



ผลการวิจัย

1. ประเภท จำนวน และสภาพทางพยาธิของ เนื้อเยื่อเต้านมที่ทำการศึกษาวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ใช้เนื้อเยื่อเต้านม 4 ประเภท คือ เนื้อเยื่อเต้านมปกติ 5 ตัวอย่าง เนื้อเยื่ออกเต้านมชนิด benign 15 ตัวอย่าง เนื้อเยื่ออกเต้านมชนิด Gynecomastia 5 ตัวอย่าง และเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม 85 ตัวอย่าง ทั้งหมดมีสภาพพยาธิทั้งแสดงไว้ในตารางที่ 3

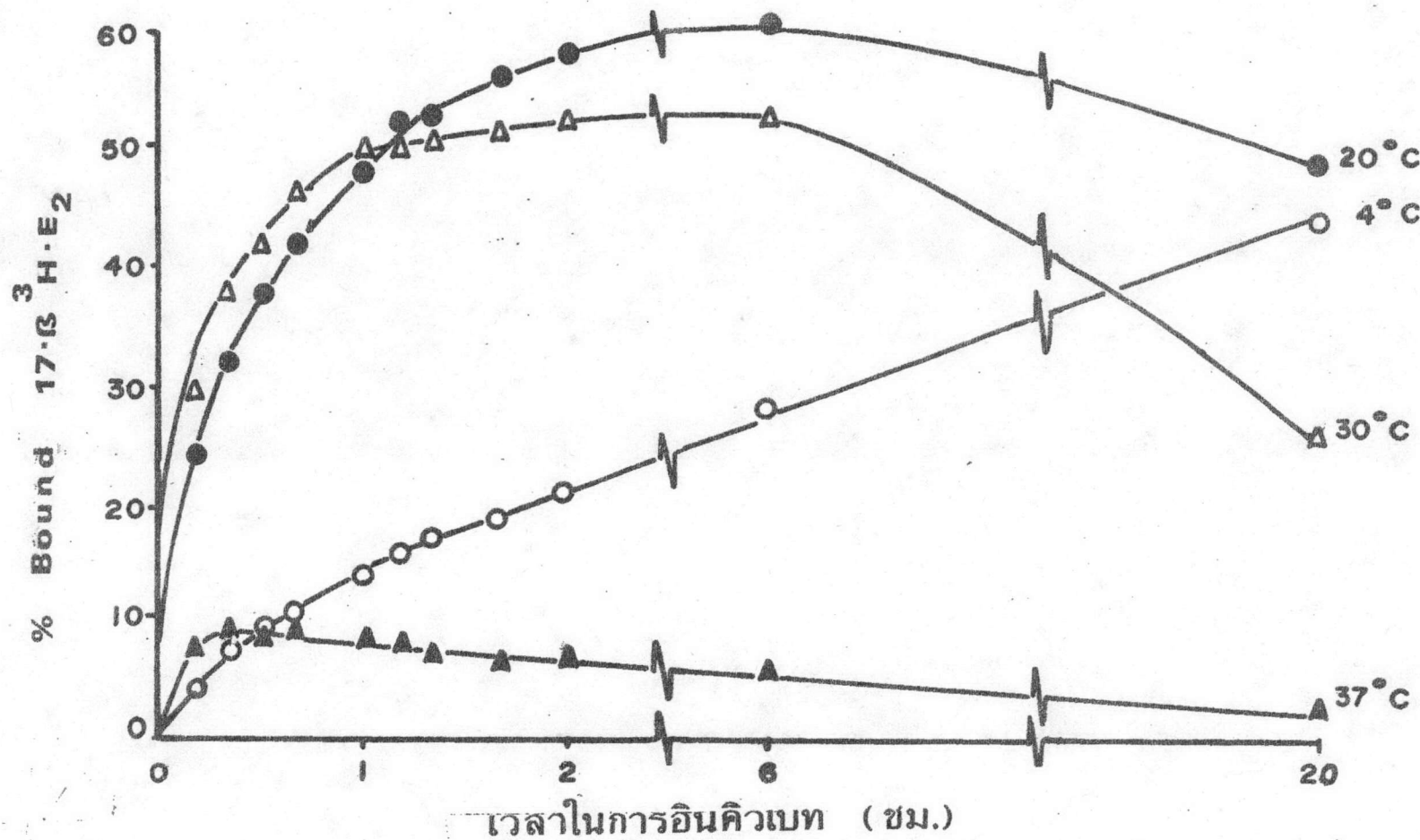
2. ปฏิกิริยาการจับตัวของรีเซพเตอร์โปรตีนกับ  $17 - \beta^3H - E_2$  ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ

หลังจากอินคิวเบตไฮโคซอดกับสารมาตรฐาน  $17 - \beta^3H - E_2$  (40 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส, 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ในช่วงเวลาตั้งแต่ 0 ถึง 20 ชั่วโมง ตามวิธีการทดลองหัวข้อที่ 3.2 หน้า 25 หลังการเติมผงถ่านและปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสมาหาปริมาณกับมันตรังสี เขียนกราฟระหว่าง % การจับตัวกับเวลาที่ใช้ในการอินคิวเบตที่อุณหภูมิต่าง ๆ (รูปที่ 3) ผลการทดลองแสดงว่าเมื่ออินคิวเบตไฮโคซอดกับสารมาตรฐาน  $17 - \beta^3H - E_2$  ที่ 4 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง ปฏิกิริยาก็ยังไม่ถึงสมดุลซึ่งติดกับการอินคิวเบตที่ 20 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเพียง  $1\frac{1}{2}$  ถึง 2 ชั่วโมงปฏิกิริยาก็ถึงสมดุลแล้ว ส่วนที่ 30 องศาเซลเซียส นั้นใช้เวลาเพียง  $\frac{1}{2} - 1$  ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนการอินคิวเบตที่ 37 องศาเซลเซียสนั้น ปฏิกิริยาสลายตัวเร็วมาก ปัญหาจึงมีว่าควรทำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง หรือ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง

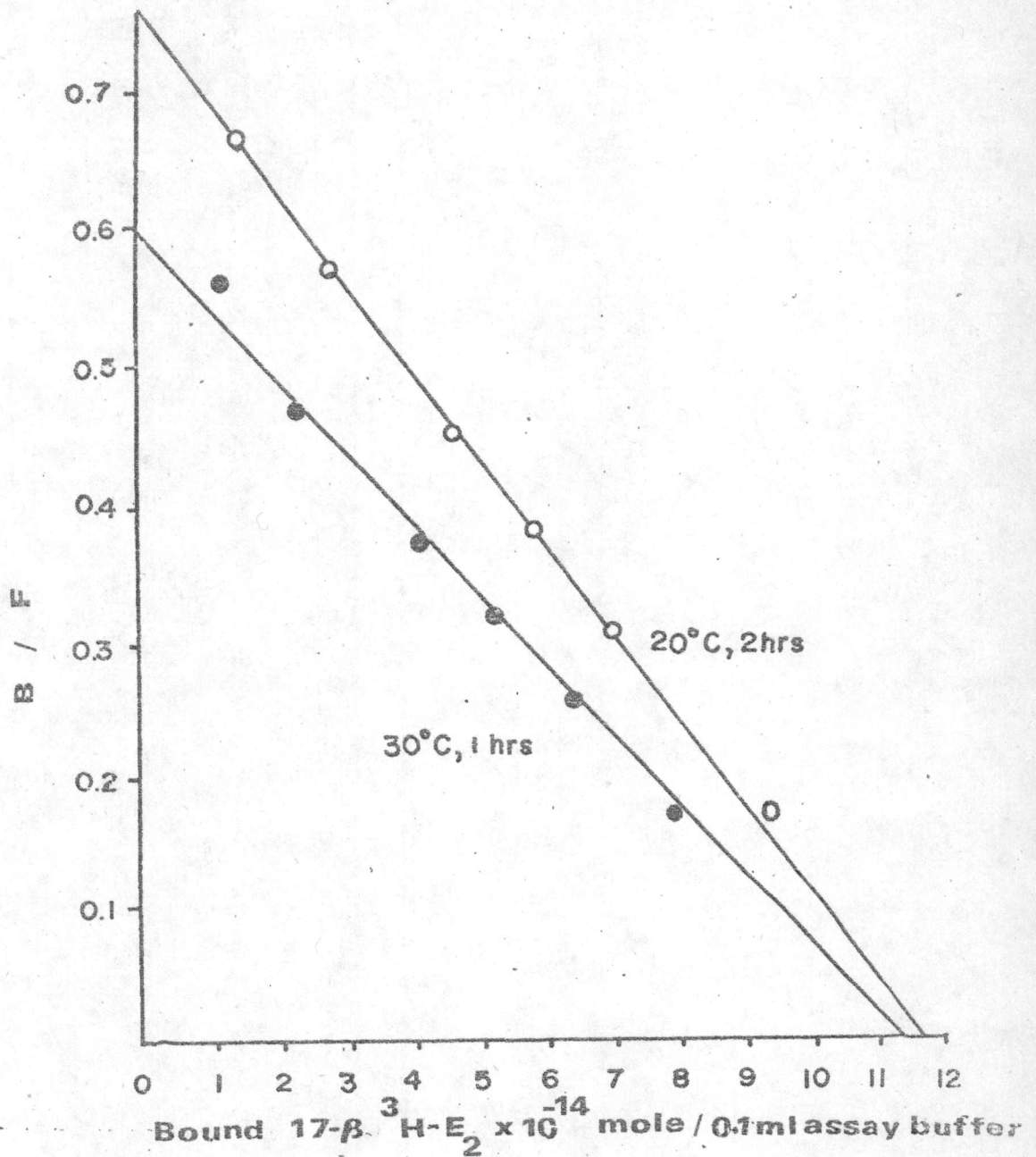
เมื่อทดลองอินคิวเบตไฮโคซอดกับสารมาตรฐาน  $17 - \beta^3H - E_2$  ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 1 หัวข้อ 3.8.1 หน้า 28 โดยอินคิวเบตที่ 20 องศาเซลเซียส 2 ชั่วโมง หรือ 30 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง เติมผงถ่านปั่นแยกเอาชั้นน้ำใสวัดปริมาณกับมันตรังสี เขียนกราฟ Scatchard และคำนวณหาปริมาณอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (หัวข้อ 3.9 หน้า 29 ผลการทดลอง (รูปที่ 4) จะเห็นว่า  $B_0$  ซึ่งเป็นปริมาณ total binding sites ของรีเซพเตอร์โปรตีน เมื่ออินคิวเบตที่ 20 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3 สภาพทางพยาธิของเนื้อเยื่อเต้านมประเภทต่าง ๆ

ประเภทของเนื้อเยื่อ เต้านม	จำนวน ทั้งสิ้น	สภาพทางพยาธิ	จำนวน	จำนวน lymphnode metastas		
				+	-	ไม่มีรายงาน
เนื้อเยื่อเต้านมปกติ	5	-	5	0	0	5
เนื้อเยื่อเต้านม gynaecomastia	5	-	5	0	0	5
เนื้องอกเต้านม ประเภทธรรมดา	15	Fibroadenoma	11	0	0	11
		Giant fibroadenoma	1	0	0	1
		Fibrocystic disease	1	0	0	1
		Cystosarcoma phyllodes	2	0	0	2
เนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม	85	Infiltrating ductal carcinoma (IDC)	81	60	20	1
		Lobular carcinoma (LC)	2	1	1	0
		Mucin-ous carcinoma (MC)	1	0	1	0
		Anaplastic squamous Cell carcinoma (SC)	1	0	0	1



รูปที่ 3 แสดงการจับตัวของรีเซพเตอร์โปรตีนและ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ โดยอินคิวเบตไซโตซอลจากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมและ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ที่เวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ คือ 4 °C (○-○), 20 °C (●-●), 30 °C (△-△) และ 37 °C (▲-▲) ในช่วงเวลาดังแต่ 0 ถึง 20 ชม. เปอร์เซ็นต์ของ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน วัดโดยวิธีวัดด้วยแสงฉาน ความวิธิตัวเป็นการวิจัยหัวข้อที่ 3.2



รูปที่ 4 แสดง Scatchard plot ในการหาปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนเป็น เพลโตโมล/มก. ไฮโคซอลโปรตีน ( $P_0$ ) และค่า Dissociation constant ( $K_d$ ) ของไฮโคซอลในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมจากตัวอย่างเดียวกัน เมื่ออินคิวเบต ที่  $30^\circ$  x 1 ชม. (●-●) แสดงค่า  $K_d$   $1.9 \times 10^{-10}$  โมลา,  $P_0$  54.5 เพลโตโมล/มก. ไฮโคซอลโปรตีน และที่  $20^\circ$  x 2 ชม. (o-o) แสดงค่า  $K_d$   $1.6 \times 10^{-10}$  โมลา,  $P_0$  55.9 เพลโตโมล/มก. ไฮโคซอลโปรตีน

2 ชั่วโมง มีค่ามากกว่า  $P_0$  เมื่ออินคิวเบตที่ 30 องศา 1 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย  
 แต่ค่า  $K_d$  ของการอินคิวเบตที่ 30 องศา เซลเซียส 1 ชั่วโมง มีค่ามากกว่าที่  
 20 องศา เซลเซียส 2 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในรูปที่ 3 ก็คือการแตกตัว  
 ที่ 20 องศา เซลเซียส จะต่ำกว่าที่ 30 องศา เซลเซียส

ดังนั้นจากผลการทดลองความรูปที่ 3 และ 4 ในการวิจัยครั้งนี้จึงเลือก  
 อินคิวเบตไฮโทซอลกับสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ที่ 20 องศา เซลเซียส เป็น  
 เวลา 2 ชั่วโมง

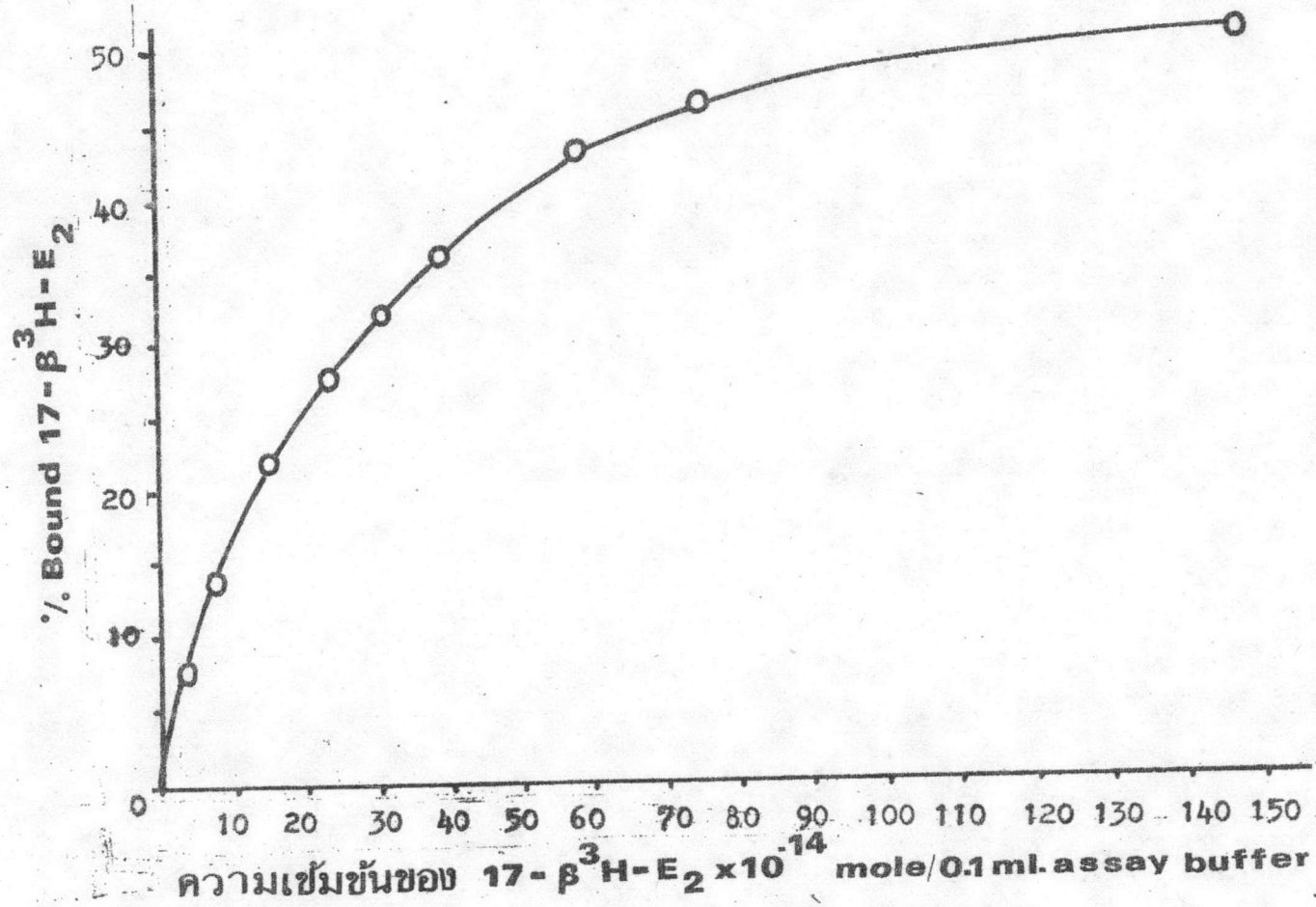
3. ผลการหาความเข้มข้นของสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ที่ใช้ในการวัด  
ปริมาณเอสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

เมื่ออินคิวเบต 0.1 มล. ไฮโทซอลกับสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$   
 ( $3.68 - 147.2 \times 10^{-14}$  โมล/0.1 มล. assay buffer) ตามการทดลอง  
 หัวข้อที่ 3.3 หน้า 26 หลัง เติมผงถ่านแล้วปั่นแยกชั้นนำไปสว่าวัดหาปริมาณกับมันตรังสี  
 เขียนกราฟระหว่างปริมาณของสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ที่ถูกจับไว้กับปริมาณ  
 ของสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ที่ใช้ (รูปที่ 5)

การทดลองพบว่าเมื่อใช้ปริมาณสารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ตั้งแต่  
 $3.68 - 58.8 \times 10^{-14}$  โมล/0.1 มล. assay buffer ปริมาณของ  
 bound  $17-\beta^3H - E_2$  จะเพิ่มขึ้น แต่เมื่อใส่สารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$   
 เกิน  $73.6 \times 10^{-14}$  โมล/0.1 มล. assay buffer แล้ว ปริมาณ  
 bound  $17-\beta^3H - E_2$  จะคงที่ แสดงว่า binding sites ถูกใช้หมดโดย  
 สมบูรณ์ตามผลการทดลองจึงเลือกใช้สารมาตรฐาน  $17-\beta^3H - E_2$  ความเข้ม  
 ข้นตั้งแต่  $3.68 - 147.2 \times 10^{-14}$  โมล/0.1 มล. assay buffer

4. ผลการหาปริมาณผงถ่านที่เหมาะสมในการแยกพวก free form (F) ออก  
จาก bound form (B)

เติมผงถ่านซึ่งมีปริมาณ 0.01 กรัม%, 0.05 กรัม%, 0.1 กรัม%, 0.2 กรัม%



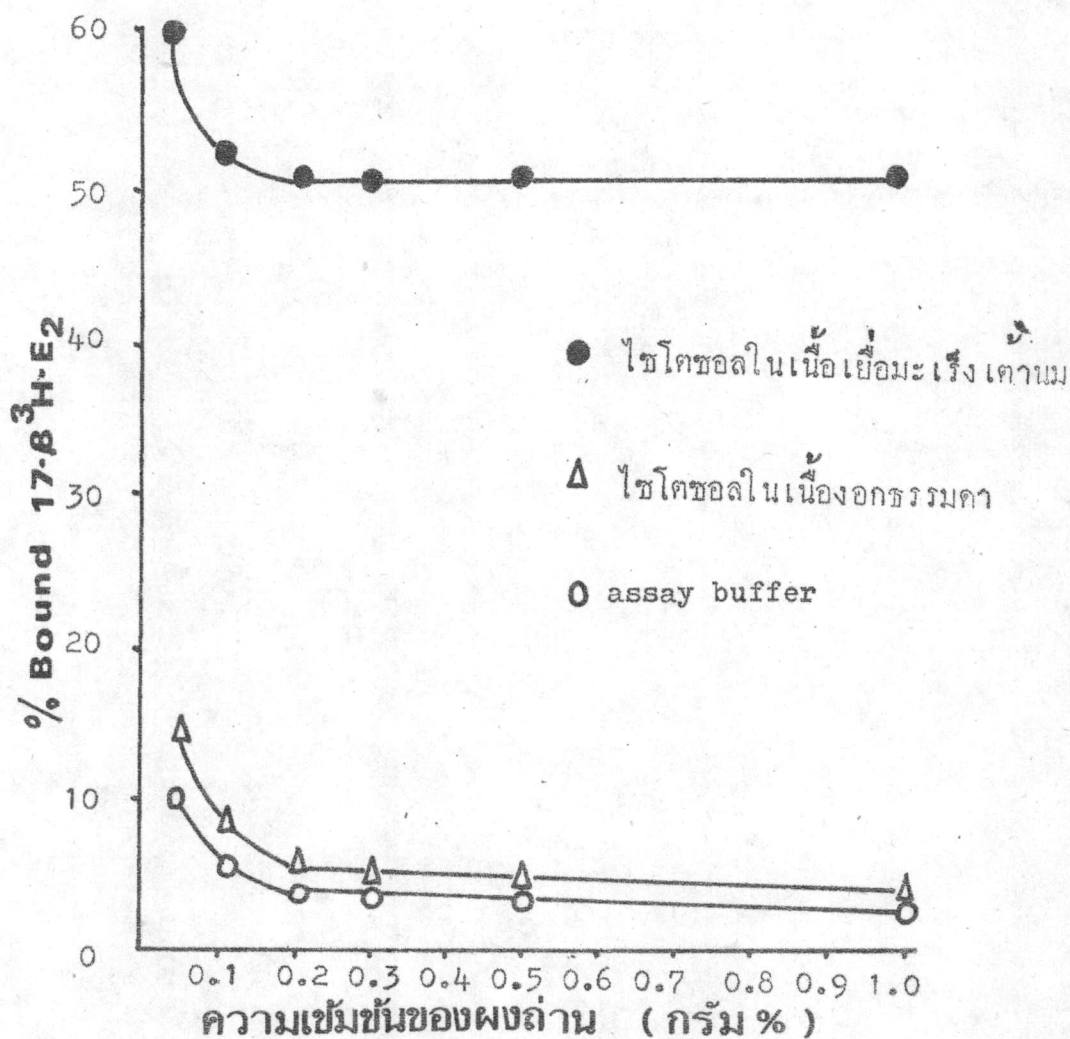
รูปที่ 5 แสดงกราฟ saturation ของการจับตัวระหว่างรีเซพเตอร์โปรตีนและสารมาตรฐาน  $17-\beta^3\text{H-E}_2$  โดยอินคิว เบทโซโตซอลของ เนื้อเยื่อมะเร็ง เต้านมกับสารมาตรฐาน  $17-\beta^3\text{H-E}_2$  ซึ่งมีความเข้มข้น ตั้งแต่  $3.68 \times 10^{-10}$  ถึง  $147.2 \times 10^{-10}$  โมล / 0.1 มล. assay buffer ที่ 20 °C เป็นเวลา 2 ชม. วัดปริมาณ  $17-\beta^3\text{H-E}_2$  ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีนด้วยวิธีคูลัมบ์ด้วยผงถ่าน ตามวิธีดำเนินการวิจัยหัวข้อที่ 3.3

0.3 กรัม%, 0.5 กรัม% และ 1.0 กรัม% ลงใน incubation mixture ซึ่งประกอบด้วยไฮโดรซอลของเนื้อเยื่อมะเร็งหรือไฮโดรซอลของเนื้อเยื่อเต้านมผสมรวมทั้ง assay buffer กับสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  400 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer ปั่นแยกเอาชิ้นนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดรังสี เขียนกราฟระหว่าง % bound  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  กับความเข้มข้นของผงदान (รูปที่ 6) พบว่าการอินคิวเทตสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  ผงदान 0.05 กรัม% สามารถถูก  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  ได้ 90% หรือมี nonspecific binding เป็นประมาณ 10% ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของผงदानขึ้นอีกพบว่า nonspecific binding จะลดลงจนถึงประมาณ 4% เมื่อใช้ผงदान 0.2 กรัม% ต่อจากนั้น nonspecific binding จะลดลงน้อยมาก ถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของผงदानขึ้นอีกจนถึง 1 กรัม% สำหรับการวัด specific binding นั้น พบว่า % bound จะลดลง ถ้าความเข้มข้นของผงदानเพิ่มขึ้น แต่จะไม่ลดลงอีกถึงแม้จะเพิ่มความเข้มข้นของผงदानขึ้นอีก

ในการเลือกความเข้มข้นของผงदानที่เหมาะสมคือเอาจุดที่มี % bound สูง blank ค่า (Binoux และ Odell, 1973) ตามรูปที่ 6 จุดที่มีความเข้มข้นของผงदानต่ำสุดคือ 0.2 กรัม% การวิจัยต่อจากนี้เลือกใช้ปริมาณผงदानที่มีความเข้มข้น 0.25 กรัม% 0.5 มล.

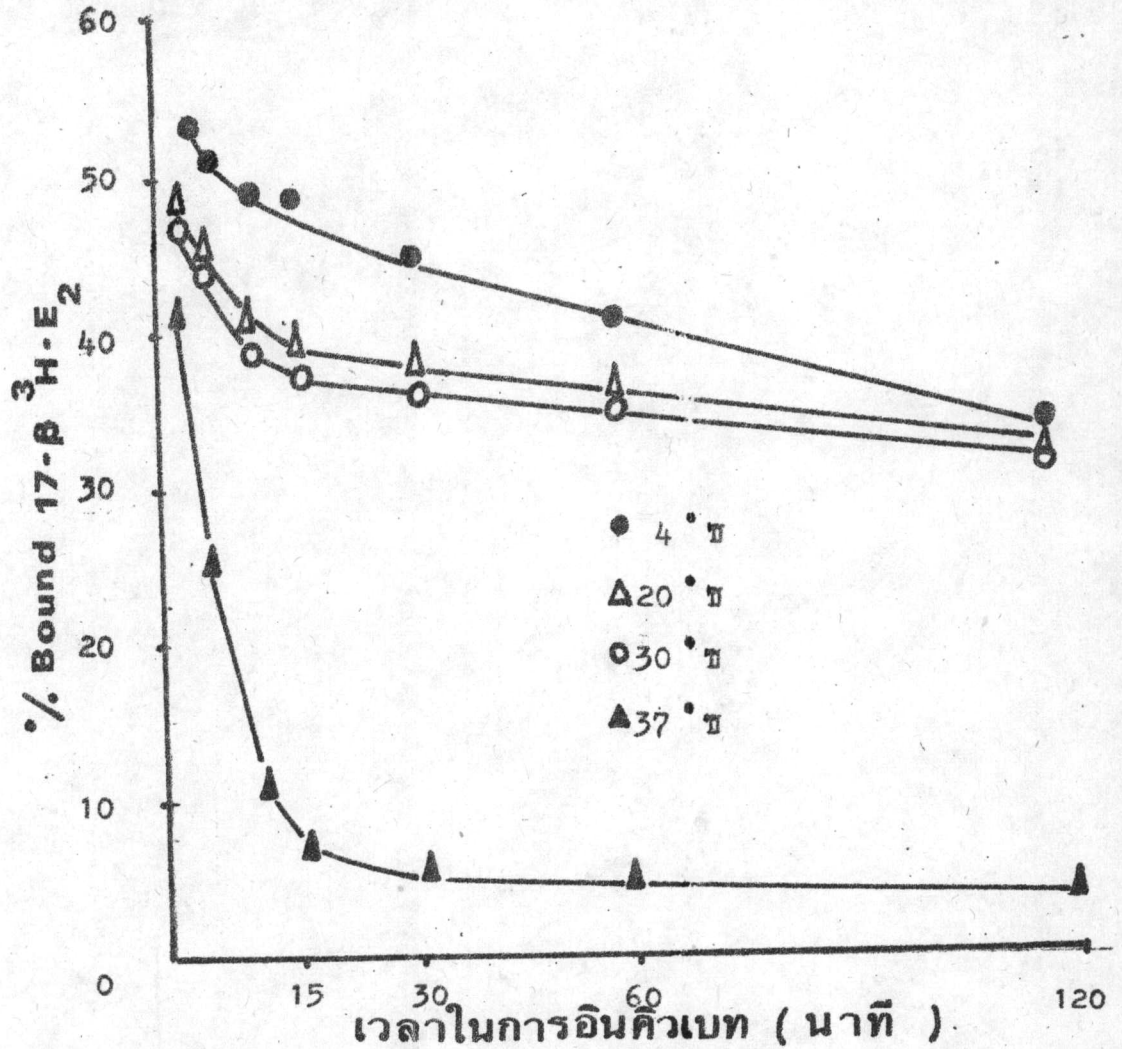
##### 5. เวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการจับพวก low affinity binding complex และ free $17-\beta$ $^3\text{H}-\text{E}_2$ โดยผงदान

เติม 0.5 มล. ผงदानความเข้มข้น 0.25 กรัม% ลงใน incubation mixture ระหว่างไฮโดรซอลจากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมกับสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  (40 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer) ตามหัวข้อ 3.5 หน้า 27 แล้วอินคิวเทตเป็นช่วงเวลา 0, 2, 5, 10, 15, 30, 60 และ 120 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส, 20 องศาเซลเซียส, 30 องศาเซลเซียส และ 37 องศาเซลเซียส ปั่นแยกเอาชิ้นนำไปวัดปริมาณด้วยเครื่องวัดรังสี เขียนกราฟระหว่าง % bound  $17-\beta$   $^3\text{H}-\text{E}_2$  กับเวลาที่ใช้ในการอินคิวเทตด้วยผงदान (รูปที่ 7)



รูปที่ 6 แสดงปริมาณของพลาสมา (0.5 มล., 0.05 - 1.0 กรัม %) ที่ใช้ในการกักจับ free 17- $\beta$   $^3\text{H-E}_2$  โดยการอินคิวเบตไซโตซอลจากเนื้อเยื่อเมะเร็งเต้านม (●—●) จากเนื้อเยื่อออกกรรมตา ( $\Delta$ — $\Delta$ ) และจาก assay buffer (○—○) กับสารมาตรฐาน 17- $\beta$   $^3\text{H-E}_2$  400 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer ที่ 20 °C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วกักจับ free 17- $\beta$   $^3\text{H-E}_2$  ด้วยพลาสมาที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 0.05 - 1.0 กรัม %





รูปที่ 7 แสดงอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการกุดจับของผนัง เมื่อกำหนดความเข้มข้น 0.25 กรัม % ลงใน incubation mixture ระหว่างไซโตซอลจากเนื้อเยื่อมะพร้าว และ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> แล้วอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 4 °C (●—●), 20 °C (Δ—Δ), 30 °C (○—○) และ 37 °C (▲—▲) เป็นเวลา 0, 2, 5, 10, 15, 30, 60, และ 120 นาที ตามลำดับ บันแยกเอาชิ้นน้ำใส่วัดปริมาณ bound 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub>

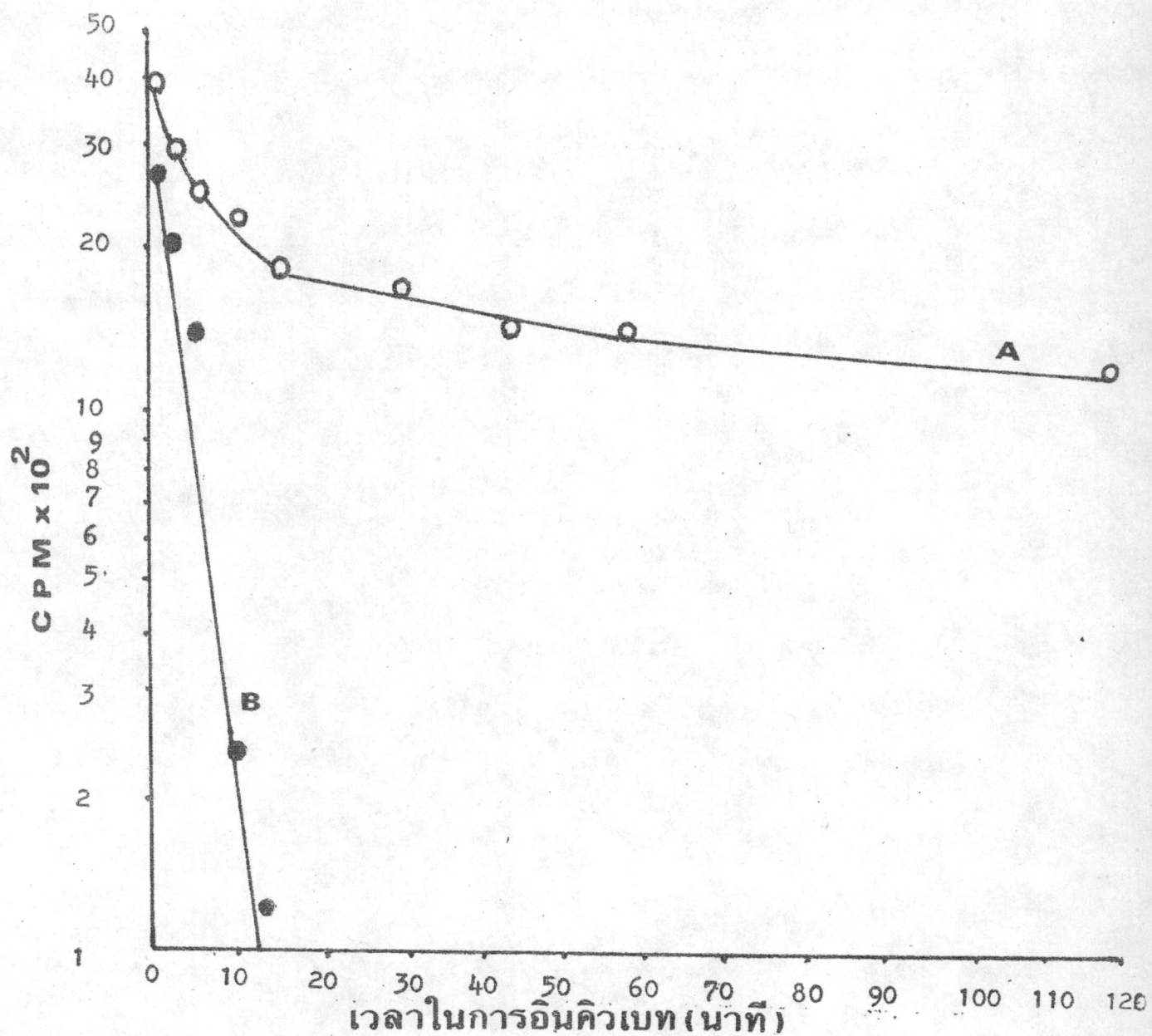
จากกราฟการทดลองในรูปที่ 7 พบว่าการดูดซับของผนังเพิ่มขึ้นตามอุณหภูมิในช่วงเวลาต่าง ๆ นั่นคือเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเปอร์เซ็นต์การจับตัวลดลง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กลางใจเวลาดึง 60 นาที เปอร์เซ็นต์การจับตัวลดลงเท่ากับการอินคิวเบตที่ 20 องศาเซลเซียส และ 30 องศาเซลเซียส เพียง 10 - 15 นาที ส่วนที่ 37 องศาเซลเซียส การดูดซับของผนังจะเพิ่มขึ้นเร็วมากเพียง 10 นาทีของการอินคิวเบตก็สามารถทำให้การจับตัวของรีเซพเตอร์และ  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  ลดลงเหลือน้อยกว่า 10%

เมื่อเขียนกราฟ semilog ระหว่าง bound  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  กับเวลาที่อินคิวเบตด้วยผนังที่ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 8) เสนอกราฟ A แสดง high affinity binding ของไซโตซอลในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อินคิวเบตด้วยผนัง เสนอกราฟ B แสดง low affinity binding ของไซโตซอลในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่อินคิวเบตด้วยผนัง ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการหักลบระหว่าง total  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  กับ bound  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  จากกราฟแสดงว่าพวกผนัง 0.25 กรัม% สามารถดูดซับ low affinity binding complex ซึ่งเกิดแตกตัวโดยสมบูรณ์ได้หมดในช่วงเวลา 10 - 15 นาที และการดูดซับพวก high affinity binding complex ที่ช่วงเวลาดังกล่าวต่ำมาก

ตามการทดลองดังกล่าว สรุปได้ว่าอินคิวเบตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส กับผนังเวลา 15 นาที หลังจากภาวะสมดุลเพียงพอที่จะจับพวก low affinity binding complex และ free  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  ออกได้หมด

#### 6. ผลของความร้อนที่มีต่อสมบัติของอีโคโนไมนรีเซพเตอร์โปรตีน

อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 5, 15 และ 30 นาที ตามลำดับ ก่อนอินคิวเบตกับสารรังสี ทำเทียบกับไซโตซอลที่ไม่ได้อุณหภูมิ การทดลองหัวข้อที่ 3.6 หน้า 27 หลังจากนั้นแยกเอาชิ้นน้ำใสไปวัดหาปริมาณกัมมันตรังสี เขียนกราฟระหว่าง bound  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  (10 - 400 พิโกกรัม/0.1 มล. assay buffer)



รูปที่ 8 แสดงความสามารถของเอนไซม์ 0.25 กรัม % ในการจับพวก **low affinity binding complex** ที่อุณหภูมิ 30 °C ในช่วงเวลา 0, 2, 5, 10, 15, 30, 45, 60 และ 120 นาที ตามลำดับ (A) เส้นกราฟแสดงการแตกตัวของ **high affinity binding complex** (B) เส้นกราฟแสดงการแตกตัวของ **low affinity binding complex**

จากรูปที่ 9 แสดงว่าถ้าอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 และ 30 นาที (แผนภาพ D,E) จะไม่มีการจับของอีโคโนโรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนกับ  $^{125}\text{I}$ - $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$  แต่การอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 และ 5 นาที (แผนภาพ B,C) ยังพบว่ามีจับตัว แต่ปริมาณการจับตัวน้อยกว่าไฮโดรซอลที่ไม่โดน (แผนภาพ A)

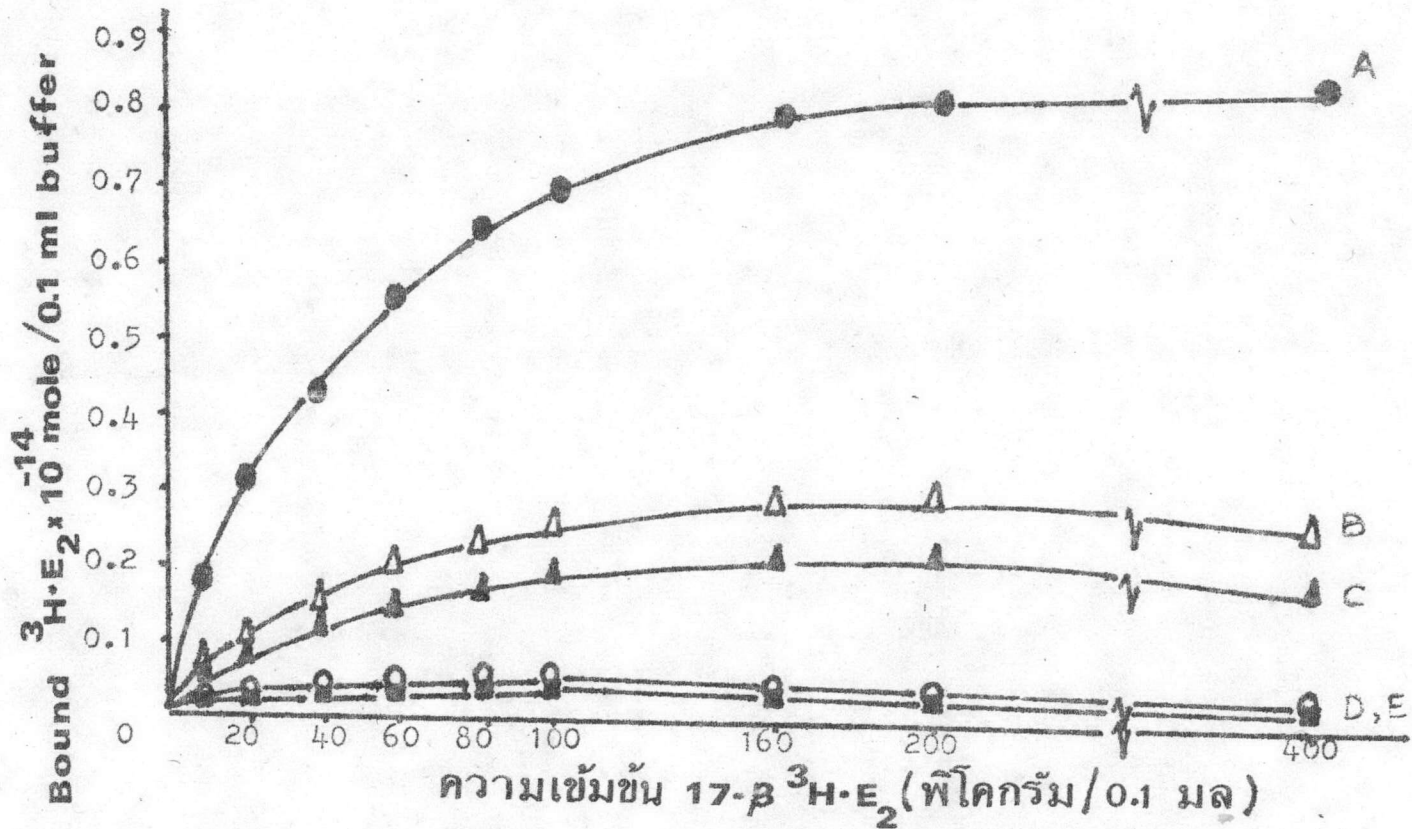
จากการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าอีโคโนโรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนนี้สลายตัวโดยความร้อนที่เกิดจากการจับตัวกับสารมาตรฐาน  $^{125}\text{I}$ - $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$  ซึ่งจะลดลงเมื่อเวลาของการอุ่นเพิ่มขึ้น และถ้าเกิน 15 นาทีแล้วความร้อนที่ 45 องศาเซลเซียสทำลายสมบัติของอีโคโนโรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนโดยสิ้นเชิง

## 7. ผลการเก็บไฮโดรซอลและการสูญเสียปฏิกิริยาการจับตัว

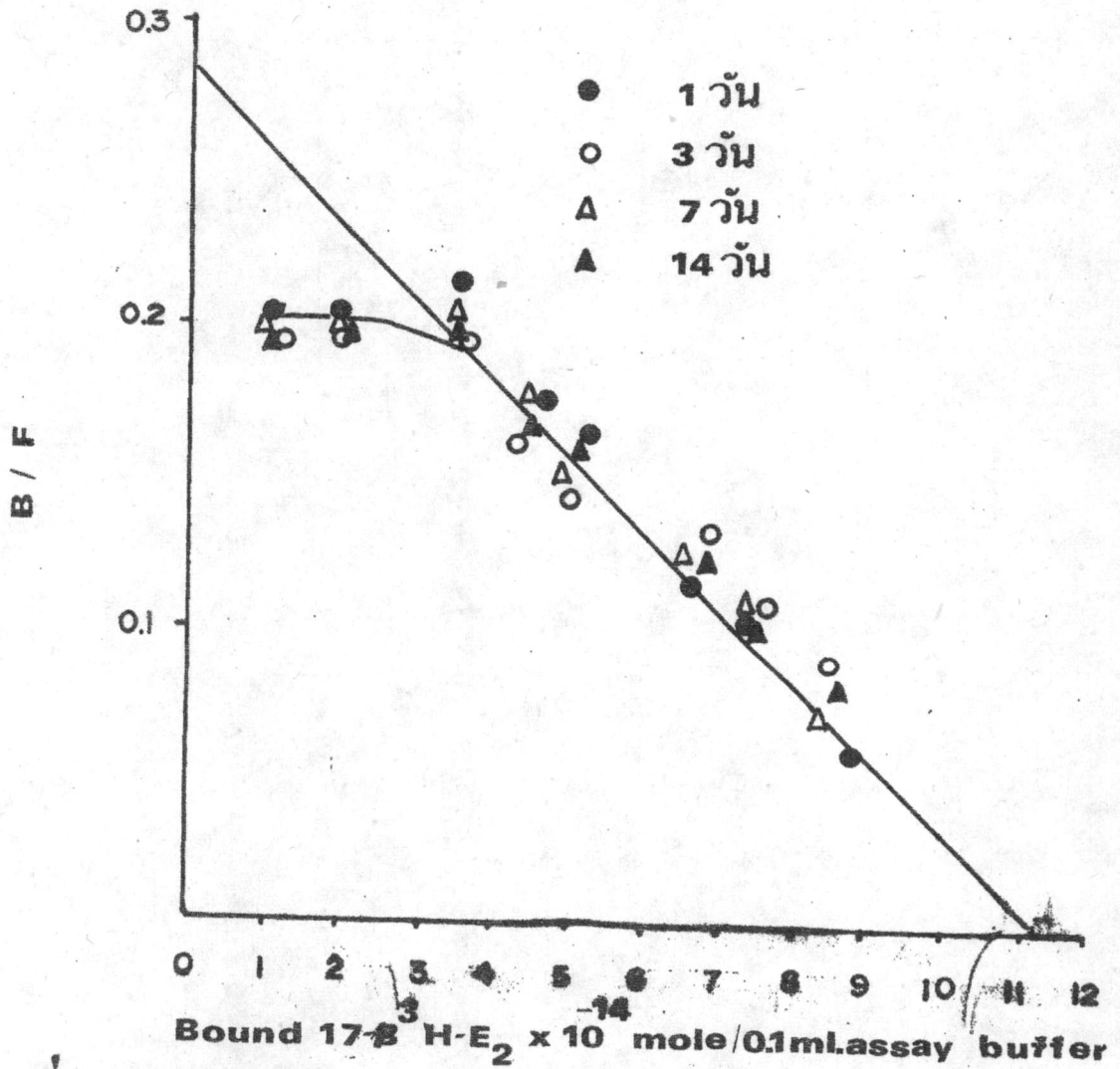
7.1 ผลการเก็บไฮโดรซอลที่ -20 องศาเซลเซียส เมื่อเก็บไฮโดรซอลที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน ก่อนการหาปริมาณอีโคโนโรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน ตามการทดลองหัวข้อที่ 3.7.1 หน้า 27 หลังจากนั้นแยกเอาชิ้นน้ำใส่ไปวัดปริมาณกัมมันตรังสี เขียน Scatchard plot (หัวข้อ 3.8 หน้า 28) ระหว่าง B/F กับ B

จากรูปที่ 10 พบว่าค่า  $P_0$  หรือปริมาณ total binding sites ที่เก็บที่ -20 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน มีค่าใกล้เคียงกัน ค่า  $K_d$  เท่ากัน แสดงว่าการเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสไม่ทำให้สมบัติการจับกับฮอโรโมนของไฮโดรซอลเปลี่ยนไปจนสังเกตเห็นได้ อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้พยายามวัดปริมาณของรีเซพเตอร์ในวันเก็บที่ใกล้เคียงกัน นอกเหนือจากนี้ที่เก็บชิ้นเนื้อในคอนเป็น และไม่มีเวลาพอที่จะทำการทดลองให้เสร็จในวันนั้นจึงจะเก็บไฮโดรซอลที่ -20 องศาเซลเซียสเพื่อทำการทดลองในวันต่อไป

7.2 ผลการแช่แข็งและทำให้ละลาย จากรูปที่ 11 จะเห็นว่าเมื่อนำไฮโดรซอลที่แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) และทำให้ละลายเป็นจำนวน 1, 2, 3 และ 4 ครั้ง ก่อนนำมาอินคิวเบตกับสารมาตรฐาน  $^{125}\text{I}$ - $^3\text{H}$ - $\text{E}_2$  (หัวข้อ 3.7.2 หน้า 28)

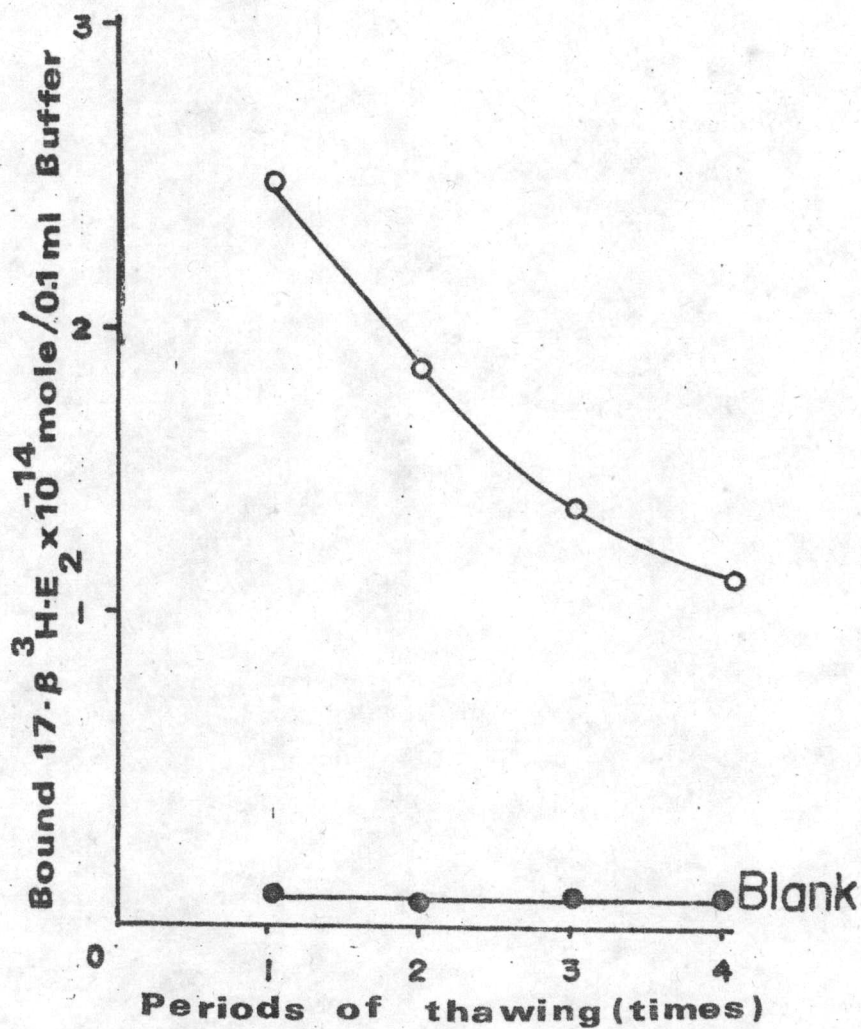


รูปที่ 9 แสดงอิทธิพลของความร้อนที่มีต่อ activity ของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน เมื่ออุณหภูมิตั้งไว้ที่ 45 °ซ เป็นเวลา 0 นาที (●-●), 1 นาที (Δ-Δ), 5 นาที (▲-▲), 15 นาที (○-○) และ 30 นาที (■-■) ก่อนอินคิวเทอกับสารมาตรฐาน 17-β-³H-E₂ และหาปริมาณกับมันตรังสีที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีนตามหัวข้อการดำเนินการวิจัยที่ 3.6



รูปที่ 10

แสดง activity ของรีเซพเตอร์โปรตีนในไซโทซอลจากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม เมื่อเก็บไซโทซอลที่ - 20 °C เป็นเวลา 1 วัน (●-●), 3 วัน (○-○), 7 วัน (△-△), และ 14 วัน (▲-▲) ก่อนนำไปอินคิวเบตกับสารมาตรฐาน 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ตามปริมาณ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน ตามหัวข้อการดำเนินการวิจัยที่ 3.7.1



รูปที่ 11 แสดงอัตราการสูญเสีย activity ของรีเซพเตอร์โปรตีน  
ในไซโตซอลจากเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม เมื่อแช่แข็งและทำให้  
ละลาย (freeze และ thaw ) หลาย ๆ ครั้ง



การจับตัวระหว่างไซโทซอดรีเซพเตอร์กับ  $17-\beta^3 \text{H} - \text{E}_2$  จะลดลงตามจำนวนครั้งที่แช่และทำให้ละลาย

จากผลการทดลองในข้อ 7 นี้ สรุปได้ว่าการเก็บไซโทซอดเป็นเวลา 14 วัน ที่  $-20$  องศาเซลเซียสไม่ทำให้คุณสมบัติการจับตัวของรีเซพเตอร์โปรตีนและ  $17-\beta^3 \text{H} - \text{E}_2$  เปลี่ยนไปจนสังเกตเห็น แต่ถ้านำไซโทซอดมาทำให้ละลายแล้วกลับทำให้เย็นอีกครั้งเดียว ทำให้ประสิทธิภาพของการจับตัวลดลงจากเดิมถึง 50%

#### 8. ปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนภายในก้อนเนื้อมะเร็งก้อนเดียวกัน

จากการวัดหาปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนตามส่วนต่าง ๆ ของก้อนเนื้อมะเร็งก้อนเดียวกัน (หัวข้อ 6 หน้า 35) และคำนวณหาปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน และค่า  $K_d$  ตามหัวข้อ 3.8 หน้า 28 ได้ผลตามตารางที่ 4 พบว่า ค่า  $K_d$  ในแต่ละส่วนของตัวอย่างที่ทดลองนั้นมีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันและการจับตัวค่อนข้างแน่น คือมีค่า  $K_d < 10^{-9}$  โมล ส่วนปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในแต่ละส่วนของตัวอย่างที่ทดลองนั้น พบว่าบางตัวอย่างก็มีค่าใกล้เคียงกัน เช่น CA 51, CA 92 แต่บางตัวอย่าง CA 100, CA 95 CA 36 ก็มีปริมาณแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด

#### 9. ความแม่นยำของการวัดปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

เมื่อนำไซโทซอดซึ่งเก็บ  $-20$  องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 3, 7 และ 14 วัน (หัวข้อ 3.7.1 หน้า 27) มาหาปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน ปรากฏว่าปริมาณดีสโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนมีค่าใกล้เคียงกัน คือมีค่า 27.5, 26.9, 28.0 และ 28.4 เฟมโตโมล/มก. ไซโทซอดโปรตีน คิดเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm \text{SD} = 27.65 \pm 0.75$  เฟมโตโมล/มก. ไซโทซอดโปรตีน ค่า C.V. (coefficient of variation) 2.7% ต่ำกว่า 20% ซึ่งอยู่ในขอบเขตที่ยอมรับได้ว่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าวิธีการนี้มีความแม่นยำเชื่อถือได้ (Abraham, 1971)



ตารางที่ 4 ปริมาณดีดีโทรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนภายในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมก่อนตัดชิ้น

ตัวอย่าง	ส่วนที่	ปริมาณรีเซพเตอร์ เฟมโตโมด/มก. ไฮโดรซอลโปรตีน	Kd x 10 <sup>-10</sup> M
CA 100	1	23.8	2.17
	2	42.1	5.60
	3	35.4	7.40
CA 51	1	29.2	0.61
	2	27.7	0.50
	3	28.4	0.53
CA 95	1	52.1	3.64
	2	110.5	4.21
	3	98.2	4.50
CA 36	1	120.5	3.64
	2	89.1	9.12
	3	70.0	0.68
CA 92	1	94.1	4.00
	2	95.6	3.80
	3	98.9	3.60

ตารางที่ 5

แสดงความแม่นยำในการวัดปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์

ตัวอย่าง	วันที่ทำการทดลอง	ปริมาณรีเซพเตอร์ เฟมโตโมล / มก.ไซโทซอลโปรตีน
CA 51	1	27.5
	3	26.9
	7	28.0
	14	28.4
ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD		27.65 $\pm$ 0.75
Coefficient of Variation		2.7 %

10. ปริมาณของอีส์โตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนและค่า dissociation constant  
( $K_d$ ) ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติ benign และ gynaecomastia

จากการวัดปริมาณรีเซพเตอร์โปรตีนและ DNA (หน้า 28 และ 34) แล้วคำนวณปริมาณรีเซพเตอร์ต่อมิลลิกรัม - ไฮโดรซอดโปรตีนเปรียบเทียบกับจำนวนไบน-ดิงไซต์ต่อเซลล์ และค่า  $K_d$  (ตารางที่ 5) ปรากฏว่าตรวจไม่พบอีส์โตรเจนรีเซพเตอร์ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้อเยื่อเต้านมประเภท gynaecomastia ส่วนเนื้อเยื่อเต้านมประเภท benign นั้นพบว่า 2 ใน 15 ตัวอย่าง (13.3%) มีปริมาณอีส์โตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนเท่ากับ 50.0 และ 21.4 เฟมโตโมล/มก. ไฮโดรซอดโปรตีน หรือ 1563 และ 783 ไบนดิงไซต์/เซลล์ ส่วนค่า  $K_d$  เท่ากับ 7.8 และ  $0.4 \times 10^{-10}$  โมลาร์ ซึ่งเนื้อเยื่อเต้านมทั้งสองที่ตรวจพบรีเซพเตอร์เป็นชนิด giant fibroadenoma และ cystosarcoma phylloides ซึ่งเป็นเนื้องอกเต้านม benign ที่ค่อนข้างใหญ่กว่าเนื้องอกเต้านม benign ทั่วไป นอกจากนี้พบว่าปริมาณของโปรตีนและ DNA มีค่ามากกว่า fibroadenoma ทั่วไปถึง 3 เท่า (ภาคผนวก ตารางที่ 11 ปริมาณโปรตีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ 2.6 มก./มด.)

11. ปริมาณของอีส์โตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนและค่า dissociation constant  
( $K_d$ ) ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณรีเซพเตอร์โปรตีนและค่า  $K_d$  ของเนื้อเยื่อมะเร็ง 43 ตัวอย่าง ที่ถือว่าเป็นรีเซพเตอร์บวก (receptor positive) ซึ่งมีค่าพิกัดตั้งแต่ 10 เฟมโตโมล/มก. ไฮโดรซอดโปรตีน ถึง 167.3 เฟมโตโมล/มก. ไฮโดรซอดโปรตีน คิดเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD เท่ากับ  $67.1 \pm 40.4$  เฟมโตโมล/มก. ไฮโดรซอดโปรตีน หรือมีค่าตั้งแต่ 0.2 เฟมโตโมล/ไมโครกรัม DNA ถึง 10.0 เฟมโตโมล/ไมโครกรัม DNA คิดเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD  $1.6 \pm 1.9$  เฟมโตโมล/ไมโครกรัม DNA ซึ่งถ้าคำนวณต่อเซลล์จะมีปริมาณตั้งแต่ 783 โมเลกุล/เซลล์ ถึง 39130 โมเลกุล/เซลล์ คิดเป็นค่าเฉลี่ย  $6339 \pm 7547$  โมเลกุล/เซลล์ ส่วน

ตารางที่ 6 ปริมาณของอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนและค่า dissociation constant (Kd) ในเนื้อเยื่อเต้านมปกติและเนื้องอกชนิดธรรมดา

พยาธิสภาพ	จำนวนตัวอย่าง	ปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์		Kd x 10 <sup>-10</sup> M
		เฟมโตโมล/ มก. โปรตีน	ไบคิงไซท์/ เซลล์	
Normal breast	5	-	-	-
Gynaecomastia	5	-	-	-
Fibroadenoma	12	-	-	-
Cystosarcoma phylloides	1	-	-	-
Cystosarcoma phylloides*	1	50.0	1563	7.80
Giant fibro - adenoma**	1	21.4	783	0.4

\* ปริมาณโปรตีนในไซโทซอล = 6.6 มก./มล.

ปริมาณ DNA ใน nuclear pellet = 825 µg/มล.

\*\* ปริมาณโปรตีนในไซโทซอล = 5.6 มก./มล.

ปริมาณ DNA ใน nuclear pellet = 600 µg/มล.

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนและค่า dissociation constant ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมที่เป็นรีเซพเตอร์บวก ( $R_c^+$ ) จำนวน 43 ราย

	ปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน			Kd x 10 <sup>-10</sup>
	เฟมโตโมล/มก. ไซโทซอลโปรตีน	เฟมโตโมล/ไมโคร-กรัม DNA	โมเลกุล/เซลล์	
พิสัย	10 - 167.3	0.2 - 10.0	783 - 39130	0.13-120
ค่าเฉลี่ย	67.1	1.6	6339	2.4
S.D.	40.4	1.9	7547	2.4

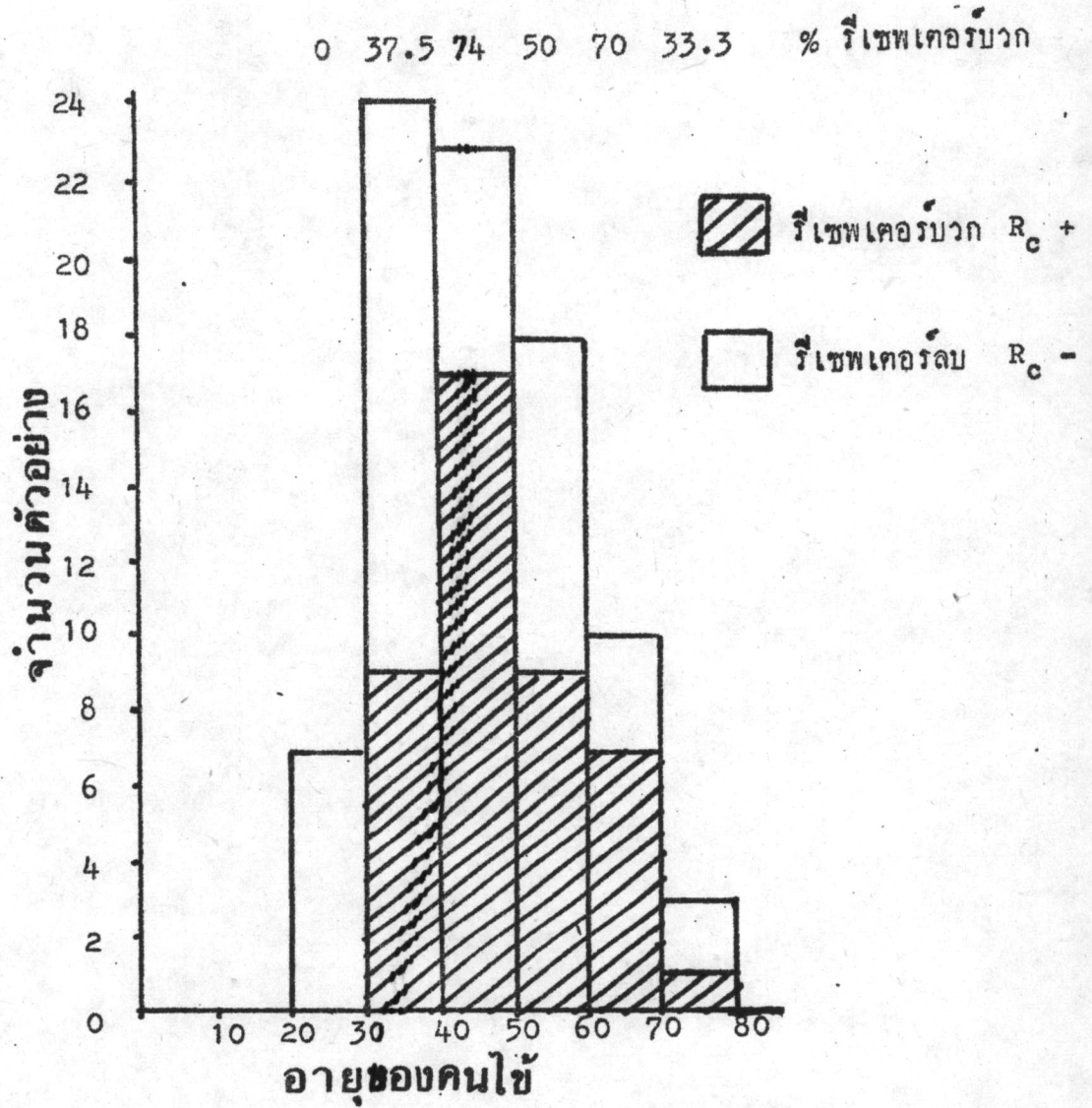
มีค่าตั้งแต่  $0.13 \times 10^{-10}$  โมลา ถึง  $12.0 \times 10^{-10}$  โมลา คิดเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  SD เท่ากับ  $2.4 \pm 2.4 \times 10^{-10}$  โมลา

12. ความสัมพันธ์ระหว่างอายุคนไข้กับจำนวนคนไข้ที่มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (receptor positive)

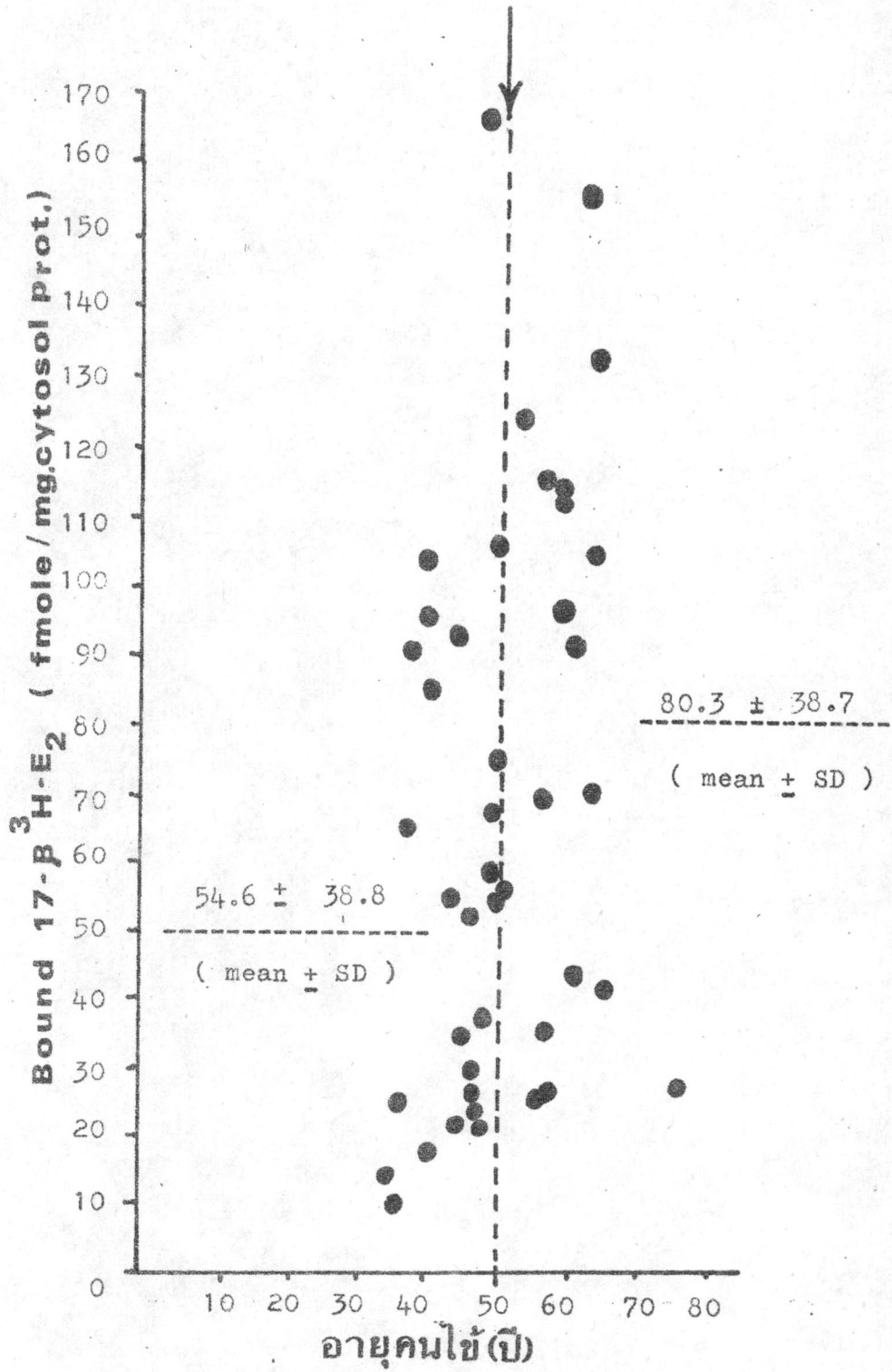
จากผลการเปรียบเทียบหาความสัมพันธ์ระหว่างช่วงอายุและจำนวนคนไข้ที่มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนรูปที่ 12 ปรากฏว่าไม่พบอัสโตรเจนรีเซพเตอร์ในคนไข้ที่มีอายุระหว่าง 20 - 30 ปี จำนวน 7 ราย และคนไข้ที่มีอายุระหว่าง 30 - 40 ปี จำนวน 24 ราย พบว่ามีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์ 9 ราย หรือ 37.5% ส่วนคนไข้ที่มีอายุ 40 - 50 ปี ซึ่งมีจำนวน 23 ราย พบว่า 17 ราย มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนหรือประมาณ 74% และคนไข้ที่มีอายุระหว่าง 50 - 60 ปี พบว่ามีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน 9 ราย ในจำนวน 18 ราย หรือ 50% ส่วนคนไข้ที่มีอายุ 60 ปี - 70 ปี จำนวน 10 ราย มี 7 รายที่มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน หรือ 70% พบคนไข้ที่สูงอายุระหว่าง 70 ปี - 80 ปี มีพบ 1 รายใน 3 ราย หรือ 33% ถ้าคิดจำนวนคนไข้ที่ตรวจพบอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (receptor positive) ทั้งหมดมี 43 ราย ในจำนวนคนไข้ทั้งหมด 85 ราย หรือ 51%

13. ความสัมพันธ์ระหว่างช่วงอายุของคนไข้กับปริมาณของอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน

จากการหาความสัมพันธ์ระหว่างอายุของคนไข้กับปริมาณอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน (เฟมโตโมล/มก.ไซโทซอลโปรตีน) ตามรูปที่ 13 ปรากฏว่าค่าอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนค่อนข้างกระจุกกระจาย ในคนไข้ที่มีอายุตั้งแต่ 20 ปี - 30 ปี ตรวจไม่พบอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน ส่วนคนไข้ที่มีอายุสูงกว่า 50 ปี มีปริมาณอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนโดยเฉลี่ยแล้วค่อนข้างสูง คือมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $80.3 \pm 38.7$  เฟมโตโมล/มก.ไซโทซอลโปรตีน เมื่อเทียบกับคนไข้ที่มีอายุต่ำกว่า 50 ปี ซึ่งมีปริมาณอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนโดยเฉลี่ยเท่ากับ  $54.5 \pm 38.8$  เฟมโตโมล/มก.ไซโทซอลโปรตีน ถ้าความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคนใช้ที่พบอีลโตรเจนรีเซพเตอร์ ( $R_c +$ ) และอายุของคนใช้



รูปที่ 13 แสดงปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน ( เฟมโตโมล / มก. ไทโทซอลโปรตีน ) ในคนไข้ที่มีอายุต่าง ๆ และเปรียบเทียบปริมาณอีสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนในคนไข้ที่มีอายุต่ำกว่า และสูงกว่า 50 ปี



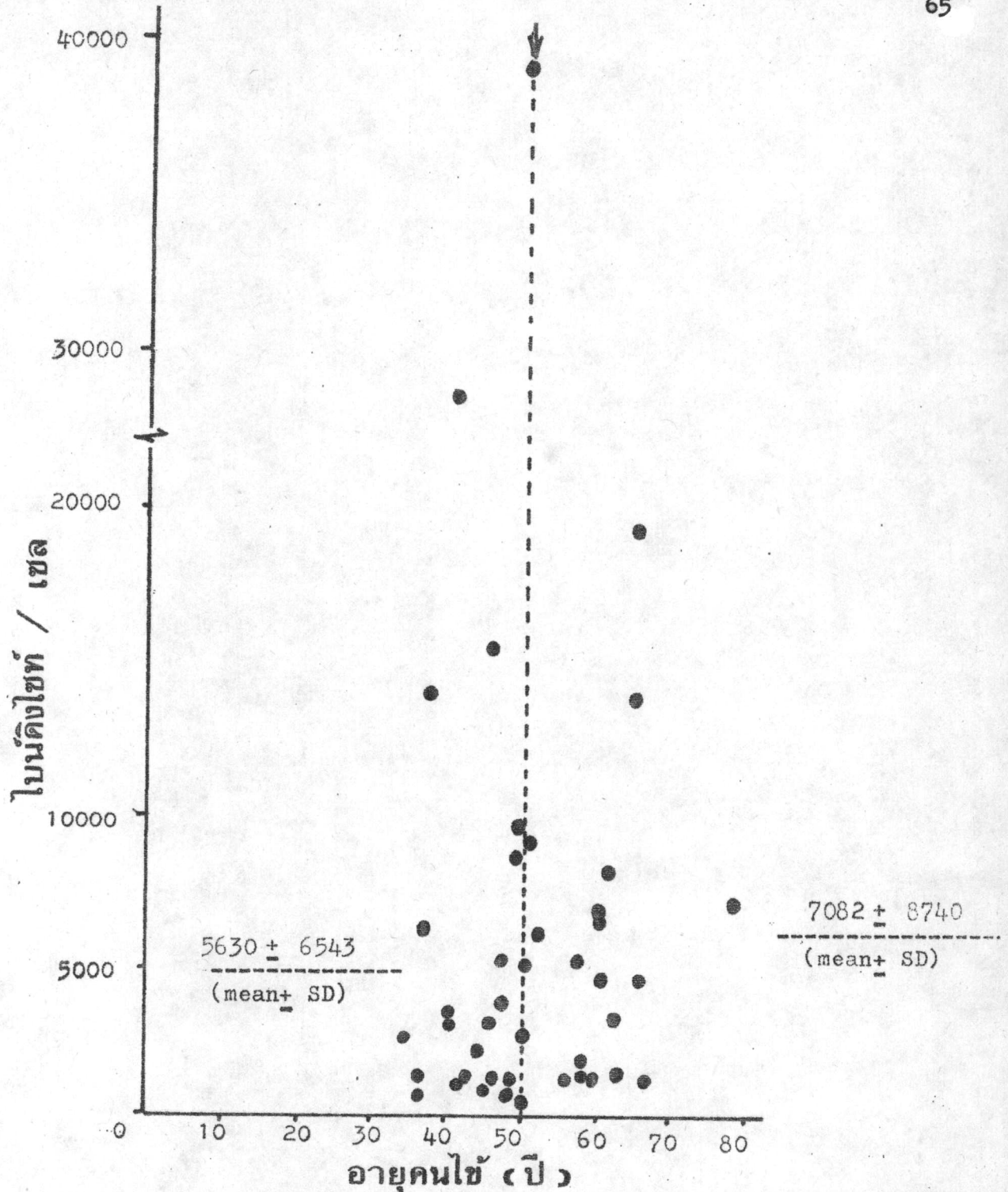
เมื่อลอง เปรียบเทียบ เติมนกราฟระหว่างช่วงอายุของคนไข้กับปริมาณไบน-  
คิงโซท/เซด ตามรูปที่ 14 พบว่าค่าไบนคิงโซท/เซดก็กระจุกกระจายเช่นเดียวกัน  
แต่พวกคนไข้ อายุสูงกว่า 50 ปี มีปริมาณไบนคิงโซท/เซด เท่ากับ  $7082 \pm 8740$   
และไม่แตกต่างจากปริมาณไบนคิงโซท/เซด ของคนไข้ที่อายุต่ำกว่า 50 ปี ซึ่งมีค่า  
เท่ากับ  $5630 \pm 6543$

14. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคนไข้ที่มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีนและปริมาณ  
มิดลิกริมไซโคซอดโปรตีน

จากผลการทดลองหาอิทธิพลของปริมาณโปรตีนในไซโคซอดกับความถี่  
จำนวนคนไข้ที่เป็นรีเซพเตอร์บวก (receptor positive) และรีเซพเตอร์ลบ  
(receptor negative) ตามรูปที่ 15 พบว่าเมื่อปริมาณไซโคซอดโปรตีนน้อยกว่า  
1 มก./มด. โอกาสที่จะพบว่าเป็นรีเซพเตอร์โปรตีนบวกมีน้อย คือมีเพียง 16%  
(4/24) โดยเฉพาะเมื่อปริมาณโปรตีนต่ำกว่า 0.8 มก./มด. จะไม่พบอัสโตรเจน-  
รีเซพเตอร์โปรตีนเลย แต่หาปริมาณไซโคซอดโปรตีนมากกว่า 1 มก./มด. โอกาส  
ที่จะพบว่าเป็นรีเซพเตอร์บวกก็มีมาก โดยเฉพาะในช่วงปริมาณโปรตีนระหว่าง 1 - 5 มก.  
จำนวนรีเซพเตอร์บวกมีประมาณ 70% (37/54) แต่เมื่อปริมาณไซโคซอดโปรตีนสูง  
กว่า 5 มก./มด. กลับพบว่าจำนวนรีเซพเตอร์บวกลดลงจนเหลือประมาณ 28% (2/7)

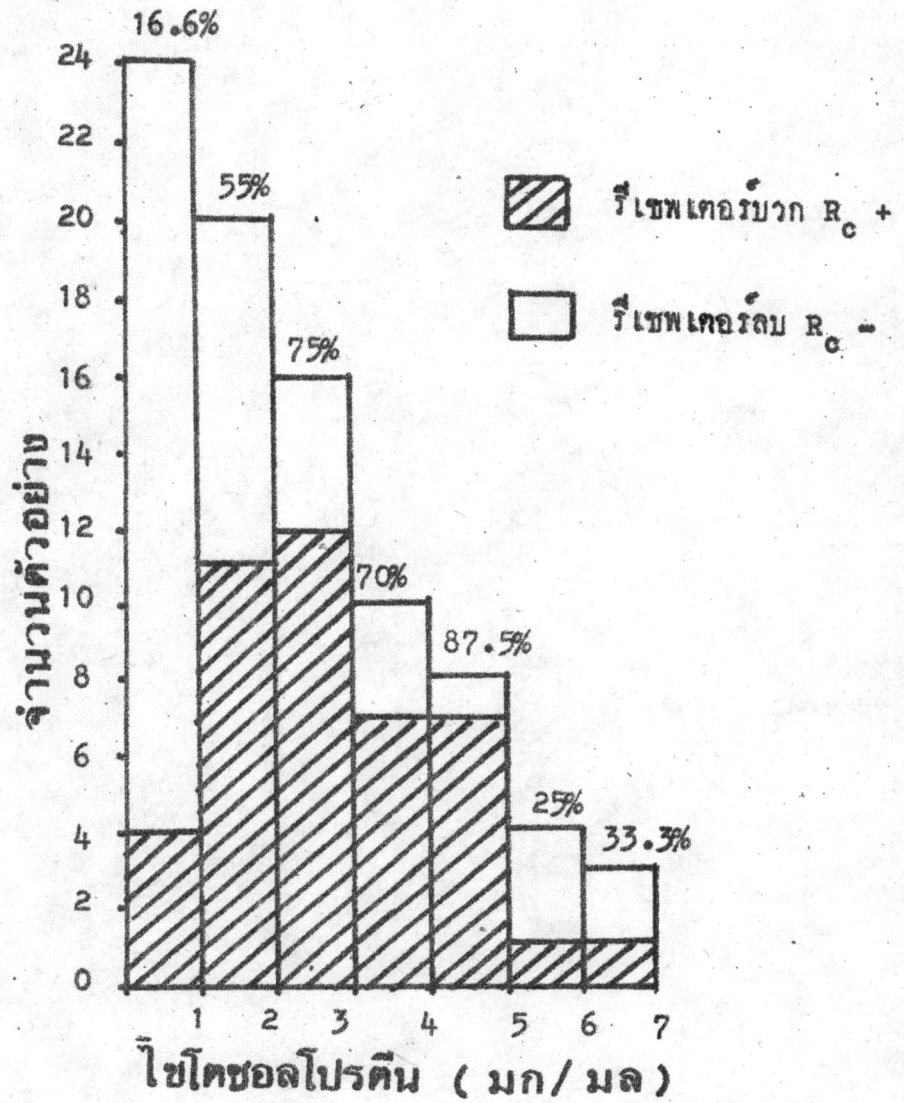
15. ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคนไข้ที่มีอัสโตรเจนรีเซพเตอร์โปรตีน และปริมาณ  
ไมโครกริม DNA

รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรีเซพเตอร์บวกและรีเซพ-  
เตอร์ลบ กับปริมาณไมโครกริม DNA จะเห็นว่าจำนวนรีเซพเตอร์บวกและรีเซพ-  
เตอร์ลบมีค่าไม่แตกต่างกันมาก ในทุก ๆ ความเข้มข้นของ DNA กล่าวคือมีรีเซพ-  
เตอร์บวกเท่ากับ 51% (16/31) ในช่วงความเข้มข้น 0 - 100 ไมโครกริม DNA  
และ 50% (13/26) ในช่วง 100 - 200 ไมโครกริม และ 53% (7/13) ในช่วง  
200 - 300 ไมโครกริม ส่วนช่วง 300 - 400 ไมโครกริม มี 46% (7/15)

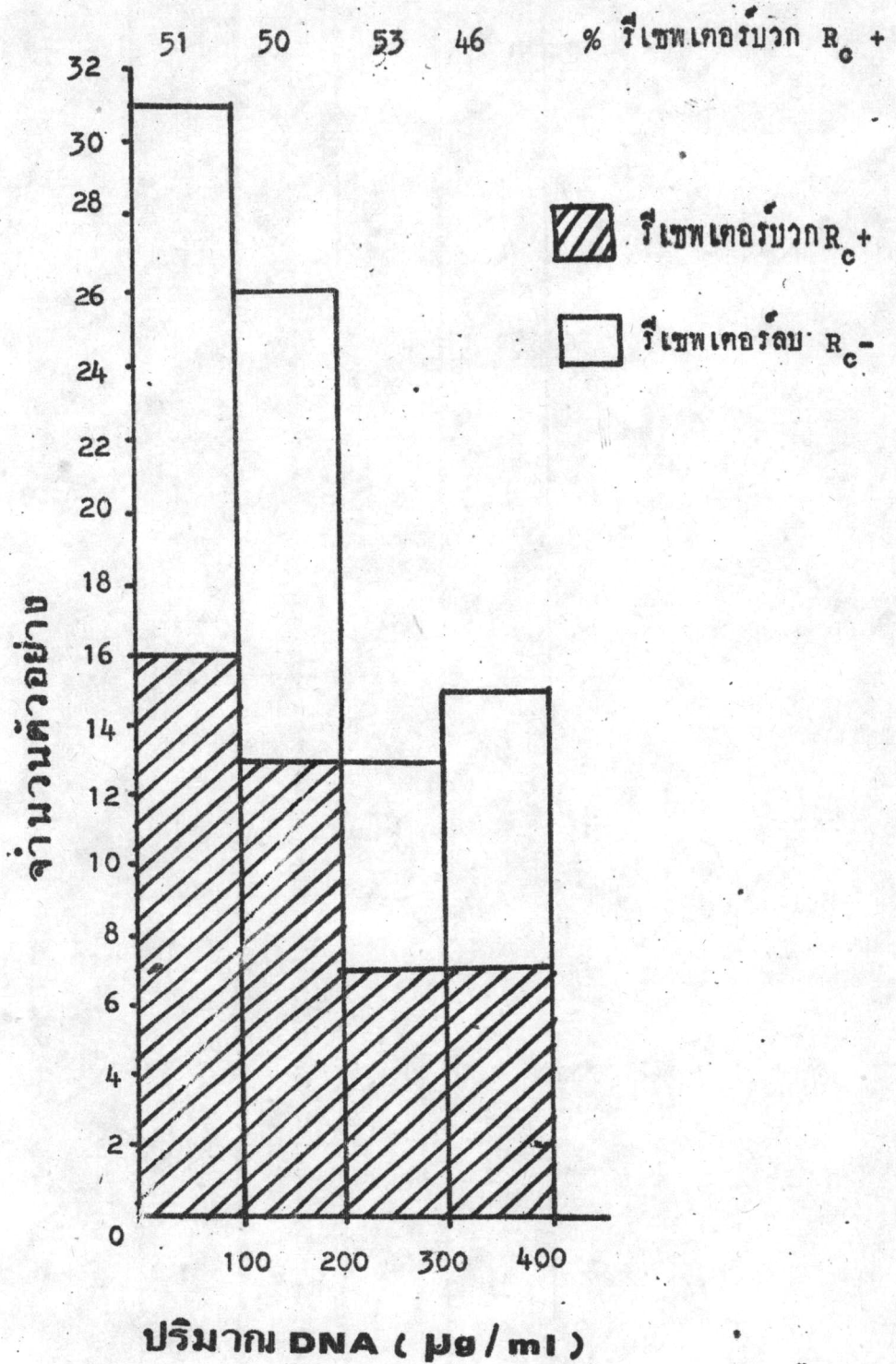


รูปที่ 14

แสดงปริมาณไขมันคอเลสเตอรอลในเลือด ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม จากคนไข้ที่มีอายุต่าง ๆ และเปรียบเทียบปริมาณคอเลสเตอรอลในคนไข้ที่มีอายุต่ำกว่า และ สูงกว่า 50 ปี



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคนไข้ที่มีปัสสาวะมีเม็ดเลือดแดง (R<sub>c</sub><sup>+</sup>) และปริมาณโปรตีนในปัสสาวะ (มิลลิกรัม / มล.)



รูปที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนคาเซทิฟิมอิสโทโรเจนฟีเชทเคอริ (R<sub>0</sub><sup>+</sup>) และปริมาณ DNA (ไมโครกรัม / มล)

16. ระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในน้ำเหลืองของคนไข้ประเภทที่หมดประจำเดือน  
(menopause)

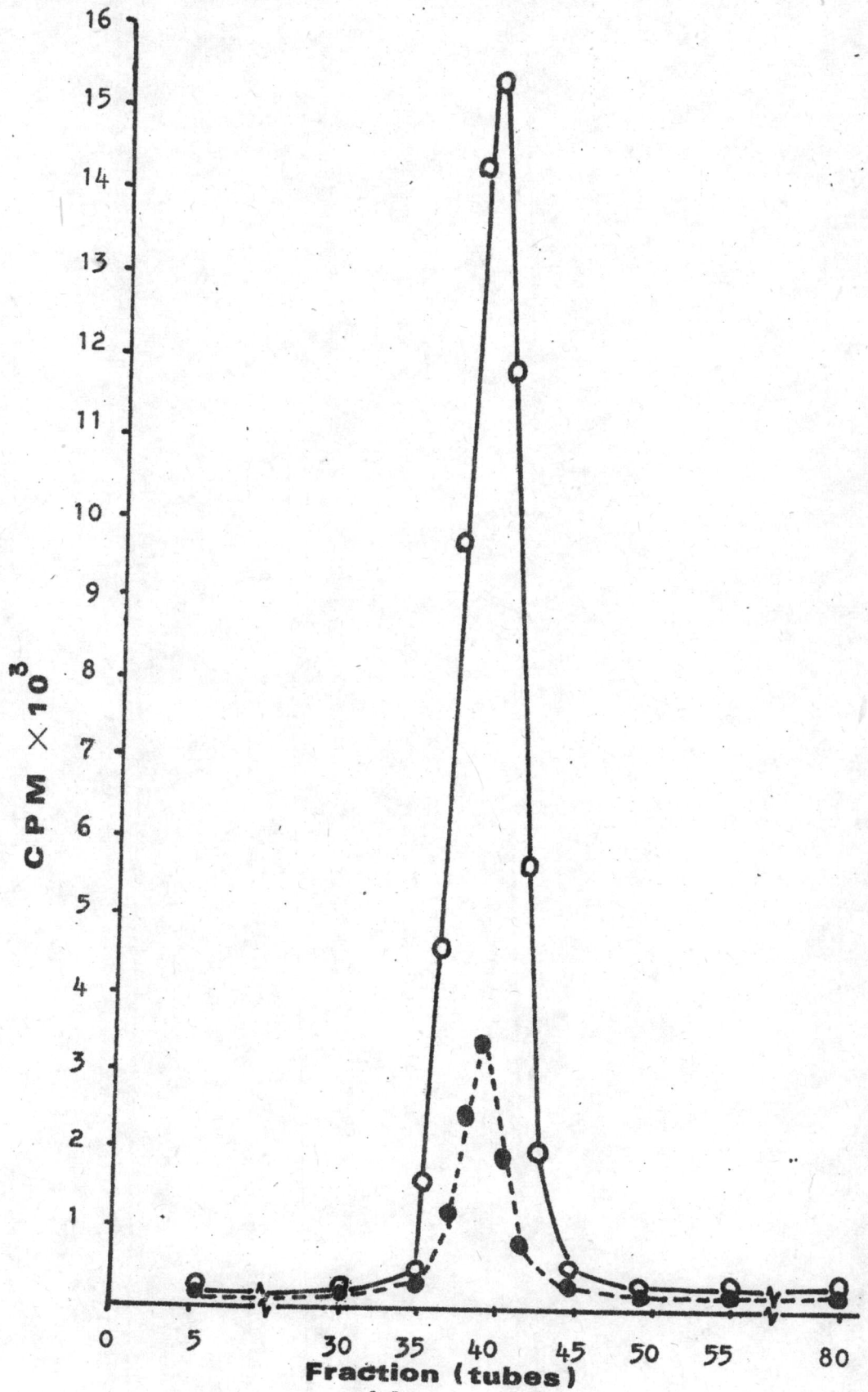
การทดลองในครั้งนี้ใช้หลัก RIA (สมัย สตีฟสันไพบูลย์, 2518) ตามที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 9 หน้า 36 โดยหาระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจนในน้ำเหลืองในคนปกติที่หมดประจำเดือนแล้ว 4 ราย เปรียบเทียบกับคนไข้ที่หมดประจำเดือน 11 ราย ในจำนวนนี้ที่เป็นรีเซพเตอร์บวก 4 ราย รีเซพเตอร์ลบ 7 ราย โดยเจาะเลือดคนไข้ก่อนผ่าตัดและเจาะเลือดหญิงปกติซึ่งอาสาสมัครมาทดลอง นำเลือดมาปั่นแยกเอาน้ำเหลืองหาระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนตามหัวข้อ 9.1 หน้า 36 และหัวข้อ 9.2 หน้า 37 โดยปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนของแต่ละตัวอย่างโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน (รูปที่ 18 ในภาคผนวก) โดยดูตามตารางที่ 8 คือ ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในน้ำเหลืองในคนปกติมีค่าโดยเฉลี่ย  $\pm$  SD เท่ากับ  $22.7 \pm 8.1$  พิโคกรัม/มล. ซึ่งใกล้เคียงกับระดับฮอร์โมนคนไข้ที่เป็นรีเซพเตอร์บวกที่มีค่าโดยเฉลี่ย  $\pm$  SD เท่ากับ  $24.4 \pm 14.4$  พิโคกรัม/มล. และคนไข้ที่เป็นรีเซพเตอร์ลบซึ่งมีค่าโดยเฉลี่ย  $\pm$  SD เท่ากับ  $20.6 \pm 6.0$  พิโคกรัม/มล.

17. ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน

ผลการทดสอบความบริสุทธิ์ของ  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  ที่จับกับรีเซพเตอร์โปรตีน (หัวข้อ 8 หน้า 36) เปรียบกับสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  (400 พิโคกรัม/0.1 มล. assay buffer) โดยดูตามรูปที่ 17 ซึ่งมี peak เกือบตรงกับ peak ของสารมาตรฐาน  $17-\beta$   $^3\text{H} - \text{E}_2$  (fraction 40)

ตารางที่ 8 ปริมาณของฮอร์โมนไอส์โตรเจนในน้ำเหลืองของคนที่หมกประจำเดือนเทียบกับ  
คนปกติที่หมกประจำเดือนแล้ว

ตัวอย่าง	อายุ	% $\frac{B}{T}$	% Fraction recovery	total fraction recovery	ปริมาณไอส์โตรเจนในน้ำเหลือง				
					พิโคกรัม จากกราฟมาตรฐาน	พิโคกรัม-blank	พิโคกรัม ใน ๒ มล.	พิโคกรัม/มล.	
1	60	90.9	18.5	62.9	9.1	6.6	35.0	17.5	
2	57	87.5	20.1	68.3	14.2	11.7	58.2	29.1	
3	55	17.7	60.2	60.2	7.5	5.0	28.2	14.1	
4	58	88.8	18.7	63.6	13.8	11.3	60.4	30.2	
กลุ่ม 1 คนปกติที่หมกประจำเดือน มีค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.					22.7	$\pm$ 8.1	Pg/มล.		
CA 51	58	96.5	18.5	62.9	4.1	1.6	86.4	43.2	
CA 60	78	93.8	18.3	62.1	6.8	4.3	23.5	11.7	
CA 106	59	87.1	21.1	71.8	14.3	11.8	55.8	22.9	
CA107	62	90.8	22.7	77.0	9.1	6.6	29.1	14.4	
กลุ่มที่ 2 คนไข้ที่มีไอส์โตรเจนรีเซพเตอร์ มีค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.					24.4	$\pm$ 14.4	Pg/มล.		
CA 30	56	91.4	18.6	63.2	8.5	6.0	32.2	16.1	
CA 42	57	89.5	18.4	62.4	11.6	9.1	49.5	24.7	
CA 44	57	90.6	19.4	65.9	9.2	6.7	34.5	17.3	
CA 63	59	92.6	18.8	63.9	7.6	5.1	27.1	13.5	
CA 69	61	90.4	19.5	66.4	9.2	6.7	34.3	17.1	
CA 74	55	88.1	19.9	67.5	13.9	11.4	57.4	28.7	
CA 94	60	88.8	21.0	71.4	13.8	11.3	53.8	16.9	
กลุ่มที่ 3 คนไข้ที่ไม่พบไอส์โตรเจนรีเซพเตอร์มีค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.					20.6	$\pm$ 6.0	Pg/มล.		
blank	-	99.6	-	-	2.5	-	-	-	



รูปที่ 17 แสดงความบริสุทธิ์ของ 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ภายหลังจากจับกับรีเซพเตอร์โปรตีน (●-●) เทียบกับสารมาตรฐาน 17-β <sup>3</sup>H-E<sub>2</sub> ที่ไม่ได้ออกจับกับรีเซพเตอร์โปรตีน (o-o)