บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผล

ผลของชีรัมลิงหางยาวระยะต่าง ๆ ต่อคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวเพศผู้อายุ 23-25 วัน

จากผลที่ชีรัมจากลิงทั้ง 3 ระยะที่ใช้ทดสอบ มีผลต่อค่าไบโอและอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ได้แตกต่างกัน สังเกตได้จากค่าอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองเพิ่มสูงขึ้นตามระยะการพัฒนาการเจริญของลิงหางยาวที่อายุต่าง ๆ กัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าชีรัมที่ระยะการเจริญสูงขึ้นสามารถกระตุ้นค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ได้มากกว่าอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Marrama et al. (1983) ที่ได้ทำการตรวจวัดหาอัตราส่วน BA : RIA ของ LH ในชีรัมของคนที่ระยะการเจริญอายุต่าง ๆ พบว่าค่าอัตราส่วนนี้เพิ่มสูงขึ้นเมื่อมีการเจริญเพิ่มขึ้นตั้งแต่เด็กจนกระทั่งโตเต็มที่ ซึ่งผลนี้ Montanini et al. (1984) ได้รายงานยืนยันในเด็กชายวัยรุ่นที่พบว่ามีค่าอัตราส่วน BA : RIA ของ LH ต่ำกว่าในชายโตเต็มวัย และ Asawaroengchai (1983) ได้รายงานว่าชีรัมรวมของลิงหางยาวทุกอายุที่ 3.3 % ให้ผลในการกระตุ้นค่าอัตราส่วน BA : RIA ของ LH จากเซลล์ต่อมใต้สมองลิงหางยาวระยะโตเต็มวัยได้ดีกว่าระยะฟีตัสใน *in vitro* อย่างไรก็ตาม การศึกษาเหล่านี้เพียงแต่คาดคะเนว่าปัจจัยที่สร้างความแตกต่างของอัตราส่วนดังกล่าวอาจเป็นสเตียรอยด์ในชีรัม แต่มิได้ทำการทดลองยืนยันว่าเป็นสเตียรอยด์ใดหรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์ใดที่รับผิดชอบต่อค่า BA : RIA ที่แตกต่างกันไปในแต่ละระยะ การศึกษาของข้าพเจ้าที่ได้ใช้โมเดลหนูเพื่อตรวจหาปัจจัยในชีรัมทั้ง 3 ระยะ ดังกล่าวร่วมกับข้อมูลเบื้องต้นของ Asawaroengchai นั้น แสดงว่ามีการพัฒนาของเซลล์ต่อมใต้สมองเองในการตอบสนองต่อตัวกระตุ้นควบคู่ไปกับการเปลี่ยนแปลงระดับของสเตียรอยด์ และสัดส่วนของสเตียรอยด์บางตัวในชีรัมที่รับผิดชอบต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบโมเลกุลของ LH โดยพบความสัมพันธ์ที่พอวิจารณ์ได้ดังต่อไปนี้

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับและอัตราส่วนของสเตียรอยด์ในซีรัมกับคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH

จากผลการวัดค่าสเตียรอยด์ในซีรัมลิงระยะต่างๆ ที่ใช้ทดสอบ ตลอดจนอัตราส่วนของสเตียรอยด์ ดังตาราง 15 สามารถนำมาหาความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองได้ดังแสดงในตาราง 15

ตารางที่ 15 แสดงค่าอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจน (P : E) โปรเจสเตอโรนต่อเทสโทสเตอโรน (P : T) และเทสโทสเตอโรนต่ออีสโตรเจน (T : E) ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์และผลต่อค่า BA ในแต่ละวันของการทดลอง และ RIA ในการทดลอง 3 วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม - = ไม่เปลี่ยนแปลง ↑ เพิ่มขึ้น ↓ ลดลง

กลุ่มทดลองที่ได้รับซีรัมจากลิงระยะ	อัตราส่วนของสเตียรอยด์			ซีรัม 6 %		ซีรัม 6 % + GnRH 7.5×10^{-15} M.	
	P:E	P:T	T:E	BA	RIA	BA	RIA
A♂	17.66	0.93	19.03	↑↑↑	-	↑↑↑	↓
A♀	19.47	5.21	3.12	↑↑↑	-	↑↑↑	↓
P♂	20.23	2.05	9.86	_↑↑	-	_↑↑	↑
P♀	4.64	5.00	0.93	↑↑↑	↑	↑↑↑	↑
I♂	29.35	3.67	8.00	↑↑_	-	↑__	↑
I♀	20.07	6.57	3.05	---	-	---	↑

การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติโมเลกุล rLH โดยเทสโทสเตอโรน

ผลของชีรัมจากลิงระยะต่าง ๆ ต่อ rLH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมอง พบว่าคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH มีความสัมพันธ์กับปริมาณของเทสโทสเตอโรนในชีรัมของลิงระยะต่าง ๆ โดยที่เทสโทสเตอโรนตั้งแต่ 8.64×10^{-15} M (ในกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก Iơ) สามารถกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และความสามารถในการกระตุ้นนี้เพิ่มขึ้นตามปริมาณของเทสโทสเตอโรนซึ่งสูงที่สุดที่ 40.34×10^{-15} M (ในกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก Aơ) และไม่ให้ผลการกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH ที่ปริมาณของเทสโทสเตอโรนต่ำกว่า 8.64×10^{-15} M (5.04×10^{-15} M ในกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก IQ) ฉะนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปริมาณของเทสโทสเตอโรนที่ 8.64×10^{-15} M เป็นปริมาณต่ำสุดที่อาจมีผลกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองของการศึกษานี้ และนอกจากนี้ไม่พบความสัมพันธ์ดังกล่าวกับสเตียรอยด์อื่น ๆ (อีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน)

ส่วนผลของเทสโทสเตอโรนต่ออิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองไม่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แม้จะคำนวณปริมาณสะสมตลอด 3 วันของการทดลอง ซึ่งผลจากการที่เทสโทสเตอโรนไปเพิ่มเฉพาะไบโอแอคทิวิตี rLH นี้ ทำให้มีอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH เพิ่มสูงขึ้นตามไปด้วย

ตามที่ได้เคยมีรายงานการศึกษาในหนู in vivo โดย Solano et al. (1979) ว่าอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH ทั้งที่เก็บสะสมไว้ในต่อมใต้สมองและในชีรัมของหนูขาวเพศผู้จะลดลงในระหว่าง 5-25 วัน ภายหลังจากที่ตัดต่อมเพศ การลดลงของอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH ในหนูที่ตัดต่อมเพศนี้ ไม่มีหลักฐานว่าเกิดเนื่องมาจากการสร้างแอลฟาซับยูนิต (ซึ่งรับผิดชอบต่อคุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทิวิตี) เพิ่มขึ้น แต่มีการทดลองยืนยันว่าเทสโทสเตอโรนที่ 4.5×10^{-8} M - 6.05×10^{-8} M (15-20 µg)/100 g น้ำหนักตัวสามารถยับยั้งการลดลงของอัตราส่วน BA : RIA ของ rLH ในกรณีนี้ได้ ซึ่งปริมาณของเทสโทสเตอโรนในระดับนี้เป็นปริมาณที่หนูขาวเพศผู้สร้างขึ้นในแต่ละวัน (Solano et al., 1980) Dufau et al. (1971) ได้ทดลองนำเอาสายของคาร์โบไฮเดรทซึ่งเป็นองค์ประกอบของโมเลกุล LH ของคนออก พบว่าคุณสมบัติทางไบโอแอคทิวิตี LH ลดลง ฉะนั้นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายหลังหลังจากการตัดต่อมเพศจึงอาจจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของปริมาณคาร์โบไฮเดรทในโมเลกุลของ rLH อันเป็นสาเหตุให้สูญเสียคุณสมบัติทางไบโอแอคทิวิตี

สำหรับผลของเทสโทสเตอโรนต่อคุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทีฟ rLH in vitro นั้น ได้เคยมีรายงานไว้เช่นเดียวกัน โดย Tang (1980) และ Tang and Spies (1975) ซึ่งว่าชีรัมหนูเพศผู้ที่ความเข้มข้น 10% หรือเทสโทสเตอโรนที่ 10^{-8} M. ไม่มีผลต่อค่าอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศเมียระยะโตเต็มวัยในการเพาะเลี้ยง 3 วัน

จากหลักฐานและรายงานเหล่านี้บ่งชี้ว่า เทสโทสเตอโรนสามารถปรับคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH โดยอาจมีผลช่วยให้มีการนำเข้าโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรทสู่ rLH โมเลกุล และการทดลองของข้าพเจ้าที่ใช้โมเดลหนูนี้ยังมีความไวในการตอบสนองสูงกว่าการทดลองใด ๆ ที่เคยมีรายงานมา โดยสามารถแสดงการเปลี่ยนแปลงหรือการตอบสนองต่อสเตียรอยด์ได้ในปริมาณที่ต่ำกว่ามาก

ผลของอัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนต่อ rLH โมเลกุล

มีข้อที่น่าสังเกตเกี่ยวกับผลของชีรัมลิงหางยาวต่อ rLH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองใน 3 วัน ของการทดลอง โดยพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับชีรัมจาก A♀ และ P♂ ให้รูปแบบของการกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH แตกต่างไปจากกลุ่มอื่น กล่าวคือ ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจากวันแรก และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลอง เมื่อพิจารณาอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนในตารางที่ 15 พบว่าทั้ง 2 กลุ่มนี้มีอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกันคือ 19.47-20.23 (61.94×10^{-15} M. ต่อ 3.81×10^{-15} M. และ 29.53×10^{-15} M.ต่อ 1.46×10^{-15} M) ในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีรัมจาก A♀ และ P♂ ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่อัตราส่วนนี้ร่วมกับเทสโทสเตอโรนในปริมาณที่ต่ำ เช่นในกรณีของกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก I♀ (5.04×10^{-15}M.) จะไม่ให้ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH เพิ่มตลอด 3 วันของการทดลอง และที่อัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนต่ำกว่า 19.47-20.23 ไม่อาจแสดงผลต้านผลของเทสโทสเตอโรนในการไปเพิ่มค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ได้ ดังเห็นได้จากกลุ่มทดลองที่ได้รับชีรัมจาก A♂ ที่มีอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนเท่ากับ 17.66 (37.45×10^{-15} M.ต่อ 2.12×10^{-15} M.) แต่มีค่าเทสโทสเตอโรนสูง (40.34×10^{-15} M) ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH สามารถเพิ่มสูงขึ้นทันทีจากวันแรก และสูงสุดในวันที่ 2 ของการทดลอง ส่วนกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก P♀ ที่มีอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนต่อที่ 4.64 (54.74×10^{-15} M. ต่อ 11.80×10^{-15}M.) ไม่แสดงผลต้านทานผลของเทสโทสเตอโรน ที่ความเข้มข้นเพียง 10.94×10^{-15} M. โดยในกรณีนี้

ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH เพิ่มขึ้นตลอดช่วง 3 วันของการทดลอง แต่ในกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก AQ และ PO มีปริมาณของเทสโทสเตอโรนที่ 11.88×10^{-15} M. และ 13.68×10^{-15} M. ตามลำดับ อาจเป็นปริมาณที่สูงพอที่จะแสดงผลต้านกับอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจน (ที่ 19.47-20.23) ได้ โดยสามารถแสดงผลให้ปรากฏในวันที่ 2 และ 3 ของการทดลอง ดังที่ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH สามารถเพิ่มขึ้นได้เล็กน้อยในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 3

ส่วนกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก IO ซึ่งมีอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนเท่ากับ 29.35 (31.70×10^{-15} M.ต่อ 1.08×10^{-15} M.) แต่ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH เพิ่มขึ้นใน 2 วัน ของการทดลอง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า อัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่มากกว่า 20.23 ของกรณีนี้มิได้แสดงผลต้านต่อเทสโทสเตอโรนในการเพิ่มคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH โมเลกุล ในขณะเดียวกันปริมาณของเทสโทสเตอโรนของกลุ่มนี้ยังค่อนข้างต่ำและค่าไบโอแอคทิวิตีของ rLH เพิ่มขึ้นเพียง 1.4 เท่า เท่านั้น ซึ่งต่างจากกลุ่มอื่นที่มีปริมาณเทสโทสเตอโรนสูงกว่าและสามารถเพิ่มค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ได้ 2-8 เท่า (ในกลุ่ม AO AQ และ PQ) ฉะนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า ปริมาณของเทสโทสเตอโรนที่ 8.64×10^{-15} M. เป็นปริมาณต่ำสุดที่อาจมีผลกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองของการศึกษานี้

มีข้อน่าสังเกตอีกประการหนึ่งก็คือ ในกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก PQ นอกจากจะสามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นในคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH โมเลกุลแล้ว ยังกระตุ้นการเพิ่มขึ้นในคุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุลให้สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มนี้มีอัตราส่วนโปรเจนเตอโรนต่ออีสโตรเจนต่ำกว่าทุกกลุ่ม (ที่ 4.64) และมีอีสโตรเจนสูงกว่าทุกกลุ่ม (11.80×10^{-15} M. เมื่อเทียบกับ 1.08×10^{-15} M.-3.8×10^{-15} M. ในกลุ่มอื่น) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอัตราส่วนโปรเจนเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่ต่ำ ในขณะเดียวกันกับมีปริมาณของเทสโทสเตอโรนที่ 10.94×10^{-15} M.) ให้ผลในการเพิ่มไบโอแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมอง และเฉพาะอัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนนี้ยังให้ผลในการเพิ่มคุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุลอีกด้วย

ผลของอีสโตรเจนในการเพิ่มคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ LH ได้เคยมีรายงานไว้โดย Marut et al. (1981) ว่า ทั้งในลิงวอกและลิงหางยาวที่ระยะก่อนตกไข่ ซึ่งอีสโตรเจนสูง (surge) ตรวจพบว่าในซีรัมลิงนี้มีไบโอแอคทิวิตี LH สูงขึ้นถึง 100 เท่า และในลิงที่ตัดรังไข่แล้วให้อีสโตรเจนที่ 2×10^{-15} M. (50 µg)/ Kg น้ำหนักตัวพบว่าไบโอแอคทิวิตี LH เพิ่มขึ้น

ภายใน 24 ชั่วโมง และนอกจากนี้ Liu and Jackson (1977) ได้รายงานว่า ในหนูขาวเพศเมียที่ตัดต่อมเพศและให้อีสโตรเจนที่ความเข้มข้นเดียวกันกับ Marut et al. (1981) เป็นเวลา 22 ชั่วโมง พบว่าอีสโตรเจนสามารถเพิ่มการนำเข้าของ [^{3}H] กลูโคซะมีน และ [^{14}C] ลิวซีน ไปในโมเลกุลของ LH ได้ การนำคาร์โบไฮเดรทและกรดอะมิโนเข้าไปในโมเลกุลของ LH เนื่องมาจากผลของอีสโตรเจนนี้ได้มีรายงานสนับสนุนผลการทดลองนี้ (Liu and Jackson, 1979a, 1979b, Wakabayashi, 1968) จากรายงานเหล่านี้แสดงให้เห็นผลของอีสโตรเจน นอกจากไปเพิ่มคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ LH โมเลกุลแล้วยังเพิ่มการสังเคราะห์ LH จากเซลล์ต่อมใต้สมองด้วย Tang (1980) ได้รายงานว่าซีรัมหนูเพศเมียที่ความเข้มข้น 10% หรืออีสโตรเจนที่ 10^{-8} M มีแนวโน้ม (ไม่มีนัยสำคัญ) ที่ไปเพิ่มอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศเมียระยะโตเต็มวันในการเพาะเลี้ยง 3 วัน

จากหลักฐานและรายงานต่าง ๆ ที่กล่าวข้างต้นนี้บ่งชี้ให้เห็นว่าอีสโตรเจนมีความสำคัญต่อการเพิ่มคุณสมบัติไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุล แต่ผลการศึกษาของข้าพเจ้านี้แสดงให้เห็นว่าไม่ใช่เฉพาะอีสโตรเจนเพียงลำพังที่กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุล แต่ความสำคัญอยู่ที่อัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนในซีรัม โดยที่อัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนสูงถึง 20 จะมีผลต้านการเพิ่มขึ้นของไบโอแอคทิวิตี rLH ซึ่งหมายความว่าแม้อีสโตรเจนจะสูง ดังรายงาน แต่ถ้าโปรเจสเตอโรนสูงด้วยก็จะให้ผลต้าน การเพิ่มขึ้นของไบโอแอคทิวิตี rLH นอกเสียจากว่าโปรเจสเตอโรนจะต่ำและอีสโตรเจนสูงเท่านั้น จึงจะให้ผลในการเพิ่มคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH

ผลของส่วน Dialysable และ Non-dialysable fraction ของซีรัม PQ ต่อ rLH โมเลกุล

จากการแยกส่วนของซีรัม PQ ด้วยวิธี Dialysis พบว่าส่วน Non dialysable fraction สามารถไปเพิ่มเฉพาะคุณสมบัติทางไบโอแอคทิวิตีของ rLH เท่านั้น เมื่อตรวจหาปริมาณของสเตียรอยด์ทั้ง 3 ในทั้ง 2 ส่วน พบว่าปริมาณสเตียรอยด์ส่วนมาก (อีสโตรเจน 97.62% โปรเจสเตอโรน 94.48% และเทสโทสเตอโรน 95.42%) อยู่ในส่วน Non-dialysable fraction ซึ่งหมายความว่าสเตียรอยด์ส่วนนี้อาจเป็นสาเหตุของการเพิ่มไบโอแอคทิวิตี rLH ส่วนสเตียรอยด์ส่วนน้อย (อีสโตรเจน 3.66% โปรเจนเตอโรน 5.51% และเทสโทสเตอโรน 3.01%) ไม่มีผลต่อ rLH โมเลกุล สเตียรอยด์ในส่วน Non-dialysable

fraction นี้ได้แก่ส่วนของสเตียรอยด์ที่รวมตัวอยู่กับพลาสมาโปรตีน ซึ่งไม่สามารถผ่าน Dialysis tubing ออกมาได้

ในการแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพของสเตียรอยด์ Anderson (1974) ได้เคยมีรายงานว่า เฉพาะสเตียรอยด์อิสระเท่านั้นที่จะผ่านเข้าไปในเซลล์เป้าหมายและสามารถแสดงคุณสมบัติทางชีวภาพได้ มีผู้วิจัยหลายท่านที่พยายามที่จะศึกษาเกี่ยวกับสเตียรอยด์ที่ไปรวมอยู่กับพลาสมาโปรตีน โดยพยายามที่จะวัดค่า K_a (Kinetic association หรือ Kinetic affinity เสนอโดย Scatchard, 1949) พบว่าค่า K_a ระหว่างสเตียรอยด์กับรีเซบเตอร์ในเซลล์เป้าหมาย มีค่าสูงกว่า K_a ระหว่างสเตียรอยด์กับพลาสมาโปรตีน นอกจากนี้นักวิทยาศาสตร์ยังได้พยายามที่จะอธิบายถึงกลไกการผ่านเข้าสู่เซลล์ของสเตียรอยด์ที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีน Pardigde (1981) โดยพบว่าฮอร์โมนที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีนเมื่ออยู่ใน in vitro จะอยู่ในสภาพอิสระ ส่วนใน in vivo สภาพอิสระของฮอร์โมนจะเกิดขึ้นเฉพาะภายใน capillary ที่ไปเลี้ยงเซลล์เป้าหมาย และได้อธิบายถึงกลไกการผ่านเข้าสู่เซลล์ของสเตียรอยด์ที่รวมอยู่ด้วยพลาสมาโปรตีนโดยตั้งสมมติฐานไว้ 2 สมมติฐานคือ 1. สเตียรอยด์ผ่านเข้าสู่เซลล์โดย Collision mechanism โดยที่สเตียรอยด์ที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีนเมื่อไปถึงเซลล์เป้าหมายสเตียรอยด์จะถูกส่งข้ามผนังเซลล์เข้าไปในเซลล์ไปให้รีเซบเตอร์ และ 2. Free intermediate mechanism คือ สเตียรอยด์จะแยกตัวเป็นอิสระจากพลาสมาโปรตีนก่อนที่จะถึงเซลล์เป้าหมาย แล้วจึงถูกรีเซบเตอร์ภายในเซลล์ที่มี affinity สูงกว่าพลาสมาโปรตีนดึงเข้าสู่เซลล์ ซึ่ง Free intermediate mechanism นี้ได้มีหลายคณะวิจัยสนับสนุนว่าเป็นไปได้มากที่สุด

จากผลการทดลองของข้าพเจ้านี้พบว่าเฉพาะส่วน Non-dialysable fraction ซึ่งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ (M.W. มากกว่า 12,000 ดาลตัน) ให้ผลในการเพิ่มคุณสมบัติทางไบโอแอคทิวิตี rLH ซึ่งส่วนนี้เป็นส่วนของสเตียรอยด์ที่ไปรวมตัวอยู่กับพลาสมาโปรตีน กลไกการแตกตัวและการผ่านเข้าสู่เซลล์อาจจะเกิดขึ้นได้ตามข้อเสนอของ Pardigde (1981) ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ฉะนั้นอาจเป็นไปได้ว่าพลาสมาโปรตีนจะเป็นตัวช่วยรักษาคุณสมบัติทางชีวภาพของสเตียรอยด์ในระบบไหลเวียนเลือดไม่ให้สเตียรอยด์ถูกทำลายไปก่อนที่จะมาถึงเซลล์ เมื่อเปรียบเทียบกับผลของซีรัมจาก PQ ที่ยังไม่ได้แยก (ไม่ได้ทำ Dialysis) ในการทดลองที่ 1 จะเห็นได้ว่าค่าไบโอแอคทิวิตีและอิมมิวโนแอคทิวิตีของ rLH ในกลุ่มนี้สูงกว่ากลุ่มที่ใส่ Non-diasable fraction ของ PQ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสเตียรอยด์ในซีรัม PQ ในรูปอิสระถูกแยกออกไป จึงทำให้มีสเตียรอยด์ในส่วน Non-dialysable fraction ของ PQ มีค่าต่ำกว่าซีรัม PQ ที่ยังไม่

ได้แยก ผลการกระตุ้นคุณสมบัติดังกล่าวของ rLH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองจึงต่ำกว่าผลของซีรัม PO ที่ยังไม่ได้แยก ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสเตียรอยด์ในกระแสโลหิตทั้งในรูปอิสระและรูปที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีน มีผลร่วมกันต่อคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิว-โนแอคทีฟของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมอง แต่มีกลไกเช่นไร การทดลองนี้ไม่อาจสรุปได้

ผลของ GnRH สังเคราะห์ 7.5×10^{-12} M. ต่อ rLH โมเลกุล

GnRH ที่ 7.5×10^{-12} M. กระตุ้นคุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุลอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง 3 วัน และไปลดคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH โมเลกุลเฉพาะในวันที่ 3 ของการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งทำให้อัตราส่วน BA : RIA ของ rLH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองลดลง รายงานของ Menon et al. (1977) ซึ่งแสดงว่า GnRH ที่ 2×10^{-8} M. (25 ng/ml) สามารถเพิ่มการนำเข้าของ [^{3}H] กลูโคซะมีน และ [^{3}H] โพรลีนไปในโมเลกุลของ LH ที่หลั่งออกมาในอาหารเลี้ยงต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวเพศเมียระยะโตเต็มวัย ภายใน 2 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง และรายงานทำนองเดียวกันโดย Liu and Jackson (1977) ซึ่งพบว่าการให้ GnRH ที่ 3.6×10^{-8} M. ให้ไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูขาวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถไปเพิ่มการนำเข้าของ [^{3}H] กลูโคซะมีน และ [^{3}H] โพรลีนได้เช่นกัน จากหลักฐานเหล่านี้แสดงว่า GnRH สามารถเพิ่มการสังเคราะห์โดยส่งเสริมการนำเข้าของสายคาร์โบไฮเดรตล่วงหน้าก่อนที่ LH โมเลกุลจะหลั่งออกมาจากเซลล์โกนาโดโทรป กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นภายหลังอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ซึ่งตรงกับผลการทดลองของข้าพเจ้าที่ไบโอแอคทิวิตี rLH เพิ่มหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไปถึง 2 วัน ซึ่งอาจเนื่องมาจากปริมาณของ GnRH ที่ใช้ต่ำ (7.5×10^{-12} M.) กว่าการทดลองของผู้อื่นบวกกับเซลล์ต่อมใต้สมองของการทดลองของข้าพเจ้าเป็นของหนูขาวอายุเพียง 23-25 วัน ส่วนในวันที่ 3 ของการทดลองนั้น ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ลดลง อาจเนื่องมาจากผลของ GnRH ที่ให้ไปในสภาพต่อเนื่องกันนี้ไปลดคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟของ rLH ที่หลั่งออกจากเซลล์ต่อมใต้สมอง

ผลของ GnRH 7.5×10^{-12} M. ร่วมกับซีรัมลิงหางยาวต่อ rLH โมเลกุล

เมื่อให้ GnRH 7.5×10^{-12} M. ร่วมกับซีรัมลิงหางยาวแบบต่อเนื่องกัน พบว่ากลุ่มทดลองที่มีปริมาณของเทสโทสเตอโรนตั้งแต่ 8.64×10^{-15}M.-40.34×10^{-15}M. หลั่งไบโอแอค-ทิวิตี rLH เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ให้เฉพาะ GnRH เพียงลำพัง และการเพิ่มขึ้นของไบโอแอคทิวิตี

rLH นี้ สัมพันธ์กับปริมาณของเทสโทสเตอโรน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า GnRH ที่ 7.5×10^{-15} M. เพียงลำพังกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี rLH ได้ต่ำ แต่ผลการกระตุ้นนี้สามารถได้รับผลเสริมจากเทส-โทสเตอโรน แต่เทสโทสเตอโรนในปริมาณที่สูงที่ 40.34×10^{-15} M. กลับให้ผลลดผลของ GnRH ต่ออิมมิวโนแอคทิวิตี rLH โมเลกุล จะเห็นได้จากกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก A♂ ทำให้อัตราส่วน BA : RIA ของ rLH สูงขึ้น ซึ่งผลของเทสโทสเตอโรนนี้ ได้เคยมีรายงานไว้โดย Solano et al. (1980) ได้ศึกษาใน <u>in vivo</u> พบว่าในหนูขาวเพศผู้ที่ตัดต่อมเพศ อัตราส่วน BA : RIA ของ rLH ลดลง แต่เมื่อให้เทสโทสเตอโรนที่ 1.5×10^{-7} M. ต่อวัน (ซึ่งเป็นปริมาณที่หนูขาวเพศผู้สร้างขึ้นในแต่ละวัน) ทำให้อัตราส่วน BA : RIA ของ rLH เพิ่มสูงขึ้นทันที จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของเทสโทสเตอโรนในชีรัมสามารถที่จะไปปรับผลของ GnRH ต่อไบโอแอคทิวิตีและอิมมิวโนแอคทิวิตีของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมอง

การเพิ่มขึ้นของค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ในแต่ละวันของการทดลอง พบว่า GnRH ที่ 7.5×10^{-12} M. ร่วมกับชีรัมลิงหางยาวระยะต่าง ๆ ให้ผลแตกต่างกันออกไป ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับการทดลองที่ให้เฉพาะชีรัมเพียงอย่างเดียว โดยที่การเพิ่มขึ้นของค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของการทดลองเพิ่มขึ้นด้วย Slope ที่ชันกว่า (ในวันแรกของการทดลองในกลุ่มทดลองที่ได้รับชีรัมจาก A♂ และในวันที่ 2 ของการทดลองของกลุ่มที่ได้รับชีรัมจาก A♀ P♂ P♀ I♂) หลังจากนั้นก็ลดต่ำลง

ในกรณีที่มีอัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่ 20 จะไปต้านผลของ GnRH (7.5×10^{-12} M.) แม้ว่าจะมีปริมาณของเทสโทสเตอโรนในช่วง 8.64×10^{-15}M. -40.34×10^{-15}M. ก็ตาม พบว่าไบโอแอคทิวิตี rLH จะไม่เพิ่มขึ้นในวันแรกของการทดลอง ผลของอัตราส่วนโปรเจนเตอโรนต่ออีสโตรเจนนี้อาจเกี่ยวกับการไปยับยั้งการนำเข้าของสายคาร์โบไฮเดรทเข้าไปในโมเลกุลของ rLH ดังที่ Mukhopadhyay et al. (1979) ได้รายงานไว้ว่า สเตียรอยด์จากต่อมเพศอาจให้ผลรบกวนผลกระตุ้นของ GnRH ต่อการเพิ่มอัตราส่วน BA : RIA ของ LH ได้

ค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ที่เพิ่มจนสูงสุดแล้ว จะกลับลดต่ำลงเรื่อย ๆ อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากความสามารถในการนำสายของคาร์โบไฮเดรทเข้าโมเลกุล rLH ลดลง หรือเกิดการลดความไวของเซลล์ต่อมใต้สมองต่อ GnRH ในการหลั่ง rLH โมเลกุล เพราะในการศึกษานี้ให้ GnRH ในสภาพต่อเนื่องกัน ซึ่งเคยมีรายงานไว้ว่า GnRH ที่ 3×10^{-8} M. ที่ให้ไปในหนูขาวต่อเนื่องกัน 12 ชั่วโมง การหลั่ง LH จะลดลง โดยพบว่า LH จะหลั่งเพิ่มขึ้นเฉพาะช่วงแรก

หลังจากนั้นการหลั่ง LH ลดลง (Smith and Vale, 1981)

นอกจากผลของเทสโทสเตอโรนในปริมาณที่สูง จะไปลดผลของ GnRH ต่ออิมมิวโน-แอคทิวิตี rLH แล้ว โปรเจสเตอโรนในปริมาณที่สูง (61.94×10^{-15} M.) ก็ให้ผลทำนองเดียวกัน ซึ่งจะเห็นได้จากกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก AQ แต่ผลของโปรเจสเตอโรนที่ไปลดผลของ GnRH นี้ สามารถถูกต้านได้ด้วยอีสโตรเจนซึ่งให้ผลตรงข้าม ดังจะเห็นได้จากกลุ่มที่ได้รับซีรัมจาก PQ ซึ่งมีปริมาณของอีสโตรเจนสูงที่ 11.80×10^{-15} M. ซึ่งในกลุ่มนี้แม้จะมีโปรเจสเตอโรนในปริมาณสูง (54.74×10^{-15} M) ก็ตาม แต่ก็มีการเพิ่มของอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของอีสโตรเจนที่สามารถต้านผลของโปรเจสเตอโรนได้ ในกลุ่มอื่น (P♂ I♂ และ IQ) ซึ่งมีปริมาณของทั้งโปรเจสเตอโรนและเทสโทสเตอโรนต่ำ แม้จะมีปริมาณของอีสโตรเจนต่ำก็ตาม แต่ก็สามารถให้ผลเสริมผลของ GnRH ในการเพิ่มอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ได้

การที่เทสโทสเตอโรนไปยับยั้งผลของ GnRH ต่อเซลล์ต่อมใต้สมองในการหลั่งอิมมิว-โนแอคทีฟ rLH นั้น Giguere et al. (1980) ได้รายงานว่าเทสโทสเตอโรนที่ 10^{-7} M. ที่ให้ไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองหนูขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะไปลดจำนวนรีเซปเตอร์ของ GnRH ที่ 10^{-12} - 10^{-4} M. ในเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาว ซึ่งทำให้มีการหลั่งอิม-มิวโนแอคทีฟ LH ลดลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Hsueh et al. (1979) ได้รายงานว่า อีส-โตรเจนและโปรเจสเตอโรนให้ผลต้านกันในการชักนำให้เซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวตอบสนองต่อ GnRH ในการหลั่งอิมมิวโนแอคทีฟ LH โดยพบว่าอีสโตรเจนที่ 10^{-12} M. จะกระตุ้นการหลั่งอิมมิวโนแอคทีฟ LH จากเซลล์ต่อมใต้สมองในการตอบสนองต่อ GnRH ที่ 10^{-12} M.-10^{-6} M. ในขณะที่โปรเจสเตอโรนที่ 10^{-8} M.-10^{-6} M. ให้ผลยับยั้ง แต่เมื่อให้สเตียรอยด์ทั้งสองนี้ในปริมาณที่เท่าเดิมร่วมกัน พบว่าผลการกระตุ้นของอีสโตรเจนลดต่ำลงไป จากผลที่ให้เฉพาะอีส-โตรเจนเพียงลำพัง

การทดลองที่กล่าวมานี้ ส่วนใหญ่ใช้ปริมาณของสเตียรอยด์ที่สูงกว่าการทดลองของข้าพเจ้ามาก อย่างไรก็ตาม การทดลองของข้าพเจ้าก็สามารถที่จะแสดงให้เห็นผลทำนองเดียวกันนั้นได้ อาจเป็นไปได้ว่าการทดลองของข้าพเจ้าใช้เซลล์ต่อมใต้สมองจากหนูที่มีอายุน้อย ซึ่งได้เคยมีรายงานว่า เซลล์ต่อมใต้สมองของหนูอายุน้อยจะมีความไวมากกว่าหนูกลุ่มอายุมากกว่า (Debeljuk et al., 1972, Dohler and Wuttke, 1975, Eldridge et al., 1974, Ojeda et al., 1977)

และอีกอย่างหนึ่งก็คือ จะเห็นได้ว่าการทดลองนี้ เซลล์ต่อมใต้สมองที่ใช้ในการตรวจสอบหาปัจจัยในซีรัมดังกล่าวสามารถตอบสนองได้ดีกับค่าเทสโทสเตอโรนในการหลั่งไบโอแอคทิวิตี rLH กว่าสเตียรอยด์อื่น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวเพศผู้นี้มีรีเซบเตอร์ที่เหมาะสมต่อเทสโทสเตอโรนที่มากระตุ้นทำให้มีการหลั่งไบโอแอคทิวิตี rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเทสโทสเตอโรน ดังที่ Tang (1979, 1980) ได้เคยเสนอไว้ว่ามีความแตกต่างระหว่างเซลล์ต่อมใต้สมองในเพศผู้และเพศเมียต่อสิ่งที่มากระตุ้น

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเหล่านี้พอที่จะรวบรวมมาสรุปเป็นประเด็นที่บรรลุตามวัตถุประสงค์การศึกษาที่ตั้งไว้ตามหัวข้อดังต่อไปนี้ คือ

1. ชีรัมจากลิงหางยาวทั้ง 3 ระยะ มีผลโดยตรงต่อ rLH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมอง ทั้งคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุล โดยที่คุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองจะเพิ่มขึ้นตามช่วงอายุของชีรัมที่นำมากระตุ้น และเฉพาะชีรัมจากลิงระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์เพศเมีย เท่านั้นที่ให้ผลกระตุ้นอิมมิวโนแอคทีฟ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาวระยะกำลังหย่านม

2. ปัจจัยในชีรัมที่น่าจะมีผลต่อคุณสมบัติทางไบโอแอคทีฟและอิมมิวโนแอคทีฟของ rLH โมเลกุลคือ สเตียรอยด์จากต่อมเพศ ซึ่งได้แก่ เทสโทสเตอโรน โปรเจสเตอโรน และอีสโตรเจน โดยที่การทดลองนี้ได้พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเตียรอยด์ในชีรัมกับคุณสมบัติของ rLH ดังนี้

2.1 คุณสมบัติทางไบโอแอคทิวิตี rLH จะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของเทสโทสเตอโรนในช่วง 8.64×10^{-15} M.-40.34×10^{-15} M. และค่าไบโอแอคทิวิตี rLH นี้ จะแปรตามอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจน โดยถ้าอัตราส่วนของโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่ 19.47-20.23 จะแสดงผลยับยั้งการเพิ่มขึ้นของค่าไบโอแอคทิวิตี rLH แต่อัตราส่วนที่ต่ำกว่านี้คือประมาณ 4.64 จะแสดงผลเพิ่มค่าไบโอแอคทิวิตี rLH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ต่อมใต้สมองลงในอาหารเลี้ยงเซลล์

2.2 คุณสมบัติทางอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นด้วยอัตราส่วนโปรเจสเตอโรนต่ออีสโตรเจนที่ 4.64 โดยที่อัตราส่วนที่มากกว่านี้ไม่แสดงผลต่อค่าอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ความสัมพันธ์เช่นนี้ไม่พบว่ามีกับสเตียรอยด์ตัวอื่นหรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์อื่นไม่มีความสัมพันธ์ต่อการกระตุ้นดังกล่าว

3. สเตียรอยด์ในชีรัมลิงหางยาวระยะย่างเข้าวัยเจริญพันธุ์มากกว่า 90 % อยู่ในรูปที่รวมตัวอยู่กับพลาสมาโปรตีนและยังรับผิดชอบต่อการรักษาค่าไบโอแอคทิวิตีของ rLH

4. GnRH ที่ 7.5×10^{-12} M. เพียงลำพังสามารถไปเพิ่มการหลั่งอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมอง และ

4.1 ระดับเทสโทสเตอโรนเพียงลำพังที่มากกว่า 8.64×10^{-15} M. สามารถไปเพิ่มความไวของเซลล์ต่อมใต้สมองต่อ GnRH ในการกระตุ้นไบโอแอคทิวิตี

4.2 ปริมาณของอีสโตรเจนที่มากกว่า 1.08×10^{-15} M. สามารถไปเพิ่มความไวของเซลล์ต่อมใต้สมองในการหลั่งอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH ตอบสนองต่อ GnRH แต่ผลนี้ถูกต้านได้ด้วยเทสโทสเตอโรนและโปรเจสเตอโรนที่มากกว่า 40.34×10^{-15} M. และ 61.94×10^{-15} M. ตามลำดับ

5. การให้ GnRH แบบต่อเนื่องกัน ทำให้เซลล์ต่อมใต้สมองลดความไวต่อ GnRH โดยมีทั้งไบโอและอิมมิวโนแอคทิวิตี rLH หลั่งออกมาลดลง ซึ่งผลนี้จะเห็นได้เด่นชัดในวันที่ 3 ของการทดลอง

จากการศึกษานี้ทำให้ทราบถึงชนิดของสเตียรอยด์จากต่อมเพศหรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์ในซีรัม ซึ่งได้แก่ เทสโทสเตอโรน อีสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน ทั้งสามมีบทบาทในการการควบคุมค่าไบโอและอิมมิวโนแอคทิวิตีของ LH โมเลกุลที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองทั้งทางตรงและทางอ้อมที่ผ่าน GnRH และพบว่า สเตียรอยด์ส่วนที่รวมอยู่กับพลาสมาโปรตีนยังรับผิดชอบต่อการรักษาค่าไบโอแอคทิวิตีของ LH ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ต่อมใต้สมองโดยตรง ซึ่งเป็นผลให้ค่า BA:RIA สูงอยู่ได้ตลอด 3 วันของการเพาะเลี้ยง เนื่องจากอัตราส่วน BA : RIA ของ LH ถูกกำหนดตามค่าของสเตียรอยด์ และ/หรืออัตราส่วนของสเตียรอยด์ในระยะต่าง ๆ ของการเจริญดังกล่าว ค่าอัตราส่วน BA:RIA ของ LH นี้อาจเป็นเครื่องแสดงถึงสภาพทางสรีรวิทยาที่สำคัญ หรืออาจเป็นเครื่องบ่งบอกที่มีความหมายที่ดีเมื่อมีเหตุการเปลี่ยนแปลงทางสรีรสภาพใด ๆ ที่เฉพาะเจาะจงได้