

การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศเมีย  
Effect of Young Coconut Juice on Healing of Female Rat Wounds

อิบรอฮีม ซาโยะ

Ibrahim Sayoh

๗

|         |        |        |      |    |   |
|---------|--------|--------|------|----|---|
| เลขที่  | 017561 | 063    | 2552 | ว. | 2 |
| Bib Key |        | 312308 |      |    |   |
|         | 3      | 1/1.0. |      | 52 |   |

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

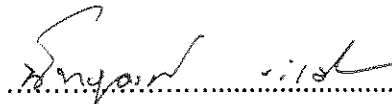
2552

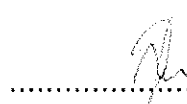
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศเมีย  
ผู้เขียน นายอิบรอฮีม ซาโยะ  
สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

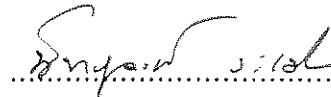
คณะกรรมการสอบ



 ประธานกรรมการ

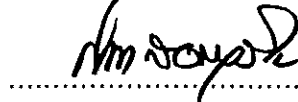
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิชาอูตะห์ ระเด่นอาหมัด) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิสสา ถาน้อย)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

 กรรมการ

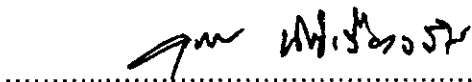
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นิชาอูตะห์ ระเด่นอาหมัด)

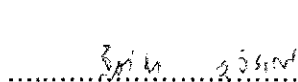


 กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัจจา สุว่างเจริญ)

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กัจจา สุว่างเจริญ)




 กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ.อนุพงศ์ นิตีเรืองจรัส)

(ดร.จิตติมา รุจิราลัย)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้  
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาค  
ศาสตร์

  
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

|                 |   |
|-----------------|---|
| ชื่อวิทยานิพนธ์ | การศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศเมีย |
| ผู้เขียน        | นายอิบรอฮีม ซาโยะ                                       |
| สาขาวิชา        | กายวิภาคศาสตร์  |
| ปีการศึกษา      | 2551  |

### บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อน (YCJ) ต่อการสมานแผลและความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ phytoestrogen (PE) ในน้ำมะพร้าวอ่อนในหนูที่ทำการผ่าตัดเอารังไข่ออก (ovariectomy = ovx) ซึ่งเป็นแบบจำลองสำหรับสตรีวัยทอง โดยใช้หนูเพศเมียทั้งหมด 48 ตัว ทำการผ่าตัดหน้าท้องเพื่อเอารังไข่ออก (ovariectomized rat : ovx) จำนวน 36 ตัว โดยหนู 24 ตัวได้รับ treatment เป็นเวลา 7 วัน (กลุ่ม 7 วัน) และที่เหลืออีก 24 ตัวได้รับเป็นเวลา 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) และ แบ่งหนู ovx ออกเป็น 3 กลุ่มตามการได้รับ treatment ดังนี้ กลุ่ม control คือกลุ่มที่ได้รับ estradiol benzoate (EB) ความเข้มข้น 2.5 µg/kgBW/day (i.p.) กลุ่ม YCJ คือกลุ่มที่ได้รับ YCJ ความเข้มข้น 100 mL/kgBW/day และกลุ่ม ovx ที่ได้รับ deionized water (DI) เช่นเดียวกับกลุ่ม sham ด้วยความเข้มข้นและระยะเวลาเช่นเดียวกับสองกลุ่มแรก ภายหลังจากทำ ovx หรือ sham จะทำแผลมาตรฐานยาว 1.5 เซนติเมตรบริเวณแผ่นหลังได้สะบักทั้งสองข้าง แล้วจึงให้ treatment ดังกล่าวข้างต้นเมื่อได้รับ treatment ครบตามเวลาที่กำหนดแล้ว จะทำการเก็บผิวหนังและอวัยวะภายในเพื่อศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาในระดับ LM และ TEM ต่อไป ผลการทดลองของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วย สีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วันไม่พบความแตกต่างทั้งความหนาของชั้น epidermis, dermis, hypodermis หรือขนาดของแผลในแต่ละกลุ่มการทดลอง สำหรับผลการทดลองในกลุ่ม 14 วันพบว่าชั้น epidermis และ dermis ของกลุ่ม YCJ มีความหนามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ความหนาชั้น hypodermis ของกลุ่ม YCJ น้อยกว่ากลุ่ม ovx แม้ว่าขนาดของแผลแต่ละกลุ่มทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ขนาดของแผลในกลุ่ม YCJ น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ การศึกษาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิด ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วันพบองค์ประกอบที่ติดสีย้อมดังกล่าวได้แก่ keratinocytes, fibroblasts, hair follicles, sebaceous gland, extracellular matrix และ panniculus carnosus โดยในกลุ่ม YCJ พบมีจำนวนของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis มากที่สุด ในขณะที่กลุ่ม control พบน้อยที่สุด จากผลต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า YCJ มีฤทธิ์คล้ายสารในกลุ่ม SERM (selective estrogen receptor modulator) นอกจากนี้จากการศึกษาทางเคมีคลินิกโดยการวัดระดับของ cholesterol, triglyceride, HDL, LDL, AST, ALT, ALP, total protein, albumin, BUN, creatinine ในเลือด

พบว่าค่าต่างๆ ดังกล่าวในกลุ่ม YCJ ต่ำกว่ากลุ่ม sham control และ ovx ยกเว้นค่า HDL แสดงให้เห็นว่า YCJ นอกจากช่วยสมานแผลแล้วยังไม่มีผลเสียต่อการทำงานของอวัยวะต่างๆ

**Thesis Title** Effect of Young Coconut Juice on Healing of Female Rat  
Wounds  
**Author** Mr. Ibrahim Sayoh  
**Major Program** Anatomy  
**Academic Year** 2008

### **ABSTRACT**

This study aimed to evaluate the potential medical use of young coconut juice (YCJ), assumed to contain phytoestrogens (PE), to facilitate wound healing properties and its safety. Comparisons were made between two groups of animals: a control and experimental group. Forty eight Wistar rats were used, 36 being ovariectomized (ovx), 24 rats were treated for 7 days the others for 14 days. For each length of treatment time ovariectomized rats were divided into 3 groups, 6 rats per group. Group 1 received estradiol benzoate (EB) (i.p.) at 2.5 µg/kgBW/day (control group); group 2 received YCJ at 100 mL/kg BW/day (YCJ group). Group 3 were ovx and received deionized water, and group 4 were a sham-operated controls that also received deionized water, in the same way as the test groups everyday, once a day. Two weeks after ovariectomy, two equidistant 1.5-cm full-thickness skin incisional wounds were made through both the skin and panniculus carnosus muscle and left to heal by secondary intention. Rats were force fed with YCJ or given an injection of EB for another 7 or 14 days. After sacrifice, wounds were excised and bisected and internal organs were removed, fixed and paraffin embedded for routine H & E and immunohistochemical staining; and TEM studies.

Routine H & E revealed that after the 7 days treatment epidermal,dermal and hypodermal thicknesses were not different when each group was compared. However, when treated for 14 days, ovx rats receiving YCJ not only had accelerating wound healing, but also increasing thickness of the epidermis and dermis, and decreasing hypodermal thickness. When the depth and the width of wounds were measured, there were no significant differences between the wound areas of each group, although the YCJ group was smallest. The expression of both ER $\alpha$  and ER $\beta$  immunoreactivity was localized at the epidermis, dermis, hypodermis, hair follicles, sebaceous glands, keratinocytes, fat cells, fibroblasts and panniculus carnosus

(skeletal muscles). In the YCJ group, the number of hair follicles in either the dermis or hypodermis was highest and that of the control was lowest. These data altogether show novel tissue-specific differences of YCJ treated animals on the skin and skin appendages and consequently YCJ might be categorized as a SERM (selective estrogen receptor modulator). Biochemical markers for liver and renal function tests including cholesterol, triglyceride, HDL, LDL, AST, ALT, ALP, total protein, albumin, BUN, creatinine in YCJ group were lower than for the sham, control and ovx groups. The present study clearly demonstrated the beneficial effects of YCJ on cutaneous wound healing and the safety of YCJ consumption after assessing the results of the serum chemical analysis of various organs.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนับสนุน และความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นิชาอุตะห์ ระเด่นอาหมัด อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง และแก้ไขข้อบกพร่อง อันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิจจา สว่างเจริญ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นพ. อนุพงศ์ นิตีเรืองจรัส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำ ช่วยตรวจสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิสสา ถาน้อย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร. จุติมา รุจิราลัย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะ และแก้ไขข้อบกพร่อง ของวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ สำหรับทุนผู้ช่วยนักวิจัย คณะวิทยาศาสตร์ (RA) และบัณฑิตวิทยาลัย สำหรับทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และคอยให้ความช่วยเหลือประสานงานในด้านต่าง ๆ ด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่จากสถานเลี้ยงสัตว์ทดลองภาคใต้ทุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์เรื่องสถานที่และอำนวยความสะดวกในการเลี้ยงสัตว์ทดลองตลอดการศึกษาครั้งนี้ ตลอดจนเจ้าหน้าที่จากภาควิชาพยาธิวิทยาคลินิก คณะแพทยศาสตร์ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ พี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคน จากภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นกำลังใจอันดี ทำให้การทำวิทยานิพนธ์สำเร็จ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณครอบครัว และคนใกล้ชิดที่ส่งเสริมโอกาสทางการศึกษา และให้กำลังใจอันดีมาโดยตลอดจนกระทั่งประสบความสำเร็จในครั้งนี้

อิบรอฮีม ซาโยะ

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| สารบัญ   | (8)  |
| รายการตาราง  | (11) |
| รายการรูป  | (12) |
| คำย่อและสัญลักษณ์                                      | (15) |
| บทที่  |      |
| 1 บทนำ   | 1    |
| 1. บทนำต้นเรื่อง                                       | 1    |
| 2. การตรวจสอบเอกสาร                                    | 2    |
| 2.1. ผิวหนัง   | 2    |
| 2.2. การสมานแผล  | 8    |
| 2.3. เอสโตรเจน   | 11   |
| 2.4. ตัวรับเอสโตรเจน                                   | 17   |
| 2.5. มะพร้าว   | 19   |
| 3. วัตถุประสงค์  | 21   |
| 2 วิธีการวิจัย   | 22   |
| 1. สารเคมี   | 22   |
| 2. วัสดุ เครื่องมือ และอุปกรณ์                         | 24   |
| 3. วิธีดำเนินการวิจัย                                  | 26   |
| 3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง                                | 26   |
| 3.2 การเตรียมผงน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวอ่อนเข้มข้น | 29   |
| 3.3 การเตรียม $\beta$ -estradiol 3-benzoate (EB)       | 29   |
| 3.4 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ                        | 30   |
| 3.5 การย้อมสีตัวอย่างเนื้อเยื่อ                        | 32   |
| 3.6 การอ่านผลการสมานแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM      | 35   |
| 3.7 การอ่านผลการสมานแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ TEM     | 35   |
| 3.8 การตรวจวิเคราะห์ค่า serum E2                       | 36   |
| 3.9 การตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกอื่นๆ              | 36   |
| 4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง                              | 36   |
|  | (8)  |



## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่   | หน้า |
|---|------|
| 3 ผลการทดลอง  | 37   |
| 1. ค่า serum E2 (pg/mL) ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน  | 38   |
| 2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่างๆ                     | 39   |
| ก. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน                              | 39   |
| 1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล                                       | 39   |
| 2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ                            | 42   |
| ข. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในกลุ่ม 7 วัน                | 53   |
| 1. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยใช้ anti-ER $\alpha$ antibody บริเวณเนื้อเยื่อแผล | 53   |
| 2. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\beta$ antibody บริเวณเนื้อเยื่อแผล | 58   |
| ค. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 14 วัน                             | 65   |
| 1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล                                       | 65   |
| 2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาและการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ                            | 68   |
| ง. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ในกลุ่ม 14 วัน               | 79   |
| 1. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยใช้ anti-ER $\alpha$ antibody บริเวณเนื้อเยื่อแผล | 79   |
| 2. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\beta$ antibody บริเวณเนื้อเยื่อแผล | 84   |
| 3. ค่าทางเคมีคลินิกต่างๆ ในซีรัมของเลือดหนู   | 94   |
| 3.1 การวิเคราะห์ค่า BUN และ creatinine ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน                             | 94   |
| 3.2 การวิเคราะห์ค่า total protein, albumin, ALP, AST และ ALT ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน       | 96   |
| 3.3 การวิเคราะห์ค่า cholesterol, triglyceride, HDL และ LDL ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน         | 101  |
| 4. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณแผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค TEM                               | 105  |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่               | หน้า |
|---------------------|------|
| 4 วิจารณ์ผลการทดลอง | 108  |
| 5 สรุปผลการทดลอง    | 121  |
| บรรณานุกรม          | 123  |
| ภาคผนวก             | 133  |
| ประวัติผู้เขียน     | 146  |

## รายการตาราง

| ตารางที่                                       | หน้า |
|--|------|
| 2-1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเพื่อให้สารต่างๆ | 27   |

## รายการรูป

| รูปที่ | หน้า   |    |
|--------|--|----|
| 1-1    | แสดงชั้นต่างๆ และองค์ประกอบของผิวหนัง  | 6  |
| 1-2    | แสดง hair follicles  | 6  |
| 1-3    | แสดงต่อมไขมัน  | 7  |
| 1-4    | แสดงชั้นต่างๆ ของผิวหนังชั้น epidermis ชนิดบาง   | 7  |
| 1-5    | แสดงชีวสังเคราะห์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน   | 16 |
| 1-6    | แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ ER $\alpha$ และ ER $\beta$   | 18 |
| 1-7    | แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ERs   | 18 |
| 2-1    | แสดงขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลอง และระยะเวลาในแต่ละขั้นตอน   | 28 |
| 3-1    | กราฟแสดงค่า serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน  | 38 |
| 3-2    | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน  | 40 |
| 3-3    | กราฟแสดงความลึกและความกว้างของบริเวณแผล ในกลุ่ม 7 วัน  | 41 |
| 3-4    | แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน  | 43 |
| 3-5    | กราฟแสดงความหนาของชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน   | 44 |
| 3-6    | แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน   | 46 |
| 3-7    | กราฟแสดงความหนาของชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน  | 47 |
| 3-8    | แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ในกลุ่ม 7 วัน   | 49 |
| 3-9    | กราฟแสดงความหนาของชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน  | 50 |
| 3-10   | กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน                                   | 52 |
| 3-11   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 7 วัน  | 54 |
| 3-12   | แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 7 วัน                                    | 55 |
| 3-13   | กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตรเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน | 57 |
| 3-14   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน   | 59 |

## รายการรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า  |    |
|--------|---|----|
| 3-15   | แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 7 วัน   | 60 |
| 3-16   | กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน                        | 62 |
| 3-17   | กราฟแสดงจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน | 64 |
| 3-18   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีอิมมูโน H&E ในกลุ่ม 14 วัน   | 66 |
| 3-19   | กราฟแสดงความลึกและความกว้างของบริเวณแผล ในกลุ่ม 14 วัน  | 67 |
| 3-20   | แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีอิมมูโน H&E ในกลุ่ม 14 วัน   | 69 |
| 3-21   | กราฟแสดงความหนาของชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน   | 70 |
| 3-22   | แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีอิมมูโน H&E ในกลุ่ม 14 วัน  | 72 |
| 3-23   | กราฟแสดงความหนาของชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน  | 73 |
| 3-24   | แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีอิมมูโน H&E ในกลุ่ม 14 วัน  | 75 |
| 3-25   | กราฟแสดงความหนาของชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน  | 76 |
| 3-26   | กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน   | 78 |
| 3-27   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 14 วัน  | 80 |
| 3-28   | แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในกลุ่ม 14 วัน   | 81 |
| 3-29   | กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน                      | 83 |
| 3-30   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน   | 85 |
| 3-31   | แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในกลุ่ม 14 วัน  | 86 |

## รายการรูป (ต่อ)

| รูปที่ | หน้า   |     |
|--------|--|-----|
| 3-32   | กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$ ในชั้น dermis และ hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน                        | 88  |
| 3-33   | กราฟแสดงจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$ และ ER $\beta$ บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน | 90  |
| 3-34   | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis กับค่า serum E2   | 92  |
| 3-35   | กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น hypodermis กับค่า serum E2   | 93  |
| 3-36   | กราฟแสดงค่า BUN ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 94  |
| 3-37   | กราฟแสดงค่า creatinine ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน  | 95  |
| 3-38   | กราฟแสดงค่า total protein ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 96  |
| 3-39   | กราฟแสดงค่า albumin ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 97  |
| 3-40   | กราฟแสดงค่า ALP ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 98  |
| 3-41   | กราฟแสดงค่า AST ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 99  |
| 3-42   | กราฟแสดงค่า ALT ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 100 |
| 3-43   | กราฟแสดงค่า cholesterol ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 101 |
| 3-44   | กราฟแสดงค่า triglyceride ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน  | 102 |
| 3-45   | กราฟแสดงค่า HDL ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 103 |
| 3-46   | กราฟแสดงค่า LDL ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน   | 104 |
| 3-47   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยเทคนิค TEM ในกลุ่ม 7 วัน  | 106 |
| 3-48   | แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยเทคนิค TEM ในกลุ่ม 14 วัน   | 107 |

## คำย่อและสัญลักษณ์

|               |   |  |
|---------------|---|--|
| ALP           | = | Alkaline phosphatase                   |
| ALT           | = | Alanine aminotransferase               |
| AST           | = | Aspartate aminotransferase             |
| BUN           | = | Blood urea nitrogen                    |
| EB            | = | $\beta$ -estradiol 3-benzoate          |
| ERs           | = | Estrogen receptors                     |
| ER $\alpha$   | = | Estrogen receptor $\alpha$ subtype     |
| ER $\beta$    | = | Estrogen receptor $\beta$ subtype      |
| E1            | = | Estrone                                |
| E2            | = | 17 $\beta$ -estradiol                  |
| HDL           | = | High density lipoprotein               |
| LDL           | = | Low density lipoprotein                |
| LM            | = | Light microscope                       |
| MIF           | = | Macrophage migration inhibitory factor |
| PBS           | = | Phosphate buffer saline                |
| TBS           | = | Tris-buffer saline                     |
| TEM           | = | Transmission electron microscope       |
| TNF- $\alpha$ | = | Tumor necrosis factor $\alpha$         |
| YCJ           | = | Young coconut juice                    |

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1. บทนำต้นเรื่อง

ผิวหนังเป็นอวัยวะที่สำคัญอย่างยิ่งในสตรีเนื่องจากสตรีส่วนใหญ่เป็นผู้ที่รักสวยรักงาม ในสตรีที่หมดระดูจะมีการเปลี่ยนแปลงของผิวหนังในทางเสื่อมทำให้เกิดผลเสียตามมาได้ มีรายงานว่าประชากรสูงอายุร้อยละ 40 ถึง 60 จะมีปัญหาเกี่ยวกับโรคของผิวหนังอย่างน้อยหนึ่งชนิด (Dunn *et al.*, 1997) ปัญหาทางผิวหนังจะมีผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของวัยนี้ (Beauregard *et al.*, 1987) โดยพบว่าสตรีวัยหมดระดูจะมีผิวหนังฝ่อลีบ เหี่ยวยุบแห้ง หมองคล้ำ หย่อนยาน ต่อมไขมันสร้างสิ่งคัดหลั่งลดลง ปริมาณของคอลลาเจนในผิวหนังลดลง (Bologna, 1993; Pierard *et al.*, 1995) และความยืดหยุ่นของผิวหนังจะลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Agache *et al.*, 1980; Cua *et al.*, 1990; Deleixhe-mauhim *et al.*, 1994; Escoffier *et al.*, 1989) การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนจากการสูญเสียการทำงานของรังไข่อาจทำให้การเปลี่ยนแปลงของผิวหนังดังกล่าวมีมากขึ้น (Bologna *et al.*, 1989; Bologna, 1993; Brincat *et al.*, 1983; Brincat *et al.*, 1987; Pierard *et al.*, 1995) อาการแสดงของความเสื่อมของผิวหนังมักจะพบในบริเวณที่ถูกแสงแดดก่อน เช่น ใบหน้า หนำอก แขน และมือ ซึ่งผิวหนังที่เหี่ยวยุบอาจมีผลกระทบต่อจิตใจของสตรีโดยตรง ส่งผลให้เกิดความสูญเสียความมั่นใจในตนเอง (Beauregard *et al.*, 1987) นอกจากนี้ความเสื่อมของผิวหนังยังทำให้เซลล์และเส้นเลือดที่มาเลี้ยงผิวหนังลดลงชั้นของหนังกำพร้าและหนังแท้ก็แบนราบลงทำให้ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าหลุดลอกออกได้ง่ายขึ้น (Holland *et al.*, 1994) รวมทั้งโรคผิวหนังบางชนิดที่พบในวัยนี้ เช่น โรค xerosis จะเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดแผลกดทับและการติดเชื้อ ส่งผลทำให้เกิดปัญหารุนแรงตามมาได้ (Guralnik *et al.*, 1988)

การสมานแผล (cutaneous wound healing) ประกอบด้วยกระบวนการหลายขั้นตอนได้แก่ inflammation, angiogenesis, wound contraction, granulation tissue formation, reepithelialization และ matrix deposition กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องหลายชนิดได้แก่ keratinocytes, fibroblasts, endothelial cells และ infiltration inflammatory cells นอกจากนี้ยังมีตัวควบคุมกระบวนการสมานแผลประกอบด้วย mediators ต่างๆ เช่น cytokines, growth factors, proteinase และฮอร์โมนต่างๆรวมทั้งฮอร์โมนเพศ มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับผลของฮอร์โมนเพศต่อการสมานแผลมากมาย ตัวอย่างเช่น Rubin และคณะ (Rubin *et al.*, 1995) พบว่าฮอร์โมนเพศมีผลต่อ growth factors



ที่ควบคุมการสมานแผลเช่น keratinocyte growth factor โดยไปมีผลต่อ stimulation of proliferation, migration และ morphogenesis of pluripotential cells

ปัจจุบันมีการใช้ฮอร์โมนทดแทน (HRT) อย่างกว้างขวางเพื่อรักษาอาการต่างๆ ของวัยหมดระดู อาการของระบบทางเดินปัสสาวะและอวัยวะสืบพันธุ์ ป้องกันภาวะกระดูกพรุน และป้องกันโรคหลอดเลือดโคโรนารี (Oikarinen, 2000) ผลของฮอร์โมนทดแทนต่อผิวหนังในสตรีวัยหมดระดูก็มีการศึกษากันมากมาย ทั้งในแง่ความหนาของผิวหนัง ปริมาณคอลลาเจน ความยืดหยุ่นของผิวหนัง เป็นต้น แต่ในขณะเดียวกัน HRT ก็ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายอย่างรวมทั้งมะเร็งหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งเต้านม มะเร็งรังไข่ มะเร็งมดลูก (Berei *et al.*, 2007; Emons *et al.*, 2004; Pritchard, 2002) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาพืชที่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogen) โดยใช้ น้ำมะพร้าวอ่อนมาทดแทน HRT เพื่อจะได้พัฒนาเป็นสารเสริมอาหาร (nutraceutical or functional food) หรือยา หรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

## 2. การตรวจสอบเอกสาร

### 2.1 ผิวหนัง (skin)

เป็นอวัยวะที่อยู่นอกสุด และมีพื้นที่มากที่สุดของร่างกายมนุษย์ ทำหน้าที่ปกป้องอวัยวะอื่นๆ ที่อยู่ข้างใต้จากการกระทบเทือน การสูญเสียความชุ่มชื้น การสัมผัสกับจุลชีพภายนอก ช่วยรักษาสมดุลอุณหภูมิของร่างกาย ช่วยสังเคราะห์วิตามินดี เป็นต้น ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังประกอบด้วยชั้นย่อยๆ 3 ชั้น เรียงลำดับจากชั้นบนสุดถึงชั้นใต้สุด ดังนี้ คือ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นใต้หนังแท้ (hypodermis) ดังแสดงในรูปที่ 1-1

**2.1.1 ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis)** เป็นชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด keratinized stratified squamous epithelium ที่ประกอบด้วยเซลล์หลักคือ keratinocytes ทำหน้าที่สร้าง keratin ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างของเซลล์นี้ เมลาโนไซต์ (melanocytes) ทำหน้าที่สร้างเมลานิน (melanin) ช่วยดูดซับรังสีจากแสงแดดไม่ให้ทำลายองค์ประกอบอื่นที่อยู่ข้างใต้ langerhans cells ทำหน้าที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันปกป้องการรุกรานจากจุลชีพภายนอก และ merkel cells ทำหน้าที่รับสัมผัส ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของชั้นหนังกำพร้ายังประกอบด้วยชั้นย่อยๆ 5 ชั้น เรียงลำดับจากล่างสุดถึงบนสุด ดังแสดงในรูปที่ 1-4 ดังนี้ คือ

1. Stratum basale เป็นชั้นล่างสุดติด basement membrane เซลล์ในชั้นนี้มีรูปร่างเป็นแท่งเรียงตัวชั้นเดียว (columnar cells) นิวเคลียสโปร่งไซโตพลาสซึมประกอบด้วย intermediate filaments และ desmosome โดยมัดของ intermediate filaments ที่มองเห็นผ่านกล้องจุลทรรศน์เรียกว่า tonofilaments เซลล์ในชั้นนี้สามารถแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ได้สูงระหว่างเซลล์ของชั้น stratum basale นี้ พบ melanocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีรยางค์ไซโตพลาสซึม (cytoplasmic process) ยื่นออกมารอบตัว ภายในไซโตพลาสซึมนี้ มีการสังเคราะห์ melanin ขึ้นมาในรูปของเมลานโซม (melanosome) ระยะเวลาต่างๆ จากนั้น melanin granule ที่อยู่ภายในเมลานโซม จึงจะถูกส่งเข้าเซลล์ keratinocytes ที่อยู่ในชั้นนี้และชั้น stratum spinosum โดยผ่านตามรยางค์ดังกล่าว
2. Stratum spinosum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal cell) จำนวน 5-8 ชั้น ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ในชั้นนี้ พบแกรนูลขนาดเล็ก และ lamellar core รวมเรียกว่า lamellar bodies ลักษณะ tonofibrils ที่ยื่นออกรอบๆ เซลล์ ทำให้เห็นเซลล์มีลักษณะคล้ายหนามยื่นออกมารอบตัว
3. Stratum granulosum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างหลายเหลี่ยม (polygonal cell) จำนวน 2-3 ชั้น แต่จะแบนกว่าชั้น stratum spinosum ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ในชั้นนี้ มีแกรนูลเป็นจำนวนมากเรียกว่า kerato-hyaline granule ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นสาร keratin ในเซลล์ชั้นบน นอกจากนี้ยังพบ lamellar bodies จำนวนมากในไซโตพลาสซึมของเซลล์ในชั้นนี้ โดยจะปล่อยสาร glycolipid acylglucosylceramide ออกสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ ซึ่งสารดังกล่าวช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำของเซลล์ได้
4. Stratum lucidum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ที่ไม่มีนิวเคลียส เซลล์แบนและค่อนข้างโปร่งแสง เนื่องจากภายในเซลล์ของชั้นนี้มีสาร eleidin ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก kerato-hyaline granule
5. Stratum corneum เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ที่หมดสภาพการทำงานแล้ว เนื่องจากมี keratin สะสมไว้ ความหนาของชั้นนี้ประมาณ 20-30 เซลล์ แต่ขอบของเซลล์ไม่ชัดเจน เซลล์ในชั้นนี้จะหลุดลอกออกและถูกแทนที่ด้วยเซลล์ชั้นล่างต่อไป

**2.1.2 ชั้นหนังแท้ (Dermis)** เป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ fibroblast macrophage mast cell และเม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ยึดไว้ด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด dense irregular collagenous connective tissue ที่มี elastic fiber เสริมอยู่ด้วย เพื่อช่วยให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น ตอนบนของชั้นหนังแท้พบบริเวณเชื่อมต่อกับชั้น epidermis เรียกว่า papillary layer มีลักษณะเป็น projection ยื่นขึ้นไปสวมไว้กับชั้น epidermis ลักษณะดังกล่าวนี้คือ dermal papilla ถัดลงมาทางตอนล่างคือ reticular layer เป็นบริเวณที่พบมัดของเส้นใยคอลลาเจน (bundle of collagen fiber) และเส้นใยอีลาสติกชนิดหยาบ (coarse elastic fiber) นอกจากนี้ยังพบเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด หลอดน้ำเหลือง เส้นประสาทและตัวรับประสาทความรู้สึก (sensory receptor) กล้ามเนื้อเรียบ และโครงสร้างอื่นๆ ที่ดัดแปลงจากผิวหนัง (skin derivatives) เช่น ต่อมเหงื่อ (sweat gland) ต่อมไขมัน (sebaceous gland) ดังแสดงในรูปที่ 1-3 และ hair follicles ดังแสดงในรูปที่ 1-2 เป็นต้น

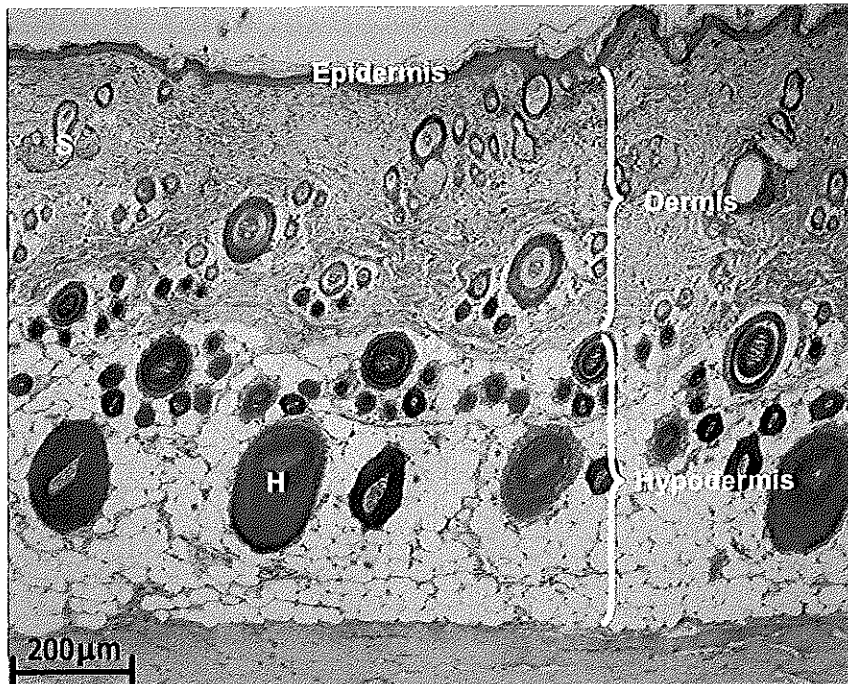
**2.1.3 ชั้นใต้หนังแท้ (Hypodermis หรือ superficial fascia)** เป็นชั้นที่อยู่ลึกใต้ต่อชั้น dermis มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด loose connective tissue และเซลล์ไขมัน (adipose cells) เป็นองค์ประกอบหลัก จึงทำให้ผิวหนังเคลื่อนได้อย่างอิสระ นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งสะสมพลังงาน และช่วยควบคุมอุณหภูมิร่างกายด้วย ลักษณะของชั้นนี้จะแตกต่างกันในผิวหนังบริเวณต่างๆ เช่น ผิวหนังบริเวณศีรษะและคอจะถูกแทนที่ด้วยกล้ามเนื้อ และไม่มีเซลล์ไขมัน ในชั้น hypodermis ของผิวหนังบริเวณเปลือกตา (eyelids) คลิตอริส (clitoris) องคชาติ (penis) เป็นต้น

**2.1.4 โครงสร้างที่ดัดแปลงมาจากผิวหนัง (skin derivatives)** โครงสร้างเหล่านี้เจริญมาจากชั้น epidermis ช่วยทำหน้าที่เสริมแก่ผิวหนัง ในการควบคุมอุณหภูมิร่างกาย รักษาความชุ่มชื้น และอื่น ๆ ประกอบด้วย เส้นผมและขน (hair) เล็บ (nail) ต่อมเหงื่อ ต่อมไขมัน และต่อมน้ำนม (mammary gland) ในบทนี้จะกล่าวเฉพาะ เส้นผมและขน และต่อมไขมัน

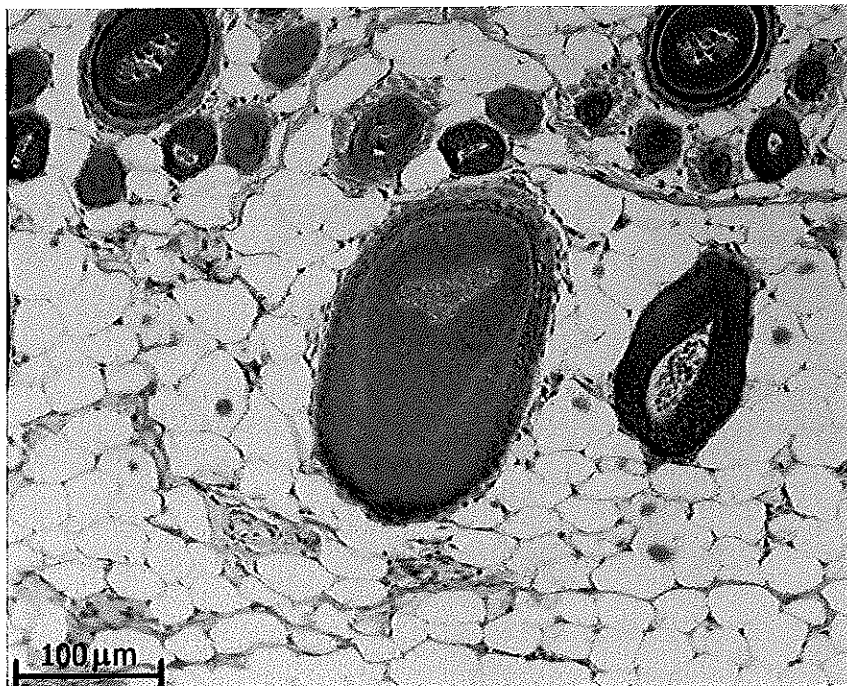
1. เส้นผมและขน (hair) เจริญมาจากผิวหนังชั้น epidermis โดยโครงสร้างส่วนที่โผล่พ้นผิวหนัง เรียกว่า hair shaft ส่วนโครงสร้างที่ฝังตัวอยู่ในผิวหนังเรียกว่า hair root โครงสร้างที่ห่อหุ้ม hair root ไว้เรียกว่า hair follicles ประกอบด้วยเซลล์ของเส้นขนที่มี keratin สะสมในไซโตพลาสซึมเป็นจำนวนมาก เซลล์เหล่านี้เจริญมาจากเซลล์ของชั้น epidermis และชั้น dermis ร่วมกัน โดย hair follicles สามารถพบได้หลายระยะดังนี้คือ ระยะเจริญ (anagen phase) ระยะถดถอย (catagen phase) และระยะพัก (telogen phase) ปลายล่างของ hair follicles จะโป่งพองออกเรียกว่า hair bulb เนื้อเยื่อชั้นนอกของ hair follicles มีเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ที่เรียกว่า clonogenic keratinocytes ซึ่งสามารถเจริญ

เปลี่ยนแปลงเป็น hair shaft เซลล์ของชั้น epidermis และต่อมไขมันได้ นอกจากนี้ภายใน hair bulb ยังประกอบด้วยเนื้อเยื่อเจริญที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มขึ้นไปทางตอนบน ทำให้เส้นผมยาวออกไปทางด้านปลายเรื่อยๆ เนื้อเยื่อเจริญนี้คือ hair matrix การทอดตัวของ hair follicles มักจะเฉียงลึกลงไปถึงชั้น hypodermis ทางด้านข้างของ hair follicles มีกล้ามเนื้อเรียบ arrector pili ยึดเกาะอยู่ ส่วนปลายอีกด้านจะเกาะที่ dermal papilla เมื่อมีการหดตัวของกล้ามเนื้อนี้ ทำให้ hair follicles ตั้งตรงมากขึ้นเกิดอาการ ขนลุกตามมา

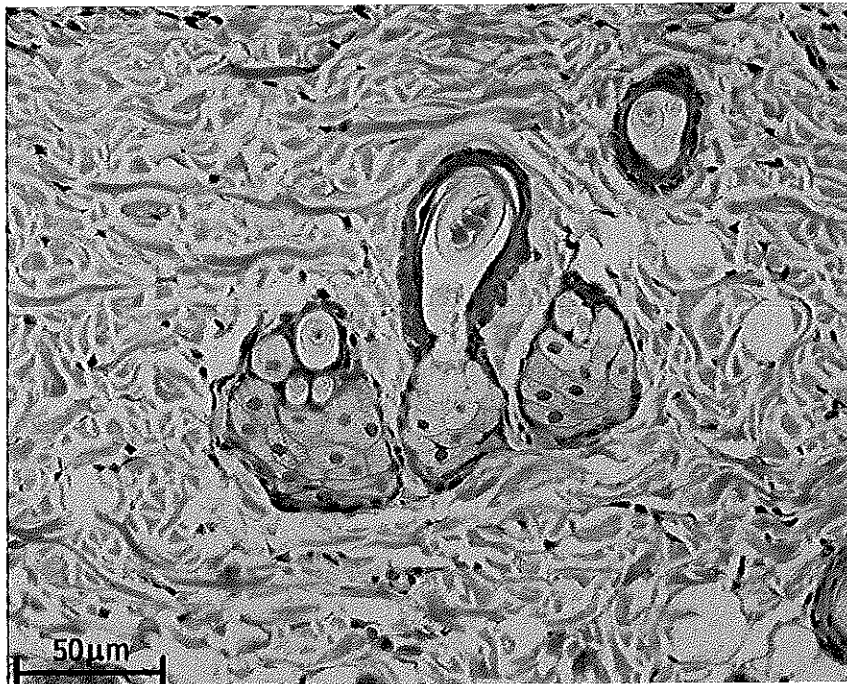
2. ต่อมไขมัน (sebaceous gland) ต่อมนี้มีหน่วยผลิตรูปร่างเป็นกระเปาะ (simple branched alveolar gland) เจริญออกจากเนื้อเยื่อของ hair follicles และยังคงติดต่อกันอยู่โดยจะขับสารคัดหลั่งออกทางด้านข้างของ hair follicles ไปเคลือบผิวชั้น epidermis สารคัดหลั่งจากต่อมนี้มีไขมัน (sebum) เป็นส่วนประกอบ จึงช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำจากร่างกายได้ แบบแผนการหลั่งเป็นชนิด holocrine



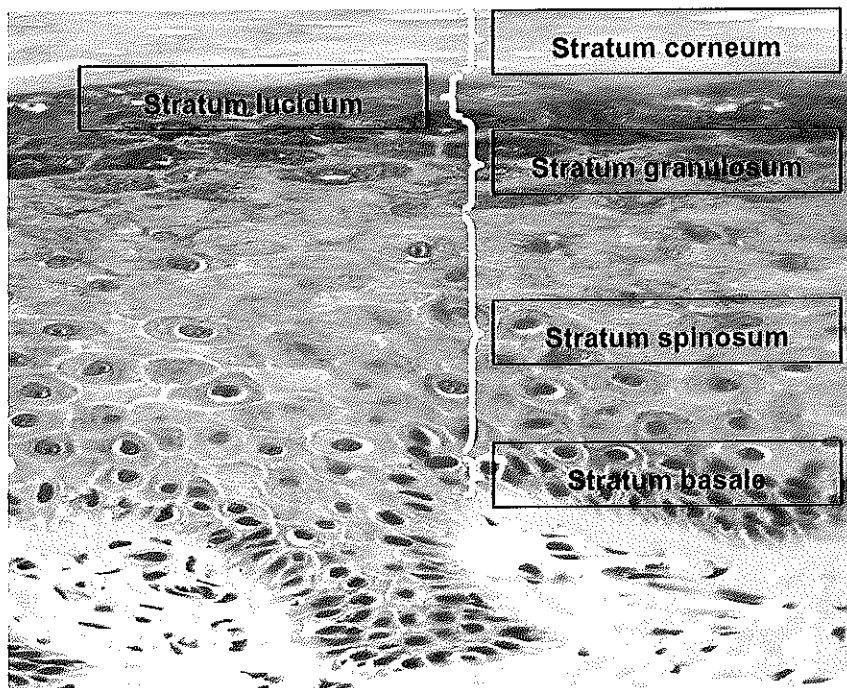
รูปที่ 1-1 แสดงชั้นต่างๆ และองค์ประกอบของผิวหนัง S = ต่อมไขมัน H = hair follicles



รูปที่ 1-2 แสดง hair follicles (10x)



รูปที่ 1-3 แสดงต่อมไขมัน (20x)



รูปที่ 1-4 แสดงชั้นต่างๆ ของผิวหนังชั้น epidermis ชนิดบาง

## 2.2 การสมานแผล (wound healing)

เป็นกระบวนการตอบสนองของร่างกายมนุษย์เมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (tissue injury) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น เพื่อให้เกิดการสร้างเซลล์ใหม่ทดแทนเซลล์ที่ถูกทำลาย และในที่สุดเซลล์ใหม่จะรวมกันเป็นเนื้อเยื่อใหม่ เพื่อทำหน้าที่ตามปกติต่อไป การสมานแผลประกอบด้วยหลายกระบวนการที่ซับซ้อน และบางกระบวนการก็อาจเกิดขึ้นในเวลาเดียวกันได้ อย่างไรก็ตามสามารถแบ่งช่วงการสมานแผลได้เป็น 3 ช่วงได้แก่ ช่วงเกิดการอักเสบ (inflammatory phase) ช่วงเกิดการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferation phase) และช่วงการเจริญของเซลล์ (maturation phase)

### 2.2.1 Inflammatory phase

เมื่อมีการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อใดๆ ก็หมายถึงมีการบาดเจ็บของหลอดเลือด บริเวณเนื้อเยื่อดังกล่าวด้วย กระบวนการแรกที่เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการได้รับบาดเจ็บของหลอดเลือดคือ การเกิดการแข็งตัวของเลือด (blood clot formation) บริเวณเนื้อเยื่อและหลอดเลือดที่ได้รับบาดเจ็บ ผ่านการทำงานของโปรตีนในพลาสมา (plasma) ที่เรียกว่า ปัจจัยในการแข็งตัวของเลือด (coagulation factors) พร้อมกับเกิดการสะสมของเกร็ดเลือด (platelets) บริเวณดังกล่าว ในขณะที่เดียวกันเกร็ดเลือดจะสร้างสารสื่อกลาง (mediators) กระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) แบบเฉียบพลัน กระบวนการดังกล่าวทั้งหมดจึงส่งผลร่วมกันในการป้องกันการสูญเสียเลือดในปริมาณที่มากเกินไปจนสมดุลง กระบวนการนี้จะใช้เวลาประมาณ 5-10 นาที นอกจากนี้กระบวนการดังกล่าวข้างต้นยังช่วยสร้างสาร bradykinin ซึ่งจะชักนำให้เกิดการสร้างสาร C3a และ C5a ในระบบคอมพลีเมนต์ (complement cascades) ต่อไป สาร C3a และ C5a จะทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) ได้โดยตรงหรือผ่านการกระตุ้น mast cell ให้สร้างสารสื่อกลางที่ทำให้หลอดเลือดมีการขยายตัวที่เรียกว่า vasoactive mediators เช่น histamine leukotrienes เป็นต้น ในขณะที่มีการขยายตัวของหลอดเลือดนั้น สาร fibropeptides ที่สร้างจากกระบวนการแข็งตัวของเลือด และสาร prostaglandins E1 และ E2 จากการกระตุ้นของระบบคอมพลีเมนต์จะทำหน้าที่เป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ (chemotactic factor) ของเซลล์ที่มีส่วนในกระบวนการอักเสบให้เคลื่อนที่มายังบริเวณที่มีบาดแผล โดยเซลล์ชนิดแรกที่เคลื่อนที่มายังบริเวณดังกล่าวคือ เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) ชนิดนิวโตรฟิล (neutrophil) ซึ่งจะทำหน้าที่จับกิน (phagocytize) สิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรีย (bacteria) สิ่งสกปรกภายนอกในร่างกายอื่นๆ (foreign bodies) รวมถึงเศษเซลล์ที่ตายแล้วเข้าไปในโครงสร้างที่เรียกว่า cytoplasmic vesicle จากนั้นนิวโตรฟิลจะปล่อยไลโซโซม (lysosome) ที่อยู่ภายใน lysosomal granules มาย่อยสลายสิ่งแปลกปลอมดังกล่าว นอกจากการย่อยสลายโดยอาศัย lysosome แล้ว neutrophil ยังสร้างสารกลุ่ม reactive oxygen species มาทำลายสิ่งแปลกปลอมด้วย นอกจากหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นแล้ว neutrophil ยังสามารถสร้าง chemotactic factor กลุ่ม leukotrienes ได้

รวมถึงยังกระตุ้นให้มีการปล่อยเอนไซม์ elastase และ collagenase เพื่อยังประโยชน์ในการย่อยสลายเส้นใยอีลาสตินและเส้นใยคอลลาเจน ที่เป็นโครงสร้างหนึ่งของหลอดเลือด ซึ่งในที่สุดจะอำนวยความสะดวกที่ของเซลล์ผ่านผนังหลอดเลือดไปยังบริเวณที่มีบาดแผลได้ง่ายขึ้น เมื่อ neutrophil จับกินสิ่งแปลกปลอมบริเวณบาดแผลหมดแล้ว เซลล์ก็จะตายและถูกรวมตัวเข้ากับเลือดที่แข็งตัวแล้ว (clotted blood) หรืออาจจะถูกจับกินโดย macrophages ก็ได้ เซลล์เม็ดเลือดขาวอีกชนิดหนึ่งที่เข้ามายังบริเวณบาดแผลในเวลาใกล้เคียงกับ neutrophil คือ โมโนไซต์ (monocytes) ทันทีที่ monocytes เข้ามาจะถูกสารโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบใน extracellular matrix กระตุ้นให้เปลี่ยนเป็น macrophages ซึ่งจะทำหน้าที่ร่วมกับ neutrophil ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม รวมถึงการกำจัด neutrophil ที่ตายแล้วโดยวิธีการจับกินด้วย แต่ความแตกต่างระหว่าง neutrophil และ macrophages ในกระบวนการนี้คือช่วงเวลาที่ยพบ neutrophil บริเวณบาดแผลจะเป็นช่วงเวลาสั้นๆ ในขณะที่สามารถพบ macrophages ได้ตลอดในระหว่างที่มีการดำเนินของการสมานแผล ที่เป็นเช่นนั้นเพราะ macrophages มีหน้าที่สร้างสาร cytokines และ growth factors ซึ่งสารที่สร้างขึ้นนี้สามารถเพิ่มอายุขัยให้กับ macrophages โดยตรง และยังทำหน้าที่เป็น chemotactic factor และ mitogenic factor ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) เพื่อกระตุ้นให้เซลล์ดังกล่าวมีการเคลื่อนที่มายังบริเวณบาดแผล และกระตุ้นการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนด้วย นอกจากนี้สารที่สร้างจาก macrophages ยังมีส่วนสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณบาดแผลด้วย

### 2.2.2 Proliferation phase

เป็นช่วงของการสมานแผลที่ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ คือ reepithelialization granulation tissue และ wound contraction

Reepithelialization เป็นกระบวนการที่มีการแบ่งเซลล์ keratinocytes บริเวณขอบแผลแบบไมโทซิส (mitosis) โดยการกระตุ้นจาก growth factors ที่สร้างจากเกร็ดเลือด (platelet derived growth factors : PDGF) growth factors จาก macrophages dermal parenchymal cells และรวมถึง growth factors จาก keratinocytes เองด้วย กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงถึง 72 ชั่วโมงหลังจากเกิดบาดแผล เมื่อแบ่งเซลล์แล้ว keratinocytes จะเคลื่อนที่ (migrate) โดยมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ดังนี้คือ มีการหดสั้นลงของ intracellular tonofilaments การหดหายตัวของ intracellular desmosome มีการงอกยาวขึ้นของ cytoplasmic actin filaments รอบๆ เซลล์ และ hemidesmosomes บริเวณ basement membrane มีปริมาณลดลงทั้งนี้เพื่อเอื้อต่อการเคลื่อนที่ของ keratinocytes จากขอบของบาดแผลเข้าปิดแผลในที่สุด เมื่อถึงขั้นตอนนี้จะมีการสร้าง basement membrane ขึ้นมาใหม่จึงเป็นการปิดกั้นการส่งสัญญาณ (signal) ระหว่าง keratinocytes กับองค์ประกอบที่อยู่ใน extracellular matrix ของผิวหนังชั้นหนังแท้ ทำให้ keratinocytes หยุดการเคลื่อนที่ และมีการเปลี่ยนแปลง (differentiation) เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตามปกติต่อไป ในขณะที่



กระบวนการ reepithelialization กำลังดำเนินอยู่นั้น เซลล์ fibroblasts จะถูกกระตุ้นจาก macrophage derived growth factors และ platelet derived growth factors ให้มีการแบ่งเซลล์ มีการเคลื่อนที่ และมีการสร้าง extracellular matrix ซึ่ง extracellular matrix ที่ถูกสร้างขึ้นนี้จะเปลี่ยนแปลงเป็น neodermis พร้อมกับการสร้าง granulation tissue ซึ่งจะเกิดขึ้นภายใน 2 ถึง 4 วันหลังจากมีบาดแผล granulation tissue เป็นโครงสร้างที่ประกอบด้วยองค์ประกอบต่างๆ คือ macrophages fibroblasts และหลอดเลือดเส้นใหม่ จำนวนมากที่ฝังตัวอยู่ในโปรตีน โครงสร้างที่เป็นคอลลาเจน fibronectin glycosaminoglycans และ glycoproteins นอกจากนี้ extracellular matrix ยังเป็นแหล่งของ cytokines ต่างๆ รวมถึง cytokines ที่มีหน้าที่ในการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วย นอกจาก fibroblasts จะทำหน้าที่สร้าง extracellular matrix ดังกล่าวแล้ว ยังพบว่า fibroblasts ที่เรียกชื่อเฉพาะว่า myofibroblasts ยังมีส่วนช่วยทำให้มีการหดตัว เล็กของบาดแผล โดย myofibroblasts จะสร้างมัดของเส้นใยแอกตินภายในไซโตพลาสซึม จำนวนมาก (intracytoplasmic actin bundles) เพื่อเอื้อต่อการเคลื่อนที่และกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของบาดแผลดังกล่าว

### 2.2.3 Maturation phase

เป็นช่วงต่อจากช่วง proliferative phase ดังนั้นองค์ประกอบใน extracellular matrix จึงเปลี่ยนแปลงไปตามความต้องการของเซลล์ โครงสร้างต่างๆ ของช่วงนี้คือ fibronectin และ hyaluronic acid ซึ่งเคยเป็นตัวกระตุ้นการเคลื่อนที่และกระตุ้นการแบ่งเซลล์จะถูกแทนที่ด้วย คอลลาเจนและ proteoglycans เพื่อทำหน้าที่เสริมความแข็งแรงและความยืดหยุ่นให้กับบาดแผล และเมื่อรอยแผลเป็นจากบาดแผล (scar) เจริญเต็มที่แล้ว ปริมาณของสาร proteoglycans ซึ่งเดิมเคยทำหน้าที่สะสมน้ำให้กับบริเวณบาดแผล จะมีปริมาณลดน้อยลง ส่งผลให้น้ำบริเวณบาดแผลแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆ โดยรอบ ในขณะที่เดียวกันก็มีการเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจนชนิดที่ 3 (collagen type III) เป็นคอลลาเจนชนิดที่ 1 (collagen type I) และมีการจัดเรียงตัวใหม่ (rearrangement) ของคอลลาเจนจากเดิมที่เป็นเส้นใยขนาดเล็กและการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ กลายเป็นคอลลาเจนที่มีเส้นใยขนาดใหญ่ขึ้น มีการรวมกันของเส้นใยคอลลาเจนเป็นมัด (fascicles) และมีการเรียงตัวของมัดเส้นใยคอลลาเจนที่เป็นระเบียบขนานกับแนวของผิวหนังมากขึ้น เมื่อมีคอลลาเจนกลุ่มใหม่แทนที่ คอลลาเจนกลุ่มเดิมจึงถูกย่อยสลายออกไปโดยเอนไซม์ collagenases และเอนไซม์ proteases ที่สร้างจาก fibroblasts macrophages keratinocytes และ inflammatory cells

โดยทั่วไปเมื่อมีบาดแผลที่ผิวหนัง ลักษณะของบาดแผลที่เกิดขึ้นสามารถแบ่งประเภทโดยอาศัยระยะเวลาที่ใช้ในการสมานแผลได้เป็น 2 ประเภท คือ บาดแผลชนิดเฉียบพลัน (acute wounds) เป็นบาดแผลที่สามารถเกิดการสมานแผลได้ปกติตามกระบวนการสมานแผลดังกล่าวข้างต้น ซึ่งรวมระยะเวลาแล้วไม่เกิน 45 วัน เช่น traumatic wounds, surgical wounds, gunshot wounds, radiation-damaged wounds, burns เป็นต้น อีกประเภทหนึ่ง คือ แผลเรื้อรัง

(chronic wounds) เป็นแผลที่ใช้เวลานานในการสมานแผล โดยทั่วไปถ้าแผลใดๆ ไม่สามารถเกิดการสมานแผลได้ภายใน 2 เดือน ก็จะต้องถือว่าเป็นแผลเรื้อรัง เช่น pressure ulcers, venous ulcers, diabetic (neuropathic) ulcers, ischemic (arterial) ulcers เป็นต้น นอกจากนี้แผลเรื้อรังยังหมายรวมถึงแผลที่มีการอักเสบเป็นเวลานาน แผลที่มีการติดเชื้อ แผลที่มีความไม่สมดุลระหว่าง proteinases และ inhibitors ด้วย (Rovee and Maibach, 2004)

การเกิดการสมานแผลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทหลักๆ คือ primary intention เป็นการสมานแผลที่เกิดในแผลที่ได้รับการเย็บปิดแผล หรือปิดด้วย flap หรือ graft หลังจากเกิดแผลได้ไม่นาน ใช้ในกรณีที่แผลนั้นสะอาด หรือมีการปนเปื้อนไม่มาก และอีกประเภทคือ secondary intention หรือ spontaneous intention เป็นการหายของแผลที่แผลเปิดนั้นสามารถหายเองได้โดยกลไก contraction เป็นหลัก (พงศธร สงวนเชื้อ 2544)

### 2.3 เอสโตรเจน (estrogens)

เป็นชื่อกลุ่มของสารประกอบที่สามารถกระตุ้นการเติบโต และคงลักษณะทางเพศของเพศหญิง ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภทโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและสมบัติโดยทั่วไปดังนี้

1. เอสโตรเจนตามธรรมชาติ (natural estrogens) สารกลุ่มนี้ที่มีความสำคัญในคนมี 3 ชนิด คือ เอสตราไดโอดอล (estradiol) เอสโตรน (estrone) และ เอสทริโอดอล (estriol) นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนที่ได้จากสัตว์พวกอู่อื่น เอสโตรเจน (equine estrogens) เช่น อีควิลิน (equilin) อีควิเลนิน (equilenin) และ ฮิปพูลิน (hippulin) และเมทาบอลไลท์ (metabolite) บางชนิดของ equine estrogens
2. เอสโตรเจนพวกสเตียรอยด์สังเคราะห์ (synthetic steroidal estrogens) สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่ได้แก่พวกที่เป็นเอสเทอร์ (ester) และอนุพันธ์ของ 17 แอลฟาเอธินีน (17 $\alpha$ -ethinyl derivative) ของเอสโตรเจนตามธรรมชาติ
3. เอสโตรเจนพวกที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (nonsteroidal estrogens) เช่น ไดเอทิลสทิลเบสทรอล (diethylstilbestrol) และไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) นอกจากนี้ยังมียาที่ใช้ในการรักษาโรคอื่นๆ ซึ่งเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมจะมีกัมมันตภาพเอสโตรเจนิก (estrogenic activity) ได้บ้าง เช่น สารพวกคาร์ดิโอกไลโคไซด์ (cardiac glycosides)

#### 2.3.1 ซิวสังเคราะห์และลักษณะทางเคมีของเอสโตรเจน

การสังเคราะห์เอสโตรเจนต้องใช้คอเลสเตอรอล (cholesterol) เป็นสารตั้งต้น โดยเซลล์แกรนูโลซา (granulosa cell) และเซลล์ของธีกาอินเทอร์นา (theca interna) ของฟอลลิเคิล

(ovarian follicle) จะเป็นแหล่งสำคัญของรังไข่ที่มีการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน เซลล์เหล่านี้สามารถสังเคราะห์ cholesterol ได้เองโดยอาศัยอะซีเตท (acetate) เป็นสารตั้งต้นหรือรับเอา cholesterol จากไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein, LDL) cholesterol บางส่วนที่เซลล์ยังไม่ได้ใช้จะถูกนำไปสะสมไว้ในแกรนูลไขมัน (lipid granules) ในรูปคอเลสเตอรอลเอสเทอร์ (cholesterol ester) เมื่อ granulosa cell ได้รับการกระตุ้นจากฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (follicle-stimulating hormone, FSH) ซึ่งเป็นโกนาโดโทรปินที่หลั่งจากต่อมใต้สมอง FSH จะจับกับตัวรับ (receptor) บนเซลล์นี้ ผลของการจับกันทำให้มีการสร้างอะดีโนซีน 3', 5'-โมโนฟอสเฟต (adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP) จากนั้น cAMP จะออกฤทธิ์ทำให้เกิดการแตกออกของโซ่ข้าง (side chain) ของ cholesterol ทำให้ได้เป็นเพรกนีโนโลน (pregnenolone) เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นที่บริเวณไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของ granulosa cell จากนั้น pregnenolone จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นโปรเจสเตอโรน (progesterone) progesterone จะถูกส่งไปยัง theca interna เพื่อเปลี่ยนเป็นแอนโดรสทีนไดโอน (androstenedione) และเทสโทสเตอโรน (testosterone) เอสโตรเจนถูกสร้างขึ้นได้จากสารตั้งต้น 2 ตัว คือ androstenedione หรือ testosterone โดยอาศัยปฏิกิริยาที่สำคัญคือ การแอโรมาไทเซชัน (aromatization) ของวงแหวนเอ (ring A) ของสารตั้งต้นดังกล่าว ขั้นตอนแรกของกระบวนการนี้ คือ มีการไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) ของกลุ่มเมทิล (methyl group) ที่อยู่ตรงคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 19 ทำให้ได้กลุ่มไฮดรอกซีเมทิล (hydroxymethyl group) เกาะอยู่ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 10 ต่อจากนั้น hydroxymethyl group จะหลุดออกจากนิวเคลียส และ ring A จะถูกแอโรมาไทซ์ทำให้ได้ฟีโนลิกไฮดรอกซิลที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 3 ในบรรดาเอสโตรเจนหลักทั้ง 3 ชนิด 17-เบตาเอสตราไดออล (17 $\beta$ -estradiol) มีฤทธิ์แรงที่สุดและเป็นสารคัดหลั่งส่วนใหญ่ของรังไข่ estradiol จะถูกออกซิไดซ์ (oxidized) เป็น estrone โดยที่ estradiol และ estrone สามารถเปลี่ยนกลับไปมาได้ ดังแสดงในรูปที่ 1-5 ส่วน estrone จะถูกไฮดรอกซิเลต (hydroxylate) ต่อไปเป็น estriol ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นที่ตับเป็นส่วนใหญ่ นอกจากรังไข่แล้วอวัยวะอื่นๆ ได้แก่ รก ต่อมหมวกไต ตับ เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อลาย และ hair follicles ก็สามารถสร้างเอสโตรเจนในปริมาณที่มีนัยสำคัญได้เช่นกัน เอสโตรเจนที่สร้างขึ้นจากเนื้อเยื่อเหล่านี้ส่วนใหญ่เป็น estrone ซึ่งอาศัย androstenedione และ testosterone เป็นสารตั้งต้น เอสโตรเจนที่สร้างขึ้นจากปฏิกิริยานี้จะเป็นแหล่งสำคัญของเอสโตรเจนในผู้ชายและผู้หญิงวัยหลังหมดระดู (postmenopause) นอกจากเอสโตรเจนตามธรรมชาติในร่างกายแล้ว ยังมีสารกลุ่มสเตียรอยด์สังเคราะห์และสารที่ไม่ใช่สเตียรอยด์อีกหลายชนิดที่มี estrogenic activity โดยในบรรดาเอสโตรเจนที่ไม่ใช่สเตียรอยด์พบว่า diethylstilbestrol มีฤทธิ์แรงที่สุด นอกจากนี้สารที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ที่มี estrogenic activity บางชนิดอาจพบได้ในพืชหลายชนิดเรียกว่า phytoestrogens เช่น เจนิสทีน (genistein) คูเมสโตรล (coumestrol) และ เดดซีน (daidzein) ซึ่งปัจจุบันยังไม่ปรากฏว่าสารเหล่านี้มีอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์

จึงสามารถใช้ในการรักษาแบบทดแทน (replacement therapy) สำหรับการรักษาอาการของผู้หญิงวัยหมดระดู (menopause) ในบางกรณีสารพวกเอสโตรเจนเหล่านี้ร่วมกับสารที่มีฤทธิ์เหมือน progesterone อาจถูกนำมาใช้ในการควบคุมวัฏจักรระดู (menstrual cycle) และควบคุมภาวะเจริญพันธุ์ (fertility)

### 2.3.2 ฤทธิ์ทางสรีระวิทยาและเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ที่สำคัญของเอสโตรเจนจะอยู่ที่อวัยวะต่างๆ ในระบบสืบพันธุ์ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดดังนี้

1. รังไข่ (ovaries) เอสโตรเจนมีฤทธิ์ควบคุมการเจริญของฟอลลิเคิลโดยออกฤทธิ์ร่วมกับฮอร์โมนโกนาโดโทรฟินส์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการขยายขนาดของ granulosa cell และ theca interna cell
2. ท่อนำไข่ (fallopian tubes, oviduct) เอสโตรเจนมีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของเซลล์ซีครีทอรี (secretory cells) และเซลล์ที่มีซีเลีย (cilia) ที่อยู่บนเยื่อผนังของท่อนำไข่
3. มดลูก (uterus) เอสโตรเจนมีผลทำให้เยื่อบุมดลูกหนาขึ้น โดยการทำให้จำนวนและความสูงของเซลล์ในเยื่อบุมดลูกเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันยังทำให้จำนวนต่อมในเยื่อบุมดลูกเพิ่มและต่อมยาวขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้นการสร้างเส้นเลือดที่ขดเป็นวง (coil or spiral arteries) ให้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วสำหรับกล้ามเนื้อมดลูกพบว่าเอสโตรเจนมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนที่ใช้ในการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกคือ แอกติน (actin) และไมโอซิน (myosin) เพิ่มขึ้น ทั้งยังทำให้เพิ่มความไวในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งออกซีโทซิน (oxytocin) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่กระตุ้นการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูกในขณะคลอด
4. ช่องคลอด (vagina) เอสโตรเจนมีผลทำให้เยื่อช่องคลอดหนาขึ้น เกิดกระบวนการคอร์นิฟิเคชัน (cornification) ของเซลล์บุผิวชั้นนอก มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์ในชั้นล่างสุด รวมทั้งการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในชั้นกลางและชั้นนอกสุดของเยื่อ นอกจากนี้เอสโตรเจนยังทำให้มีการสะสมไกลโคเจนในชั้นเยื่อบุดังกล่าวด้วย
5. อวัยวะเพศภายนอก (external genitalia) เอสโตรเจนกระตุ้นการเติบโตของเลเบีย (labia) และคลิทอริส (clitoris) นอกจากนี้ยังกระตุ้นการเจริญและการทำหน้าที่ของต่อมบาร์โธลิน (bartholin's gland) ซึ่งน้ำคั่งหลังของต่อมนี้จะช่วยหล่อลื่นช่องคลอดขณะร่วมเพศ
6. ต่อมน้ำนม (mammary gland) เอสโตรเจนเพียงตัวเดียวสามารถกระตุ้นการเจริญของระบบท่อ (tubular duct system) แต่เมื่อมี progesterone อยู่ด้วย

เอสโตรเจนจะเพิ่มส่วนของโลบูลโลแอลวีโอลา (lobuloalveolar) ของต่อมน้ำนม แต่การพัฒนาแอลวีโอลาต้องอาศัยฮอร์โมนโปรแลกทิน (prolactin) จากต่อมใต้สมองร่วมด้วย การเจริญและการสะสมเม็ดสี (pigmentation) ของหัวนม (nipple) และลานหัวนม (areolar) ก็เป็นผลมาจากฤทธิ์ของ เอสโตรเจน

7. ผลอื่นๆ เอสโตรเจนมีผลทำให้มีรูปร่างลักษณะของเพศหญิง เช่น มีผิวอ่อนนุ่ม มีการสะสมไขมันใต้ผิวหนัง มีขนบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์และขนใต้รักแร้ งอกยาวขึ้น มีผลกระตุ้นให้ตับสร้างโกลบูลินส์ (globulins) ซึ่งเป็นโปรตีน สำหรับขนส่งฮอร์โมนไปยังอวัยวะเป้าหมาย นอกจากนี้เอสโตรเจนยังมีผล เปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดโดยทำให้ความเข้มข้นของไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เพิ่มขึ้นแต่ความเข้มข้นของ cholesterol ลดลง ส่วนผลต่อ ความเข้มข้นของไลโปโปรตีน (lipoprotein) ในเลือดพบว่าทำให้ไลโปโปรตีน ความหนาแน่นต่ำ (low density lipoprotein, LDL) ลดลงและทำให้ไลโปโปรตีน ความหนาแน่นสูง (high density lipoprotein, HDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งผลดังกล่าว สามารถลดความเสี่ยงของการเกิดโรคของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงหัวใจได้ และอาจมีส่วนลดอุบัติการณ์การเกิดกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) ในผู้หญิงวัยก่อนหมดระดู (premenopausal women) นอกจากนี้เอสโตรเจนยังเพิ่มความเสี่ยงในการชักนำให้เกิดมะเร็งของ อวัยวะต่างๆ เช่น มดลูก อัณฑะ กระดุก ไต และเต้านม เป็นต้น การออกฤทธิ์ ของเอสโตรเจนต่ออวัยวะดังกล่าวจะคล้ายกับสเตียรอยด์ฮอร์โมนอื่นๆ โดย การซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายและเข้าจับกับตัวรับที่จำเพาะ ในไซโตพลาสซึม จากนั้นสารเชิงซ้อนของเอสโตรเจนและตัวรับนี้จะเกิด การแปรสภาพก่อนจะเคลื่อนย้ายเข้าสู่นิวเคลียสและจะทำให้เกิดการ สังเคราะห์ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอและเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA and messenger RNA, rRNA and mRNA) จากนั้น mRNA จะ เคลื่อนย้ายออกสู่ไซโตพลาสซึม และทำให้เกิดการสังเคราะห์โปรตีนชนิดใหม่ ซึ่งทำให้การทำงานของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป

การรายงานเพิ่มเติมเกี่ยวกับเอสโตรเจนพบว่า การเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน มีผลต่อความหนาของชั้นผิวหนัง (Gruber et al., 1995) นอกจากนี้ Brincat และคณะ (Brincat et al., 1987) และ Castelo-Branco และคณะ (Castelo-Branco et al., 1992) พบว่าใน หญิงวัยหมดประจำเดือนจะมีผิวหนังบางลงโดยมีความหนาของชั้นคอลลาเจนน้อยลง Ashcroft และคณะ (Ashcroft et al., 1999) พบว่าถ้าให้เอสโตรเจนเฉพาะที่ (topical application) จะช่วย เพิ่มความหนาของผิวหนังและเพิ่มปริมาณของคอลลาเจนได้

นับตั้งแต่ปี 1962 มีการศึกษาในสัตว์ทดลองหลายชนิดพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อการสมานแผลของผิวหนัง (cutaneous wound healing) และกระบวนการสมานแผลจะช้าลงถ้าขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน (Ashcroft *et al.*, 1999; Calvin *et al.*, 1998; Jorgensen and Schmidt, 1962; Pallin *et al.*, 1975) นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าคนหรือสัตว์ทดลองได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (exogenous estrogens replacement) จะทำให้การสมานแผลเร็วขึ้น (Ashcroft *et al.*, 1999; Pirila *et al.*, 2001; Pirila *et al.*, 2002) จากการวิจัยในสตรีวัยหมดประจำเดือนพบว่าทำให้ฮอร์โมนทดแทน (HRT = hormone replacement therapy) จะช่วยป้องกันการเกิดแผลเรื้อรังได้ นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยอีกมากที่พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนช่วยส่งเสริมกระบวนการสมานแผลโดยมีผลให้มี matrix deposition เพิ่มขึ้น กระบวนการ epithelialization เร็วขึ้นและช่วยลดการอักเสบได้ด้วย (Ashcroft *et al.*, 1997; Ashcroft *et al.*, 1999; Calvin *et al.*, 1998; Jorgensen and Schmidt, 1962; Pallin *et al.*, 1975; Pirila *et al.*, 2001; Pirila *et al.*, 2002)

จากการทดลองในหนูขาว (Wistar rats) อายุ 4 เดือนพบว่าภายหลังจากเอารังไข่ออก (ovariectomy) ทำให้การสมานแผลช้าลง แสดงว่าการหายช้าของแผลดังกล่าวเกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน (Calvin *et al.*, 1998) และเมื่อให้เอสโตรเจนทดแทนในหนูที่มีบาดแผล (acute incisional wound) พบว่าการหายของแผลดีขึ้นแสดงว่าเอสโตรเจนมีผลต่อทั้งอัตราการหายและคุณภาพของแผลโดยตรง (Ashcroft *et al.*, 1997)

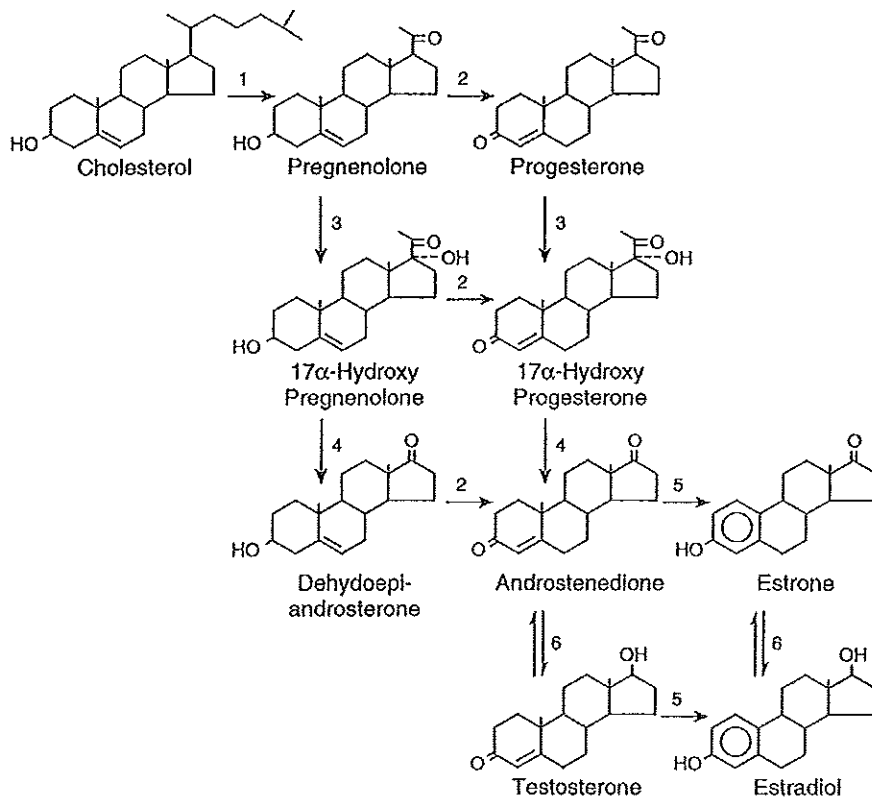
Pirila และคณะ (Pirila *et al.*, 2002) พบว่าในกระบวนการสมานแผล ขั้นตอนที่เรียกว่า remodelling of the extracellular matrix เกี่ยวข้องกับเอนไซม์ที่ชื่อว่า matrix metalloproteinases (MMPs) ใน basement membrane zone components โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ที่เรียกว่า laminin-5 จากการศึกษาด้วยวิธี western blotting พบว่าเมื่อให้ MMPs inhibitors ที่ชื่อว่า CMT-8 ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ออก (ovariectomy = ovx) พบว่าในกลุ่ม ovx มี laminin 5  $\gamma$ 2-chain expression ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham และ กลุ่ม CMT-8 หรือ estrogen-treated ovx rats

จากการศึกษาของ Ashcroft และคณะ (Ashcroft *et al.*, 2003) พบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลยับยั้งการอักเสบโดยไปมีผลลด macrophage migration inhibitory factor (MIF) factor นี้ถูกสร้างมาจากเซลล์หลายชนิดรวมทั้ง monocytes, endothelial cells, keratinocytes และ anterior pituitary cells

Kanda และ Watanabe (Kanda and Watanabe, 2004) พบว่าเอสโตรเจนมีผลทำให้ keratinocytes มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบบไมโทซิสรวมทั้งการเพิ่มการสร้าง neuron growth factor (NGF) ทำให้มีเส้นประสาทมาเลี้ยงผิวหนังมากขึ้น นอกจากนี้ยังกระตุ้น monocytes และ macrophages ให้สร้าง Platelet derived growth factor-A (PDGF-A)

factor นี้มีผลให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบบไมโทซิสของ fibroblasts ซึ่งจะส่งผลเพิ่มการสร้าง extracellular matrix ทำให้แผลมีการหดตัวเล็กลงได้เร็วและมีความแข็งแรงมากขึ้นด้วย

Losordo และ Isner (Losordo and Isner, 2001) รายงานเพิ่มเติมว่า เอสโตรเจน ส่งผลทำให้มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแบบไมโทซิส ทำให้มีการเคลื่อนที่ (migration) ทำให้มีการจัดเรียงตัวใหม่และทำให้มีการเชื่อมต่อกันของ endothelial cell เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในที่สุดจะทำให้มีการสร้างเส้นเลือดเส้นใหม่ที่มีจำนวนและคุณภาพมากขึ้น โดยเอสโตรเจนจะส่งผลต่อโครงสร้างดังกล่าวข้างต้นผ่านทาง ERs

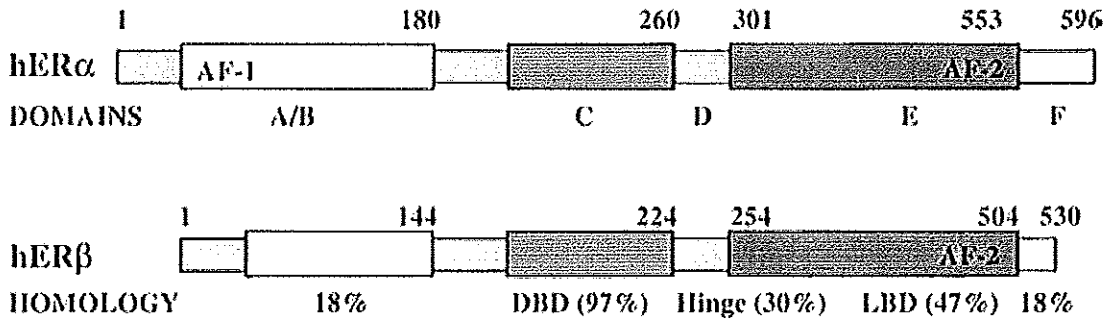


รูปที่ 1-5 แสดงชีวสังเคราะห์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน โดย 1=cholesterol side-chain cleavage enzyme complex, 2=3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, 3=17 $\alpha$ -hydroxylase, 4=17,20-lyase, 5=aromatase, 6=17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase (Griffin and Ojeda, 2000)

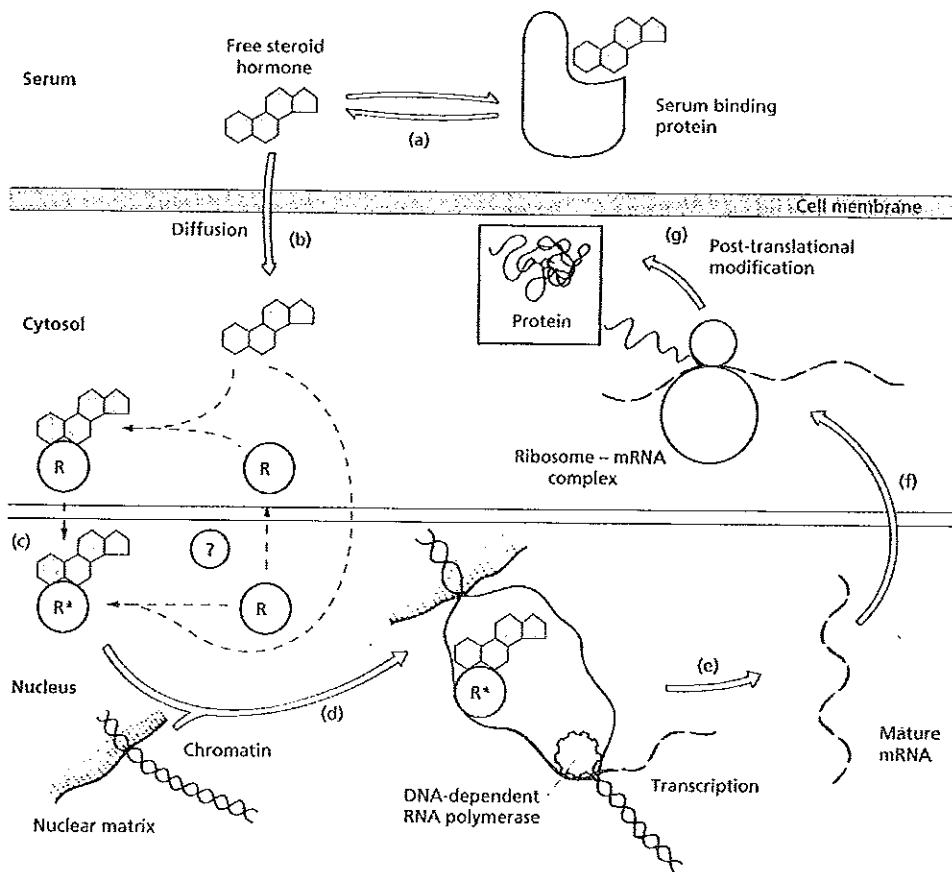
## 2.4 ตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors, ERs)

เป็นสารชีวโมเลกุลชนิดโปรตีนที่อยู่ทั้งในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียสของเซลล์ จะถูกกระตุ้นการทำงานโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน มีขนาดโมเลกุล 26 กิโลดาลตัน มีหน้าที่หลักเป็น transcription factor ควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) ERs สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทโดยอาศัยลักษณะโครงสร้างและยีนที่ควบคุมการแสดงออกที่แตกต่างกัน คือ ตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟา (estrogen receptor alpha : ER $\alpha$ ) ถูกควบคุมการแสดงออกด้วยยีน ESR1 บนโครโมโซมคู่ที่ 6 พบมากในเซลล์ของเยื่อบุภายในโพรงมดลูก (endometrium) รังไข่ (ovarian stroma) ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) เป็นต้น และตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้า (estrogen receptor beta : ER $\beta$ ) ซึ่งควบคุมการแสดงออกด้วยยีน ESR2 บนโครโมโซมคู่ที่ 14 พบมากในเซลล์ของไต (kidney) สมอง (brain) กระดูก (bone) หัวใจ (heart) เป็นต้น ERs ทั้ง 2 ประเภทมีโครงสร้างเป็นลำดับกรดอะมิโนที่เรียกว่า domain ERs แต่ละประเภทประกอบด้วย domains ทั้งหมด 7 domains โดย domains ที่สำคัญ คือ DNA-binding domain (DBD) เป็น domain ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะสามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอได้ และ ligand-binding domain (LBD) เป็น domain ที่มีลำดับกรดอะมิโนจำเพาะที่ฮอร์โมน (ligand) จะเข้าจับดังแสดงในรูปที่ 1-6 / ฮอร์โมนเอสโตรเจนจัดเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนจึงสามารถเคลื่อนผ่านชั้น phospholipid bilayers ของเยื่อหุ้มเซลล์ได้และเข้าจับกับ ERs รวมกันเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า dimers โดยอาจจะเป็น dimers แบบ ER $\alpha$  ( $\alpha\alpha$ ) หรือ ER $\beta$  ( $\beta\beta$ ) หรือ ER $\alpha\beta$  ( $\alpha\beta$ ) เพื่อกระตุ้นการทำงานของตัวรับเอสโตรเจน จากนั้น dimers จะเข้าจับกับดีเอ็นเอตรงบริเวณที่มีลำดับเบสจำเพาะซึ่งเรียกบริเวณนี้ว่า hormone response elements โครงสร้างเชิงซ้อนของ dimers และดีเอ็นเอนี้จะเรียกว่า DNA-receptor complex ซึ่งโครงสร้างนี้จะกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัส (transcription) ของดีเอ็นเอกลายเป็น mRNA (messenger ribonucleic acid) จากนั้นจะเกิดการแปลรหัส (translation) จาก mRNA เป็นโปรตีนซึ่งจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงเชิงหน้าที่ของเซลล์นั้นต่อไปดังแสดงในรูปที่ 1-7





รูปที่ 1-6 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  (Kong *et al.*, 2003)



รูปที่ 1-7 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของ ERs (Brook and Marshall, 2001)

## 2.5 มะพร้าว (coconut)

มะพร้าวหรือชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) เป็นพืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่จัดอยู่ในอันดับ (Order) Palmales วงศ์ (Family) Palmae หรือ Arecaceae (palm) เผ่า (Tribe) Cocoideae สกุล (Genus) *Cocos* คำระบุชนิด (specific epithet) *nucifera* ลักษณะโดยทั่วไปมีลำต้นตรง รูปทรงกระบอกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-30 เซนติเมตร สูงประมาณ 20-25 เมตรแล้วแต่สายพันธุ์ ระบบรากเหมือนกับพืชใบเลี้ยงเดี่ยว คือ ไม่มีรากแก้ว แต่มีระบบรากฝอย (fibrous root system) กระจายรอบๆ ลำต้นประมาณ 2,000-3,000 เส้น ยาวประมาณ 6-10 เมตร ทำหน้าที่ดูดและลำเลียงน้ำ ธาตุอาหาร และยึดลำต้นไม่ให้ล้ม มีใบประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ก้านทาง (rachis หรือ leaf stalk หรือ petiole) ยาวประมาณ 4-7 เมตร และใบย่อยซึ่งอยู่ 2 ข้างของก้านทางเรียงเป็นแผงจำนวน 200-250 ใบย่อย ใบย่อยยาว 50-100 เซนติเมตรขึ้นไป กว้าง 2.5 เซนติเมตร มีเส้นกลางใบขนานตามความยาวของใบ มีช่อดอกที่มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียอยู่ในช่อเดียวกัน แต่จะอยู่คนละดอกกัน เป็นช่อดอกแบบช่อแยกแขนงหรือแพนนิเคิล (panicle) ยาวประมาณ 75-100 เซนติเมตร ประกอบด้วยแกนกลางหรือก้านช่อดอก (rachis) ลักษณะเป็นแท่งยาวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 เซนติเมตร ช่อดอกหนึ่ง ๆ มีดอกตัวผู้จำนวน 200-300 ดอกและดอกตัวเมียจำนวน 10-20 ดอก ส่วนผลมะพร้าวมีเปลือก 3 ชั้น ภายในมีเมล็ดเรียกว่า ซีด (seed) หรือเนื้อมะพร้าว หรือเนื้อในเมล็ด (kernel) และน้ำมะพร้าว (coconut water) หรือลิควิด เอ็นโดสเปิร์ม (liquid endosperm) โดยปกติมะพร้าวสามารถให้ผลได้เมื่ออายุประมาณ 3 ปี ให้ผลโดยเฉลี่ย 10 ผลต่อทะลาย มะพร้าวมีแหล่งกำเนิดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ตั้งแต่แหลมมลายูหรือแถบมาเลเนเซีย (Malenesia) ถึงปาปัวนิวกินี ปัจจุบันพบกระจายในประเทศริมฝั่งทะเลในแถบเอเชีย และตามหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก ในประเทศไทยมีมะพร้าวสายพันธุ์ที่น่าสนใจ เช่น สปีคาคา ไทปิกา นานา มะพร้าวลูกผสม เป็นต้น โดยจะกล่าวเฉพาะสายพันธุ์นานาเท่านั้น สายพันธุ์นานา มักเรียกมะพร้าวในกลุ่มมะพร้าวเตี้ย (dwarf type) หรือมะพร้าวเบาหรือมะพร้าวหมูสี มะพร้าวกลุ่มนี้เมื่อโตเต็มที่แล้วลำต้นมีขนาดเล็ก และสูงได้ไม่เท่ามะพร้าวสูง มะพร้าวสายพันธุ์นี้ยังมีสายพันธุ์ย่อยๆ ได้แก่ มะพร้าวหมูสีเหลือง มะพร้าวหมูสีส้ม มะพร้าวหมูสีเขียว เป็นต้น โดยมะพร้าวหมูสีเขียวมีสายพันธุ์ที่น่าสนใจ คือ มะพร้าวน้ำหอม (aromatic coconut) เป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะพิเศษคือน้ำมีกลิ่นหอมคล้ายใบเตยและรสหวาน ผลขนาดเล็ก สีเขียวทรงกลมรีเล็กน้อย น้ำหนักทั้งผลเฉลี่ย 900 กรัมต่อผล ขนาดของรอบโคนต้นเหนือจากพื้นดิน 1 เมตร สูงประมาณ 71 เซนติเมตร อายุเริ่มออกช่อดอกประมาณ 3-4 ปี มีต้นกำเนิดที่อำเภอนครศรีธรรมราช จังหวัดนครศรีธรรมราช ปัจจุบันพบมีการเพาะปลูกกระจายทั่วประเทศและเป็นพืชเศรษฐกิจของชายฝั่งทะเลภาคใต้ และมีการนำส่วนต่างๆ ของมะพร้าวมาใช้ประโยชน์มากมาย โดยเฉพาะน้ำมะพร้าวอ่อนมักนิยมทำเป็นเครื่องดื่มทั้งนี้เพราะน้ำมะพร้าวอ่อนมีคุณค่าทางสารอาหารสูงมีทั้งวิตามิน ได้แก่ วิตามิน บี3 (niacin), วิตามิน บี7 (biotin), วิตามิน บี2 (riboflavin), กรดโฟลิก (folic acid), วิตามิน บี1

(thiamin), วิตามิน บี6 (pyridoxine) และเกลือแร่ที่เป็นส่วนประกอบสำคัญ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม เหล็ก ทองแดง ฟอสฟอรัส จนเป็นที่รู้จักกันดีในนาม น้ำเกลือแร่จากธรรมชาติ ซึ่งปัจจุบันทางองค์การอาหารและเกษตรแห่งชาติ (FAO) ได้ส่งเสริมให้มีการพัฒนาน้ำมะพร้าวอ่อนเป็นเครื่องดื่มสำหรับนักกีฬา (sport drinks) เนื่องจากมีปริมาณเกลือแร่สูง นอกจากนี้ น้ำมะพร้าวอ่อนยังพบมี ascorbic acid ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย

ในทางการแพทย์โดยเฉพาะการแพทย์แผนไทยจะใช้น้ำมะพร้าวอ่อนในการรักษาผู้ป่วยที่อาเจียนท้องร่วง ผู้ป่วยอหิวาตกโรค ผู้ป่วยที่มีภาวะความเป็นกรดในเลือดสูง ผู้ป่วยโรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ และช่วยขับปัสสาวะในผู้ป่วยโรคหัวใจ รวมทั้งรักษาผู้ป่วยโรคตับและโรคไตด้วย สำหรับสตรีหลังคลอดบุตรนั้นมีรายงานการใช้ น้ำมะพร้าวอ่อนเพื่อเสริมน้ำนม เพราะมีความบริสุทธิ์สูงไม่มีสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อร่างกายเจือปนอยู่

จากการค้นจากฐานข้อมูล Napalert พบสารที่เป็นองค์ประกอบใน coconut milk ที่มีผู้ศึกษาแล้วได้แก่ สารกลุ่ม alkaloid ชื่อ 2-(3-methyl-but-2-enyl-purin-6-one (Letham, 1982) และ Zeatin riboside (Trans:14-O-[3-O-[3-O- $\beta$ -D-Galactopyranosyl(1-2)- $\alpha$ -D-Galactopyranosyl(1-3)- $\alpha$ -L-arabinofuranosyl]-4-O-( $\alpha$ -L-arabinoguranosyl)- $\beta$ -D-Galactopyranosyl] (Kobayashi *et al.*, 1997) พบสารในกลุ่ม phytosterol ชื่อ  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, stigmastatrienol, fucosterol,  $\alpha$ -spinasterol (โครงการศึกษาวิจัยสมุนไพร 2524) นอกจากนี้ยังพบสารในกลุ่ม carbohydrate เช่น sucrose, glucose และ fructose เป็นองค์ประกอบด้วย (Khoi *et al.*, 1984)

แม้ยังไม่มีการวิเคราะห์ฮอร์โมนในน้ำมะพร้าวอ่อน แต่จากงานวิจัยของ ดร.บุษกร (Punghmatharith, 1988) ด้วยวิธี radioimmunoassay พบว่าในสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อน มีสารซึ่งมีคุณสมบัติทาง immunology สามารถจับกับแอนติบอดี estrone-3-glucoronide (280 pg/mL) รองลงมาเป็นสารซึ่งสามารถจับกับแอนติบอดี pregnanediol-3 $\alpha$ -glucoronide (263 pg/mL) progesterone (27 pg/mL) 17 $\beta$ -estradiol (2.45 pg/mL) testosterone (1.58 pg/mL) และ estrone (0.75 pg/mL) และจากการศึกษาด้วยวิธี thin-layer chromatography พบว่าน้ำมะพร้าวอ่อน มีสาร estrone, 17 $\beta$ -estradiol และ  $\beta$ -sitosterol แต่ไม่พบ progesterone นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อฉีดสารสกัดจากน้ำมะพร้าวอ่อนในปริมาณที่เทียบเท่ากับน้ำมะพร้าวอ่อน 7,500 mL/kgBW/day ติดต่อกันเป็นเวลา 3 วัน ทำให้น้ำหนักมดลูกของหนูขาว (rats) อายุ 23 วัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากงานวิจัยของ ดร.นิซาอุดดี (Radenahmad *et al.*, 2006) ที่มีการผ่าตัดบริเวณสืบพันธุ์ทั้งสองข้างของหนูขาวเพื่อตัดรังไข่ออกพบว่ากลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับน้ำมะพร้าวอ่อนทุกวันในปริมาณ 100 mL/kgBW มีการสมานแผลเร็วกว่ากลุ่มอื่นๆ รวมทั้งกลุ่มที่หนูถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับฮอร์โมน E2 ทุกวัน นอกจากนี้ยังพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมะพร้าวอ่อนมีผิวหนังนวลกว่า ขนนุ่มกว่าและไม่มีแผลเป็น (scar)

จากการตรวจเลือดหนูขาวดังกล่าวด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA) และ Chemiluminescent (CIA) พบว่าปริมาณน้ำมะพร้าวอ่อนที่ให้หนู 100 mL/kgBW มีค่า E2 serum เท่ากับในกลุ่มหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้างและได้รับ estradiol benzoate 2.5 µg/kgBW ทุกวัน จากหลักฐานดังกล่าวข้างต้นแสดงว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนมีฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen like hormone) โดยฮอร์โมนดังกล่าวพบในพืชจึงเรียกว่าไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens)

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงว่ามีพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการสมานแผล และ phytoestrogens ดังกล่าวเป็นชนิดฟลาโวนอยด์ (flavonoid) (Fu *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2002; Okoli *et al.*, 2007; Uydes-Dogan *et al.*, 2005)

### 3. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อนต่อการสมานแผลในหนูขาวเพศเมียในระดับจุลพยาธิวิทยา (histopathology)
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors, ERs) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry)
3. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรากขน (hair follicles)
4. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาน้ำมะพร้าวอ่อนให้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร (natural or functional food) หรือยา หรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

## บทที่ 2

### วิธีการวิจัย

#### 1. สารเคมี

##### 1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

- 1.1.1 pentobarbital sodium salt (Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)
- 1.1.2 distilled water
- 1.1.3 disinfectant
- 1.1.4 normal saline
- 1.1.5 young coconut juice (YCJ)
- 1.1.6  $\beta$ -estradiol 3-benzoate (EB, Sigma- Aldrich, St. Louis, MO)
- 1.1.7 olive oil
- 1.1.8 deionized water
- 1.1.9 20% buffered formalin
- 1.1.10 4% paraformaldehyde
- 1.1.11 0.1 M PBS pH 7.2

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

- 1.2.1 50%, 70%, 80%, 95% และ 100% alcohol
- 1.2.2 xylene
- 1.2.3 melted paraplant
- 1.2.4 gelatin
- 1.2.5 Mayer's hematoxylin
- 1.2.6 working eosin
- 1.2.7 0.1 M TBS pH 7.2
- 1.2.8 hydrogen peroxide
- 1.2.9 methanol
- 1.2.10 Triton-X100

- 1.2.11 Mouse anti-estrogen receptor ( $ER\alpha$ , amino acid 120-170) monoclonal antibody (MAB447, Chemicon international, Temecula, CA)
- 1.2.12 Rabbit anti-estrogen receptor beta ( $ER\beta$ , MYEB) polyclonal antibody (AB1410, Chemicon international, Temecula, CA)
- 1.2.13 Vectastain ABC kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- 1.2.14 DAB substrate kit (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
- 1.2.15 Permount

1.3 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการย้อมสีเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้ลำแสงอิเล็กตรอน (transmission electron microscope (TEM))

- 1.3.1 0.1 M PBS pH 7.2
- 1.3.2 Osmium tetroxide ( $OsO_4$ )
- 1.3.3 Uranyl acetate
- 1.3.4 70%, 95% และ 100% alcohol
- 1.3.5 Propylene oxide
- 1.3.6 Embedding mixture
- 1.3.7 Toluine blue
- 1.3.8 Permount
- 1.3.9 Lead citrate
- 1.3.10 Sodium hydroxide

## 2. วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์

### 2.1 วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

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

### 2.2 วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการย้อมสีเพื่อศึกษาด้วย LM

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

## 2.3 วัสดุ เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ และการย้อมสีเพื่อศึกษาด้วย TEM

- 2.3.1 ขวดเตรียมตัวอย่าง (processing bottle)
- 2.3.2 จานรองและปากคีบตัวอย่างชิ้นเนื้อ (petri dish and forcep)
- 2.3.3 ตู้ดูดควัน (fume hood)
- 2.3.4 เครื่องเขย่า (orbital shaker)
- 2.3.5 แท่นให้ความร้อน (hot plate)
- 2.3.6 แท่นคนสารแม่เหล็ก และแท่งแม่เหล็ก (magnetic stirrer, magnetic bar)
- 2.3.7 ตู้อบ (oven)
- 2.3.8 เครื่องตัดบางพิเศษ (Ultramicrotome)
- 2.3.9 เครื่องตัดมีดแก้ว (glass knife breaker)
- 2.3.10 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope (LM))
- 2.3.11 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope (TEM), JEM 2010 ELECTRON MICROSCOPE, JEOL, Japan)
- 2.3.12 บล็อกพลาสติก (embedding capsule)
- 2.3.13 ใบมีดแก้ว (glass knife)
- 2.3.14 ใบมีดเพชร (diamond knife)
- 2.3.15 สไลด์แก้วและกระจกปิดสไลด์ (slide and cover slip)
- 2.3.16 กระดาษไข (waxed paper)
- 2.3.17 จานรองเคลือบขี้ผึ้ง (bee wax-coated plate)
- 2.3.18 กระดาษกรอง (filter paper)
- 2.3.19 กริด (grid)



### 3. วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

##### 3.1.1 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูขาว (Wistar rats) เพศเมียอายุ 2 เดือน น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ผ่านการรับรองการขออนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

##### 3.1.2 การทำสลบ

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

3.1.3 การผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเอารังไข่ออก (ovariectomy:ovx) หรือไม่เอารังไข่ออก (sham-operation:sham)

หลังจากการโกนขนสัตว์ทดลองแล้ว ที่ตำแหน่งใต้กระดูกซี่โครงชั้นสุดท้าย ประมาณ 1 ความกว้างของนิ้วมือคือตำแหน่งที่จะเปิดแผลขนาดความยาว 1-2 เซนติเมตรและมีความลึกผ่านชั้นผิวหนัง ชั้นใต้ผิวหนัง และชั้นกล้ามเนื้อ เพื่อเข้าสู่ช่องท้อง และเอารังไข่ออก (ovx) หรือไม่เอารังไข่ออก (sham) ต่อไป หลังจากนั้นจึงเย็บปิดแผลด้วยไหมเย็บแผลชนิดละลายได้เอง ทุกขั้นตอนที่ปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองจะใช้เทคนิคปลอดเชื้อทั้งหมด

##### 3.1.4 การผ่าตัดเพื่อให้เกิดแผลมาตรฐาน

หลังจากแผลที่เกิดจากการผ่าตัดเปิดช่องท้องหายสนิท จะผ่าตัดเพื่อให้เกิดแผลมาตรฐาน โดยโกนขนบริเวณแผ่นหลังสัตว์ทดลอง ใช้ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 22 สอดในร่องแผ่นพลาสติกเพื่อให้สามารถควบคุมความลึกได้ กรีดให้เกิดแผลขนาดยาว 1.0 เซนติเมตร และลึก 3.0 มิลลิเมตรบริเวณใต้กระดูกสะบัก 2.0 เซนติเมตร ระดับความลึกดังกล่าวทำให้เกิดแผลผ่านชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) ชั้นใต้หนังแท้ (hypodermis) ซึ่งเป็นชั้นที่มีเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ทั่วไป และไม่ต้องเย็บแผล เพราะจะทำให้แผลมีการอักเสบและทำให้การอ่านผลทางเนื้อเยื่อวิทยามีโอกาสผิดพลาดมากยิ่งขึ้น (มณฑา จำเรียวรักษ์, 2544) นอกจากนี้จากงานวิจัยของ มณฑา จำเรียวรักษ์ (2544) พบว่าการป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อหลังการผ่าตัดและทุก ๆ วันหลังจากนั้นอาจเป็นตัวแปรสำคัญต่อผลการทดลอง ดังนั้นในการทดลองจริงจึงไม่ป้ายแผลด้วยยาฆ่าเชื้อหลังการผ่าตัดในทุกกรณี

### 3.1.5 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเพื่อให้สารต่างๆ

การทดลองครั้งนี้จะแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

#### 1. กลุ่มควบคุม (control group) ประกอบด้วย

Sham operation (sham) หมายถึง กลุ่มสัตว์ทดลองที่ไม่ได้ตัดรังไข่ออก แต่ได้รับการผ่าตัดเปิดแผลที่ช่องท้องเหมือนกลุ่มทดลอง กลุ่มนี้ได้รับ deionized water (DI) ขนาดเท่ากับกลุ่ม ovx+YCJ ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกันติดต่อกันเป็นเวลา 7 (กลุ่ม 7 วัน) และ 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) ตามลำดับ โดยให้ทางท่อป้อนอาหาร (feeding tube) กลุ่มนี้เรียกว่ากลุ่ม sham

Ovariectomy (ovx) หมายถึง กลุ่มที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง และได้รับ DI ขนาดเท่ากับกลุ่ม ovx+YCJ ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกันติดต่อกันเป็นเวลา 7 (กลุ่ม 7 วัน) และ 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) ตามลำดับ โดยให้ทางท่อป้อนอาหาร (feeding tube) กลุ่มนี้เรียกว่ากลุ่ม ovx

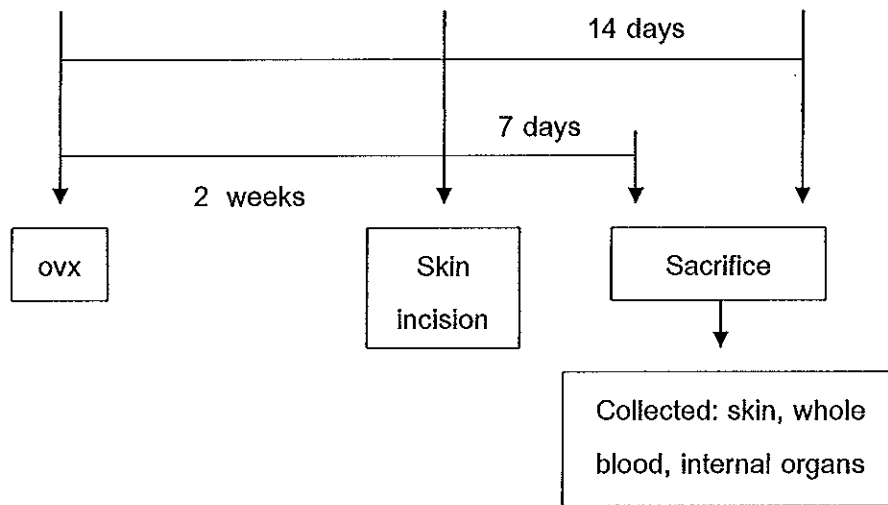
Ovariectomy และได้รับ EB 2.5  $\mu\text{g}/\text{kgBW}$  (ovx+EB) ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 (กลุ่ม 7 วัน) และ 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) ตามลำดับ โดยฉีดเข้าชั้น subcutaneous tissue บริเวณหน้าท้อง กลุ่มนี้เรียกว่ากลุ่ม ovx+EB

2. กลุ่มทดลอง (experimental group) หมายถึง กลุ่มสัตว์ทดลองที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง และให้น้ำมะพร้าวอ่อน (YCJ) 100 mL/kgBW ทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เวลาเดียวกัน ติดต่อกันเป็นเวลา 7 (กลุ่ม 7 วัน) และ 14 วัน (กลุ่ม 14 วัน) ตามลำดับ โดยให้ทางท่อป้อนอาหาร (feeding tube) กลุ่มนี้เรียกว่ากลุ่ม ovx+YCJ

| groups<br>(ovx on 1 <sup>st</sup> day)* | 14 <sup>th</sup> day<br>(start feeding) | 21 <sup>st</sup> day<br>(กลุ่ม 7 วัน) | 28 <sup>th</sup> day<br>(กลุ่ม 14 วัน) |
|---|---|---------------------------------------|--|
| 1.sham                                  | Feed DI                                 | Sacrificed (6 rats)                   | Sacrificed (6 rats)                    |
| 2.ovx                                   | Feed DI                                 | Sacrificed (6 rats)                   | Sacrificed (6 rats)                    |
| 3.ovx+EB                                | Inject EB                               | Sacrificed (6 rats)                   | Sacrificed (6 rats)                    |
| 4.ovx+YCJ                               | Feed YCJ                                | Sacrificed (6 rats)                   | Sacrificed (6 rats)                    |

ตารางที่ 2-1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเพื่อให้สารต่างๆ

\*หนูทุกกลุ่มที่ผ่านการผ่าตัดหน้าท้องเพื่อเอารังไข่ออกหรือไม่เอารังไข่ออก จะถูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 14 วัน โดยไม่ให้สารใดๆ ก่อนจะทำแผลมาตรฐานและให้สารต่างๆ ดังกล่าวข้างต้น



รูปที่ 2-1 แสดงขั้นตอนการเตรียมสัตว์ทดลอง และระยะเวลาในแต่ละขั้นตอน

การศึกษาครั้งนี้จะทำ preliminary phase กลุ่มละ 3 ตัว และฆ่าเพื่อเก็บตัวอย่างในวันที่ 21 และวันที่ 28 หนูที่ฆ่าแล้วจะเก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณแผลมาตรฐาน (wound) บริเวณที่ไม่มีแผล (normal) และบริเวณแผลจากการผ่าตัดเอารังไข่ออก (ovx) ก่อนจะรักษาสภาพไว้ใน 20% buffered formalin เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในระดับ light microscope (LM) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptors, ERs) ที่ผิวหนัง นอกจากนี้ยังรักษาสภาพไว้ใน 4% paraformaldehyde ซึ่งเป็น primary fixative เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาในระดับ transmission electron microscope (TEM) และเก็บเลือดเพื่อตรวจหาค่า serum E2 ด้วย โดยการประเมินผลในระดับ LM นั้นจะสังเกตการเปลี่ยนแปลงขนาดและจำนวนของ epithelial cells, fibroblast cells, lymphocytes, macrophages, neutrophils และคอลลาเจน (collagen fiber) และการเรียงตัวของคอลลาเจน ปริมาณหลอดเลือดฝอย ปริมาณรากขน (hair follicles) ความหนาของชั้นหนังกำพร้า (epidermis) ชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นใต้หนังแท้ (hypodermis) และสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ของหนูแต่ละกลุ่ม รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงของ ERs ทั้งชนิดอัลฟา (ER $\alpha$ ) และเบต้า (ER $\beta$ ) ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (immunohistochemistry)

### 3.1.6 การฆ่าสัตว์ทดลอง

เมื่อให้สารต่าง ๆ ครบตามเวลาที่กำหนด จะฆ่าสัตว์ทดลองด้วยวิธีการทำให้กระดูกข้อต่อคอเคลื่อน (cervical dislocation) เมื่อสัตว์ทดลองตายแล้วทำการโกนขนหนูบริเวณที่ต้องการเก็บผิวหนัง แล้วจึงใช้กิโยตินสำหรับตัดคอเพื่อเก็บตัวอย่างเลือดและผิวหนังเพื่อการศึกษาต่อไป

## 3.2 การเตรียมผงน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวอ่อนเข้มข้น

### 3.2.1 น้ำมะพร้าวอ่อน (YCJ)

น้ำมะพร้าวอ่อนที่ใช้ตลอดการทดลองคือ น้ำมะพร้าวอ่อนพันธุ์น้ำหอม อายุเก็บเกี่ยว 6 เดือน ช่วงการเก็บเกี่ยวตั้งแต่เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2549 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2550 จากสวนมะพร้าวพันธุ์น้ำหอมเลขที่ 81/1 หมู่บ้านคลองปวง ตำบล พิจิตร อำเภอนาหม่อม จังหวัดสงขลา

### 3.2.2 การเตรียมผงน้ำมะพร้าวอ่อน และน้ำมะพร้าวอ่อนเข้มข้น

นำน้ำมะพร้าวอ่อนปริมาตร 100 มิลลิลิตร มาทำให้แห้งด้วยเครื่อง freeze dryer จนได้ผงน้ำมะพร้าวอ่อนน้ำหนัก 5.5 กรัม เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส ในการทดลองครั้งนี้ใช้น้ำมะพร้าวอ่อนที่ความเข้มข้น 100 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมของสัตว์ทดลอง (100 mL/kgBW) ตลอดการทดลอง โดยเตรียมจากการนำผงน้ำมะพร้าวอ่อนน้ำหนัก 5.5 กรัมละลายใน DI จนได้สารละลายปริมาตรรวมเท่ากับ 10 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อนำไปใช้ต่อไป

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

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

ชั่ง EB ปริมาณ 15 มิลลิกรัม ละลายในน้ำมันมะกอก ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อนำไปใช้ต่อไป

### 3.3.2 การเตรียมขนาดความเข้มข้น 2.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

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

### 3.4 การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

#### 3.4.1 เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM

นำตัวอย่างผิวหนังที่รักษาสภาพไว้แล้วใน 20% buffered formalin ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. Dehydration โดยแช่ในแอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมากตามลำดับดังนี้

|                  |           |
|------------------|-----------|
| 50% alcohol      | 3 ชั่วโมง |
| 70% alcohol      | 5 ชั่วโมง |
| 95% alcohol I    | 5 ชั่วโมง |
| 95% alcohol II   | 6 ชั่วโมง |
| 100% alcohol I   | 4 ชั่วโมง |
| 100% alcohol II  | 5 ชั่วโมง |
| 100% alcohol III | 7 ชั่วโมง |

2. Clearing โดยแช่ใน xylene ตามลำดับดังนี้

|            |           |
|------------|-----------|
| Xylene I   | 3 ชั่วโมง |
| Xylene II  | 4 ชั่วโมง |
| Xylene III | 5 ชั่วโมง |

3. Infiltration โดยแช่ใน melted parplast

|             |           |
|-------------|-----------|
| Parplast I  | 3 ชั่วโมง |
| Parplast II | 5 ชั่วโมง |

4. Embedding โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ ดังกล่าวข้างต้นแล้วฝังใน melted parplast โดยอาศัยเครื่อง embedding centre

5. Sectioning โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ฝังใน parplast แล้ว มาตัดให้บาง ด้วยเครื่อง microtome ด้วยความหนา 5 ไมโครเมตร ก่อนจะวางไว้บน tespa coated slide ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า section

### 3.4.2 เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ TEM

นำตัวอย่างผิวหนังที่ได้รักษาสภาพไว้แล้วใน 4% paraformaldehyde (primary fixation) และแช่อยู่ใน 0.1 M PBS pH 7.2 ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. Secondary fixation ด้วย 1% OsO<sub>4</sub> เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
2. ล้าง 1% OsO<sub>4</sub> ส่วนเกินออกให้หมดด้วยน้ำกลั่นประมาณ 2-3 ครั้ง
3. Enblocking ด้วย 2% uranyl acetate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
4. Dehydration โดยแช่ในแอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้น 70%, 95% และ 100% ตามลำดับ โดยแช่ใน 70% alcohol 1 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที แช่ใน 95% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที และแช่ใน 100% alcohol 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
5. Clearing ใน propylene oxide 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
6. Infiltration ใน embedding mixture โดยค่อย ๆ ให้ embedding mixture แทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้เวลาทั้งหมด 5 ชั่วโมง
7. Embedding โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อแล้วฝังใน embedding mixture แล้วทำให้ embedding mixture แข็งตัว (polymerization) ด้วยการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 12-15 ชั่วโมง
8. Sectioning โดยนำตัวอย่างผิวหนังที่ฝังใน embedding mixture แล้ว มาตัดให้บางด้วยเครื่อง ultramicrotome ด้วยความหนา 400 นาโนเมตร ก่อนจะวางไว้บน common slide ซึ่งต่อไปนี้จะเรียกว่า thick section ส่วนตัวอย่างที่ตัดด้วยความหนา 90 นาโนเมตร จะเรียกว่า thin section ซึ่งจะวางไว้บนกริด (grid)

### 3.5 การย้อมสีตัวอย่างเนื้อเยื่อ

#### 3.5.1 เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ LM

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

นำ section มาย้อมสี H&E เพื่อศึกษาเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วไปตามขั้นตอนดังนี้

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

### 3.5.1.2 การย้อมสีด้วยเทคนิควิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตร์

(Immunohistochemistry)

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

1. Deparaffinization ใน xylene 10 นาที
2. Rehydration โดยใช้แอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นมากไปยังความเข้มข้นน้อยตามลำดับดังนี้
 

|                 |         |
|-----------------|---------|
| 100% alcohol    | 10 นาที |
| 95% alcohol     | 10 นาที |
| 80% alcohol     | 10 นาที |
| 70% alcohol     | 10 นาที |
| 50% alcohol     | 10 นาที |
| Distilled water | 10 นาที |
3. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
4. Incubate ใน 0.3% Triton-X100 ใน 0.1 M TBS pH 7.2 นาน 30 นาที
5. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
6. Incubate ใน 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ใน methanol นาน 20 นาที
7. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
8. Incubate ใน non-specific protein blocking serum ใน moisture chamber นาน 60 นาที
9. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
10. Incubate ใน primary antibody ใน moisture chamber ที่อุณหภูมิตั้งที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 คืน
11. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
12. Incubate ใน secondary antibody นาน 90 นาที
13. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
14. Incubate ใน ABC ที่อุณหภูมิตั้งที่ห้อง นาน 90 นาที
15. ล้างใน 0.1 M TBS pH 7.2 จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที
16. Incubate ใน DAB นาน 2-10 นาที
17. ล้างด้วย distilled water



18. Dehydration โดยใช้แอลกอฮอล์ตั้งแต่ความเข้มข้นน้อยไปยังความเข้มข้นมากตามลำดับดังนี้

|              |         |
|--------------|---------|
| 50% alcohol  | 10 นาที |
| 70% alcohol  | 10 นาที |
| 80% alcohol  | 10 นาที |
| 95% alcohol  | 10 นาที |
| 100% alcohol | 10 นาที |

19. Clearing ใน xylene นาน 10 นาที

20. mounting ด้วย permount

### 3.5.2 เพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ TEM

#### 3.5.2.1 การย้อมสี thick section ด้วย 0.5% Toluine blue

เพื่อศึกษาดำแหน่งที่ต้องการในเบื้องต้น ก่อนจะศึกษาด้วย thin section ต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำให้ thick section แห้งด้วยการอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
2. หยด 0.5% Toluine blue ให้ท่วม รอจนขอบหยดสีเป็นสีเงิน
3. ล้างสีส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น
4. ระบายน้ำออกด้วยการอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส
5. mounting ด้วย permount

#### 3.5.2.2 การย้อมสีกริด

เพื่อศึกษารายละเอียดโครงสร้างของตัวอย่างเนื้อเยื่อ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

1. วางแผ่นกระดาษไขในจานรองที่เคลือบด้วยซีฟี่นึ่ง
2. หยดสารละลาย 5% uranyl acetate บนแผ่นกระดาษไข 1 หยดต่อ 1 กริด
3. นำกริดด้านที่มีชั้นเนื้อเยื่อคว่ำลงในหยดของ 5% uranyl acetate ใช้เวลาย้อมนาน 5 นาที ก่อนจะนำฝาครอบกันแสงครอบจานรอง
4. นำกริดล้างด้วยน้ำกลั่นต้มสุก และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง
5. หยดสารละลาย lead citrate บนแผ่นกระดาษไข 1 หยดต่อ 1 กริด พร้อมกั้วางเกล็ดของ sodium hydroxide 2-3 เกล็ดไว้ใกล้ ๆ
6. นำกริดวางบนหยดของ lead citrate ใช้เวลาย้อมนาน 5-10 นาที
7. นำกริดล้างด้วยน้ำกลั่นต้มสุก และซับให้แห้งด้วยกระดาษกรอง
8. เก็บกริดที่แห้งแล้วใส่กล่องเก็บกริด

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

#### 3.6.1 การวัดความลึกของบริเวณแผล

วัดความลึก 3 บริเวณ โดยวัดจากชั้น epidermis ตั้งฉากกับบริเวณที่ลึกที่สุดของแผลที่ยังพบมี granulation tissue แล้วหาค่าเฉลี่ยของความลึกที่วัดได้

#### 3.6.2 การวัดความกว้างของบริเวณแผล

วัดความกว้าง 3 บริเวณ คือ บริเวณปากแผล บริเวณกึ่งกลางแผล และบริเวณขอบล่างของแผล โดยวัดจากขอบแผลทั้งสองข้างที่ยังพบมี granulation tissue แล้วหาค่าเฉลี่ยของความกว้างที่วัดได้

#### 3.6.3 การวัดความหนาของชั้น epidermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้น stratum granulosum จนถึงชั้น stratum basale แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

#### 3.6.4 การวัดความหนาของชั้น dermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้นใต้ต่อ stratum basale จนถึงชั้นเหนือต่อชั้น hypodermis แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

#### 3.6.5 การวัดความหนาของชั้น hypodermis

วัดความหนา 25 บริเวณที่หนาที่สุด โดยวัดจากชั้นใต้ต่อชั้น dermis จนถึงชั้นเหนือต่อชั้น muscularis adiposa แล้วหาค่าเฉลี่ยของความหนาที่วัดได้

#### 3.6.6 การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรากขน (hair follicles)

วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของรากขนที่ใหญ่ที่สุดจำนวน 10 เส้น โดยวัดในชั้น dermis และชั้น hypodermis ตามลำดับแล้วหาค่าเฉลี่ยของเส้นผ่านศูนย์กลางของรากขนในแต่ละชั้นที่วัดได้

#### 3.6.7 การนับจำนวนของ hair follicles

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

### 3.7 การอ่านผลการสแกนแผลทางเนื้อเยื่อวิทยาระดับ TEM

สังเกตการเปลี่ยนแปลงขนาด การเรียงตัว องค์ประกอบภายในไซโตพลาสซึม และนิวเคลียสของเซลล์ keratinocytes

### 3.8 การตรวจวิเคราะห์ค่า serum E2

ใช้ตัวอย่างซีรัมจากเลือดหนูทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน ส่งตรวจ ณ หน่วยเวชศาสตร์นิวเคลียร์ โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อตรวจวิเคราะห์หาค่า serum E2 ด้วยหลักการทาง electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA)

### 3.9 การตรวจวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกอื่นๆ

ใช้ตัวอย่างซีรัมจากเลือดหนูทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน ส่งตรวจ ณ ห้องปฏิบัติการเคมีคลินิก ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลสงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เพื่อตรวจวิเคราะห์หาค่า BUN (Blood urea nitrogen), creatinine, total protein, albumin, ALP (Alkaline phosphatase), AST (Aspartate aminotransferase), ALP (Alanine aminotransferase), cholesterol, triglyceride, HDL (High density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein)

## 4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ใช้โปรแกรม Microimage และทดสอบความถูกต้องแม่นยำของข้อมูลด้วยวิธีทางสถิติโดยใช้โปรแกรม Microsoft EXCEL version 2003 และ SPSS version 11.5

### บทที่ 3

#### ผลการทดลอง

การทดสอบผลการทดลองใช้สถิติทดสอบ Mann-Whitney U test โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS version 11.5 และใช้สัญลักษณ์ต่อไปนี้ตลอดการทดลองเพื่อแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

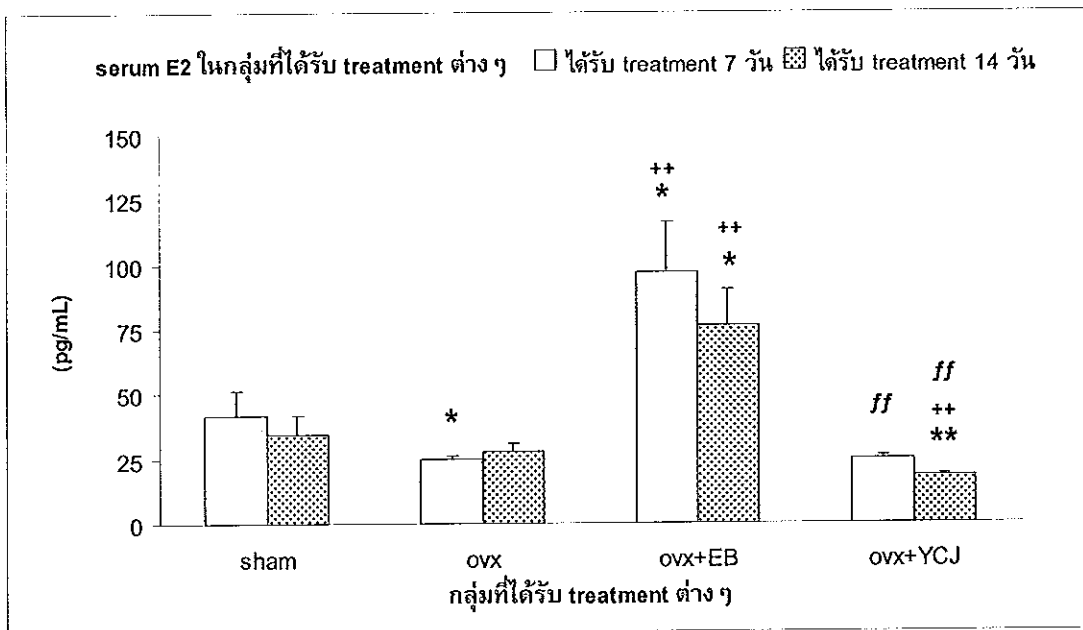
\* และ \*\* คือ การเปรียบเทียบระดับนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม sham โดยมีค่า  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

+ และ ++ คือ การเปรียบเทียบระดับนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม ovx โดยมีค่า  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

*f* และ *ff* คือ การเปรียบเทียบระดับนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม ovx+EB โดยมีค่า  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ

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

การเปรียบเทียบค่า serum E2 ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx มีค่า serum E2 ( $24.71 \pm 1.25$ ) ต่ำกว่า และกลุ่ม ovx+EB มีค่า serum E2 ( $97.03 \pm 19.23$ ) สูงกว่ากลุ่ม sham ( $41.91 \pm 9.26$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  กลุ่ม ovx+EB มีค่า serum E2 สูงกว่ากลุ่ม ovx อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  และกลุ่ม ovx+YCJ มีค่า serum E2 ( $24.60 \pm 1.44$ ) ต่ำกว่ากลุ่ม ovx+EB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  สำหรับการเปรียบเทียบค่า serum E2 ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB มีค่า serum E2 ( $76.27 \pm 13.68$ ) สูงกว่ากลุ่ม sham ( $34.29 \pm 7.46$ ) และกลุ่ม ovx ( $28.09 \pm 3.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ และกลุ่ม ovx+YCJ ( $18.18 \pm 0.71$ ) มีค่า serum E2 ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ ทั้ง 3 กลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.01$  ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-1



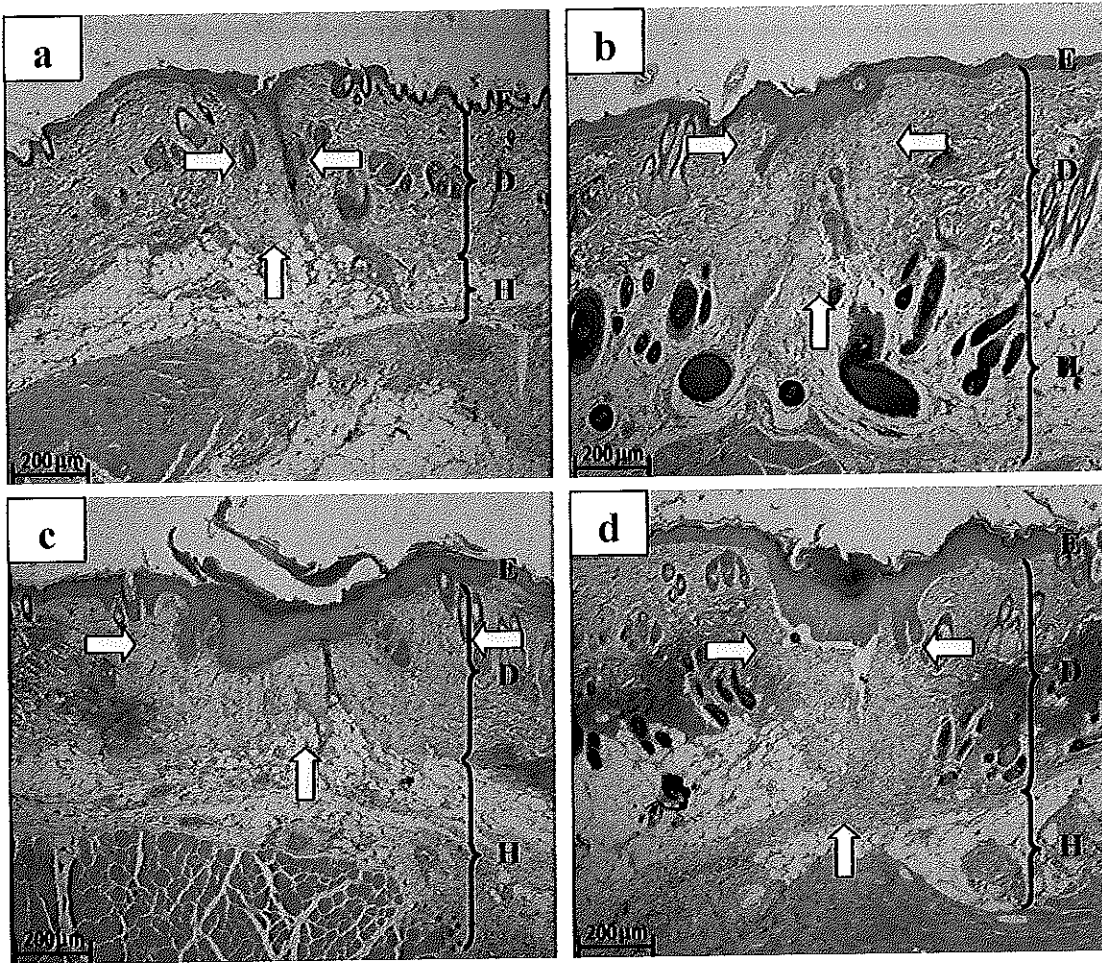
รูปที่ 3-1 กราฟแสดงค่า serum E2 (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่างๆ และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม EXCEL โปรแกรม Image analyzer และโปรแกรม SPSS ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

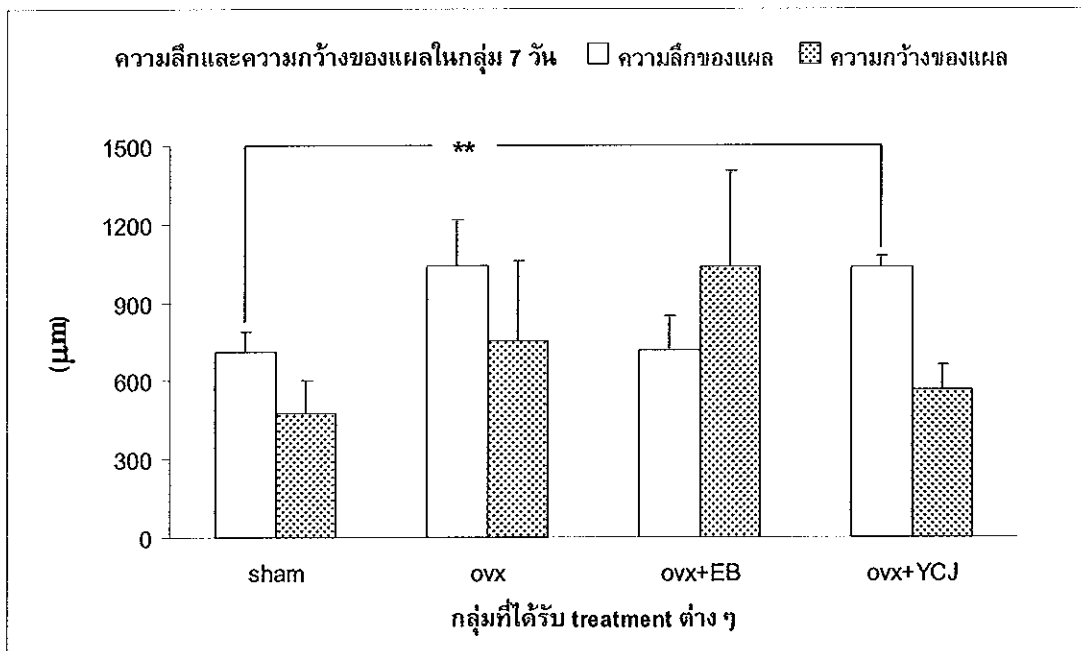
ก. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อม Hematoxylin and Eosin ในกลุ่ม 7 วัน

1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล (wounded skin)

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลในกลุ่ม 7 วัน พบชั้น epidermis ของทุกกลุ่มหนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ในชั้น dermis พบ granulation tissue ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ extracellular matrix (ECM) ดังแสดงในรูปที่ 3-2 เมื่อวัดความลึกและความกว้างของแผล ( $\mu\text{m}$ ) ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าความลึกของแผลในกลุ่ม sham ( $712.43 \pm 77.74$ ) น้อยกว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $1,036.30 \pm 42.41$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  แต่ไม่ต่างกับกลุ่ม ovx ( $1,044.07 \pm 173.28$ ) และกลุ่ม ovx+EB ( $715.11 \pm 131.32$ ) อย่างไรก็ตามในกลุ่ม sham ยังคงมีความลึกของแผลน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ เช่นเดียวกันกับความกว้างของแผลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม sham ( $478.81 \pm 120.70$ ) ovx ( $750.28 \pm 308.03$ ) ovx+EB ( $1,037.57 \pm 366.80$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $566.81 \pm 98.06$ ) อย่างไรก็ตามในกลุ่ม sham ยังคงมีความกว้างของแผลน้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-3



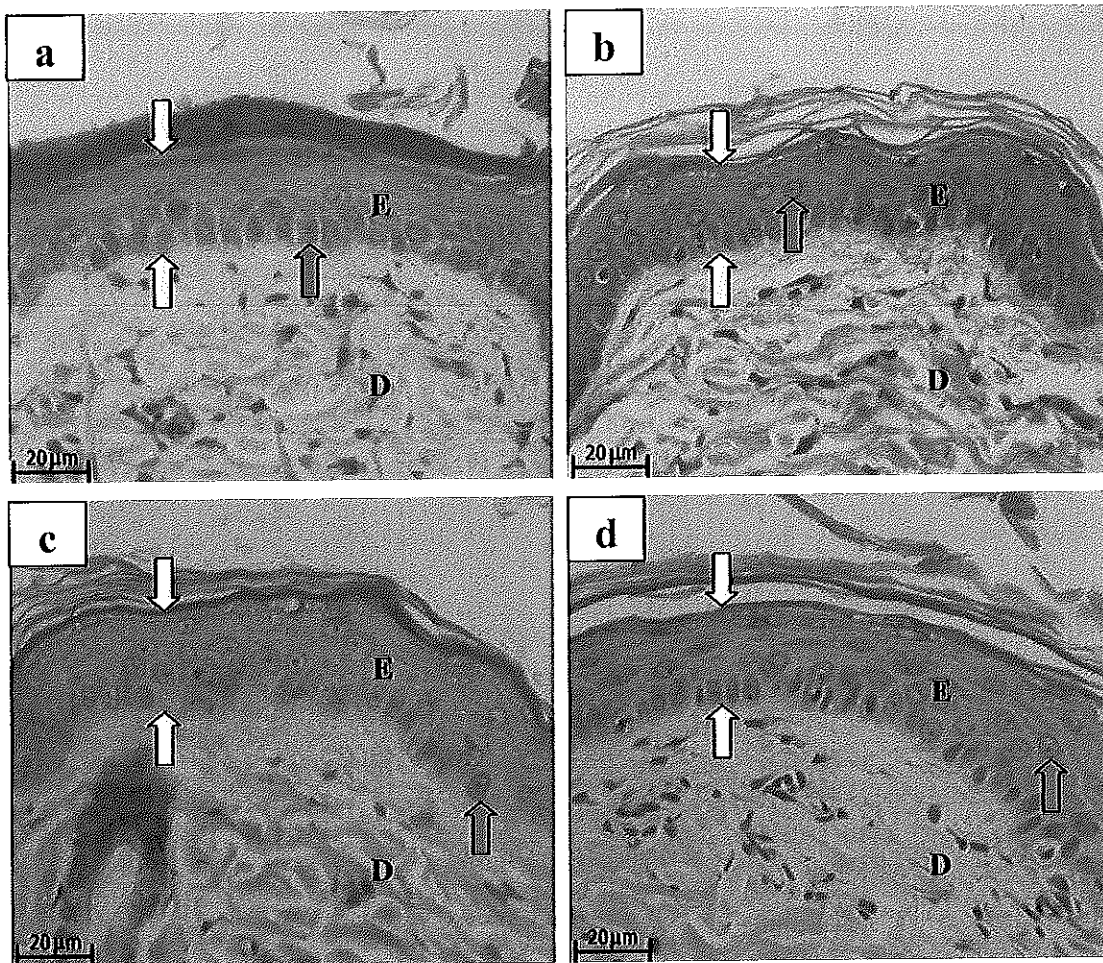
รูปที่ 3-2 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, E = Epidermis, D = Dermis, H = Hypodermis และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของแผล



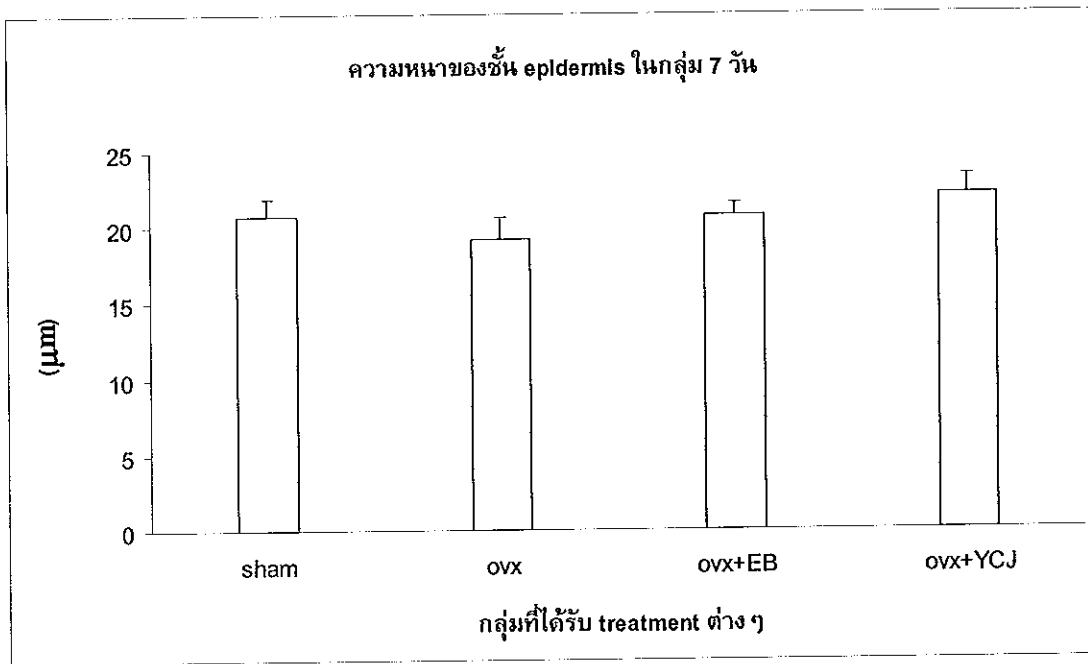
รูปที่ 3-3 กราฟแสดงความลึกและความกว้างของบริเวณแผล (mean±SEM) ในกลุ่ม 7 วัน



2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ (normal skin)  
การตรวจสอบชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ  
ใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes (ลูกศร  
สีเขียวในรูปที่ 3-4) เรียงตัวเป็นชั้นๆ โดย keratinocytes ที่อยู่ชั้นล่างสุดมี  
รูปร่างทรงสูงที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแทนที่เซลล์ชั้นบนที่เสื่อมสภาพ  
แล้ว ขนาดของ keratinocytes ในกลุ่ม sham ovx+EB และ ovx+YCG ไม่พบ  
ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม แต่ ในกลุ่ม ovx พบมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มอื่นๆ  
ดังแสดงในรูปที่ 3-4 การวัดความหนาของชั้น epidermis ด้วยโปรแกรม  
Microimage พบว่าความหนาของชั้น epidermis ( $\mu\text{m}$ ) ในกลุ่ม sham  
( $20.76 \pm 1.07$ ) ovx ( $19.17 \pm 1.52$ ) ovx+EB ( $20.72 \pm 0.88$ ) และ ovx+YCG  
( $22.06 \pm 1.25$ ) ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-5

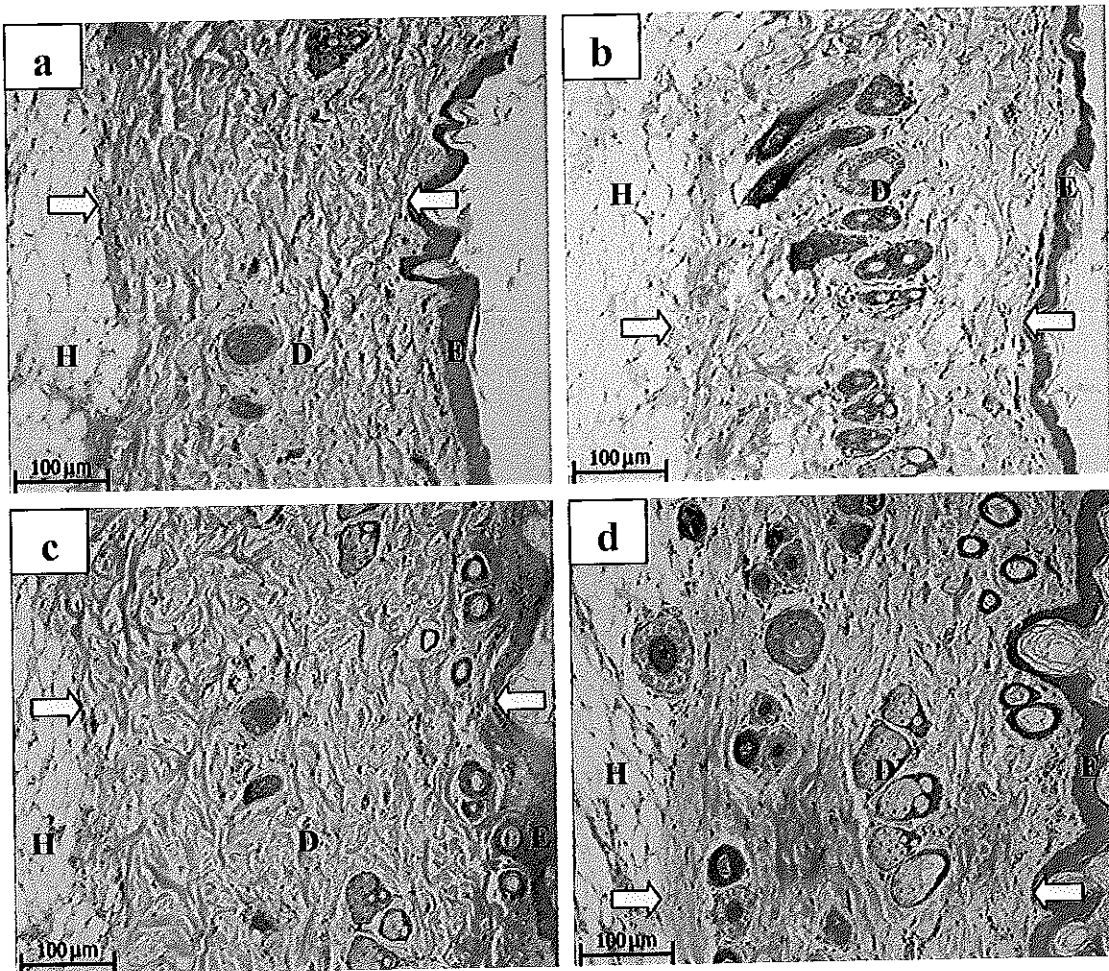


รูปที่ 3-4 แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (40x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, E = epidermis, D = dermis ลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น epidermis และลูกศรสีเขียวแสดงเซลล์ keratinocytes

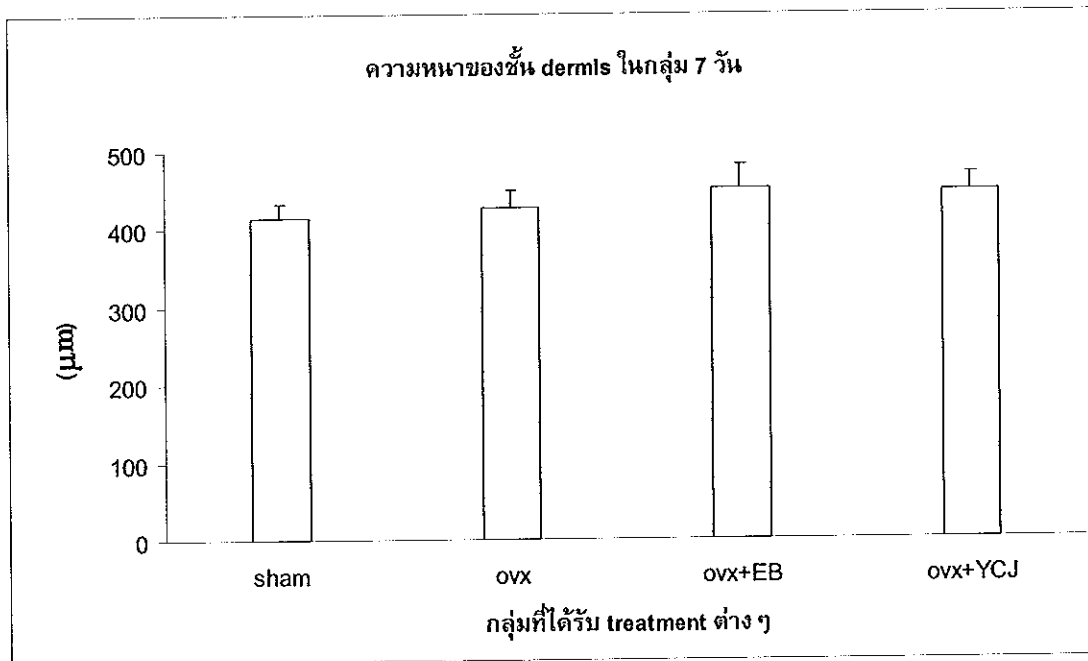


รูปที่ 3-5 กราฟแสดงความหนาของชั้น epidermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

การตรวจสอบชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ fibroblasts แทรกอยู่ระหว่างคอลลาเจน ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชั้นนี้ นอกจากนี้ยังพบ sebaceous gland, hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ในชั้นนี้ด้วย ลักษณะการเรียงตัวของคอลลาเจนในกลุ่ม ovx พบมีการเรียงตัวอย่างหลวมๆ ทำให้เห็นเป็นช่องว่างในชั้น dermis มากกว่าเมื่อเทียบกับอีกสามกลุ่มคือ sham ovx+EB และ ovx+YCJ ดังแสดงในรูปที่ 3-6 ความหนาของชั้น dermis ( $\mu\text{m}$ ) เมื่อวัดด้วยโปรแกรม Microimage ในกลุ่ม sham ( $415.47 \pm 18.58$ ) ovx ( $426.66 \pm 22.79$ ) ovx+EB ( $451.14 \pm 29.91$ ) และ ovx+YCJ ( $447.20 \pm 21.61$ ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-7

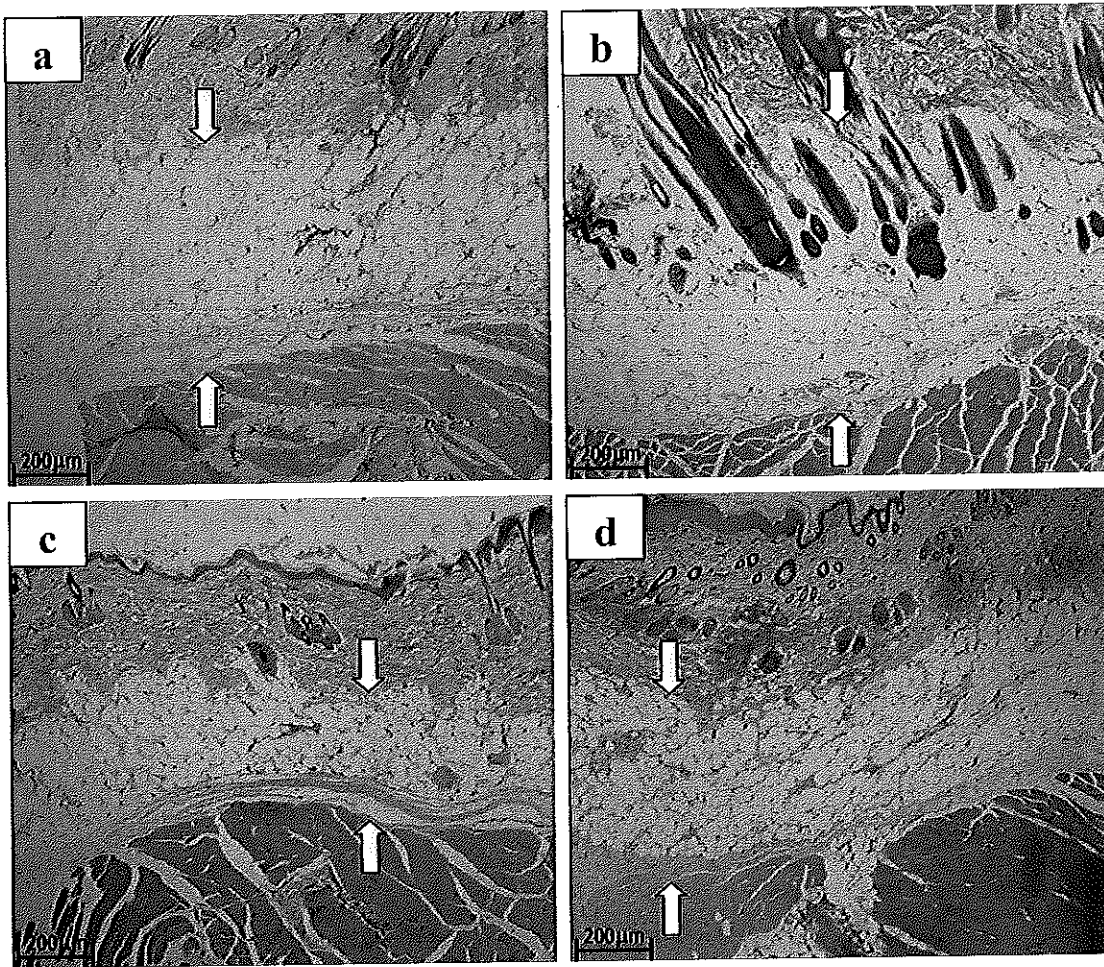


รูปที่ 3-6 แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของชั้น dermis



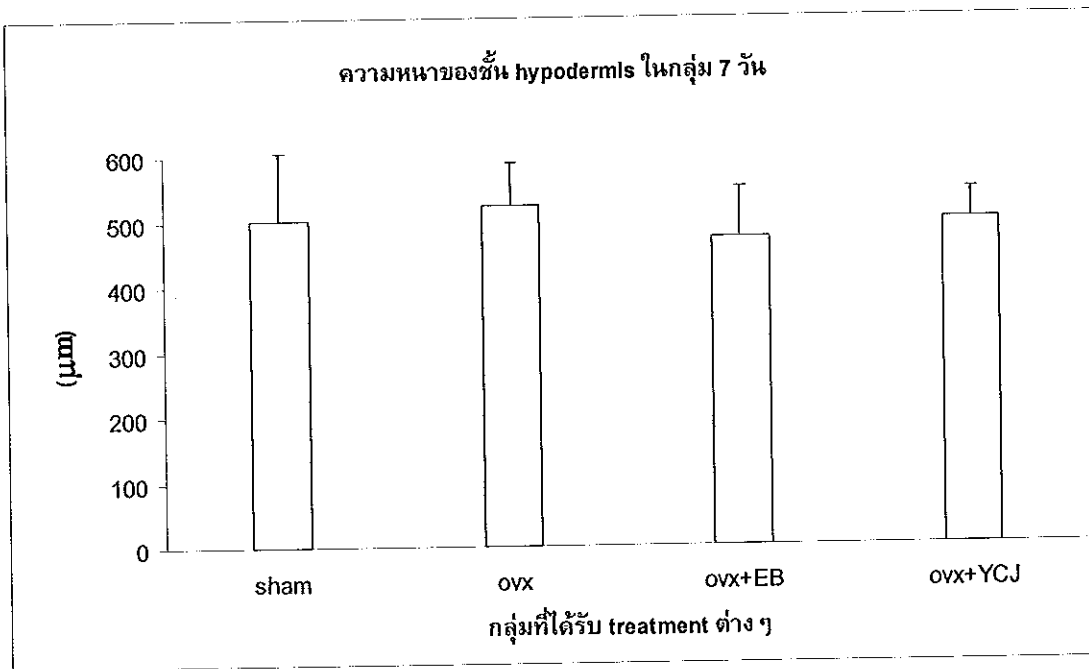
รูปที่ 3-7 กราฟแสดงความหนาของชั้น dermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

การตรวจสอบชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบ hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ในชั้นนี้ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3-8 ความหนาของชั้น hypodermis ( $\mu\text{m}$ ) เมื่อวัดด้วยโปรแกรม Microimage ในกลุ่ม sham ( $501.41 \pm 104.42$ ) ovx ( $522.74 \pm 65.58$ ) ovx+EB ( $472.32 \pm 77.01$ ) และ ovx+YCJ ( $499.44 \pm 44.68$ ) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-9



รูปที่ 3-8 แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ และลูกศรชี้เหลือง แสดงขอบเขตของชั้น hypodermis

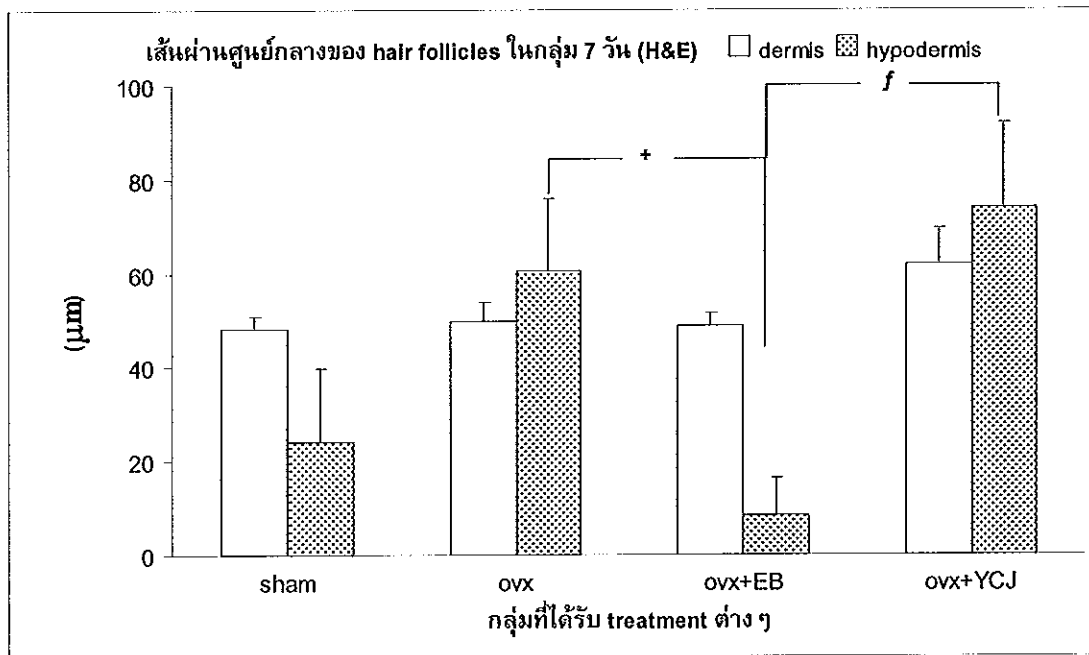




รูปที่ 3-9 กราฟแสดงความหนาของชั้น hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลาง ( $\mu\text{m}$ ) ของกลุ่ม sham ( $48.00 \pm 2.92$ ) ovx ( $49.88 \pm 4.01$ ) ovx+EB ( $48.94 \pm 2.69$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $61.91 \pm 7.64$ ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น hypodermis พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่ม ovx ( $60.41 \pm 15.67$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $73.76 \pm 18.31$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $8.24 \pm 8.24$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่ต่างกับกลุ่ม sham ( $24.01 \pm 15.77$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-10

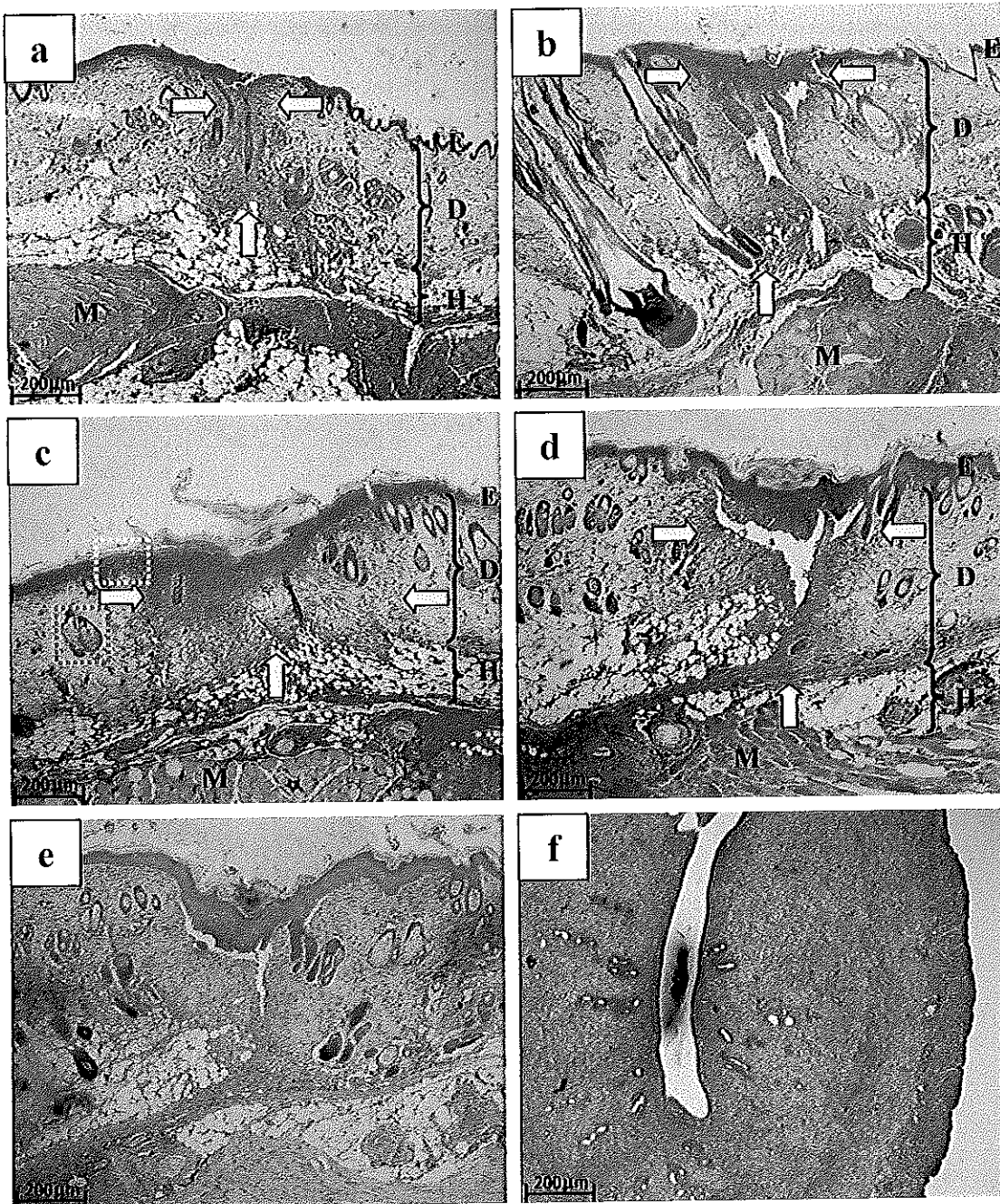


รูปที่ 3-10 กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis และ hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

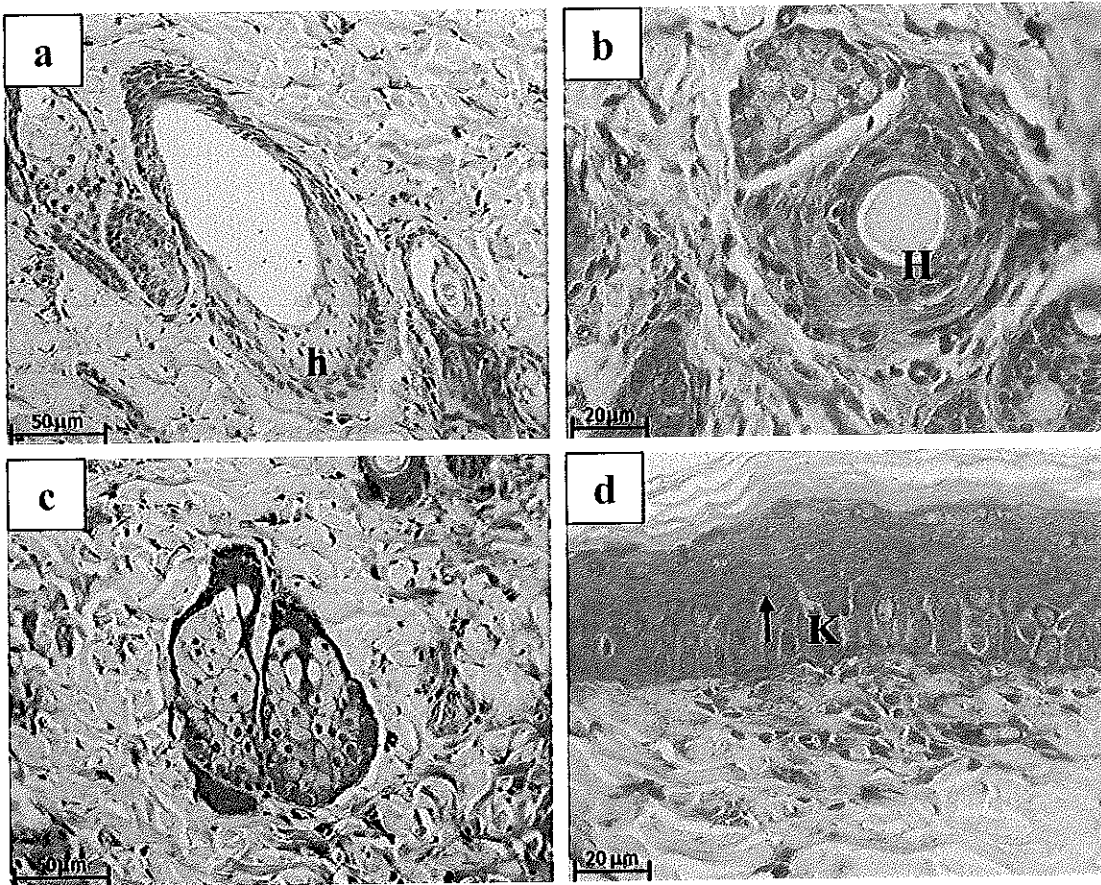
ข. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้  
ในกลุ่ม 7 วัน

1. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้โดยใช้ anti-ER $\alpha$  antibody

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 7 วัน พบชั้น epidermis หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes (Ir+) หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ในชั้น dermis พบ granulation tissue (Ir+) ดัดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้สังเกตเห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม sham (a) น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่ สามกลุ่มที่เหลือไม่พบความแตกต่างในขอบเขตของแผลอย่างชัดเจน นอกจาก เซลล์ keratinocytes และ granulation tissue ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ต่อ ER $\alpha$  แล้ว ยังพบ hair follicles, panniculus carnosus และ sebaceous gland ที่ย้อมติดสีดังกล่าวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 3-11 และ 3-12



รูปที่ 3-11 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  (4x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, e = negative control และ counterstain ด้วย hematoxylin, f = positive control (uterus), E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis, M = panniculus carnosus และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของแผล



รูปที่ 3-12 แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 7 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป 3-12a ขยายจากกรอบวงกลมสีเหลืองในรูป 3-11b แสดง hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (h) (20x) แต่ติดสี counter stain ของ hematoxylin (สีน้ำเงิน)

รูป 3-12b ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวในรูป 3-11a แสดง hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (H) (40x)

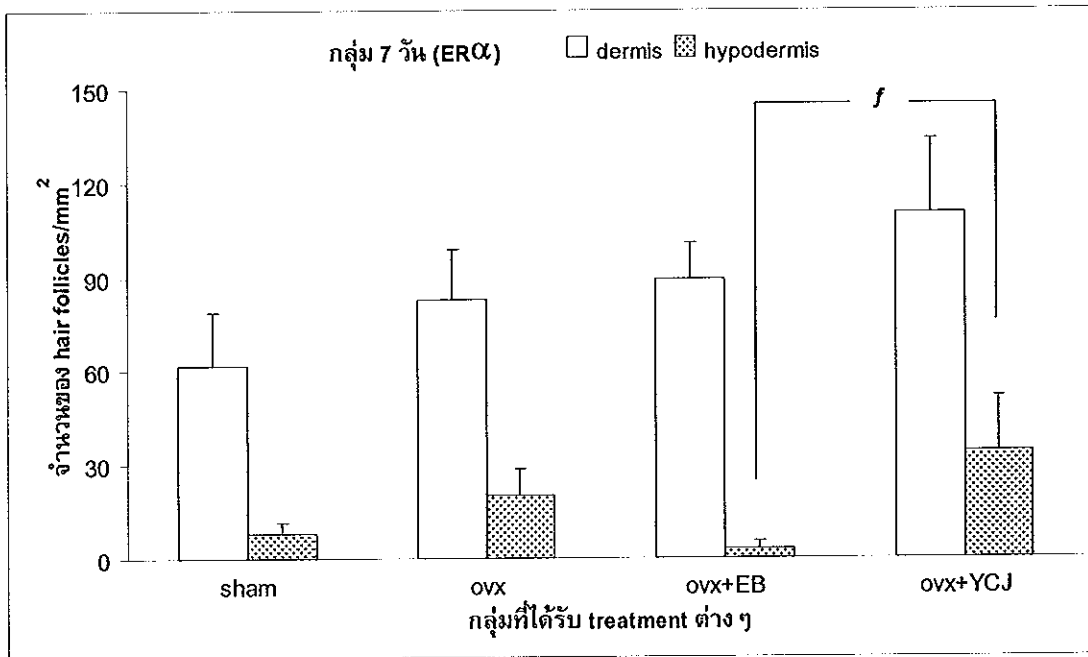
รูป 3-12c ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงในรูป 3-11c แสดง sebaceous gland (S) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (20x)

รูป 3-12d ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเหลืองในรูป 3-11c แสดง keratinocytes (K) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม sham ( $61.83 \pm 16.84$ ) ovx ( $82.67 \pm 16.29$ ) ovx+EB ( $89.17 \pm 11.76$ ) และ ovx+YCJ ( $110.33 \pm 23.55$ ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสำหรับจำนวนของ hair follicles ในชั้น hypodermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ ( $34.00 \pm 17.78$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $3.17 \pm 2.32$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $8.00 \pm 3.60$ ) และ ovx ( $20.00 \pm 8.37$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-13

สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  พบว่ามีน้อยมาก และไม่มี ความแตกต่างเมื่อทดสอบทางสถิติ จึงไม่แสดงในผลการทดลองครั้งนี้

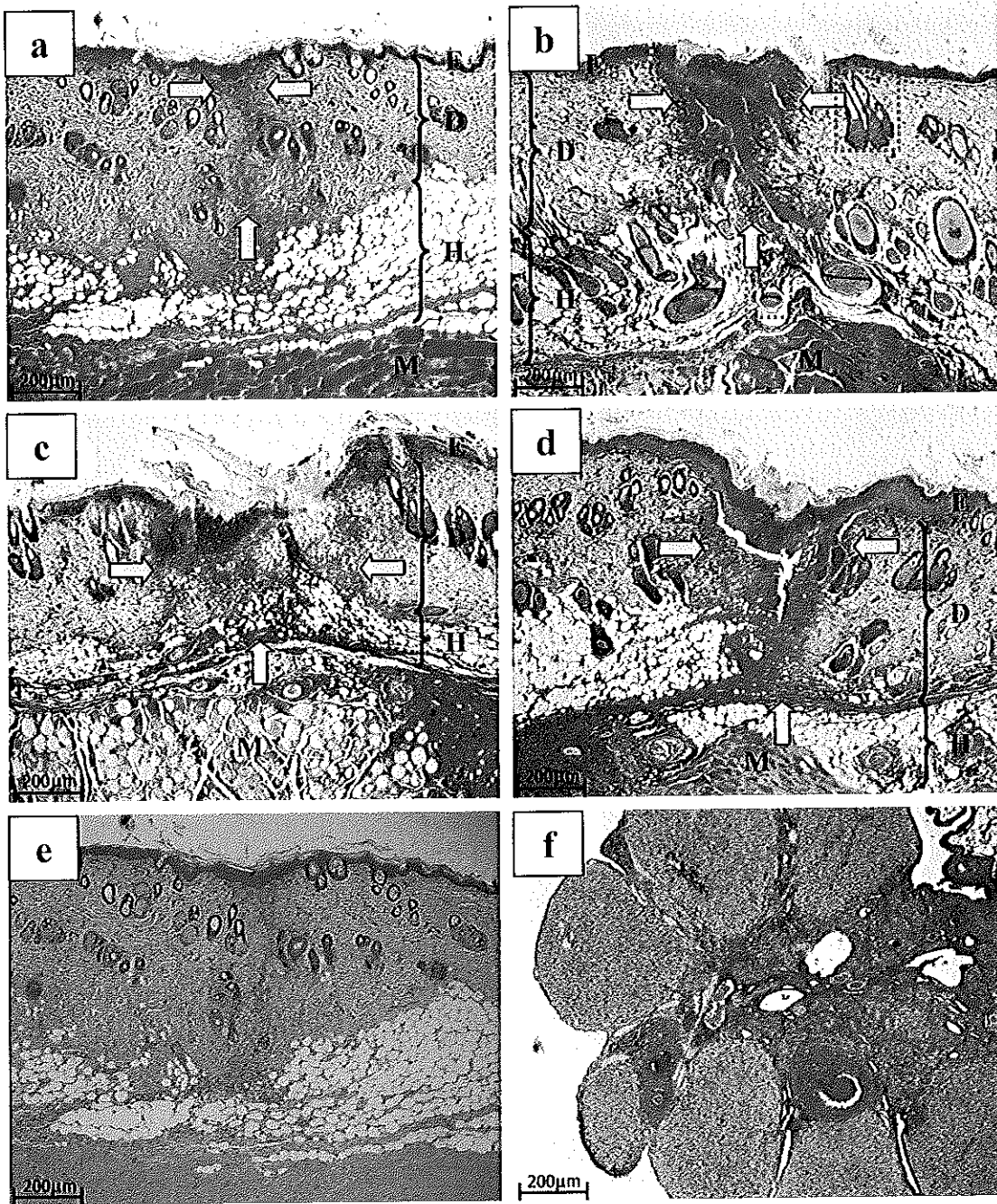


รูปที่ 3-13 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERO ในชั้น dermis และ hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

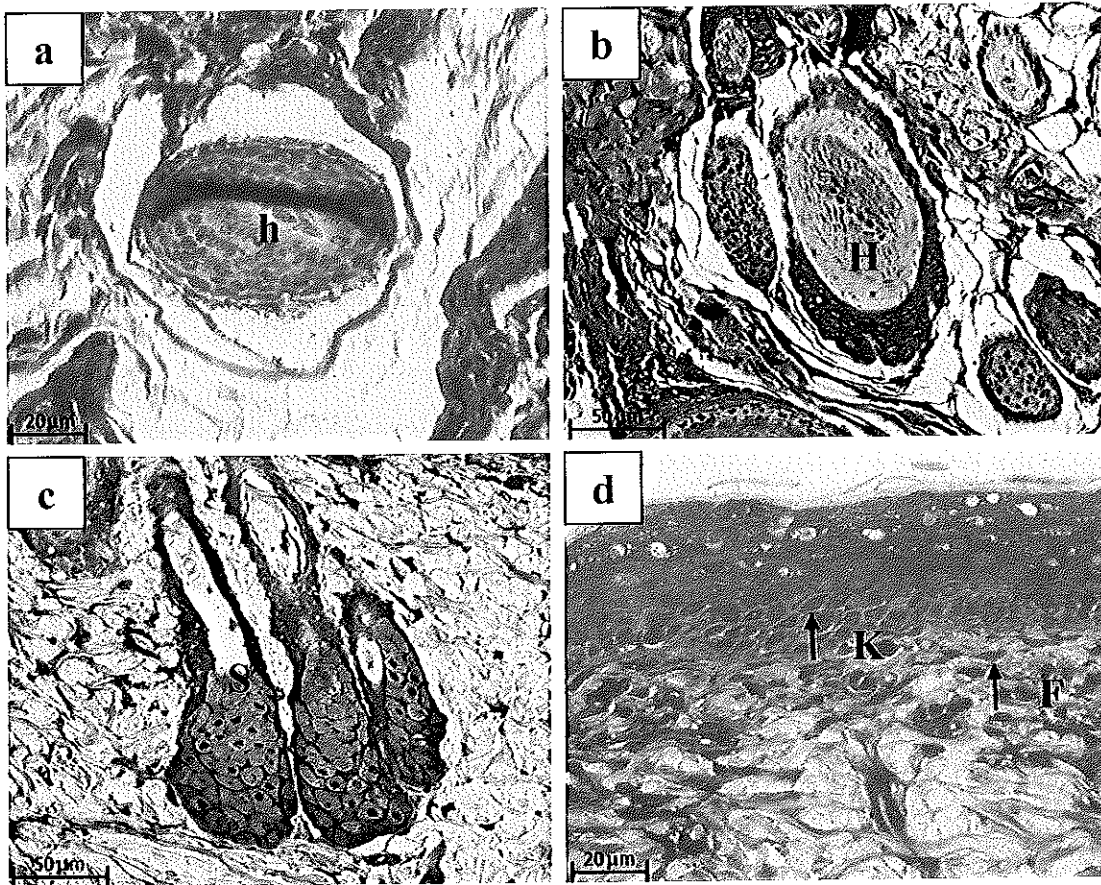


## 2. วิธีการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\beta$ antibody

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน พบชั้น epidermis หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes (I $r$ +) หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ในชั้น dermis พบ granulation tissue (I $r$ +) ติดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้เห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม sham (a) น้อยกว่ากลุ่มอื่น ๆ ในขณะที่สาม กลุ่มที่เหลือไม่พบความแตกต่างในขอบเขตของแผลอย่างชัดเจน นอกจากเซลล์ keratinocytes และ granulation tissue ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  แล้ว ยังพบ hair follicles, panniculus carnosus และ sebaceous gland ที่ย้อมติดสีดังกล่าวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 3-14 และ 3-15



รูปที่ 3-14 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  (4x) ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, e = negative control และ counterstain ด้วย hematoxylin, f = positive control (ovary), E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis, M = panniculus carnosus และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของแผล



รูปที่ 3-15 แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 7 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป 3-15a ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวในรูป 3-14b แสดง hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (h) (40x)

รูป 3-15b ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเหลืองในรูป 3-14b แสดง hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (H) (20x)

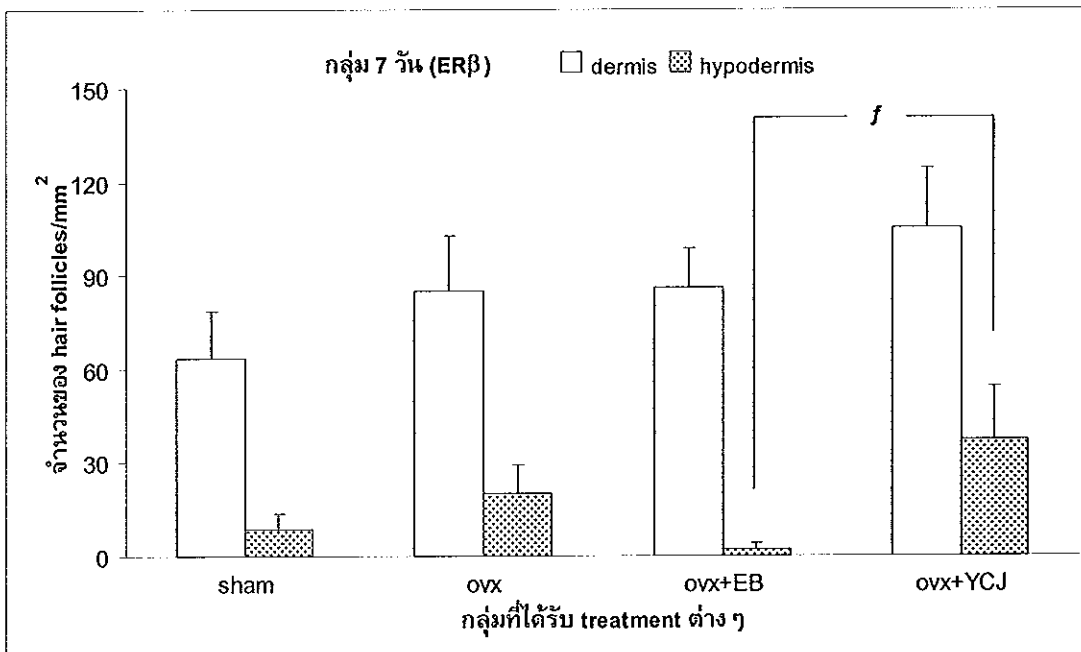
รูป 3-15c ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงในรูป 3-14b แสดง sebaceous gland (S) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (20x)

รูป 3-15d ขยายจากกรอบวงกลมสีเหลืองในรูป 3-14b แสดง keratinocytes (K) และ fibroblasts (F) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่าง ๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น dermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม sham (63.33 $\pm$ 15.27) ovx (85.00 $\pm$ 17.60) ovx+EB (85.83 $\pm$ 12.92) และ ovx+YCJ (105.33 $\pm$ 19.06) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น hypodermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ (37.00 $\pm$ 17.45) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB (2.17 $\pm$ 1.80) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham (8.50 $\pm$ 4.98) และ ovx (20.17 $\pm$ 8.84) ดังแสดงในรูปที่ 3-16

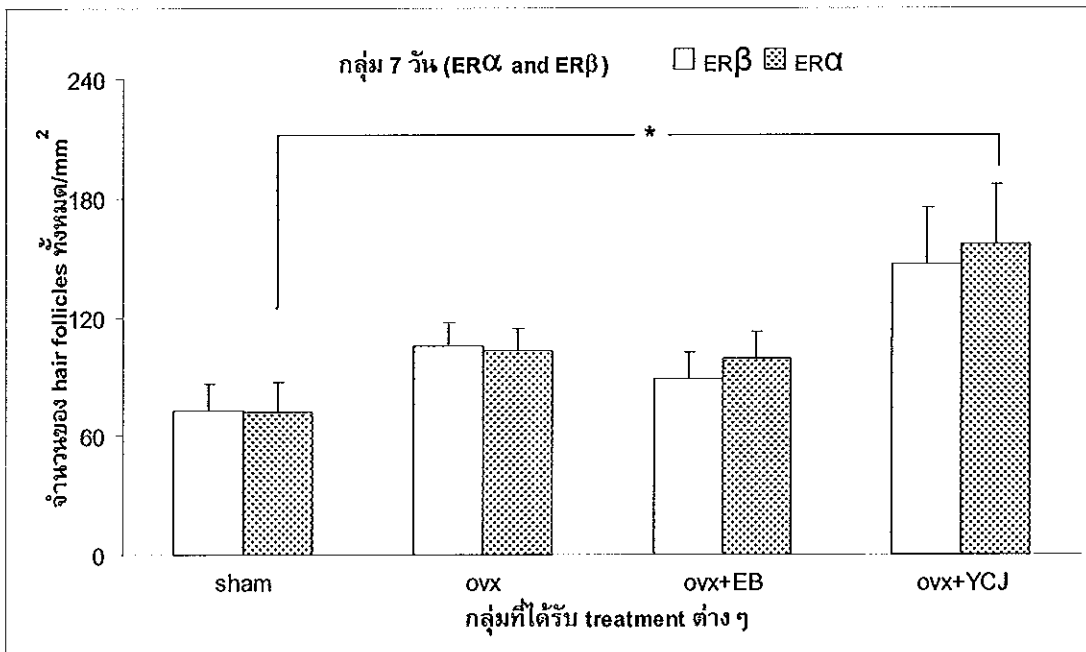
สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  พบว่ามีน้อยมาก และไม่มี ความแตกต่างเมื่อทดสอบทางสถิติ จึงไม่แสดงในผลการทดลองครั้งนี้



รูปที่ 3-16 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERβ ในชั้น dermis และ hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 7 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนรวมของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis พบว่าจำนวนรวมของ hair follicles ของกลุ่ม sham (72.67 $\pm$ 13.69) ovx (105.17 $\pm$ 12.20) ovx+EB (88.67 $\pm$ 13.68) และ ovx+YCJ (146.83 $\pm$ 28.16) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับจำนวนรวมของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis พบว่าจำนวนรวมของ hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ (156.67 $\pm$ 29.93) มากกว่ากลุ่ม sham (72.33 $\pm$ 14.80) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx (103.33 $\pm$ 10.72) และ ovx+EB (99.17 $\pm$ 13.16) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-17

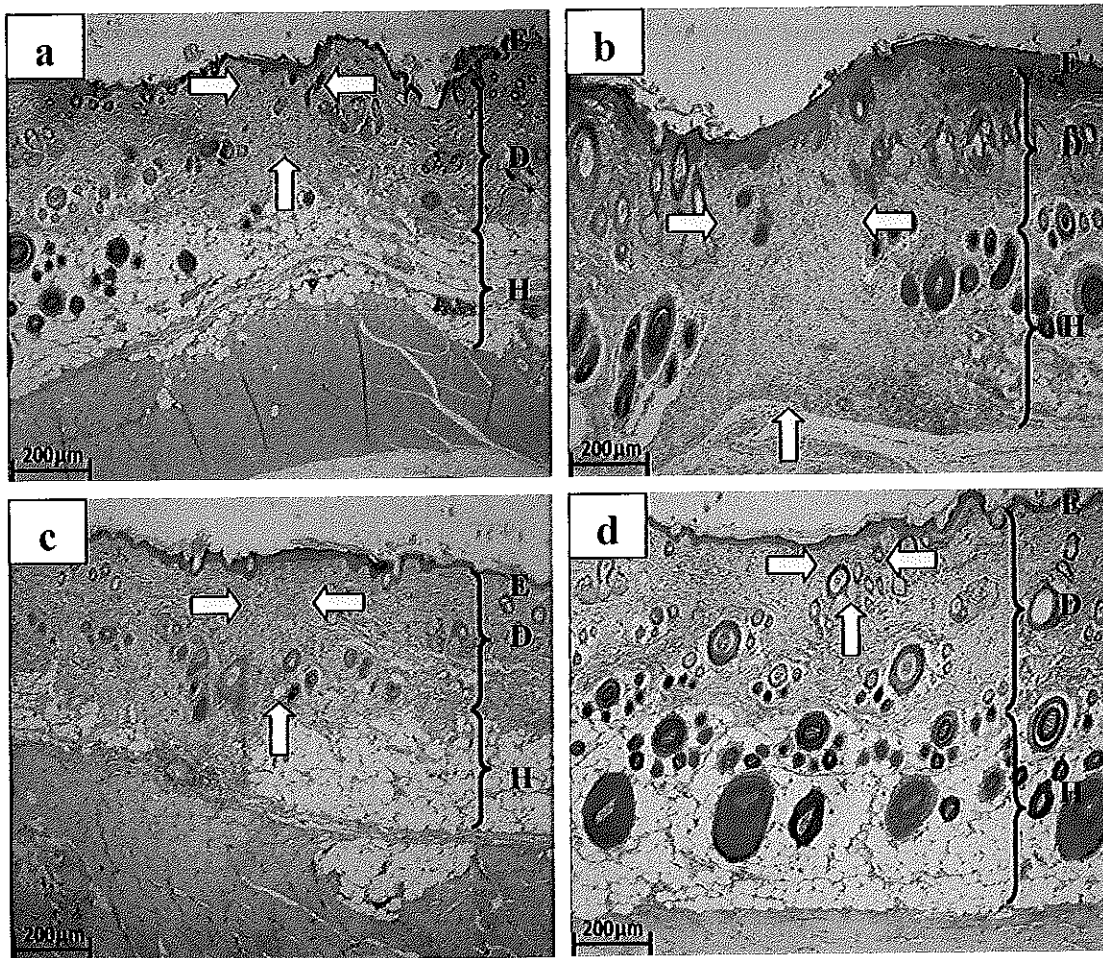


รูปที่ 3-17 กราฟแสดงจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  (mean $\pm$ SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 7 วัน

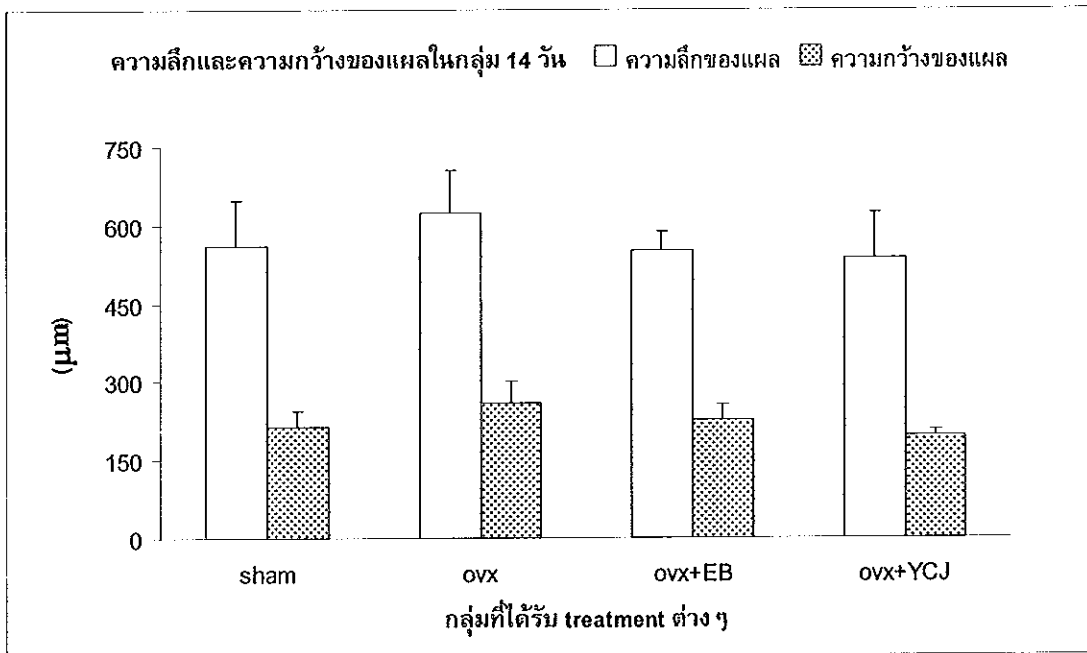
ค. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อม Hematoxylin and Eosin ในกลุ่ม 14 วัน

1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล (wounded skin)  
 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลในกลุ่ม 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม ovx หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างดังกล่าว ในชั้น dermis พบ granulation tissue ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ดังแสดงในรูปที่ 3-18 เมื่อวัดความลึกและความกว้างของแผล ( $\mu\text{m}$ ) ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าความลึกของแผลในกลุ่ม sham ( $560.17 \pm 88.54$ ) ovx ( $623.73 \pm 82.21$ ) ovx+EB ( $550.71 \pm 36.90$ ) และ ovx+YCJ ( $537.15 \pm 86.07$ ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามในกลุ่ม ovx+YCJ ยังคงมีความลึกของแผลน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กลุ่ม ovx มีความลึกของแผลมากที่สุดเช่นเดียวกับกับความกว้างของแผลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม sham ( $214.55 \pm 29.65$ ) ovx ( $260.31 \pm 40.25$ ) ovx+EB ( $225.28 \pm 29.34$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $195.48 \pm 11.88$ ) อย่างไรก็ตามในกลุ่ม ovx+YCJ ยังคงมีความกว้างของแผลน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กลุ่ม ovx มีความกว้างของแผลมากที่สุดดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-19



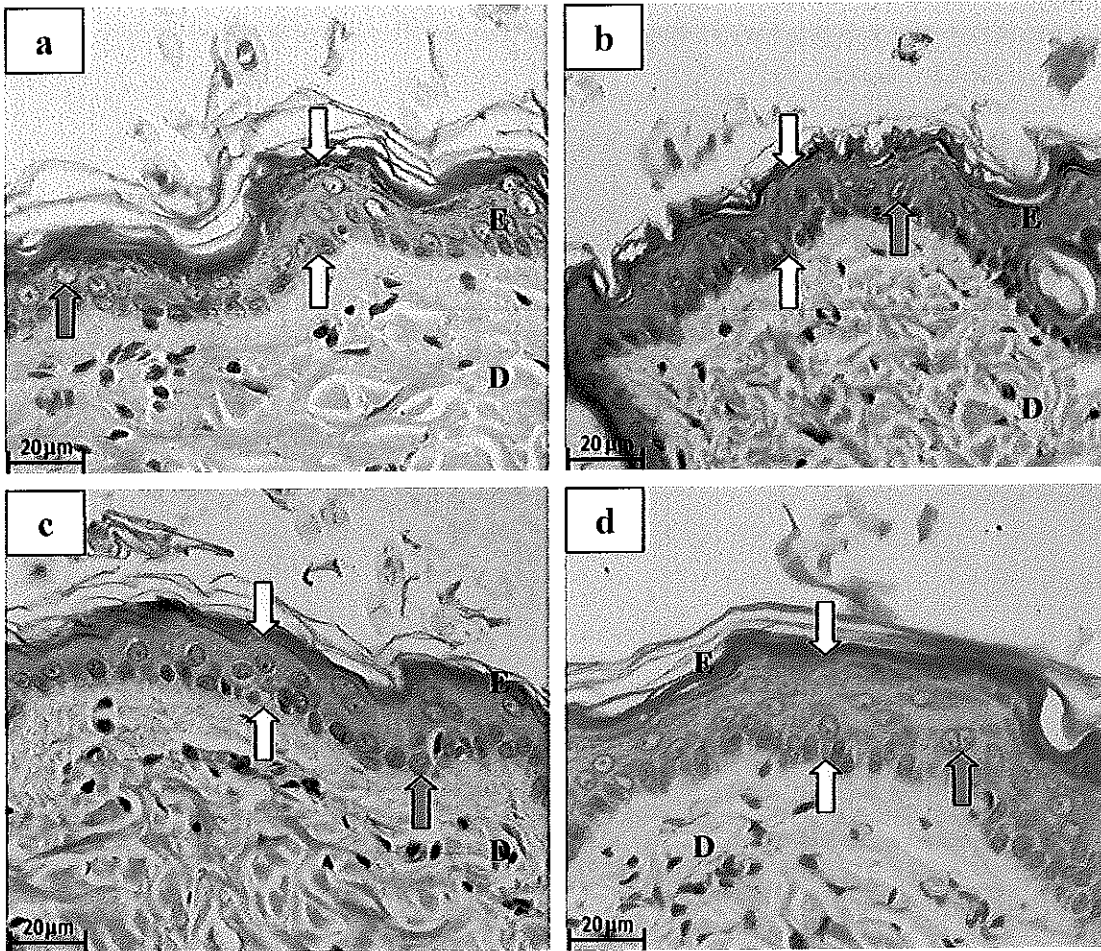


รูปที่ 3-18 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของแผล

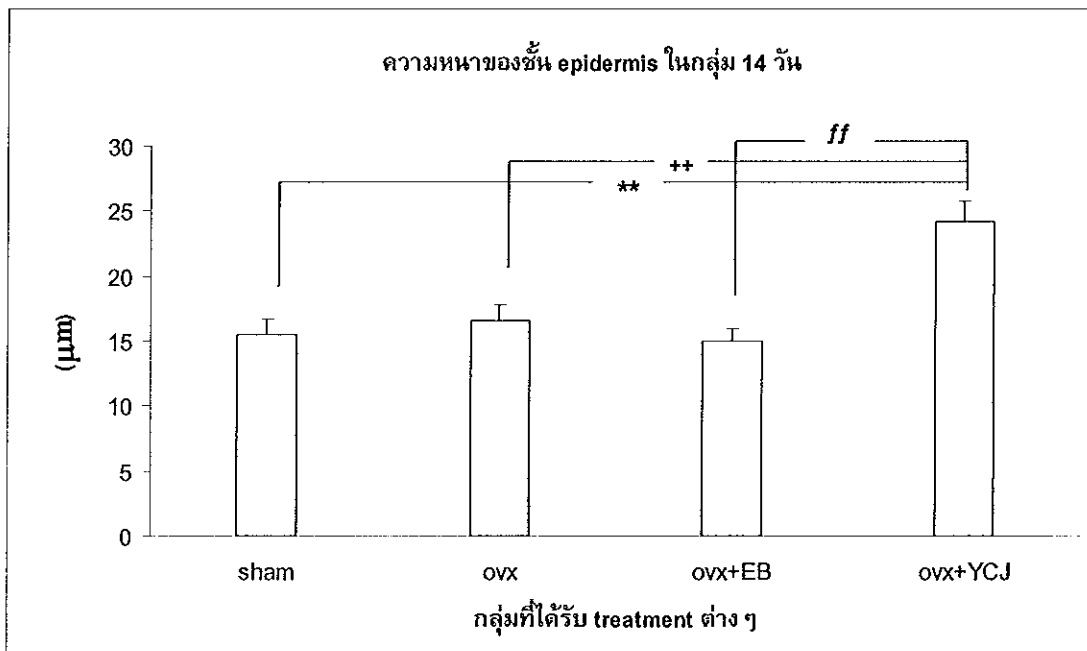


รูปที่ 3-19 กราฟแสดงความลึกและความกว้างของบริเวณแผล (mean±SEM) ในกลุ่ม 14 วัน

2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ (normal skin)  
การตรวจสอบชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ keratinocytes (ลูกศรสีเขียวในรูปที่ 3-20) เรียงตัวเป็นชั้นๆ โดย keratinocytes ที่อยู่ชั้นล่างสุดมีรูปร่างทรงสูงที่สามารถแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนแทนที่เซลล์ชั้นบนที่เสื่อมสภาพแล้ว ขนาดของ keratinocytes ในกลุ่ม sham ovx+EB และ ovx+YJCJ มีขนาดใหญ่ และกลมมนมากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่ม ovx ที่พบมี keratinocytes ขนาดเล็กและลีบแบน ดังแสดงในรูปที่ 3-20 การวัดความหนาของชั้น epidermis ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าความหนาของชั้น epidermis ( $\mu\text{m}$ ) ในกลุ่ม ovx+YJCJ ( $24.14 \pm 1.57$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่ม sham ( $15.48 \pm 1.19$ ) ovx ( $16.57 \pm 1.22$ ) และ ovx+EB ( $14.97 \pm 1.02$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-21

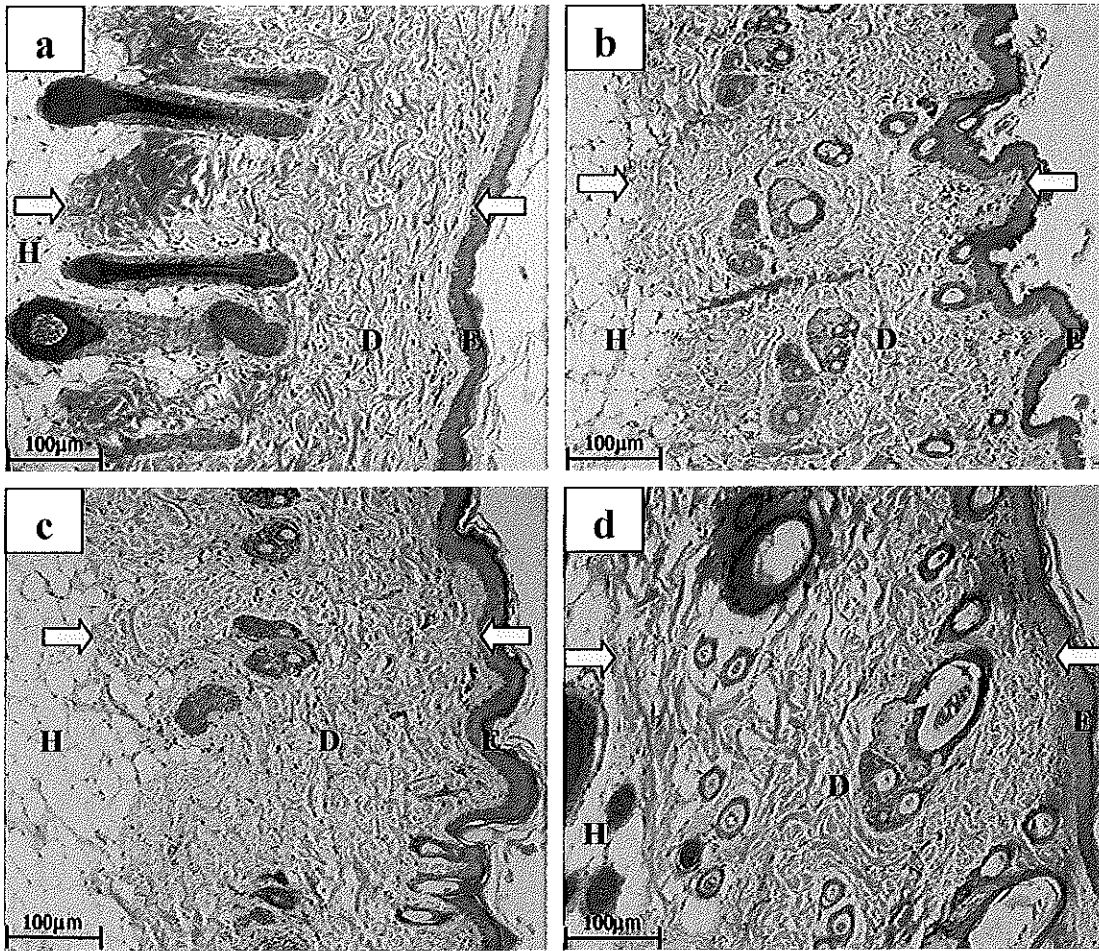


รูปที่ 3-20 แสดงชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (40x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, E = epidermis, D = dermis ลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของชั้น epidermis และลูกศรสีเขียวชี้แสดงเซลล์ keratinocytes

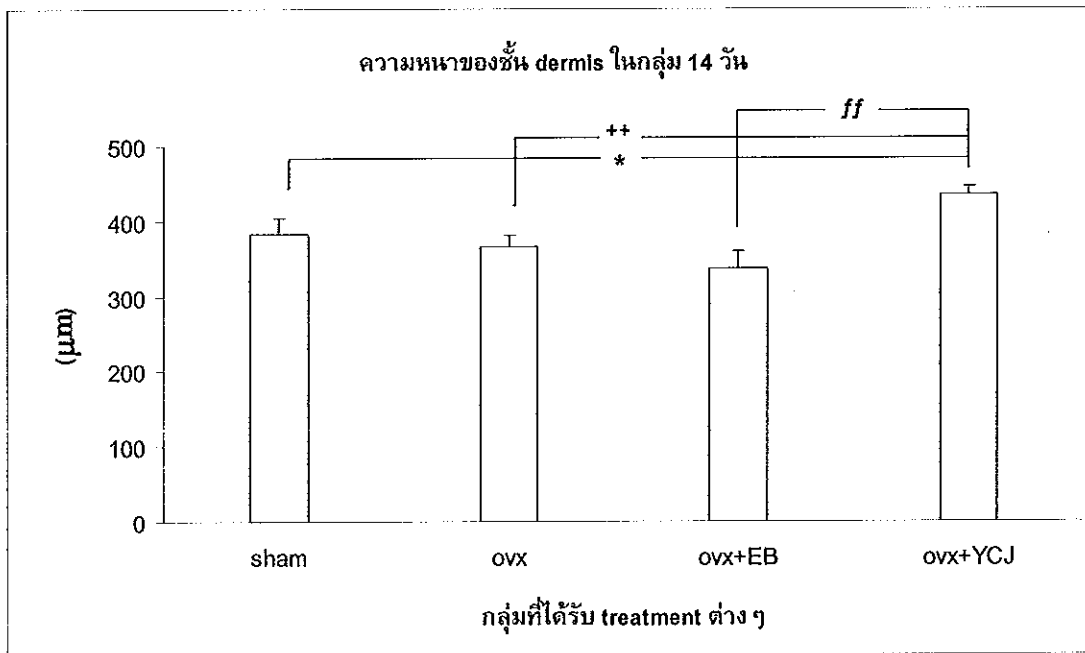


รูปที่ 3-21 กราฟแสดงความหนาของชั้น epidermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน

การตรวจสอบชั้น dermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเซลล์ fibroblasts แทรกอยู่ระหว่างคอลลาเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของชั้นนี้ นอกจากนี้ยังพบ sebaceous gland, hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ในชั้นนี้ด้วย ลักษณะการเรียงตัวของคอลลาเจน ในกลุ่ม ovx พบมีการเรียงตัวอย่างหลวมๆ ทำให้เห็นเป็นช่องว่างในชั้น dermis มากกว่าเมื่อเทียบกับอีกสามกลุ่มคือ sham ovx+EB และ ovx+YCJ ดังแสดงในรูปที่ 3-22 เมื่อวัดความหนาของชั้น dermis ( $\mu\text{m}$ ) ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าความหนาของชั้น dermis ในกลุ่ม ovx+YCJ ( $436.13 \pm 9.83$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx ( $365.41 \pm 15.67$ ) และกลุ่ม ovx+EB ( $336.59 \pm 23.15$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  และหนากว่ากลุ่ม sham ( $383.39 \pm 20.91$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-23



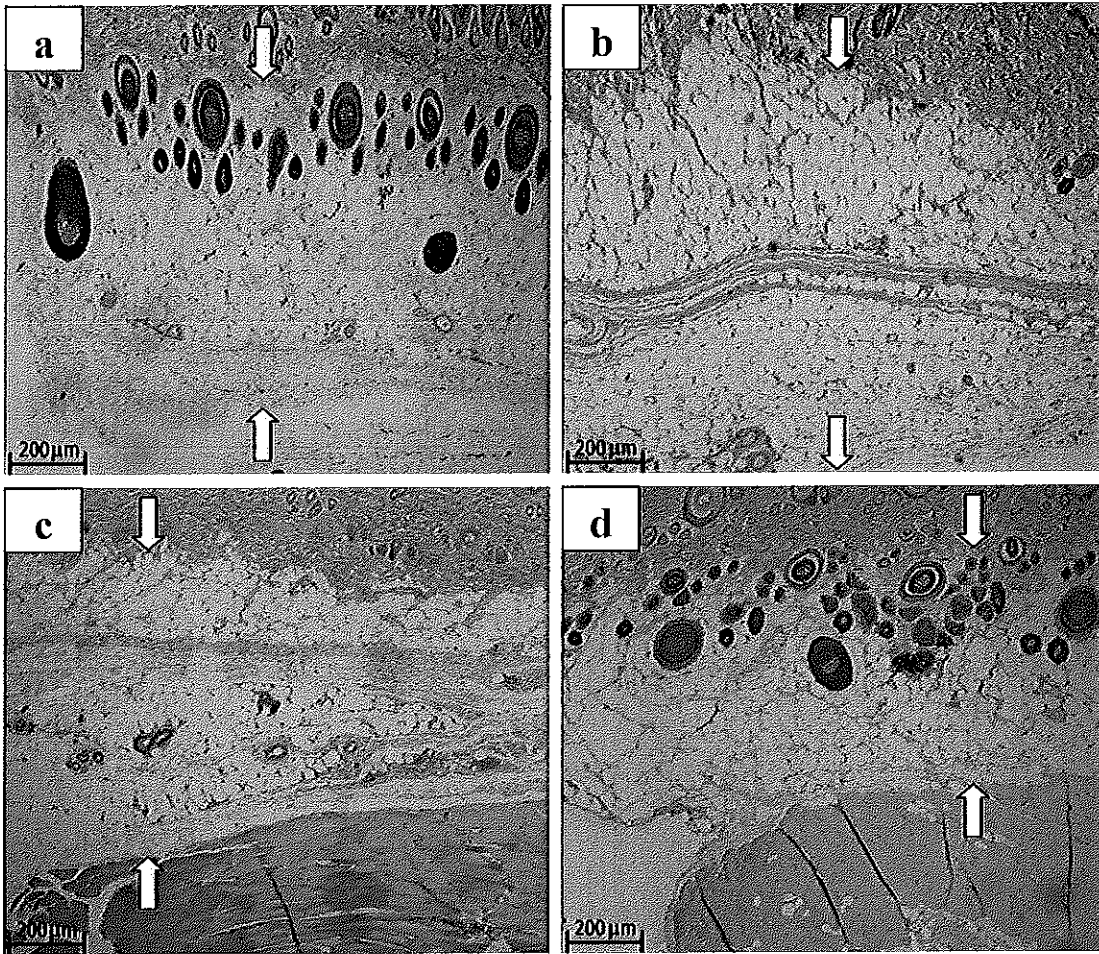
รูปที่ 3-22 แสดงชั้น dermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (10x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis และลูกศรชี้เหลืองแสดงขอบเขตของชั้น dermis



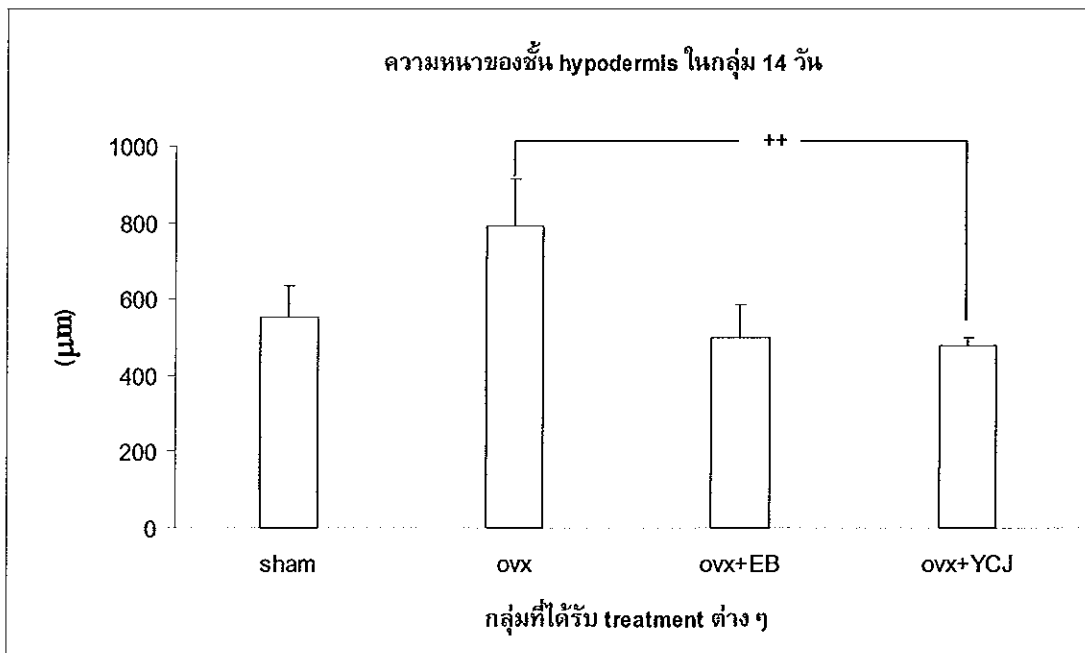
รูปที่ 3-23 กราฟแสดงความหนาของชั้น dermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน



การตรวจสอบชั้น hypodermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติกายใต้กล้องจุลทรรศน์  
ในกลุ่ม 14 วัน พบเป็นชั้นที่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก นอกจากนี้ยังพบ  
hair follicles และเส้นเลือดฝอยกระจายอยู่ในชั้นนี้ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 3-24 การวัดความหนา  
ของชั้น hypodermis ( $\mu\text{m}$ ) ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าความหนาของชั้น hypodermis  
ในกลุ่ม ovx ( $790.54 \pm 123.98$ ) มีความหนามากกว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $476.55 \pm 19.95$ ) อย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $552.54 \pm 79.25$ ) และ  
ovx+EB ( $498.87 \pm 86.20$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-25



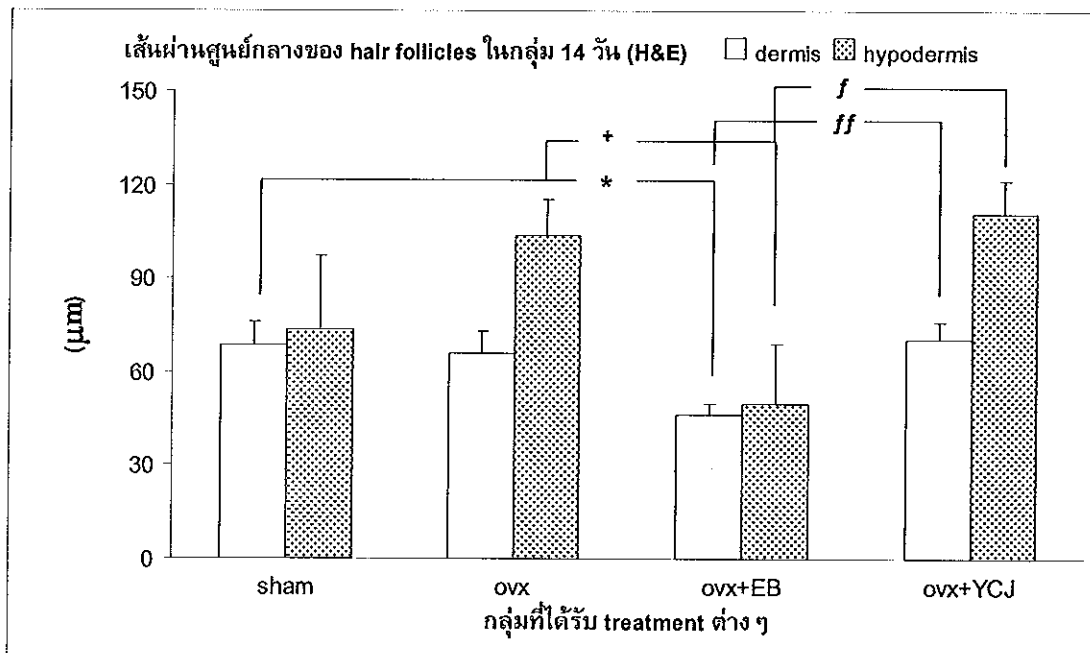
รูปที่ 3-24 แสดงชั้น hypodermis ของเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม hematoxylin and eosin (4x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ และลูกศรชี้เหลือง แสดงขอบเขตของชั้น hypodermis



รูปที่ 3-25 กราฟแสดงความหนาของชั้น hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติใน  
กลุ่ม 14 วัน

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยสีย้อม H&E ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis ด้วยโปรแกรม Microimage พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ( $\mu\text{m}$ ) ของกลุ่ม sham ( $68.69 \pm 7.11$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $70.24 \pm 5.80$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $46.23 \pm 3.68$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx ( $65.78 \pm 7.46$ ) สำหรับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น hypodermis พบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของกลุ่ม ovx+YCJ ( $110.91 \pm 10.24$ ) และกลุ่ม ovx ( $103.78 \pm 11.41$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $49.88 \pm 19.10$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $73.56 \pm 23.57$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-26

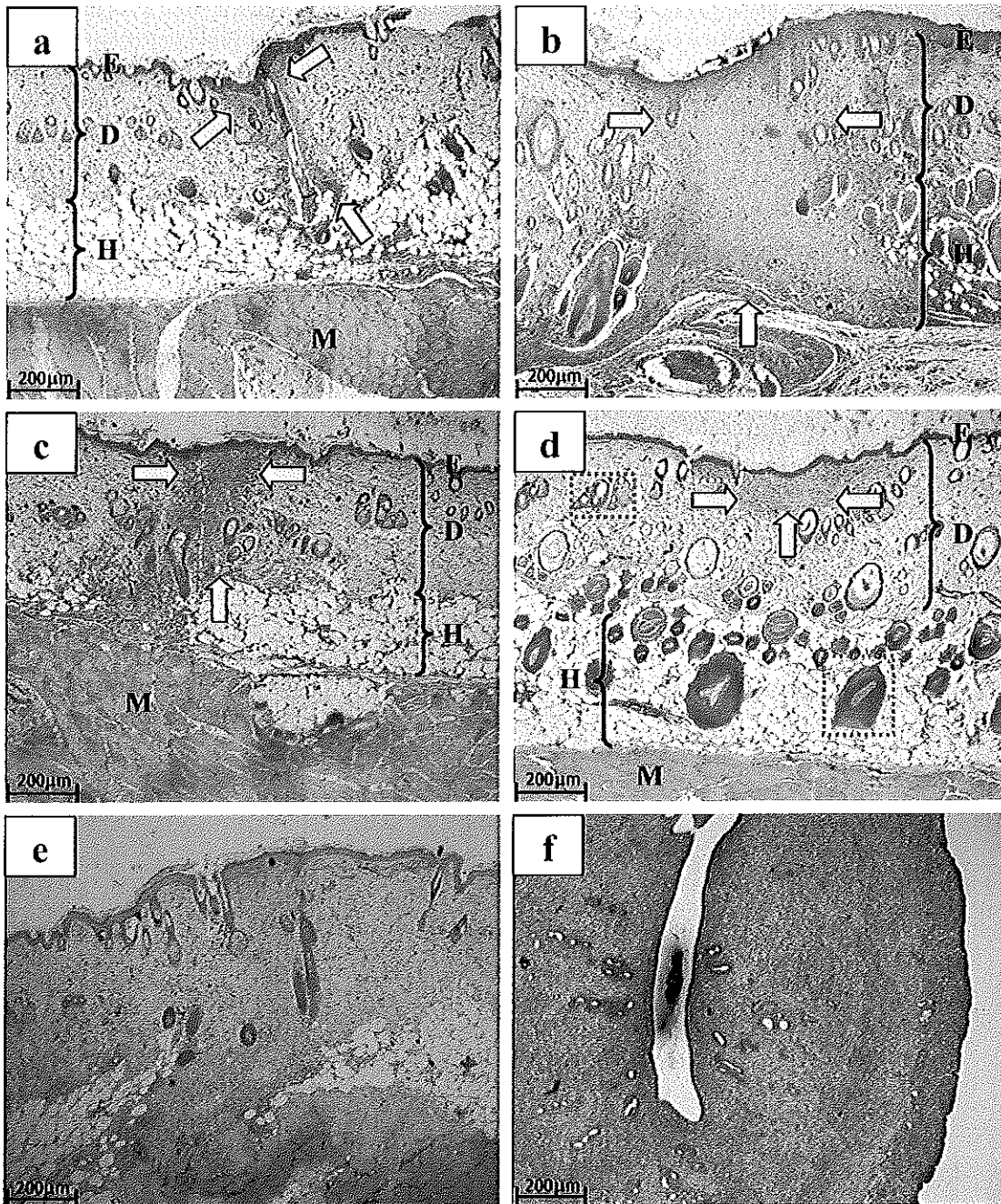


รูปที่ 3-26 กราฟแสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis และ hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน

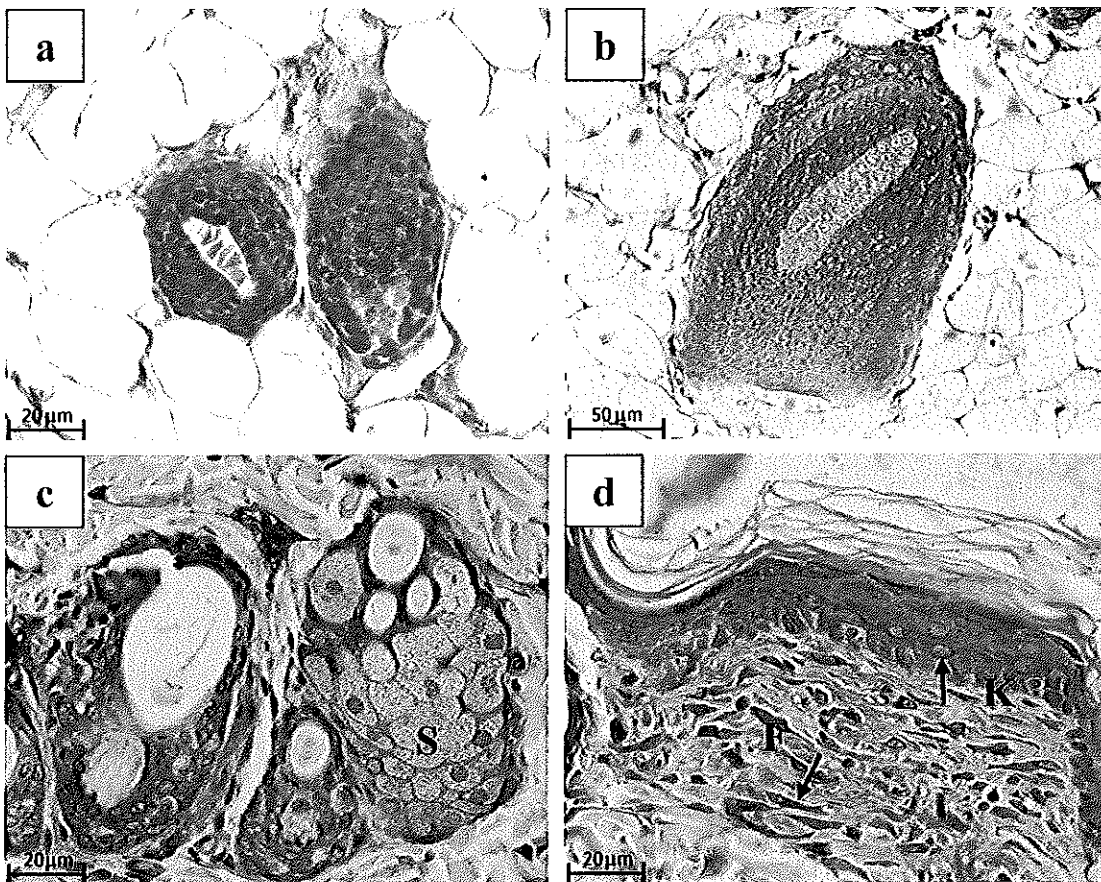
ง. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้  
ในกลุ่ม 14 วัน

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

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม ovx หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes (Ir+) หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างดังกล่าว ในชั้น dermis พบ granulation tissue (Ir+) ติดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้สังเกตเห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม ovx+YCJ น้อยที่สุด ในขณะที่กลุ่ม ovx มีขอบเขตของแผลมากที่สุด นอกจากเซลล์ keratinocytes และ granulation tissue ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  แล้ว ยังพบ hair follicles, panniculus carnosus และ sebaceous gland ที่ย้อมติดสีดังกล่าวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 3-27 และ 3-28



รูปที่ 3-27 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  (4x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, e = negative control และ counter stain ด้วย hematoxylin, f = positive control (uterus), E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis, M = panniculus carnosus และลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผล



รูปที่ 3-28 แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในกลุ่ม 14 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป 3-28a ขยายจากกรอบวงกลมสีเหลืองในรูป 3-27a แสดง hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x) แต่ติดสี counter stain ของ hematoxylin (สีน้ำเงิน) แทน

รูป 3-28b ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวในรูป 3-27d แสดง hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (20x)

รูป 3-28c ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงในรูป 3-27d แสดง sebaceous gland (S) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

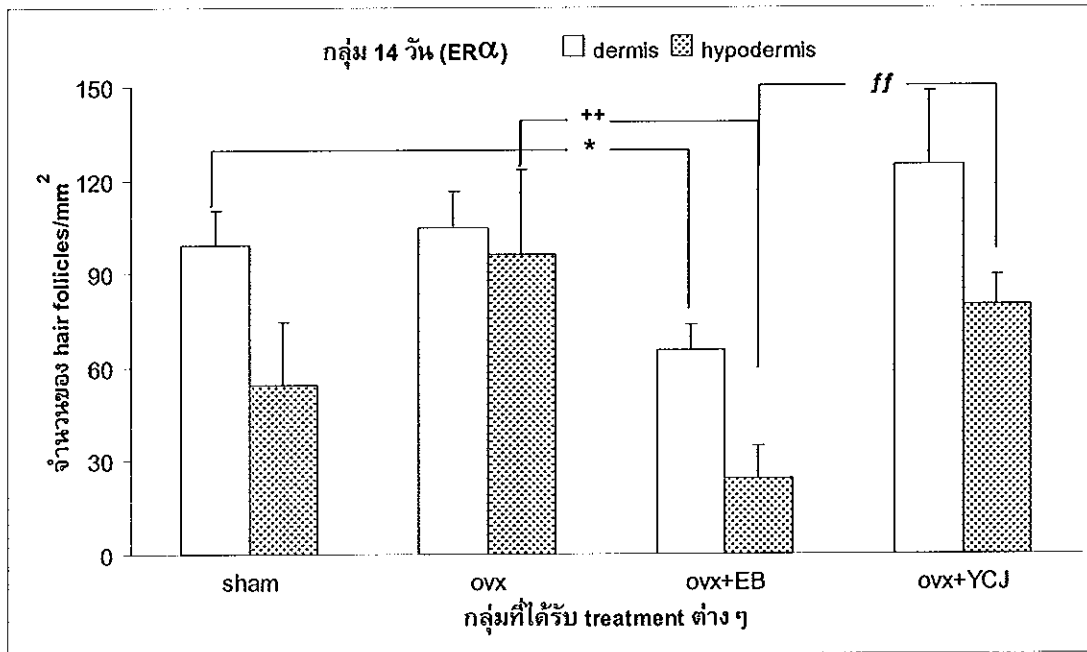
รูป 3-28d ขยายเท่าจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเหลืองในรูป 3-27d แสดง keratinocytes (K) และ fibroblasts (F) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)



การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม sham ( $99.17 \pm 10.92$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $65.50 \pm 8.02$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx ( $104.83 \pm 11.36$ ) และ ovx+YCJ ( $125.00 \pm 23.70$ ) สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น hypodermis พบว่าจำนวน hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ ( $80.17 \pm 9.38$ ) และกลุ่ม ovx ( $96.33 \pm 27.04$ ) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $24.00 \pm 10.84$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $54.17 \pm 20.54$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-29

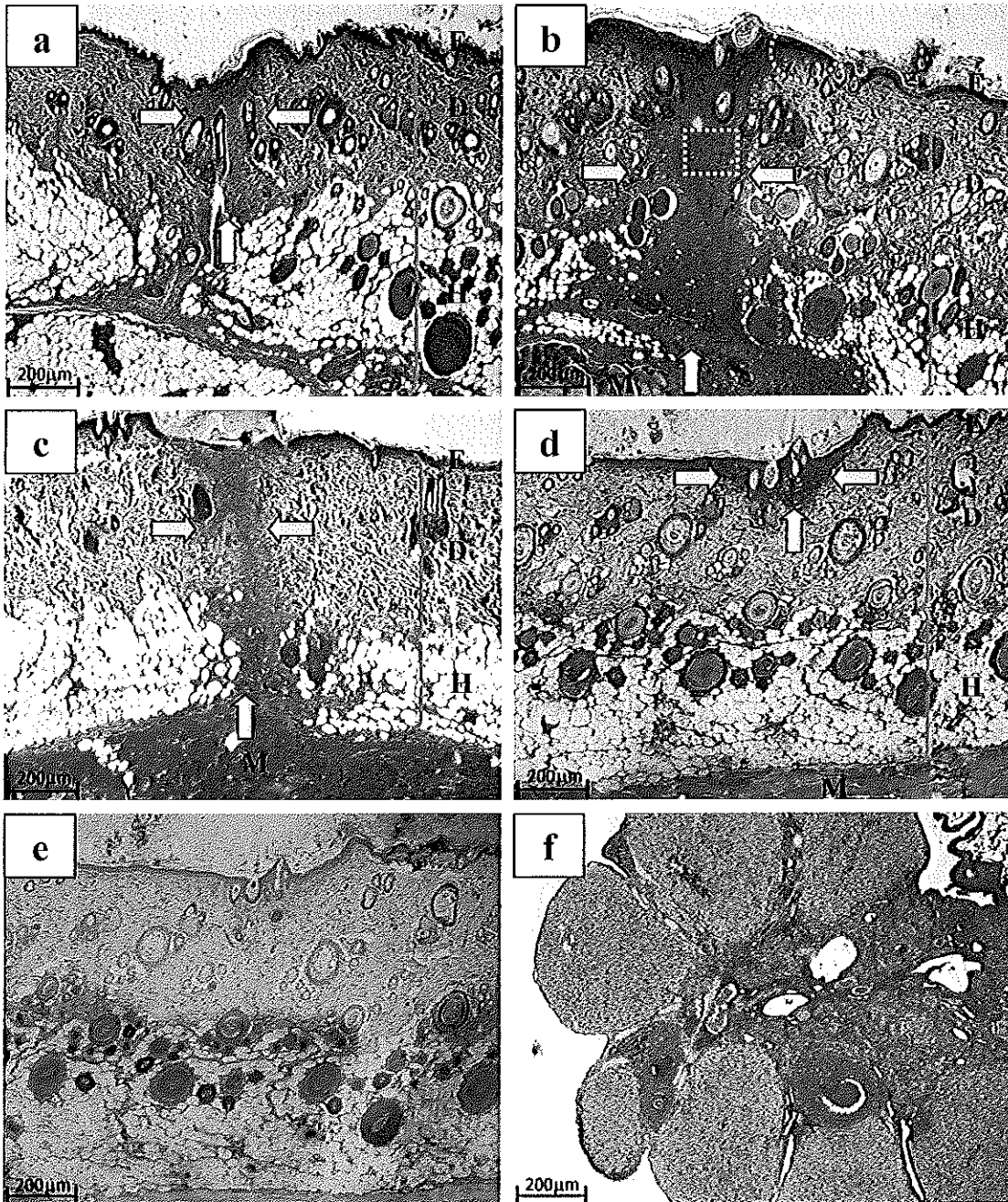
สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  พบว่ามีน้อยมาก และไม่มี ความแตกต่างเมื่อทดสอบทางสถิติ จึงไม่แสดงในผลการทดลองครั้งนี้



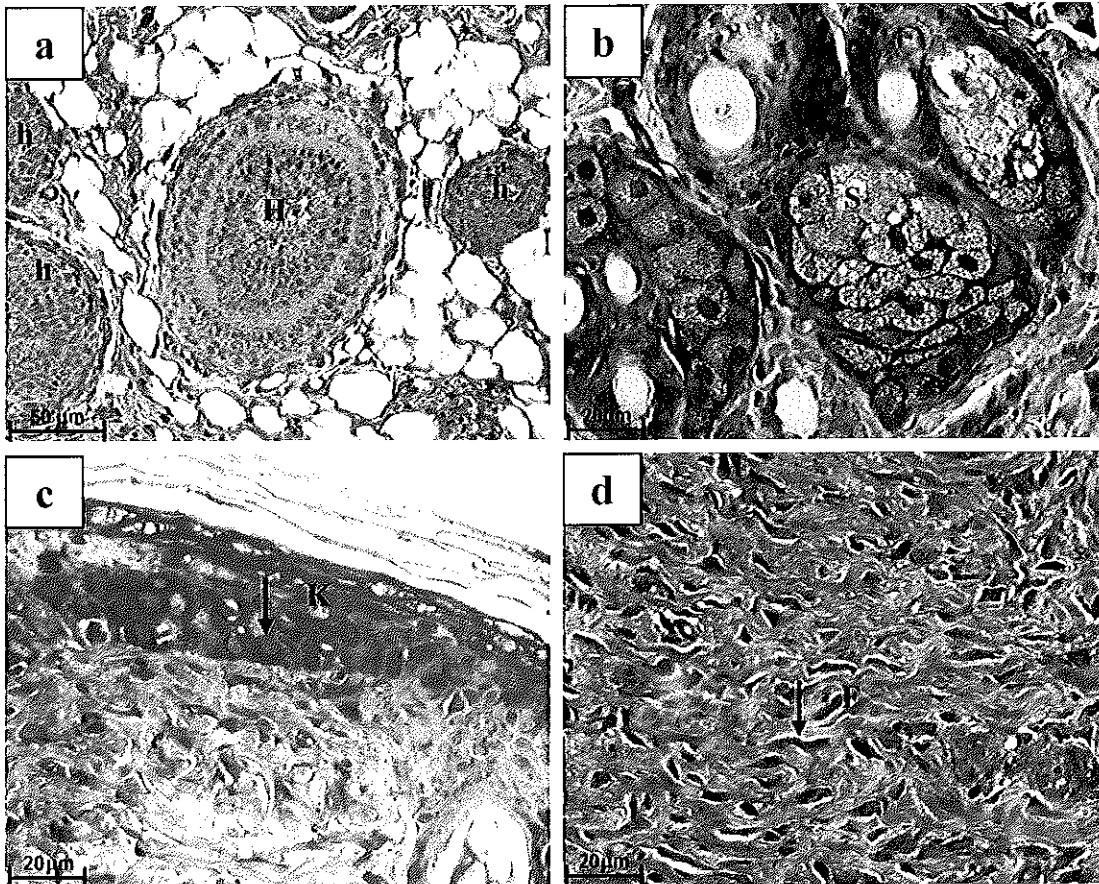
รูปที่ 3-29 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ในชั้น dermis และ hypodermis (mean $\pm$ SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน

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

ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของเนื้อเยื่อบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน พบชั้น epidermis ของกลุ่ม ovx หนาตัวมากกว่า มีการเรียงตัวของ keratinocytes (Ir+) หลายชั้นกว่าเมื่อเทียบกับชั้น epidermis ของเนื้อเยื่อปกติ ส่วนกลุ่มอื่นๆ ไม่พบความแตกต่างดังกล่าว ในชั้น dermis พบ granulation tissue (Ir+) ดัดสีน้ำตาลเข้ม ซึ่งประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว ชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ ECM ทำให้สังเกตเห็นขอบเขตของแผลในกลุ่ม ovx+YCJ น้อยที่สุด ในขณะที่กลุ่ม ovx มีขอบเขตของแผลมากที่สุด นอกจากเซลล์ keratinocytes และ granulation tissue ที่ดัดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  แล้ว ยังพบ hair follicles, panniculus carnosus และ sebaceous gland ที่ย้อมดัดสีดังกล่าวเช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 3-30 และ 3-31



รูปที่ 3-30 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  (4x) ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ, e = negative control และ counterstain ด้วย hematoxylin, f = positive control (ovary), E = epidermis, D = dermis, H = hypodermis, M = panniculus carnosus และลูกศรสีเหลืองแสดงขอบเขตของแผล



รูปที่ 3-31 แสดงโครงสร้างในเนื้อเยื่อผิวหนังที่ย้อมติดหรือไม่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในกลุ่ม 14 วัน ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

รูป 3-31a ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเขียวในรูป 3-30b แสดง hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (20x) โดย H = hair follicles ที่ย้อมติดสี ER $\beta$  มาก และ h = hair follicles ที่ย้อมติดสี ER $\beta$  น้อย โดยส่วนใหญ่ติดสี counterstain ของ hematoxylin (สีน้ำเงิน)

รูป 3-31b ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีแดงในรูป 3-30b แสดง sebaceous gland (S) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

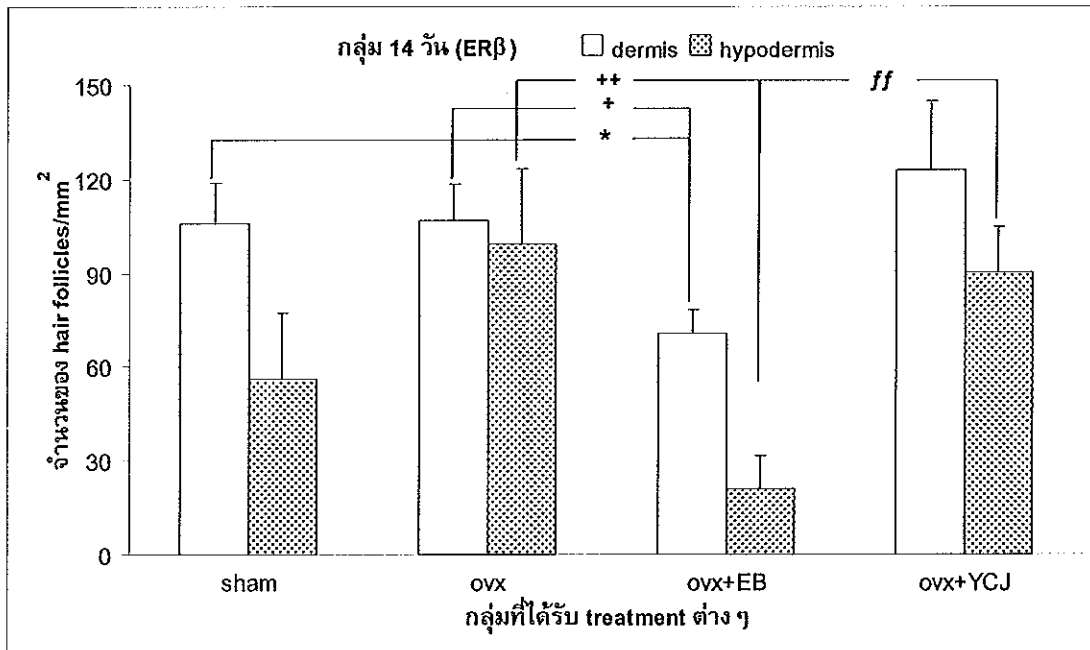
รูป 3-31c ขยายจากกรอบวงกลมสีเหลืองในรูป 3-30b แสดง keratinocytes (K) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

รูป 3-31d ขยายจากกรอบสี่เหลี่ยมสีเหลืองในรูป 3-30b แสดง fibroblasts (F) ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (40x)

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น dermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม sham (105.67 $\pm$ 13.28) และกลุ่ม ovx (107.00 $\pm$ 11.39) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB (70.50 $\pm$ 7.82) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx+YCJ (122.67 $\pm$ 22.33) สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ในชั้น hypodermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ (90.17 $\pm$ 14.88) และกลุ่ม ovx (99.33 $\pm$ 24.25) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB (20.83 $\pm$ 10.99) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham (56.17 $\pm$ 21.11) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-32

สำหรับจำนวนของ hair follicles ที่ไม่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  พบว่ามีน้อยมาก และไม่มีความแตกต่างเมื่อทดสอบทางสถิติ ซึ่งไม่แสดงในผลการทดลองครั้งนี้

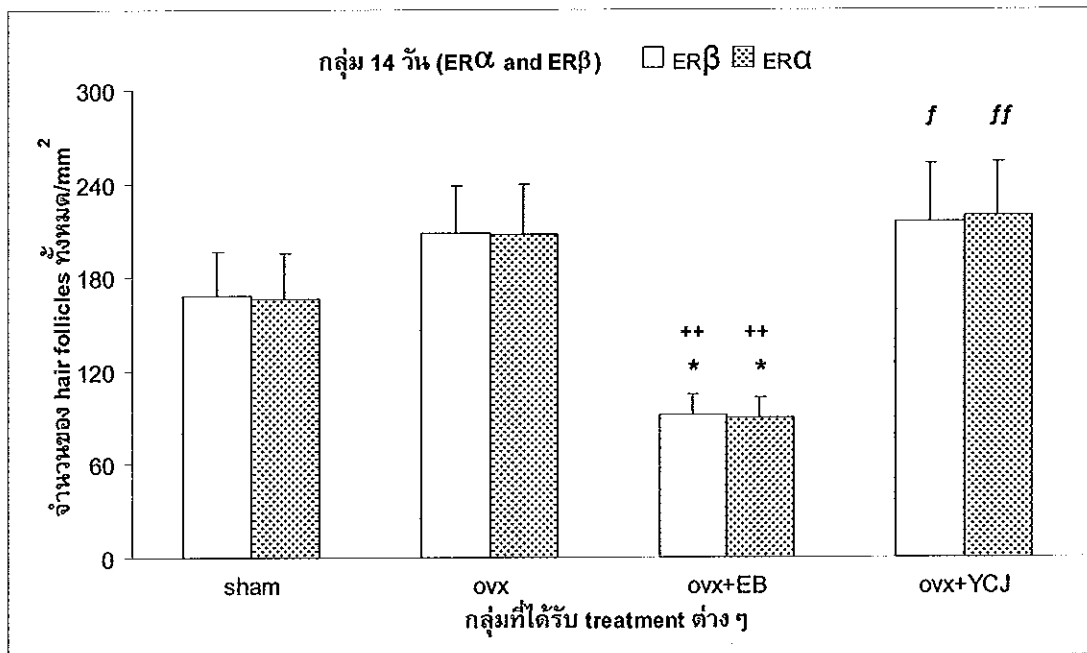


รูปที่ 3-32 กราฟแสดงจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERβ ในชั้น dermis และ hypodermis (mean±SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน

การตรวจสอบ hair follicles บริเวณเนื้อเยื่อปกติที่ย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม 14 วัน พบ hair follicles กระจายตัวทั้งในชั้น dermis และ hypodermis โดยจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในแต่ละชั้นจะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองต่างๆ ซึ่งจะได้กล่าวในรายละเอียดต่อไป

การนับจำนวนรวมของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\beta$  ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis พบว่าจำนวนของ hair follicles ของกลุ่ม sham (168.17 $\pm$ 27.84) และ ovx+YCJ (215.83 $\pm$ 37.03) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB (91.33 $\pm$ 13.41) ที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05 และกลุ่ม ovx (208.00 $\pm$ 30.92) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ที่ระดับนัยสำคัญ p<0.01 สำหรับจำนวนรวมของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis พบว่าจำนวนรวมของ hair follicles ของกลุ่ม ovx+YCJ (219.83 $\pm$ 34.07) และ ovx (207.17 $\pm$ 32.47) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB (89.67 $\pm$ 13.11) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ p<0.01 และกลุ่ม sham (166 $\pm$ 29.15) มากกว่ากลุ่ม ovx+EB ที่ระดับนัยสำคัญ p<0.05 ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-33

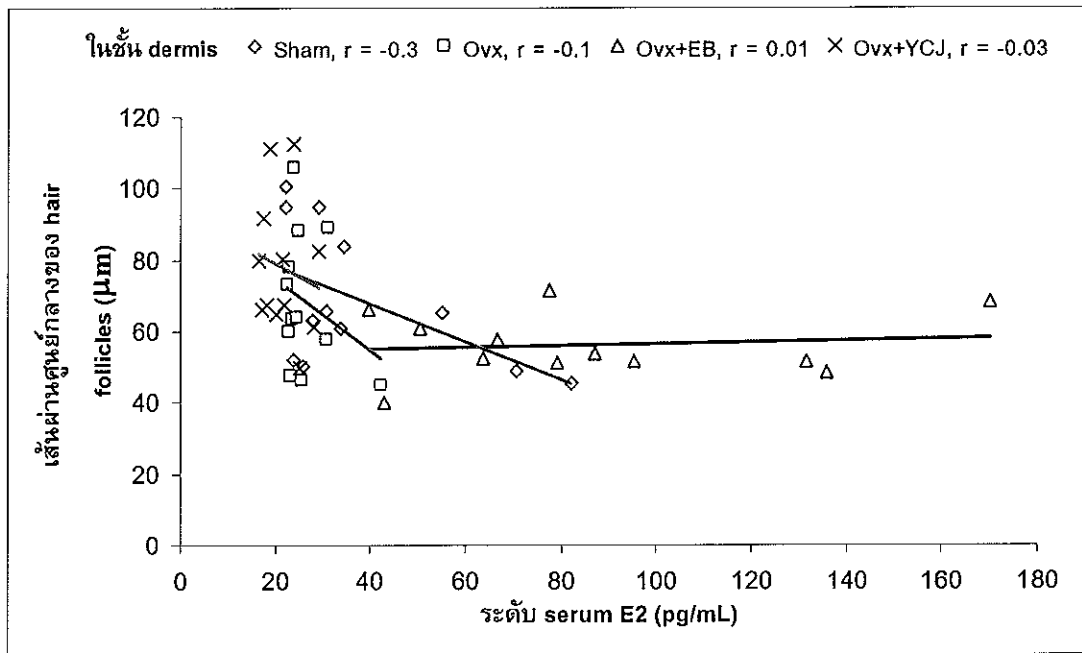




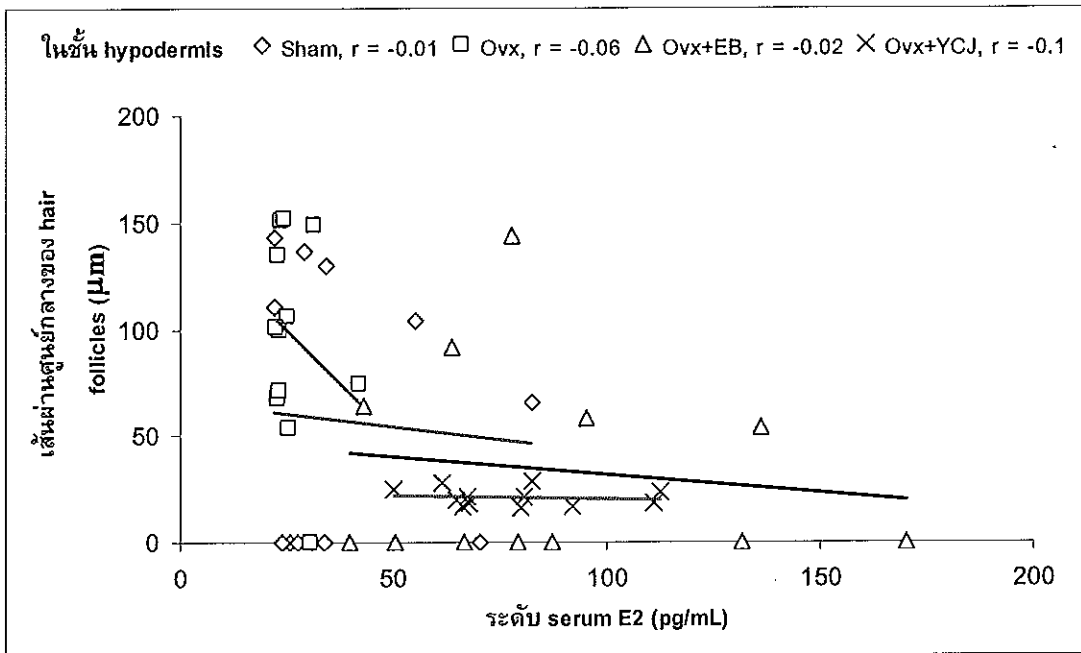
รูปที่ 3-33 กราฟแสดงจำนวนรวมของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis ที่ติดสีย้อมด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  (mean $\pm$ SEM) บริเวณเนื้อเยื่อปกติในกลุ่ม 14 วัน

การตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis กับค่า serum E2 ของกลุ่ม sham ( $r = -0.3$ ) ovx ( $r = -0.1$ ) และ ovx+YCJ ( $r = -0.03$ ) ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าเมื่อค่า serum E2 สูงขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles กลับลดลง แต่ในกลุ่ม ovx+EB ( $r = 0.01$ ) มีผลตรงข้ามคือเมื่อค่า serum E2 มากขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ก็มากขึ้นด้วย ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-34 ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น hypodermis กับค่า serum E2 ของกลุ่ม sham ( $r = -0.01$ ) ovx ( $r = -0.06$ ) ovx+EB ( $r = -0.02$ ) และ ovx+YCJ ( $r = -0.1$ ) ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าเมื่อค่า serum E2 มากขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles กลับลดลง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-35

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนของ hair follicles ทั้งในชั้น dermis และ hypodermis กับค่า serum E2 ของกลุ่ม sham, ovx, ovx+EB และ ovx+YCJ ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่ามีรูปแบบความสัมพันธ์เช่นเดียวกับกราฟรูปที่ 3-35 คือเมื่อค่า serum E2 มากขึ้น จำนวนของ hair follicles ลดลง แต่ไม่ได้แสดงกราฟดังกล่าว ณ ที่นี้



รูปที่ 3-34 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น dermis กับค่า serum E2 โดยกราฟสีน้ำเงินคือกลุ่ม sham กราฟสีเขียวคือกลุ่ม ovx กราฟสีดำคือกลุ่ม ovx+EB กราฟสีแดงคือกลุ่ม ovx+YCJ

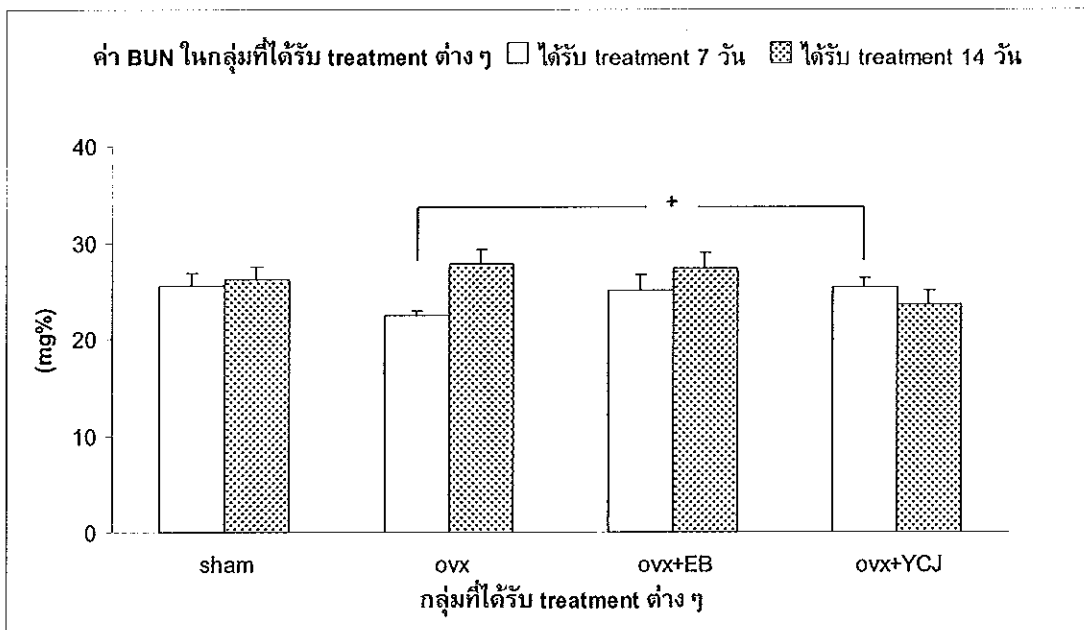


รูปที่ 3-35 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในชั้น hypodermis กับค่า serum E2 โดยกราฟสีน้ำเงินคือกลุ่ม sham กราฟสีเขียวคือกลุ่ม ovx กราฟสีดำคือกลุ่ม ovx+EB กราฟสีแดงคือกลุ่ม ovx+YCJ

### 3. ค่าทางเคมีคลินิกต่าง ๆ ในซีรัมของเลือดหนู

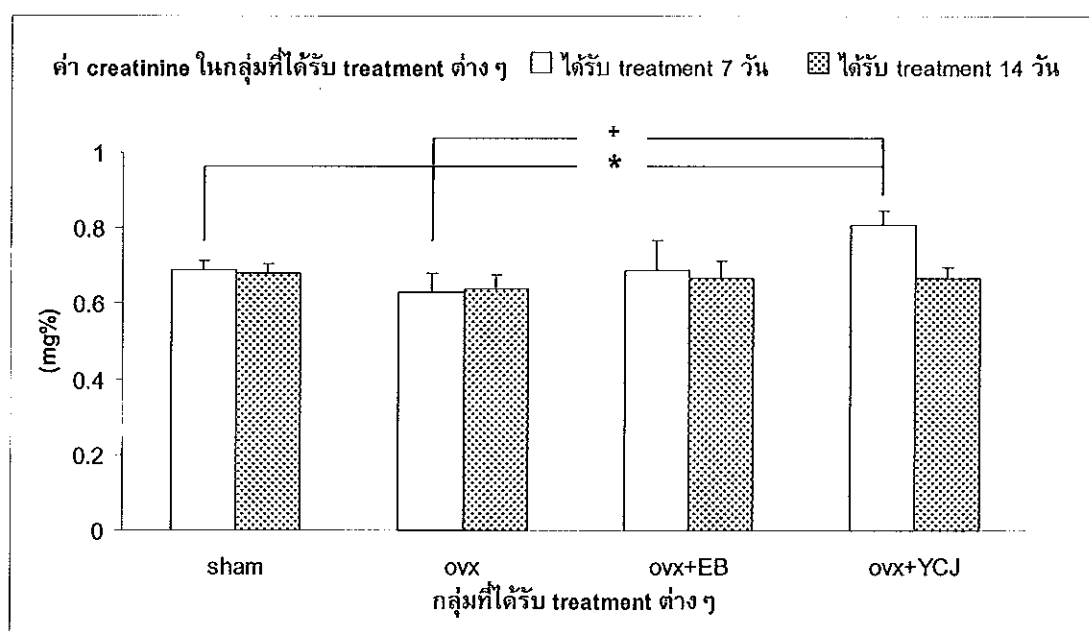
#### 3.1. การวิเคราะห์ค่า BUN (mg%) และ creatinine (mg%) ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า BUN ในซีรัมของเลือดหนูด้วยวิธีทางเคมีคลินิกในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $25.35 \pm 1.02$ ) มีค่า BUN สูงกว่ากลุ่ม ovx ( $22.47 \pm 0.52$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $25.52 \pm 1.33$ ) และกลุ่ม ovx+EB ( $25.10 \pm 1.51$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า BUN ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $26.13 \pm 1.37$ ) ovx ( $27.87 \pm 1.35$ ) ovx+EB ( $27.27 \pm 1.66$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $23.65 \pm 1.32$ ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-36



รูปที่ 3-36 กราฟแสดงค่า BUN (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

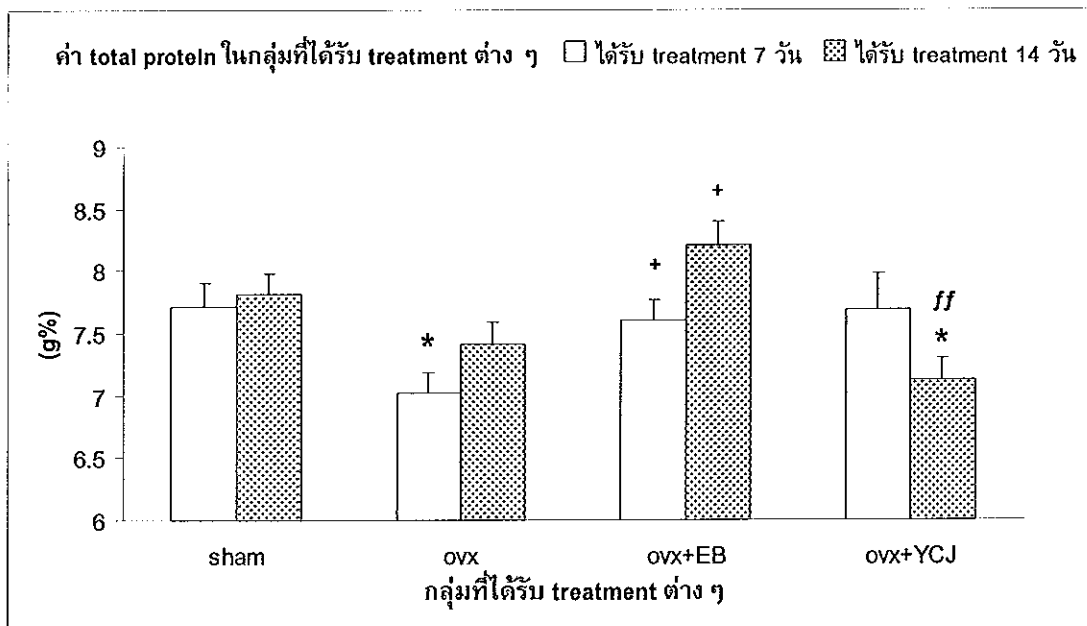
การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine ในซีรัมของเลือดหนูด้วยวิธีทางเคมีคลินิกในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $0.81 \pm 0.04$ ) มีค่า creatinine สูงกว่ากลุ่ม sham ( $0.69 \pm 0.02$ ) และ ovx ( $0.63 \pm 0.05$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx+EB ( $0.69 \pm 0.08$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $0.68 \pm 0.02$ ) ovx ( $0.64 \pm 0.04$ ) ovx+EB ( $0.67 \pm 0.04$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $0.67 \pm 0.03$ ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-37



รูปที่ 3-37 กราฟแสดงค่า creatinine (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

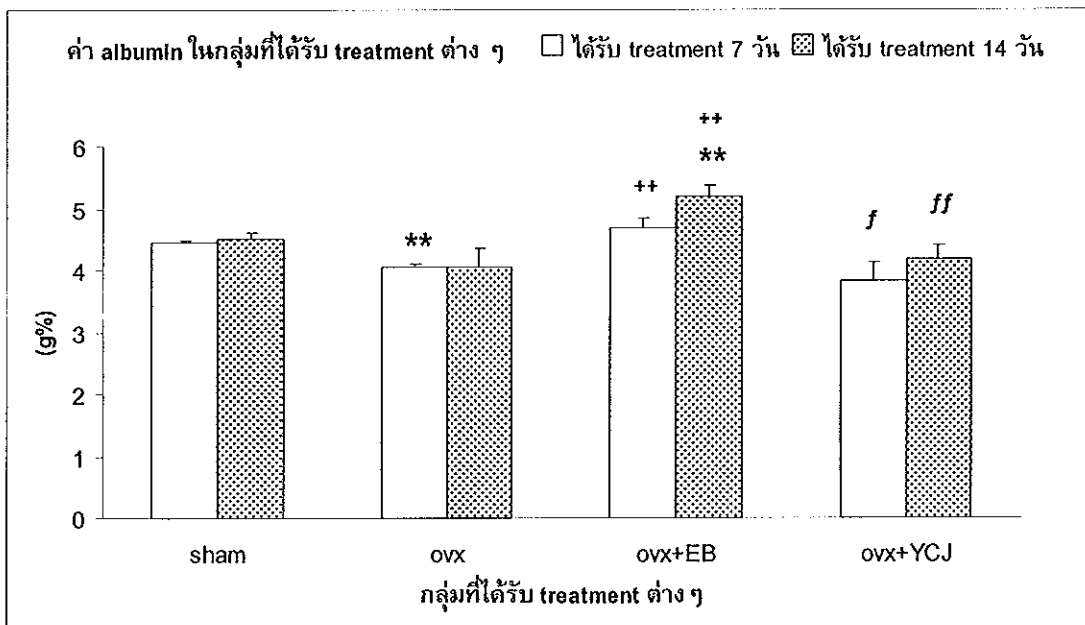
### 3.2. การวิเคราะห์ค่า total protein (g%) albumin (g%) ALP (U/L) AST (U/L) และ ALT (U/L) ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า total protein ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB ( $7.6\pm 0.16$ ) และกลุ่ม sham ( $7.72\pm 0.19$ ) มีค่า total protein สูงกว่ากลุ่ม ovx ( $7.02\pm 0.17$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p<0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx+YCJ ( $7.68\pm 0.29$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า total protein ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $7.82\pm 0.17$ ) และกลุ่ม ovx+EB ( $8.20\pm 0.19$ ) มีค่า total protein สูงกว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $7.12\pm 0.18$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p<0.05$  และ  $p<0.01$  ตามลำดับ นอกจากนี้กลุ่ม ovx+EB ยังพบมีค่า total protein สูงกว่ากลุ่ม ovx ( $7.42\pm 0.17$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p<0.05$  อีกด้วย ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-38



รูปที่ 3-38 กราฟแสดงค่า total protein (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

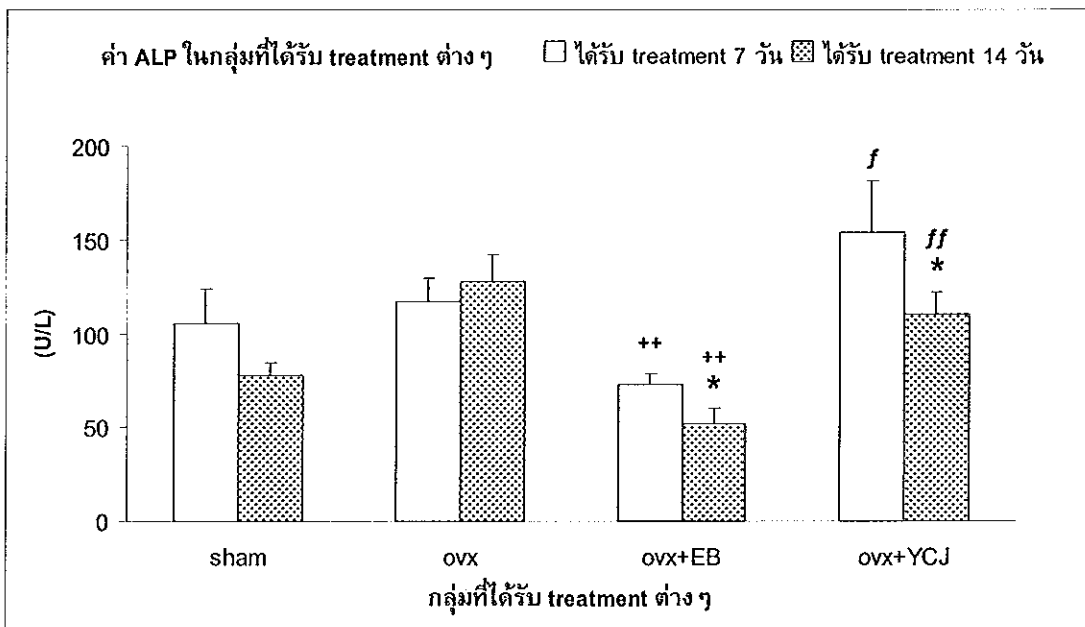
การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า albumin ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB ( $4.68 \pm 0.15$ ) และกลุ่ม sham ( $4.45 \pm 0.04$ ) มีค่า albumin สูงกว่ากลุ่ม ovx ( $4.05 \pm 0.06$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  นอกจากนี้กลุ่ม ovx+EB ยังพบมีค่า albumin สูงกว่ากลุ่ม ovx+YCJ ( $3.82 \pm 0.32$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  อีกด้วย สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า albumin ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB ( $5.20 \pm 0.16$ ) มีค่า albumin สูงกว่ากลุ่ม sham ( $4.52 \pm 0.09$ ) กลุ่ม ovx ( $4.05 \pm 0.29$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $4.18 \pm 0.22$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-39



รูปที่ 3-39 กราฟแสดงค่า albumin (mean±SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

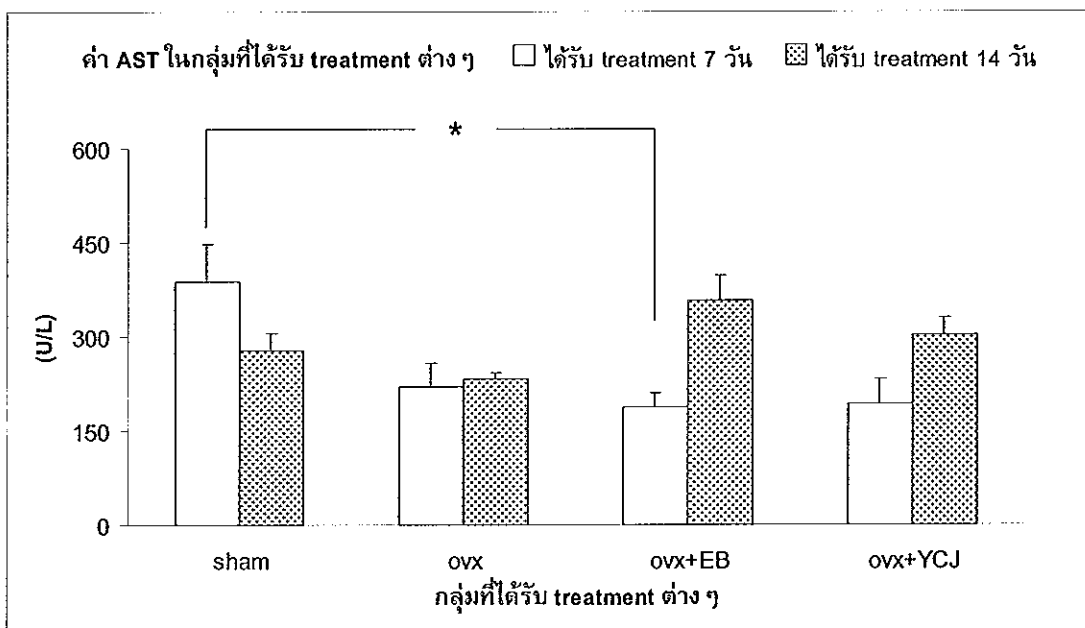


การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า ALP ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx ( $116.83 \pm 12.98$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $154.25 \pm 27.20$ ) มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $72.83 \pm 5.59$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  และ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $105.17 \pm 18.69$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า ALP ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham ( $77.67 \pm 6.73$ ) กลุ่ม ovx ( $127.80 \pm 14.21$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $110.50 \pm 12.05$ ) มีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม ovx+EB ( $51.67 \pm 8.63$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$   $p < 0.01$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ นอกจากนี้กลุ่ม ovx+YCJ ยังพบมีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  อีกด้วยดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-40



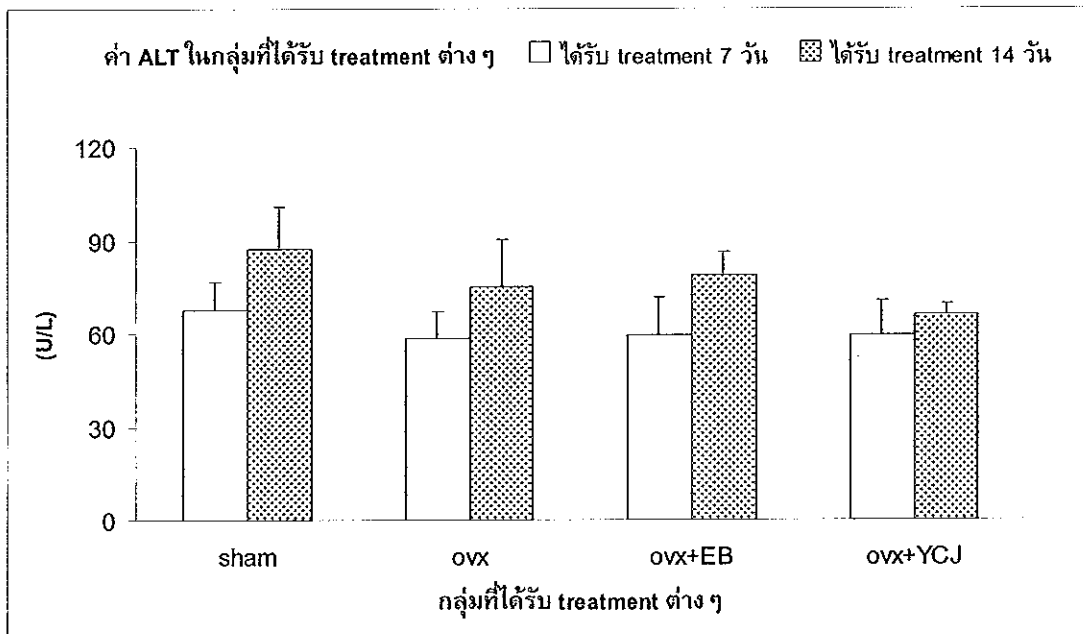
รูปที่ 3-40 กราฟแสดงค่า ALP (mean±SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า AST ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม sham (388.00±59.28) มีค่า AST สูงกว่ากลุ่ม ovx+EB (188.60±20.66) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx (219.67±37.82) และ ovx+YCJ (193.33±38.50) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า AST ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม sham (277.25±26.84) ovx (233.50±8.62) ovx+EB (358.00±38.95) และกลุ่ม ovx+YCJ (301.67±27.71) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-41



รูปที่ 3-41 กราฟแสดงค่า AST (mean±SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

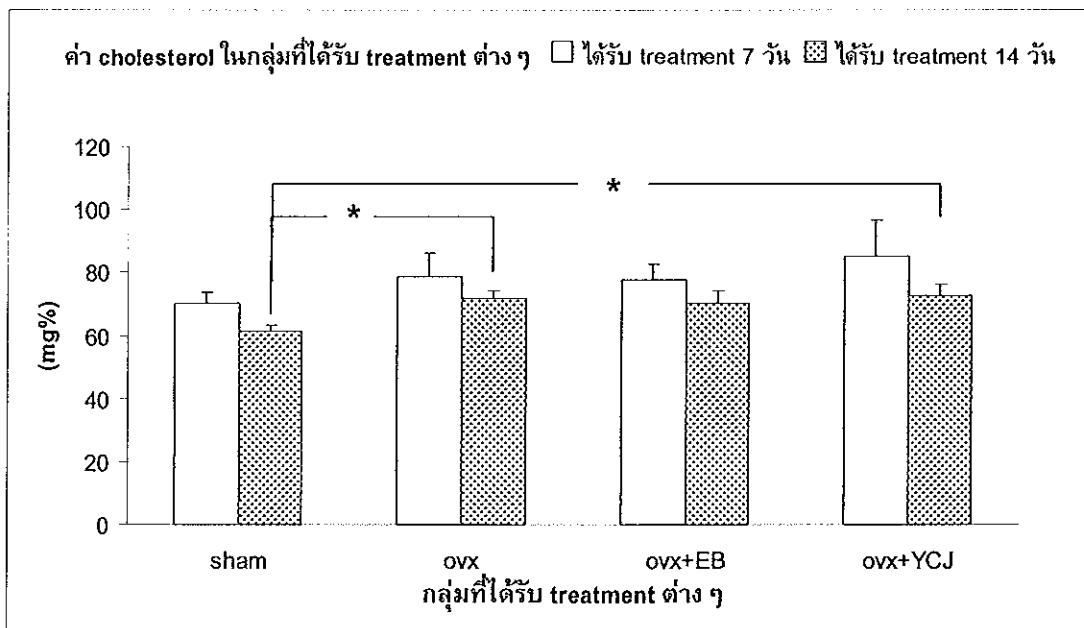
การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า ALT ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $67.50 \pm 8.98$ ) ovx ( $58.33 \pm 8.52$ ) ovx+EB ( $59.33 \pm 12.38$ ) และ ovx+YCJ ( $59.50 \pm 11.20$ ) เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของค่า ALT ในกลุ่ม 14 วัน ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $87.17 \pm 13.81$ ) ovx ( $75.33 \pm 15.04$ ) ovx+EB ( $78.67 \pm 7.43$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $65.83 \pm 3.96$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-42



รูปที่ 3-42 กราฟแสดงค่า ALT (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

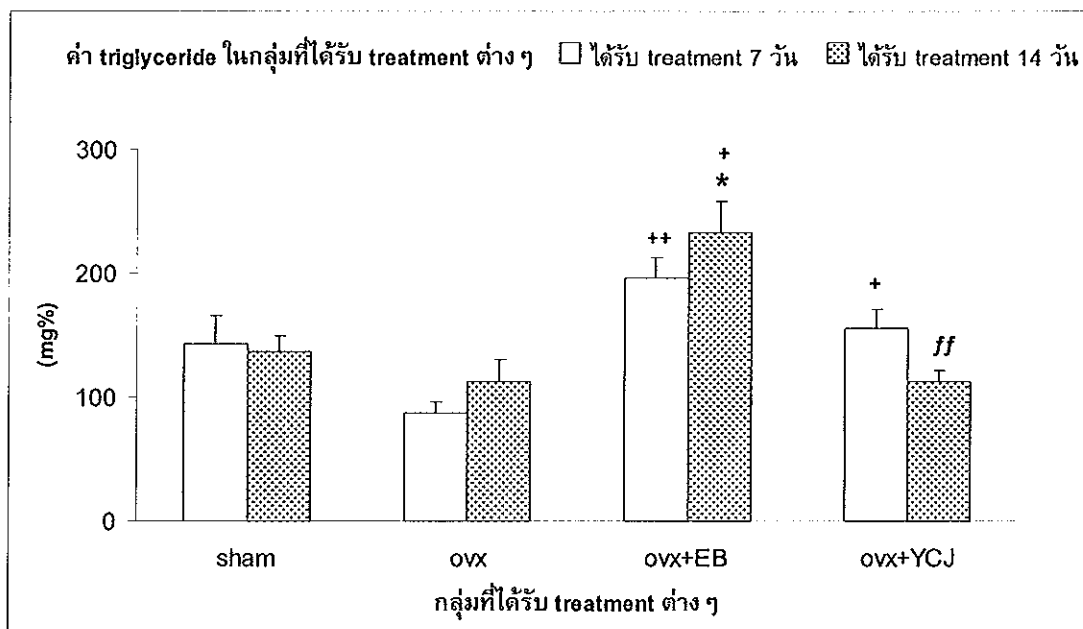
### 3.3. การวิเคราะห์ค่า cholesterol (mg%) triglyceride (mg%) HDL (mg%) และ LDL (mg%) ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า cholesterol ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $70.00 \pm 3.61$ ) ovx ( $78.67 \pm 7.27$ ) ovx+EB ( $77.83 \pm 4.81$ ) และ ovx+YJC ( $85.33 \pm 11.17$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า cholesterol ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx ( $71.67 \pm 2.44$ ) และกลุ่ม ovx+YJC ( $72.67 \pm 3.54$ ) มีค่า cholesterol สูงกว่ากลุ่ม sham ( $61.33 \pm 2.08$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx+EB ( $70.33 \pm 4.02$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-43



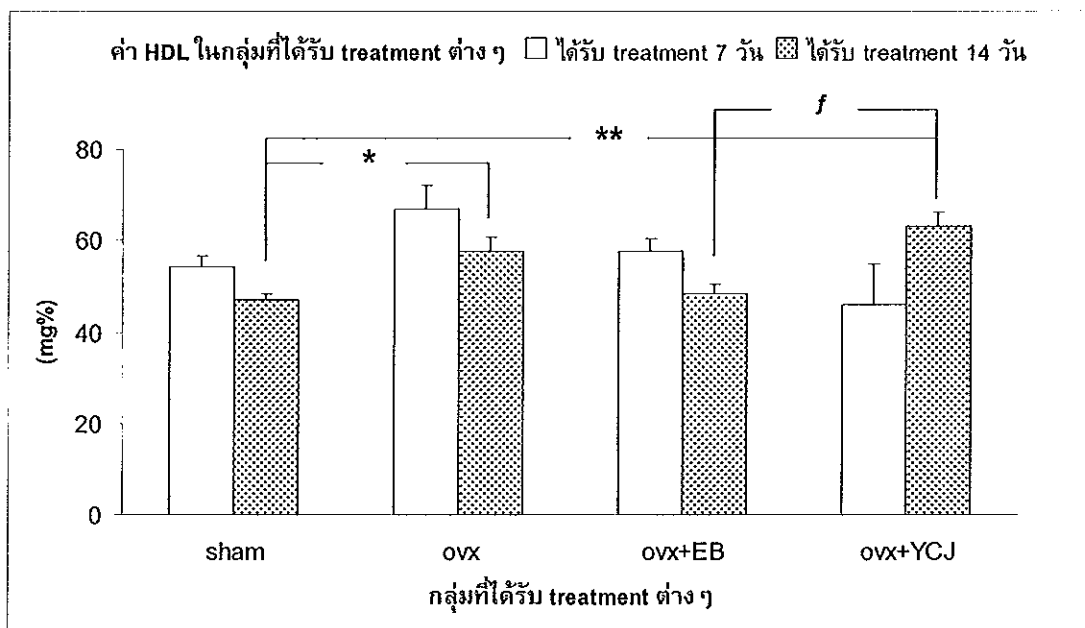
รูปที่ 3-43 กราฟแสดงค่า cholesterol (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า triglyceride ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB ( $195.83 \pm 16.61$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $155.17 \pm 15.99$ ) มีค่า triglyceride สูงกว่ากลุ่ม ovx ( $86.83 \pm 9.49$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.01$  และ  $p < 0.05$  ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม sham ( $143.33 \pm 21.96$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า triglyceride ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+EB ( $233.00 \pm 25.23$ ) มีค่า triglyceride สูงกว่ากลุ่ม sham ( $137.17 \pm 11.57$ ) กลุ่ม ovx ( $113.17 \pm 17.84$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $112.83 \pm 8.89$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$   $p < 0.05$  และ  $p < 0.01$  ตามลำดับ ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-44



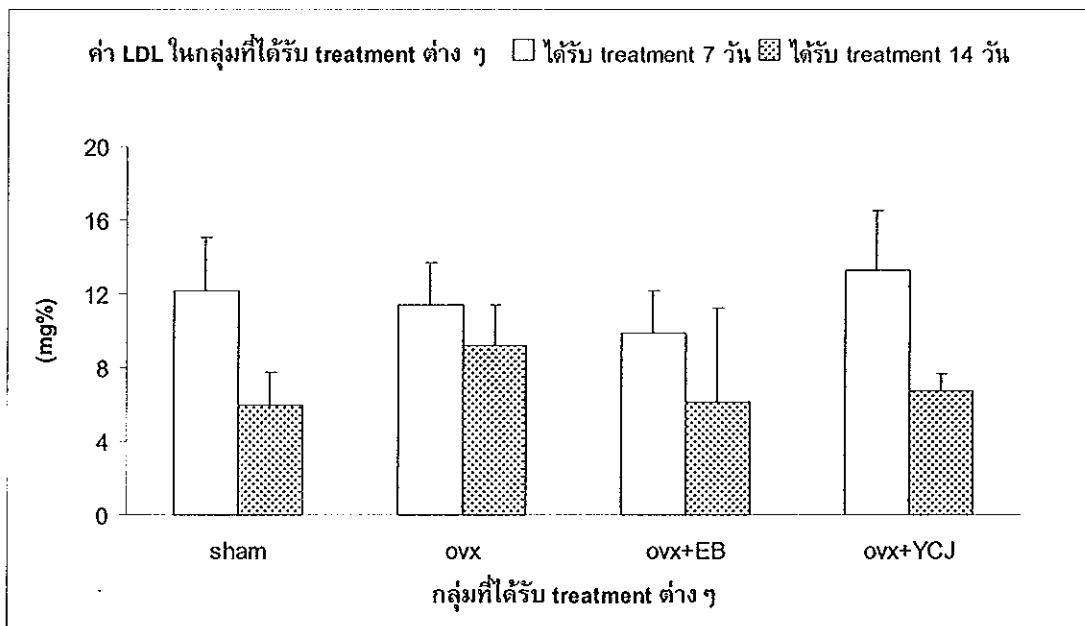
รูปที่ 3-44 กราฟแสดงค่า triglyceride (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า HDL ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $54.08 \pm 2.42$ ) ovx ( $66.82 \pm 5.36$ ) ovx+EB ( $57.57 \pm 2.98$ ) และ ovx+YCJ ( $46.05 \pm 9.03$ ) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่า HDL ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx ( $57.57 \pm 3.20$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $63.12 \pm 3.04$ ) มีค่า HDL สูงกว่ากลุ่ม sham ( $47.05 \pm 1.32$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ  $p < 0.05$  แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่ม ovx+EB ( $48.58 \pm 1.73$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-45



รูปที่ 3-45 กราฟแสดงค่า HDL (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า LDL ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $12.13 \pm 2.92$ ) ovx ( $11.43 \pm 2.24$ ) ovx+EB ( $9.88 \pm 2.31$ ) และ ovx+YCJ ( $13.25 \pm 3.28$ ) เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของค่า LDL ในกลุ่ม 14 วัน ที่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม sham ( $5.98 \pm 1.77$ ) ovx ( $9.17 \pm 2.27$ ) ovx+EB ( $6.10 \pm 5.14$ ) และกลุ่ม ovx+YCJ ( $6.73 \pm 0.89$ ) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-46



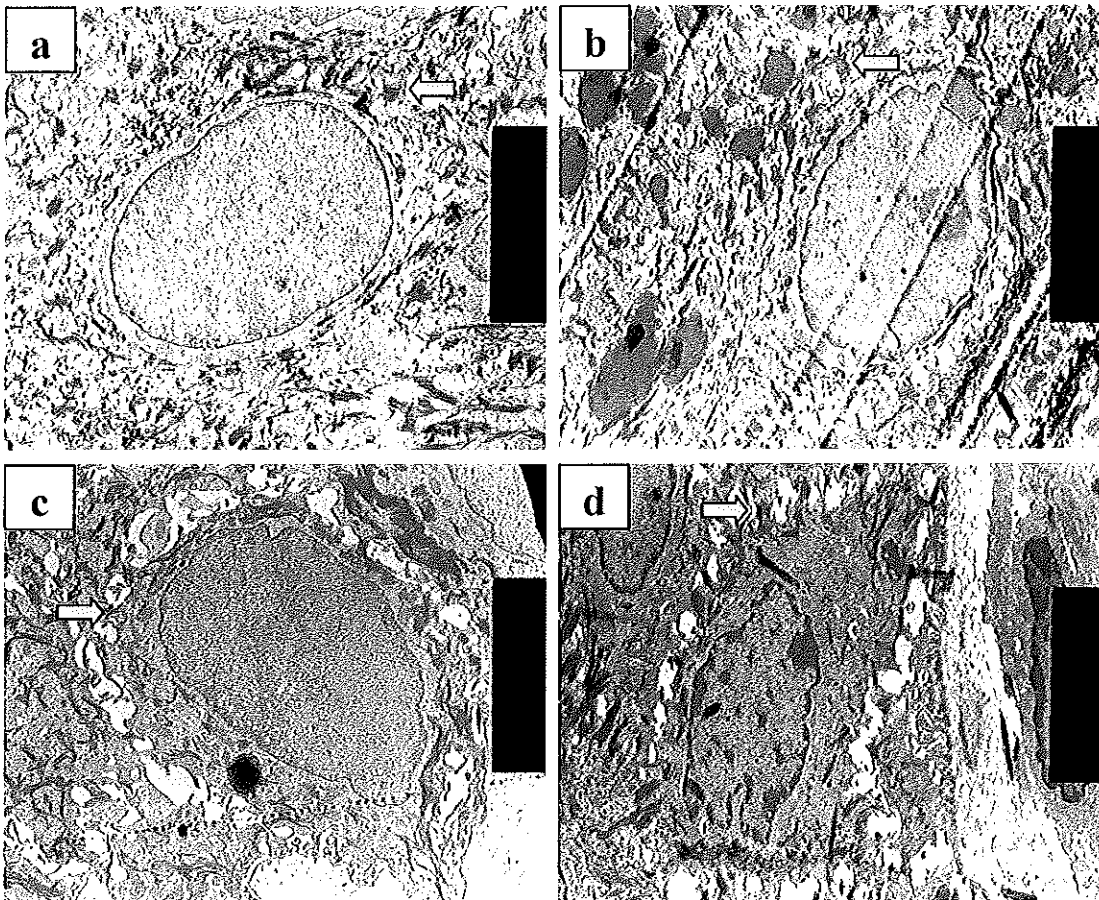
รูปที่ 3-46 กราฟแสดงค่า LDL (mean $\pm$ SEM) ในกลุ่ม 7 วัน (กราฟแท่งสีขาว) และ 14 วัน (กราฟแท่งลายจุด)

#### 4. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณแผลจากการศึกษาด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

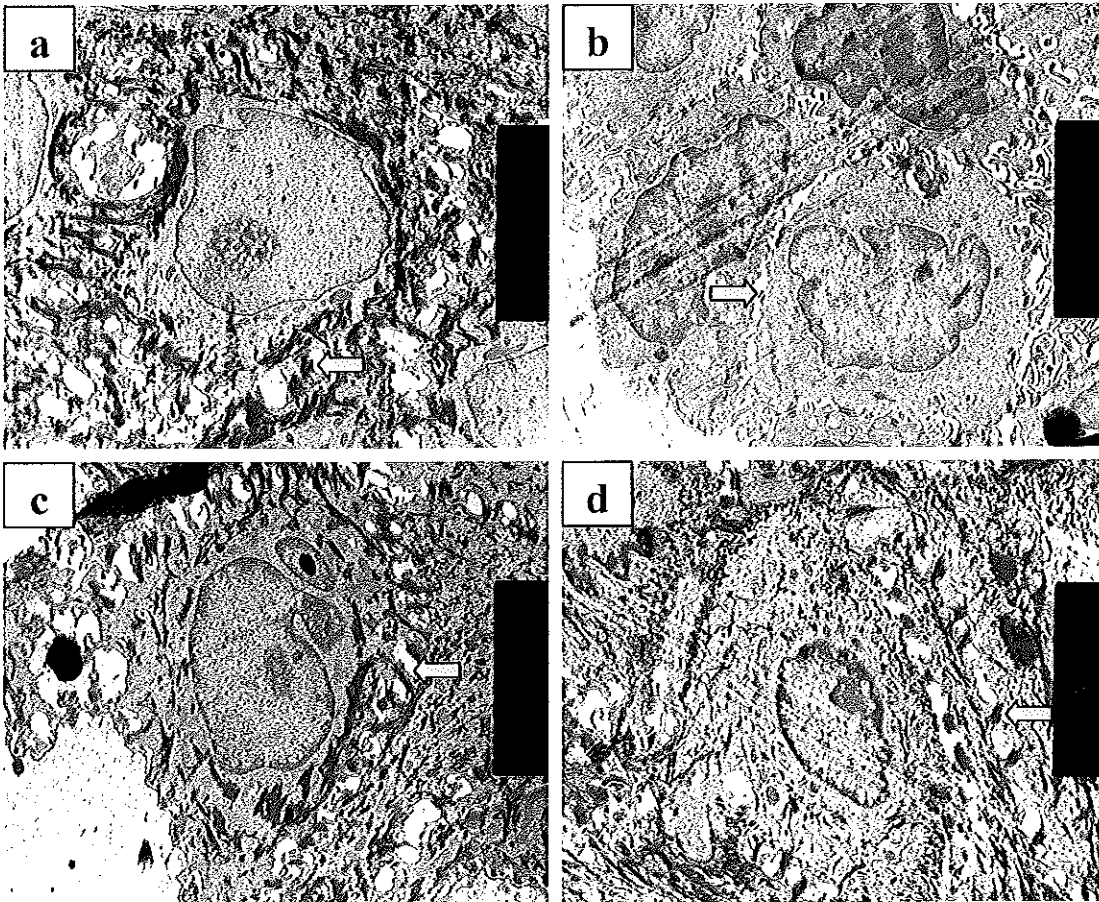
จากการสังเกต epidermis บริเวณแผลด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอน (TEM) ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าแนวโน้มขนาดของเซลล์ keratinocytes ในกลุ่ม sham เท่ากับกลุ่ม ovx+EB เท่ากับกลุ่ม ovx+YcJ เท่ากับกลุ่ม ovx (sham=ovx+EB=ovx=ovx+YcJ) ส่วนโครงสร้างของเซลล์ keratinocytes เช่น cytoplasmic process ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม sham ovx ovx+EB และ ovx+YcJ ดังแสดงในรูปที่ 3-47

สำหรับกลุ่ม 14 วัน พบว่าแนวโน้มขนาดของเซลล์ keratinocytes ของกลุ่ม ovx เล็กกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กลุ่ม sham ovx+EB และ ovx+YcJ ไม่พบความแตกต่างของขนาดเซลล์ keratinocytes ระหว่างกลุ่ม (sham=ovx+EB=ovx+YcJ>ovx) นอกจากนี้ในกลุ่ม ovx ยังพบมี cytoplasmic process ขนาดเล็กและจำนวนน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ด้วย สำหรับกลุ่ม sham ovx+EB และ ovx+YcJ ไม่พบความแตกต่างของขนาดและจำนวนของ cytoplasmic process ดังแสดงในรูปที่ 3-48





รูปที่ 3-47 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยเทคนิค TEM ในกลุ่ม 7 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YcJ และลูกศรชี้เหลืองแสดง cytoplasmic process ของ keratinocytes (x6000)



รูปที่ 3-48 แสดงเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลที่ย้อมด้วยเทคนิค TEM ในกลุ่ม 14 วัน โดย a = sham, b = ovx, c = ovx+EB, d = ovx+YCJ และลูกศรชี้เหลืองแสดง cytoplasmic process ของ keratinocytes (x6000)

## บทที่ 4

### วิจารณ์ผลการทดลอง

#### 1. การวิเคราะห์ค่า serum E2 (pg/mL)

ค่าเฉลี่ยของ serum E2 ของกลุ่ม ovx ต่ำกว่ากลุ่มอื่นๆ เนื่องจากกลุ่ม ovx ไม่มีรังไข่ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการสร้าง E2 ทำให้ serum E2 ที่ตรวจวัดได้ด้วยหลักการ electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) มีปริมาณลดลง แต่ไม่เท่ากับศูนย์ เนื่องจากยังมีบางอวัยวะที่สามารถสร้าง E2 ทดแทน ได้แก่ ต่อมหมวกไต ผิวหนัง hair follicles เป็นต้น (Ohnemus *et al.*, 2006) ในกลุ่ม ovx+EB มีค่าเฉลี่ยของ serum E2 มากกว่ากลุ่มอื่นๆ จากการได้รับ estradiol benzoate (EB) ซึ่งเป็น E2 สังเคราะห์ร่วมกับการสร้างจากอวัยวะอื่นๆ ดังกล่าวข้างต้นเสริมด้วย ในขณะที่กลุ่ม sham แม้จะมีรังไข่ซึ่งเป็นอวัยวะหลักในการสร้าง E2 แต่ปริมาณ serum E2 จะเปลี่ยนแปลงไปตามรอบระดู (estrous cycle) ทำให้ค่า serum E2 ที่ตรวจวัดในแต่ละครั้งไม่คงที่ ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยของ serum E2 ของกลุ่ม sham ต่ำกว่ากลุ่ม ovx+EB แต่อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยของ serum E2 ของกลุ่มนี้ยังสูงกว่ากลุ่ม ovx และกลุ่ม ovx+YCJ

การตรวจวัดค่า serum E2 ของกลุ่ม ovx+YCJ พบว่าค่าเฉลี่ยของ serum E2 ต่ำเช่นเดียวกับกลุ่ม ovx แม้จะได้รับน้ำมะพร้าวอ่อน (YCJ) ซึ่งตามรายงานของ ดร.บุษกร (Punghmatharith, 1988) กล่าวว่า มีสารคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (phytoestrogens : PE) และ PE ที่มีฤทธิ์ในการสมานแผลส่วนใหญ่เป็นชนิดฟลาโวนอยด์ (flavonoids) (Fu *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2006; Khanna *et al.*, 2002; Okoli *et al.*, 2007; Uydes-Dogan *et al.*, 2005) แล้วก็ตาม ตรงกันข้ามกับรายงานของ Radenahmad และคณะ (Radenahmad *et al.*, 2006) ที่กล่าวว่า การให้ YCJ เข้มข้น 100 mL/kgBW ทำให้ค่า serum E2 สูงขึ้นเทียบเท่ากับกลุ่ม sham และกลุ่ม ovx+EB ทั้งนี้อาจเนื่องจากแหล่งของ YCJ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ต่างกับแหล่งที่ใช้ในงานของ Radenahmad และคณะ ทำให้ความเข้มข้น 100 mL/kgBW ของ YCJ ที่ใช้ในครั้งนี้อาจจะไม่เพียงพอที่จะทำให้ค่า serum E2 เทียบเท่ากับกลุ่ม sham และกลุ่ม ovx+EB ซึ่งต้องทำการวิจัยเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป อย่างไรก็ตามความเข้มข้นที่ใช้ยังส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างอื่นๆ ซึ่งจะได้อธิบายในรายละเอียดต่อไป

2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อมชนิดต่างๆ และการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม EXCEL โปรแกรม Image analyzer และโปรแกรม SPSS ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

ก. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีย้อม Heamatoxylin and Eosin (H&E)

1. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณแผล (wounded skin)

ชั้น epidermis บริเวณแผลในกลุ่ม 7 วันของทุกกลุ่มการทดลอง หนากว่าบริเวณเนื้อเยื่อปกติ และยังพบ granulation tissues ซึ่งเป็นโครงสร้างในชั้น dermis ที่ประกอบด้วย กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ fibroblasts เส้นเลือดเส้นใหม่ และ extracellular matrix (ECM) ทั้งนี้เนื่องจากบริเวณดังกล่าว มีการสมานแผลยังไม่เสร็จสมบูรณ์ ยังอยู่ในขั้นตอน proliferative phase ขอบเขตของแผลในกลุ่ม sham น้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ เนื่องจากในกลุ่ม sham มีระดับ serum E2 ในระดับคงที่สม่ำเสมอ การสมานแผลจึงเกิดในอัตราปกติ ในขณะที่กลุ่มอื่นๆ คือ ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ซึ่งได้ผ่าตัดเอารังไข่ออก จะทำให้ระดับ serum E2 ต่ำกว่ากลุ่ม sham ช่วงหนึ่ง (ระยะเวลา 14 วัน หลังทำ ovx และก่อนให้ treatments ต่างๆ) จึงส่งผลให้การสมานแผลล่าช้ากว่าปกติ เช่นเดียวกับรายงานของ Ashcroft และคณะ (Ashcroft *et al.*, 1997; Ashcroft *et al.*, 1999) พบว่าหนูที่ทำ ovx จะทำให้การสมานแผลช้าลงอย่างเห็นได้ชัด โดยทำให้กระบวนการอักเสบนานขึ้น ลดกระบวนการ reepithelialization เพิ่มขนาดของบริเวณแผล และลดการสะสมของคอลลาเจนบริเวณแผลด้วย แม้ว่าในกลุ่ม ovx+EB และ ovx+YCJ จะได้รับ EB และ PE ตามลำดับแล้วก็ตาม ทั้งนี้อาจเป็นผลจากระยะเวลาที่ให้สารทดแทนกับกลุ่ม ovx+EB และ ovx+YCJ ไม่นานพอที่จะทำให้การสมานแผลเร็วเท่ากับกลุ่ม sham

สำหรับในกลุ่ม 14 วัน เฉพาะกลุ่ม ovx เท่านั้นที่มีชั้น epidermis บริเวณแผลหนากว่าบริเวณเนื้อเยื่อปกติ และยังพบ granulation tissues เป็นบริเวณกว้าง ขอบเขตของแผลในกลุ่มนี้จึงมากกว่ากลุ่มอื่นๆ อาจเนื่องจากผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนในระดับต่ำ การสมานแผลจึงเกิดในอัตราที่ช้ากว่าปกติ ในขณะที่กลุ่ม sham, ovx+EB และ ovx+YCJ ซึ่งได้รับ E2 หรือ estrogen-like substances จากแหล่งต่างๆ คือ จากการสร้างของรังไข่ จาก exogenous estrogen (EB) และจาก PE (YCJ) ตามลำดับ ส่งผลให้การสมานแผล

เกิดในอัตราที่เร็ว พบชั้น epidermis บริเวณแผลมีความหนาเท่ากับหรือใกล้เคียงกับชั้น epidermis บริเวณเนื้อเยื่อปกติ และพบ granulation tissues น้อยกว่า ซึ่งเป็นการสมานแผลในขั้นตอน remodeling phase การสมานแผลที่เกิดในอัตราที่เร็วนี้ เป็นผลจากการที่เอสโตรเจนช่วยยับยั้งการสร้าง proinflammatory cytokine เช่น macrophage migration inhibitory factor (MIF), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ashcroft *et al.*, 2003) จึงลดการเคลื่อนที่ของ inflammatory cells เช่น neutrophil, lymphocyte, macrophages มายังบริเวณแผลทำให้ระยะเวลาของการอักเสบลดลง (Ashcroft *et al.*, 1999 และ Mills *et al.*, 2005) เมื่อ neutrophil ลดลง การสร้างเอนไซม์ elastase (neutrophil-derived elastase) จึงลดลงทำให้ ECM ถูกทำลายน้อยลง แผลจึงมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ E2 ยังกระตุ้นอัตราการเกิด reepithelialization ซึ่งเสริมการลดขนาดแผลเช่นกัน (Ashcroft *et al.*, 1999) และในสามกลุ่มนี้ คือ sham ovx+EB และ ovx+YCJ ยังพบอีกว่ากลุ่ม ovx+YCJ มีการสมานแผลเร็วที่สุดทั้งจากการวัดความลึกและความกว้างของขอบเขตแผล (ovx+YCJ>sham>ovx+EB) แสดงว่าการให้ ovx+YCJ ที่ความเข้มข้นเท่าเดิม (100 mL/kgBW) ด้วยระยะเวลาสั้นขึ้น (14 วัน) ทำให้การสมานแผลในกลุ่มนี้ดีขึ้น อาจกล่าวได้ว่าสารใน YCJ มีผลทำให้การสมานแผลดีกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ YCJ และสารดังกล่าวน่าจะเป็น PE ดังรายงานของ Benassayag และคณะ (Benassayag *et al.*, 2002) ว่า PE อาจจะมีผลหลายด้าน เช่น proliferation, differentiation และควบคุมการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของเซลล์เป้าหมาย (target cells) ขนาดความเข้มข้น ชนิดของ PE การมีหรือไม่มี endogenous E2 ในกรณีนี้ PE ใน YCJ น่าจะกระตุ้นเซลล์ที่ช่วยในการสมานแผล เช่น keratinocytes, fibroblasts ให้มี proliferation และ differentiation มากขึ้น นอกจากนี้ Rao และคณะ (Rao *et al.*, 1997) ยังพบว่า PE ช่วยลดกระบวนการอักเสบ ซึ่งผลดังกล่าวของ PE ล้วนเป็นปัจจัยช่วยให้การสมานแผลเกิดได้เร็วขึ้น

## 2. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยา และการวิเคราะห์ผลบริเวณเนื้อเยื่อปกติ (normal skin)

เซลล์ keratinocytes บริเวณฐานของชั้น epidermis มีลักษณะรูปร่างทรงสูง (columnar cell) และเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวสูง โดยสามารถแบ่งตัวเพื่อทดแทนเซลล์ชั้นบนที่เสื่อมสภาพแล้ว ในกลุ่ม ovx ทั้งในกลุ่ม 7 และ 14 วัน มีเซลล์ keratinocytes ขนาดเล็ก และลีบแบนกว่ากลุ่มอื่นๆ และเมื่อเทียบเซลล์ keratinocytes ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx ในกลุ่ม 14 วัน มีเซลล์ keratinocytes ขนาดเล็ก และลีบแบนกว่ากลุ่ม 7 วัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดความหนาของชั้น epidermis ของกลุ่ม ovx ในกลุ่ม 14 วัน ที่พบว่ามีค่าน้อยกว่ากลุ่ม 7 วัน แสดงว่า serum E2 ในระดับต่ำของกลุ่ม ovx มีผลต่อขนาดที่เล็กลงและรูปร่างที่ลีบแบนของเซลล์ keratinocytes และยังมีส่งผลต่อความหนาของชั้น epidermis ด้วย เช่นเดียวกับการรายงานของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) ที่กล่าวว่าหนูที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออก serum E2 จะต่ำลงทำให้ความหนาของชั้น epidermis (epidermal thickness) ลดลง และสามารถกระตุ้นให้ชั้น epidermis ดังกล่าวหนาขึ้นได้ด้วยการให้ E2 ทดแทน สำหรับอีกสามกลุ่มคือ sham ovx+EB และ ovx+Y CJ ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน มีขนาดและรูปร่างของเซลล์ keratinocytes ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเซลล์ keratinocytes มีขนาดใหญ่กว่า และเซลล์มีลักษณะรูปร่างกลมมนมากกว่ากลุ่ม ovx นอกจากนี้ยังพบว่าในกลุ่ม ovx+Y CJ ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน มีความหนาของชั้น epidermis มากกว่ากลุ่มอื่นๆ และเมื่อเทียบความหนาระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+Y CJ ในกลุ่ม 14 วันมีความหนามากกว่ากลุ่ม 7 วัน แสดงว่าการให้ Y CJ ทำให้ความหนาของชั้น epidermis เพิ่มขึ้น และการให้ Y CJ ด้วยความเข้มข้นเท่าเดิม (100 mL/kgBW) แต่ระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) ทำให้ชั้น epidermis หนาขึ้น แสดงว่าสาร PE ใน Y CJ มีผลต่อการแบ่งเซลล์ keratinocytes ของชั้น epidermis และทำให้ epidermis หนาขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Benassayag และคณะ (Benassayag *et al.*, 2002) ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น โดย PE ใน Y CJ น่าจะกระตุ้นเซลล์ keratinocytes ให้มีการ proliferation และ differentiation บริเวณเนื้อเยื่อปกติด้วยเช่นกัน ส่วนการวัดความหนาของชั้น epidermis ของกลุ่ม sham และ ovx+EB ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน พบว่าทั้งสองกลุ่มให้ผลเหมือนกันคือ มีความหนาของชั้น epidermis น้อยกว่ากลุ่ม ovx+Y CJ และเมื่อเทียบความหนาของชั้น epidermis ของกลุ่มทั้งสองระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน ก็ให้ผลเช่นเดียวกันคือระยะเวลาที่นานขึ้น (14 วัน) ทำให้ความหนาของชั้น epidermis ลดลง ซึ่งตรงกันข้ามกับ

รายงานของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) ที่กล่าวว่า E2 ที่ให้กับหนูที่ผ่าตัดเอารังไข่ออกทำให้ความหนาของชั้น epidermis เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ความเข้มข้นของ EB ที่ให้กับกลุ่ม ovx+EB อาจไม่เพียงพอที่จะคงความหนาของชั้น epidermis ดังกล่าวได้

สำหรับชั้น dermis ของกลุ่ม ovx ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบมีคอลลาเจนขนาดเล็ก การเรียงตัวของคอลลาเจนหลวมๆ ไม่เป็นระเบียบเมื่อเทียบกับอีกสามกลุ่ม (sham ovx+EB และ ovx+YCJ) ที่มีการเรียงตัวของคอลลาเจนอย่างเป็นระเบียบและมีคอลลาเจนขนาดใหญ่ ทั้งนี้เนื่องจากการมี serum E2 ระดับต่ำในกลุ่ม ovx ทำให้ปริมาณคอลลาเจนลดลงและมีการแตกหักของคอลลาเจนด้วย ซึ่งสอดคล้องกับ Brincat และคณะ (Brincat *et al.*, 1983) ที่รายงานว่าผู้หญิงหลังจากหมดประจำเดือนแล้ว 5 ปีจะทำให้ปริมาณคอลลาเจนลดลงถึง 30% และ Brincat (Brincat, 2000) ที่กล่าวว่าผู้หญิงวัยทองมีความเสี่ยงมากขึ้นต่อการแตกหักของคอลลาเจนและการให้ E2 ทำให้การแตกหักลดลง ส่วนการวัดความหนาของชั้น dermis ของกลุ่ม sham ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม แต่ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+YCJ มีความหนาของชั้น dermis มากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อีกสามกลุ่มคือ sham ovx และ ovx+EB ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ทั้งนี้เนื่องจาก PE ใน YCJ ที่ให้ทดแทนในกลุ่มนี้อาจมีผลกระตุ้นให้มีการ proliferation และ differentiation ของเซลล์ fibroblasts ที่อยู่ในชั้น dermis เช่นเดียวกับกรณีของเซลล์ keratinocytes ของชั้น epidermis ดังกล่าวข้างต้น ทำให้มีการสร้างคอลลาเจนในปริมาณที่มากขึ้น และทำให้ความหนาของชั้น dermis ของกลุ่ม ovx+YCJ มากขึ้นดังกล่าว ตามรายงานที่สอดคล้องของ Brincat และคณะ (Brincat *et al.*, 1983) ที่กล่าวว่าปริมาณของคอลลาเจนนั้นแปรผันโดยตรงกับความหนาของชั้น dermis จากการศึกษาด้วยหลักการทางรังสีวิทยา และเมื่อเทียบความหนาของชั้น dermis ของกลุ่ม sham ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าเฉพาะกลุ่ม ovx+YCJ ที่พบมีความหนาของชั้น dermis ใกล้เคียงกันระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน แสดงว่าการให้ PE ใน YCJ แก่กลุ่มนี้ด้วยความเข้มข้นเท่าเดิม (100 mL/kgBW) แต่ระยะเวลาที่นานขึ้น (14 วัน) ทำให้ชั้น dermis มีความหนาเท่าเดิมหรือมากขึ้น ส่วนอีกสามกลุ่มคือ sham ovx และ ovx+EB มีผลตรงกันข้ามคือระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้ความหนาของชั้น dermis ยิ่งลดลง แสดงว่าการมี serum E2 ในระดับต่ำเป็นระยะเวลานานของกลุ่ม ovx ทำให้ชั้น dermis บางลงซึ่งบ่งชี้ว่ามีปริมาณของคอลลาเจนน้อยลง (Brincat *et al.*, 1983)

ส่วนในกลุ่ม sham และ ovx+EB แม้จะมี endogenous E2 และ exogenous E2 ตามลำดับ แต่ก็ไม่มีผลให้ชั้น dermis หนาขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Holland และคณะ (Holland *et al.*, 1994) ที่กล่าวว่าผู้หญิงวัยทองที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (HRT) ทำให้การสร้าง collagen น้อยลงและเจริญเป็น collagen ตัวเต็มวัยได้ช้า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Haapasaari และคณะ (Haapasaari *et al.*, 1997) กล่าวว่า การได้รับเอสโตรเจนอย่างเดียวหรือร่วมกับ โปรเจสเตอโรนในผู้หญิงวัยทองไม่ได้ช่วยเพิ่มปริมาณคอลลาเจนและไม่ได้ทำให้อัตราการสังเคราะห์คอลลาเจนเกิดขึ้นเร็วด้วย

การวัดความหนาของชั้น hypodermis ของกลุ่ม sham ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ในกลุ่ม 7 วัน ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ในขณะที่ในกลุ่ม 14 วัน พบว่ากลุ่ม ovx มีความหนาของชั้น hypodermis มากกว่ากลุ่มอื่นๆ ส่วนอีกสามกลุ่มคือ sham ovx+EB และ ovx+YCJ ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม นอกจากนี้เมื่อเทียบความหนาของชั้น hypodermis ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าเฉพาะกลุ่ม ovx ที่มีความหนาของชั้น hypodermis เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป ทั้งนี้เนื่องจากการมี serum E2 ในระดับต่ำเป็นระยะเวลานาน (14 วัน) ทำให้กลุ่ม ovx มีการสะสมของชั้นไขมันหนากว่ากลุ่มอื่นๆ เช่นเดียวกับการรายงานของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) ที่กล่าวหาผู้ที่ได้รับการผ่าตัดเอารังไข่ออกจะทำให้ความหนาของชั้น hypodermis มากขึ้นและสามารถทำให้ลดลงด้วยการให้ E2 และเมื่อเทียบกับกลุ่ม 7 วัน เฉพาะกลุ่ม ovx เท่านั้นที่มีความหนาของชั้น hypodermis มากขึ้น นั้นแสดงว่าการที่มี serum E2 ในระดับต่ำเป็นระยะเวลานาน (14 วัน) จะทำให้การสะสมของชั้นไขมันยิ่งมากขึ้น ดังรายงานของ Azzi และคณะ (Azzi *et al.*, 2005) ดังกล่าวข้างต้น ส่วนอีกสามกลุ่มคือ sham ovx+EB และ ovx+YCJ ไม่มีความแตกต่างของความหนาของชั้น hypodermis ระหว่างกลุ่ม 7 และ 14 วัน



ข. ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาจากสไลด์เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ โดยใช้ anti-ER $\alpha$  และ anti-ER $\beta$  antibody

องค์ประกอบที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ของทุกกลุ่มการทดลอง (sham ovx ovx+EB และ ovx+YCJ) ทั้งในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน คือ keratinocytes fibroblasts hair follicles sebaceous gland ECM และ panniculus carnosus ดังปรากฏในหลายรายงานเช่น Ohnemus และคณะ Oh และ Smart Brandenberger และคณะ Thornton และคณะ (Brandenberger *et al.*, 1997; Oh and Smart, 1996; Ohnemus *et al.*, 2004; Thornton *et al.*, 2003) เป็นต้น แสดงว่า endogenous E2 exogenous E2 และ PE ใน YCJ ที่ให้กลับกลุ่มการทดลองต่างๆ อาจเป็นส่วนหนึ่งที่มีผลต่อ องค์ประกอบดังกล่าวผ่านทาง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  โดยลักษณะการแสดงผลจะ แตกต่างกันในแต่ละองค์ประกอบดังได้กล่าวไปแล้วในข้อ ก.

สำหรับผลการนับจำนวนของ hair follicles ที่ติดสีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ ERs ทั้งสองในชั้น dermis และ hypodermis และผลการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ในกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx+YCJ มีจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ดังกล่าวมากกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยเฉพาะ hair follicles ในชั้น hypodermis ที่มีจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่ากลุ่ม ovx+EB ซึ่งปรากฏในกลุ่ม ovx+YCJ ของกลุ่ม 14 วัน เช่นเดียวกัน แสดงว่า PE ใน YCJ น่าจะแสดงผลเป็น ER antagonist ผ่านทาง ER $\alpha$  โดยมี ER $\beta$  เป็นตัวตรวจสอบ แล้วทำให้ hair follicles เจริญงอกยาวเข้าสู่ ชั้น hypodermis มีขนาดใหญ่และมีจำนวนมากขึ้นด้วยโดยเป็น hair follicles ในระยะ anagen phase เช่นเดียวกับการรายงานของ Chanda และคณะ (Chanda *et al.*, 2000) และ Ohnemus และคณะ (Ohnemus *et al.*, 2004) ว่า ICI 182,780 ซึ่งเป็น ER antagonist แล้วทำให้ hair follicles เจริญเข้าสู่ anagen phase โดยการทำงานผ่าน ER $\alpha$  โดยมี ER $\beta$  เป็นตัวตรวจสอบ สำหรับกลุ่ม ovx+EB การได้รับ exogenous E2 เป็นระยะเวลาสั้นขึ้น (14 วัน) ไม่ทำให้ hair follicles เจริญเข้าสู่ anagen phase เหมือนกลุ่ม ovx+YCJ แสดงว่า exogenous E2 น่าจะแสดงผลเป็น ER agonist แล้วชักนำให้ hair follicles เข้าสู่ catagen phase ได้เร็วและทำให้ hair follicles อยู่ในระยะ telogen phase ยาวนานขึ้น จึงพบ hair follicles จำนวนน้อย และเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดเล็ก โดยการทำงานดังกล่าวผ่านทาง ER $\alpha$  โดยมี ER $\beta$  เป็นตัวตรวจสอบ สอดคล้องกับการรายงานของ Chanda และคณะ (Chanda *et al.*, 2000) และ Ohnemus

และคณะ (Ohnemus *et al.*, 2004) ว่า E2 ซึ่งเป็น ER agonist จะชักนำให้ hair follicles เข้าสู่ catagen phase ได้เร็วและทำให้ hair follicles อยู่ในระยะ telogen phase นานขึ้นโดยการทำงานผ่าน ER $\alpha$  โดยมี ER $\beta$  เป็นตัวตรวจสอบ สำหรับกลุ่ม ovx ในกลุ่ม 7 วัน แม้จะมีจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles น้อยกว่ากลุ่ม ovx+YCJ แต่ก็ยังมากกว่ากลุ่ม sham และ ovx+EB และเมื่อระยะเวลาผ่านไป (14 วัน) พบว่าจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles ยิ่งมากขึ้นโดยเฉพาะในชั้น hypodermis แสดงว่าการมี serum E2 ในระดับต่ำทำให้ hair follicles เข้าสู่ระยะ anagen phase และมีการเจริญของเส้นขนมากขึ้น ดังผลการทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles กับค่า serum E2 ซึ่งพบว่าเมื่อค่า serum E2 มากขึ้น จำนวนและเส้นผ่านศูนย์กลางของ hair follicles กลับลดลง ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3-34 และ 3-35 เช่นเดียวกับการรายงานของ Chanda และคณะ (Chanda *et al.*, 2000) ที่พบว่าการทำ ovx ในหนูทำให้ hair follicles เข้าสู่ anagen phase ได้เร็วและมากขึ้น แม้จะให้ E2 ความเข้มข้น 1 nmol ทดแทนทางผิวหนังแล้วก็ตาม นอกจากนี้ keratinocyte stem cells ในส่วนของ follicular bulb ของ hair follicles ในระยะ anagen phase อาจทำหน้าที่เป็น multipotent stem cells ที่สามารถเจริญเป็นเซลล์ของ hair matrix, เซลล์ของ sebaceous gland และเจริญเป็นเซลล์ของชั้น epidermis ทำให้การสมานแผลเร็วขึ้น ดังรายงานของ Oh และ Smart (Oh and Smart, 1996) และทฤษฎีของ Kierszenbaum (Kierszenbaum, 2007)

จากผลต่างๆ ดังกล่าวของ PE ใน YCJ ต่อดองค์ประกอบของผิวหนัง อาจกล่าวได้ว่า PE ใน YCJ น่าจะมีบทบาทเป็น selective estrogen receptor modulators (SERMs) หนึ่งเช่นเดียวกับ tamoxifen และ raloxifene ซึ่งเป็น SERMs ที่มีบทบาทช่วยเร่งการสมานแผล โดยลดกระบวนการอักเสบ ลดการแสดงออกของ proinflammatory cytokines และเพิ่มกระบวนการ reepithelialization ตามรายงานของ Hardman และคณะ (Hardman *et al.*, 2008)

### 3. การวิเคราะห์ค่าทางเคมีคลินิกต่าง ๆ ในซีรัมหนู

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

ค่า BUN ในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วันของกลุ่ม ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ไม่แตกต่างจากค่า BUN ของกลุ่ม sham แต่เมื่อเทียบค่า BUN ของกลุ่ม ovx+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าค่า BUN ในกลุ่ม 14 ลดลงเล็กน้อย ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ ที่มีแนวโน้มสูงขึ้น แสดงว่าการให้ PE ใน YCJ ทำให้ค่า BUN ลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของ Tomobe และคณะ (Tomobe *et al.*, 1998) ที่กล่าวว่า การให้ soy protein ซึ่งมี PE ปริมาณสูงในหนูเป็นเวลา 90 วัน ทำให้ค่า BUN ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สำหรับค่า creatinine ของกลุ่ม ovx+YCJ ในกลุ่ม 7 วันพบมีค่าสูงกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าการได้รับ YCJ ความเข้มข้น 100 mL/kgBW ในระยะสั้น (7 วัน) อาจส่งผลต่อไตในการรักษาสมดุลของ creatinine แบบเฉียบพลัน โดยทำให้การขับออกของ creatinine ที่ไตลดลงส่งผลให้พบ creatinine ในกระแสเลือดปริมาณมากขึ้น เมื่อระยะเวลาผ่านไป (14 วัน) พบว่าค่า creatinine ของกลุ่ม ovx+YCJ ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม 7 วัน แต่กลับไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า creatinine เมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tomobe และคณะ (Tomobe *et al.*, 1998) ดังกล่าวข้างต้น

#### 3.2. การวิเคราะห์ค่า total protein albumin ALP AST และ ALT ในกลุ่ม 7 และ 14 วัน

ค่า total protein ของกลุ่ม ovx ในกลุ่ม 7 วัน ต่ำกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่เมื่อระยะเวลาผ่านไป (14 วัน) ค่า total protein ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แต่อย่างไรก็ตามค่า total protein ยังคงต่ำกว่ากลุ่ม sham นั้นแสดงว่าผลของการมีระดับ serum E2 ต่ำจากการตัดรังไข่ออกจะทำให้การสังเคราะห์ total protein ลดลง สำหรับกลุ่ม ovx+YCJ พบมีการสังเคราะห์ total protein ที่ต่ำลดลงเมื่อได้รับ YCJ เป็นระยะเวลาผ่านไป (14 วัน) ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Setchell และคณะ (Setchell *et al.*, 1987) ที่กล่าวว่า การได้รับ PE ซึ่งเป็นชนิด daidzein และ genistein ปริมาณ 50 mg/day ในอาหารของเสือชีตาห์ (cheetahs) ไม่ทำให้ค่า liver function test (total protein, albumin, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase,

alkaline phosphatase) มีการเปลี่ยนแปลงและเมื่อเปลี่ยนอาหารเป็นชนิดที่ไม่มี PE พบว่าทำให้ค่า alanine aminotransferase และ aspartate aminotransferase ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างของสปีชีส์ ชนิดของ PE และความเข้มข้น เป็นต้น สำหรับค่า albumin ของกลุ่ม ovx ในกลุ่ม 7 วัน พบว่าต่ำกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) ค่า albumin ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham อย่างไรก็ตามค่า albumin ยังคงต่ำกว่ากลุ่ม sham แสดงว่า ผลของการมีระดับ serum E2 ต่ำจากการตัดรังไข่ออกจะทำให้การสังเคราะห์ albumin ที่ตับลดลง ซึ่งสอดคล้องกับค่า total protein ในกลุ่ม ovx ดังกล่าวข้างต้น สำหรับกลุ่ม ovx+EB พบมีการสังเคราะห์ albumin ที่ตับเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ EB เป็นระยะเวลา 14 วัน)

ค่า ALP ของกลุ่ม ovx+EB ในกลุ่ม 14 วัน ต่ำกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน แม้ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แต่ค่า ALP ยังคงต่ำกว่า แสดงว่าผลจากการได้รับ EB ทำให้มีการสร้าง ALP จากตับลดลง และเมื่อให้ EB เป็นระยะเวลา 14 วัน ก็จะทำให้การสร้าง ALP ลดลงมากขึ้น สำหรับกลุ่ม ovx+YCJ ในกลุ่ม 14 วัน พบมีค่า ALP สูงกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน แม้ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แต่ค่า ALP ยังคงสูงกว่า และเมื่อเทียบค่า ALP ของกลุ่ม ovx+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าค่า ALP ลดลง แสดงว่าการได้รับ YCJ ทำให้มีการสร้าง ALP จากตับเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มควบคุมปกติ ซึ่งตรงข้ามกับรายงานของ Setchell และคณะ (Setchell *et al.*, 1987) ดังกล่าวข้างต้น แต่เมื่อให้ YCJ เป็นระยะเวลา 14 วัน ไม่พบว่าทำให้การสร้าง ALP มากขึ้น อย่างไรก็ตามค่า ALP ยังสูงกว่ากลุ่มควบคุมปกติ ดังนั้นการได้รับ YCJ อาจเสี่ยงต่อการอุดตันของระบบลำเลียงเลือดและระบบลำเลียงน้ำดี ในตับได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Setchell และคณะ (Setchell *et al.*, 1987) ที่กล่าวว่าเชื้อซีดำที่ได้รับ PE จากอาหาร ทำให้พบจำนวนเส้นที่มีพยาธิสภาพเป็น venocclusive disease ในตับถึง 60% ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่พบมีการอุดตันของหลอดเลือดในตับ สำหรับค่า AST และ ALT ในกลุ่ม 7 และ 14 วันของกลุ่ม ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Setchell และคณะ (Setchell *et al.*, 1987) ดังกล่าวข้างต้น แสดงว่าการได้รับ EB และ YCJ ไม่น่าจะเพิ่มความเสี่ยงต่อการถูกทำลายของเซลล์ตับ (hepatocytes) ซึ่งผลทางพยาธิวิทยาในระดับเซลล์ของตับยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

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

ค่า cholesterol ของกลุ่ม ovx และ ovx+YCJ ในกลุ่ม 14 วัน สูงกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน แม้ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham แต่ค่า cholesterol ยังคงสูงกว่ากลุ่ม sham และเมื่อเปรียบเทียบค่า cholesterol ของกลุ่ม ovx และ ovx+YCJ ระหว่างกลุ่ม 7 วัน และ 14 วัน พบว่าค่า cholesterol ของทั้งสองกลุ่ม ในกลุ่ม 14 วันต่ำกว่ากลุ่ม 7 วัน แสดงว่าผลจากการมีระดับ serum E2 ต่ำ และการได้รับ YCJ ของกลุ่ม ovx และ ovx+YCJ ตามลำดับนั้น ทำให้มีการสังเคราะห์ cholesterol ที่ตับได้มากขึ้น ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของ Lucas และคณะ (Lucas *et al.*, 2002) ที่กล่าวว่า การได้รับ flaxseed ซึ่งมี PE ปริมาณสูงในผู้หญิงวัยทองทำให้ระดับ cholesterol LDL HDL และ triglyceride ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างในสปีชีส์ ชนิดและแหล่งของ PE เป็นต้น อย่างไรก็ตามในกลุ่ม ovx และกลุ่ม ovx+YCJ ที่ได้รับ treatment 14 วัน พบมีค่า HDL สูงซึ่งการสังเคราะห์ HDL ในปริมาณที่เพิ่มขึ้นจะช่วยกระตุ้นการนำพา cholesterol ที่มีปริมาณสูง และล่องลอยอยู่ในกระแสเลือดให้เกิดเมทาบอลิซึมที่เซลล์ตับได้มากขึ้น จึงอาจเป็นปัจจัยในการลดความเสี่ยงต่อการเกิดพยาธิสภาพเกี่ยวกับระบบหลอดเลือด และระบบหลอดเลือดหัวใจจากการมี cholesterol สูงข้างต้นได้

ค่า triglyceride ของกลุ่ม ovx+EB ในกลุ่ม 14 วัน สูงกว่ากลุ่ม sham ในขณะที่กลุ่ม 7 วัน แม้ไม่พบความแตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แต่ค่า triglyceride ยังคงสูงกว่ากลุ่ม sham แสดงว่าผลจากการได้รับ EB ของกลุ่ม ovx+EB ทำให้มีการสังเคราะห์ triglyceride ที่ตับได้มากขึ้น และเมื่อได้รับสารดังกล่าวเป็นระยะเวลาเพิ่มขึ้น (14 วัน) ก็ยิ่งทำให้การสังเคราะห์ triglyceride มากขึ้นด้วย สำหรับค่า LDL ซึ่งเป็นไขมันที่พบว่าทำให้เกิด lipid peroxidation ได้ง่าย และชักนำให้เกิดโรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจ ตามรายงานของ Tapiero และคณะ (Tapiero *et al.*, 2002) การทดลองในครั้งนี้พบว่าในกลุ่ม 7 วัน และ 14 วันของกลุ่ม ovx ovx+EB และ ovx+YCJ ค่า LDL ไม่แตกต่างเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แสดงว่าการได้รับ exogenous E2 และ PE ใน YCJ ของกลุ่ม ovx+EB และ ovx+YCJ ตามลำดับ ไม่ทำให้ค่า LDL สูง และด้วย PE มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ดังรายงานของ Ruiz-Larrea และคณะ (Ruiz-Larrea *et al.*, 1997) จึงช่วยต่อต้านการเกิด lipid peroxidation ข้างต้น ตามรายงานของ Kapiotis และคณะ (Kapiotis *et al.*, 1997) ดังนั้นปัจจัย

ดังกล่าวจึงน่าจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจ

#### 4 ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาบริเวณแผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค TEM

ลักษณะของเซลล์ keratinocytes ในกลุ่ม sham ovx ovx+EB และ ovx+YJC ในกลุ่ม 7 วันพบมี cytoplasmic process รอบๆ เซลล์ และมีการเชื่อมต่อ (connection) กับเซลล์อื่นๆ ที่อยู่ใกล้เคียง แสดงว่า PE ใน YCJ น่าจะส่งผลดังกล่าวข้างต้น เช่นเดียวกับการรายงานของ Calautti และคณะ (Calautti *et al.*, 1998) ที่กล่าวว่าเซลล์ keratinocytes ของหนูที่เลี้ยงภายในสภาพที่มี 100  $\mu$ M genistein ทำให้เซลล์อยู่ห่างกันมากขึ้นและมีโครงสร้างที่ยื่นออกนอกเซลล์เพื่อเชื่อมเซลล์ที่อยู่ติดกัน (pseudopod-like structures) และกลุ่มนี้พบมี cell-cell junction น้อย ส่วนในกลุ่ม sham มีผลตรงกันข้ามกับรายงานนี้ซึ่งกล่าวว่าในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นเซลล์ keratinocyte ที่ไม่ได้รับ genistein แต่อยู่ภายใต้สภาพที่มีแคลเซียม ไม่พบลักษณะเหมือนกับกลุ่มที่ได้รับ genistein แต่พบว่าเซลล์ keratinocytes อยู่ชิดกันมากขึ้นและมี cell-cell junction มากกว่า ผลที่ต่างกันนี้อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน โดยในรายงานของ Calautti และคณะ (Calautti *et al.*, 1998) มีแคลเซียมซึ่งสามารถกระตุ้น cell-cell adhesion ได้ และตามรายงานของ Zhao และคณะ (Zhao *et al.*, 2008) กล่าวว่าในแบบจำลองเซลล์มะเร็งเต้านม เซลล์ที่มีการแสดงออกของ cell-cell adhesion protein น้อยจะทำให้มีความเสี่ยงในการเกิด metastasis และทำให้การดำเนินโรครุนแรงมากขึ้น ซึ่งดูเหมือนว่าในกลุ่ม ovx+YJC ที่มี cell-cell junction น้อยจะมีคุณสมบัติดังกล่าว แต่เนื่องจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็นเซลล์ต่างชนิดและต่างสถานะ การแสดงผลจึงน่าจะต่างกันได้ โดยในกลุ่ม ovx+YJC อาจจะกระตุ้นให้มีการส่งผ่านสารสื่อต่างๆ เช่น ฮอร์โมน cytokines ระหว่างเซลล์ keratinocytes ผ่านทาง cytoplasmic process แล้วทำให้เกิดผลต่างๆ ดังกล่าวในข้อ 2ก. และข้อ 2ข. ส่วนขนาดและรูปร่างของเซลล์ keratinocytes ที่พบในกลุ่ม sham เท่ากับกลุ่ม ovx+EB เท่ากับกลุ่ม ovx เท่ากับกลุ่ม ovx+YJC ก็สอดคล้องกับผลการทดลองจากการตรวจสอบเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (LM) และผลจากการวัดความหนาของชั้นของ epidermis เช่นกัน

สำหรับ cytoplasmic process ของ keratinocytes ในกลุ่ม sham ovx+EB และ ovx+YJC ของกลุ่ม 14 วัน ไม่พบความแตกต่างของขนาดและจำนวน แต่เมื่อเทียบกับกลุ่ม 7 วัน พบว่า cytoplasmic process ของสามกลุ่มดังกล่าวในกลุ่ม 14 วัน มีจำนวน cytoplasmic process มากขึ้น แสดงว่าระยะเวลาการให้ treatment ทำให้ cytoplasmic process มากขึ้น ดังนั้น PE ใน YCJ น่าจะส่งผลดังกล่าว เช่นเดียวกับการรายงานของ Calautti และคณะ (Calautti *et al.*, 1998) ดังกล่าวข้างต้น และดูเหมือนว่าในกลุ่ม ovx+YJC มีคุณสมบัติเหมือนกับรายงานของ Zhao และคณะ (Zhao *et al.*, 2008) ดังกล่าวข้างต้น แต่เนื่องจากเซลล์ที่ใช้ทดสอบเป็นเซลล์ต่างชนิดและต่างสถานะ การแสดงผลจึงน่าจะต่างกันได้ โดย YCJ น่าจะทำให้

มีการส่งผ่านของสารสื่อต่างๆ มากขึ้น จึงส่งผลต่อลักษณะของ keratinocytes ดังผลการทดลองจากเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงในกลุ่ม 14 วัน เช่น มีการสมานแผลเร็วขึ้น epidermis หนาขึ้นหรือบางลง เป็นต้น ส่วนในกลุ่ม sham มีผลตรงกันข้ามกับรายงานของ Calautti และคณะ (Calautti *et al.*, 1998) ผลที่ต่างกันนี้อาจเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน สำหรับกลุ่ม ovx พบมี cytoplamic process น้อยกว่าและขนาดเล็กกว่ากลุ่ม sham, ovx+EB และ ovx+Y CJ และเมื่อเทียบกับกลุ่ม 7 วัน พบว่ากลุ่ม ovx ในกลุ่ม 14 วันมี cytoplamic process น้อยกว่าและขนาดเล็กกว่ากลุ่ม 7 วัน แสดงว่าการส่งผ่านสารสื่อต่างๆ ของเซลล์ keratinocytes ของกลุ่มนี้น่าจะช้าหรือน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ ทำให้ส่งผลต่อลักษณะของ keratinocytes ดังผลการทดลองจากเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เช่น การสมานแผลช้ากว่ากลุ่มอื่นๆ keratinocytes เล็กและลีบแบน epidermis บาง เป็นต้น อย่างไรก็ตามการทดลองด้วยเทคนิคทางกล้องจุลทรรศน์แบบอิเล็กตรอนยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป

## บทที่ 5

### สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษาดังนี้สรุปได้ว่า การได้รับ YCJ ความเข้มข้น 100 mL/kgBW เป็นเวลา 14 วันในหนูที่ทำการ ova (แบบจำลองสำหรับสตรีวัยทอง) ไม่ทำให้ค่า serum E2 สูงเท่ากับ sham แต่ทำให้การสมานแผลดีกว่า โดยสารออกฤทธิ์ใน YCJ น่าจะส่งผลลดการอักเสบ โดยลดการเคลื่อนที่ (chemotaxis) ของ inflammatory cells มายังบริเวณแผล กระตุ้นการเกิด reepithelialization กระตุ้น fibroblasts ให้มีการสังเคราะห์คอลลาเจนได้มากขึ้น ทำให้มีการหดเล็กลง (wound contraction) ของแผลเร็วขึ้น ส่วนบริเวณเนื้อเยื่อปกติ YCJ ยังทำให้ความหนาของชั้น epidermis dermis เพิ่มขึ้น และทำให้ชั้น hypodermis บางลงด้วย นอกจากนี้ YCJ ยังกระตุ้น hair follicles ให้เข้าสู่ anagen phase ซึ่งเป็นระยะที่มีการเจริญของเส้นขนทั้งขนาดและจำนวนที่มากขึ้น การกระตุ้น hair follicles ดังกล่าวอาจมีผลกระตุ้น keratinocyte stem cells บริเวณ follicular bulb ของ hair follicle ทำให้ stem cells เจริญเป็นเซลล์ของชั้น epidermis มากขึ้น จึงทำให้การสมานแผลเร็วขึ้น โดย YCJ น่าจะมีฤทธิ์ดังกล่าวผ่านตัวรับเอสโตรเจนทั้งชนิด ER $\alpha$  และ ER $\beta$  และสามารถออกฤทธิ์ได้ทั้งแบบ agonist และ antagonist ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดขององค์ประกอบของผิวหนัง ความเข้มข้นของ YCJ เป็นต้น โดยผลต่อเซลล์ keratinocytes ของชั้น epidermis นั้น YCJ น่าจะออกฤทธิ์กระตุ้นการส่งผ่านสารสื่อต่างๆ เช่น cytokines ฮอร์โมนต่างๆ ผ่านทาง cytoplasmic process ที่มากขึ้นด้วย ฤทธิ์ต่างๆดังกล่าวของ YCJ ทำให้ YCJ มีคุณสมบัติคล้าย selective estrogen receptor modulators (SERMs) ซึ่งยังต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป การศึกษาความปลอดภัยในการบริโภค YCJ เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน พบว่าการได้รับ YCJ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า BUN แต่ส่งผลให้ค่า creatinine สูงได้ในระยะแรก อย่างไรก็ตามในระยะเวลานานขึ้น (14 วัน) ทำให้ค่า BUN และ creatinine ลดลง ดังนั้น YCJ อาจไม่มีผลต่อการทำงานของไต ส่วนผลของ YCJ ต่อค่า liver function test พบว่าการได้รับ YCJ เป็นเวลา 14 วันทำให้ค่า total protein ลดลง แต่ไม่ทำให้ค่า albumin เปลี่ยนแปลง ในขณะที่ค่า ALP มีค่าสูงขึ้น ส่วนค่า AST และ ALT ไม่เปลี่ยนแปลง cholesterol และ HDL มีค่าสูงขึ้นเมื่อได้รับ YCJ นานขึ้น ในขณะที่ triglyceride และ LDL มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง การได้รับ YCJ จึงไม่น่าจะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงต่อระดับไขมันในเลือด ซึ่งจะไปมีผลต่อระบบหลอดเลือดและระบบหลอดเลือดหัวใจ อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของ YCJ ต่อการสมานแผลในอวัยวะอื่นๆ ผลต่อโรคกระดูกพรุน ผลต่อโรคมะเร็งต่างๆ และผลดังกล่าวต่อหนูเพศผู้ ตลอดจนการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในน้ำมะพร้าวอ่อน เป็นต้น ยังคงต้องทำการวิจัยเพิ่มเติมต่อไป



ผลการวิจัยในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางคลินิก สำหรับผู้ป่วยแผลหายช้า (chronic wound) หรือเพื่อรักษาอาการของผู้หญิงวัยทอง (postmenopausal women) หรือเพื่อรักษาผู้ป่วยศีรษะล้าน (alopecia) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม การนำไปใช้จริงในมนุษย์ยังคงต้องการการศึกษาทางคลินิกในอีกหลายประเด็น เช่น ความเข้มข้นต่างๆ ของ YCJ ระยะเวลาของการบริโภค YCJ เป็นเวลานานๆ วิธีการให้ YCJ ตลอดจนผลข้างเคียงจากการได้รับ YCJ ต่ออวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไต หัวใจ ในระดับโมเลกุลทั้งในเพศหญิงและเพศชาย

งานวิจัยในอนาคตเพื่อศึกษาฤทธิ์ของ E2 และ YCJ ผ่านทาง ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ต่อการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของเซลล์ keratinocytes เพื่อทำหน้าที่เฉพาะนั้น จะทำการศึกษาการแสดงออกของ keratin markers ในเซลล์ keratinocytes เช่น K1, K5, K6, K10, K14 และ filaggrin ซึ่งมีการแสดงออกที่จำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ keratinocytes ในแต่ละชั้น โดย filaggrin พบในเซลล์ชั้น stratum granulosum K5 และ K14 พบในเซลล์ชั้น stratum basale (Fuchs, 1990) K1 และ K10 พบในเซลล์ชั้น stratum spinosum (Fuchs, 1990) และ K6 พบในเซลล์ชั้น stratum spinosum และยังเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์ keratinocytes มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนมาก (hyperproliferation) อีกด้วย (Mansbridge and Knapp, 1987 Weiss *et al.*, 1984; Fuchs, 1990) นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่า keratinocyte growth factor และ epidermal growth factor ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ keratinocytes นั้นจะถูกสร้างมากขึ้นโดยการควบคุมของ E2 (Werner, 1998; Gibbs *et al.*, 2000) ดังนั้นเพื่อยืนยันยังผลของ E2 และ YCJ ต่อการเพิ่มความหนาของชั้น epidermis ดังผลการทดลองในครั้งนี้ จะได้ทำการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ Ki-67 ในชั้น stratum basale ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้เพื่อบ่งชี้ว่าเซลล์ในชั้นนี้มีการแบ่งเซลล์มากขึ้น

Hardman และคณะ (Hardman *et al.*, 2008) รายงานว่าหนูที่ทำ ovx มีการสมานแผลช้าและมีเซลล์ neutrophil ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ Ly-6G และเซลล์ macrophage ที่ติดสีย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ต่อ Mac-3 จำนวนมากกว่ากลุ่มปกติ และการให้ E2 tamoxifene และ raloxifene กับหนู ovx ทำให้การแสดงออกของ TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ) และ MIF (macrophage migration inhibitory factor) ลดลง ซึ่งเป็น cytokines ที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการสมานแผล ในอนาคตจึงจะทำการศึกษาการแสดงออกของ cytokines ดังกล่าวเพื่อศึกษากลไกการควบคุมการสมานแผลของ E2 และ YCJ

### บรรณานุกรม

- กิจจา สว่างเจริญ. 2533. ฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนคุมกำเนิด. ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- พงศธร สงวนเชื้อ. 2544. Wound Healing Process and Principle of Wound management. ใน การดูแลบาดแผลและทวารเทียม. คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์: 5-11.
- มณฑา จำเริญรักษ์. 2544. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไคโตซานจากกระดองปลาหมึกและเปลือกกุ้งต่อการห้ามเลือด การสมานแผล และความปลอดภัยในการนำไปใช้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สุพจน์ ตั้งจตุพร. 2543. มะพร้าวน้ำหอม เอกสารประกอบการเรียนการสอน. วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีชลบุรี.
2524. โครงการวิจัยสมุนไพร สมุนไพรอันดับที่ 2 การรวบรวมข้อมูลเบื้องต้นสำหรับงานวิจัย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 156-165.
- Agache, P.G., Monneur, C., Leveque, J.L. and De Rigal, J. 1980. Mechanical properties and Young's modulus of human skin in vivo. Arch Dermatol Res. 269(3), 221-232.
- Ashcroft, G.S., Dodsworth, J., van Boxtel, E., Tamuzzer, R.W., Horan, M.A., Schultz, G.S. and Ferguson, M.W. 1997. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. Nat Med. 3(11), 1209-1215.
- Ashcroft, G.S., Greenwell-Wild, T., Horan, M.A., Wahl, S.M. and Ferguson, M.W. 1999. Topical estrogen accelerates cutaneous wound healing in aged humans associated with an altered inflammatory response. Am J Pathol. 155(4), 1137-1146.
- Ashcroft, G.S., Mills, S.J., Lei, K., Gibbons, L., Jeong, M.J., Taniguchi, M., Burow, M., Horan, M.A., Wahl, S.M. and Nakayama, T. 2003. Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. J Clin Invest. 111(9), 1309-1318.
- Azzi, L., El-Alfy, M., Martel, C. and Labrie, F. 2005. Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. J Invest Dermatol. 124(1), 22-27.
- Beauregard, S. and Gilchrist, B.A. 1987. A survey of skin problems and skin care regimens in the elderly. Arch Dermatol. 123(12), 1638-1643.

- Benassayag, C., Perrot-Appianat, M. and Ferre, F. 2002. Phytoestrogens as modulators of steroid action in target cells. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 777(1-2), 233-248.
- Beral, V., Bull, D., Green, J. and Reeves, G. 2007. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet.* 369(9574), 1703-1710.
- Black, M.M., Bottoms, E. and Shuster, S. 1970. Skin collagen content and thickness in systemic sclerosis. *Br J Dermatol.* 83(5), 552-555.
- Bologna, J.L. 1993. Dermatologic and cosmetic concerns of the older woman. *Clin Geriatr Med.* 9(1), 209-229.
- Bologna, J.L., Braverman, I.M., Rousseau, M.E. and Sarrel, P.M. 1989. Skin changes in menopause. *Maturitas.* 11(4), 295-304.
- Brandenberger, A.W., Tee, M.K., Lee, J.Y., Chao, V. and Jaffe, R.B. 1997. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the midgestational human fetus. *J Clin Endocrinol Metab.* 82(10), 3509-3512.
- Brincat, M., Kabalan, S., Studd, J.W., Moniz, C.F., de Trafford, J. and Montgomery, J. 1987. A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol.* 70(6), 840-845.
- Brincat, M., Moniz, C.F., Kabalan, S., Versi, E., O'Dowd, T., Magos, A.L., Montgomery, J. and Studd, J.W. 1987. Decline in skin collagen content and metacarpal index after the menopause and its prevention with sex hormone replacement. *Br J Obstet Gynaecol.* 94(2), 126-129.
- Brincat, M., Moniz, C.F., Studd, J.W., Darby, A.J., Magos, A. and Cooper, D. 1983. Sex hormones and skin collagen content in postmenopausal women. *Br Med J (Clin Res Ed).* 287(6402), 1337-1338.
- Brincat, M., Moniz, C.J., Studd, J.W., Darby, A., Magos, A., Emburey, G. and Versi, E. 1985. Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. *Br J Obstet Gynaecol.* 92(3), 256-259.
- Brincat, M., Versi, E., Moniz, C.F., Magos, A., de Trafford, J. and Studd, J.W. 1987. Skin collagen changes in postmenopausal women receiving different regimens of estrogen therapy. *Obstet Gynecol.* 70(1), 123-127.
- Brincat, M., Yuen, A.W., Studd, J.W., Montgomery, J., Magos, A.L. and Savvas, M. 1987. Response of skin thickness and metacarpal index to estradiol therapy in postmenopausal women. *Obstet Gynecol.* 70(4), 538-541.

- Brincat, M.P. 2000. Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas*. 35(2), 107-117.
- Brincat, M.P. 2000. Hormone replacement therapy and the skin: beneficial effects: the case in favor of it. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 79(4), 244-249.
- Brook, C.G.D. and Marshall, N.J. 2001. *Essential Endocrinology*. Iowa State University Press. 179.
- Calautti, E., Cabodi, S., Stein, P.L., Hatzfeld, M., Kedersha, N. and Paolo Dotto, G. 1998. Tyrosine phosphorylation and src family kinases ovx+EB keratinocyte cell-cell adhesion. *J Cell Biol*. 141(6), 1449-1465.
- Callens, A., Vaillant, L., Lecomte, P., Berson, M., Gall, Y. and Lorette, G. 1996. Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques. *Dermatology*. 193(4), 289-294.
- Calvin, M., Dyson, M., Rymer, J. and Young, S.R. 1998. The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. *Br J Obstet Gynaecol*. 105(2), 223-227.
- Canalis, E. and Raisz, L.G. 1978. Effect of sex steroids on bone collagen synthesis in vitro. *Calcif Tissue Res*. 25(2), 105-110.
- Castelo-Branco, C., Duran, M. and Gonzalez-Merlo, J. 1992. Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas*. 15(2), 113-119.
- Creidi, P., Faivre, B., Agache, P., Richard, E., Haudiquet, V. and Sauvanet, J.P. 1994. Effect of a conjugated oestrogen (Premarin) cream on ageing facial skin. A comparative study with a placebo cream. *Maturitas*. 19(3), 211-223.
- Cua, A.B., Wilhelm, K.P. and Maibach, H.I. 1990. Elastic properties of human skin: relation to age, sex, and anatomical region. *Arch Dermatol Res*. 282(5), 283-288.
- DaCosta, M.L., Regan, M.C., al Sader, M., Leader, M. and Bouchier-Hayes, D. 1998. Diphenylhydantoin sodium promotes early and marked angiogenesis and results in increased collagen deposition and tensile strength in healing wounds. *Surgery*. 123(3), 287-293.
- Danforth, D.N., Veis, A., Breen, M., Weinstein, H.G., Buckingham, J.C. and Manalo, P. 1974. The effect of pregnancy and labor on the human cervix: changes in collagen, glycoproteins, and glycosaminoglycans. *Am J Obstet Gynecol*. 120(5), 641-651.

- Deleixhe-Mauhin, F., Pierard-Franchimont, C., Rorive, G. and Pierard, G.E. 1994. Influence of chronic haemodialysis on the mechanical properties of skin. *Clin Exp Dermatol.* 19(2), 130-133.
- Dignan, C., Burlingame, B., Kumar, S. and Aalbersberg, W. 2004. The Pacific Islands food composition tables. Rome: Food and agriculture organization of the united nations (FAO). 135.
- Dunn, L.B., Damesyn, M., Moore, A.A., Reuben, D.B. and Greendale, G.A. 1997. Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Arch Dermatol.* 133(3), 339-342.
- Emons, G., Huschmand-Nia, A., Krauss, T. and Hinney, B. 2004. Hormone replacement therapy and endometrial cancer. *Onkologie.* 27(2), 207-210.
- Escoffier, C., de Rigal, J., Rochefort, A., Vasselet, R., Leveque, J.L. and Agache, P.G. 1989. Age-related mechanical properties of human skin: an in vivo study. *J Invest Dermatol.* 93(3), 353-357.
- Fraser, D., Padwick, M.L., Whitehead, M., Coffey, A. and King, R.J. 1991. Presence of an oestradiol receptor-related protein in the skin: changes during the normal menstrual cycle. *Br J Obstet Gynaecol.* 98(12), 1277-1282.
- Fuchs, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 111(62), 2807-2814.
- Fu, S.C., Hui, C.W., Li, L.C., Cheuk, Y.C., Qin, L., Gao, J. and Chan, K.M. 2005. Total flavones of *Hippophae rhamnoides* promotes early restoration of ultimate stress of healing patellar tendon in a rat model. *Med Eng Phys.* 27(4), 313-321.
- Gibbs, S., Silva Pinto, A.N., Murli, S., Huber, M., Hohl, D. and Ponec, M. 2000. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. *Wound Repair Regen.* 8(3), 192-203.
- Griffin, J.E. and Ojeda, S.R. 2000. *Textbook of Endocrine Physiology.* Oxford University Press. 479.
- Grosman, N. 1973. Study on the hyaluronic acid-protein complex, the molecular size of hyaluronic acid and the exchangeability of chloride in skin of mice before and after oestrogen treatment. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 33(3), 201-208.
- Grosman, N., Hvidberg, E. and Schou, J. 1971. The effect of oestrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh).* 30(5), 458-464.

- Gruber, D., Sator, M., Frigo, P., Knogler, W. and Huber, J.C. 1995. [Correlation of skinfold thickness with bone density and estradiol, FSH and prolactin level in a sample of 231 women]. *Wien Klin Wochenschr.* 107(20), 622-625.
- Gupta, A., Kumar, R., Pal, K., Singh, V., Banerjee, P.K. and Sawhney, R.C. 2006. Influence of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavone on dermal wound healing in rats. *Mol Cell Biochem.* 290(1-2), 193-198.
- Guralnik, J.M., Harris, T.B., White, L.R. and Cornoni-Huntley, J.C. 1988. Occurrence and predictors of pressure sores in the National Health and Nutrition Examination survey follow-up. *J Am Geriatr Soc.* 36(9), 807-812.
- Haapasaari, K.M., Raudaskoski, T., Kallioinen, M., Suvanto-Luukkonen, E., Kauppila, A., Laara, E., Risteli, J. and Oikarinen, A. 1997. Systemic therapy with estrogen or estrogen with progestin has no effect on skin collagen in postmenopausal women. *Maturitas.* 27(2), 153-162.
- Hall, D.A. 1981. Gerontology: collagen disease. *Clin Endocrinol Metab.* 10(1), 23-55.
- Hardman, M.J., Emmerson, E., Campbell, L. and Ashcroft, G.S. 2008. Selective estrogen receptor modulators accelerate cutaneous wound healing in ovariectomized female mice. *Endocrinology.* 149(2), 551-557.
- Holland, E.F., Studd, J.W., Mansell, J.P., Leather, A.T. and Bailey, A.J. 1994. Changes in collagen composition and cross-links in bone and skin of osteoporotic postmenopausal women treated with percutaneous estradiol implants. *Obstet Gynecol.* 83(2), 180-183.
- Hutchins, A.M., Martini, M.C., Olson, B.A., Thomas, W. and Slavin, J.L. 2001. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentrations in postmenopausal women. *Nutr Cancer.* 39(1), 58-65.
- Jemec, G.B. and Wojnarowska, F. 1987. The distribution of p29 protein in normal human skin. *Br J Dermatol.* 117(2), 217-224.
- Jorgensen, O. and Schmidt, A. 1962. Influence of sex hormones on granulation tissue formation and on healing of linear wounds. *Acta Chir Scand.* 124, 1-10.
- Kapiotis, S., Hermann, M., Held, I., Seelos, C., Ehringer, H. and Gmeiner, B.M. 1997. Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17(11), 2868-2874.

- Khanna, S., Venojarvi, M., Roy, S., Sharma, N., Trikha, P., Bagchi, D., Bagchi, M. and Sen, C.K. 2002. Dermal wound healing properties of redox-active grape seed proanthocyanidins. *Free Radic Biol Med.* 33(8), 1089-1096.
- Khoi, D.H., Thang, D.T. and Nhan, P.T. 1984. Chemical composition of coconut milk of varieties from southern vietnam. *Rev Pharm.* 27-36.
- Kobayashi, H., Morisaki, N., Tago, Y., Hashimoto, Y., Iwasaki, S., Kawachi, E., Nagata, R. and Shudo, K. 1997. Structural identification of a major cytokinin in coconut milk as 14-O-(3-O-[beta-D-galactopyranosyl-(1-->2)-alpha-D-galactopyranosyl-(1-->3)-alpha-L-arabinofuranosyl]-4-O-(alpha-L-arabinofuranosyl)-beta-d-galactopyranosyl)-trans-zeatin riboside. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 45(2), 260-264.
- Kong, E.H., Pike, A.C. and Hubbard, R.E. 2003. Structure and mechanism of the oestrogen receptor. *Biochem Soc Trans.* 31(1), 56-59.
- Letham, D.S. 1982. A 6-oxypurine with growth promoting activity. *Plant Science Letters.* 26(2-3), 241-249.
- Limpaphayom, K., Panyakhamlerd, K., Taechakraichana, N., Kukulprasong, A., Chotnopparatpattara, P. and Chaikittisilpa, S. 1999. The predictive value of skin thickness in the diagnosis of osteopenia. *J Med Assoc Thai.* 82(4), 347-351.
- Lovell, C.R., Smolenski, K.A., Duance, V.C., Light, N.D., Young, S. and Dyson, M. 1987. Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during ageing. *Br J Dermatol.* 117(4), 419-428.
- Lucas, E.A., Wild, R.D., Hammond, L.J., Khalil, D.A., Juma, S., Daggy, B.P., Stoecker, B.J. and Arjmandi, B.H. 2002. Flaxseed improves lipid profile without altering biomarkers of bone metabolism in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87(4), 1527-1532.
- Maheux, R., Naud, F., Rioux, M., Grenier, R., Lemay, A., Guy, J. and Langevin, M. 1994. A randomized, double-blind, placebo-ovx+EBled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. *Am J Obstet Gynecol.* 170(2), 642-649.
- Mansbridge, J.N. and Knapp, A.M. 1987. Changes in keratinocyte maturation during wound healing. *J Invest Dermatol.* 89(3), 253-263.
- Mills, S.J., Ashworth, J.J., Gilliver, S.C., Hardman, M.J. and Ashcroft, G.S. 2005. The sex steroid precursor DHEA accelerates cutaneous wound healing via the estrogen receptors. *J Invest Dermatol.* 125(5), 1053-1062.

- Oh, H.S. and Smart, R.C. 1996. An estrogen receptor pathway regulates the telogen-anagen hair follicle transition and influences epidermal cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(22), 12525-12530.
- Ohnemus, U., Uenalan, M., Conrad, F., Handjiski, B., Mecklenburg, L., Nakamura, M., Inzunza, J., Gustafsson, J.A. and Paus, R. 2005. Hair cycle control by estrogens: catagen induction via estrogen receptor (ER)-alpha is checked by ER beta signaling. *Endocrinology*. 146(3), 1214-1225.
- Ohnemus, U., Uenalan, M., Inzunza, J., Gustafsson, J.A. and Paus, R. 2006. The hair follicle as an estrogen target and source. *Endocr Rev*. 27(6), 677-706.
- Oikarinen, A. 2000. Systemic estrogens have no conclusive beneficial effect on human skin connective tissue. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 79(4), 250-254.
- Okoli, C.O., Akah, P.A. and Okoli, A.S. 2007. Potentials of leaves of *Aspilia africana* (Compositae) in wound care: an experimental evaluation. *BMC Complement Altern Med*. 7, 24.
- Pallin, B., Ahonen, J., Rank, F. and Zederfeldt, B. 1975. Granulation tissue formation in oophorectomized rats treated with female sex hormones. I. A histological study. *Acta Chir Scand*. 141(8), 702-709.
- Pallin, B., Ahonen, J. and Zederfeldt, B. 1975. Granulation tissue formation in oophorectomized rats treated with female sex hormones. II. Studies on the amount of collagen and on tensile strength. *Acta Chir Scand*. 141(8), 710-714.
- Panyakhamlerd, K., Chotnopparatpattara, P., Taechakraichana, N., Kukulprasong, A., Chaikittisilpa, S. and Limpaphayom, K. 1999. Skin thickness in different menopausal status. *J Med Assoc Thai*. 82(4), 352-356.
- Pierard, G.E., Letawe, C., Dowlati, A. and Pierard-Franchimont, C. 1995. Effect of hormone replacement therapy for menopause on the mechanical properties of skin. *J Am Geriatr Soc*. 43(6), 662-665.
- Pirila, E., Parikka, M., Ramamurthy, N.S., Maisi, P., McClain, S., Kucine, A., Tervahartiala, T., Prikk, K., Golub, L.M., Salo, T. and Sorsa, T. 2002. Chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen promote wound healing in ovariectomized rats: effects on matrix metalloproteinase-2, membrane type 1 matrix metalloproteinase, and laminin-5 gamma2-chain. *Wound Repair Regen*. 10(1), 38-51.



- Pirila, E., Ramamurthy, N., Maisi, P., McClain, S., Kucine, A., Wahlgren, J., Golub, L., Salo, T. and Sorsa, T. 2001. Wound healing in ovariectomized rats: effects of chemically modified tetracycline (CMT-8) and estrogen on matrix metalloproteinases -8, -13 and type I collagen expression. *Curr Med Chem.* 8(3), 281-294.
- Pritchard, K.I. 2002. Hormonal replacement therapy in breast cancer. *Ann Oncol.* 13 Suppl 4, 73-80.
- Punghmatharith, B. 1988. Sex hormone-like substances in young coconut juice and their effects on uterine growth in rats. *Songkhlanakarin J Sci Technol.* 10(2), 221-226.
- Punnonen, R. 1972. Effect of castration and peroral estrogen therapy on the skin. *Acta Obstet Gynecol Scand Suppl.* 21, 3-44.
- Punnonen, R., Vaajalahti, P. and Teisala, K. 1987. Local oestriol treatment improves the structure of elastic fibers in the skin of postmenopausal women. *Ann Chir Gynaecol Suppl.* 202, 39-41.
- Radenahmad, N., Vongvatcharanon, U., Withyachumnarnkul, B. and Connor, J.R. 2006. Serum levels of 17beta-estradiol in ovariectomized rats fed young-coconut-juice and its effect on wound healing. *Songkhlanakarin J Sci Technol.* 28(5), 897-910.
- Rao, C.V., Wang, C.X., Simi, B., Lubet, R., Kelloff, G., Steele, V. and Reddy, B.S. 1997. Enhancement of experimental colon cancer by genistein. *Cancer Res.* 57(17), 3717-3722.
- Reddi, A.H., Gay, R., Gay, S. and Miller, E.J. 1977. Transitions in collagen types during matrix-induced cartilage, bone, and bone marrow formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12), 5589-5592.
- Riggs, B.L., Wahner, H.W., Dunn, W.L., Mazess, R.B., Offord, K.P. and Melton, L.J. 1981. Differential changes in bone mineral density of the appendicular and axial skeleton with aging: relationship to spinal osteoporosis. *J Clin Invest.* 67(2), 328-335.
- Rovee, D.T. and Maibach, H.I. 2004. The epidermis in wound healing. *In Florida: CRC Press LLC.* 25-57.
- Rubin, J.S., Bottaro, D.P., Chedid, M., Miki, T., Ron, D., Cheon, G., Taylor, W.G., Fortney, E., Sakata, H., Finch, P.W. et al. 1995. Keratinocyte growth factor. *Cell Biol Int.* 19(5), 399-411.

- Ruiz-Larrea, M.B., Mohan, A.R., Paganga, G., Miller, N.J., Bolwell, G.P. and Rice-Evans, C.A. 1997. Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones. *Free Radic Res.* 26(1), 63-70.
- Schmidt, J.B., Binder, M., Demshik, G., Bieglmayer, C. and Reiner, A. 1996. Treatment of skin aging with topical estrogens. *Int J Dermatol.* 35(9), 669-674.
- Setchell, K.D., Gosselin, S.J., Welsh, M.B., Johnston, J.O., Balistreri, W.F., Kramer, L.W., Dresser, B.L. and Tarr, M.J. 1987. Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. *Gastroenterology.* 93(2), 225-233.
- Shahrad, P. and Marks, R. 1977. A pharmacological effect of oestrone on human epidermis. *Br J Dermatol.* 97(4), 383-386.
- Stumpf, W.E., Sar, M. and Joshi, S.G. 1974. Estrogen target cells in the skin. *Experientia.* 30(2), 196-198.
- Tapiero, H., Ba, G.N. and Tew, K.D. 2002. Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother.* 56(1), 36-44.
- Thornton, M.J., Taylor, A.H., Mulligan, K., Al-Azzawi, F., Lyon, C.C., O'Driscoll, J. and Messenger, A.G. 2003. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. *Exp Dermatol.* 12(2), 181-190.
- Tomobe, K., Philbrick, D.J., Ogborn, M.R., Takahashi, H. and Holub, B.J. 1998. Effect of dietary soy protein and genistein on disease progression in mice with polycystic kidney disease. *Am J Kidney Dis.* 31(1), 55-61.
- Uydes-Dogan, B.S., Takir, S., Ozdemir, O., Kolak, U., Topcu, G. and Ulubelen, A. 2005. The comparison of the relaxant effects of two methoxylated flavones in rat aortic rings. *Vascul Pharmacol.* 43(4), 220-226.
- Weiss, R.A., Eichner, R. and Sun, T.T. 1984. Monoclonal antibody analysis of keratin expression in epidermal diseases: a 48- and 56-kdalton keratin as molecular markers for hyperproliferative keratinocytes. *J Cell Biol.* 98(4), 1397-1406.
- Werner, S. 1998. Keratinocyte growth factor: a unique player in epithelial repair processes. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9(2), 153-165.
- Woessner, J.F., Jr. 1979. Total, latent and active collagenase during the course of post-partum involution of the rat uterus. Effect of oestradiol. *Biochem J.* 180(1), 95-102.
- Zhao, Y. and Planas-Silva, M.D. 2008. Mislocalization of cell-cell adhesion complexes in tamoxifen-resistant breast cancer cells with elevated c-Src tyrosine kinase activity. *Cancer Lett.*

[http://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen_receptor) (accessed 13/08/2008)

ภาคผนวก

## ภาคผนวก

การเตรียมสารเคมีเพื่อ凍ตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย LM

การเตรียม 20% buffer formalin solution

สารเคมีที่ใช้

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

วิธีการเตรียม

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

การเตรียม normal saline (0.9% NaCl)

สารเคมีที่ใช้

|                        |  |        |    |
|------------------------|--|--------|----|
| sodium chloride (NaCl) |  | 9.0    | g  |
| distilled water        |  | 1000.0 | mL |

วิธีการเตรียม

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

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

|                   |       |    |
|-------------------|-------|----|
| 95% ethyl alcohol | 500.0 | mL |
| distilled water   | 450.0 | mL |

**วิธีการเตรียม**

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

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

|                   |       |    |
|-------------------|-------|----|
| 95% ethyl alcohol | 700.0 | mL |
| distilled water   | 250.0 | mL |

**วิธีการเตรียม**

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

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

|                   |       |    |
|-------------------|-------|----|
| 95% ethyl alcohol | 800.0 | mL |
| distilled water   | 150.0 | mL |

**วิธีการเตรียม**

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

## การเตรียมสารเคมีเพื่อย้อมสี hematoxylin & eosin

### การเตรียม Mayer's hematoxylin

#### สารเคมีที่ใช้

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

#### วิธีการเตรียม

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

### การเตรียม stock eosin solution

#### สารเคมีที่ใช้

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

#### วิธีการเตรียม

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

### การเตรียม working eosin solution

#### สารเคมีที่ใช้

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

#### วิธีการเตรียม

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



### การเตรียมสารเคมีเพื่อย้อมสีด้วยวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี

#### การเตรียม 0.1 M TBS pH 7.2

##### สารเคมี

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

##### วิธีการเตรียม

ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น ละลายในน้ำกลั่นได้ปริมาณ 1000 mL ผสมให้เข้ากัน

#### การเตรียม 0.3% hydrogen peroxide ใน methanol

##### สารเคมี

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

##### วิธีการเตรียม

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

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

##### สารเคมี

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

##### วิธีการเตรียม

เติม Triton X-100 ตามปริมาณข้างต้นลงใน 0.1 M TBS pH 7.2 และควรเตรียมเมื่อจะใช้เท่านั้น

การเตรียมสารเคมีเพื่อ凍ตัวอย่างและเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย TEM

การเตรียม 4% paraformaldehyde

สารเคมีที่ใช้

|   |       |    |
|---|-------|----|
| paraformaldehyde  | 10.0  | g  |
| sodium dihydrogen phosphate ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ) | 5.3   | g  |
| 50% sodium hydroxide (NaOH)                               | 1.8   | mL |
| distilled water   | 250.0 | mL |

วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 200.0 mL ใส่บีกเกอร์
2. ค่อยๆ เติม paraformaldehyde จำนวน 10.0 g และ  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  จำนวน 5.3 g ลงไป ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องช่วยผสม และค่อยๆ เพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นประมาณ  $60^\circ\text{C}$
3. ค่อย ๆ เติมสารละลาย 50% NaOH จนได้สารละลายใส
4. นำสารละลายที่เตรียมได้มาปรับ pH ให้ได้ 7.2 และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 250.0 mL
5. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และวางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ  $0-4^\circ\text{C}$  พร้อมทั้งจะนำมาใช้

หมายเหตุ

1. สารละลาย 4% paraformaldehyde เป็นสารละลายที่แตกตัวช้า จึงต้องให้ความร้อน และเติม 50% NaOH เพื่อช่วยในการละลาย
2. สารละลาย 4% paraformaldehyde เป็นสารที่มีกลิ่นฉุนและเป็นอันตรายต่อระบบทางเดินหายใจ ควรเตรียมสารละลายในตู้ดูดควัน

### การเตรียม 0.1 M Phosphate Buffer Solution, pH 7.2 (0.1 M PBS, pH 7.2)

#### สารเคมีที่ใช้

- สารละลาย A, sodium phosphate monobasic 0.2 M
 

|   |        |    |
|---|--------|----|
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 31.2   | g  |
| distilled water                                     | 1000.0 | mL |
- สารละลาย B, disodium phosphate dibasic 0.2 M
 

|   |        |    |
|---|--------|----|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 35.6   | g  |
| distilled water                                     | 1000.0 | mL |

#### วิธีการเตรียม

- ชั่ง NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O จำนวน 31.2 g ใส่ในบีกเกอร์
- เติมน้ำกลั่นเพื่อช่วยในการละลาย 800.0 mL ผสมสารให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่องช่วยผสม นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000.0 mL
- นำสารละลายที่เตรียมได้ มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดเก็บสาร (สารละลาย A)
- ชั่ง Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O จำนวน 35.6 g ใส่ในบีกเกอร์
- เติมน้ำกลั่นเพื่อช่วยในการละลาย 800.0 mL ผสมสารให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่องช่วยผสม นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1000.0 mL
- นำสารละลายที่เตรียมได้ มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บไว้ในขวดเก็บสาร (สารละลาย B)
- ผสมสารละลาย A : สารละลาย B ด้วยอัตราส่วนดังนี้
 

|            |       |       |       |       |       |    |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|----|
| สารละลาย A | 23.0  | 46.0  | 69.0  | 92.0  | 115.0 | mL |
| สารละลาย B | 77.0  | 154.0 | 231.0 | 308.0 | 385.0 | mL |
| ปริมาตรรวม | 100.0 | 200.0 | 300.0 | 400.0 | 500.0 | mL |
- นำสารละลาย 0.2 M PBS มาปรับ pH ให้ได้ 7.2 โดยใช้ 1 N NaOH หรือ conc HCl
- เตรียมสารละลาย 0.1 M PBS ได้จากนำสารละลาย 0.2 M PBS มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 เก็บใส่ขวดเก็บสาร วางเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C พร้อมทั้งจะนำมาใช้ต่อไป

## การเตรียม 4% osmium tetroxide

### สารเคมีที่ใช้

|                                     |      |    |
|-------------------------------------|------|----|
| osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) | 1.0  | g  |
| distilled water                     | 25.0 | mL |

### วิธีการเตรียม

- ล้างหลอดแก้ว (ampule) หรือ ภาชนะบรรจุ  $\text{OsO}_4$  ให้สะอาดด้วยน้ำยาล้างจาน และนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นให้สะอาดอีกครั้ง แล้วเช็ดให้แห้งด้วยกระดาษเช็ดเลนส์
- ห่อหลอดแก้วด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ให้หนาพอสมควร
- ตีหลอดแก้วที่เตรียมได้ในข้อ 2 ให้แตกละเอียด เทใส่ขวดเก็บสารสีชา (reagent bottle for  $\text{OsO}_4$ )
- เติมน้ำกลั่น (ที่ผ่านการต้มสุกและกรองแล้ว) ปริมาตร 25.0 mL เขย่าเบาๆ เพื่อให้  $\text{OsO}_4$  ละลายจนหมด จะได้ 4%  $\text{OsO}_4$
- เมื่อต้องการใช้ 1%  $\text{OsO}_4$  ให้เจือจางจาก 4%  $\text{OsO}_4$  ด้วย 0.1 M PBS ในอัตราส่วน 1:3
- เก็บ 1%  $\text{OsO}_4$  ไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C ส่วน 4%  $\text{OsO}_4$  ให้เก็บไว้ที่มีตู้พร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

### หมายเหตุ

- สารละลาย 4%  $\text{OsO}_4$  เป็นสารมีพิษทำลายเยื่อบุทางเดินหายใจเมื่อได้รับไอระเหย และส่งผลให้เกิดมะเร็งปอดขึ้นได้ จึงควรเตรียมสารละลายในตู้ดูดควัน
- สารละลายที่เตรียมได้จะมีสีเหลืองใส แต่ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีขุ่น หรือมีตะกอนสีดำเกิดขึ้น แสดงว่า สารละลายเสื่อมประสิทธิภาพ

### การเตรียม 5% uranyl acetate

#### สารเคมีที่ใช้

|                |       |    |
|----------------|-------|----|
| uranyl acetate | 5.0   | g  |
| 70 % methanol  | 100.0 | mL |

#### วิธีการเตรียม

1. ชั่ง uranyl acetate จำนวน 5.0 g ใส่ในบีกเกอร์
2. เติม 70% methanol ลงไปเพื่อช่วยในการละลาย โดยใช้เครื่องช่วยผสม เมื่อละลายดีแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตรให้ได้ 100.0 mL
3. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดเก็บสาร สีชา วางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0-4°C พร้อมทั้งจะนำมาใช้

หมายเหตุ สารละลายจะมีสีเหลืองใส ถ้าหากว่า สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองขุ่น แสดงว่าสารละลายเสื่อมประสิทธิภาพ ไม่ควรนำมาใช้

### การเตรียม 2% uranyl acetate

#### สารเคมีที่ใช้

|                |       |    |
|----------------|-------|----|
| uranyl acetate | 2.0   | g  |
| 70% methanol   | 100.0 | mL |

#### วิธีการเตรียม

1. ชั่ง uranyl acetate จำนวน 2.0 g ใส่ในบีกเกอร์
2. เติม 70% methanol ลงไปเพื่อช่วยในการละลาย โดยใช้เครื่องช่วยผสม เมื่อละลายดีแล้ว นำสารละลายที่ได้มาปรับปริมาตร ให้ได้ 100.0 mL
3. นำสารละลายที่เตรียมได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 ใส่ขวดเก็บสาร สีชา วางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0-4°C พร้อมทั้งจะนำมาใช้

### การเตรียม embedding mixture

#### สารเคมีที่ใช้

| <b>mixture 1 :</b>               | <b>small amount</b> | <b>medium amount</b> | <b>large amount</b> |
|----------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| EMBed-812                        | 5.0 mL              | 20.0 mL              | 62.0 mL             |
| DDSA                             | 8.0 mL              | 31.0 mL              | 100.0 mL            |
| <b>mixture 2 :</b>               |                     |                      |                     |
| EMBed-812                        | 8.0 mL              | 20.0 mL              | 100.0 mL            |
| NMA                              | 7.0 mL              | 17.0 mL              | 90.0 mL             |
| <b>final embedding mixture :</b> |                     |                      |                     |
| <b>mixture 1 :</b>               | 13.0 mL             | 51.0 mL              | 162.0 mL            |
| <b>mixture 2 :</b>               | 15.0 mL             | 37.0 mL              | 190.0 mL            |
| <b>DMB-30*</b>                   | 0.56 mL             | 1.7 mL               | 7.0 mL              |

#### วิธีการเตรียม

1. ตวง EMBED-812 ปริมาตร 5.0 mL (หรือปริมาตรที่ต้องการ) ผสมกับ DDSA ปริมาตร 8.0 mL ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม (**mixture 1**)
2. ตวง EMBED-812 ปริมาตร 8.0 mL (หรือปริมาตรที่ต้องการ) ผสมกับ NMA ปริมาตร 7.0 mL ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม (**mixture 2**)
3. นำ mixture 2 ผสมกับ mixture 1 ให้เข้ากันดี โดยใช้เครื่องช่วยผสม
4. เติม DMB 30 ปริมาตร 0.56 mL ลงไป ผสมให้เข้ากันดีอีกครั้ง พร้อมที่จะนำมาใช้

หมายเหตุ ควรเตรียม embedding mixture ให้เสร็จก่อนนำมาใช้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ฟองอากาศที่เกิดจากการเตรียมค่อยๆ ลอยออกจากสารละลายจนหมด

## การเตรียมสารเคมีเพื่อย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วย TEM

### 0.5 % toluline blue

#### สารเคมีที่ใช้

|                      |       |    |
|----------------------|-------|----|
| toluine blue         | 0.5   | g  |
| disodium tetraborate | 0.5   | g  |
| ditilled water       | 100.0 | mL |

#### วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 90.0 mL ใส่ในบีกเกอร์
2. ค่อยๆ เติม disodium tetraborate จำนวน 0.5 g และ toluine blue จำนวน 0.5 g ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องช่วยผสม บั่นนาน 2 ชั่วโมง นำมาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100.0 mL
3. นำสารละลายสีที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดเก็บสารพร้อมที่จะนำมาใช้

### การเตรียม mesh cement

#### สารเคมีที่ใช้

|                   |      |    |
|-------------------|------|----|
| 50% ethyl alcohol | 95.0 | mL |
| acetic acid       | 5.0  | mL |

#### วิธีการเตรียม

1. ตวง 50% ethyl alcohol ปริมาตร 95.0 mL ใส่ขวดเก็บสาร
2. เติม acetic acid ปริมาตร 5.0 mL ลงไปผสมเข้าด้วยกัน ปิดฝาให้สนิทพร้อมที่จะนำมาใช้

## การเตรียม lead citrate

### สารเคมีที่ใช้

|                 |      |    |
|-----------------|------|----|
| lead nitrate    | 1.33 | g  |
| sodium citrate  | 1.76 | g  |
| distilled water | 50.0 | mL |

### วิธีการเตรียม

1. ตวงน้ำกลั่นปริมาตร 30 mL ใส่ขวดรูปกรวย
2. ค่อยๆ เติม lead nitrate จำนวน 1.33 g ลงไป ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เครื่องผสม
3. เติม sodium citrate จำนวน 1.76 g ผสมสารให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว (เขย่าอย่างแรง ประมาณ 5-10 นาที) จะได้สารละลายที่ขาว (คล้ายน้ำนม) วางทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ระหว่างนี้เขย่าสารละลายเป็นครั้งคราว
4. ค่อยๆ เติม 1 N NaOH ลงไปในสารละลายที่เตรียมได้ ประมาณ 8 mL จนได้สารละลายมีสีใส
5. นำสารละลายที่เตรียมได้ มาปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50.0 mL มากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 เก็บใส่ขวดเก็บสาร วางเก็บไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสพร้อมที่จะนำมาใช้ต่อไป

หมายเหตุ หากสังเกตเห็นสารละลายขุ่นหรือตกตะกอนไม่ควรนำมาใช้อีก



## ประวัติผู้เขียน

|                                       |                       |                     |
|---------------------------------------|-----------------------|---------------------|
| ชื่อ สกุล                             | นายอิบรอฮีม ซาโยะ     |                     |
| รหัสประจำตัวนักศึกษา                  | 4910220108            |                     |
| วุฒิการศึกษา                          |                       |                     |
| วุฒิ                                  | ชื่อสถาบัน            | ปีที่สำเร็จการศึกษา |
| วิทยาศาสตร์บัณฑิต<br>(เทคนิคการแพทย์) | มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ | 2547                |

## ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการเรียน)

1. ทุนผู้ช่วยนักวิจัย (RA) กองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2. ทุนผู้ช่วยสอน (TA) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Sayoh, I., Radenahmad, N., Sawangjaroen, K., Subhadhirasakul, P., Boonyoung, P., Rundorn, W. and Mitranun, W. "Histopathological Assessment of Young Coconut Juice on Cutaneous Wound Healing of Ovariectomized Rats" Proceedings of the 31<sup>th</sup> Annual Conference of the Anatomy Association of Thailand 2008, Pethchaburi, Thailand, April 30-May 2, 2008.