลาย และระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ extensor digitorum longus (EDL) และกล้ามเนื้อ gastrocnemius ซึ่งกล้ามเนื้อทั้งสองชนิด เป็นกล้ามเนื้อที่มีเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว ซึ่งเป็นเส้นใยกล้ามเนื้อที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (strength) (Ahmed et al., 2005) และกล้ามเนื้อทั้งสองชนิดมีปริมาณพาร์วัลบูมินในปริมาณมาก (Heizmann et al., 1982)

2. การตรวจเอกสาร

2.1 วัยหมดประจำเดือน

วัยหมดประจำเดือน (menopause) คือ ช่วงเวลาของการสิ้นสุดการมีประจำเดือนอย่างถาวร เนื่องจากรังไข่หยุดทำงาน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ขาดประจำเดือนไปแล้วอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 เดือน โดยปราศจากพยาธิสภาพต่อการหมดประจำเดือน (Utian, 2004) และถือว่าการมีประจำเดือนครั้งสุดท้ายเป็นเวลาที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน ดังนั้น สตรีที่มีประจำเดือนมาครั้งสุดท้ายเมื่ออายุเท่าใด จะถือว่าเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนเมื่ออายุนั้น ซึ่งอายุเฉลี่ยของสตรีที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจะอยู่ระหว่าง 47-50 ปี (นิมิต, 2543) สตรีในวัยนี้จะมีระดับฮอร์โมนเพศลดลง ทั้งเอสโตรเจน โปรเจสเตอโรน และแอนโดรเจน ทำให้เกิดความเสื่อมของร่างกายหลายระบบ เช่น ระบบสืบพันธุ์ ระบบขับถ่ายปัสสาวะ ระบบหัวใจและหลอดเลือด เกิดภาวะกระดูกพรุน เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของร่างกายเหล่านี้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นค่อยไป (วารุณี และพิชิต, 2543) ส่วนการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้งสองข้างนั้น ถือว่าเป็นการหมดประจำเดือนจากการผ่าตัด (induced menopause) (Utian, 2004) ซึ่งในสตรีที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้งสองข้าง จะมีระดับเอสโตรเจนและเทสโทสเตอโรนลดลงอย่างฉับพลัน ซึ่งอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของร่างกายมากกว่าการหมดประจำเดือนตามธรรมชาติ และมีอาการของวัยหมดประจำเดือนที่รุนแรงกว่า (นิมิต, 2543) สำหรับวัยหมดประจำเดือนในหนูเป็นหนูที่มีอายุอยู่ในช่วง 450 - 540 วัน (Durbin et al., 1966) แต่หนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างสามารถนำมาใช้เป็นโมเดลของสตรีวัยหมดประจำเดือนได้เช่นกัน เนื่องจากการสูญเสียหน้าที่ในระบบสืบพันธุ์ และมีการเปลี่ยนแปลงของระบบต่างๆ เหมือนสตรีวัยหมดประจำเดือน (Bellino, 2000)

ในสตรีวัยเจริญพันธุ์ ชนิดของเอสโตรเจนที่มีบทบาท และมีฤทธิ์มากที่สุดคือ เอสตราไดออล ซึ่งร้อยละ 95 สร้างมาจากรังไข่ ที่เหลือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงภายนอก รังไข่ (peripheral conversion) ได้แก่ ไขมัน เป็นต้น แต่เมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน รังไข่จะสูญเสียฟอลลิเคิล (ovarian follicle) ทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถสร้างเอสโตรเจนต่อไปได้อีก ทำให้ระดับเอสโตรเจนลดลง โดยอยู่ในรูปของเอสโตรนมากกว่าเอสตราไดออล ซึ่งเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือนนั้นจะเปลี่ยนแปลงมาจากแอนโดรสตีโรนไดโอนและเทสโทสเตอโรน ซึ่งอยู่ในกลุ่มของแอนโดรเจน และมักเกิดในเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) ซึ่งในวัยหมดประจำเดือนยังมี stromal cell ของรังไข่ และต่อมหมวกไตที่สามารถสร้างแอนโดรเจนได้ สตรีวัยหมดประจำเดือนจะมีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนต่างๆ ดังตารางที่ 1-1

ตารางที่ 1-1 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนชนิดต่างๆ ในกระแสเลือดในสตรีวัยหมดระดูเปรียบเทียบกับวัยเจริญพันธุ์ (นิมิต, 2543)

ชนิดของฮอร์โมน	วัยเจริญพันธุ์	วัยหมดระดู
เอสตราไดอล (estradiol)	40-400 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร	10-20 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร
เอสโตรน (estrone)	30-200 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร	30-70 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร
เทสโทสเตอโรน (testosterone)	20-80 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร	15-70 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร
แอนโดรสตีไนด์ไอออน (androstenedione)	60-300 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร	30-150 นาโนกรัมต่อเดซิลิตร

2.2 sarcopenia

sarcopenia เป็นภาวะที่มีการสูญเสียมวลและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ซึ่งจะพบมากขึ้นเมื่อมีอายุมากขึ้น จึงพบมากในผู้สูงอายุ ทำให้กล้ามเนื้อสูญเสียการทำงาน เคลื่อนไหวได้ลำบากขึ้น ส่งผลให้การทรงตัวเสียไป เสี่ยงต่อการหกล้มและเกิดอุบัติเหตุได้ง่าย (Kjaer, 2001) เกิดจากหลายสาเหตุ เช่น ทูพโภชนาการ สารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น หรือการเคลื่อนไหวร่างกายลดลงเมื่ออายุมากขึ้น หรือเกิดโรคเรื้อรัง และอาจเกิดจากความผิดปกติของการเผาผลาญโปรตีน (protein metabolism) ความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine system) การสูญเสียหน้าที่ของระบบประสาทและกล้ามเนื้อ (neuromuscular system) การแสดงออกของยีนลดลง แต่ปัจจัยด้านพันธุกรรมที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของมวลและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็นยีนชนิดใด การตายของเซลล์ (apoptosis) การอักเสบ (inflammation) เป็นต้น (Morley, 2001; Leeuwenburgh, 2003; Lee et al., 2007)

ในวัยสูงอายุ จะมีการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ เนื่องจากเซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดและจำนวนลดลง โดยเฉพาะเซลล์กล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) ทำให้ความเร็วและแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อลดลง ทำให้การเคลื่อนไหวของแขนขาช้าลง และอ่อนแรงลง นอกจากนี้ยังมีจำนวน satellite cell ลดลง ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการบาดเจ็บได้ง่าย ซึ่งกลไกการเกิด sarcopenia ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่มีการเสนอแนะว่า การขาดฮอร์โมนเพศ มีความสัมพันธ์กับการเสื่อมของมวลกล้ามเนื้อตามอายุ (sarcopenia) (Lee et al., 2007; Brown, 2008)

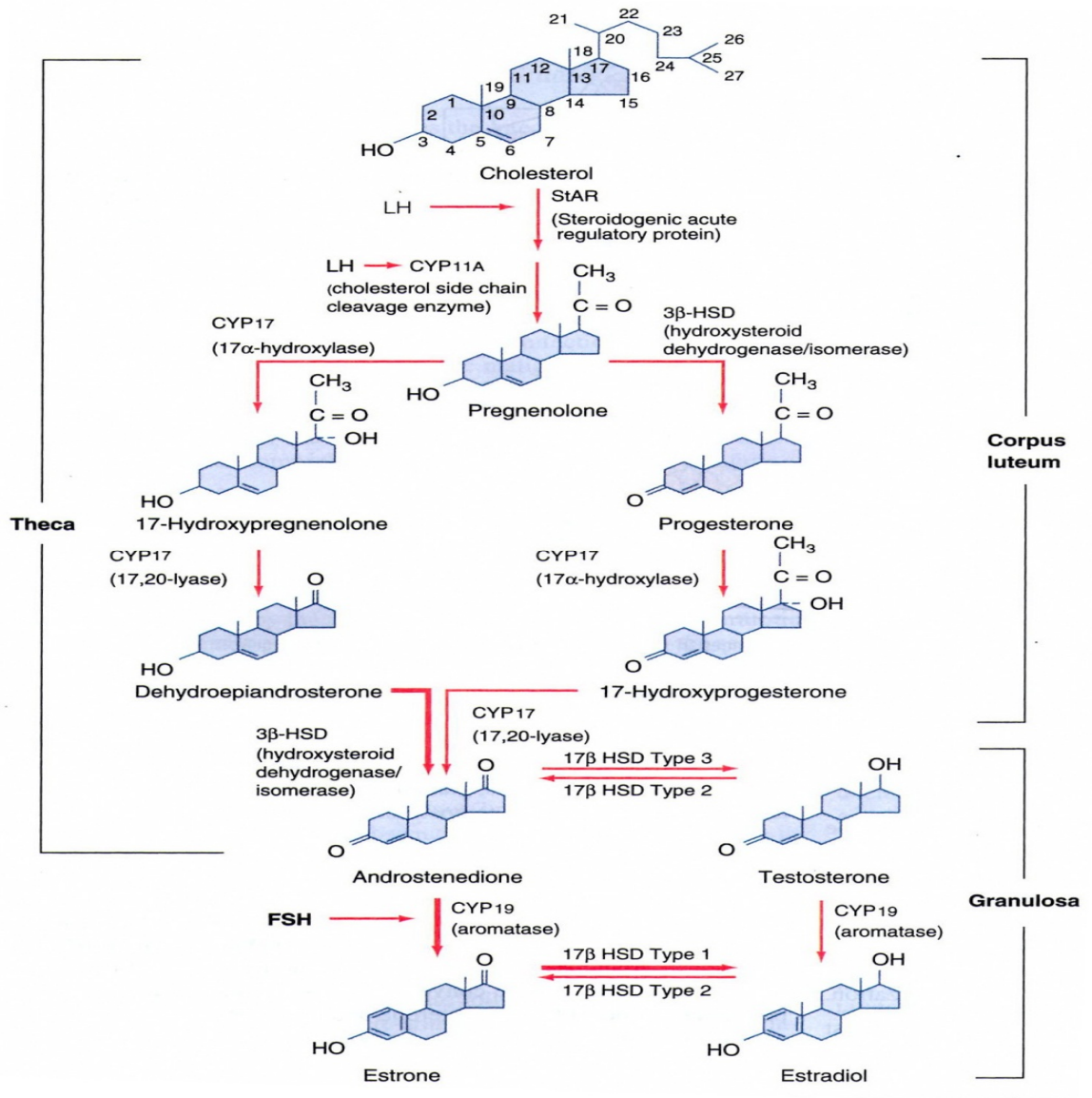
เมื่ออายุมากขึ้น จะประสบกับภาวะเสี่ยงต่อการเป็น sarcopenia เนื่องจากอายุมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนต่างๆ ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของโปรตีน การสังเคราะห์โปรตีน เช่น โกรทฮอร์โมน (growth hormone),

เทสโทสเตอโรน (testosterone) และ insulin-like growth factor (IGF-1) โดยระดับฮอร์โมนจะลดลง ทำให้มวลกล้ามเนื้อลดลง และไขมันในร่างกายเพิ่มขึ้น (Biesiada, 1999)

ภาวะการสูญเสียความแข็งแรงของกล้ามเนื้อจากอายุในผู้หญิงนั้น พบว่ามีเพิ่มมากขึ้นในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน โดยจากการศึกษาของ Phillips และคณะ (1993) พบว่าความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ adductor pollicis ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนลดลงเป็นอย่างมากเมื่อเทียบกับผู้ชาย ซึ่งการลดลงของความแข็งแรงของกล้ามเนื้อในผู้หญิงเกิดได้เร็วกว่าผู้ชาย ซึ่งอาจเกิดจากการลดลงของฮอร์โมนเพศหญิง

2.3 ฮอร์โมนเพศที่มีบทบาทต่อกล้ามเนื้อลาย

ฮอร์โมนเพศที่มีบทบาทต่อการทำงานของกล้ามเนื้อลาย ได้แก่ เอสโตรเจน แอนโดรเจน และโปรเจสเทอโรน ซึ่งฮอร์โมนทั้งสามชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) เป็นกลุ่มฮอร์โมนที่มีสูตรโครงสร้างของสเตียรอยด์ โดยถูกสังเคราะห์มาจากโคเลสเตอรอล (cholesterol) ดังรูปที่ 1-1 ทำให้มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน และสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปออกฤทธิ์ภายในเซลล์เป้าหมายได้ (ธีรยศ, 2542) ฮอร์โมนทั้งสามชนิดมีหน้าที่ในการเจริญและพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์และลักษณะทางเพศของหญิงและชาย (จันทนา, 2545) ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของสเตียรอยด์ฮอร์โมน จะออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปในเซลล์ของอวัยวะเป้าหมาย และจับกับรีเซพเตอร์ที่อยู่ในนิวเคลียส (nuclear receptor) หรือในไซโตพลาสซึม (cytoplasmic receptor) ซึ่งรีเซพเตอร์ของฮอร์โมนเพศทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา และเบต้า ($ER\alpha$ และ $ER\beta$) โปรเจสเทอโรน รีเซพเตอร์ชนิดเอ และบี (PR-A และ PR-B) และ แอนโดรเจน รีเซพเตอร์ (AR) ซึ่งมีการพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ที่นิวเคลียสในเซลล์กล้ามเนื้อลายของคนทั้งชนิดแอลฟา และเบต้า พบทั้งในเพศหญิงและเพศชายในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน แต่เพศชายมีจำนวนเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ต่อเซลล์กล้ามเนื้อลายหนึ่งเซลล์มากกว่าเพศหญิง และในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนจำนวนเอสโตรเจน รีเซพเตอร์มีแนวโน้มลดลง (Wiik et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์บนเยื่อหุ้มเซลล์ ในไซโตพลาสซึม และบนเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลาย (Brown, 2008) และพบในนิวเคลียสของ endothelial cell ของหลอดเลือดฝอยที่ไปเลี้ยงกล้ามเนื้ออีกด้วย (Wiik et al., 2009) เชื่อว่าเอสโตรเจนมีผลโดยตรงต่อกล้ามเนื้อผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา (Brown, 2008) และนอกจากนี้มีการพบโปรเจสเทอโรน รีเซพเตอร์ในกล้ามเนื้อลายของเพศหญิง ส่วนแอนโดรเจน รีเซพเตอร์พบทั้งในกล้ามเนื้อลายของเพศหญิงและเพศชาย (Copas et al., 2001; Sinha-Hikim et al., 2004)



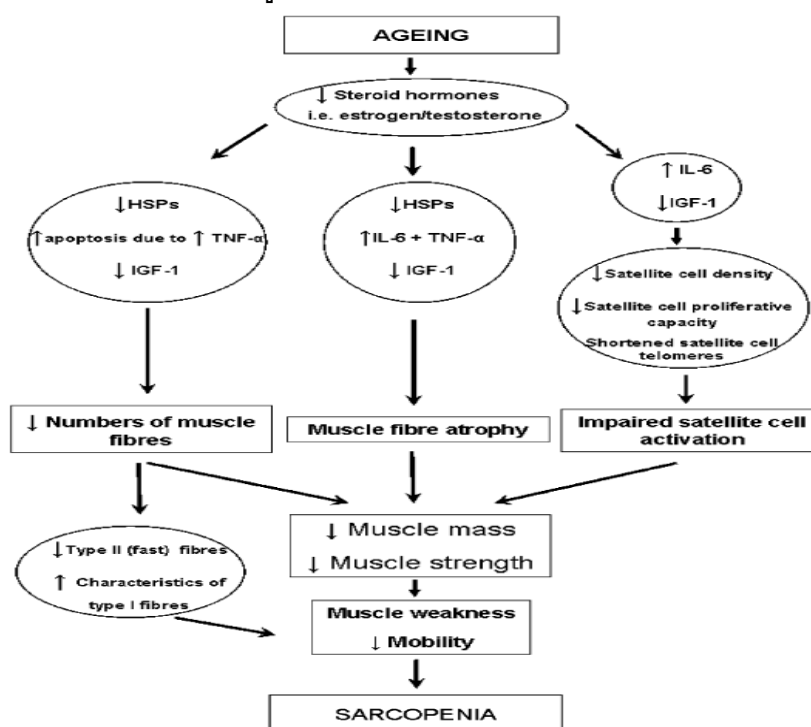
รูปที่ 1-1 กระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนในรังไข่ (Kasper et al., 2005)

2.3.1 เอสโตรเจน (estrogen)

เอสโตรเจน เป็นชื่อกลุ่มของสารประกอบที่สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโต และรักษาลักษณะทางเพศของเพศหญิงให้คงอยู่ได้ เอสโตรเจนในมนุษย์มีอยู่ 3 ชนิด คือ เอสตราไดออล (estradiol) เอสโตรน (estrone) และเอสไตรออล (estriol) การสังเคราะห์เอสโตรเจนต้องอาศัยโคเลสเตอรอล โดยเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และเซลล์ธีคา อินเทอร์นา (theca interna cell) ของฟอลลิเคิลภายในรังไข่จะทำหน้าที่ร่วมกันในการสังเคราะห์ เมื่อเซลล์แกรนูโลซาถูกกระตุ้น ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโคเลสเตอรอลไปเป็นเพรกนิโนโลน (pregnenolone) และในที่สุดจะได้โปรเจสเตอโรน (progesterone) ส่วนเซลล์ธีคา อินเทอร์นา

เมื่อถูกกระตุ้นจะเปลี่ยนโคเลสเตอรอลเป็นโปรเจสเตอโรน และในที่สุดจะได้แอนโดรสตีไดโอน (androstenedione) ดังรูปที่ 1-1 ซึ่งเซลล์แกรนูโลซาจะสร้างเอสโตรเจนจากสารตั้งต้น 2 ตัว คือ แอนโดรสตีไดโอน และเทสโทสเตอโรน ที่ได้จากเซลล์รีกา อินเทอร์นา โดยอาศัยปฏิกิริยาอะโรมาไทเซชัน (aromatization) ได้เป็นเอสตราไดออลและเอสโตรน ซึ่งเอสโตรเจนทั้งสองชนิดสามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ ส่วนเอสโตรนจะถูกเมตาบอลิซึมเปลี่ยนไปเป็นเอสโตรออล ซึ่งส่วนใหญ่เกิดที่ตับ แหล่งที่มีการสังเคราะห์เอสโตรเจน ไม่ได้เกิดเฉพาะในรังไข่ รก และต่อมหมวกไตเท่านั้น ในเนื้อเยื่อรอบนอก (peripheral tissue) เช่น ตับ เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อลาย และฟอลลิเคิลของขนและผม (hair follicle) ก็สามารถสร้างเอสโตรเจนได้เช่นกัน ซึ่งจะเป็แหล่งสังเคราะห์เอสโตรเจนที่สำคัญในสตรีวัยหมดประจำเดือน เมื่อรังไข่ไม่ทำงาน (กิจจา, 2533) ซึ่งมีการศึกษาพบเอนไซม์ aromatase ในกล้ามเนื้อลายด้วย (Larionov et al., 2003)

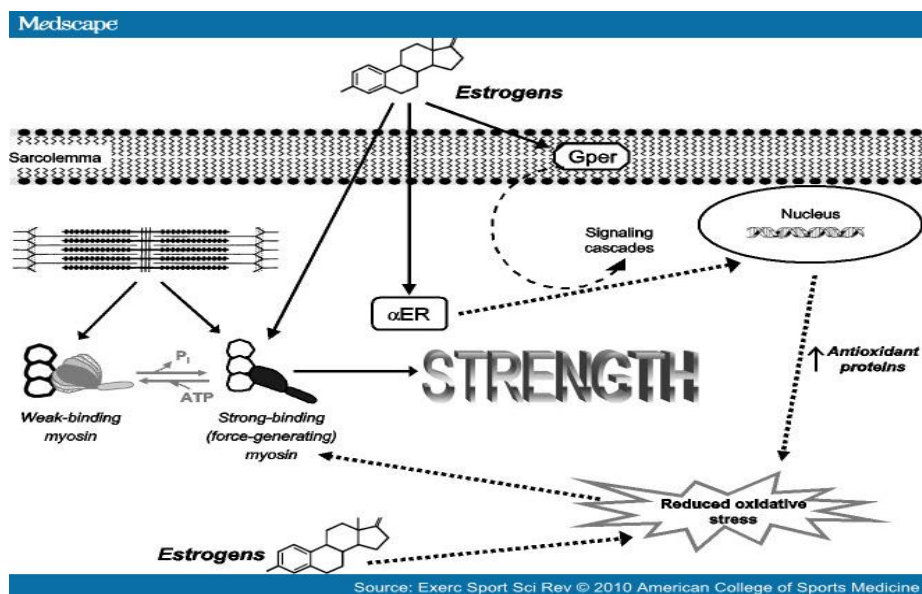
Lee และคณะ (2007) เสนอแนะว่าการขาดเอสโตรเจนก่อให้เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อได้ ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มจำนวน pro-inflammatory cytokines เช่น interleukin-6 (IL-6) และ tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (Girasole et al., 1999; Kramer et al., 2004) ซึ่ง interleukin-6 จะทำให้ insulin-like growth factor-1 (IGF-1) ลดลง (De Benedetti et al., 1997) ทำให้มีผลต่อกล้ามเนื้อดังรูปที่ 1-2



รูปที่ 1-2 ปัจจัยต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกล้ามเนื้อ : HSPs=heat shock proteins, TNF- α = tumor necrosis factor alpha, IL-6=interleukin-6, IGF-1=insulin-like growth factor-1 (Lee et al., 2007)

เอสโตรเจนมีบทบาทต่อกระบวนการสร้างมวลกล้ามเนื้อ จากการศึกษาการฟื้นตัวของกล้ามเนื้อที่ฉีกในหนูพบว่า ในระยะฟื้นตัว หนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่มีการเพิ่มขึ้นของมวลกล้ามเนื้อที่ผ่น้อยกว่ากลุ่มหนูที่ไม่ถูกตัดรังไข่ (McClung et al., 2006b; Sitnick et al., 2006) และหนูที่ถูกตัดรังไข่และให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนมีการเพิ่มขึ้นของมวลกล้ามเนื้อ และพื้นที่หน้าตัดของกล้ามเนื้อที่ผ่นมากกว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่แต่ไม่ได้รับฮอร์โมนทดแทน (McClung et al., 2006a) ซึ่งการฟื้นตัวของมวลกล้ามเนื้อที่ผ่นนั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ฮอร์โมน ไซโตไคน์ (cytokines) ซึ่งจะไปกระตุ้น Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนและมีผลต่อการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ และพบว่า ในหนูที่ถูกตัดรังไข่มีการ phosphorylation ของ Akt และ p70s6k ลดลงเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ถูกตัดรังไข่ แสดงว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทกระตุ้นการทำงานของ Akt และ p70s6k ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิด จัดเป็น serine/threonine protein kinase ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการส่งสัญญาณที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน (Sitnick et al., 2006) นอกจากนี้ เอสโตรเจนควบคุม extracellular matrix remodeling ผ่านทาง transforming growth factor- β (TGF- β) signaling pathway ด้วย ซึ่งจะทำงานร่วมกับ growth factor และ inflammatory cytokine signaling pathway (McClung et al., 2006a) Wade และคณะ (2001) กล่าวว่า เอสโตรเจนกระตุ้น MAPK cascade ทำให้โกรทฮอร์โมน (growth hormone) เพิ่มขึ้น ทำให้มีการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ

นอกจากนี้เอสโตรเจนยังมีบทบาทต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ จากการศึกษาความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อของหนูเพศเมียพบว่า กล้ามเนื้อลายของหนูที่ถูกตัดรังไข่มีแรงในการหดตัวน้อยกว่าหนูที่ไม่ถูกตัดรังไข่ และในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่แล้วได้ฮอร์โมนทดแทนจะมีแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อมากขึ้น (Moran et al., 2007) ซึ่งได้มีการอธิบายว่าการลดลงของเอสโตรเจน ทำให้การทำปฏิกิริยาระหว่างแอกตินกับไมโอซินลดลง โดยทำให้ปริมาณของไมโอซินที่จับกับแอกตินได้ดีมีจำนวนน้อยลงในขณะที่หดตัว แต่จำนวนโมเลกุลของแอกตินและไมโอซินไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งอาจเกิดจากยีนที่ควบคุมการสร้างไมโอซินถูกรบกวนทำให้โครงสร้างของไมโอซินเปลี่ยนแปลงไป (Moran et al., 2006) Lowe และคณะ (2010) เชื่อว่าเอสโตรเจนมีผลต่อ reduction-oxidation state และช่วยรักษาโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนหลังจากมีการแปลรหัส ทำให้โปรตีนต่างๆสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจะมี antioxidant protein ที่ถูกควบคุมโดยเอสโตรเจนผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ มาเกี่ยวข้องด้วย โดยได้ตั้งสมมติฐานกลไกการทำงานของเอสโตรเจนต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อไว้ดังรูปที่



รูปที่ 1-3 กลไกการทำงานของเอสโตรเจนต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อ (Lowe et al., 2010) (ATP = adenosine triphosphate; Gper = G protein-coupled receptor; P_i = inorganic phosphate)

จากรูปที่ 1-3 อธิบายได้ว่า เมื่อเอสโตรเจนจับกับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ เป็นการเริ่มต้นการแปลงสัญญาณและ/หรือควบคุมยีนที่ก่อให้เกิดการลดลงของ oxidative stress (การที่เซลล์ถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ) ในเส้นใยทั้งหมด เอสโตรเจนอาจจะมีผลในการต่อต้านอนุมูลอิสระโดยตรง การลดลงของ oxidative stress อาจจะช่วยรักษาโครงสร้างและการทำงานของไมโอซิน ซึ่งมีผลต่อความแข็งแรงต่อไปและทำให้เอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากการทำงานของเอสโตรเจนผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์แล้ว เอสโตรเจนควบคุมการตอบสนองทางสรีระอื่นๆ ด้วย เช่น G protein-coupled receptor เมื่อจับกับเอสโตรเจน จะเริ่มส่งสัญญาณภายในเซลล์ เป็นการตอบสนองอย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีการส่งสัญญาณการถอดรหัสที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจนจะมีความซับซ้อน

นอกจากนี้เอสโตรเจนยังมีผลต่อความเร็วในการหดตัวของกล้ามเนื้อ โดยจากการศึกษาของ Kadi และคณะ (2002) พบว่า การตัดตรงไขในหนูเพศเมีย ทำให้ myosin heavy chain ชนิดหดตัวเร็วเปลี่ยนไปเป็น myosin heavy chain ชนิดหดตัวช้า ทั้งในกล้ามเนื้อ extensor digitorum longus ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่หดตัวเร็ว และ soleus ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่หดตัวช้า แต่เมื่อนำหนูที่ถูกตัดตรงไขมาวิ่งและให้ฮอร์โมนทดแทน กล้ามเนื้อทั้งสองมัดไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ซึ่งจากการศึกษาของ McCormick และคณะ (2004) ได้เสนอแนะว่าการที่ประสิทธิภาพการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเปลี่ยนแปลง จากผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนนั้น อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนหรือโครงสร้างอื่นๆ ภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งแคลเซียม (calcium transport)

2.3.2 โปรเจสเตอโรน (progesterone)

โปรเจสเตอโรน เป็นฮอร์โมนตามธรรมชาติในร่างกายที่หลังจากคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) แต่หลังจากรังไข่ ต่อมหมวกไตส่วนนอก และอวัยวะได้เล็กน้อย เนื่องจากโปรเจสเตอโรนเป็นสารตัวกลางในกระบวนการชีวสังเคราะห์ของสเตียรอยด์ฮอร์โมนทั้งหมดในร่างกาย เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญสำหรับการตั้งครรภ์และชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุมดลูกเป็น secretory phase (กิจจา, 2533) โปรเจสเตอโรนไม่ค่อยมีบทบาทสำคัญต่อกล้ามเนื้อลาย แต่โปรเจสเตอโรนมีผลต่อการเผาผลาญพลังงานในกล้ามเนื้อลาย คือส่งเสริมการสลายกลูโคสจากกล้ามเนื้อลาย โดยยับยั้งการทำงานของอินซูลินต่อกล้ามเนื้อ (Kalkhoff, 1982) และทำให้การลำของกล้ามเนื้อซ้าง (Schneider et al., 2004)

2.3.3 แอนโดรเจน (androgen)

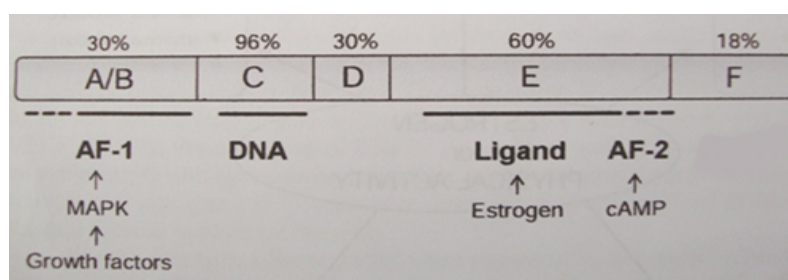
แอนโดรเจน เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย และการพัฒนาลักษณะทางเพศแบบทุติยภูมิของเพศชาย แอนโดรเจนที่สำคัญ ได้แก่ เทสโทสเตอโรน และแอนโดรสตีโรนไโดอิน ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์เอสโตรเจนด้วย ถูกสังเคราะห์จากอวัยวะของเพศชาย รังไข่ และต่อมหมวกไตส่วนนอกของเพศหญิง แอนโดรเจนค่อนข้างมีบทบาทต่อกล้ามเนื้อลาย โดยพัฒนาระบบกล้ามเนื้อให้มีขนาดใหญ่ขึ้น มีความแข็งแรงมากขึ้น เนื่องจากร่างกายมีการสังเคราะห์โปรตีนมากขึ้น มีรายงานว่าในหนูตะเภาเพศผู้ ซึ่งปกติจะมีกล้ามเนื้อลายขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย หากทำการตัดเอาอวัยวะออก ขนาดกล้ามเนื้อจะลดลง และการให้เทสโทสเตอโรนแก่หนูตะเภาเพศเมียหรือเพศผู้ที่ตัดเอาอวัยวะออก จะเห็นการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน (กิจจา, 2533)

เกษรา (2540) พบว่าหนูเพศผู้ที่ถูกผ่าตัดอวัยวะออกไปจะมีน้ำหนักของกล้ามเนื้อลดลง ความแข็งแรงในการหดตัว และอัตราความเร็วของการหดตัวลดลง เวลาที่ใช้ในการหดตัวและคลายตัวนานขึ้น ปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อลดลง แสดงว่าความไวต่ออินซูลินของกล้ามเนื้อลดลง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของกล้ามเนื้อที่หดตัวช้า และเมื่อให้ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทดแทน พบว่าช่วยแก้ไขความผิดปกติที่เกิดขึ้นในหนูที่ผ่าตัดอวัยวะออกให้กลับคืนสู่ปกติได้

Ferrando และคณะ (2002) พบว่าการให้เทสโทสเตอโรนทดแทนในผู้ชายที่มีระดับฮอร์โมนเพศน้อยกว่าปกติ ทำให้กล้ามเนื้อมีความแข็งแรงเพิ่มขึ้น และกล้ามเนื้อมีการสังเคราะห์โปรตีนมากขึ้น เช่นเดียวกับ Bhasin และคณะ (2005) พบว่าทำให้มวลกล้ามเนื้อและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อเพิ่มมากขึ้น แต่การให้เทสโทสเตอโรนทดแทน จะทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายได้ เช่น มะเร็งต่อมลูกหมาก กล้ามเนื้อโตผิดปกติ หัวใจทำงานผิดปกติ เป็นต้น (Brown, 2008)

2.4 เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ (estrogen receptor)

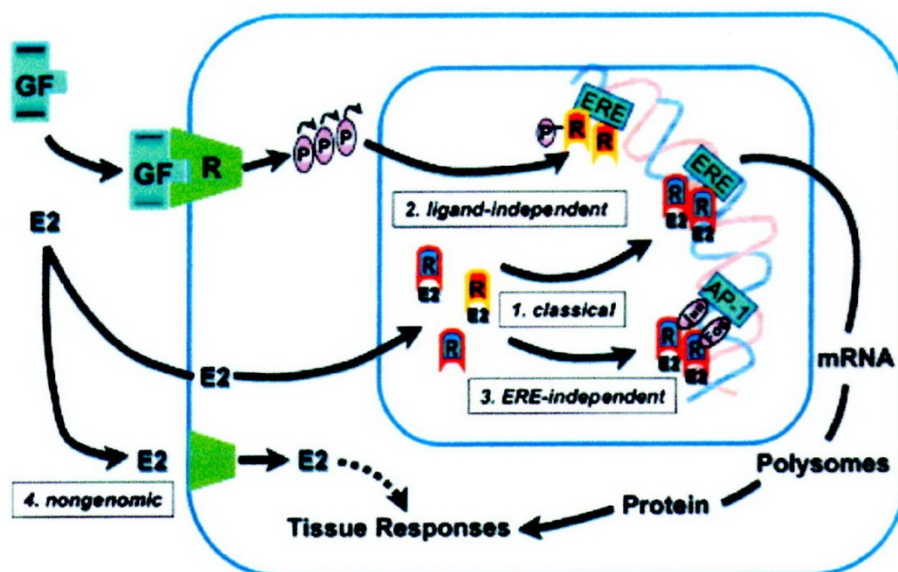
เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ มี 2 ชนิด คือ เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา (ER α) และ เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้า (ER β) ทำหน้าที่เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการถอดรหัส (transcription factor) และทำให้เกิดการแสดงออกของยีน (gene expression) จัดอยู่ในกลุ่มตัวรับที่อยู่ในนิวเคลียส (super family nuclear receptor) ซึ่งประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 5 โดเมน ได้แก่ โดเมน A/B, C, D, E และ F ดังรูปที่ 1-4 โดเมน A/B อยู่บริเวณ N-terminal ทำหน้าที่เป็น transactivation function ซึ่งกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของยีนเป้าหมาย ในเอสโตรเจน รีเซพเตอร์แต่ละชนิด โดเมน A/B มีความแตกต่างกันมากที่สุด โดเมน C เป็น DNA-binding domain ซึ่งเป็นบริเวณที่จับกับดีเอ็นเอที่เฉพาะเจาะจงและเกี่ยวกับ receptor dimerization โดเมน C มีความคล้ายคลึงกันมากที่สุดระหว่างเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ทั้งสองชนิด ซึ่งบ่งบอกว่ายีนเป้าหมายของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดมีความคล้ายกัน โดเมน D เป็น flexible hinge region เชื่อมระหว่างโดเมน C และ E โดเมน E เป็น ligand-binding domain มีความสำคัญต่อการจับกับ ligand การเกิดการจับคู่ของรีเซพเตอร์ (receptor dimerization) และการกระตุ้นการถอดรหัส (transcriptional activation) ส่วนโดเมน F หน้าที่ยังไม่ชัดเจน ดังนั้น บริเวณที่มีการทำงานกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (activation function site) จะอยู่ในโดเมน A/B (AF-1) และ E (AF-2) โดยทั้งสองส่วนจะจับกับ co-activator จากนั้นจะไปจับกับ promoter ของยีนเป้าหมาย การกระตุ้นการถอดรหัสจะเกิดขึ้นได้จากการทำงานของโดเมน A/B ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย co-activator ตัวอื่น และโดเมน E ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน (Wiik, 2008)



รูปที่ 1-4 แผนผังโครงสร้างของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาเปอร์เซ็นต์แสดงความคล้ายคลึงกับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้า และ AF-1 และ 2 คือบริเวณที่มีการทำงาน ซึ่งถูกกระตุ้นด้วย co-activator ต่างๆ (Wiik, 2008)

เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ($ER\alpha$) และ เบต้า ($ER\beta$) พบในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน ในมดลูก ต่อมม้าม ระบบประสาทส่วนกลาง ระบบหัวใจและหลอดเลือด และกระดูก จะพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ($ER\alpha$) ในปริมาณมาก ส่วนในอวัยวะ ต่อมลูกหมาก รังไข่ ตับอ่อน ผิวหนัง กล้ามเนื้อลาย จะพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา ($ER\alpha$) น้อย แต่จะพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้า ($ER\beta$) ในปริมาณมาก (Wiik, 2008)

Wiik (2008) กล่าวว่า เอสโตรเจน รีเซพเตอร์อาจควบคุมการถอดรหัสของยีนเป้าหมายได้หลายกลไก ทั้งกรณีมีและไม่มีเอสโตรเจนมากระตุ้นการทำงานของรีเซพเตอร์ กลไกการทำงานของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ต่อกล้ามเนื้อลาย ยังไม่ทราบแน่ชัด แต่โดยทั่วไป เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ น่าจะทำงานโดยมีเอสโตรเจนมาจับกับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ และเกิดการ conformational change เกิดการจับคู่ของรีเซพเตอร์ หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ที่พร้อมทำงานจะจับกับยีนเป้าหมายบริเวณ estrogen response element (ERE) และทำให้เกิดการถอดรหัสและสร้างโปรตีนต่อไป (Classical ligand-dependent activation) นอกจากนี้ เอสโตรเจน รีเซพเตอร์ที่พร้อมทำงาน ที่จับกับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์แล้ว ยังสามารถจับกับโปรตีนที่เป็นปัจจัยในการถอดรหัสก่อน แล้วจึงจะไปกระตุ้นยีนเป้าหมายที่นอกเหนือจากบริเวณ estrogen response element ได้เช่นกัน เพื่อให้เกิดการถอดรหัส (Non-ERE dependent action) นอกจากนี้เอสโตรเจน รีเซพเตอร์สามารถทำงานได้โดยไม่ต้องมีเอสโตรเจนมากระตุ้นการทำงาน แต่มีปัจจัยการเจริญเติบโต (growth factor) มากระตุ้นแทน ทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ mitogen-activated protein kinase (MAPK) signal transduction cascade เกิดการเติมกลุ่มฟอสเฟส (phosphorylation) ในเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ และเกิดการกระตุ้น estrogen response element (Ligand-independent activation of ER) และอีกวิถีทางหนึ่งคือ เอสโตรเจนไม่ได้ทำงานผ่านทางยีน โดยเอสโตรเจนไปกระตุ้น MAPK และ ERK signaling แทน (Non-genomic signaling) ดังรูปที่ 1-5

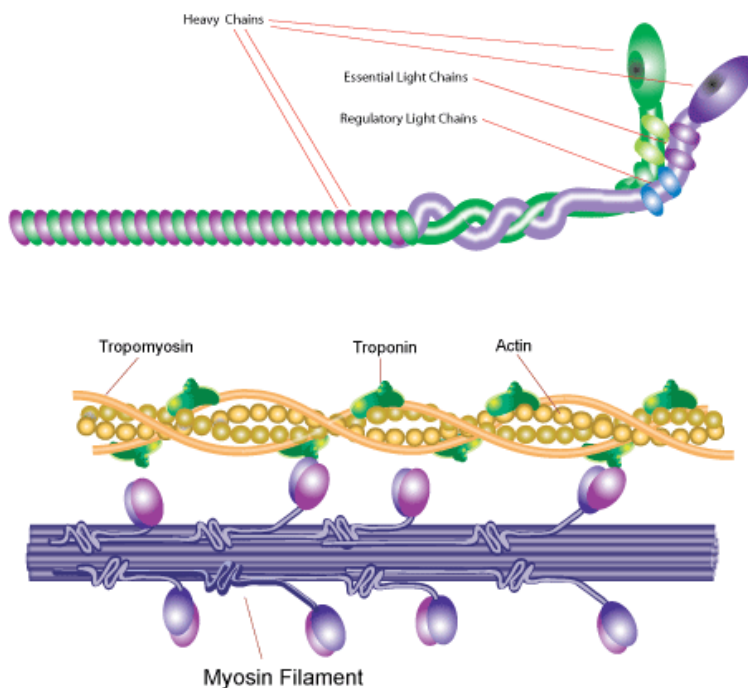


รูปที่ 1-5 กลไกการทำงานของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์วิธีต่างๆ (Wiik, 2008)

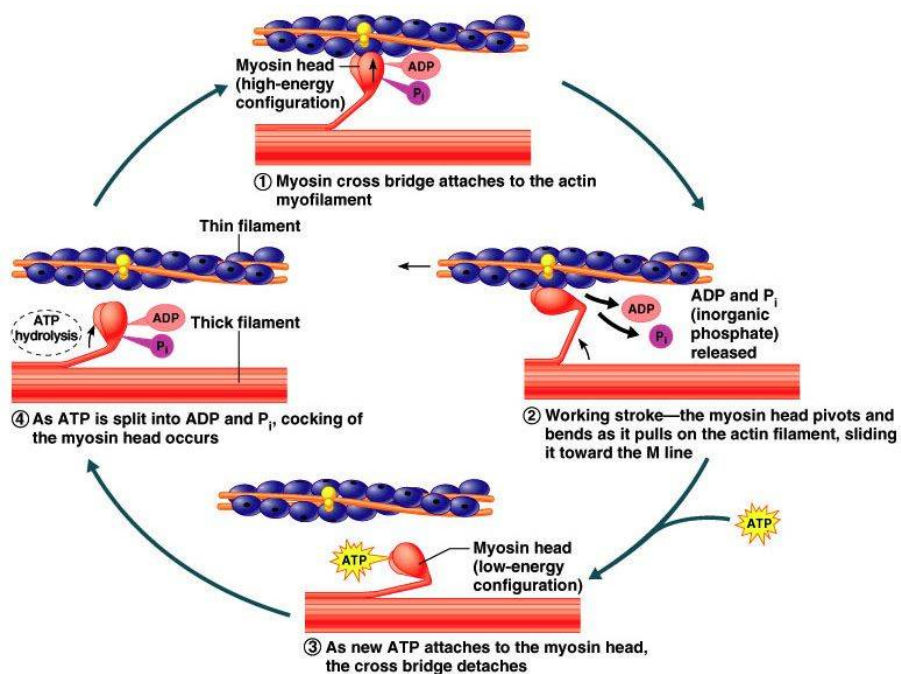
2.5 โครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลาย

ภายในเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle fiber) ประกอบด้วย ไมโอไฟบริล (myofibril) จำนวนมาก ถ้าเอาไมโอไฟบริลมาขยายดู จะเห็นว่ามีลายตามขวางที่เกิดจากการกระจายตัวของโปรตีนที่ทำให้กล้ามเนื้อยึดหดตัว (contractile protein) อยู่อย่างไม่เท่ากัน ที่มีโปรตีนมากจะมีลักษณะที่บกว่าที่มีโปรตีนน้อย ซึ่งมีลักษณะจาง ไมโอไฟบริลประกอบด้วยไมโอฟิลาเมนต์ (myofilament) 2 ชนิด ซึ่งมีโปรตีนที่ทำให้กล้ามเนื้อยึดหดตัวอยู่ ได้แก่ thick filament ประกอบด้วยโปรตีนไมโอซิน (myosin) และ thin filament ประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (actin) โทรโปนิน (troponin) และโทรโปไมโอซิน (tropomyosin) (ดังรูปที่ 1-6) ไมโอซินประกอบด้วยเส้นใยโปรตีน 6 เส้น คือ เส้นใยโปรตีนชนิดหนัก (heavy chain) 2 เส้น และเส้นใยชนิดเบา (light chain) 4 เส้น ไมโอซินแบ่งได้เป็น 2 ส่วน คือส่วนหัวและส่วนหาง ส่วนหัวของไมโอซินจะมีเอนไซม์ adenosine triphosphatase (ATPase) และมีตำแหน่งที่สามารถรวมตัวกับแอกตินได้ (actin binding site) ในส่วนของ heavy meromyosin (ส่วนหัวของไมโอซิน) เป็นส่วนที่ยื่นออกไปเป็นตะขอ เรียกว่า cross bridge เพื่อจับกับแอกติน และรวมตัวกันได้สารเชิงซ้อน เรียกว่า actomyosin ทำให้เกิดการหดตัว แอกติน เป็นโปรตีนที่มีลักษณะกลมประกอบกันขึ้นเป็นเส้น 2 เส้นพันกันเป็นเกลียว มีตำแหน่งให้หัวของไมโอซินมาเกาะ (myosin binding site) ส่วนโทรโปนิน เป็นโปรตีนลักษณะกลม แบ่งออกเป็นสามส่วน คือ troponin-T เป็นส่วนที่จับกับโทรโปไมโอซิน troponin-I เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยาของไมโอซินและแอกติน และ troponin-C จะจับกับแคลเซียม ทำให้มีการหดตัวเกิดขึ้น และโทรโปไมโอซิน เป็นโปรตีนที่มีลักษณะเป็นเส้นใยสองเส้นพันกันเป็นเกลียว ผ้งอยู่ในร่องเกลียวของแอกติน (ชัยเลิศ, 2544; กัลยพงษ์, 2545)

ในกล้ามเนื้อลายส่วนใหญ่มีประจุแมกนีเซียมมากกว่า 2×10^{-6} โมลาร์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่สูงพอที่จะทำให้แอกตินและไมโอซินแตกตัวออกจากกัน และ ATP (adenosine triphosphate) ที่มีอยู่ไม่ถูก hydrolyse กล้ามเนื้อจึงอยู่ในสภาพคลายตัว ส่วนแคลเซียมจะน้อยกว่า 10^{-7} โมลาร์ ซึ่งในขณะที่พัก โทรโปนินไอจะจับกับแอกตินและโทรโปไมโอซิน ทำให้ตำแหน่ง myosin binding site ถูกปิดไว้ แต่เมื่อมีกระแสประสาทมากระตุ้น จะเกิดการเปลี่ยนคุณสมบัติของเยื่อหุ้ม terminal cisternae ของซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัม ซึ่งเป็นแหล่งเก็บสะสมแคลเซียม ทำให้แคลเซียมเข้ามาสู่ซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) จำนวนแคลเซียมที่มากขึ้นจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการจับกันของแอกตินและไมโอซิน โดยแคลเซียมจะไปจับกับโทรโปนินซี ทำให้โทรโปไมโอซินเกิดการเลื่อนตัวและเปิด myosin binding site จากนั้นเอนไซม์ ATPase (adenosine triphosphatase) ที่ส่วนหัวของไมโอซิน จะสลาย ATP เป็น ADP (adenosine diphosphate) และ Pi (inorganic phosphate) มาจับอยู่ที่หัวของไมโอซิน ทำให้ไมโอซินมีความชอบพอ (affinity) ต่อ myosin binding site ของแอกตินสูงขึ้น และมีการจับกันของไมโอซินกับแอกตินอย่างแน่นหนา เกิดเป็น actomyosin complex ส่วนหัวของไมโอซินจะเคลื่อนตัวโดยการงอที่ hinge และดึงสายแอกตินเข้ามา ทำให้มีการหดสั้นเข้าของ sarcomere ซึ่งเป็นหน่วยหน้าที่ที่เล็กที่สุดของกล้ามเนื้อ ซึ่งต้องอาศัยพลังงานจากการสลาย ATP ดังกล่าวข้างต้น หลังจากนั้น ADP และ Pi จะถูกปล่อยออกจากส่วนหัวของไมโอซิน ทำให้ ATP โมเลกุลใหม่สามารถเข้าไปจับแทนได้ ความชอบพอของไมโอซินต่อแอกตินจะลดลง ทำให้โปรตีนทั้งสองแยกออกจากกัน เกิดวัฏจักรของการจับและปล่อยของ crossbridge ขึ้น (ดังรูปที่ 1-7) เมื่อกระแสประสาทหมดไป ผนัง terminal cisternae จะกลับสู่สภาพปกติ คือไม่ยอมให้แคลเซียมซึมผ่าน ขณะที่แคลเซียมที่ตกค้างอยู่ในซาร์โคพลาสซึมก็ถูกเก็บกลับเข้าซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัม โดยกระบวนการ active transport ความเข้มข้นของแคลเซียมลดลงจนถึงระดับที่ทำให้ actomyosin สลายตัว กล้ามเนื้อจึงคลายตัว (ทวิตักต์, 2543; ชัยเลิศ, 2544)



รูปที่ 1-6 แสดงลักษณะของ thick และ thin filament
 (<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html>)



รูปที่ 1-7 กลไกการหดตัวของกล้ามเนื้อ
 (<http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/AP1/AP%201%20resources.htm>)

เซลล์กล้ามเนื้อลาย แบ่งได้เป็น 3 ชนิด ตามความเร็วในการหดตัวและแหล่งพลังงานที่ใช้ ดังที่แสดงในตารางที่ 1-2

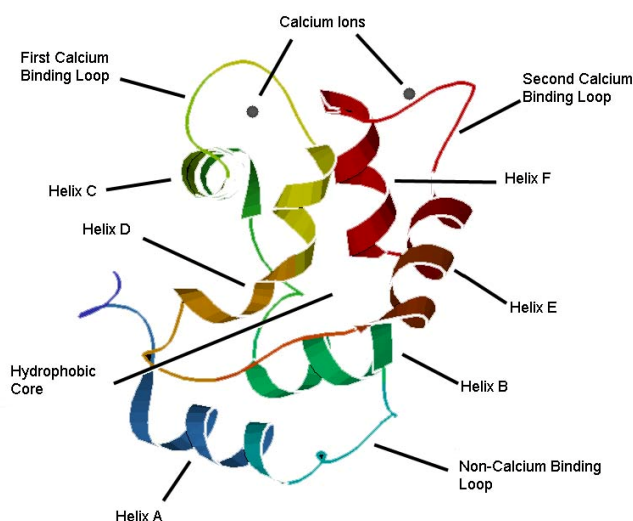
ตารางที่ 1-2 แสดงคุณสมบัติของเซลล์กล้ามเนื้อ 3 ชนิด (กัลยพงษ์, 2545)

คุณสมบัติ	Type I (slow oxidative)	Type IIa (fast oxidative)	Type IIb (fast glycolytic)
การสร้าง ATP	ใช้ออกซิเจน (oxidative phosphorylation)	ใช้ออกซิเจน (oxidative phosphorylation)	ไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis)
ไมโทคอนเดรีย	มาก	มาก	น้อย
เส้นเลือดฝอย	มาก	มาก	น้อย
ไมโอโกลบิน (Myoglobin)	มาก (กล้ามเนื้อสีแดง)	มาก (กล้ามเนื้อสีแดง)	น้อย (กล้ามเนื้อสีขาว)
การทำงานของ เอนไซม์ Glycolytic	ต่ำ	ปานกลาง	สูง
ปริมาณไกลโคเจน	ต่ำ	ปานกลาง	สูง
อัตราการล่า	ช้า	ปานกลาง	เร็ว
การทำงานของ เอนไซม์ Myosin- ATPase	ต่ำ	สูง	สูง
ความเร็วในการหดตัว	ช้า	เร็ว	เร็ว
ขนาดของใยกล้ามเนื้อ (เส้นผ่านศูนย์กลาง)	เล็ก	ปานกลาง	ใหญ่
ขนาดของ motor unit	เล็ก	ปานกลาง	ใหญ่

2.6 พาร์วัลบูมิน (parvalbumin)

พาร์วัลบูมิน เป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียม (Ca^{+2} binding protein) ที่มีขนาดเล็ก หนักประมาณ 12 kDa ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนย่อย แต่ละส่วนมีลักษณะโครงสร้างเป็นรูปเกลียว (helix-loop-helix motif) ได้แก่ โดเมน AB, CD และ EF โดยโดเมน AB เป็นส่วนที่ไม่จับกับไอออนใดๆ โดเมน CD ประกอบด้วย N-terminal binding site และโดเมน EF ประกอบด้วย C-terminal site ดังรูปที่ 1-8 พาร์วัลบูมินเป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม EF-hand family ซึ่งเป็น

กลุ่มของโปรตีนที่จับกับแคลเซียมที่มีตำแหน่งที่จับกับแคลเซียมเป็นลักษณะเป็นรูปเกลียว คือ EF-hand ซึ่งพาร์วัลบูมินมี EF-hand 2 ชนิด คือ โดเมน CD และ EF ซึ่งจะมีความชอบพอ (affinity) ต่อแคลเซียมอย่างมาก แต่มีความชอบพอต่อแมกนีเซียมในระดับปานกลาง (Cates et al., 2002) พาร์วัลบูมินมีสองรูปแบบ ได้แก่ แบบแอลฟา (α isoform) และแบบเบต้า (β isoform) (Henzi and Tenner, 2008)

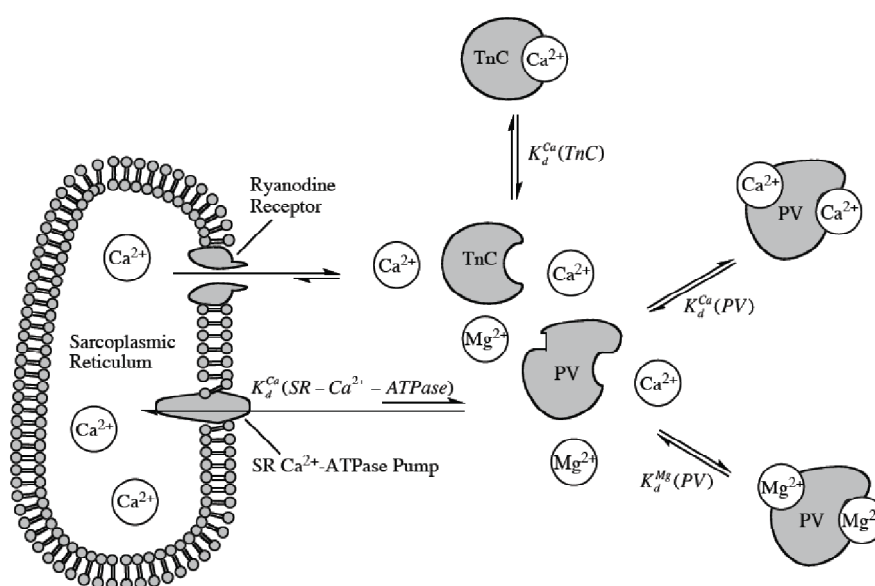


รูปที่ 1-8 โครงสร้างของพาร์วัลบูมิน

(http://www.science.widener.edu/~bastin/Widener/Research_Parvalbumin.html)

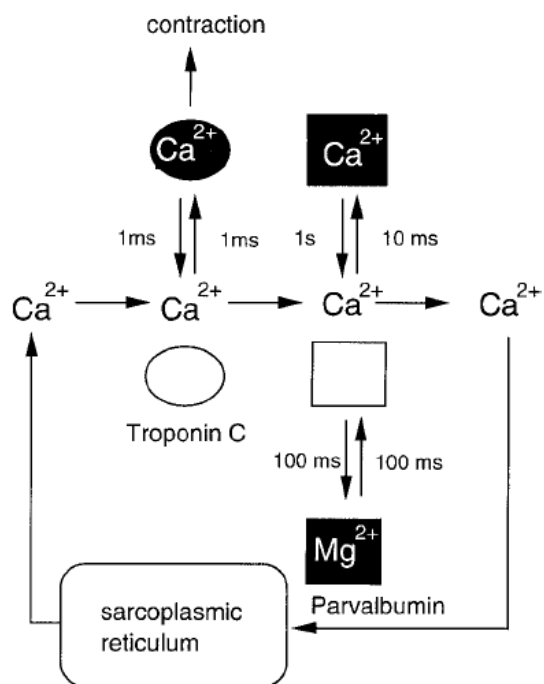
ในกล้ามเนื้อลาย พาร์วัลบูมินพบได้ในซาร์โคพลาสซึม (sarcoplasm) และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ในขณะที่พัก ความเข้มข้นของแมกนีเซียมในกล้ามเนื้อมีมากกว่าแคลเซียม ทำให้พาร์วัลบูมินจับกับแมกนีเซียม เมื่อกล้ามเนื้อถูกกระตุ้น แคลเซียมที่ปล่อยมาจากซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัม จะไม่จับกับพาร์วัลบูมินทันที แต่จะจับกับโทรโปนินซีแทน เนื่องจากพาร์วัลบูมินจับอยู่กับแมกนีเซียมและการปล่อยแมกนีเซียมใช้เวลานาน กล้ามเนื้อจึงเกิดการหดตัว เมื่อระดับแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อมากขึ้นในระหว่างที่กำลังหดตัว แมกนีเซียมจะแยกตัวออกจากพาร์วัลบูมินอย่างช้าๆ และแคลเซียมจะแยกตัวออกจากโทรโปนินซีมาจับกับพาร์วัลบูมินแทน เนื่องจากพาร์วัลบูมินมีความสามารถจับกับแคลเซียมมากกว่า (Hou et al., 1991) จากนั้นแคลเซียมจะแยกตัวออกจากพาร์วัลบูมิน และถูกดึงกลับไปยังซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัม โดยกระบวนการ Ca^{2+} -ATPase pump ทำให้เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ (Wilwert et al., 2006) (ดังรูปที่ 1-9 และ 1-10) จะเห็นว่าพาร์วัลบูมินมีบทบาทสำคัญต่อการคลายตัวของกล้ามเนื้อ ถ้ามีพาร์วัลบูมินจำนวนมาก แคลเซียมจะถูก

ดิ่งกลับได้มาก การคลายตัวของกล้ามเนื้อจะเร็วขึ้น และจะทำให้เกิดการหดตัวครั้งใหม่เร็วขึ้นเช่นกัน ซึ่งจากการศึกษาของ Schmitt และ Pette (1991) ได้เปรียบเทียบปริมาณพาร์วัลบูมินในเส้นใยกล้ามเนื้อแต่ละชนิด พบว่าเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) มีปริมาณพาร์วัลบูมินน้อย ส่วนเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว มีปริมาณพาร์วัลบูมินมาก และ Muntener และคณะ (1995) พบว่าเมื่อฉีด parvalbumin cDNA เข้าไปในกล้ามเนื้อโซเลียส (soleus) ซึ่งประกอบด้วยใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (muscle fiber type I) ของหนู เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้น ทำให้เวลาในการคลายตัวของกล้ามเนื้อสั้นลง แต่เวลาในการหดตัวไม่เปลี่ยนแปลง ขณะที่ Schwaller และคณะ (1999) ศึกษาการทำงานของเส้นใยกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) ของหนูที่ถูกน็อคเอาต์ยีนที่ควบคุมการแสดงออกของพาร์วัลบูมิน (parvalbumin knockout mice) พบว่าทำให้เวลาในการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น เนื่องจากการลดลงของแคลเซียมภายในเซลล์กล้ามเนื้อเกิดช่องว่าง นอกจากนี้ยังพบว่าทำให้กล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็วทนต่อการล้ามากขึ้น และมีจำนวนไมโทคอนเดรียมากขึ้น ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับกล้ามเนื้อชนิดหดตัวช้า (Chen et al., 2001) จากข้อมูลข้างต้น แสดงให้เห็นว่าพาร์วัลบูมินมีความจำเป็นต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว



รูปที่ 1-9 การทำงานของพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลาย : TnC = Troponin C, PV = Parvalbumin, Ca^{2+} = Calcium ion, Mg^{2+} = Magnesium ion, SR = Sarcoplasmic reticulum, ATPase = adenosine triphosphatase

(http://www.science.widener.edu/~bastin/Widener/Research_Parvalbumin.html)



รูปที่ 1-10 จลนศาสตร์ของการจับและปล่อยแมกนีเซียมและแคลเซียมของพาร์วัลบูมิน
(Berchtold et al., 2000)

3. วัตถุประสงค์

3.1 เพื่อศึกษาผลของการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลายของหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่

3.2 เพื่อศึกษาผลของการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลายของหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

4.1 สามารถอธิบายสาเหตุของความเสื่อมถอยของกล้ามเนื้อในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้

4.2 อาจใช้เป็นแนวทางในการรักษาภาวะ sarcopenia ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน โดยการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนได้

บทที่ 2

สารเคมี วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1.1 สารเคมี

1.1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสัตว์ทดลอง

- 1) Thiopental sodium for injection (Jagsonpal Pharmaceuticals LTD., Haryana, India)
- 2) Betadine solution antiseptic microbicide (IDS manufacturing LTD., Pathumthani, Thailand)
- 3) Oestradiol Benzoate Injection (March Pharmaceutical CO., LTD., Bangkok, Thailand)
- 4) 70% Ethyl alcohol (วิทยาศรม จำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
- 5) ยาแก้ปวดพาราเซตามอลชนิดน้ำ (Continental-Pharm CO., LTD., Bangkok, Thailand)
- 6) ยาฆ่าเชื้อสำหรับแช่อุปกรณ์ผ่าตัด (ปรูฟพี จำกัด นนทบุรี, ประเทศไทย)
- 7) น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (วิทยาศรม จำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

1.1.2 สารเคมีสำหรับการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน

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

1.1.3 สารเคมีที่ใช้ในการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ

- 1) Kreb's solution (ภาคผนวก)
- 2) 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4 (ภาคผนวก)
- 3) Thiopental sodium for injection (Jagsonpal Pharmaceuticals LTD., Haryana, India)

1.1.4 สารเคมีทั่วไป

- 1) Ethanol (Mallinckrod Baker Sdn. Bhd. Salangor D.E., Malaysia)
- 2) Xylene (Lab-Scan, Bangkok, Thailand)

- 3) Permout (Fair Lawn, New Jersey, USA)
- 4) Formaldehyde solution (Lab scan, Bangkok, Thailand)
- 5) Concentrate HCL (Riedel-de Haën AG, Seelze, Germany)
- 6) Distilled water (ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

1.1.5 สารเคมีที่ใช้ย้อม H&E

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

1.1.6 สารเคมีที่ใช้ในการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

- 1) Mouse anti-parvalbumin monoclonal antibody (Chemicon Temecula, California, USA)
- 2) 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4 (ภาคผนวก)
- 3) 0.01 M citric buffer (ภาคผนวก)
- 4) Anti-mouse Texas Red IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 5) Anti-rabbit Fluorescence IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 6) Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 7) Normal horse serum (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 8) Normal goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 9) 0.3% Triton X-100 in 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4 (ภาคผนวก)
- 10) Mouse anti-estrogen receptor antibody (Chemicon Temecula, California, USA)
- 11) Rabbit anti- β estrogen receptor antibody (Chemicon Temecula, California, USA)

1.1.7 สารเคมีที่ใช้สำหรับเวสเทิร์น บลอต

สารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีนจากตัวอย่าง

- 1) Sodium deoxycholic acid (3α , 12α -Dihydroxy- 5β -cholan-24-oic acid (sodium salt)) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- 2) Tetra sodium pyrophosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3) Sodium fluoride (BDH laboratory supplies, Poole, UK)
- 4) EGTA 1, 2-Di (2-aminoethoxyethane- NNN'N'-tetra-acetic acid) (BDH laboratory supplied, Poole, UK)
- 5) Triton X-100 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
- 6) Tris pH 8.0 (ภาคผนวก)
- 7) Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF) (USB corporation, Cleveland, USA)
- 8) Magnesium chloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 9) Sodium orthovanadate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 10) Leupeptin (USB corporation, Cleveland, USA)
- 11) Aprotinin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 12) BCA TM Protein Assay Kit (Thermo Scientific, Rockford, USA)
- 13) Liquid nitrogen (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

1.1.8 สารเคมีสำหรับการทำ SDS-PAGE

- 1) 30% Acrylamide/ Bis solution 37.5:1 (2.6% C)(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- 2) Ammonium persulfate (APS) (Amersham bioscience AB, Uppsala, Sweden)
- 3) 1.5 M Tris-HCl buffer pH8.8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- 4) 0.5 M Tris-HCl buffer pH6.8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- 5) Sodium dodecyl sulfate (SDS) (USB corporation, Cleveland, USA)
- 6) TEMED (N,N,N',N'-tetra-methyl-ethylenediamine) (USB corporation, Cleveland, USA)
- 7) Glycine (Solon Ind, Pkwy. Solon, Ohio, USA)
- 8) Tris (Solon Ind, Pkwy. Solon, Ohio, USA)
- 9) Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- 10) Mercaptoethanol (BME) (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)
- 11) Methanol (Mallinckrodt Baker Inc., Phillipsburg, USA)

- 12) Isopropanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 13) Biotinylated Protein Ladder (Cell signaling, Danvers, USA)

1.1.9 สารเคมีสำหรับการทำ Immunoblotting

- 1) Anti-Mouse IgG, HRP-linked antibody (Cell signaling, Danvers, USA)
- 2) Anti-parvalbumin mouse monoclonal antibody (Chemicon Temecula, California, USA)
- 3) Anti-biotin, HRP-linked antibody (Cell signaling, Danvers, USA)

1.1.10 สารเคมีสำหรับการทำ Autoradiography

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

1.2 วัสดุอุปกรณ์ และเครื่องมือ

1.2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ทั่วไป

- 1) ข้อนตักสาร
- 2) กระดาษชั่งสาร
- 3) กระดาษกรอง (Filter paper)
- 4) กรวยกรอง (Funnel)
- 5) ขวดเก็บตัวอย่าง (Specimen bottle)
- 6) นาฬิกาจับเวลา
- 7) กล่องเก็บสไลด์
- 8) ถาดอะลูมิเนียม (Aluminum tray)
- 9) จานรอง (Petri dish)
- 10) กระบอกลม (Cylinder)
- 11) ขวดเตรียมสาร

- 12) ขวดรูปชมพู่ (Flask)
- 13) เครื่องกวนสารอัตโนมัติ (Magnetic stirrer)
- 14) แท่งแม่เหล็ก (Magnetic bar)
- 15) เครื่องวัด pH (pH meter)
- 16) เครื่องช่วยผสม (Vertex)
- 17) กระจกปิดสไลด์ (Cover slips)
- 18) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)
- 19) บีกเกอร์ (Beaker)
- 20) บีเปต (Pipet)
- 21) บีเปตทิว (Pipet tip)
- 22) แท่นให้ความร้อน (Hot plate)
- 23) หลอดทดลอง (Test tube)
- 24) Microtube
- 25) เครื่องชั่ง
- 26) ตู้ดูดควัน (Fume hood)
- 27) ตู้อบ (Oven)
- 28) ตู้แช่แข็งเนื้อเยื่อ
- 29) คีมจับชิ้นเนื้อ (Forceps)

1.2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับเตรียมสัตว์ทดลอง

- 1) อุปกรณ์ผ่าตัด (Operating set)
- 2) Surgical needles (Mani Kiyohara Industrial Park, Utsunomiya, Tochigi, Japan)
- 3) Absorbable surgical suture (United states surgical, Norwalk, Connecticut, USA)
- 4) โคมไฟส่องให้ความอบอุ่น (Royal Philips electronics, P.R.C., Holland)
- 5) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)
- 6) ท่อป้อนอาหารสัตว์ทดลอง (Feeding tube)
- 7) 100% Natural cotton (บางพลี คอตตอน อินดัสตรี จำกัด, สมุทรปราการ, ประเทศไทย)
- 8) ผ้าก๊อช (Gauze)
- 9) กระบอกฉีดยา (นิโปร จำกัด, พระนครศรีอยุธยา, ประเทศไทย)
- 10) เข็มฉีดยา (Nipro corporation, Osaka, Japan)

- 11) ผ้าปลอดเชื้อปูพื้นรองผ่าตัด
 - 12) มีดผ่าตัด (Blade)
 - 13) บัตเตอร์เลี่ยน (Wahl LTD., Kent, England)
- 1.2.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ
- 1) เครื่องคอมพิวเตอร์ Power Macintosh G4
 - 2) เครื่อง PowerLab, Model 4/20 (ADInstruments, Australia)
 - 3) Force transducer, Model 1030 (ADInstruments, Australia)
 - 4) Bridge Amp, Model 110 (ADInstruments, Australia)
 - 5) Bipolar electrodes (ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
 - 6) Needle electrodes (ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
 - 7) ด้าย
 - 8) แผ่นไม้กระดาน
- 1.2.4 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อและการย้อม
- 1) เครื่องตัดเย็น (Cryostat) (LEICA CM 1850)
 - 2) แท่นวางตัวอย่าง (Stub)
 - 3) ตัวกลางช่วยยัดตัวอย่างเนื้อเยื่อ (Tissue freezing medium) (LEICA microsystem)
 - 4) สไลด์แก้ว (TESPA coated slide)
 - 5) พู่กันและคีมจับชิ้นเนื้อ (Paint brush and forceps)
 - 6) มีดผ่าตัด (Scalpel)
 - 7) จานรอง (Petri dish)
 - 8) ใบมีดตัดเนื้อเยื่อ (Disposable blade)
- 1.2.5 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการย้อมมิวมูโนฟลูออเรสเซนท์
- 1) ภาดย้อมสไลด์พร้อมที่จับ (Rack and holder)
 - 2) ภาดอะลูมิเนียม (Aluminum tray)
 - 3) น้ำยาทาเล็บ (Nail polish)
 - 4) กระดาษอะลูมิเนียมฟรอยด์
 - 5) กล่องพลาสติกและแท่นรองสไลด์

- 6) กระดาษทิชชู
- 7) เตาอบไมโครเวฟ (Microwave oven)

1.2.6 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในเทคนิคเวสเทิร์น บลอต

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

2. สัตว์ทดลอง

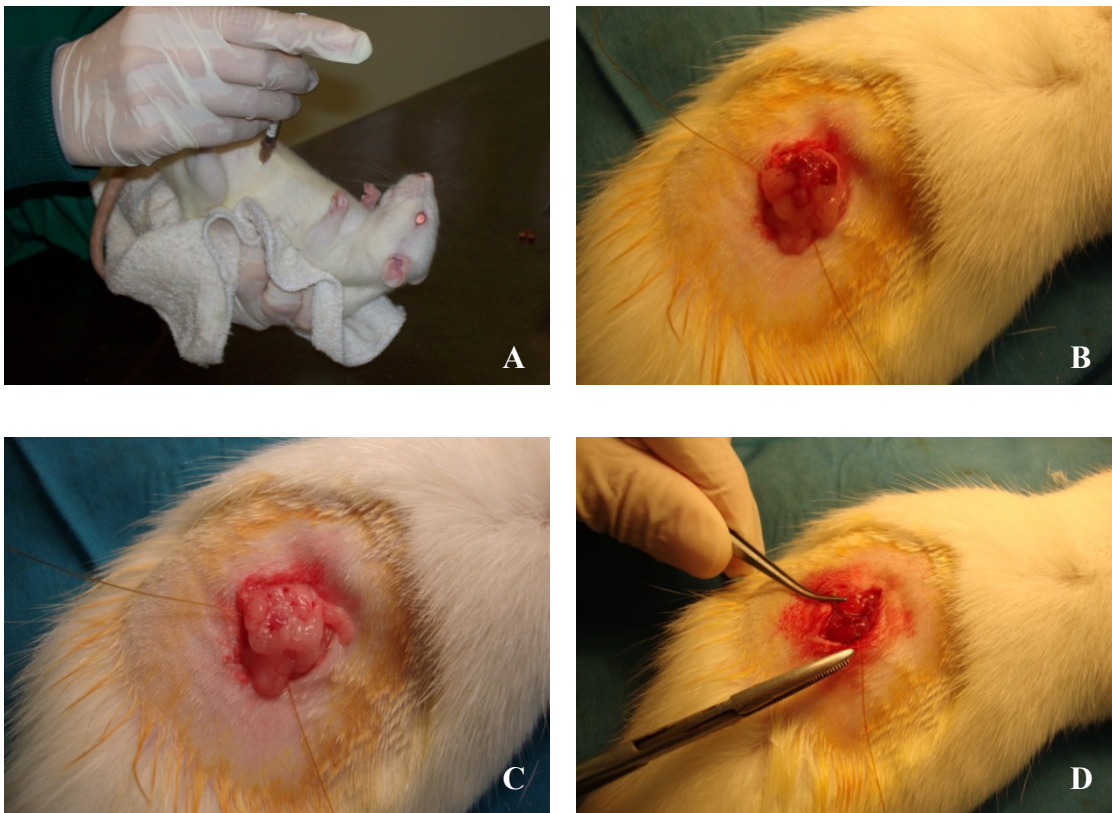
งานวิจัยนี้ศึกษาในหนูขาวใหญ่พันธุ์ Wistar เพศเมีย อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จำนวน 50 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มๆ ละ 10 ตัว โดยใช้สัตว์ทดลองจากหน่วยเรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ การทดลองนี้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง เมื่อวันที่ 31 สิงหาคม 2553 ได้รับเลขที่จริยบรรณ ศธ 0521.11/679

2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

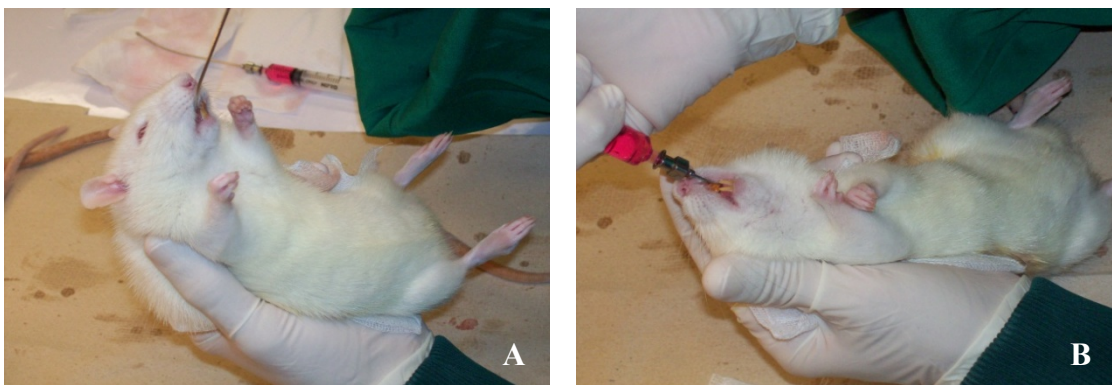
ก่อนการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน หนูทุกตัวจะได้รับการผ่าตัดรังไข่ (ovariectomy) ออกทั้งสองข้าง เพื่อให้สัตว์ทดลองอยู่ในสภาวะหมดประจำเดือน (menopause) ยกเว้นกลุ่มควบคุมจะได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ตัดรังไข่ออกจากตัว โดยขั้นตอนการผ่าตัดรังไข่ มีดังนี้

1. ชั่งน้ำหนักหนู และทำสัญลักษณ์ไว้บริเวณหางของหนู
2. ฉีดยาสลบ thiopental ขนาด 60 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection, i.p.)
3. เมื่อหนูสลบ นำหนูมาโกนขนบริเวณด้านข้างของลำตัวใต้ต่อกระดูกซี่โครงซี่สุดท้ายทั้งสองข้าง
4. ใช้สำลีชุบ 70% แอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดผิวหนังให้ทั่วบริเวณที่จะผ่าตัด และใช้ไม้พันสำลีชุบเบตาดีนทาทั่วบริเวณที่จะผ่าตัดอีกครั้ง จากนั้นใช้ 70% แอลกอฮอล์ทาซ้ำอีกครั้งหนึ่ง
5. กำหนดแนวผ่าตัดโดยเลือกบริเวณตรงกลางของด้านข้างลำตัว วัดจากซี่โครงซี่สุดท้ายลงมาประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นใช้กรรไกรผ่าตัดเปิดผนังด้านข้างลำตัวออกทีละชั้น เริ่มจากชั้นผิวหนัง ชั้นไขมัน และชั้นกล้ามเนื้อ ความกว้างของแผลประมาณ 1 เซนติเมตร
6. ใช้ปากคีบปลายคีมคีบรังไข่ออกมา จากนั้นใช้ไหมละลายผูกห้ามเลือด แล้วจึงตัดรังไข่ออก และตรวจสอบการผูกห้ามเลือดอีกครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าไม่มีเลือดไหลซึมออกมา ก่อนจะใส่กลับเข้าไปในตัว แต่ในหนูกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ต้องตัดรังไข่ออก ไม่ต้องทำขั้นตอนนี้
7. เย็บแผลโดยใช้ไหมละลาย โดยเย็บทีละชั้นจนครบทั้ง 3 ชั้น และใช้เบตาดีนทาบริเวณแผล
8. ใช้ไฟส่องให้ความอบอุ่นแก่หนู ดูดเสมหะออกจากจมูกและปาก เพื่อป้องกันการปิดกั้นทางเดินหายใจ รอจนหนูรู้สึกตัวดีแล้ว จึงให้หลอดป้อนอาหารป้อนยาแก้ปวดชนิดน้ำ โดยให้ขนาด 300 มก./กก. แล้วจึงย้ายหนูไปเลี้ยง โดยแยกเลี้ยงกรงละ 1-2 ตัว เพื่อป้องกันหนูกัดกันในช่วงพักฟื้น

หนูทุกตัวซึ่งได้รับการผ่าตัด จะได้รับการพักฟื้น 2 สัปดาห์ เพื่อให้แผลหายสนิท และจะได้รับการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนต่อไป



รูปที่ 2-1 (A) แสดงการฉีดยาสลบทางช่องท้อง (B) แสดงการผูกไหมห้ามเลือดก่อนตัดรังไข่ (C) แสดงการตัดรังไข่ออกจากตัว (D) แสดงการเย็บปิดแผล



รูปที่ 2-2 (A) แสดงการดูดเสมหะหลังผ่าตัด (B) แสดงการให้ยาแก้ปวดหลังจากหนูรู้สึกตัว

2.2 การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน

ในการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ใช้หนู 50 ตัว แบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Sham operation) เป็นกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดแต่ไม่ตัดรังไข่ออกจากตัวและได้รับ olive oil ฉีดใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน หลังจากผ่าตัด 2 สัปดาห์ ฉีดเป็นเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ (OVX) เป็นกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกจากตัวทั้งสองข้างและได้รับ olive oil ฉีดใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน หลังจากผ่าตัด 2 สัปดาห์ ฉีดเป็นเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 10 มก./กก. (E10) ละลายใน olive oil ฉีดใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน หลังจากผ่าตัด 2 สัปดาห์ ฉีดเป็นเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 20 มก./กก. (E20) ละลายใน olive oil ฉีดใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน หลังจากผ่าตัด 2 สัปดาห์ ฉีดเป็นเวลา 10 สัปดาห์

กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 40 มก./กก. (E40) ละลายใน olive oil ฉีดใต้ผิวหนัง วันละ 1 ครั้ง ทุกวัน หลังจากผ่าตัด 2 สัปดาห์ ฉีดเป็นเวลา 10 สัปดาห์

วิธีการผ่าตัดรังไข่ (ovariectomy) การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน และการวัดฮอร์โมนเอสโตรเจนดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ Radenahmad และคณะ (2006) ร่วมกับ Chu และคณะ (2006) และ McClung และคณะ (2006a)

ระหว่างการทดลอง สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำตามปกติ อยู่ในห้องที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีการควบคุมแสงสว่างโดยเปิดและปิดไฟทุก 12 ชั่วโมงตลอดการทดลอง



รูปที่ 2-3 แสดงการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนโดยฉีดใต้ผิวหนัง

3. วิธีการศึกษา

3.1 การวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ

เป็นวิธีการที่ใช้หลักการแปลงปรากฏการณ์ทางสรีรวิทยาเชิงกล คือการหดตัวและคลายตัวของกล้ามเนื้อ ให้อยู่ในรูปที่สามารถบันทึกได้ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ได้ โดยใช้โปรแกรม Chart ซึ่งจะใช้ Force transducer ช่วยในการแปลงสัญญาณเชิงกลจากการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อด้วยความแรงและความเร็วต่างๆ กัน มาเป็นสัญญาณไฟฟ้า และใช้ Bridge Amp ในการขยายสัญญาณจาก Force transducer แล้วส่งไปยังเครื่อง PowerLab และใช้เครื่อง PowerLab ในการแปลงสัญญาณไฟฟ้าเป็นสัญญาณดิจิทัล แล้วส่งเข้าเครื่องคอมพิวเตอร์ แสดงผลออกมาในรูปของเส้นบันทึกบนหน้าจอ

เมื่อครบกำหนดการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน จะทำการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ เพื่อศึกษาความแรงและความเร็วในการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้ไฟฟ้ากระตุ้นที่กล้ามเนื้อและเส้นประสาทและวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยใช้โปรแกรม Chart ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ (ดัดแปลงจาก Sotiriadou et al., 2006 และ คณาจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2550)

1. นำหนูแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก และทำให้สลบโดยฉีด thiopental (70 มก./กก.) เข้าทางช่องท้อง เมื่อหนูสลบ นำหนูมาโกนขนบริเวณขาทั้งสองข้างและทำการผ่าตัดเปิดท่อน้ำเหลือง เพื่อป้องกันการปิดกั้นทางเดินน้ำเหลืองจากเสมหะ และดูดเสมหะได้ง่ายขึ้น

2. วางหนูนอนคว่ำบนแท่นไม้ ใช้กรรไกรผ่าตัดและปากคีบผ่าตัดเปิดกล้ามเนื้อ EDL และ radial nerve และกล้ามเนื้อ gastrocnemius และ sciatic nerve เพื่อวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อทั้งสองมัด โดยจะวัดขาข้างขวาของหนูทุกตัว หลังจากนั้นใช้ด้ายผูกเอ็นส่วนปลาย (distal tendon) ของกล้ามเนื้อทั้งสองมัด ตัดเอ็นออกจากกระดูก และเลาะกล้ามเนื้อให้หลุดออกเป็นอิสระจากส่วนปลาย และยึดขาของหนูให้อยู่กับที่ด้วยลวด ใช้ผ้าก๊อชชุบ Krebs's solution ปิดบริเวณกล้ามเนื้อ เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ และขณะทำการทดลองให้หยด Krebs's solution บนกล้ามเนื้อเป็นระยะๆ

3. เตรียมเปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ เครื่อง PowerLab และเปิดโปรแกรม Chart ให้เรียบร้อย และกำหนด channel ที่ใช้บันทึก จำนวน 2 channel คือ contract และ stimulus และตั้งค่า bridge amplifier โดยตั้งค่า range ที่ 20 มิลลิโวลต์ ตั้งค่า High Pass เป็น DC และ Low Pass เป็น 20 เฮิรตซ์

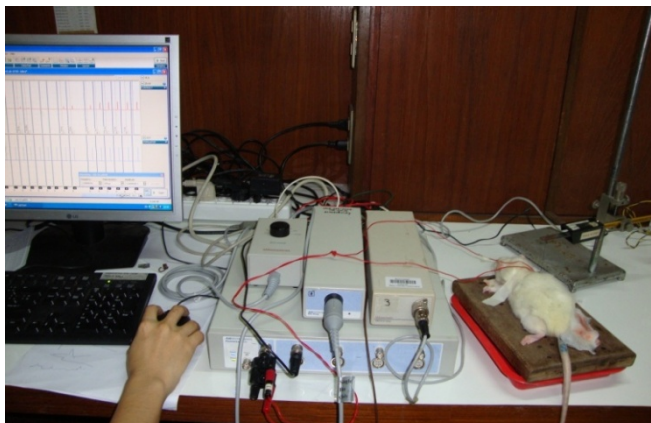
4. ก่อนการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ ต้องทำ force transducer calibration สำหรับกล้ามเนื้อ gastrocnemius ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อที่หดตัวแรง จะใช้คาน (blade) ของ Force transducer 2 แผ่น และใช้ตุ้มน้ำหนัก 10 กรัม ส่วนกล้ามเนื้อ EDL ซึ่งมีแรงหดตัว

น้อย ใช้คาน 1 แผ่น และใช้ตุ้มน้ำหนัก 2 กรัม เมื่อทำ calibration เรียบร้อยแล้ว ผูกปลายด้ายที่ติดกับเอ็นเข้ากับคานของ force transducer และปรับให้ด้ายตึงพอประมาณ

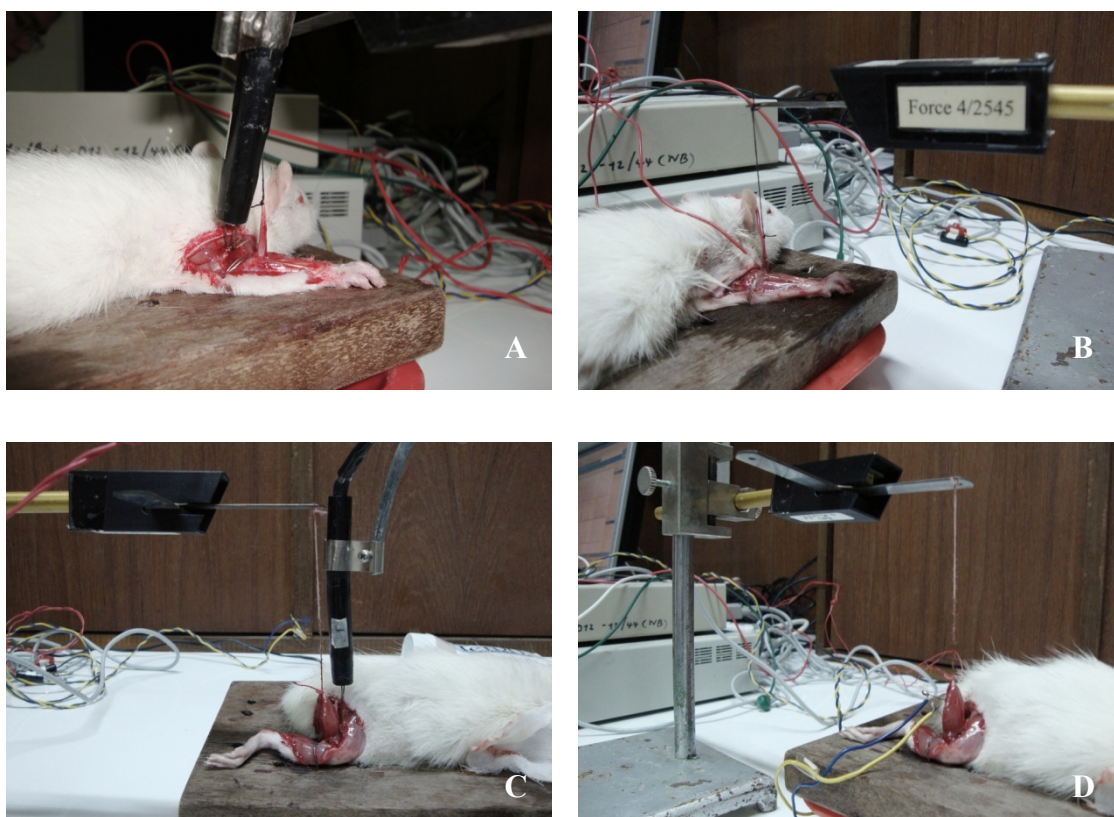
5. วัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยการกระตุ้นเส้นประสาทด้วยไฟฟ้า โดยใช้ bipolar electrodes คล้องเส้นประสาท จัดให้อยู่ในตำแหน่งที่เหมาะสม ให้ electrodes สัมผัสกับเส้นประสาทเท่านั้น และปลายอีกด้านของ electrodes ต่อกับปุ่ม moutput ของเครื่อง PowerLab และตั้งค่าตัวกระตุ้น โดยตั้งค่าความแรงในช่วง 2 โวลต์, ความถี่ 1 เฮิรตซ์, ระยะเวลา 0.1 มิลลิวินาที และเพิ่มความแรงของตัวกระตุ้น (amplitude) ครั้งละ 0.04 โวลต์ และทำการบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อ เพื่อหาค่าความแรงของตัวกระตุ้นที่ทำให้กล้ามเนื้อเริ่มหดตัว (threshold stimulus) และค่าความแรงของตัวกระตุ้นที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวด้วยความแรงสูงสุด (maximal stimulus) เมื่อกระตุ้นเส้นประสาท

6. วัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ โดยการกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยไฟฟ้าโดยตรง โดยเสียบ needle electrodes บริเวณตรงกลางของกล้ามเนื้อให้ปลาย 2 อัน ห่างกันพอประมาณ และปลายอีกด้านของ electrodes ต่อกับปุ่ม moutput ของเครื่อง PowerLab และตั้งค่าตัวกระตุ้น โดยตั้งค่าความแรงในช่วง 5 โวลต์, ความถี่ 1 เฮิรตซ์, ระยะเวลา 0.1 มิลลิวินาที และเพิ่มความแรงของตัวกระตุ้น (amplitude) ครั้งละ 0.1 โวลต์ และทำการบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อ เพื่อหาค่าความแรงของตัวกระตุ้นที่ทำให้กล้ามเนื้อเริ่มหดตัว (threshold stimulus) และค่าความแรงของตัวกระตุ้นที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวด้วยความแรงสูงสุด (maximal stimulus) จากนั้นกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยการกระตุ้นคู่ โดยใช้ความแรงในการกระตุ้นระดับ submaximal stimulus และกระตุ้นต่อเนื่อง โดยใช้ความแรงในการกระตุ้นระดับ maximal stimulus โดยเพิ่มความถี่ในการกระตุ้น ครั้งละ 5 เฮิรตซ์ เพื่อหาค่าความถี่ (frequency) ที่ทำให้กล้ามเนื้อหดตัวจนไม่มีช่วงคลายตัวระหว่างการกระตุ้นแต่ละครั้ง (complete tetanus) หลังจากนั้นกระตุ้นกล้ามเนื้อด้วยความถี่สูง (120 เฮิรตซ์) โดยใช้ความแรงในการกระตุ้นระดับ maximal stimulus เพื่อให้เกิดการหดตัวสูงสุดจนล้า

7. วิเคราะห์ความแรงและความเร็วในการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อจากเส้นบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อที่ได้ทั้งหมด โดยวิเคราะห์แรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อสูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดี่ยว และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง เวลาที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ เวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง ความถี่ที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นคู่ และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนเกิดการล้าจนเหลือ 25% ของแรงสูงสุด



รูปที่ 2-4 แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ



รูปที่ 2-5 (A) แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ EDL โดยกระตุ้น radial nerve
 (B) แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ EDL โดยกระตุ้นโดยตรง
 (C) แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ gastrocnemius โดยกระตุ้น sciatic nerve
 (D) แสดงการวัดการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ gastrocnemius โดยกระตุ้นโดยตรง

3.2 การเก็บเลือดและเนื้อเยื่อ

หลังจากวัดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบร้อยแล้ว ผ่าตัดเปิดช่องท้องและทรวงอก เจาะเลือด 3 มิลลิลิตร จากหัวใจ เมื่อเลือดแข็งตัวดีนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และนำซีรัมไปตรวจระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูทุกกลุ่มด้วยวิธี Chemiluminescent immune assay (CLA) (ส่งตรวจตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์) และเก็บกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ข้างขวา นำไปล้างใน PBS buffer ใช้ผ้าก๊อชซับให้แห้งและชั่งน้ำหนักกล้ามเนื้อ จากนั้นนำกล้ามเนื้อไปเก็บรักษาสภาพที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักมดลูก เพื่อแสดงถึงการเจริญเติบโตของมดลูก ซึ่งเป็นผลมาจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกาย

3.3 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ เป็นการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อให้พร้อมเพื่อที่จะนำไปตัดให้บางด้วยเครื่องตัดเย็น (cryostat)

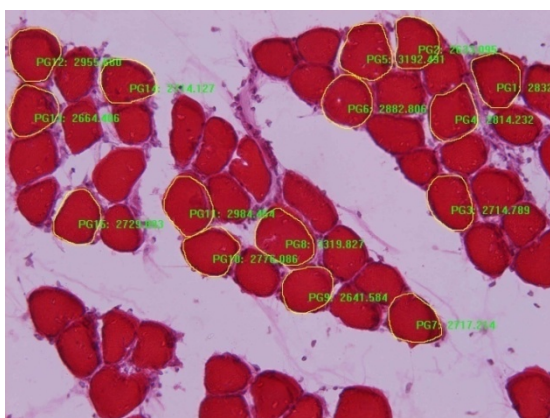
1. นำเนื้อเยื่อออกจากตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียส มาละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาวางในช่องว่างภายในเครื่องตัดเย็น (cryochamber)
2. ตัดแต่งชิ้นเนื้อให้ได้รูปร่างและขนาดที่ต้องการ
3. นำแท่นวางตัวอย่าง (stub) วางในช่องเก็บแท่นวางตัวอย่างภายในเครื่องตัดเย็น
4. ทาตัวกลางช่วยยึดตัวอย่าง (tissue freezing medium) บนแท่นวางตัวอย่าง เพื่อเป็นฐานช่วยยึดเนื้อเยื่อ
5. เมื่อตัวกลางช่วยยึดตัวอย่างเริ่มแข็ง (เป็นสีขาว) ให้วางเนื้อเยื่อ จะทำให้เนื้อเยื่อยึดติดกับแท่นวางตัวอย่าง
6. นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ได้มายึดติดกับที่จับบล็อกตัวอย่างของเครื่องตัดเย็น ล็อคให้แน่นพอดี จากนั้นตัดเนื้อเยื่อด้วยความหนา 20 ไมครอน โดยตัดตามขวางกึ่งกลางของมัดกล้ามเนื้อ
7. เก็บชิ้นเนื้อโดยใช้วิธีการ systemic random sampling โดยเก็บชิ้นเนื้อทุกๆ 5 section

3.4 การศึกษาขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อลายด้วยการย้อมแบบ H&E

การย้อมวิธีนี้อาศัยการทำให้สีหรือสสารเคมีไปทำปฏิกิริยาหรือรวมตัวกับสิ่งที่ต้องการศึกษาตามคุณสมบัติความเป็นกรดและด่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ โดยที่สี hematoxylin จะติดสีในส่วนที่มีคุณสมบัติในการติดสีด่าง (basophilic) เช่น นิวเคลียส ทำให้เห็นเป็นสีน้ำเงินม่วง ส่วนสี eosin จะติดสีในส่วนที่มีคุณสมบัติในการติดสีกรด (eosinophilic)

เช่น ไฮโดรฟลาสซึม ทำให้เห็นเป็นสีชมพูหรือแดง เพื่อให้สามารถแยกแยะความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น ซึ่งการย้อมแบบ H&E ดัดแปลงมาจาก สมมาตร (2544)

1. แช่เนื้อเยื่อในน้ำกลั่น เพื่อละลายตัวกลางช่วยยัดตัวอย่าง (tissue freezing medium) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
2. แช่เนื้อเยื่อใน alcohol-formalin เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 1 นาที
3. แช่เนื้อเยื่อด้วย 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 วินาที
4. ล้างเนื้อเยื่อในน้ำกลั่น จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 1 นาที
5. ย้อมด้วยสี Mayer's hematoxylin นาน 5 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำประปา
6. ย้อมด้วยสี eosin นาน 2 นาที แล้วล้างสีส่วนเกินและดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration) ด้วย 95% แอลกอฮอล์ 1 ครั้ง โดยการยกขึ้นลงซ้ำๆ 20-30 ครั้ง
7. ล้างเนื้อเยื่อใน 100% แอลกอฮอล์ 1 ครั้ง โดยการยกขึ้นลงซ้ำๆ 20-30 ครั้ง
8. ทำให้เซลล์ใส (clearing) โดยแช่ในไซลีน เป็นเวลา 2 นาที
9. หยด permount ลงบนเนื้อเยื่อในแผ่นสไลด์ และปิดทับด้วย cover slip จากนั้นนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล DP 50 (DP50, Olympus) และวัดขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อลายด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus 6.0 โดยแบ่งพื้นที่ของ section เป็น 5 ส่วน เลือกส่วนละ 10 เซลล์ เพื่อวัดพื้นที่หน้าตัด จะได้ขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์ทั้งหมด 50 เซลล์ต่อตัวอย่าง 1 ตัว ซึ่งการวัดขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อลายดัดแปลงมาจากงานวิจัยของ McClung และคณะ (2006a)



รูปที่ 2-6 ภาพแสดงการวัดขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อลาย

3.5 การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (Immunofluorescence)

การย้อมวิธีนี้อาศัยปฏิกิริยาของแอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) โดยแอนติบอดีที่ใช้เป็นแอนติบอดีที่ทราบชนิด ซึ่งจะจับกับแอนติเจนที่เฉพาะเจาะจงกันในเซลล์ และเป็นสิ่งที่ต้องการศึกษา ซึ่งแอนติบอดีที่ใช้จะผูกติดกับสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ เรียกว่า Fluorescein-labeled antibody ทำให้เห็นการเรืองแสงที่บริเวณปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีการย้อมแบบ indirect immunofluorescence method คือ การย้อมโดยใช้แอนติบอดี 2 ตัว ได้แก่ แอนติบอดีตัวที่ 1 (unlabeled primary antibody) ซึ่งเป็นตัวที่จับกับแอนติเจนที่ต้องการศึกษาในเนื้อเยื่อ และแอนติบอดีตัวที่ 2 (labeled secondary antibody) ซึ่งผูกติดกับสารเรืองแสง จะเป็นตัวที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีตัวที่ 1 เป็นการขยายสัญญาณการเรืองแสงให้ชัดขึ้น การย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ สามารถเลือกชนิดของสารเรืองแสงได้ ซึ่งมีหลากหลายสี และเทคนิคไม่ยุ่งยาก ใช้เวลาน้อย

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อลายด้วยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (ดัดแปลงจาก Cai et al., 2001, Vongvatcharanon et al., 2010 และ Wirakiat et al., 2012)

1. แช่เนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer เพื่อละลายตัวกลางช่วยยึดตัวอย่าง (tissue freezing medium) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
2. แช่เนื้อเยื่อใน alcohol-formalin เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 1 นาที
3. แช่เนื้อเยื่อด้วย 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 วินาที
4. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
5. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% Triton X-100 ใน 0.1 M Phosphate buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
6. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
7. แช่เนื้อเยื่อในบล็อกกิ้งบัฟเฟอร์ (blocking buffer) ซึ่งประกอบด้วย 2% normal horse serum ใน 0.1 M Phosphate buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
8. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
9. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีตัวที่ 1 (mouse anti-parvalbumin primary antibody) อัตราส่วน 1:50 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
10. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
11. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีตัวที่ 2 (Texas Red anti-mouse secondary antibody) อัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
12. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. หยด Vectashield mounting medium และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ผึ่งกึ่งขอบของกระจกปิดสไลด์ให้ทั่วด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดแห้งเร็ว

14. ห่อสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟรอยด์ เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

15. ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้วิธีการย้อมเช่นเดียวกับกลุ่มอื่น เว้นแต่ไม่ใส่ primary antibody

16. ศึกษาการแสดงออกของพาริวาลูมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Fluorescence microscope Olympus, BX50) และบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล (DP50, Olympus)

การศึกษาการแสดงออกของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ในกล้ามเนื้อลายด้วยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (ดัดแปลงจาก Wiik et al., 2009 และ Barros et al., 2009)

1. แช่เนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer เพื่อละลายตัวกลางช่วยยึดตัวอย่าง (tissue freezing medium) จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

2. แช่เนื้อเยื่อใน alcohol-formalin เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อ เป็นเวลา 1 นาที

3. แช่เนื้อเยื่อด้วย 70% แอลกอฮอล์ เป็นเวลา 10 วินาที

4. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. แช่เนื้อเยื่อใน 0.01 M citric buffer แล้วให้ความร้อนด้วยไมโครเวฟ ที่ 700 วัตต์ นาน 10 นาที วางให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที

6. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

7. แช่เนื้อเยื่อใน 0.3% Triton X-100 ใน 0.1 M Phosphate buffer ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที

8. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

9. แช่เนื้อเยื่อในบล็อกกิงก์บัฟเฟอร์ (blocking buffer) ซึ่งประกอบด้วย 3% normal horse serum ใน 0.1 M Phosphate buffer (สำหรับศึกษาเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟา) หรือ 3% normal goat serum (สำหรับศึกษาเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้า) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

11. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีตัวที่ 1 (mouse anti-estrogen receptor antibody อัตราส่วน 1:50 หรือ rabbit anti- β estrogen receptor antibody อัตราส่วน 1:200) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

12. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

13. แช่เนื้อเยื่อในแอนติบอดีตัวที่ 2 (Texas Red anti-mouse secondary antibody หรือ Fluorescence anti-rabbit secondary antibody) อัตราส่วน 1:200 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
14. ล้างเนื้อเยื่อใน 0.1 M Phosphate buffer จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
15. หยด Vectashield mounting medium และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ผึ่งกึ่งขอบของกระจกปิดสไลด์ให้ทั่วด้วยน้ำยาทาเล็บชนิดแห้งเร็ว
16. ห่อสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระดาษอะลูมิเนียมฟรอยด์ เก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
17. ในกลุ่มควบคุมเชิงลบ (negative control) ใช้วิธีการย้อมเช่นเดียวกับกลุ่มอื่น เว้นแต่ไม่ใส่ primary antibody
18. ศึกษาการแสดงออกของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Olympus IX70 microscope, Fluoview FV300 Laser Scanning Confocal System)

3.6 เวสเทิร์น บลอต (Western blot)

เป็นวิธีการแยกหาโปรตีนที่ประกอบด้วยโปรตีนหลายชนิดผสมกันอยู่ในเนื้อเยื่อ โดยการแยกตามน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ด้วยวิธี SDS-PAGE หลังจากนั้นเคลื่อนย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) และใช้วิธีอิมมูโนบลอตติง (immunoblotting) เพื่อหาโปรตีนที่ต้องการ โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสไปทดสอบกับซีรัมที่มีแอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนที่ต้องการศึกษา ก่อนที่จะจับกับแอนติบอดีชนิดที่ 2 ที่ผูกติดกับเอนไซม์ เพื่อขยายสัญญาณ และสามารถทำปฏิกิริยากับ enhanced chemiluminescent reagents (ECL) ทำให้บริเวณที่มีแถบโปรตีนที่ต้องการศึกษา เกิดการเรืองแสงออกมา (ดัดแปลงจาก Wirakiat et al., 2012)

การสกัดโปรตีนกล้ามเนื้อ

1. นำกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius มาตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ ภายใต้อุณหภูมิจุดเยือกแข็ง
2. ใส่ complete lysis buffer ให้ท่วมเนื้อเยื่อ ใช้ homogenizer บดเนื้อเยื่อให้ละเอียด โดยค่อยๆเพิ่มความเร็วในการบดจากต่ำสุดไปสูงสุด จนเนื้อเยื่อละเอียด แล้วบดต่อไปอีก 2 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นจนแข็ง (freezer) ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เป็นเวลา 15 นาที และทิ้งให้ละลายจนเป็นของเหลว (thawed) โดยนำมาวางที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที ทำเช่นนี้ 2 รอบ
3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

4. แยกเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) สำหรับนำไปวัดปริมาณโปรตีน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

การวัดปริมาณโปรตีน

นำ supernatant ที่ได้ไปคำนวณหาความเข้มข้นโดยวิธีของ Lowry (BIO-RAD) โดยเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน คือ bovine serum albumin (BSA) โดยมีขั้นตอนดังนี้

1. นำ supernatant มา dilute 10 เท่าด้วยน้ำ
2. ใส่โปรตีนมาตรฐานในถาดหลุมแถวที่ 1 จาก well A ถึง well H ใส่ well ละ 25 ไมโครลิตร
3. นำ sample ที่ dilute แล้ว ใส่ well ละ 1 ไมโครลิตร แล้ว dilute ด้วยน้ำ 25 เท่า
4. เตรียม working solution โดยเตรียมในอัตราส่วน solution A: solution B เท่ากับ 5 มิลลิลิตร: 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วใส่ใน well ทั้งของ standard และ sample
5. เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง shaker นาน 2 นาที
6. incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
7. วัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่นแสง 562 นาโนเมตร
8. นำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณหาสมการมาตรฐาน และคำนวณหาปริมาณโปรตีนที่จะใช้เตรียมตัวอย่าง

การเตรียมตัวอย่าง (sample)

1. นำ supernatant ที่ทราบความเข้มข้นของโปรตีนไปผสมกับ sample buffer (Laemmli sample buffer) อัตราส่วน 1:1
2. นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
3. นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นแยก (centrifuge) ด้วยความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

การเตรียมเจลสำหรับ SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

1. เตรียมอุปกรณ์ชุด electrophoresis และประกอบกระจกสำหรับเตรียมเจล
2. เตรียม 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide resolving gel และดูส่วนผสมใส่ในกระจกที่ประกอบแล้ว ใช้ isopropanol เป็นตัว top up บนหน้าเจล เพื่อไล่ฟองอากาศ วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรต์เซชัน (polymerization)

3. เตรียม 4% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide stack gel แล้วล้าง isopropanol ด้วยน้ำ 2 ครั้ง หลังจากนั้นดูดส่วนผสมใส่ในกระจก วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 60 นาที เพื่อให้เกิดการพอลิเมอร์ไรต์เซชัน (polymerization)
4. ประกอบกระจกกับอุปกรณ์ชุด electrophoresis
5. เติม 1xSDS running buffer
6. หยอด sample ที่ผสมด้วย loading buffer 10 ไมโครลิตร ลงใน well
7. ปลดปล่อยกระแสไฟฟ้า 90 โวลต์ constant amplify ต่อเจล ในขณะที่สีของ dye อยู่ในชั้นของ stack gel และเปลี่ยนเป็น 100 โวลต์ เมื่อสีของ dye อยู่ในชั้นของ resolving gel โดย run ในกระบวนน้ำแข็ง จนกระทั่งสีถึงขอบล่างของเจล

การย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส

1. ประกอบเจลและเมมเบรนลงใน Mini Trans-Blot โดยมีลำดับการวางดังนี้ ฟองน้ำ กระดาษกรอง (filter paper) แผ่นเจล แผ่นไนโตรเซลลูโลส กระดาษกรอง และฟองน้ำ
2. ประกอบ cassette กับชุดอุปกรณ์ Mini Trans-Blot
3. เติมทรานสเฟอรัลบัฟเฟอร์ (transfer buffer) ลงในแชมเบอร์ (chamber) พร้อมใส่น้ำแข็ง
4. ย้ายโปรตีนจากแผ่นเจลมายังแผ่นไนโตรเซลลูโลส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 250 มิลลิแอมป์ constant amplify เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

การทำอิมมูโนบลอตติง (Immunoblotting)

1. บล็อกโปรตีนที่ไม่ต้องการ (non-specific protein) โดยนำแผ่นไนโตรเซลลูโลส มาแช่ใน 7% non fat milk ใน TBS (TBS 27.9 มิลลิลิตร + non fat milk 2.1 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน และเขย่าแนวราบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อีก 30 นาที
2. ล้างแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
3. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในแอนติบอดีตัวที่หนึ่งที่ละลายใน 10% non fat milk ใน TBS อัตราส่วน 1:1,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส
4. ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกจากแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที
5. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในแอนติบอดีตัวที่สองที่ละลายใน 10% non fat milk ใน TBS อัตราส่วน 1:10,000 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง และ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

6. ล้างแอนติบอดีส่วนเกินออกด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 4 นาที และตามด้วย TBS 1 ครั้ง ก่อนนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL

การทำให้เกิดภาพของแถบโปรตีน (Detection)

1. แช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสใน enhance chemiluminescent reagents เป็นเวลา 5 นาที และทำให้แผ่นไนโตรเซลลูโลสแห้งสนิท
2. ประกบแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วย hyperfilm 1, 3 และ 5 นาที
3. นำ hyperfilm ในข้อ 2 ไปทำให้เกิดภาพในน้ำยาดีเวลอปเปอร์ (developer) เป็นเวลา 30 วินาที ล้างน้ำยาดีเวลอปเปอร์ด้วยน้ำประปา แล้วตามด้วยน้ำยาฟิกเซอร์ (fixer) 1 นาที ล้างด้วยน้ำประปาอีก 1 ครั้ง และทำให้ hyper film แห้งสนิท
4. วิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีน โดยนำแผ่นฟิล์มไปสแกน และวัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image-Pro Plus 6.0

4. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

1. ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด ประสิทธิภาพการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ ขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อลาย แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน
2. ระดับความเข้มข้นของแถบพาร์วัลบูมินที่แสดงออกในแต่ละกลุ่มการทดลอง แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. วิเคราะห์ผลการทดลองโดยใช้สถิติ one way ANOVA และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มโดยใช้ Least significant different test (LSD) $p < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. ข้อมูลพื้นฐาน

1.1 น้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม

จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีน้ำหนักตัวมากที่สุด ซึ่งมากกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10 และ E20 มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่ม E10 และ E20 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1 ขณะที่น้ำหนักตัวก่อนการทดลองของหนูแต่ละกลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกัน

1.2 อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มต่อเดือน

จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวมากที่สุด ซึ่งมากกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10, E20 และ E40 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่ม Sham หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีอัตราการเพิ่มของน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่ม E20 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1

1.3 น้ำหนักมดลูกของหนูแต่ละกลุ่ม

จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีน้ำหนักมดลูกน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนทุกกลุ่มมีน้ำหนักมดลูกมากกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีน้ำหนักมดลูกมากกว่ากลุ่ม E10 และ E20 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1

1.4 น้ำหนักมดลูก / น้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม

จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนทุกกลุ่ม มีน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีน้ำหนักมดลูก/น้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่ม E10 และ E20 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1

- 1.5 น้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL ของหนูแต่ละกลุ่ม
จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีน้ำหนักกล้ามเนื้อน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนทุกกลุ่มมีน้ำหนักกล้ามเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่ม Sham แต่กลุ่ม E20 และ E40 มีน้ำหนักกล้ามเนื้อมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1
- 1.6 น้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL ต่อน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม
จากการศึกษาพบว่า กลุ่ม OVX มีน้ำหนักกล้ามเนื้อ/น้ำหนักตัวน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10, E20 และ E40 มีน้ำหนักกล้ามเนื้อต่อน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่ม Sham แต่มากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 3-1
- 1.7 น้ำหนักกล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม
จากการศึกษาพบว่า น้ำหนักกล้ามเนื้อทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3-1
- 1.8 น้ำหนักกล้ามเนื้อ gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม
จากการศึกษาพบว่า น้ำหนักกล้ามเนื้อทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 แสดงน้ำหนักตัว อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือน น้ำหนักมดลูก น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius และ น้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัว ของหนูแต่ละกลุ่ม (แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM)

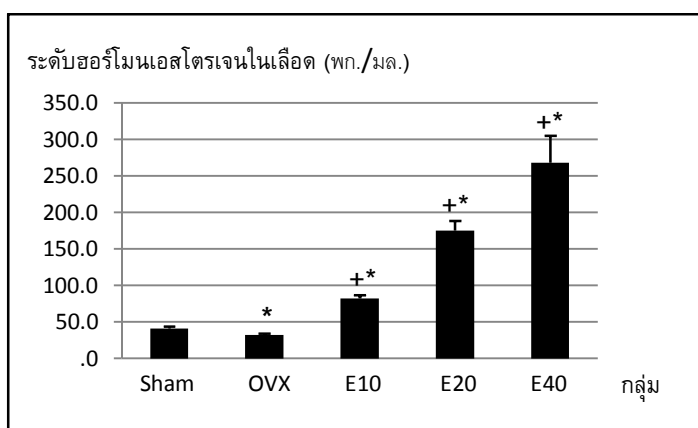
กลุ่ม	Sham	OVX	E10	E20	E40
น้ำหนักตัว (กรัม)	260.53 \pm 2.93 ⁺	275.60 \pm 5.22*	248.60 \pm 3.67 ⁺ *	247.47 \pm 4.88 ⁺ *	261.27 \pm 3.07 ⁺
อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือน (กรัม)	8.35 \pm 0.71 ⁺	17.93 \pm 1.29*	6.98 \pm 0.83 ⁺	6.43 \pm 1.29 ⁺	9.65 \pm 1.35 ⁺
น้ำหนักมดลูก (กรัม)	0.46 \pm 0.04 ⁺	0.14 \pm 0.01*	0.57 \pm 0.01 ⁺ *	0.61 \pm 0.03 ⁺ *	0.75 \pm 0.04 ⁺ *
น้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัว (x100)	0.18 \pm 0.02 ⁺	0.05 \pm 0.01*	0.23 \pm 0.01 ⁺ *	0.25 \pm 0.01 ⁺ *	0.29 \pm 0.02 ⁺ *
น้ำหนัก EDL (กรัม)	0.070 \pm 0.002 ⁺	0.060 \pm 0.003*	0.063 \pm 0.002	0.069 \pm 0.002 ⁺	0.070 \pm 0.003 ⁺
น้ำหนัก EDL ต่อน้ำหนักตัว (x100)	0.027 \pm 0.001 ⁺	0.022 \pm 0.001*	0.025 \pm 0.001 ⁺	0.028 \pm 0.001 ⁺	0.027 \pm 0.001 ⁺
น้ำหนัก gastrocnemius (กรัม)	1.587 \pm 0.029	1.600 \pm 0.088	1.533 \pm 0.047	1.573 \pm 0.045	1.587 \pm 0.031
น้ำหนัก gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัว (x100)	0.609 \pm 0.008	0.577 \pm 0.024	0.616 \pm 0.014	0.635 \pm 0.012	0.607 \pm 0.010

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$ (n = 10)

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$ (n = 10)

2. ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด

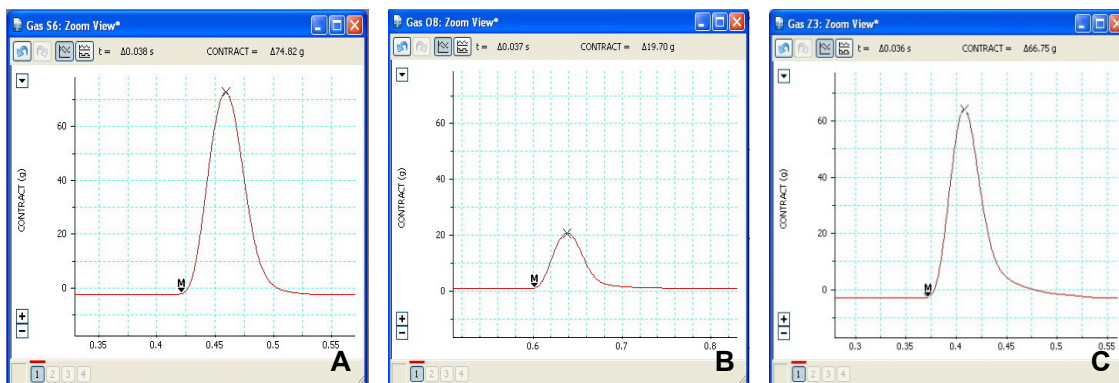
จากการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนจากซีรัมของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่า หนูกลุ่ม OVX มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนน้อยที่สุดคือ 32.8 ± 1.63 พก./มล. ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) กลุ่ม Sham มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 41.6 ± 2.43 พก./มล. ส่วนกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทั้งสามกลุ่มมีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่ากลุ่ม OVX และ กลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน 10, 20 และ 40 มคก./กก. มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน 82.38 ± 4.79 , 175.6 ± 12.84 และ 268.63 ± 36.47 พก./มล. ตามลำดับ กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน E10 มีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนน้อยกว่ากลุ่ม E20 และ E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-1



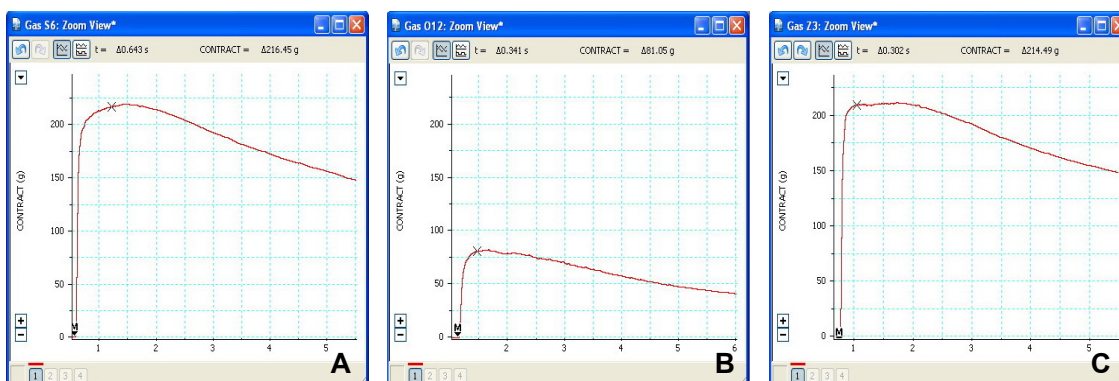
รูปที่ 3-1 แสดงระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม

- * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$ (n = 10)
- + มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$ (n = 10)

3. ประสิทธิภาพการหดและคลายตัวของกล้ามเนื้อ



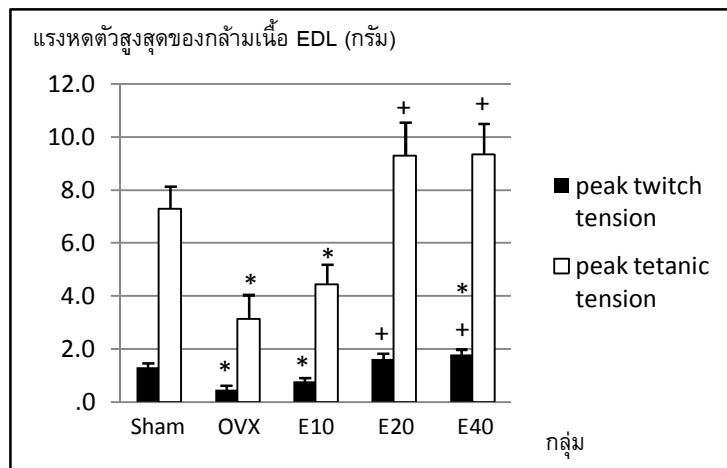
รูปที่ 3-2 แสดงเส้นบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นเดี่ยวในกลุ่ม Sham (A), OVX (B) และ E20 (C)



รูปที่ 3-3 แสดงเส้นบันทึกการหดตัวของกล้ามเนื้อเมื่อกระตุ้นต่อเนื่องในกลุ่ม Sham (A), OVX (B) และ E20 (C)

3.1 แรงหดตัวสูงสุดของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius เมื่อกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension)

จากการศึกษาพบว่า ในกล้ามเนื้อ EDL กลุ่ม OVX มีแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยวและกระตุ้นต่อเนื่องน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E20 มีแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยวและกระตุ้นต่อเนื่องเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยวมากกว่ากลุ่ม OVX และกลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่ม E10 มีแรงหดตัวเพิ่มขึ้น แต่น้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E20 และ E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-4

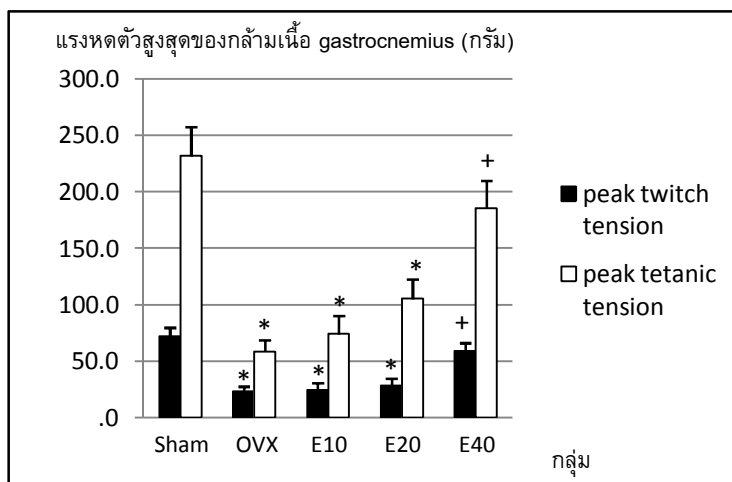


รูปที่ 3-4 แสดงแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) ของกล้ามเนื้อ EDL ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius กลุ่ม OVX มีแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยวและกระตุ้นต่อเนื่องน้อยที่สุด ซึ่งน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยวและกระตุ้นต่อเนื่องเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนกลุ่ม E10 และ E20 มีแรงหดตัวเพิ่มขึ้น แต่น้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-5



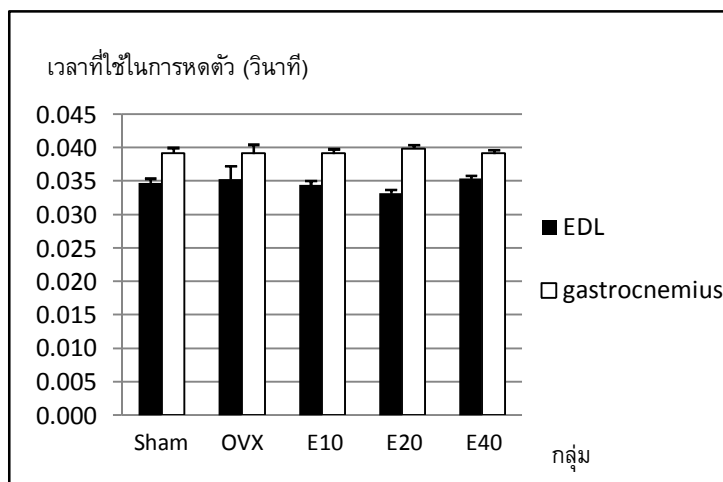
รูปที่ 3-5 แสดงแรงหดตัวสูงสุดเมื่อกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) ของกล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

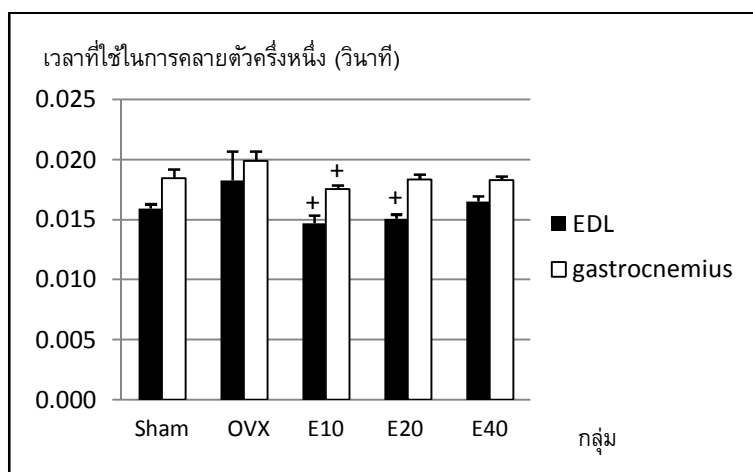
+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

3.2 เวลาที่ใช้ในการหดตัว (contraction time) และเวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง (one-half relaxation time) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius

จากการศึกษาพบว่า เวลาที่ใช้ในการหดตัวในกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน ดังรูปที่ 3-6 ส่วนเวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง ในกล้ามเนื้อ EDL กลุ่ม OVX มีค่าไม่ต่างจากกลุ่ม Sham แต่มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่ม Sham ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10 และ E20 มีค่าลดลงใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และน้อยกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius พบว่ากลุ่ม OVX มีค่าไม่ต่างจากกลุ่ม Sham แต่มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่ม Sham ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10 มีค่าลดลงใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และน้อยกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-7



รูปที่ 3-6 แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัว (contraction time) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

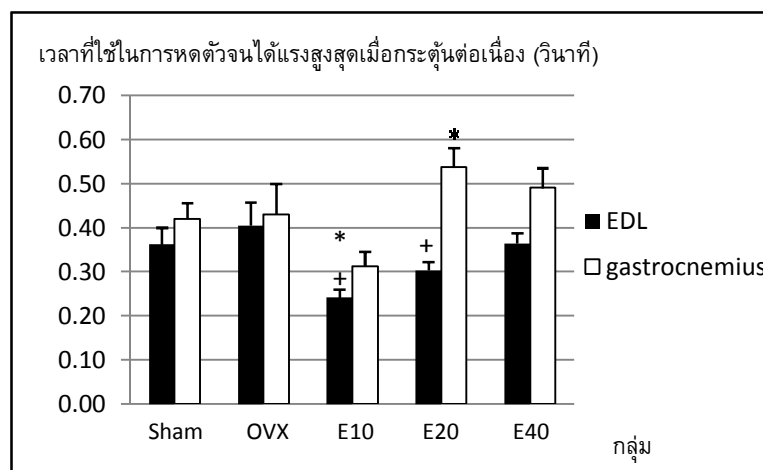


รูปที่ 3-7 แสดงเวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง (one-half relaxation time) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)
+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

3.3 เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง (time to peak tension) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius

จากการศึกษาพบว่า ในกล้ามเนื้อ EDL กลุ่ม OVX มีค่าเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่องไม่ต่างจากกลุ่ม Sham แต่มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่ม Sham ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีค่าลดลงใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham โดยกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม OVX กลุ่ม Sham และกลุ่ม E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และกลุ่ม E20

มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius กลุ่ม OVX มีค่าเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่องไม่ต่างจากกลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีค่าไม่ต่างจากกลุ่ม Sham และ OVX แต่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E20 มีค่ามากกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และกลุ่ม E10 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม E20 และ E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-8



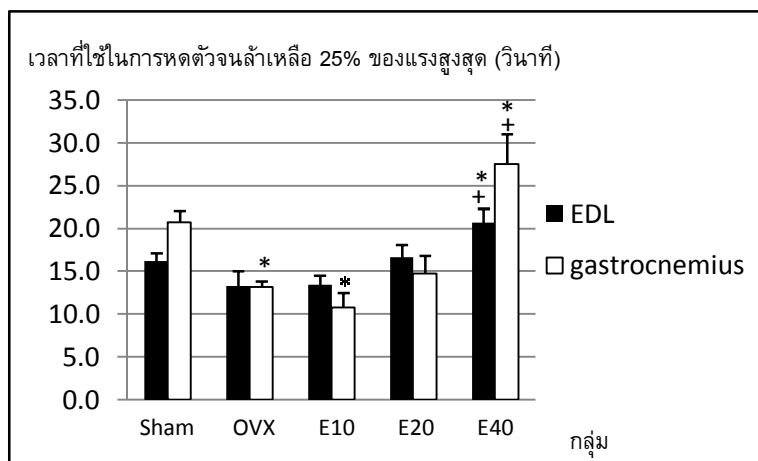
รูปที่ 3-8 แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง (time to peak tension) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

3.4 เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนล้าเหลือ 25% ของแรงสูงสุด (time to fatigue) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius

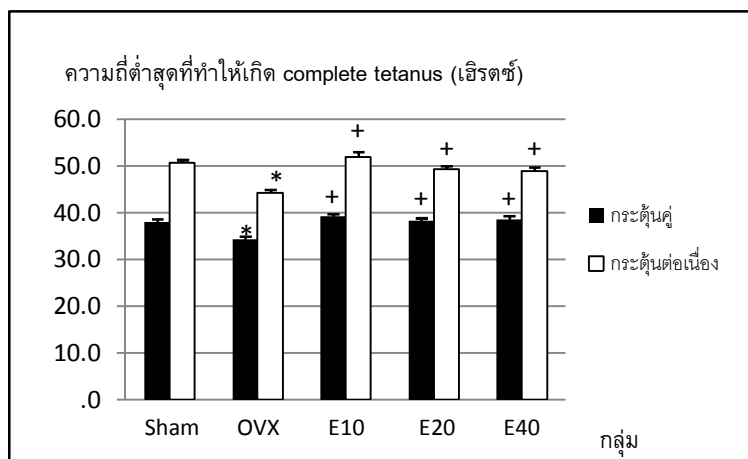
จากการศึกษาพบว่า ในกล้ามเนื้อ EDL กลุ่ม OVX มีค่าเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนล้าเหลือ 25% ของแรงสูงสุดไม่ต่างจากกลุ่ม Sham แต่มีแนวโน้มน้อยกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีค่าเพิ่มขึ้น โดยกลุ่ม E40 มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius กลุ่ม OVX และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10 มีค่าเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนล้าเหลือ 25% ของแรงสูงสุดน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E40 มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-9



รูปที่ 3-9 แสดงเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนล้มเหลือ 25% ของแรงสูงสุด (time to fatigue) ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)
 * มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$
 + มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

3.5 ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่อง ของกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius

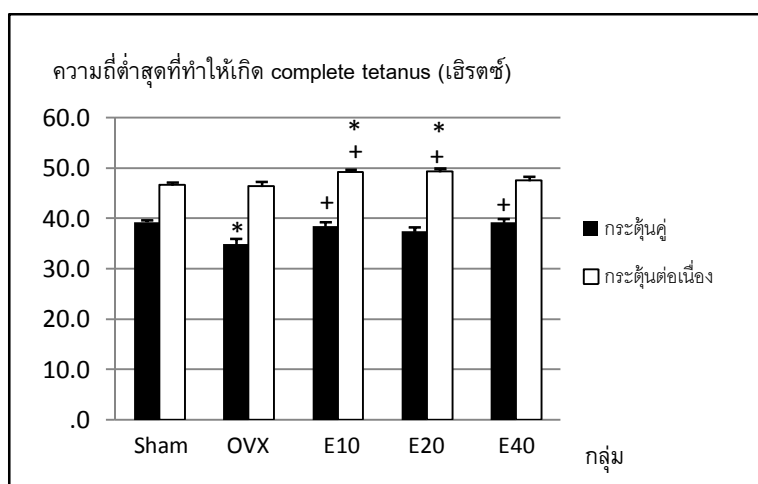
จากการศึกษาพบว่า ในกล้ามเนื้อ EDL กลุ่ม OVX มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่องน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยกลุ่ม E10 มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นต่อเนื่องมากกว่ากลุ่ม E20 และ E40 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius กลุ่ม OVX มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ น้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นต่อเนื่องไม่ต่างจากกลุ่ม Sham ขณะที่กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนมีค่าเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham โดยกลุ่ม E10 และ E40 มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ มากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และกลุ่ม E10 และ E20 มีค่าความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง มากกว่ากลุ่ม OVX และกลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-10 และ 3-11



รูปที่ 3-10 แสดงความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่องของกล้ามเนื้อ EDL ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$



รูปที่ 3-11 แสดงความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นคู่ และกระตุ้นต่อเนื่องของกล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

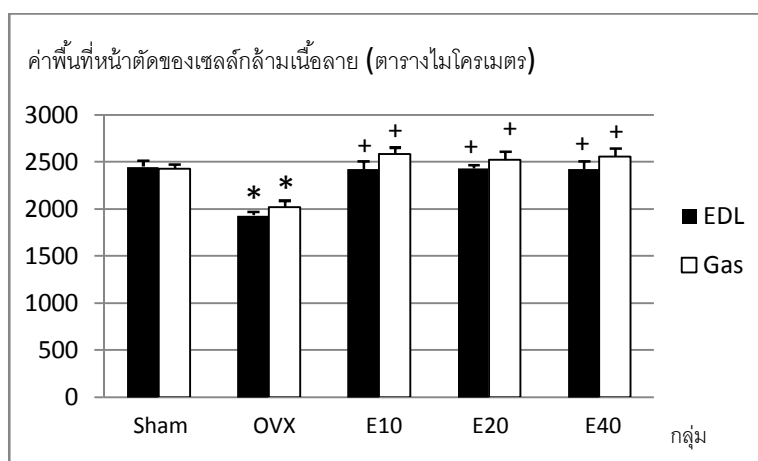
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

4. ศึกษาขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อลายด้วยการย้อมแบบ H&E

เซลล์กล้ามเนื้อลาย มีลักษณะเป็นทรงกระบอก เมื่อตัดตามขวาง จะมองเห็นเซลล์ลักษณะเป็นวงกลม แต่ละเซลล์มีมากกว่าหนึ่งนิวเคลียส และนิวเคลียสอยู่บริเวณขอบเซลล์ ย้อมติดสีม่วง ไซโตพลาสซึมย้อมติดสีชมพู มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบเซลล์กล้ามเนื้อ เรียกว่า endomysium ซึ่งจะมองเห็นเส้นใยคอลลาเจน ย้อมติดสีชมพู แทรกอยู่ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อลาย ดังรูปที่ 3-13 และ 3-14

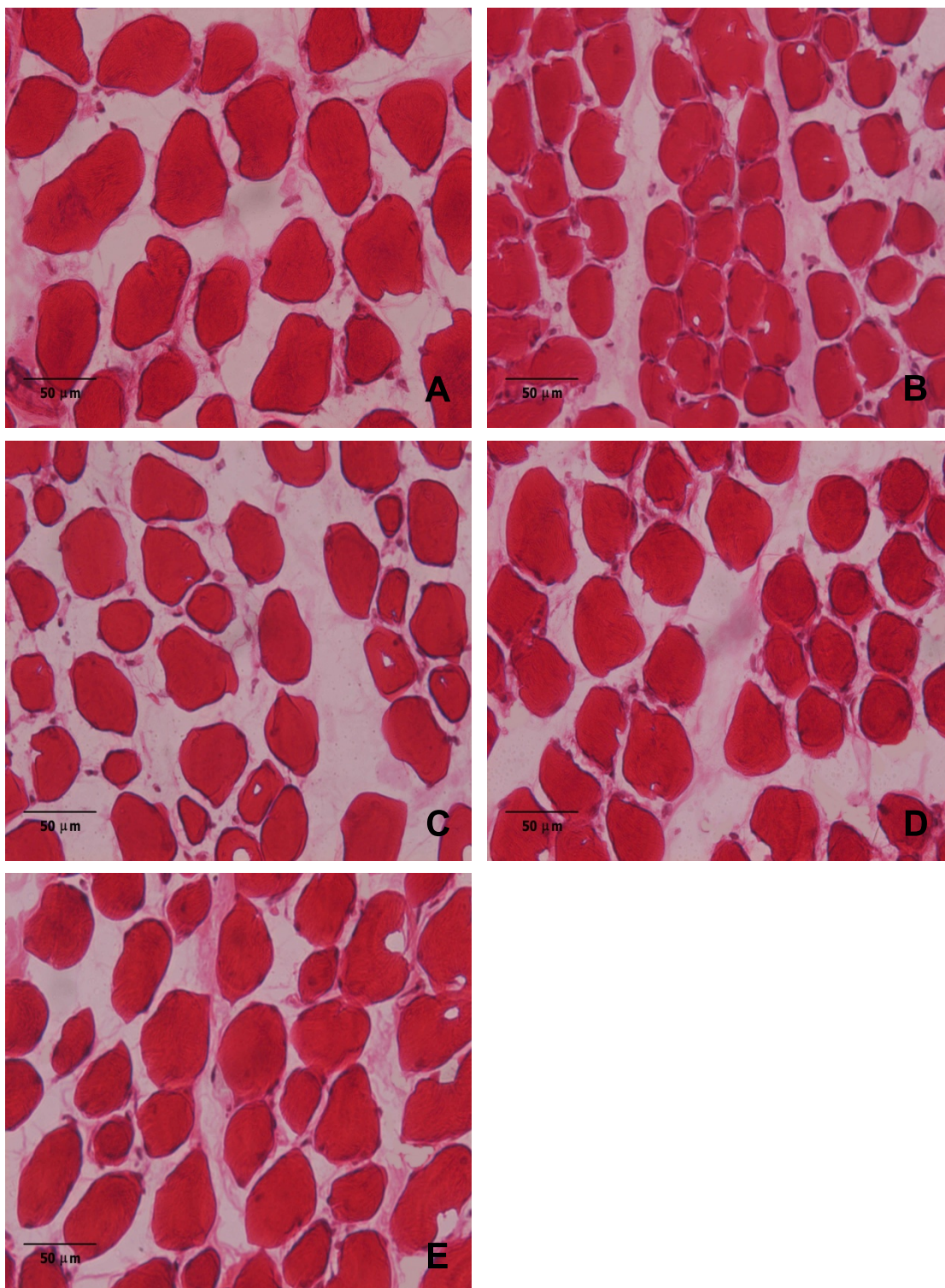
จากการวัดขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่า กลุ่ม OVX มีค่าเฉลี่ยของพื้นที่หน้าตัดของเซลล์น้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทน E10, E20 และ E40 มีค่าเพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ทั้งในกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ดังรูปที่ 3-12



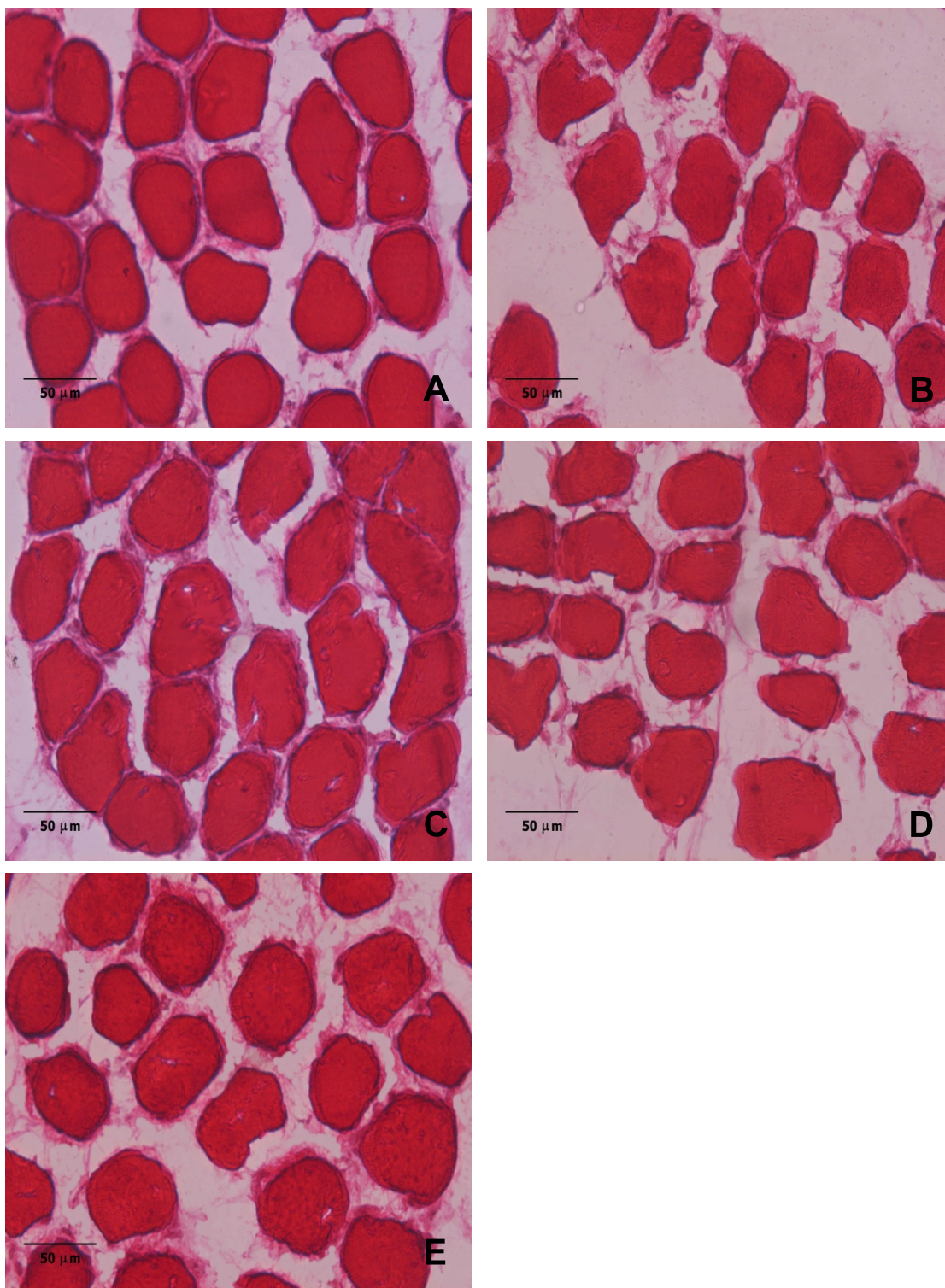
รูปที่ 3-12 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ของหนูแต่ละกลุ่ม (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$



รูปที่ 3-13 แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D) และ E40 (E) ด้วยการย้อมแบบ H&E

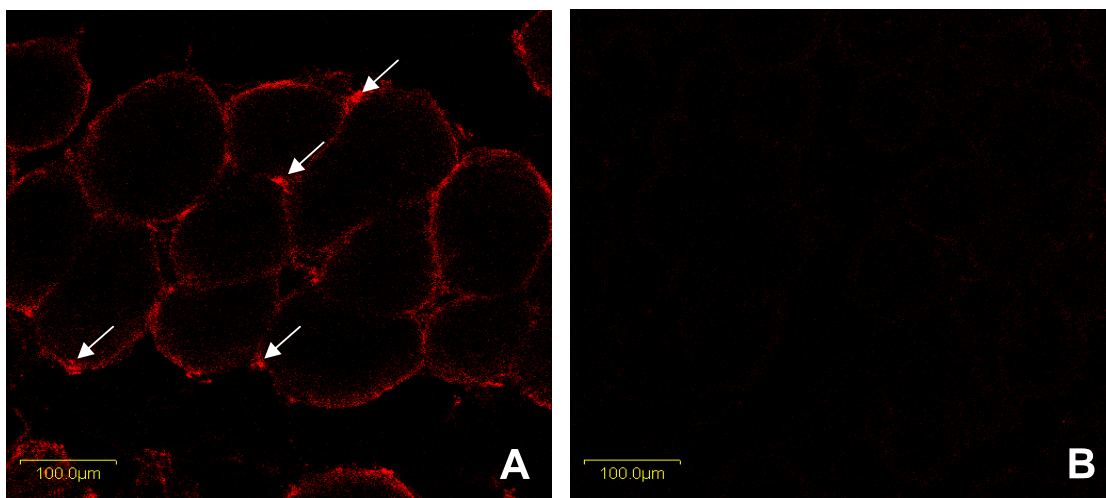


รูปที่ 3-14 แสดงลักษณะของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D) และ E40 (E) ด้วยการย้อมแบบ H&E

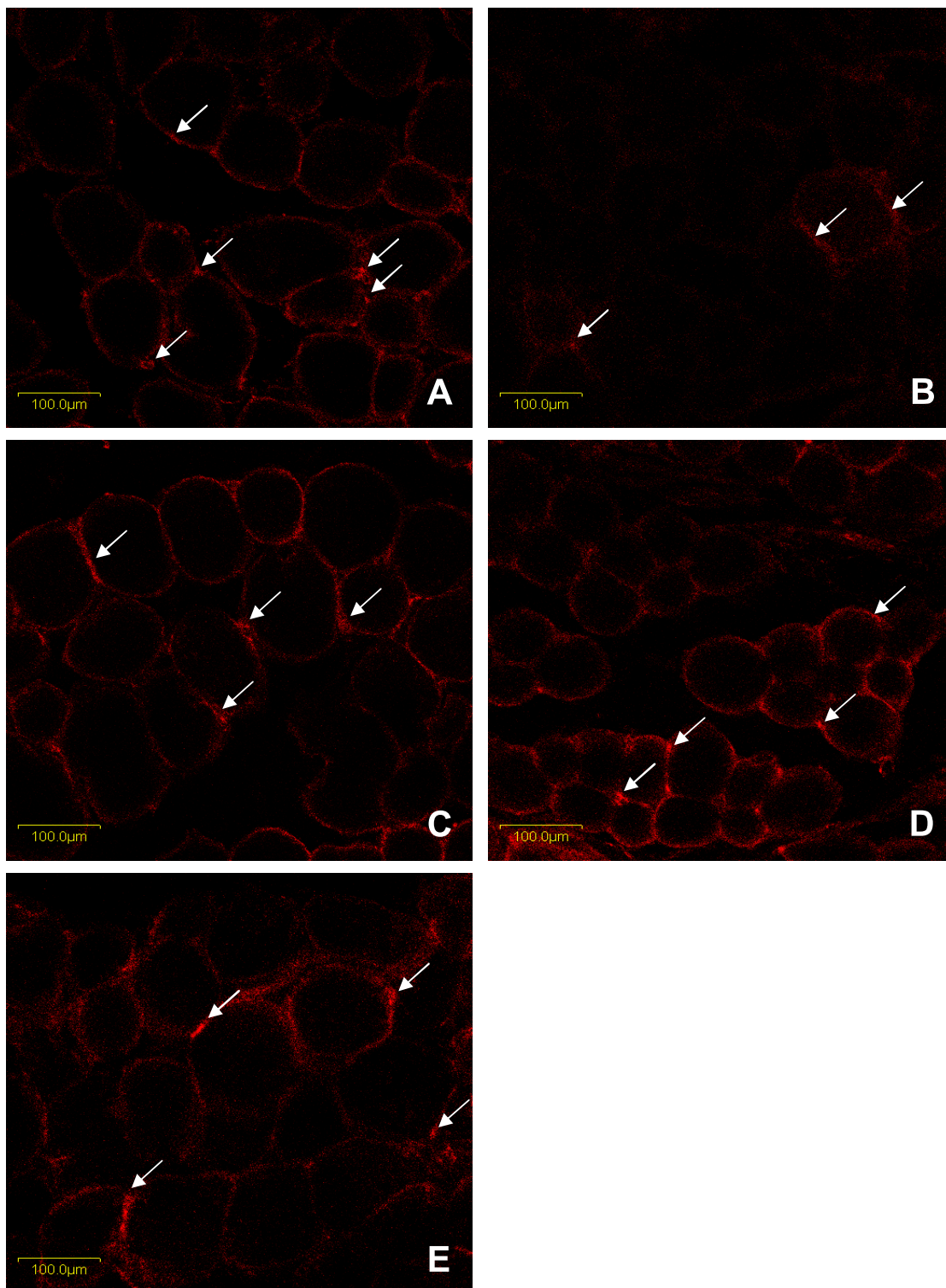
5. ปฏิกริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด α (ER α) ในกล้ามเนื้อลายโดยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาพบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α บริเวณนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก ย้อมติดสีแดง (รูปที่ 3-15 A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α บริเวณนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-15 B)

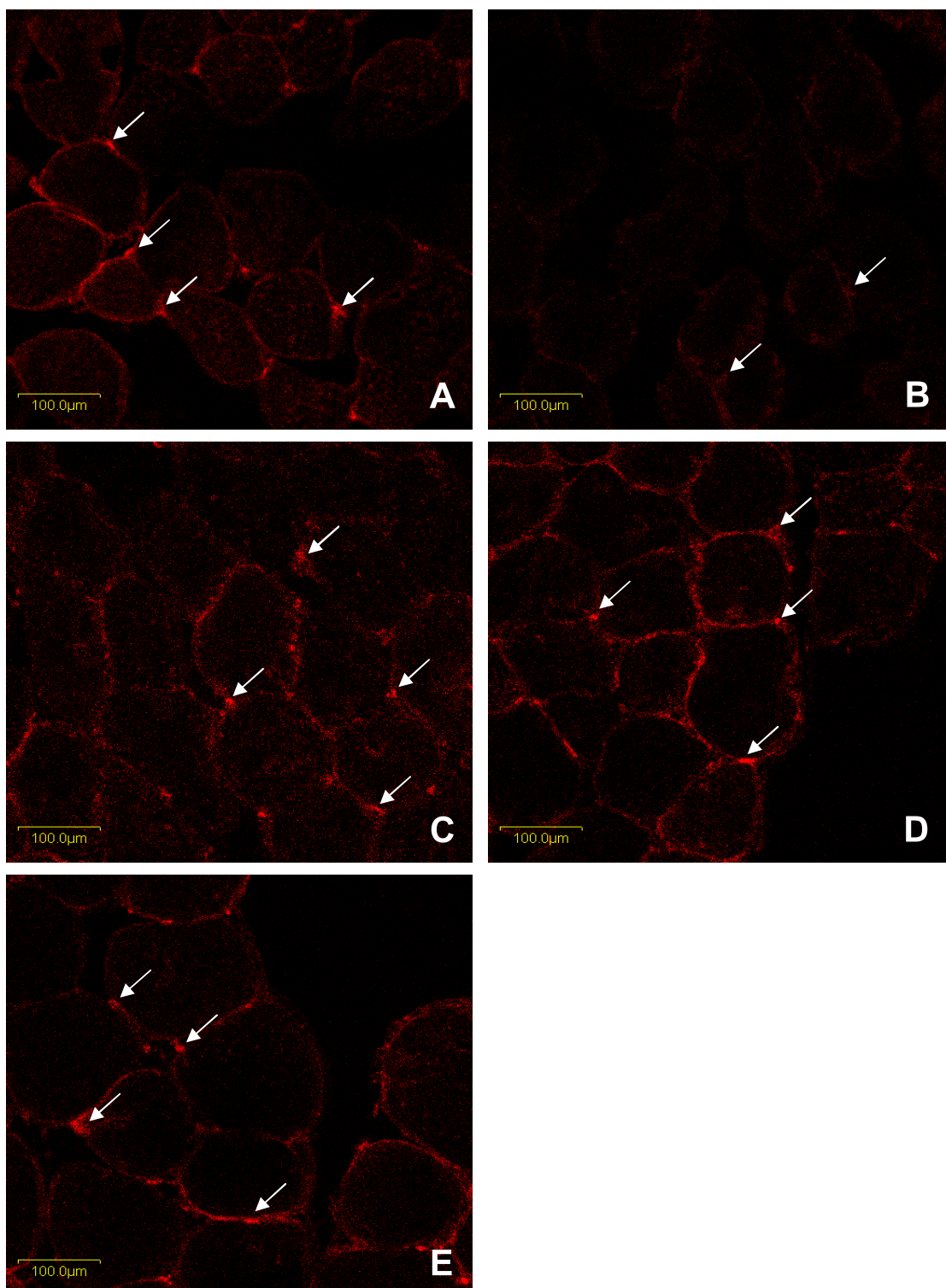
จากการศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α ในเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของหนูในกลุ่มที่มีการตัดรังไข่ (OVX) (รูปที่ 3-16B และ 3-17B) ลดลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (Sham) (รูปที่ 3-16A และ 3-17A) และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10, 20 และ 40 มคก./กก. ในกลุ่ม E10, E20 และ E40 (รูปที่ 3-16C-E และ 3-17C-E) ตามลำดับ พบว่ามีการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham



รูปที่ 3-15 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α (ปลายศรสีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก (A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ ER α ในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (B)



รูปที่ 3-16 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER α (ปลายครีชีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D) และ E40 (E)



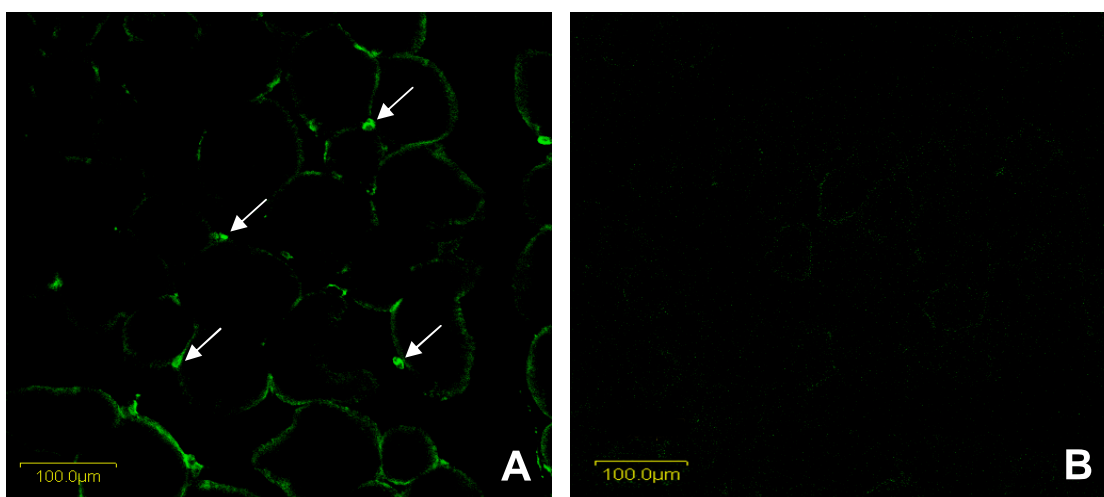
รูปที่ 3-17 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ ER α (ปลายตรัสีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D)

และ E40 (E)

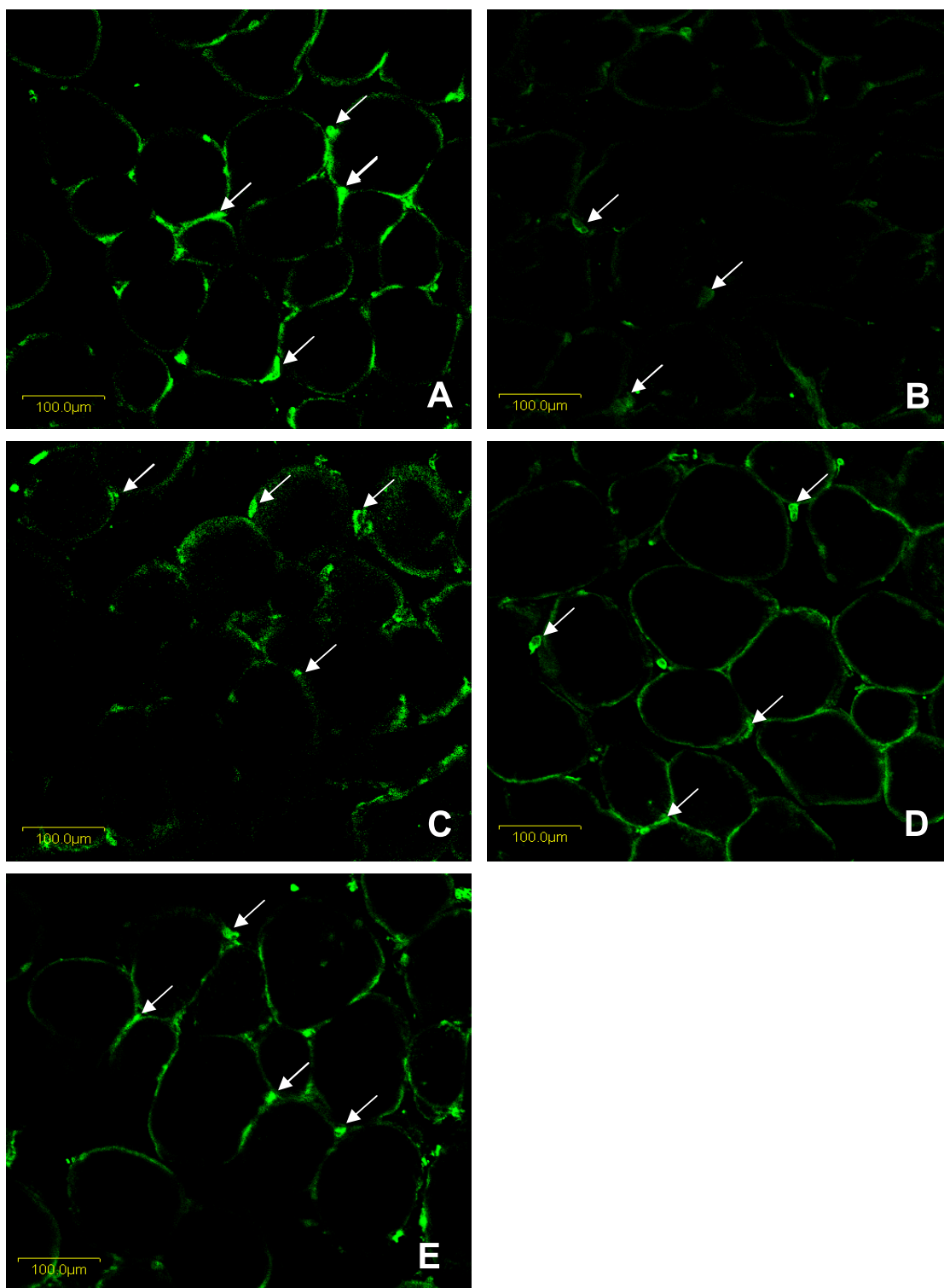
6. ปฏิกริยาอิมมูโนของ estrogen receptor ชนิด β ($ER\beta$) ในกล้ามเนื้อลายโดยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาพบปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ บริเวณนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก ย้อมติดสีเขียว (รูปที่ 3-18A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ บริเวณนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-18B)

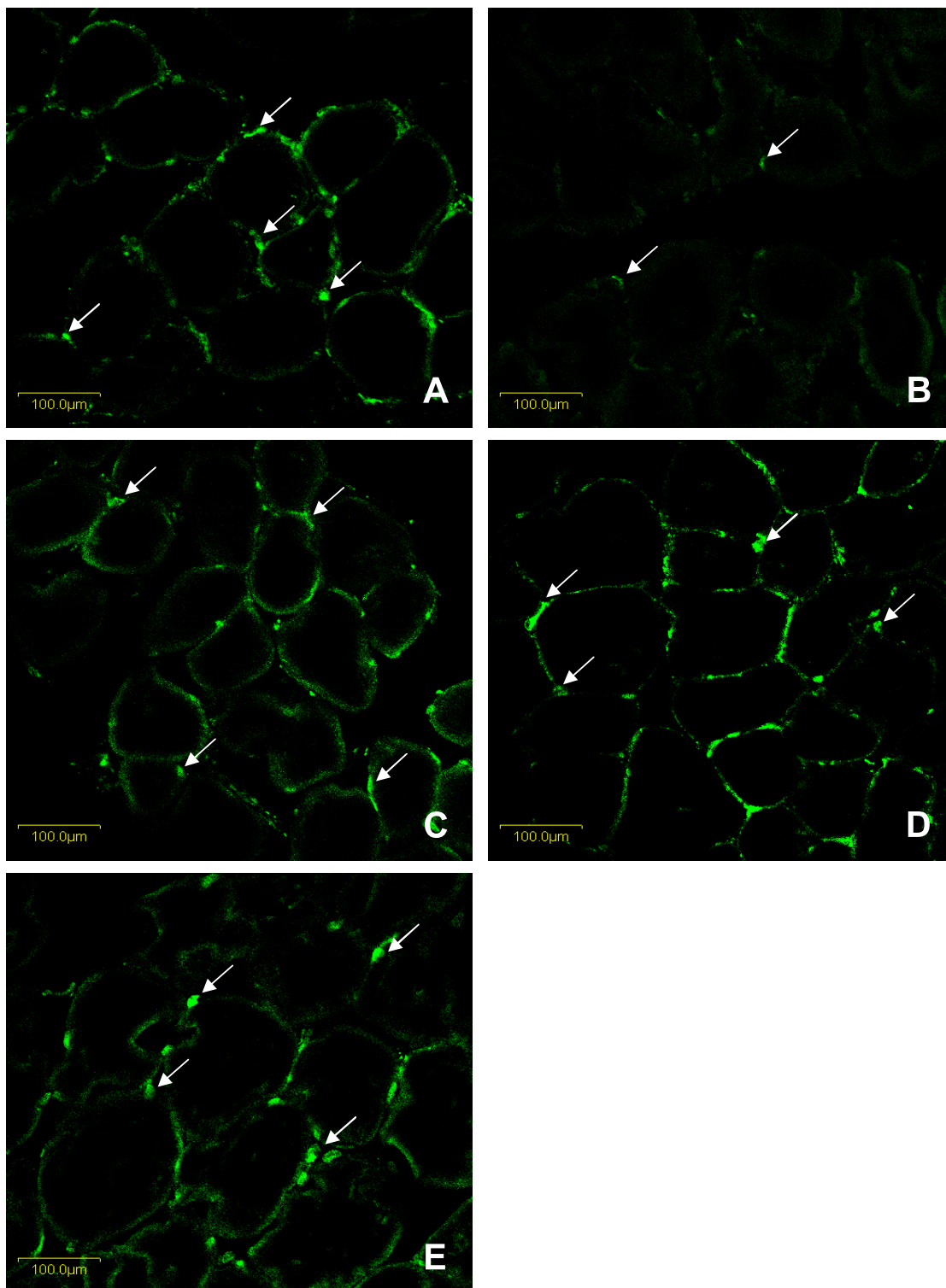
จากการศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ ในเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของหนูในกลุ่มที่มีการตัดรังไข่ (OVX) (รูปที่ 3-19B และ 3-20B) ลดลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (Sham) (รูปที่ 3-19A และ 3-20A) และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10, 20 และ 40 มคก./กก. ในกลุ่ม E10, E20 และ E40 (รูปที่ 3-19C-E และ 3-20C-E) ตามลำดับ พบว่ามีการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham



รูปที่ 3-18 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ (ปลายศรสีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก (A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ ในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (B)



รูปที่ 3-19 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ (ปลายครีชีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D) และ E40 (E)

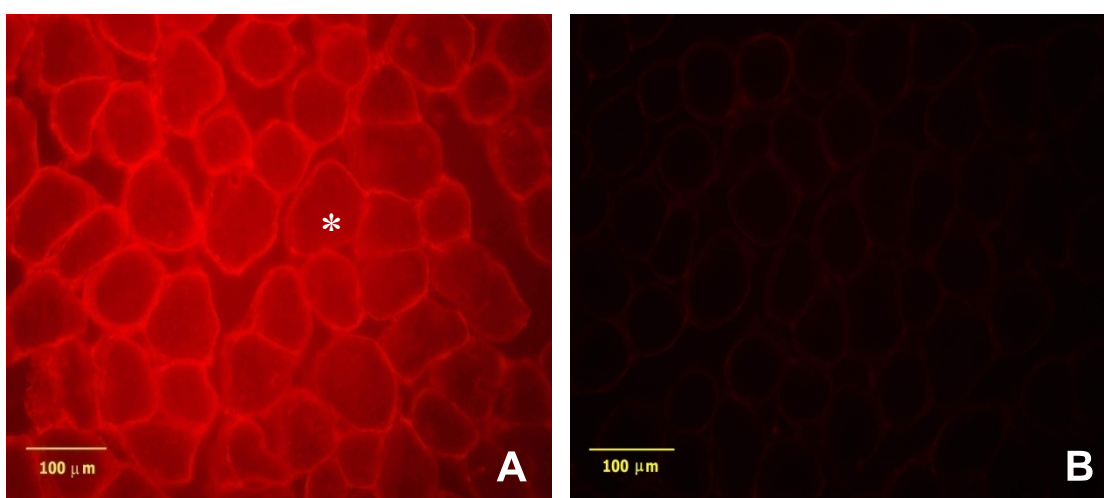


รูปที่ 3-20 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ $ER\beta$ (ปลายครีชีขาว) ที่พบในนิวเคลียสของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D) และ E40 (E)

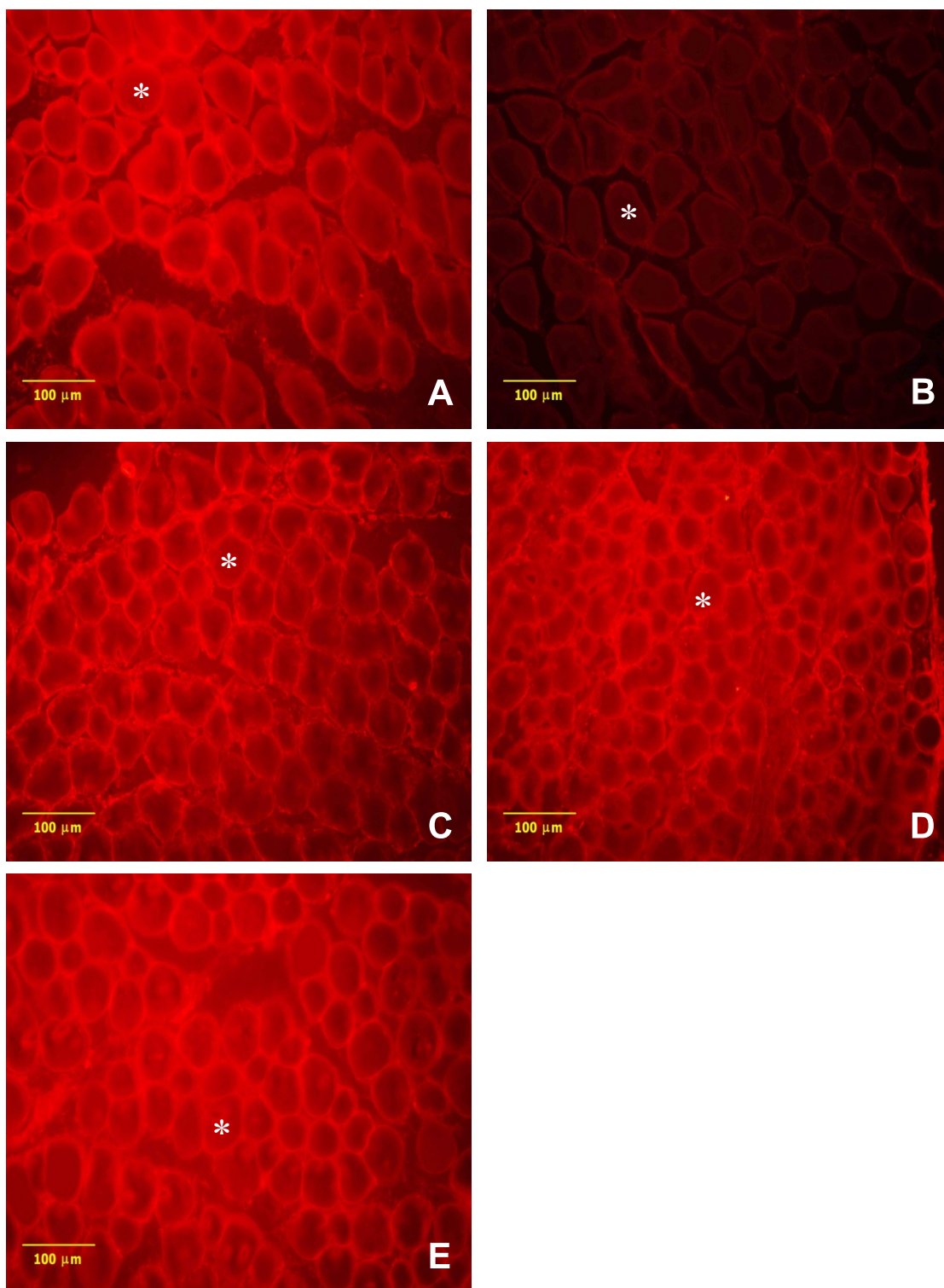
7. ปฏิกริยาอิมมูโนของโปรตีน parvalbumin (PV) ในกล้ามเนื้อละลายโดยวิธีการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

จากการศึกษาพบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อละลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก ย้อมติดสีแดง (รูปที่ 3-21A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อละลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (รูปที่ 3-21B)

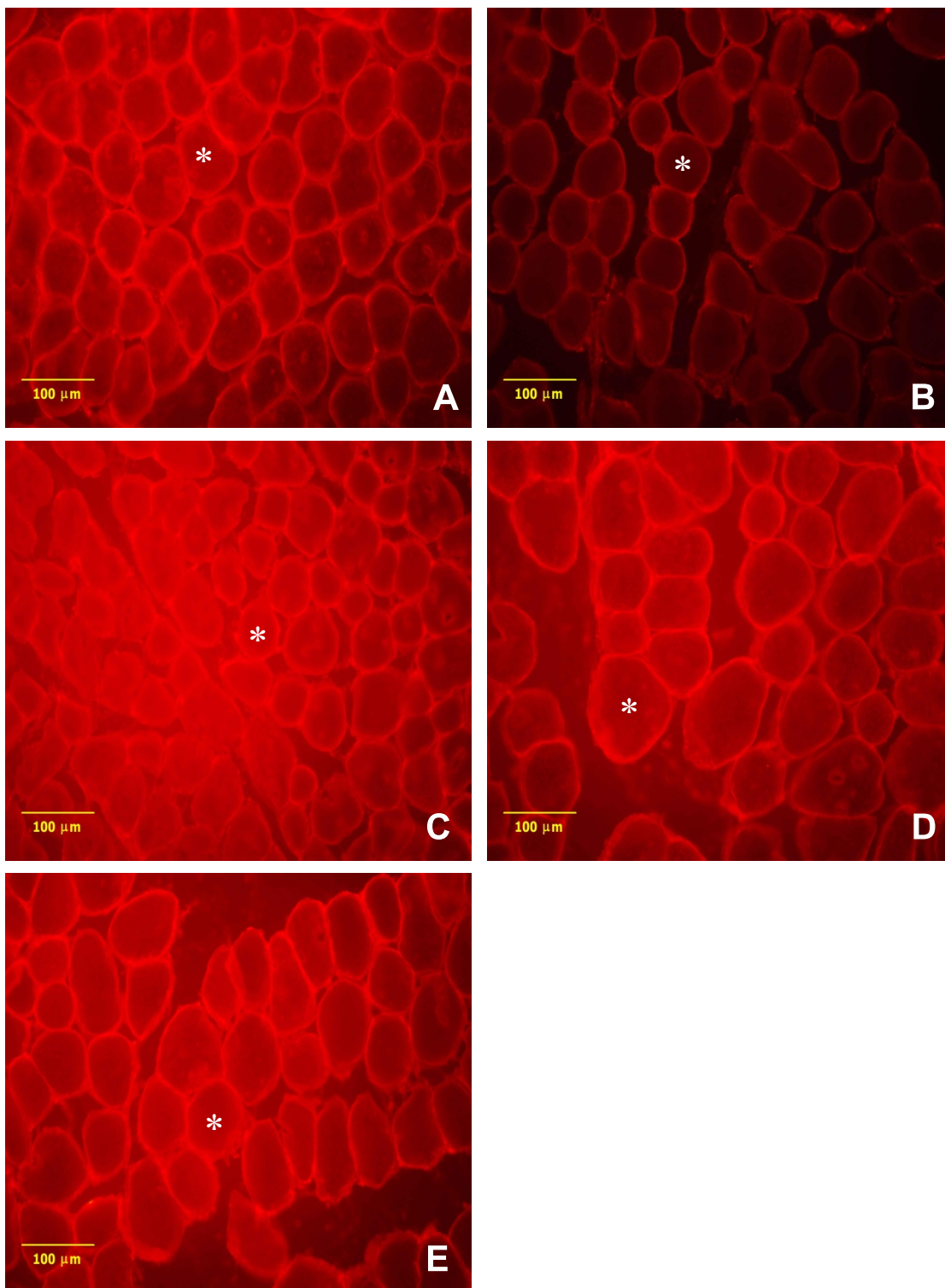
จากการศึกษาปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของหนูในกลุ่มที่มีการตัดรังไข่ (OVX) (รูปที่ 3-22B และ 3-23B) ลดลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (Sham) (รูปที่ 3-22A และ 3-23A) และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10, 20 และ 40 มก./กก. ในกลุ่ม E10, E20 และ E40 (รูปที่ 3-22C-E และ 3-23C-E) ตามลำดับ พบว่าการแสดงออกของปฏิกริยาอิมมูโนของ PV เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham



รูปที่ 3-21 แสดงปฏิกริยาอิมมูโนของ PV (*, สีแดง) ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อละลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงบวก (A) และไม่พบปฏิกริยาอิมมูโนของ PV ในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อละลายของหนูกลุ่มควบคุมเชิงลบ (B)



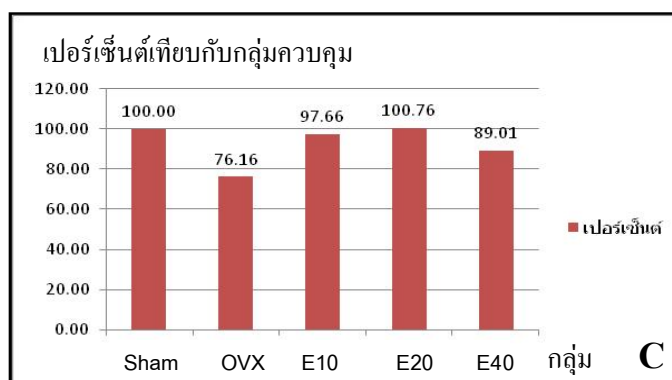
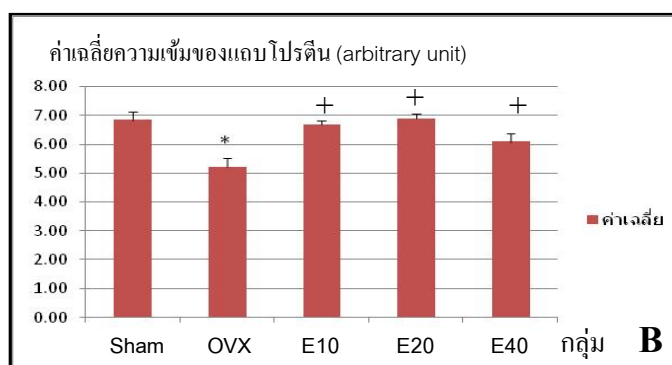
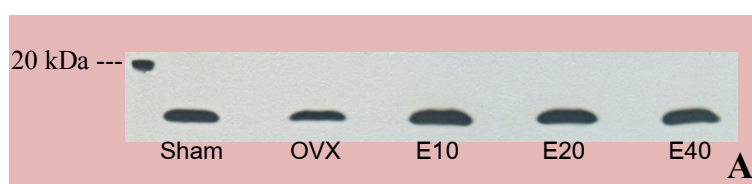
รูปที่ 3-22 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ PV (*,สีแดง) ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D), E40 (E)



รูปที่ 3-23 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนของ PV (*,สีแดง) ที่พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius ของหนูกลุ่ม Sham (A), OVX (B), E10 (C), E20 (D), E40 (E)

8. การแสดงออกของโปรตีน parvalbumin (PV) ในกล้ามเนื้อลายโดยเทคนิค เวสเทิร์น บลอต

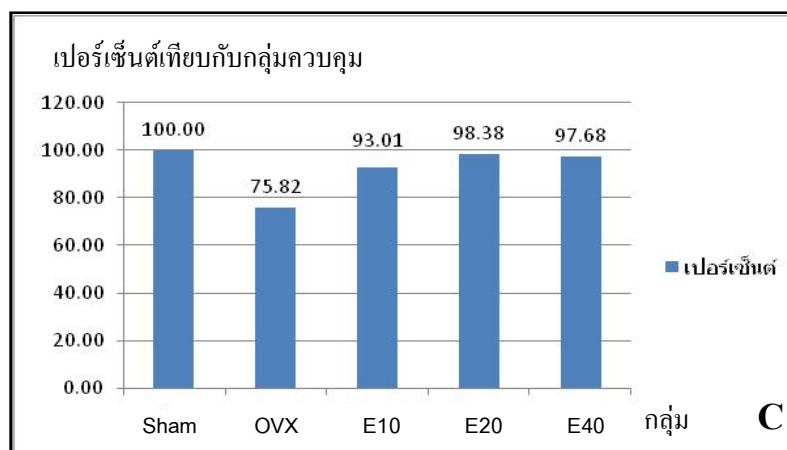
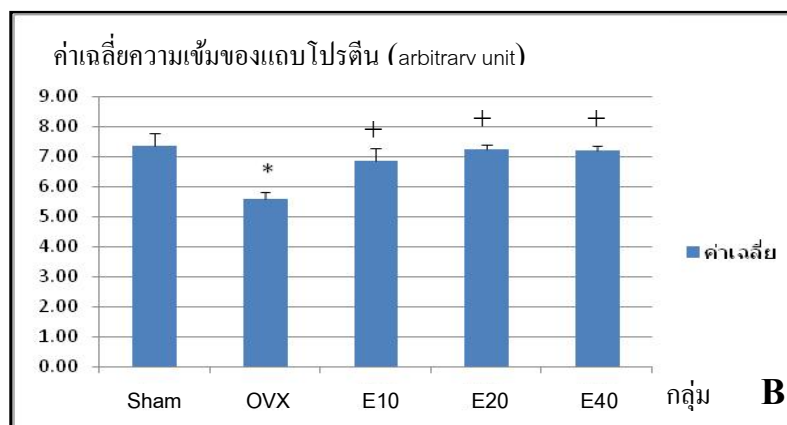
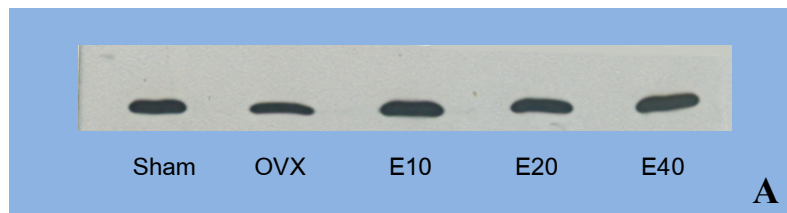
จากการศึกษาค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีน PV ในกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius พบว่าหนูในกลุ่ม OVX มีปริมาณของ PV ลดลงน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเมื่อได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน พบว่าปริมาณของ PV เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม Sham และมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังรูปที่ 3-24 และ 3-25



รูปที่ 3-24 ภาพแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ EDL (A) แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีนพาร์วัลบูมิน (B) แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์ของความเข้มเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham (C) (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$



รูปที่ 3-25 ภาพแถบโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อ gastrocnemius (A) แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยความเข้มของแถบโปรตีนพาร์วัลบูมิน (B) แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์ของความเข้มเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham (C) (n=10)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Sham ที่ $p < 0.05$

+ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX ที่ $p < 0.05$

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่า หนูกลุ่ม OVX มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด น้ำหนักมดลูก และน้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการตัดรังไข่ทั้งสองข้าง ทำให้หนูเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนได้ การลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้ชั้น functional layer ของมดลูกไม่เกิดการแบ่งเซลล์ให้หนาตัวขึ้น จึงทำให้น้ำหนักมดลูก และน้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัวลดลง (Hubscher et al., 2005) เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 มก./กก. พบว่ามีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดมากกว่ากลุ่ม OVX และกลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ โดยใกล้เคียงกับช่วงระดับฮอร์โมนปกติของหนูทั่วไป ซึ่งอยู่ระหว่าง 20-80 พก./มล. (Kramer and Bellinger, 2009) และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 20 และ 40 มก./กก. พบว่ามีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดมากกว่ากลุ่ม OVX กลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจเกิดผลเสียต่อร่างกาย โดย Xu และคณะ (2005) พบว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 30 มก./กก. เป็นเวลา 13 สัปดาห์ มีผลในการกระตุ้นเยื่อบุมดลูกให้มีการหนาตัวผิดปกติ (simple hyperplasia) และมีการเปลี่ยนแปลงสภาพเซลล์ (squamous metaplasia) จึงมีความเสี่ยงที่จะพัฒนากลายเป็นมะเร็งเยื่อบุมดลูก ซึ่งในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 40 มก./กก. มีน้ำหนักมดลูก และน้ำหนักมดลูกต่อน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่ม Sham กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 และ 20 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญ

หนูกลุ่ม OVX มีน้ำหนักตัวและอัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือนมากกว่ากลุ่ม Sham และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moran และคณะ (2007) กลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 และ 20 มก./กก. มีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 40 มก./กก. มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่ม Sham แต่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 และ 20 มก./กก. อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่ง Babaei และคณะ (2010) พบว่า ในหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่มีไขมันสะสมภายในร่างกาย (visceral adipose tissue) เพิ่มขึ้น ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลง อาจทำให้ความไวต่ออินซูลิน (insulin sensitivity) ลดลง แต่ระดับโปรตีนอะดิพอนЕКติน (adiponectin) ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่และได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน มีการสะสมของไขมันลดลง โดยฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจมีผลต่อการเผาผลาญไขมัน ทำให้อะดิพอนЕКติน (adiponectin) และความไวต่ออินซูลิน (insulin sensitivity) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ขณะที่ Lindheim และคณะ (1993) ศึกษาภาวะดื้อต่ออินซูลินด้วยวิธี insulin tolerance test (ITT) พบว่า เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนระดับ

ปานกลางในผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน ทำให้ความไวต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้ฮอร์โมนทดแทนระดับสูง กลับทำให้ความไวต่ออินซูลินลดลง ซึ่งอาจทำให้มีไขมันสะสมในร่างกายเพิ่มขึ้น และน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นได้ Kadowaki และคณะ (2006) กล่าวว่า ผู้หญิงมีระดับโปรตีนอะดิพอนεκติน (adiponectin) และความไวต่ออินซูลิน (insulin sensitivity) มากกว่าผู้ชาย ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจมีผลต่อการสร้างโปรตีนอะดิพอนεκติน ถ้าระดับโปรตีนอะดิพอนεκตินลดลง จะเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และพัฒนาเป็นโรคเบาหวานได้

หนูกลุ่ม OVX มีน้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL ต่อน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนทดแทนทั้งสามกลุ่ม มีน้ำหนักกล้ามเนื้อมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาขนาดพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius พบว่า การตัดรังไข่ ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อลายมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม Sham และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน เซลล์กล้ามเนื้อลายมีขนาดมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ McClung และคณะ (2006a) และ Sipila และคณะ (2001) เนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการแสดงออกของยีน มีบทบาทในการเจริญเติบโตของเซลล์กล้ามเนื้อ โดยกระตุ้นการทำงานของ Akt และ p70s6k ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการส่งสัญญาณที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีน แต่พบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่มีการ phosphorylation ของ Akt และ p70s6k ลดลง (Sitnick et al., 2006) และพบว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมดต่อน้ำหนักกล้ามเนื้อ (total protein per muscle wet weight) ลดลง (Moran et al., 2006) นอกจากนี้ ฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้ความไวต่ออินซูลิน (insulin sensitivity) เพิ่มขึ้น ซึ่งอินซูลินจะกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีนและยับยั้งการสลายของโปรตีน (Chevalier et al., 2005) ขณะที่ Wade และคณะ (2001) กล่าวว่า เอสโตรเจนกระตุ้น mitogen-activated protein kinase cascade ทำให้โกรทฮอร์โมน (growth hormone) เพิ่มขึ้น เกิดการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อและการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ pro-inflammatory cytokines เช่น interleukin-6 และ TNF- α (tumor necrosis factor alpha) (Girasole et al., 1999; Kramer et al., 2004) ซึ่ง interleukin-6 จะทำให้ insulin-like growth factor-1 ลดลง (De Benedetti et al., 1997) ทำให้มวลของกล้ามเนื้อลดลง ส่วนน้ำหนักกล้ามเนื้อ gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกัน ซึ่ง Moran และคณะ (2007) พบว่า น้ำหนักกล้ามเนื้อของหนูที่ถูกตัดรังไข่เพิ่มขึ้น เนื่องจากปริมาณโปรตีนคอลลาเจน และโครงสร้างที่ไม่ใช่โปรตีน (nonprotein contents) เพิ่มขึ้น และมีการคั่งของของเหลวภายนอกเซลล์กล้ามเนื้อลายเพิ่มขึ้น แต่เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน น้ำหนักกล้ามเนื้อกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม จึงสรุปได้ว่า การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจทำให้มวลกล้ามเนื้อลดลง แต่โครงสร้างที่ไม่ใช่มวลกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น ทำให้น้ำหนักกล้ามเนื้อไม่แตกต่างจากกลุ่ม Sham และกล้ามเนื้อมัดเล็กอาจได้รับผลจากฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่ากล้ามเนื้อมัดใหญ่ จากข้างต้นจึงแสดงให้เห็นว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการเจริญเติบโต โดยทำให้เซลล์กล้ามเนื้อมีขนาดใหญ่ขึ้น

และน้ำหนักเพิ่มขึ้น จากการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มขึ้น ซึ่งโปรตีนต่างๆในกล้ามเนื้อมีบทบาทสำคัญในการทำงานของกล้ามเนื้อ

งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อด้วย โดยการศึกษาคุณสมบัติการหดตัวของกล้ามเนื้อ ประกอบด้วยแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อสูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดี่ยว และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง เวลาที่ใช้ในการหดตัว เวลาที่ใช้ในการคลายตัว ครั้งหนึ่ง ซึ่งค่าเหล่านี้แสดงถึงความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (muscle strength) ความสามารถในการเกิดแรงอย่างรวดเร็วของกล้ามเนื้อ (muscle power) (Galley and Forster, 1996) ความถี่ที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นคู่ และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง ซึ่งแสดงถึงความเร็วในการคลายตัวของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อที่มีการหดและคลายตัวเร็ว ต้องใช้ความถี่ที่ทำให้เกิด complete tetanus สูง (Watanabe et al., 2010) และเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนเกิดการล้าจนเหลือ 25% ของแรงสูงสุด ซึ่งแสดงถึงความทนทานของกล้ามเนื้อ (muscle endurance) ความสามารถในการทำงานได้อย่างต่อเนื่องของกล้ามเนื้อ (Galley and Forster, 1996)

จากการศึกษาพบว่า หนูกลุ่ม OVX มีแรงหดตัวของกล้ามเนื้อน้อยกว่ากลุ่ม Sham อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ทำให้แรงหดตัวของกล้ามเนื้อมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยกล้ามเนื้อ EDL ในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 20 และ 40 มคก./กก. มีแรงหดตัวมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ และกล้ามเนื้อ gastrocnemius ในกลุ่มที่ให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 40 มคก./กก. มีแรงหดตัวมากกว่ากลุ่ม OVX อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ ซึ่ง Moran และคณะ (2006) พบว่า มีปฏิกิริยาของไมโอซินที่จับกับแอกตินระหว่างการหดตัวของกล้ามเนื้อลดลงในกลุ่มหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ แต่มีปฏิกิริยาเพิ่มขึ้นในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน แสดงว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้การทำงานของโปรตีนที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อมีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลง กระตุ้นการทำงานของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ซึ่งเป็นปัจจัยในการถอดรหัสสัญญาณ ทำให้มีการควบคุมยีนเป้าหมายที่บริเวณ estrogen response element ลดลงด้วย ทำให้การแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างโปรตีนไมโอซินเปลี่ยนแปลงไป โครงสร้างและการทำงานของไมโอซินจึงเปลี่ยนไป (Moran et al., 2006) นอกจากนี้ การลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เนื่องจากเอสโตรเจนมีบทบาทในการสร้างโปรตีนที่ต่อต้านสารอนุมูลอิสระด้วย ทำให้เกิด posttranslational oxidative modification ของไมโอซิน ความสามารถของไมโอซินในการจับกับแอกตินจึงลดลง (Lowe et al., 2010) ขณะที่ Wohlers และคณะ (2009) พบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่ มีการ phosphorylation ของ AMPK (adenosine monophosphate kinase) ลดลง ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นในการสร้างพลังงาน เพื่อให้กล้ามเนื้อหดตัว ซึ่งอาจจะมีผลต่อการเกิดแรงในการหดตัว นอกจากนี้ Kadi และคณะ (2002) พบว่าการขาดฮอร์โมน

เอสโตรเจน ทำให้กล้ามเนื้อ EDL มีคุณสมบัติของไมโอซินเปลี่ยนแปลงไป คือ myosin heavy chain ชนิด IIA มีจำนวนมากขึ้น ส่วน myosin heavy chain ชนิด IIB มีจำนวนน้อยลง ทำให้แรงหดตัวลดลง และนอกจากนี้จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากล้ามเนื้อ gastrocnemius ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อมัดใหญ่ จำเป็นต้องได้รับฮอร์โมนทดแทนในปริมาณที่มากกว่ากล้ามเนื้อ EDL ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อมัดเล็ก จึงจะทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อใกล้เคียงกับปกติ

กล้ามเนื้อในวัยสูงอายุ พบว่ามีจำนวนของ α_{1s} -dihydropyridine receptor ที่ transverse tubule ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการทำงานของ ryanodine receptor ลดลง ทำให้ ryanodine receptor ที่ถูกกระตุ้นให้ทำงานมีจำนวนลดลง จึงปล่อยแคลเซียมออกจากซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัมเข้าสู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อได้น้อยลง (Delbono et al., 1997) ซึ่งอาจจะทำให้การเกิดแรงหดตัวของกล้ามเนื้อลดลง และความเร็วในการหดตัวช้าลง แต่พบว่าจำนวนของ ryanodine receptor และ calsequestrin ซึ่งเป็นโปรตีนที่จับกับแคลเซียมภายในซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัมไม่มีการเปลี่ยนแปลง (Ryan et al., 2003) มีการพบว่าในกล้ามเนื้อหนูวัยสูงอายุ มี slow calsequestrin isoform เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจมีผลต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ ทำให้หดตัวช้าลง (Ryan et al., 2000) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ความเร็วในการหดตัวของหนูแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ดังนั้นฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจจะไม่มีผลต่อความเร็วในการหดตัวของกล้ามเนื้ออย่างชัดเจน แต่ฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้ปริมาณของ IGF-1 เพิ่มขึ้น (Kamanga-Sollo et al., 2008) และพบว่า IGF-1 ทำให้จำนวนของ α_{1s} -dihydropyridine receptor เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจทำให้แรงหดตัวเพิ่มขึ้น (Delbono, 2000)

จากการศึกษาพบว่าเวลาในการคลายตัวครึ่งหนึ่งในหนูกลุ่มที่ได้รับการตัดรังไข่ มีแนวโน้มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sotiriadou และคณะ (2006) และเมื่อศึกษาความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับการตัดรังไข่ ใช้ความถี่ในการกระตุ้นน้อยกว่าปกติ แสดงว่า กล้ามเนื้อมีการคลายตัวช้า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธีอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ และเวสเทิร์นบลอต พบว่ามีปริมาณโปรตีนพาร์วัลบูมิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการคลายตัวลดลง แสดงว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน อาจจะมีผลทำให้การคลายตัวของกล้ามเนื้อช้าลง และถ้ามีการขนส่งแคลเซียมกลับสู่ซาร์โคพลาสซึม เรติคูลัมช้าลง การคลายตัวช้าลง การหดตัวและการเกิดแรงหดตัวครั้งต่อไปก็จะช้าลง (Schwaller et al., 1999) เนื่องจากมีปริมาณแคลเซียมที่เข้าสู่เซลล์น้อยลง ความสามารถในการเกิดแรงอย่างรวดเร็ว (muscle power) และความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ (muscle strength) จะลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนไหวร่างกายช้าลงได้ ขาดความคล่องตัว แต่เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 10 และ 20 มคก./กก. พบว่าเวลาในการคลายตัวครึ่งหนึ่งลดลง ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanus เพิ่มขึ้น และปริมาณของโปรตีนพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับการตัดรังไข่ แสดงว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีผลทำให้การคลายตัวของกล้ามเนื้อเร็วขึ้น แต่เมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน 40 มคก./กก. พบว่าการคลายตัวของกล้ามเนื้อเริ่มช้า

ลง ซึ่งจากงานวิจัยของ Martinez-Azorin และคณะ (1992) พบว่า สาร Diethylstilbestrol ซึ่งเป็นสารสังเคราะห์จำพวกเอสโตรเจน ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Ca^{2+} -ATPase (Ca^{2+} -ATPase activity) ของซาร์โคพลาสมิค เรติคูลัม อาจจะทำให้มีการดึงแคลเซียมกลับเข้าสู่ซาร์โคพลาสมิค เรติคูลัมน้อยลง แต่พบว่า β -estradiol ไม่มีผลต่อการดึงแคลเซียมกลับเข้าสู่ซาร์โคพลาสมิค เรติคูลัม (SR- Ca^{2+} uptake) ในกล้ามเนื้อหัวใจ (Dodds et al., 2001) จึงสันนิษฐานได้ว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในปริมาณมาก อาจมีผลเสียต่อการดึงแคลเซียมกลับได้มากกว่า แต่โปรตีนพาร์วัลบูมินไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ Ca^{2+} -ATPase (Raymackers et al., 2000) สรุปได้ว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนอาจช่วยให้การคลายตัวของกล้ามเนื้อดีขึ้น จากการทำงานของพาร์วัลบูมิน แต่อาจมีผลเสียต่อการทำงานของเอนไซม์ Ca^{2+} -ATPase

จากการศึกษาพบว่า การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการล้าง่ายขึ้น และการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้กล้ามเนื้อมีความทนทานมากขึ้น สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sotiriadou และคณะ (2006) เนื่องจาก Wohlers และคณะ (2009) พบว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่ มีการ phosphorylation ของ AMPK (adenosine monophosphate kinase) ลดลง ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นในการสร้างพลังงาน เพื่อให้กล้ามเนื้อหดตัว เมื่อมีการสร้างพลังงาน ATP ลดลง ทำให้กล้ามเนื้อเกิดการล้าได้ง่าย จากข้างต้นจึงสรุปได้ว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีบทบาทสำคัญต่อความแรงและความเร็วของกล้ามเนื้อ (muscle strength and power) และความทนทาน (muscle endurance) ทำให้กล้ามเนื้อทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งส่งผลให้การเคลื่อนไหวร่างกายคล่องตัว และสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างต่อเนื่อง

จากการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ พบทั้งชนิดแอลฟา และเบต้าภายในเซลล์กล้ามเนื้อ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wiik และคณะ (2009) ที่พบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดในกล้ามเนื้อของคน และจะพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาเล็กน้อย แต่จะพบเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้า ในปริมาณมาก (Wiik, 2008) และมีการพบว่าเซลล์กล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) มีเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดแอลฟาเป็นจำนวนมาก (Brown, 2008) ซึ่งงานวิจัยของ Widrick และคณะ (2003) พบว่าในสตรีวัยหมดประจำเดือน มีขนาดและจำนวนของเซลล์กล้ามเนื้อชนิดหดตัวเร็ว (muscle fiber type II) ลดลง แสดงว่าเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อเซลล์กล้ามเนื้อชนิดนี้ และการศึกษาครั้งนี้พบว่า การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ทำให้มีปฏิกิริยาอิมมูโนของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ทั้งสองชนิดลดลง และเมื่อให้ฮอร์โมนทดแทน มีปฏิกิริยาอิมมูโนของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับปกติ ซึ่ง Wiik และคณะ (2009) พบว่าในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนจำนวนเอสโตรเจน รีเซพเตอร์มีแนวโน้มลดลง ฮอร์โมนเอสโตรเจน น่าจะมีผลต่อกล้ามเนื้อผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ชนิดเบต้ามากกว่าแอลฟา ซึ่ง Wiik (2008) พบว่ามีการแสดงออกของ $\text{ER}\beta$ mRNA เพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเอสโตรเจน ขณะที่ระดับของ $\text{ER}\alpha$ mRNA ไม่เปลี่ยนแปลง และจากการศึกษาระดับของโปรตีนพาร์วัลบูมินในกล้ามเนื้อของหนู พบว่าการตัดรังไข่ ทำให้ระดับของ

พาร์วัลบูมินลดลง และการได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน สามารถเพิ่มปริมาณของพาร์วัลบูมิน ซึ่งการลดลงของพาร์วัลบูมินน่าจะเกิดจากปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง เอสโตรเจนมาจับกับเอสโตรเจน รีเซพเตอร์น้อยลง เกิดการจับคู่ของรีเซพเตอร์ หลังจากนั้นรีเซพเตอร์ที่พร้อมทำงานจะจับกับยีนเป้าหมายบริเวณ estrogen response element (ERE) และทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนและสร้างโปรตีนลดลง ทำให้การสร้างเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ลดลง (Wiik, 2008) การลดลงของเอสโตรเจนและเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ทำให้การแสดงออกของยีนลดลง ทำให้การสร้างโปรตีนพาร์วัลบูมินลดลง ดังนั้น ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อการสร้างโปรตีน ทั้งเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ และ พาร์วัลบูมิน ผ่านทางเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ ถ้าฮอร์โมนเอสโตรเจน และเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ลดลง จะทำให้การสร้างโปรตีนลดลง ซึ่งจะส่งผลถึงการสร้างและการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อลายชนิดหดตัวเร็ว และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนเพิ่มขึ้น กระตุ้นการทำงานของเอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนและสร้างโปรตีนเพิ่มขึ้น ทำให้การสร้างเอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น (Wiik, 2008) เมื่อเอสโตรเจนและเอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น การแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น การสร้างโปรตีนพาร์วัลบูมินจึงเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า เอสโตรเจน รีเซพเตอร์มีบทบาทต่อมวลและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อผ่านการกระตุ้นของเอสโตรเจนและ IGF-1 (Ciana et al., 2003) ดังนั้น ถ้าระดับของเอสโตรเจนและ IGF-1 มีการเปลี่ยนแปลง จะมีผลต่อมวลและความแข็งแรงของกล้ามเนื้อ

บทที่ 5

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการตัดรังไข่ ทำให้ปริมาณเอสโตรเจน และเอสโตรเจน รีเซพเตอร์ลดลง ส่งผลให้การสังเคราะห์โปรตีนลดลง ทำให้มวลของกล้ามเนื้อ และปริมาณโปรตีนพาร์วัลบูมินลดลง และปริมาณพาร์วัลบูมินที่ลดลง เป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การคลายตัวของกล้ามเนื้อช้าลง การคลายตัวช้าลงทำให้การหดตัวครั้งใหม่ช้าลงด้วย ซึ่งส่งผลให้การทำงานของกล้ามเนื้อและความแข็งแรงลดลง ซึ่งอาจจะนำไปอธิบายกลไกการเกิดภาวะ sarcopenia ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ และการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ทำให้ปริมาณเอสโตรเจน และเอสโตรเจน รีเซพเตอร์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้มวลของกล้ามเนื้อ และปริมาณโปรตีนพาร์วัลบูมินเพิ่มขึ้น ทำให้การทำงานของกล้ามเนื้อดีขึ้น ส่งผลให้มีความแข็งแรงและทนทานของกล้ามเนื้อมากขึ้น แต่ต้องให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณสูง คือปริมาณ 20 มก./กก. และ 40 มก./กก. เนื่องจากการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 10 มก./กก. ยังไม่สามารถทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อดีขึ้นเท่าที่ควร การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 20 มก./กก. ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อ EDL ดีขึ้น แต่ในกล้ามเนื้อ gastrocnemius ยังมีแรงหดตัวที่น้อยกว่าปกติ ส่วนการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 40 มก./กก. ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของกล้ามเนื้อดีขึ้น แต่อาจจะมีผลเสียต่ออวัยวะอื่น เช่น มดลูก อาจเพิ่มความเสี่ยงต่อการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติของมดลูกได้ ดังนั้นการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 20 มก./กก. น่าจะเหมาะสมที่สุด ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไปอาจจะเพิ่มระยะเวลาในการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 20 มก./กก. หรือให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในปริมาณ 10 มก./กก. ร่วมกับการออกกำลังกาย เพื่อลดความเสี่ยงในการเกิดผลเสียต่ออวัยวะอื่นๆ นอกจากนี้อาจปรับวิธีการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนให้สอดคล้องกับธรรมชาติ เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในขนาดเดียวกันทุกวัน การออกฤทธิ์จึงอาจไม่เหมือนกับในธรรมชาติ การศึกษาครั้งต่อไป อาจจะเปรียบเทียบการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนในขนาดเดียวกันทุกวัน กับการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนในขนาดสูงและต่ำสลับกัน ในแต่ละช่วงของรอบระดู ซึ่งเป็น การเลียนแบบธรรมชาติของร่างกาย ว่าการให้ฮอร์โมนทดแทนแบบใดมีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการทำงานของกล้ามเนื้อ และส่งผลเสียต่ออวัยวะอื่นๆ น้อยที่สุด

การศึกษานี้เป็นการศึกษาผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้อลาย เพื่อช่วยอธิบายภาวะ sarcopenia ในสตรีวัยหมดประจำเดือน แต่ยังมีขาดปัจจัยของอายุว่าจะมีผลต่อโครงสร้างและการทำงานของกล้ามเนื้ออย่างไร จึงน่าสนใจที่จะศึกษาต่อไปในหนูที่มีอายุมากและหมดประจำเดือนแล้ว ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อ

อย่างไร นอกจากนี้การให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน อาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะ sarcopenia ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน แต่ยังมีทางเลือกที่หลากหลาย เช่น การให้ growth hormone (Bross et al., 1999) หรือ creatine ซึ่งคาดว่าเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ทำให้กล้ามเนื้อ มีความแข็งแรงมากขึ้น (Lawler et al., 2002)

บรรณานุกรม

- กอบจิตต์ ลิ้มปยยอม และกระเชียร ปัญญาคำเลิศ. 2543. ระบาดวิทยาของสตรีวัยหมดระดู. ใน วัยหมดระดู. เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- กัลยพงษ์ จตุรพาณิชย์. 2545. ระบบกล้ามเนื้อ. ใน สรีรวิทยา. คณะจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. เท็กซแอนด์เจอร์นัล พับลิเคชั่น: กรุงเทพฯ.
- กิจจา สว่างเจริญ. 2533. ฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนคุมกำเนิด. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: สงขลา.
- เกษรา พงศ์สัมพันธ์. 2540. การศึกษาผลของฮอร์โมนเพศชายต่อการทำงานของกล้ามเนื้อลาย ในหนู. เข้าถึงได้จาก: http://www.sat.or.th/index.php/index.php?option=com_research&Itemid=115&viewid=51. วันที่สืบค้น 7 มกราคม 2553.
- คณะจารย์ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 2550. คู่มือปฏิบัติการสรีรวิทยา. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: สงขลา.
- จันทนา ชูปรีชา. 2545. ระบบสืบพันธุ์. ใน สรีรวิทยา เล่ม 2. ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: สงขลา.
- ชัยเลิศ พิชิตพรชัย. 2544. กล้ามเนื้อ. ใน สรีรวิทยา 1. สุพรพิมพ์ เจียสกุล. เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- ทวีศักดิ์ บุรณวุฒิ. 2543. ระบบกล้ามเนื้อ. ใน สารสำคัญวิชาสรีรวิทยา. ทวีศักดิ์ บุรณวุฒิ และ วารี พร้อมเพชรรัตน์. เอส. อาร์. ฟรินดิง แมสโปรดักส์: นนทบุรี.
- ธีรยศ วิทิตสุวรรณกุล. 2542. ระบบฮอร์โมน. ใน ชิวเคมี. มนตรี จุฬาวัฒนทล และประหยัด โภมารทัต. จิรัชการพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- นิมิต เตชไกรชนะ. 2543. ฮอร์โมนทดแทนในวัยหมดระดู. ปิยอนด์ เอ็นเทอร์ไพรซ์: กรุงเทพฯ.
- วารุณี เกียรติดุริยกุล และพิชิต เจริญกุล. 2543. ฮอร์โมนเพศ : การประยุกต์ทางการแพทย์. พิมพ์ครั้งที่ 2. สุภาวนิชการพิมพ์: กรุงเทพฯ.
- สมมาตร ศรีบำรุงสันติ. 2544. คู่มือปฏิบัติการเทคนิคทางเนื้อเยื่อ. Sprint: เชียงใหม่.
- Ahmed, M.S., Matsumura, B. and Cristian, A. 2005. Age-related changes in muscles and joints. Phys Med Rehabil Clin N Am. 16: 19-39.
- Alpha Research and Manager Information Services. 1994. Pocket Thailand Public Health 1995. Bangkok : Sukhum and Sons: Bangkok.
- Anonymous. No dat. <http://faculty.irsc.edu/FACULTY/TFischer/AP1/AP%201%20resources.htm>. วันที่สืบค้น 7 มกราคม 2553.

- Anonymous. No dat. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/structural-proteins/myosin.html>. วันที่สืบค้น 7 มกราคม 2553.
- Babaei, P., Mehdizadeh, R., Ansar, M.M. and Damirchi, A. 2010. Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int.* 16(3): 100-104.
- Barros, R.P.A., Gabbi, C., Morani, A., Warner, M. and Gustafsson, J.A. 2009. Participation of ERalpha and ERbeta in glucose homeostasis in skeletal muscle and white adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 297: 124-133.
- Bastin, L.D. No dat. Biochemical role of parvalbumin in muscle relaxation. เข้าถึงได้จาก: http://www.science.widener.edu/~bastin/Widener/Research_Parvalbumin.html. วันที่สืบค้น 7 มกราคม 2553.
- Baumgartner, R.N., Koehler, K.M., Gallagher, D., Romero, L., Heymsfield, S.B., Ross, R.R., Garry, P.J. and Lindeman, R.D. 1998. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *American Journal of Epidemiology.* 147(8): 756-763.
- Bellino, F.L. 2000. Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *The journal of The North American Menopause Society.* 7: 14-24.
- Berchtold, M.W., Brinkmeier, H. and Müntener, M. 2000. Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease. *Physiol Rev.* 80: 1215-1265.
- Bhasin, S., Woodhouse, L., Casaburi, R., Singh, A.B., Mac, R.P., Lee, M., Yarasheski, K.E., Sinha-Hikim, I., Dzekov, C., Dzekov, J., Magliano, L. and Storer, T.W. 2005. Older men are as responsive as young men to the anabolic effects of graded doses of testosterone on the skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab.* 90: 678-688.
- Biesiada, E., Hamamori, Y., Kedes, L. and Sartorelli, V. 1999. Myogenic basic helix-loop helix proteins and Sp1 interact as components of a multiprotein transcriptional complex required for activity of the human cardiac -actin promoter. *Mol Cell Biol.* 19: 2577.
- Bross, R., Javanbakht, M. and Bhasin, S. 1999. Anabolic interventions for aging-associated sarcopenia. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.* 84(10): 3420-3430.

- Brown, M., Foley, A. and Ferreria, J.A. 2005. Ovariectomy, hindlimb unweighting, and recovery effects on skeletal muscle in adult rats. *Aviat Space Environ Med.* 76: 1012-1018.
- Brown, M. 2008. Skeletal muscle and bone: effect of sex steroids and aging. *Adv Physiol Educ.* 32: 120-126.
- Brys, M., Szylo, K., Romanowicz-Makowska, H., Dobrowolski, Z., Maslowska, I. and Krajewska, W. 2009. Expression of estrogen and progesterone receptor genes in endometrium, myometrium and vagina of postmenopausal women treated with estriol. *Sao Paulo Med J.* 127(3): 128-132.
- Cai, D.Q., Li, M., Lee, K.K.H., Lee, K.M., Qin, L. and Chan, K.M. 2001. Parvalbumin expression is downregulated in rat fast-twitch skeletal muscles during aging. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 387: 202-208.
- Cates, M.S., Teodoro, M.L. and Phillips, G.N. 2002. Molecular mechanisms of calcium and magnesium binding to parvalbumin. *Biophysical Journal.* 82: 1133-1146.
- Chen, G., Carroll, S., Racay, P., Dick, J., Pette, D., Traub, I., Vrbova, G., Eggli, P., Celio, M. and Schwaller, B. 2001. Deficiency in parvalbumin increases fatigue resistance in fast-twitch muscle and upregulates mitochondria. *Am J Physiol Cell Physiol.* 281: 114-122.
- Chevalier, S., Marliss, E.B., Morais, J.A., Lamarche, M. and Gougeon, R. 2005. Whole-body protein anabolic response is resistant to the action of insulin in obese women. *Am J Clin Nutr.* 82: 355-365.
- Chu, S.H., Goldspink, P., Kowalski, J., Beck, J. and Schwertz, D.W. 2006. Effect of estrogen on calcium-handling proteins, β -adrenergic receptors, and function in rat heart. *Life Sciences.* 79: 1257-1267.
- Ciana, P., Raviscioni, M., Mussi, P., Vegeto, E., Que, I. and Parker, M.G. 2003. *In vivo* imaging of transcriptionally active estrogen receptors. *Nat Med.* 9: 82-86.
- Cooke, V.E., Carlisle, R.T., Talbot, R.T., Boswell, T. and Mitchell, M.A. 2003. Oestrogen receptor alpha (ER α) and beta (ER β) in chicken skeletal muscle: mediators of myo-protection?. *Br Poult Sci.* 44: 12-13.
- Copas, P., Bukovsky, A., Asbury, B., Elder, R.F. and Caudle, M.R. 2001. Estrogen, progesterone, and androgen receptor expression in levator ani muscle and fascia. *J Womens Health Gend Based Med.* 10: 785-795.

- Dahlberg, E. 1982. Characterization of the cytosolic estrogenreceptor in rat skeletal-muscle. *Biochim Biophys Acta*. 717: 65-75.
- De Benedetti, F., Alonzi, T., Moretta, A., Lazzaro, D., Costa, P., Poli, V., Martini, A., Ciliberto, G. and Fattori, E. 1997. Interleukin-6 causes growth impairment in transgenic mice through a decrease in insulin-like growth factor-I. *J Clin Invest*. 99: 643-650.
- Delbono, O. 2000. Regulation of excitation contraction coupling by insulin-like growth factor-1 in aging skeletal muscle. *J Nutr Health Aging*. 4: 162-164.
- Delbono, O., Renganathan, M. and Messi, M.L. 1997. Excitation-Ca²⁺-release-contraction coupling in single aged human skeletal muscle fiber. *Muscle Nerve*. 5: 88-92.
- Dodds, M.L., Kargacin, M.E. and Kargacin, G.J. 2001. Effects of anti-oestrogens and β -estradiol on calcium uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum. *British Journal of Pharmacology*. 132: 1374-1382.
- Durbin, P.W., Williams, M.H., Jeung, N. and Arnold, J.S. 1966. Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female charles river (Sprague-Dawley) rat: the influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Research*. 26: 400-411.
- Ferrando, A.A., Sheffield-Moore, M., Yeckel, C.W., Gilkison, C., Jiang, J., Achacosa, A., Lieberman, S.A., Tipton, K., Wolfe, R.R. and Urban, R.J. 2002. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282: 601-607.
- Fisher, J.S., Hasser, E.M. and Brown, M. 1998. Effects of ovariectomy and hindlimb unloading on skeletal muscle. *J Appl Physiol*. 85: 1316-1321.
- Frey, R.S., McCarthy, F.D. and Johnson, D.J. 1990. Characterization of estrogen and glucocorticoid receptors in skeletal-muscle of lambs treated with estradiol-17-beta and trenbolone acetate. *J Anim Physiol Nutr*. 63: 93-102.
- Galley, P.M. and Forster, A.L. 1996. Human movement, an introductory text for physiotherapy students. Churchill Livingstone Press: Edinburgh.
- Girasole, G., Giuliani, N., Modena, A.B., Passeri, G. and Pedrazzoni, M. 1999. Oestrogens prevent the increase of human serum soluble interleukin-6 receptor induced by ovariectomy *in vivo* and decrease its release in human osteoblastic cells *in vitro*. *Clinical Endocrinology*. 51: 801-807.

- Gustafsson, J., Saartok, T., Dahlberg, E., Snochowski, M., Haggmark, T. and Eriksson, E. 1984. Studies on steroid receptors in human and rabbit skeletal muscle - clues to the understanding of the mechanism of action of anabolic steroids. *Prog Clin Biol Res.* 142: 261–290.
- Heikkinen, J., Kyllonen, E., Kurttila-Matero, E., Wilen-Rosenqvist, G., Lankinen, K.S., Rita, H. and Vaananen, H.K. 1997. HRT and exercise: effects on bone density, muscle strength and lipid metabolism. A placebo controlled 2-year prospective trial on two estrogen-progestin regimens in healthy postmenopausal women. *Maturitas.* 26: 139-149.
- Heizmann, C.W., Berchtold, M.W. and Rowlerson, A.M. 1982. Correlation of parvalbumin concentration with relaxation speed in mammalian muscles. *Proc. NatL Acad. Sci.* 79: 7243-7247.
- Henzl, M.T. and Tanner, J.J. 2008. Solution structure of Ca^{2+} -free rat α -parvalbumin. *Protein Science.* 17: 431-438.
- Hou, T.T., Johnson, J.D. and Rall, J.A. 1991. Parvalbumin content and Ca^{2+} and Mg^{2+} dissociation rates correlated with changes in relaxation rate of frog muscle fibres. *Journal of Physiology.* 441: 285-304.
- Hubscher, C.H., Brooks, D.L. and Johnson, J.R. 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic & Histochemistry.* 80(2): 79-87.
- Kadi, F., Karlsson, C., Larsson, B., Eriksson, J., Larval, M., Billig, H. and Jonsdottir, I. 2002. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 23: 335-339.
- Kadowaki, T., Yamauchi, T., Kubota, N., Hara, K., Ueki, K. and Tobe, K. 2006. Adiponectin and adiponectin receptors in insulin resistance, diabetes, and the metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation.* 116(7): 1784-1792.
- Kalbe, C., Mau, M., Wollenhaupt, K. and Rehfeldt, C. 2007. Evidence for estrogen receptor α and β expression in skeletal muscle of pigs. *Histochem Cell Biol.* 127: 95-107.
- Kalkhoff, R.K. 1982. Metabolic effects of progesterone. *Am J Obstet Gynecol.* 142: 735-738.

- Kamanga-Sollo, E., White, M.E., Hathaway, M.R., Chungb, K.Y., Johnson, B.J. and Dayton, W.R. 2008. Roles of IGF-I and the estrogen, androgen and IGF-I receptors in estradiol- 17β and trenbolone acetate-stimulated proliferation of cultured bovine satellite cells. *Domestic Animal Endocrinology*. 35: 88-97.
- Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L. and Jameson, J.L. 2005. *Harrison's principles of internal medicine*. 16th Ed. McGraw-Hill: USA.
- Kjaer, M. 2001. Counteracting sarcopenia in post-menopausal women: do hormones and strength training accomplish the task?. *Clinical Science*. 101: 171.
- Kramer, P.R. and Bellinger, L.L. 2009. The effects of cycling levels of 17β -estradiol and progesterone on the magnitude of temporomandibular joint-induced nociception. *Endocrinology*. 150(8): 3680-3689.
- Kramer, P.R., Kramer, S.F. and Guan, G. 2004. 17β -estradiol regulates cytokine release through modulation of CD16 expression in monocytes and monocyte-derived macrophages. *Arthritis & Rheumatism*. 50: 1967-1975.
- Larionov, A.A., Vasyliiev, D.A., Mason, J.I., Howie, A.F., Berstein, L.M. and Miller, W.R. 2003. Aromatase in skeletal muscle. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 84: 485-492.
- Lawler, J.M., Barnes, W.S., Wu, G., Song, W. and Demaree, S. 2002. Direct antioxidant properties of creatine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290: 47-52.
- Lee, C.E., McArdle, A. and Griffiths, R.D. 2007. The role of hormones, cytokines and heat shock proteins during age-related muscle loss. *Clinical Nutrition*. 26: 524-534.
- Leeuwenburgh, C. 2003. Role of apoptosis in sarcopenia. *J Gerontology*. 58: 999-1001.
- Lemoine, S., Granier, P., Tiffoche, C., Berthon, P.M., Rannou-Bekono, F., Thieulant, M.L., Carre, F. and Delamarche, P. 2002. Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha transcripts in rat skeletal muscle. *Acta Physiol Scand*. 174: 283-289.
- Lexell, J. 1995. Human aging, muscle mass, and fiber type composition. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 50: 11-16.
- Lindheim, S.R., Presser, S.C., Ditkoff, E.C., Vijod, M.A., Stanczyk, F.Z. and Lobo, R.A. 1993. A possible bimodal effect of estrogen on insulin sensitivity in

- postmenopausal women and the attenuating effect of added progestin. *Fertil Steril.* 60(4): 664-667.
- Lowe, D.A., Baltgalvis, K.A. and Greising, S.M. 2010. Mechanisms behind estrogen's beneficial effect on muscle strength in females. *Exerc Sport Sci Rev.* 38: 61-67.
- Martinez-Azarin, F., Teruel, J.A., Fernandez-Belda, F. and Gomez-Fernandez, J.C. 1992. Effect of diethylstilbestrol and related compounds on the Ca^{2+} -transporting ATPase of sarcoplasmic reticulum. *The Journal of Biological Chemistry.* 267(17): 11923-11929.
- McClung, J.M., Davis, J.M., Wilson, M.A., Goldsmith, E.C. and Carson, J.A. 2006a. Estrogen status and skeletal muscle recovery from disuse atrophy. *J Appl Physiol.* 100: 2012-2023.
- McClung, J.M., Davis, J.M. and Carson, J.A. 2006b. Ovarian hormone status and skeletal muscle inflammation during recovery from disuse in rats. *Exp Physiol.* 92.1: 219-232.
- Mccormick, K.M., Burns, K.L., Piccone, C.M., Gosselin, L.E. and Brazeau, G.A. 2004. Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *Journal of Muscle Research and Cell Motility.* 25: 21-27.
- Moran, A.L., Warren, G.L. and Lowe, D.A. 2006. Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol.* 100: 548-559.
- Moran, A.L., Nelson, S.A., Landisch, R.M., Warren, G.L. and Lowe, D.A. 2007. Estradiol replacement reverses ovariectomy-induced muscle contractile and myosin dysfunction in mature female mice. *J Appl Physiol.* 102: 1387-1393.
- Morley, J.E., Baumgartner, R.N., Roubenoff, R., Mayer, J. and Nair, K.S. 2001. Sarcopenia. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 137: 231-243.
- Muntener, M., Kaser, L., Weber, J. and Berchtold, M.W. 1995. Increase of skeletal muscle relaxation speed by direct injection of parvalbumin cDNA. *Proc Natl Acad Sci.* 92: 6504-6508.
- Pfaffl, M.W., Lange, I.G., Daxenberger, A. and Meyer, H.H.D. 2001. Tissue-specific pattern of estrogen receptors (ER): Quantification of $\text{ER}\alpha$ and $\text{ER}\beta$ mRNA with real-time RT-PCR. *APMIS.* 109: 345-355.

- Phillips, S.K., Rook, K.M., Siddle, N.C., Bruce, S.A. and Woledge, R.C. 1993. Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clinical Science*. 84: 95-98.
- Radenahmad, N., Vongvatcharanon, U., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2006. Serum levels of 17β -estradiol in ovariectomized rats fed young-coconut-juice and its effect on wound healing. *Songklanakarin J Sci Technol*. 28: 897-910.
- Raymackers, J.M., Gailly, P., Colson-Van Schoor, M., Pette, D., Schwaller, B., Hunziker, W., Celio, M.R. and Gillis, J. M. 2000. Tetanus relaxation of fast skeletal muscles of the mouse made parvalbumin deficient by gene inactivation. *Journal of Physiology*. 527.2: 355-364.
- Ryan, M., Carlson, B. and Ohlendieck, K. 2000. Oligomeric status of the dihydropyridine receptor in aged skeletal muscle. *Mol Cell Biol Res Commun*. 4: 224-229.
- Ryan, M., Erzen, I., Mouly, V., Thornell, L.E., Wernig, A. and Ohlendieck, K. 2003. Persistent expression of the α_{1S} dihydropyridine receptor in aged human skeletal muscle: implications for the excitation-contraction coupling hypothesis of sarcopenia. *Int J Mol Med*. 11: 425-434.
- Saartok, T. 1984. Steroid receptors in two types of rabbit skeletal muscle. *Int J Sports Med*. 15: 130-136.
- Schmitt, T.L. and Pette, D. 1991. Fiber type-specific distribution of parvalbumin in rabbit skeletal muscle. *Histochemistry*. 96: 459-465.
- Schneider, B.P., Fine, J.P., Nadolski, T. and Tiidus, P.M. 2004. The effects of estradiol and progesterone on plantarflexor muscle fatigue in ovariectomized mice. *Biological Research For Nursing*. 5: 265-275.
- Schwaller, B., Dick, J., Dhoot, G., Carroll, S., Vrbova, G., Nicotera, P., Pette, D., Wyss, A., Bluethmann, H., Hunziker, W. and Celio, M.R. 1999. Prolonged contraction-relaxation cycle of fast-twitch muscles in parvalbumin knockout mice. *Am J Physiol*. 276: 395-403.
- Sinha-Hikim, I., Taylor, W.E., Gonzalez-Cadavid, N.F., Zheng, W. and Bhasin, S. 2004. Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: Up-regulation by androgen Treatment. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 89: 5245-5255.
- Sipila, S., Taaffe, D.R., Cheng, S., Puolakka, J., Toivanen, J. and Suominen, H. 2001. Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on

- skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clinical Science*. 101: 147-157.
- Sitnick, M., Foley, A.M., Brown, M. and Spangenburg, E.E. 2006. Ovariectomy prevents the recovery of atrophied gastrocnemius skeletal muscle mass. *J Appl Physiol*. 100: 286-293.
- Sotiriadou, S., Kyparos, A., Albani, M., Arsoos, G., Clark, M.S.F., Sidoras, G., Angelopoulou, N. and Matziari, C. 2006. Soleus muscle force following downhill running in ovariectomized rats treated with estrogen. *Appl Physiol Nutr Metab*. 31: 449-459
- United Nations Department for International Economic and Social Affairs. 1985. World population prospects : estimates and projections as assessed in 1982. United Nations: New York.
- Utian, W.H. 2004. Menopause-related definitions. *International Congress Series*. 1266: 133-138.
- Vongvatcharanon, U., Mukem, S., Udomuksorn, W., Kumarsit, E. and Vongvatcharanon, S. 2010. Alcohol administration during adulthood induces alterations of parvalbumin and glial fibrillary acidic protein immunoreactivity in rat hippocampus and cingulate cortex. *Acta Histochemica*. 112: 392-401.
- Wade, C.B., Robinson, S., Shapiro, R.A. and Dorsa, D.M. 2001. Estrogen receptor ER α and ER β exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of the mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology*. 142: 2336-2342.
- Watanabe, S., Kitawaki, T. and Oka, H. 2010. Mathematical equation of fusion index of tetanic contraction of skeletal muscles. *Journal of Electromyography and Kinesiology*. 20: 284-289.
- Widrick, J.J., Maddalozzo, G.F., Lewis, D., Valentine, B.A., Garner, D.P., Stelzer, J. E., Shoepe, T.C. and Snow, C.M. 2003. Morphological and functional characteristics of skeletal muscle fibers from hormone-replaced and nonreplaced postmenopausal women. *Journal of Gerontology*. 58A(1): 3-10.
- Wiik, A. 2008. Estrogen receptor in skeletal muscle. Ph.D. Thesis, Department of Laboratory Medicine, Karolinska Institutet, Sweden.

- Wiik, A., Ekman, M., Johansson, O., Jansson, E. and Esbjörnsson, M. 2009. Expression of both oestrogen receptor alpha and beta in human skeletal muscle tissue. *Histochem Cell Biol.* 131: 181-189.
- Wilwert, J.L., Madhoun, N.M. and Coughlin, D.J. 2006. Parvalbumin correlates with relaxation rate in the swimming muscle of sheepshead and kingfish. *The Journal of Experimental Biology.* 209: 227-237.
- Wirakiat, W., Udomuksorn, W., Vongvatcharanon, S. and Vongvatcharanon, U. 2012. Effects of estrogen via estrogen receptors on parvalbumin levels in cardiac myocytes of ovariectomized rats. *Acta Histochemica.* 114: 46-54.
- Wohlers, L.M., Sweeney, S.M., Ward, C.W., Lovering, R.M. and Spangenburg, E.E. 2009. Changes in contraction-induced phosphorylation of AMP-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinases in skeletal muscle after ovariectomy. *J Cell Biochem.* 107: 171-178.
- Xu, X., Liu, M.L., Lu, J., Xie, P. and Song, H.P. 2005. Effects of long-term estrogen replacement treatment on the expression of bcl-2 and H-ras in rat endometrium. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 30(1): 41-45.

ภาคผนวก ก
ตารางแสดงค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของข้อมูลทั้งหมด

1. แสดงค่าน้ำหนักตัว อัตราการเพิ่มน้ำหนักตัวต่อเดือน น้ำหนักมดลูก น้ำหนักมดลูกต่อ
น้ำหนักตัว และฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่	น้ำหนักตัว	อัตราเพิ่มน้ำหนักเฉลี่ย ต่อเดือน	น้ำหนักมดลูก	น้ำหนักเฉลี่ยของมดลูกต่อ น้ำหนักตัว (x100)	ฮอร์โมนในเลือด	
Sham	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	260.53 10 11.36 2.93	8.35 10 2.76 0.71	0.46 10 0.15 0.04	0.18 10 0.06 0.02	41.60 10 5.95 2.43
OVX	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	275.60 10 20.22 5.22	17.93 10 4.98 1.29	0.14 10 0.05 0.01	0.05 10 0.02 0.01	32.80 10 3.99 1.63
E10	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	248.60 10 14.22 3.67	6.98 10 3.21 0.83	0.57 10 0.05 0.01	0.23 10 0.03 0.01	82.38 10 11.73 4.79
E20	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	247.47 10 18.89 4.88	6.43 10 5.00 1.29	0.61 10 0.11 0.03	0.25 10 0.04 0.01	175.60 10 31.45 12.84
E40	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	261.27 10 11.88 3.07	9.65 10 5.25 1.35	0.75 10 0.16 0.04	0.29 10 0.06 0.02	268.63 10 89.33 36.47
Total	Mean N Std. Deviation Std. Error of Mean	258.69 50 18.45 2.13	9.87 50 5.98 0.69	0.51 50 0.23 0.03	0.2 50 0.09 0.01	120.20 50 99.63 18.19

2. แสดงค่าน้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius และน้ำหนักกล้ามเนื้อ EDL และ gastrocnemius ต่อน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่ม

กลุ่มที่		น้ำหนัก EDL	น้ำหนัก EDL ต่อน้ำหนัก ตัว (x100)	น้ำหนัก Gas	น้ำหนัก Gas ต่อน้ำหนัก ตัว (x100)
Sham	Mean	0.070	0.027	1.587	0.609
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.008	0.003	0.113	0.032
	Std. Error of Mean	0.002	0.001	0.029	0.008
OVX	Mean	0.060	0.022	1.600	0.577
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.012	0.003	0.342	0.094
	Std. Error of Mean	0.003	0.001	0.088	0.024
E10	Mean	0.063	0.025	1.533	0.616
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.010	0.004	0.184	0.054
	Std. Error of Mean	0.002	0.001	0.047	0.014
E20	Mean	0.069	0.028	1.573	0.635
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.010	0.004	0.175	0.047
	Std. Error of Mean	0.002	0.001	0.045	0.012
E40	Mean	0.070	0.027	1.587	0.607
	N	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.010	0.004	0.119	0.038
	Std. Error of Mean	0.003	0.001	0.031	0.010
Total	Mean	0.066	0.026	1.576	0.609
	N	50	50	50	50
	Std. Deviation	0.010	0.004	0.200	0.059
	Std. Error of Mean	0.001	0.001	0.023	0.007

3. แสดงค่าแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อสูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) เวลาที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ (contraction time) เวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง (one-half relaxation time) เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง (time to peak tension) ความถี่ที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นคู่ และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง และเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนเกิดการล้าจนเหลือ 25% ของแรงสูงสุดของกล้ามเนื้อ EDL

กลุ่มที่		peak twitch tension	contraction time	one-half relaxation time	peak tetanic tension	time to peak tension	เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงเหลือ 25%	ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanic เมื่อกระตุ้นคู่	ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanic เมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง
Sham	Mean	1.30	0.0348	0.0159	7.28	0.36	16.18	38.00	50.67
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.67	0.0025	0.0013	3.29	0.15	3.66	2.54	2.58
	Std. Error of Mean	0.17	0.0010	0.0003	0.85	0.04	0.95	0.65	0.67
OVX	Mean	0.46	0.0353	0.0183	3.13	0.40	13.25	34.29	44.29
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.45	0.0053	0.0063	2.41	0.14	4.87	1.89	1.89
	Std. Error of Mean	0.17	0.0020	0.0024	0.91	0.05	1.84	0.71	0.71
E10	Mean	0.78	0.0345	0.0147	4.43	0.24	13.41	39.23	51.92
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.50	0.0025	0.0023	2.69	0.07	4.14	1.88	3.84
	Std. Error of Mean	0.14	0.0010	0.0006	0.75	0.02	1.15	0.52	1.06
E20	Mean	1.63	0.0332	0.0150	9.29	0.30	16.64	38.21	49.29
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.80	0.0020	0.0013	4.71	0.07	5.63	2.49	2.67
	Std. Error of Mean	0.21	0.0010	0.0004	1.26	0.02	1.50	0.66	0.71
E40	Mean	1.80	0.0354	0.0165	9.34	0.37	20.64	38.57	48.93
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	0.74	0.0017	0.0017	4.35	0.09	6.43	3.06	2.89
	Std. Error of Mean	0.20	0.0004	0.0005	1.16	0.02	1.72	0.82	0.77
Total	Mean	1.28	0.0346	0.0159	7.14	0.33	16.38	38.02	49.52
	N	50	50	50	50	50	50	50	50
	Std. Deviation	0.80	0.0027	0.0027	4.30	0.12	5.57	2.77	3.56
	Std. Error of Mean	0.10	0.0003	0.0003	0.54	0.02	0.70	0.35	0.45

4. แสดงค่าแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อสูงสุดเมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นเดี่ยว (peak twitch tension) และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง (peak tetanic tension) เวลาที่ใช้ในการหดตัวของกล้ามเนื้อ (contraction time) เวลาที่ใช้ในการคลายตัวครึ่งหนึ่ง (one-half relaxation time) เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนได้แรงสูงสุดเมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง (time to peak tension) ความถี่ที่ทำให้เกิด complete tetanus เมื่อกระตุ้นด้วยตัวกระตุ้นคู่ และตัวกระตุ้นต่อเนื่อง และเวลาที่ใช้ในการหดตัวจนเกิดการล้าจนเหลือ 25% ของแรงสูงสุดของกล้ามเนื้อ gastrocnemius

กลุ่มที่		peak twitch tension	contraction time	one-half relaxation time	peak tetanic tension	time to peak tension	เวลาที่ใช้ในการหดตัวจนเหลือ 25%	ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanic เมื่อกระตุ้นคู่	ความถี่ต่ำสุดที่ทำให้เกิด complete tetanic เมื่อกระตุ้นต่อเนื่อง
Sham	Mean	72.29	0.0392	0.0185	231.71	0.42	20.75	39.33	46.67
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	29.28	0.0033	0.0028	100.25	0.14	5.17	1.76	2.44
	Std. Error of Mean	7.56	0.0008	0.0007	25.88	0.04	1.33	0.45	0.63
OVX	Mean	23.43	0.0391	0.0199	58.49	0.43	13.19	35.00	46.43
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	11.28	0.0037	0.0021	27.30	0.18	1.80	2.89	2.44
	Std. Error of Mean	4.26	0.0014	0.0008	10.32	0.07	0.68	1.09	0.92
E10	Mean	24.60	0.0392	0.0175	74.08	0.31	10.80	38.46	49.23
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	21.65	0.0025	0.0012	59.11	0.12	6.29	3.15	1.88
	Std. Error of Mean	6.00	0.0007	0.0003	16.39	0.03	1.74	0.87	0.52
E20	Mean	28.46	0.0399	0.0184	105.33	0.54	14.76	37.50	49.29
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	23.73	0.0024	0.0015	64.47	0.17	7.74	3.25	2.67
	Std. Error of Mean	6.34	0.0006	0.0004	17.23	0.05	2.07	0.87	0.71
E40	Mean	58.86	0.0391	0.0183	185.35	0.49	27.52	39.29	47.50
	N	10	10	10	10	10	10	10	10
	Std. Deviation	27.66	0.0020	0.0011	92.06	0.17	13.18	2.67	3.25
	Std. Error of Mean	7.39	0.0005	0.0003	24.60	0.05	3.52	0.71	0.87
Total	Mean	44.29	0.0393	0.0184	141.55	0.44	18.03	38.25	47.94
	N	50	50	50	50	50	50	50	50
	Std. Deviation	31.62	0.0027	0.0019	100.48	0.17	10.06	3.00	2.79
	Std. Error of Mean	3.98	0.0003	0.0002	12.66	0.02	1.27	0.38	0.35

5. แสดงค่าพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ EDL

พื้นที่หน้าตัดEDL

กลุ่ม	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean
Sham	2451.17	10	151.44	61.82
OVX	1933.83	10	91.45	37.33
E10	2428.26	10	189.88	77.52
E20	2434.11	10	76.12	31.08
E40	2429.37	10	193.73	79.09
Total	2335.35	50	246.67	45.04

6. แสดงค่าพื้นที่หน้าตัดของเซลล์กล้ามเนื้อ gastrocnemius

พื้นที่หน้าตัดGas

กลุ่ม	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean
Sham	2425.51	10	118.10	48.22
OVX	2020.41	10	169.40	69.16
E10	2587.76	10	164.58	67.19
E20	2523.35	10	206.84	84.44
E40	2560.31	10	209.35	85.47
Total	2423.47	50	268.50	49.02

7. แสดงค่าระดับโปรตีนพาร์วัลบูมินของกล้ามเนื้อ EDL

กลุ่ม	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean
Sham	6.83	10	0.81	0.31
OVX	5.20	10	0.82	0.31
E10	6.67	10	0.38	0.14
E20	6.88	10	0.48	0.18
E40	6.08	10	0.82	0.31
Total	6.33	50	0.91	0.15

8. แสดงค่าระดับโปรตีนพาร์วัลบูมินของกล้ามเนื้อ gastrocnemius

กลุ่ม	Mean	N	Std. Deviation	Std. Error of Mean
Sham	7.35	10	1.13	0.43
OVX	5.58	10	0.59	0.22
E10	6.84	10	1.10	0.42
E20	7.23	10	0.38	0.14
E40	7.18	10	0.49	0.18
Total	6.84	50	1.00	0.17

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

1. การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาการหดตัวของกล้ามเนื้อ

1.1 การเตรียม Krebs's solution

สารเคมี

NaCl	6.92	กรัม
KCl	0.354	กรัม
CaCl ₂	0.282	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.162	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.294	กรัม
NaHCO ₃	2.1	กรัม
Glucose	2.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำ และเก็บไว้ใช้เมื่อต้องการ

2. การเตรียมสารเคมีสำหรับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

2.1 การเตรียม 0.1 M Phosphate buffer

สารเคมี

Stock 1 M Phosphate buffer

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	115.0	กรัม
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	34.22	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำ
3. นำ stock 1 M Phosphate buffer มา 100 มิลลิลิตร เติมน้ำจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปเก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียม alcohol-formalin

สารเคมี

37-40% formaldehyde	10.0	มิลลิลิตร
80% alcohol	90.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวงสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. ละลายสารทั้งหมดให้เข้ากัน

2.3 การเตรียม Tespa coated slide

สารเคมี

70% alcohol	500.0	มิลลิลิตร
Dry acetone	500.0	มิลลิลิตร
Tespa	2.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	750.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

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

2.4 การเตรียม Stock solution 1% eosin

สารเคมี

Stock eosin solution

Eosin yellowish	10.0	กรัม
95% ethanol	80.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20.0	มิลลิลิตร

Working eosin solution

1% stock eosin	1	ส่วน
95% ethanol	1	ส่วน

ขั้นตอนการเตรียม

1. ละลาย eosin yellowish ด้วยน้ำที่เล็กน้อย ใช้ magnetic stirrer ช่วยผสม
2. เมื่อผงสีละลายจนหมดจึงเติม 95% ethanol ผสมให้เข้ากัน

3. ก่อนใช้ Working eosin solution ให้เติม glacial acetic acid ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ต่อ eosin 100 มิลลิลิตร

2.5 การเตรียม Mayer' s hematoxylin

สารเคมี

Hematoxylin	1.0	กรัม
Potassium alum	50.0	กรัม
Sodium iodate	0.2	กรัม
Citric acid	1.0	กรัม
Chloral hydrate	50.0	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

1. ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. ละลายสารทั้งหมดด้วยน้ำ และเก็บไว้ใช้เมื่อต้องการ

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

สารเคมี

0.1 M phosphate buffer	300.0	มิลลิลิตร
Triton X-100	900.0	ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เติม Triton X-100 จำนวน 900 ไมโครลิตร ใส่ใน 300 มิลลิลิตร ของ 0.1 M phosphate buffer เตรียมเมื่อต้องการใช้เท่านั้น

2.7 การเตรียม 0.01 M Citric buffer pH 6

สารเคมี

tri-sodium citrate	2.94	กรัม
--------------------	------	------

ขั้นตอนการเตรียม

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

2.8 การเตรียม 1 N HCl

สารเคมี

Concentrate HCl	12.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร เติมกรด HCl ตามปริมาตรข้างต้น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเติมจนครบ 120 มิลลิลิตร (ข้อควรระวังในการเตรียมกรดที่มีความเข้มข้นสูงควรเทกรดใส่ในน้ำเพื่อความปลอดภัย)

3. การเตรียมสารเคมีสำหรับการสกัดโปรตีน

3.1 การเตรียม Lysis buffer

สารเคมี

0.1 M Sodium pyrophosphate	2.0	มิลลิลิตร
0.5 M Sodium fluoride	0.5	มิลลิลิตร
10% Sodium deoxycholate	0.025	ไมโครลิตร
1 M Tris pH 8	100.0	ไมโครลิตร
0.5 M EGTA	100.0	ไมโครลิตร
Triton X-100	50.0	ไมโครลิตร
100 mM PMSF	50.0	ไมโครลิตร
1 M Magnesium chloride	25.0	ไมโครลิตร
0.1 M Sodium vanadate	5.0	ไมโครลิตร
De-ionized water	2.15	มิลลิลิตร
Leupeptin	2.0	ไมโครลิตร
Apotinin	10.0	ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมสารเคมีทั้งหมด (ยกเว้น Leupeptin และ Apotinin) แล้วจึงนำสารละลายที่ได้ขึ้นต้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติม Leupeptin และ Apotinin ตามปริมาณข้างต้น

3.2 การเตรียม Laemmli sample buffer

สารเคมี

Laemmli sample buffer	950.0	ไมโครลิตร
β mercaptoethanol	50.0	ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

4. การเตรียมสารเคมีสำหรับเวสเทิร์น บลอต

4.1 การเตรียม 12% Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide resolving gel

สารเคมี

1.5 M Tris (HCl)	2.5	มิลลิลิตร
30% Acrylamide (37.5:1)	4.0	ไมโครลิตร
12% SDS solution	100.0	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulphate	100.0	ไมโครลิตร
TEMED	25.0	ไมโครลิตร
Double-Deionized water	3.03	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้นเมื่อผสม 10% Ammonium persulphate และ TEMED แล้ว ควรใช้เวลาให้น้อย เพราะเจลจะเริ่มเกิดพอลิเมอร์ไรต์เซชัน ที่เจลไว้นาน 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.2 การเตรียม 4% Sodium dodecyl sulfate poyacrylamide stack gel

สารเคมี

0.5 M Tris (HCl)	1.008	มิลลิลิตร
30% Acrylamide (37.5:1)	528.0	ไมโครลิตร
10% SDS solution	40.0	ไมโครลิตร
10% Ammonium persulphate	50.0	ไมโครลิตร
TEMED	20.0	ไมโครลิตร
Double-Deionized water	2.16	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

เตรียมสารเคมีตามปริมาณข้างต้น เมื่อผสม 10% Ammonium persulphate และ Temed แล้ว ควรใช้เวลาให้น้อย เพราะเจลจะเริ่มเกิดการพอลิเมอร์ไรต์เซชัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที

4.3 การเตรียม Transferring buffer

สารเคมี

Tris base	3.03	กรัม
Glycine	14.4	กรัม
Methanol	200.0	มิลลิลิตร

De-ionized water for up to 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องช่วยผสม

4.4 การเตรียม 1xSDS running buffer

สารเคมี

Tris base	3.02	กรัม
Glycine	18.8	กรัม
Sodium dodecyl sulfate	1.0	กรัม

De-ionized water for up to 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องช่วยผสม

4.5 การเตรียม Tris buffer saline with Tween 20 (TBST)

สารเคมี

5 M NaCl	30.0	มิลลิลิตร
1 M Tris pH 8	10.0	มิลลิลิตร
Tween 20	1.0	มิลลิลิตร

De-ionized water for up to 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.6 การเตรียม Tris buffer saline (TBS)

สารเคมี

5 M NaCl	30.0	มิลลิลิตร
1 M Tris pH 8	10.0	มิลลิลิตร

De-ionized water for up to 1,000 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

4.7 การเตรียม ECL

สารเคมี

Reagent A	1.0	มิลลิลิตร
Reagent B	25.0	ไมโครลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสมสารเคมีทั้งสองชนิดตามสัดส่วนที่กำหนดในห้องมืดเป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงค่อยหยดบนแผ่น membrane

4.8 การเตรียมน้ำยา Developer

สารเคมี

น้ำยา Developer and replenisher	103.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	345.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นเข้าด้วยกันทำในที่มืดมีแสงสว่างน้อย

วิธีการเก็บรักษา

เก็บในขวดสีชา และแช่เย็นไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนน้ำยาต่อเมื่อน้ำยาเปลี่ยนเป็นสีดำคล้ำ

4.9 การเตรียมน้ำยา Fixer

สารเคมี

น้ำยา Fixer and replenisher	103.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	345.0	มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียม

ผสมสารเคมีกับน้ำกลั่นเข้าด้วยกันทำในที่ที่มีแสงสว่างน้อย

วิธีการเก็บรักษา

เก็บในขวดสีชา และแช่เย็นไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปลี่ยนเมื่อเกิดตะกอนขาว