บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของเมวินฟอสต่อการหลั่งเทสโทสเตอโรนในชีรัม ของหนูอายุ 24 วัน พบว่าเมวินฟอสที่ปริมาณ 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรน ได้เฉพาะเมื่อให้เมวินฟอสครบ 30 วัน เท่านั้น ซึ่งจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่เมื่อให้เมวินฟอสเป็นเวลา 10 และ 20 วัน ระดับเทสโทสเตอโรนจะไม่ลดลงทั้ง 2 dose ทั้งนี้ เมวินฟอส อาจจะออกฤทธิ์ยับยั้ง acetylcholinesterase (Verberk., 1977; Palmer.,1978; Schoor and Brausch.,1970; Ames, et al., 1989) แบบเรื้อรังมากกว่าแบบเฉียบพลัน จึงแสดงผลต่อเนื่องจนไปลดระดับเทสโทสเตอโรน เมื่อให้เมวินฟอส เป็นเวลา 30 วันเท่านั้น เช่นเดียวกับหนูอายุ 50 วัน ที่พบว่าเมวินฟอสที่ปริมาณ 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ เมื่อให้เมวินฟอสครบ 30 วัน แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่จะพบว่าเมื่อให้เมวินฟอสเป็นเวลา 10 และ 20 วัน ที่ปริมาณความเข้มข้นเดียวกัน จะไม่ลดระดับเทสโทสเตอโรน ทั้งนี้สาเหตุที่เมวินฟอสสามารถที่จะลดระดับเทสโทสเตอโรนได้นั้น น่าจะมาจาก ระบบประสาทส่วนกลางที่ไปควบคุมการทำงานของไฮโปทาลามัส โดยที่ไฮโปทาลามัสจะกระตุ้น gonadotrophs หลั่ง GnRH ให้สร้างและหลั่ง LH โดยที่ LH จะกระตุ้น การสร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรน เนื่องจากเมวินฟอสมีผลยับยั้ง acetylcholinesterase จากระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งมีผลต่อเนื่องลงมาลดการสร้าง LH ได้ ทั้งนี้จากการรายงานของ Ratter and Michael.,1985 พบว่า organophosphate ชนิด acethion สามารถลดการสร้างและหลั่ง LH ได้ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Smallridge et al., 1991 ที่รายงานว่า diisopropyl fluorophosphate สามารถลดการสร้างและการหลั่ง LH ได้มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อมีระดับ LH ลดลง ก็จะทำให้การ

สร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรนลดลงตามไปด้วย แต่อย่างไรก็ตามเมวินฟอสจะมีผลลดระดับเทสโทสเตอโรน ในหนูตัวเต็มวัยมากกว่าหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย (ดังรูปที่ 2) ทั้งนี้เพราะว่าไฮโปทาลามัสจะหลั่ง GnRH ไปกระตุ้นการหลั่ง gonadotropin จากต่อมใต้สมองคือ LH ไปควบคุมการสร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรนในตัวที่โตเต็มวัยมากกว่าตัวที่ยังไม่เต็มวัย (Johnson and Everitt.,1988; Hadley.,1996) ซึ่งจะทำให้ตัวเต็มวัยได้รับผลกระทบมากกว่า

เมื่อศึกษาผลของเมวินฟอสต่อ Leydig cell พบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสและ Leydig cell ในลักษณะที่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงระดับเทสโทสเตอโรน โดยพบว่าในหนูอายุ 54 วัน ซึ่งได้เมวินฟอสที่ปริมาณความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน นั้นมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่พบการรวมกลุ่มของโครมาตินบริเวณรอบ ๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส การสูญเสียนิวเคลียสและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของนิวเคลียส ส่วนหนูอายุ 80 วัน พบว่าผลของการการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นกับ Leydig cell จำนวนมากและรุนแรงมากกว่าในหนูอายุ 54 วัน จะเห็นได้ว่าตัวเต็มวัยมีการตอบสนองต่อเมวินฟอส มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell ทั้งนี้เนื่องจาก Leydig cell ของหนูที่โตเต็มวัยมีความไวต่อสารรับเมวินฟอส ซึ่งจะสอดคล้องกับการรายงานของ Kelce et al.,1991 ที่ได้รายงานว่าสาร ethane dimethanesunfonate เป็นสาร cytotoxic ต่อ Leydig cell ของหนูที่โตเต็มวัยมากกว่าหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย เช่นเดียวกันกับรายงานของ Kerr et al.,1985,1986,1987; Molenaar et al., 1985; Bartlett et al.,1988; Morris et al.,1986

เมื่อเลี้ยง Leydig cell ของหนูอายุ 24 วัน ใน media ที่มี hCG และ cAMP ซึ่งจะพบว่า hCG และ cAMP จะกระตุ้นให้เพิ่มการหลั่งเทสโทสเตอโรน แต่พบจะว่า เมวินฟอสไปลดการหลั่งเทสโทสเตอโรน ลงประมาณ 10-50 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้พบว่า เมวินฟอสกับ hCG หรือ เมวินฟอสกับ cAMP สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรน ลงประมาณ 20-50 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกัน ส่วนใน Leydig cell ของหนูอายุ 70-75 วัน ผลที่ได้พบว่า hCG และ cAMP กระตุ้นการสร้างเทสโทสเตอโรน เหมือนกัน แต่พบว่าเมวินฟอสไปมีผลลดเทสโทสเตอโรนได้หมด ส่วนเมวินฟอสกับ hCG ลดระดับเทสโทสเตอโรน ได้ 25-50 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้น เมวินฟอส ปริมาณ 10 ppm ที่ลดระดับเทสโทสเตอโรน ได้ทั้งหมด ซึ่งผลที่ได้จะคล้ายๆ ผลของเมวินฟอสกับ cAMP ที่พบว่าลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ 25-50 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นเมวินฟอส ปริมาณ 10 ppm ที่สามารถลดระดับเทสโทสได้หมด กลไกการสร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรน จาก Leydig cell นั้น พบว่า LH หรือ hCG ซึ่งมี biological คล้ายกับ LH มี target cell อยู่ที่ Leydig cell โดยไปจับ receptor บริเวณผนังเซลล์ ทำให้ adenyl cyclase มีความสามารถผลิตสารสัญญาณภายในเซลล์ (second messenger) คือ cAMP ซึ่งเป็นสารที่เกิดขึ้นจาก adenosine triphosphate (ATP) โดยที่ cAMP จะไปกระตุ้นให้เกิดขบวนการสร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรน (Ewing et al.,1983; Johnson and Everitt.,1988) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ที่พบว่าทั้ง hCG และ cAMP สามารถกระตุ้นการสร้างและการหลั่งเทสโทสเตอโรน แต่อย่างไรก็ตาม เมวินฟอส หรือ เมวินฟอสกับ hCG หรือเมวินฟอสกับ cAMP พบว่ามีผลลดเทสโทสเตอโรนเหมือนกัน อาจมีสาเหตุมาจาก เมวินฟอสไปมีผลยับยั้งการออกฤทธิ์ LH ซึ่งจะส่งผลลดระดับ cAMP และลดการสร้างเทสโทสเตอโรนในที่สุด หรืออาจมีผลยับยั้ง substrate หรือ เอ็นไซม์ ในขบวนการสร้างเทสโทสเตอโรน ทั้งหมด (Haider and Upadhyaya.,1985,1986) ซึ่งสอดคล้องกับ organophosphate ชนิดอื่นๆ เช่น malathion มีผลยับยั้งเอ็นไซม์ hydroxy steroid dehydrogenase ยับยั้ง plasma progesterone (PraKash et al., 1992) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Takahashi et al., 1994 ที่พบว่า diisopropyl fluorophosphate ไปยับยั้ง progesterone ที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของไข่ตางคก organophosphate ชนิดอื่น เช่น fenthion ก็ไปมีผลลดเอ็นไซม์ 3-β-hydroxy steroid dehydrogenase (Kapur et al.,1978; Dellinger

and Morton.,1988) เช่นเดียวกันกับ การรายงานของ Klinefelter et al., 1990 (a,b) โดยการเลี้ยง Leydig cell ร่วมกับ ethane dimethanesulfonate พบว่า ethane dimethanesulfonate สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ ถึงแม้จะกระตุ้นการสร้างและหลั่งเทสโทสเตอโรนด้วย hCG และ cAMP ก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับ การศึกษาที่ผ่านมา ที่พบว่า ethane dimethanesulfonate มีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยน pregnenolone ไปเป็น เทสโทสเตอโรน Bu'Lock and Jackson., 1972, 1975 นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ในขบวนการสร้าง หรือ ลดระดับการสร้างเทสโทสเตอโรนได้ (Kerr et al.,1985,1986,1987; Molenaar et al.,1985; Bartlett et al.,1986; Morris et al.,1986; Kelce et al.,1991) นอกจากนี้ Chapin et al.,1990 ได้เลี้ยง Leydig cell ร่วมกับ tri-o-cresyl phosphate และกระตุ้น การสร้างเทสโทสเตอโรนด้วย hCG,cAMP, cholesterol,pregnenolone,progesterone และ androstenedione ผลการทดลองที่ได้พบว่า Tri-o-cresyl phosphate สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า Tri-o-cresyl phosphate มีผลลดความสมบูรณ์พันธุ์ การสร้างตัวอสุจิ และ เทสโทสเตอโรน (Carlton et al.,1987 ;Somkuti et al.,1986,1987(a,b),1991; Chapin et al.,1990) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูตัวเต็มวัยและหนูที่ยังไม่โตเต็มวัยพบว่าเมวินฟอสมีผลลดระดับเทสโทสเตอโรนใน Leydig cell ของหนูโตเต็มวัยมากกว่าหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองใน <u>in vivo</u> ทั้งมีผลต่อการลดระดับเทสโทสเตอโรน และการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell ที่พบว่าเมวินฟอสมีผลต่อตัวเต็มวัยมากกว่าตัวที่ยังไม่โตเต็มวัย

จากการศึกษาผลเมทิลพาราไธออนต่อการหลั่งเทสโทสเตอโรนในชีรัม ของหนู 24 วัน เมทิลพาราไธออนที่ปริมาณความเข้มข้น 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ไม่สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ เมื่อให้เมทิลพาราไธออนเป็นเวลา 10 และ 20 วัน ส่วนในวันที่ 30 นั้นระดับเทสโทสเตอโรนจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อให้ dose 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม

แต่ dose 100 ไมโครกรัมต่อ 1 กิโลกรัม จะไม่ลดระดับเทสโทสเตอโรนแต่อย่างใด ส่วนในหนูอายุ 50 วัน พบว่าเมทิลพาราไธออนที่ปริมาณ 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ไม่สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้เช่นเดียวกันกับหนูอายุ 24 วัน เมื่อให้เมทิลพาราไธออน 10 และ 20 วัน แต่ใน 30 วัน จะพบว่าระดับเทสโทสเตอโรน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ $p<0.01$) ใน dose 100 และ dose 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ ทั้งนี้การลดลงของเทสโทสเตอโรนจะมีผลเมื่อได้รับเมทิลพาราไธออนในระยะเวลานานๆ เช่นเดียวกันกับเมวินฟอส แต่ก็ต้องขึ้นอยู่กับปริมาณ หรือ dose ที่ให้ด้วย ส่วนสาเหตุการลดเทสโทสเตอโรนนั้นน่าจะมีสาเหตุมาจาก เมทิลพาราไธออนไปมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ acetylcholine esterase (Palmer.,1978; Schoor and Brausch.,1980) ในระบบประสาท และ ส่งผลต่อเนื่องลงมาที่ไฮโปทาลามัส ต่อมใต้สมองส่วนหน้า และระบบสืบพันธุ์ทำให้ลดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในที่สุด โดยจะพบว่า ในหนูตัวเต็มวัยได้รับผลกระทบมากกว่าตัวที่ยังไม่โตเต็มวัย (ดังรูปที่ 9)

เนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสของหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย ซึ่งได้รับสารเมทิลพาราไธออนในระดับความเข้มข้น 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน นั้นเกิดการเปลี่ยนแปลง Leydig cell เพียงเล็กน้อย แต่จะพบว่าหนูที่โตเต็มวัยอายุ 80 วัน เมื่อได้รับสารนี้เช่นเดียวกันจะเกิดการเสียหายต่อ Leydig cell จำนวนมากและรุนแรงกว่า ผลของการศึกษาทางเนื้อเยื่อจะสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเตอโรน เช่นเดียวกัน และการที่หนูโตเต็มวัยมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและ Leydig cell ที่อยู่ระหว่างเซมินิเฟอรัส มากกว่าของหนูที่ยังไม่โตเต็มวัยนั้น เพราะว่าเนื้อเยื่อของอันฑะมีความไวต่อสารนี้มากกว่า เช่นเดียวเดียวกันกับ organophosphate บางชนิดเช่น ethane dimethan esunfonate ซึ่งเป็นสาร cytotoxic ต่อ Leydig cell ของหนูที่โตเต็มวัยมากกว่าหนูที่ยังไม่โตเต็มวัย (Kerr et al.,1985,1986,1987; Molenaar et al.,1985; Bartlett et al.,1986; Morris et al.,1986; Kelce et al.,1991) และสรุปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell นั้นขึ้นอยู่ปริมารของสารที่ได้รับและวัยที่

เหมาะสมซึ่งอยู่ในช่วงวัยสืบพันธุ์

เมื่อเลี้ยง Leydig cell ของหนูอายุ 24 วัน ใน media ที่มี hCG และ cAMP ซึ่งจะพบว่า hCG และ cAMP จะกระตุ้นการหลั่งเทสโทสเตอโรน แต่พบว่าเมทิลพาราไธออนจะลดระดับเทสโทสเตอโรน ได้ประมาณ 25 และ 70 เปอร์เซนต์ เมื่อมีปริมาณของเมทิลพาราไธออน 1 และ 10 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้เมทิลพาราไธออนกับ hCG หรือ เมทิลพาราไธออนกับ cAMP ก็สามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ประมาณ 30,100 และ 30, 85 เปอร์เซนต์ เมื่อมีปริมาณเมทพาราไธออน 1 และ 10 ppm ตามลำดับ นอกจากนี้ใน Leydig cell ของหนูอายุ 70-75 วัน ก็พบว่า hCG และ cAMP กระตุ้นการหลั่งเทสโทสเตอโรนเช่นเดียวกันกับ Leydig cell ของหนูอายุ 24 วัน แต่พบว่าเมทิลพาราไธออนสามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้หมด นอกจากนี้เมทิลพาราไธออน กับ hCG ลดระดับเทสโทสเตอโรนประมาณ 80 เปอร์เซนต์ เมื่อมีปริมาณเมทิลพาราไธออน 0.001 และลดระดับเทสโทสเตอโรนได้หมดเมื่อมีปริมาณเมทิลพาราไธออน 0.01 ,0.1,1 และ 10 ppm ซึ่งคล้าย ๆ กับผลของเมทิลพาราไธออน กับ cAMP ที่มีผลลดระดับเทสโทสเตอโรนได้ประมาณ 90 เปอร์เซนต์ เมื่อมีปริมาณเมทิลพาราไธออน 0.001 และ 0.01 ppm แต่จะพบว่าเมื่อมีเมทิลพาราไธออนปริมาณ 0.1,1 และ 10 ppm จะสามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้หมด สาเหตุหรือกลไกที่เมทิลพาราไธออนสามารถลดระดับเทสโทสเตอโรนได้นั้น น่าจะมีกลไกมาจากเมทิลพาราไธออนไปมีผลยับยั้งการทำงานของ hCG และ cAMP ซึ่งจะส่งผลไปลดการหลั่งเทสโทสเตอโรน ได้ในที่สุด นอกจากนี้เมทิลพาราไธออน อาจไปมีผลลด substrate ของเทสโทสเตอโรน เช่น ลดการสะสมโคเลสเตอรอล (Prasada and Ramana.,1984(b)) หรืออาจมีผลยับยั้งเอ็นไซม์ในขบวนการสร้างเทสโทสเตอโรนทั้งหมด ซึ่งจะทำให้การหลั่งเทสโทสเตอโรนลดลงได้เช่นเดียวกันกับ organophosphate ชนิด ethane dimethanesulfonate (Kerr et al., 1985, 1986, 1987; Rommerts et al.,1985,1988; morris et al., 1986; Bartlett et al., 1986; Edwards et al.,1988) หรือมีผล

คล้ายกับ organophosphate ชนิด Tri-o-cresyl phosphate ที่ไปมีผลลดความสมบูรณ์พันธุ์, การสร้างตัวอสุจิ และ เทสโทสเตอโรน (Carlton et al.,1987; Somkuti et al.,1987,1991; Chapin et al.,1990) เป็นต้น เมื่อเทียบระหว่างตัวเต็มวัยและตัวที่ยังไม่โตเต็มวัยจะพบว่าตัวที่โตเต็มวัย Leydig cell จะตอบสนองต่อเมทิลพาราไธออนมากกว่า ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองใน in vivo และการเปลี่ยนแปลงของ Leydig cell

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลสอดคล้องกันไม่ว่าจะเป็นการศึกษาทั้งใน in vivo, in vitro และ ผลโดยตรงต่อ Leydig cell และเมื่อรวบรวมข้อมูลเข้าด้วยกันหรืออธิบายเหตุผลรวมกันแล้ว จึงสามารถสรุปได้ดังนี้

ผลของเมวินฟอสและเมทิลพาราไธออน ในการยับยั้งการหลั่งหลั่งเทสโทสเตอโรนได้นั้น น่าจะมาจากการที่สารดังกล่าวมีผลโดยตรงที่ระดับเซลล์ลัยดิก โดยยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนของเซลล์ ตลอดจนทำให้เซลล์ลัยดิกผิดปกติไป ส่วนกลไกการยับยั้งนั้นน่าจะผ่านการยับยั้งที่ cAMP

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย