บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันงานวิจัยในด้าน biomedical research ได้กำหนดให้มีการใช้ primates เป็นสัตว์ทดลอง นอกเหนือจากการทดลองในสัตว์เลี้ยงด้วยนมเช่นหนูแล้วและก่อนที่นำมาประยุกต์สู่มนุษย์ในขั้นสุดท้าย non-human primates ที่นิยมนำมาเป็นสัตว์ทดลองได้แก่ Genus Macaca เช่น (Bonnet monkey ; Macaca radiata) ลิงญี่ปุ่น (Japanese monkey; Macaca fuscata) ลิงวอก (Rhesus monkey ; Macaca mulatta) และลิงหางยาวหรือลิงแสม (Crab eating monkey; Macaca fascicularis)

สำหรับลิงหางยาว เป็นสายพันธุ์ ที่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในประเทศไทย มีถิ่นที่อยู่อาศัยตามต้นโกงกาง ป่าชายเลน และยังพบตามเกาะต่าง ๆ ในบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้อาหารของลิงชนิดนี้ได้แก่ พวกปูและหอยที่มีอยู่รอบ ๆ บริเวณที่มันอาศัยอยู่ ดังนั้นจึงชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ (Crab eating monkey)

ลิงหางยาวจัดอยู่ใน Class Mammal, Subclass Theria, Infraclass Etheria, Order Primate, Suborder Antropoid, Superfamily Cercopithecinae ได้มีการนำลิงชนิดนี้มาใช้ในงานวิจัยด้านต่าง ๆ ทั้งในประเทศและต่างประเทศ ในประเทศไทยมีการเลี้ยงลิงหางยาว เพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลอง ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ทางทหารฝ่ายสหรัฐ (Armed Forces Research Institute of Medical Sciences) และหน่วยวิจัยไพรเมทที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทั้งนี้เพราะมีรายงานหลายฉบับที่พบว่า ลิงหางยาวมีแบบแผนของฮอร์โมนทางการสืบพันธุ์คล้ายคลึงกับที่พบในมนุษย์ รวมทั้งรายงานของหน่วยวิจัยไพรเมท ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเอง (Varavudhi and Yodyingyuad, 1980)

ข้อมูลที่เกี่ยวกับระดับและแบบแผนการหลั่งของฮอร์โมนต่างๆ พบว่ามีความแตกต่างกันในแต่ละอายุ และเพศ นั้น ได้มีผู้ศึกษาและรวบรวมไว้สมบูรณ์ สำหรับลิงวอกมากกว่าลิงหางยาวด้วยเหตุที่ประเทศไทยยังมีลิงหางยาว ในปริมาณมากพออีกทั้งลิงหางยาวมีขนาดเล็ก

เหมาะกับนำมาใช้ในการทดลอง โดยที่ลิงหางยาวเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 5-10 กิโลกรัมเพศเมียมีน้ำหนักประมาณ 3.5-7.5 กิโลกรัม แบบแผนของฮอร์โมนทางการสืบพันธุ์ในลิงหางยาวที่มีรายงานไว้คือ ความยาวของรอบเดือนเฉลี่ยประมาณ 30.8 ± 1 วัน ในช่วงระยะฟอลลิคูลาร์ (follicular phase) มีค่าเฉลี่ย 14.1±1.1 วัน (12.5 - 16 วัน) ซึ่งจะต่อด้วยระยะกลางของรอบเดือน (mid cycle) ประมาณ 4 วัน ตามด้วยในระยะลูทีล (luteal phase) เฉลี่ยประมาณ 15.1 ± 1.8 วัน (10.5-18.5 วัน) (Rawson and Dukelow, 1973 ; Varavudhi, Tangpraprutigul and Asawaroengchai, 1982, Settachaiwat, 1987)

ในลิงหางยาวพบว่า อีสโตรเจนจะหลั่งออกมาจนถึงจุดสูงสุด พร้อมกับการเกิดจุดสูงสุดของ Luteinizing hormone (LH) ในระยะกึ่งกลางของรอบเดือน ซึ่งจะมีไข่ตกหลังจากเกิดจุดสูงสุดของอีสโตรเจนนาน 29-72 ชั่วโมง ในลิงหางยาว (Dukelow and Bruggemann, 1979) 24-48 ชั่วโมง ในลิงบอนเนท (Lasley, Hendrickes and Stabenfeldt, 1974) และ 37 - 43 ชั่วโมง ในลิงวอก (Weick et al.,1973) ปริมาณของอีสโตรเจน จะต้องมากกว่า200 พิโครกรัม/มิลลิลิตร ในลิงหางยาว (Schwartzetal.,1975)และปริมาณ 150-200 พิโครกรัม/มิลลิลิตร ในลิงวอก (Karsch et al., 1976) จึงจะทำให้เกิด จุดสูงสุดของ LH ได้

ในคนความยาวรอบประจำเดือนปรกติเฉลี่ย 29 ± 3 วัน(Vandewiele, Bougumil and Dyrenfurth, 1970) แต่อาจเปลี่ยนแปลงได้ขึ้นกับความแตกต่างเฉพาะตัวของแต่ละบุคคล โดยเฉพาะในช่วงระหว่างเริ่มต้น และสิ้นสุดของระยะ fertile year การตกไข่ที่ จะเกิดขึ้นในคน ต้องมีปริมาณสูงสุดของอีสโตรเจน 150-200 พิโครกรัม/มิลลิลิตร เกิดก่อนจุดสูงสุดของ LH นาน 24 ชั่วโมง(Yen et al .,1972)

รังไข่ในพวกไพรเมท จะสังเคราะห์และหลั่งสเตียรอยด์ ฮอร์โมนได้แก่ อีสโตรเจน โปรเจสเตอโรนและเทสโทสเตอโรน โดยมีฮอร์โมน Gonadotropin จากต่อมใต้สมองเป็นปัจจัยสำคัญในการควบคุมในระยะฟอลลิคูลาร์ Follicle stimulating hormone (FSH) จะช่วยให้ฟอลลิเคิลเจริญเติบโต และสร้างอีสโตรเจนช่วงต้นระยะฟอลลิคูลาร์ ปริมาณอีสโตรเจนจะค่อยๆเพิ่มขึ้นช้าๆจนประมาณ 8 วัน และจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งถึงจุดสูงสุดและจะลดลงพร้อมกับ FSH และ LH สำหรับลิงในตระกูล Macaca ปริมาณอีสโตรเจนจะเพิ่มขึ้นอีกจนเกิดจุดสูงสุดที่2 ในระหว่างช่วงกลางของระยะลูทีล ซึ่งจุดสูงสุดที่ 2

ของอีสโตรเจนนั้สร้างมาจาก คอร์พัส ลูเตียม (ลิงวอก:Hotchkiss, Atkinson and Knobil, 1971; Hutchinson and Zeleznic, 1984; ลิงหางยาว : Mouldgal, Macdonald and Greep,1972; Varavudhi et al.,1982; Luiengpirom,1987) จุดสูงสุดของอีสโตรเจนที่เกิดครั้งที่ 2 ในลิงหางยาวและลิงวอก จะไม่เห็นเด่นชัดเหมือนกับที่พบในคน และลิงชิมแปนซี แต่ปริมาณอีสโตรเจนมี เพียงพอที่จะทำให้ คอร์พัส ลูเตียม เกิดการเสื่อมสลายได้ (Karsh et al.,1976) การเสื่อมสลายของคอร์พัส ลูเตียม ในคน และลิงวอก เป็นผลมาจาก การที่อีสโตรเจน ไปยับยั้ง activity ของเอ็นไซม์ 3β-hydroxysteroid dehydrogenase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ สำคัญในการเปลี่ยนแปลง pregnenolone ไปเป็น progesterone

นอกจากนั้นยังพบว่าLHเป็นฮอร์โมนที่จำเป็นในการสร้าง progesterone สำหรับการเกิดระยะลูทีลที่ปกติในคน (Vandewiele et al., 1970) ในลิงหางยาว (Mouldgal, Macdonald and Greep, 1972) และในลิงวอก (Hutchinson and Zeleznik,1984) คอร์พัส ลูเตียม ในลิงวอก (Hisaw, 1944; Smith, 1954; Meyer, 1972; Knobil, 1973; Hodgen and Tullner, 1975) และในลิงหางยาว (Varavudhi et al., 1982; Kasemsatayakorn, 1987) มีอายุ 13-17 วัน คอร์พัส ลูเตียม ของ ไพรเมท สามารถสร้างและหลั่งสเตียรอยด์ ฮอร์โมน ได้ทั้ง อีสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรน (Milkhail, 1970 ; Baird et al., 1975) โดยในระยะฟอลลิคูลาร์ รังไข่ของคนจะสร้างโปรเจสเตอโรน โดยตรงได้ในปริมาณเล็กน้อยและอีกส่วนหนึ่งได้จาก ต่อมหมวกไตจากการสร้างโดยตรง และเปลี่ยนแปลงจาก pregnenolone และ pregnenolone sulfate (Little and Billiar, 1969) ในระยะกึ่งกลางของรอบประจำเดือน โปรเจสเตอโรนจะหลั่งจาก preovulatory follicle (Llyod et al., 1971) โดยที่โปรเจสเตอโรนจะเพิ่มในพลาสมา ประมาณ 48 ชั่วโมง ก่อนที่จะมีไข่ตก (Johnsson, 1969; Yussman and Taymor, 1970) และในระยะลูทีล ปริมาณของ progesterone ที่ผลิตจากต่อมหมวกไตจะคงที่ ในขณะที่อัตราการผลิต progesterone จาก คอร์พัส ลูเตียม จะเพิ่มขึ้น มากกว่า 20 มิลลิกรัม/วัน ปริมาณ progesterone จะเพิ่มสูงสุด 10-15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในคน (Neill et al., 1967) 7-8 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในลิงหางยาว (Stabenfeldt and Hendrickse, 1973) 4-5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในลิงวอก (Neill and Knobil, 1967) ถ้าไม่มี

การปฏิสนธิเกิดขึ้น ออร์โมน โปรเจสเตอโรน ก็จะลดลงในช่วง 4 วัน สุดท้ายของรอบเดือน ตามช่วงชีวิตของคอร์พัส ลูเตียม และเกิด menstruation

ในคนเมื่อย่างเข้าสู่วัย 45-55 ปี (Amundsen and Diers, 1973) และในสิงวอกวัย ประมาณ 27-30 ปี (Wagenen, 1972) จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงทาง endocrine Function เนื่องจากมีการเสื่อมสลายของ Reproductive system ในช่วงแรกก่อนที่จะเข้าสู่วัยหมดประจำเดือน ปริมาณ FSH เพิ่มสูงโดยที่ปริมาณ LH มิได้สูงขึ้นกว่าปกติ เนื่องจากรังไข่สร้างออร์โมน inhibin ได้น้อยลง ซึ่งออร์โมน inhibin มีหน้าที่ยับยั้ง FSH(Marder,Channing and Schwartz, 1977) วัยนี้จะเริ่มพบการเกิดรอบประจำเดือนที่สั้นเข้าในระยะฟอลลิคูลาร์ รอบประจำเดือนจะลดลงเฉลี่ยเหลือประมาณ 8-10 วัน แต่ระยะลูทีลจะคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ FSH เพิ่มขึ้น และหลั่งออกมาเร็วกว่าในสภาวะปกติ FSH จะไปเร่งอัตราการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล ทำให้มีไข่ตกเร็วขึ้น ต่อมาฟอลลิเคิลที่เหลืออยู่ จะตอบสนองต่อปริมาณ gonadotropin ได้น้อยลง ซึ่งมีผลทำให้ออร์โมน อีสโตรเจนสร้างได้ไม่เพียงพอที่จะไปทำให้เกิดภาวะ negative feedback ระยะฟอลลิคูลาร์จึงยาวขึ้น มีผลทำให้ระยะห่างในการเกิดประจำเดือนนานขึ้น และบางครั้งปริมาณอีสโตรเจน มีไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นLH ให้เกิดการตกไข่ได้ จึงพบว่ามีการเกิด cycle เป็นแบบ anovulation มีช่วงของการเกิดรอบประจำเดือนที่ห่างและไม่สม่ำเสมอจนในที่สุดก็จะถึงภาวะหมดประจำเดือนจริง Wilks, Hodgen and Ross (1979) พบว่า cycle ที่พบการตกไข่ จะต้องมีจุดสูงสุดของอีสโตรเจนเกิดที่ระยะกึ่งกลางของรอบเดือน และระดับโปรเจสเตอโรน จะต้องไม่น้อยกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ anovulatory cycle จะไม่มีจุดสูงสุดของอีสโตรเจนเกิดที่ระยะกึ่งกลางของรอบเดือน และ ระดับโปรเจสเตอโรน น้อยกว่า 1 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งอาจพบความผิดปกติเกิดขึ้นได้ 2 แบบ คือ แบบที่มีระยะลูทีลสั้น (Short Luteal Phase, SLP) คือมีระยะลูทีล เกิดน้อยกว่า 10 วัน และหลังจากเกิดจุดสูงสุดของ LH 3 วันแล้ว โปรเจสเตอโรนยังคงมีระดับต่ำ และ แบบที่มีช่วงห่างของระยะลูทีลปกติ (Inadequate Luteal Phase, ILP) คือมีระยะลูทีลเกิดปกติแต่มีระดับโปรเจสเตอโรนต่ำ เมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจะพบปริมาณ FSH และ LH สูงขึ้น อัตราส่วนของ FSH : LH มากกว่า 1 (Vanlook et al., 1971) ปริมาณอีสโตรเจนและ โปรเจสเตอโรนลดลง วัยนี้รังไข่ยังคงสร้างออร์โมนเพศชาย เทสโทสเตอโรน, androstenedione และ dehydroepiandrosterone แต่สร้างออร์โมน เทสโทสเตอ

โรนมากกว่า และปริมาณ androstenedione สร้างได้น้อยลงประมาณ 20 % (Chang and Judd, 1981) โดยรวมแล้วเทสโทสเตอโรน ที่วัดได้ในพลาสมา จะลดลงกว่าเดิม เนื่องจาก primary source (androstenedione) ที่จะเปลี่ยนไปเป็นเทสโทสเตอโรนลดลง อิสโตรเจน ในวัยเจริญพันธุ์ รังไข่จะผลิตได้โดยตรง 95% ในรูปแบบของอีสตราไดออล (E_2)และอีก5%ได้จากปฏิกริยาaromatizationของอีสโตรน(E_1) ใน peripheral tissue อีสโตรนเป็นอีสโตรเจนรูปแบบหนึ่งที่ผลิตได้มากขึ้นในวัยหมดประจำเดือน ค่าเฉลี่ยที่พบในคนวัยนี้มีค่า 35 นาโนกรัม/ลิตร (Longcope, Kato and Horton, 1969) ส่วนค่าปกติที่พบในวัยเจริญพันธุ์มีค่าประมาณ 150-300 นาโนกรัม/ลิตร และมี metabolic clearance rate (MCR) ประมาณ 1600 ลิตร/วัน (Longcope, 1971) อีสโตรนเปลี่ยนแปลงมาจาก androstenedione และเทสโทสเตอโรนใน peripheral tissue อัตราการเปลี่ยนแปลงประมาณ 2.8% (Chang and Judd, 1981) แหล่งที่เกิด aromatization พบได้ในบริเวณ adipose tissue ตับ ไต สมอง และกล้ามเนื้อ (Longcope et al., 1978) โดยทั่วไปกระบวนการนี้เกิดได้ตลอดเวลาและพบอัตราการเกิดเพิ่มมากขึ้นในวัยสูงอายุกระบวนการนี้สัมพันธ์โดยตรงกับ น้ำหนัก และอายุ (Hemsell et al., 1974 ; Judd et al., 1980) รังไข่ในวัยหมดประจำเดือนจะสูญเสียความสามารถในการสังเคราะห์ อีสตราไดออลได้ อีกทั้งไม่สามารถจะเปลี่ยนจาก androstenedione และเทสโทสเตอโรนที่รังไข่ผลิตได้ ทั้งนี้เพราะ granulosa cell สูญเสียระบบการทำงานของเอ็นไซม์ aromatase อีสตราไดออล ส่วนใหญ่จึงได้จากการเปลี่ยนแปลงจากอีสโตรนในกระแสเลือด (Judd et al., 1982) แหล่งตั้งต้นแรกของฮอร์โมนนี้ก็คือต่อมหมวกไต เหตุผลที่จะช่วยสนับสนุนคือมีรายงานพบว่าการตัดต่อมหมวกไตออกทั้งสองข้างและให้ dexamethasone จะมีผลทำให้ระดับ ฮอร์โมนอีสตราไดออลลดลงมากกว่า 50% (Veldhius et al., 1978)

ข้อมูลที่ละเอียดเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้จากการศึกษาที่พบในคนและลิงวอก สำหรับลิงหางยาวสูงอายุยังไม่เคยมีรายงานพบถึงปริมาณหรือแบบแผนการหลั่งของฮอร์โมนและการเกิดภาวะหมดประจำเดือน โดยเฉพาะลิงหางยาวที่เลี้ยงไว้ในหน่วยวิจัยไพรเมท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยแม้จะมีอายุมากแล้วก็ตาม (มากกว่า 10 ปี) แต่ก็ยังพบว่ามีเลือดประจำเดือนและสามารถที่จะผสมพันธุ์แล้วเกิดลูกได้ นอกจากนี้การเกิดภาวะ Aging ในคนและสัตว์ยังก่อให้เกิดปัญหาต่าง ๆ ทางด้านคลินิคได้หลายอย่าง รวมทั้งการศึกษาวิจัยด้านนิษวิทยา อิมมุนวิทยา และ การแพทย์หลายแขนง เนื่องด้วยที่มีเชื้อไวรัสบางชนิดมีระยะฟักตัวยาวนานมาก จนไม่

อาจจะใช้ หนู หรือ กระต่าย ซึ่งมีช่วงชีวิตสั้น และมีสายวิวัฒนาการห่างไกลจากคนมากมาทำการทดลอง และเพื่อการนำผลมาประยุกต์ใช้ในคนจึงจำเป็นต้องนำลิงซึ่งมีสายวิวัฒนาการใกล้เคียงกับคนมาใช้เป็นสัตว์ทดลอง ข้อมูลต่าง ๆ ที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอส่วนใหญ่มีข้อมูลพื้นฐานจากลิงวัยหนุ่มสาวทั้งสิ้น ในลิงสูงอายุยังไม่มีรายงาน และของลิงวัยหนุ่มสาวที่มีรายงานอยู่แล้วก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าคล้ายคลึงกับคนทุกประการ ตัวอย่างเช่นการที่ไม่พบ จุดสูงสุดของอิสตราไดออล ในระยะลูทีลในลิงหางยาว แต่พบในคนและลิงชิมแปนซี หน่วยวิจัยไพรเมทจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยได้ทำการเลี้ยง และสืบทอดลิงหางยาวไว้เพื่อใช้เป็นสัตว์ทดลองในการค้นคว้าร่วมกับหน่วยวิจัยอื่นๆ ทั้งภายนอกและภายในมหาวิทยาลัยมานานกว่า15 ปีแล้ว เช่นการค้นคว้าร่วมกับสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ หน่วยวิจัยยาเสพติด หน่วยวางแผนครอบครัว หน่วยวิจัยออร์โมนจากต่อมไร้ท่อ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ และมีลิงหางยาวภายในโคโลนีมากกว่า 100 ตัว ตลอดมา ในจำนวนนี้มีมากกว่า 20% ที่มีอายุ 15 ปีขึ้นไป ซึ่งทางหน่วยวิจัยไพรเมทไม่สามารถนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองใด ๆ ได้เพราะขาดข้อมูลพื้นฐาน นับเป็นการสูญเปล่าประกอบกับสัตว์ทดลองประเภทไพรเมทนี้มีราคาแพงและหายากขึ้นทุกวัน ดังนั้นเพื่อหาคำตอบเกี่ยวกับประสิทธิภาพการทำงาน ตลอดจนรูปแบบของฮอร์โมนทางการสืบพันธุ์ในลิงหางยาวที่มีอายุมาก เพศเมียในด้านการสร้าง และหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมนและฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง ความสำคัญของรังไข่ และต่อมใต้สมองตลอดจนความเป็นไปได้เกี่ยวกับ extra ovarian source ของ sex steroid ในลิงวัยนี้ ผู้วิจัยจึงหวังที่จะได้ข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการตัดสินใจในการเลือกใช้สัตว์ทดลองที่มีอายุมาก สำหรับงานวิจัยที่เหมาะสมต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้คือ</u>

เพื่อวัดระดับฮอร์โมน อิสโตรเจน, โปรเจสเตอโรน, เทสโทสเตอโรน, คอร์ติซอล, FSH และ LH ในซีรัมของลิงหางยาวเพศเมีย (<u>Macaca fascicularis</u>) อายุเกิน 15 ปี ในสภาวะก่อนตัดรังไข่และหลังตัด