

ผลของแอนติโปรเจสทินต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและการแสดงออกของตัวรับ
โปรเจสเตรอนในมดลูกแมวที่ได้รับยาเม็ดด็อกซีโปรเจสเตรอน อะซิเตท



นางสาว วรณี หมู่ผึ้ง

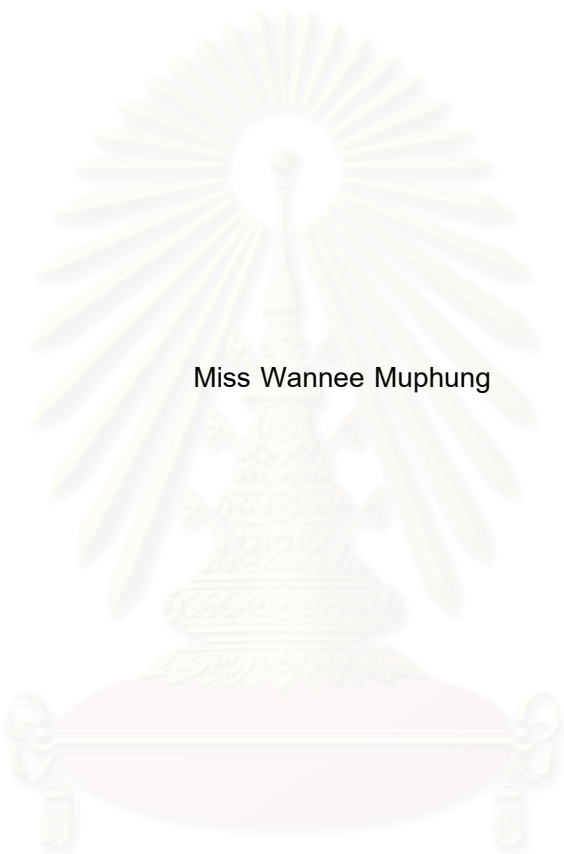
สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และวิทยาการสืบพันธุ์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF ANTIPROGESTIN ON UTERINE CHANGES AND
EXPRESSION OF PROGESTERONE RECEPTORS IN THE UTERUS OF
DOMESTIC CATS ADMINISTERED MEDROXYPROGESTERONE ACETATE



Miss Wannee Muphung

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Theriogenology

Department of Obstetrics Gynaecology and Reproduction

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของแอนติโปรเจสทินต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและการแสดงออกของตัวรับโปรเจสโตโรนในมดลูกแมวที่ได้รับยาเมดติกส์โปรเจสโตโรนอะซิเตท

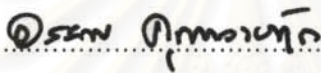
โดย นางสาววรรณิ์ หมู่ผึ้ง

สาขาวิชา วิทยาการสืบพันธุ์สัตว์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรตรงค์

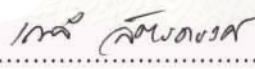
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์


คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต

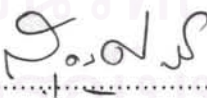
 คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. ชัยณรงค์ โลหะชิต)

 อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรตรงค์)

 อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์)

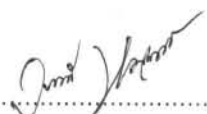
 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สุดสร สิริวิทยพงษ์)

 กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. ศยามณ ศรีสุวรรณาสกุล)

วรรณีย์ หมู่ผึ้ง : ผลของแอนตี้โปรเจสตินต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรนในมดลูกแมวที่ได้รับยาเม็ดด็อกซีโปรเจสเตอโรน อะซิเตท (EFFECTS OF ANTIPROGESTIN ON UTERINE CHANGES AND EXPRESSION OF PROGESTERONE RECEPTORS IN THE UTERUS OF DOMESTIC CATS ADMINISTERED MEDROXYPROGESTERONE ACETATE) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สพ.ญ. ดร. เกวลี ฉัตรตรงค์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. น.สพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์, 62 หน้า.

อะกลีพริสโตน เป็นแอนตี้โปรเจสตินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยการแย่งจับกับตัวรับ มีการนำมาใช้ในเนื้องอกในสุนัขและแมว รักษาหลอดอักเสบเป็นหนองในสุนัข รักษาภาวะการขยายใหญ่ของเต้านมแมว อันเป็นผลมาจากการได้รับฮอร์โมนคุมกำเนิดเมดโดกซีโปรเจสเตอโรน อะซิเตท (MPA) เพื่อคุมกำเนิดในสัตว์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงมดลูกแมว ภายหลังจากใช้ยาแอนตี้โปรเจสตินในแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA โดยใช้แมว 18 ตัว ในระยะ interoestrus แบ่งเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ MPA และกลุ่มที่ได้รับอะกลีพริสโตน ทำการตรวจทางพยาธิวิทยาทางมหกายวิภาค จุลพยาธิวิทยา และตรวจหาการขยายตัวของตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี ภายหลังจากที่ได้รับ aglepristone ผลในการตรวจทางมหกายวิภาคพบว่าน้ำหนักมดลูก เส้นผ่านศูนย์กลาง และความหนา มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ MPA ผลทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าความหนาของชั้น endometrium และ myometrium แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.92$ และ $P=0.78$ ตามลำดับ) ลักษณะการจัดเรียงของตัวและรูปร่างเซลล์บริเวณ luminal epithelium ภายหลังจากที่ได้รับยา aglepristone นั้น พบการเรียงตัวของบางตัวเป็นแบบ single layer และเรียงตัวแบบ pseudostratified เซลล์เยื่อมีรูปร่าง columnar พบแมว 1 ตัวในกลุ่มที่ได้รับอะกลีพริสโตน มีลักษณะการเรียงตัวแบบออกซาย (hyperplasia) และมีแบบที่เรียงอยู่ในต่อมมดลูกจำนวนมาก ซึ่งแสดงให้เห็นลักษณะของเยื่อมดลูกอักเสบ (endometritis) หรือ CEH อันเป็นสภาพเริ่มต้นจากการขยายใหญ่ของ endometrial gland การหนาตัวของ luminal และ glandular epithelium ความหนาแน่นของ endometrial gland การขยายของ endometrial gland สวรรค์หลังใน endometrial gland รวมทั้งการคั่งเลือดและเลือดออกในมดลูก อยู่ในระดับแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าดัชนี PCNA ภายหลังจากที่ได้รับยา aglepristone พบค่าดัชนี PCNA ต่ำกว่าแมวก่อนที่ฉีดยาคุมกำเนิด MPA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติทั้งใน luminal and glandular epithelium ($P=0.47$ และ $P=0.10$ ตามลำดับ) ผลของ PR score ภายหลังจากที่ได้รับยา aglepristone นั้นพบว่าทั้งใน luminal and glandular epithelium มีระดับ PR score สูงกว่ากลุ่มที่ฉีดยาคุมกำเนิด MPA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.42$ และ $P=0.37$) จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่ามดลูกแมวภายหลังจากที่ได้รับยา aglepristone ไม่มีความแตกต่างกับแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ทั้งทางพยาธิสภาพและการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน อาจต้องทำการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้น

ภาควิชาสัตวศาสตร์ ภาควิชาสัตวบาลและวิทยาการสืบพันธุ์
สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว์
ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... 

4775574031 : MAJOR THERIOGENOLOGY

KEY WORD : CAT / UTERUS / ANTIPROGESTIN / PROGESTERONE RECEPTOR / ENDOMETRIUM

WANNEE MUPHUNG : EFFECTS OF ANTIPROGESTIN ON UTERINE CHANGES AND EXPRESSION OF PROGESTERONE RECEPTORS IN THE UTERUS OF DOMESTIC CATS ADMINISTERED MEDROXYPROGESTERONE ACETATE. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KAYWALEE CHATDARONG, D.V.M., M.Sc. Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. ANUDEP RUNGSIPIPAT, D.V.M., Ph.D. 62 PP.

Aglepristone is a synthetic steroid hormone, which bind with great affinity to progesterone receptors without any effects of the progesterone. Aglepristone is an antiprogestin which research specifically for veterinarian. It induces abortion in animals and applies in case: endometritis, closed and open pyometra, induce parturition and mammary gland tumor. Previous report the effective of many antiprogestins for treat mammary gland tumor and pyometra in dogs and cats, which induce from MPA. The aims of the present study were to investigate of uterine change and expression of progesterone receptors after use antiprogestin in cats which administered MPA. A total of 18 interoestrus cats which separate 6 cats in 3 groups. There are control group, MPA group and aglepristone group. Pathologic change observed by macroscopic and microscopic examination. Proliferative cell nuclear antigen and progesterone receptor observed by immunohistochemistry technique. The results were not different in weight of uterus and diameter of uterine horns. Macroscopic examination found thickness of endometrium and myometrium did not differ significantly. (P=0.92 and P=0.7 8). Lumin al epithelium lining was single and pseudostratified, cell arrangement was columnar after use aglepristone. Hyperplasia cellular arrangement and presence of bacteria clumps in endometrial gland in 1 cat which may be the cause of endometritis or pyometra. Degree of luminal and glandular epithelium proliferation, endometrial gland proliferation, dilatation and secretion, hemorrhage and congestion in submucosa did not differ significantly. PCNA index in luminal and glandular epithelium after administered aglepristone were not significant lower (P=0.47 and P=0.10) than in MPA group. PR score in luminal and glandular epithelium after administered aglepristone were not significant lower (P=0.42 and P=0.37) than in MPA group. The results showed that after administered aglepristone were not differ significantly but if study for a long time the result may be clear.

Department of Obstetrics
Gynaecology and Reproduction
Field of study Theriogenology
Academic year 2007

Student's signature.....
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.สพ.ญ.ดร. เกวลี ฉัตรตรงค์ อาจารย์ปริกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.น.สพ.ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาให้ความรู้ตลอดจนให้ความคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอบพระคุณ คุณสุประดิษฐ์ หวังในธรรม เจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาบาลวิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการให้ข้อมูลและเทคนิคสำหรับการทำการทดลอง คุณพยอม ร่มโพธิ์ดี เจ้าหน้าที่ภาคสุติศาสตร์ หนองแขงวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดูแลสัตว์ทดลอง

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่ชาย พี่น้อง และน้องๆ ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจเสมอมา

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ ประจำภาคต้น ปีการศึกษา 2548 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการทำวิทยานิพนธ์สำหรับอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2549 ครั้งที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
ลักษณะมดลูกในระยะต่างๆ ของวงจรการเป็นสัดในแมว	5
ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สร้างจากคอปัสสุเทียม.....	6
ฮอร์โมนเม็ดด็อกซีโปรเจสเตอโรน อะซิเตท (medroxyprogesterone acetate-MPA).....	6
สารยับยั้งตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone-receptor blocker หรือ antiprogestin.....	8
การใช้ aglepristone เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้ง.....	14
การใช้ aglepristone เพื่อเหนี่ยวนำการคลอด.....	15
การใช้ aglepristone รักษาภาวะมดลูกเป็นหนอง (pyometra).....	15
การใช้ aglepristone รักษาการขยายใหญ่ของเนื้อเยื่อเต้านม.....	17
ความสัมพันธ์ระหว่าง aglepristone และ ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด.....	17
ตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesteronereceptor-PR).....	18
ดัชนีการงอกขยาย (proliferative cell nuclear antigen-PCNA).....	20

3. วิธีดำเนินการวิจัย	22
1. สัตว์ทดลอง.....	22
2. แผนการทดลอง.....	22
3. การตรวจหาระยะ interoestrus.....	22
4. การตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด.....	23
5. การเก็บตัวอย่างมดลูก.....	23
6. การตรวจลักษณะทางมหกายวิภาคของมดลูก (macroscopic examination).....	23
7. การตรวจลักษณะทางจุลกายวิภาคของมดลูก (microscopic examination).....	23
8. การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry).....	25
8.1 การหาค่าดัชนีการงอกขยายของเซลล์ภายในชั้นต่างๆ ของผนัง มดลูก (proliferative cell nuclear antigen-PCNA).....	25
8.2 การตรวจหาการแสดงออกของ PR	26
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	27
4. ผลการทดลอง	28
ลักษณะทางพยาธิวิทยา.....	28
1. ลักษณะทางมหพยาธิวิทยา.....	28
2. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา.....	28
ดัชนีการงอกขยาย.....	33
การแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน.....	35
5. อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	37
5.1 อภิปรายผลการทดลอง.....	37
5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	41
รายการอ้างอิง.....	42
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	62

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1	28
4.2	29
4.3	30
4.4	33
4.5	34

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติ ที่ผลิตจากร่างกาย และ เมดดอกซีโปรเจสเตอโรน อะซีเตท.....	8
2.2 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ mifepristone.....	9
2.3 แสดงการจับของฮอร์โมน และสารต้านฮอร์โมน ในนิวเคลียสของเซลล์.....	10
2.4 โครงสร้างทางเคมีของ mifepristone และ onapristone	13
2.5 โครงสร้างทางเคมีของ aglepristone.....	13
2.6 การทำงานของ aglepristone ในการแย่งจับกับตัวรับโปรเจสเตอโรน.....	14
3.1 แสดงการวัดเพื่อหาสัดส่วน endometrium/ myometrium ratio (E/M ratio).....	25
4.1 รูปร่างเซลล์ luminal epithelium และ glandular epithelium ของผนังมดลูกแมวในระยะ interoestrus.....	30
4.2 แสดงการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์ luminal epithelium และ glandular epithelium ที่พบได้ในมดลูกแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA.....	31
4.3 ผนังมดลูกแมวตัวหนึ่งในกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ aglepristone หลังจากยาคุมกำเนิด MPAแสดงกลุ่มแบคทีเรียและเม็ดเลือดขาวที่พบภายใน endometrial gland.....	32
4.4 ลักษณะของ uterine gland	33
4.5 ผนังมดลูกแมวที่ได้รับการยับยั้งด้วยวิธีภูมิคุ้มกันฮิสโตเคมี เพื่อดูดัชนีการออกขยาย (PCNA index)	34
4.6 ลักษณะของผนังมดลูกแมวที่มีการแสดงออกของ PR ในชั้นต่างๆ เซลล์ที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส.....	36

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แมวบ้าน (*Felis catus*) เป็นต้นแบบของสัตว์ป่าตระกูลแมวอื่นๆ ในการศึกษาการใช้เทคโนโลยีทางชีวภาพทางการสืบพันธุ์เพื่อขยายพันธุ์สัตว์ อีกทั้งแมวยังเป็นสัตว์เลี้ยงที่นิยม โดยเฉพาะแมวพันธุ์แท้ ได้แก่ ไคราช วิเชียรมาศ ขาวมณี และศุภลักษณ์ แมวมีวงจรการเป็นสัดแบบหลายครั้งในหนึ่งฤดูการ (seasonally polyoestrus) ขึ้นอยู่กับความยาวแสงสว่างในแต่ละวัน ในฤดูหนาวที่มีกลางวันสั้นกว่ากลางคืน แมวจะอยู่นอกฤดูการเป็นสัด (non-breeding season) ไม่มีการทำงานของรังไข่ เป็นเวลานาน 3-4 เดือน (anoestrus) เมื่อเข้าสู่ฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน การเปลี่ยนแปลงของแสงสว่างในเวลากลางวันที่ยาวนานขึ้น จะกระตุ้นให้แมวเข้าสู่ฤดูผสมพันธุ์ (breeding season) ประเทศไทยตั้งอยู่ในแถบศูนย์สูตร ทำให้กลางวันและกลางคืนมีระยะเวลาเกือบเท่ากันในทุกฤดูการ สัตว์ตระกูลแมวที่อาศัยอยู่ในประเทศไทยมีวงจรการเป็นสัดตลอดปีโดยไม่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล มีรายงานว่าแมวไทยเริ่มเป็นสัดครั้งแรกได้ตั้งแต่อายุก่อน 5 เดือน (Noakes et al., 2001) การให้แสงสว่างอย่างน้อยวันละ 10 ชม. จะทำให้แมวเป็นสัดได้ตลอดปี (Shille and Sojka, 1995; Leyva et al., 1985) นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่าการลดชั่วโมงของแสงสว่างจาก 14 เป็น 8 ชม.ต่อวัน มีผลกระทบต่อความเป็นสัดของแมว (Leyva et al., 1989) การเป็นสัดเริ่มจากรังไข่มีการสร้างฟอลลิเคิลในระยะเป็นสัด (oestrus) เป็นเวลา 4-7 วัน ถ้าไม่มีการผสมพันธุ์เกิดขึ้น จะเข้าสู่ระยะระหว่างการเป็นสัด (interoeestrus) เป็นเวลา 7-14 วัน สลับกับระยะ oestrus ไปเรื่อยๆ ตลอดฤดูผสมพันธุ์ ถ้ามีการผสมพันธุ์จะเป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ การตกไข่จะเกิด 24-36 ชม. หลังการผสมพันธุ์หลายครั้ง แต่ถ้าผสมไม่ติดและไม่มีการตั้งท้อง แมวจะเข้าสู่ระยะหลังเป็นสัด (pseudopregnancy หรือ dioestrus) เป็นเวลา 30-45 วัน ถ้าผสมติด การฝังตัวเกิดขึ้นใน 12-13 วันหลังจากการผสมพันธุ์ การตั้งท้องมีระยะเวลา 60-65 วัน (Verstegen, 2000) หลังจากรการตกไข่ ฟอลลิเคิลจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นคอร์ปัสลูเทียม (corpora luteum) ซึ่งเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ในระยะ interoeestrus และระยะ oestrus แมวมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในระดับปกติคือ ต่ำกว่า 1 นาโนกรัม/เดซิลิตร ต่อมาในวันที่ 3-4 หลังมีการตกไข่ แมวจะอยู่ในระยะ dioestrus ซึ่งมีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดเพิ่มขึ้นสูงกว่า 3 นาโนกรัม/เดซิลิตร (Tsutsui and Stabenfeldt, 1993) และจะสูงสุดประมาณวันที่ 21 หลังการตกไข่ (Widit et al., 1981) คือ 30-50 นาโนกรัม/เดซิลิตร (Verstegen, 1998) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สร้างจากในร่างกายของแมว (endogenous progesterone) ในระยะ dioestrus นี้ ทำให้เกิดการหนาตัวของเยื่อบุผนังมดลูก (hyperplasia of luminal epithelium) การหนาตัวของเยื่อบุ

ต่อมในมดลูก (hyperplasia of glandular epithelium) การเพิ่มจำนวนต่อมในมดลูก (glandular proliferation) รวมทั้งปริมาณสิ่งคัดหลั่งในมดลูก (glandular secretion) (Boomsma et al., 1982; Boomsma et al., 1991; Chatdarong et al., 2005) รวมทั้งทำให้มีการขยายใหญ่ของเต้านม (mammary hyperplasia) (Verstegen, 2000) โดยการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและเต้านมนี้จะกลับเข้าสู่สภาพปกติเมื่อแมวกลับเข้าสู่ระยะ interoestrus (Boomsma et al., 1991)

ประชากรแมวในประเทศไทยมีการเพิ่มขึ้นทุกปี ทั้งแมวเลี้ยงและแมวจรจัด จนต้องมีมาตรการควบคุมจำนวนประชากรอย่างจริงจัง ถึงแม้ว่าการทำหมันโดยการผ่าตัดเอามดลูกและรังไข่ออก (ovariohysterectomy-OVH) จะเป็นวิธีการควบคุมประชากรที่มีประสิทธิภาพที่สุด และเป็นวิธีการที่ใช้กันมากในประเทศสหรัฐอเมริกาและแคนาดา (Robert, 1994) แต่ประชาชนบางกลุ่มที่นิยมเลี้ยงแมวสายพันธุ์ดี นำเข้าจากต่างประเทศ หรือแมวพันธุ์ไทยแท้ มักต้องการเพียงการคุมกำเนิดชั่วคราว โดยหวังให้แมวสามารถมีลูกได้ต่อไปเมื่อหยุดยาคุมกำเนิด ยาฉีดคุมกำเนิดที่นิยมใช้เป็นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ คือ เมดดอกซีโปรเจสเตอโรน อะซิเตท (medroxyprogesterone acetate - MPA) ขนาดที่แนะนำให้ใช้ในแมว คือ 20 มก./กก. ทุก 5 เดือน (Romagnoli and Concannon, 2003) ในคนยาคุมกำเนิด MPA นี้มีผลต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายว่ามากกว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติถึง 45 เท่า (King and Whitehead, 1986) ในปัจจุบันยังไม่มีกรอนุญาตให้ใช้ในแมวในประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษ (Noakes et al., 2001) แต่เป็นที่นิยมในประเทศอื่นๆ รวมทั้งในประเทศแถบยุโรป (Romagnoli and Concannon, 2003) และประเทศไทย โดยในประเทศไทยและอีกหลายประเทศในทวีปอเมริกามีการแนะนำให้ใช้ยาคุมกำเนิด MPA ในการฉีดคุมกำเนิดแมว ขนาด 50 มก./ตัว ทุก 3 หรือ 6 เดือน ผลข้างเคียงคือ ทำให้เกิดการขยายใหญ่ของผนังมดลูก (endometrial hyperplasia) (Lawler et al., 1991; Potter et al., 1991) รวมทั้งการขยายใหญ่ของเต้านมชนิดไฟโบรอะดรีโนมา (feline mammary fibroadenomatous hyperplasia - FMFH) แม้ว่าจะมีการฉีดเพียงครั้งเดียวเท่านั้น (Loretto et al., 2005) ในสุนัขและแมวการฉีดยาคุมกำเนิด MPA เข้ากล้ามเนื้อเพียงครั้งเดียวทำให้มีฮอร์โมนชนิดนี้อยู่ในกระแสเลือดนานถึง 6 เดือน และการใช้เกินขนาดหรือฉีดในระยะที่ไม่ใช่ระยะ anoestrus ทำให้เกิดการขยายใหญ่ของมดลูกและเต้านมในแมวได้ (Concannon and Meyers-Wallen, 1991)

ถึงแม้ว่าจะมีข้อแนะนำให้ใช้ยาคุมกำเนิด MPA เฉพาะในระยะ anoestrus หรือระยะ interoestrus ที่ไม่มีการทำงานของรังไข่เท่านั้น แต่ก็ไม่สามารถหลีกเลี่ยงที่จะฉีดยาคุมกำเนิด MPA ในระยะ dioestrus ได้ในบางครั้ง ทั้งนี้เป็นเพราะ 30-55% ของแมวมีการตกไข่ได้เองโดยไม่ได้รับการกระตุ้นจากการผสมพันธุ์หรือเครื่องมือใดๆ (spontaneous ovulation) (Lawler et al., 1993; Gudermuth et al., 1997) แม้ว่าการตกไข่ของแมวส่วนใหญ่จะเกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นโดยการ

ผสมพันธุ์ หรือโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ ทำให้ไม่สามารถคาดการณ์ได้ว่าในภาวะหลังเป็นสัดแล้ว แมวจะอยู่ในระยะ interoestrus หรือ dioestrus ถ้าแมวได้รับยาคุมกำเนิด MPA ในขณะที่อยู่ในระยะ dioestrus ซึ่งอยู่ภายใต้อิทธิพลของ endogenous progesterone อยู่แล้ว ยาคุมกำเนิด MPA จะเสริมฤทธิ์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในร่างกายในการเหนี่ยวนำให้เกิด endometrial hyperplasia และ mammary gland hyperplasia รุนแรงขึ้นไปอีก โดยเฉพาะหลังการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สร้างจากฟอลลิเคิลนำมาก่อนในระยะ oestrus ซึ่งกระตุ้นให้มีการสร้างตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor-PR) มากขึ้น อันนำไปสู่การเกิดถุงน้ำและการหนาตัวของผนังมดลูก (cystic endometrial hyperplasia-CEH) (De Bosschere et al., 2002) และ FMFH (Martin de las Mulas et al., 2000) CEH เป็นความผิดปกติของการงอกขยายและการเสื่อมสลายที่เปลี่ยนแปลงในเนื้อเยื่อผนังมดลูก โดยพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากร่างกายนอกช่องคลอดมีผลในการเพิ่มขนาดและความหนาของผนังมดลูก เป็นสาเหตุให้เกิดการผสมไม่ติด นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดภาวะมดลูกเป็นหนอง (pyometra) อีกด้วย (Dow, 1962)

การเกิด pyometra หรือ CEH ในแมวนั้น เป็นความผิดปกติที่เกิดได้จากการที่แมวมีการตกไข่แต่ไม่ท้อง หรืออยู่ในระยะท้องเทียม (pseudopregnancy) ซ้ำกันหลายๆ รอบการเป็นสัด และเกิดขึ้นได้เป็นปกติในสัตว์ที่มีอายุมาก (Lein and Concannon, 1983) โดยเฉพาะแมวที่มีอายุมากกว่า 5 ปีและแมวที่ไม่ได้รับการผสมพันธุ์ที่มีอายุมากกว่า 3 ปี (Robert, 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานในแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ต่อเนื่องกัน 0-3 ปี (Kim and Kim, 2005) การรักษา CEH หรือ pyometra นั้นทำได้ทั้งโดยการผ่าตัดเอามดลูกและรังไข่ออก และการรักษาทางยา การผ่าตัดเป็นวิธีการที่ดีที่สุดที่จะทำให้ปัญหาสิ้นสุดลง แต่มีข้อจำกัดในเรื่องความเสี่ยงของการวางยาสลบและการผ่าตัด สำหรับการรักษาทางยาใช้ในรายที่ต้องการให้สัตว์มีโอกาสที่จะมีลูกได้ต่อไป การรักษาโดยใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว พบว่าไม่ประสบความสำเร็จนักในผลของการรักษา (Feldman et al., 1996; Davidson, 1995) การรักษาโดยใช้ฮอร์โมน prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) (Lutalyse, Pharmacia & Upjohn) สลายแหล่งสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คือ corpora lutea และทำให้เกิดการบีบตัวของมดลูกเพื่อขับหนองออกหลังการใช้ทำให้สุนัขกลับมาผสมติดได้ร้อยละ 20 (England, 1998) ใช้ได้ในรายที่เป็น pyometra แบบคอมมดลูกเปิดเท่านั้น (open-cervix pyometra) (Boomsma et al., 1982; Davidson et al., 1992) มีผลข้างเคียงคือ ทำให้เกิดการอาเจียน น้ำลายไหล หอบ ปัสสาวะอุจจาระราด หัวใจเต้นเร็ว ท้องเสีย ม่านตาขยาย ซึ่งมักพบทันทีหลังจากได้รับยา โดยบางตัวพบว่ามีอาการช็อค และตายภายหลังจากการให้ยานี้ (Berchtold, 1997) ไม่แนะนำให้ใช้ในรายมดลูกเป็นหนองชนิดคอมมดลูกปิด (closed-cervix pyometra) เพราะจะทำให้เกิดการแตกของมดลูกได้ (Robert, 1994)

ต่อมาได้มีการพัฒนาฮอร์โมน antiprogesterin ได้แก่ mifepristone-RU38486, onapristone-ZK98299 และ aglepristone-RU46534 ซึ่งออกฤทธิ์ในการแย่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการจับกับตัวรับ (progesterone receptor-PR) ทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่สามารถออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อเป้าหมายได้ โดยมีรายงานการนำ aglepristone ไปใช้ในการรักษาสุญ့်ที่เป็น pyometra ผลการรักษาอยู่ในเกณฑ์ดี โดยไม่พบผลข้างเคียง (Gurbulak et al., 2005; Blendinger et al., 1997; Breitkopf et al., 1997; Hoffmann et al., 2000; Fieni et al., 2001^b) และพบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดของสุญ့်ที่เป็น pyometra ลดลงอีกด้วย (Fieni et al., 2001^b) aglepristone ร่วมกับ cloprostenol ใช้ได้ทั้งในสุญ့်ทั้งในราย open-cervix pyometra (Gobello et al., 2003; Fieni et al., 2001^b) และ closed-cervix pyometra (Fieni et al., 2001^b) การใช้ aglepristone ในแนวรายงานการใช้เพื่อทำให้สิ้นสุดการตั้งท้อง (Georgiev and Wehrend, 2006) ใช้รักษาแมวที่มีปัญหา FMFH ซึ่งเป็นการขยายใหญ่ของเต้านมที่พบในแมวอายุมาก และแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ทำให้การขยายใหญ่ของเต้านมกลับเป็นปกติได้ภายใน 1-4 สัปดาห์หลังการรักษา (Gorlinger et al., 2002) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของ aglepristone ต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกแมว

กล่าวโดยสรุป ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทั้งจากที่สร้างในร่างกายโดย corpus luteum และจากยาคุมกำเนิด MPA มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของมดลูก ในขณะที่ aglepristone สามารถลดการหนาตัวของผนังมดลูกสุญ့် และลดการขยายใหญ่ของเต้านมแมวได้ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ aglepristone ต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน ในแมวที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการหนาตัวของมดลูกโดยใช้ยาคุมกำเนิด MPA ซึ่งใช้เป็นที่แพร่หลายในการคุมกำเนิดสุญ့်และแมว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ aglepristone ต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกและการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน ในแมวที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการหนาตัวของมดลูกโดยใช้ยาคุมกำเนิด MPA ซึ่งใช้เป็นที่แพร่หลายในการคุมกำเนิดสุญ့်และแมว

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะของมดลูกในระยะต่างๆ ของวงจรการเป็นสัดในแมว

การเปลี่ยนแปลงของมดลูกแมว มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในแต่ละระยะของวงจรการเป็นสัด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผนังมดลูก (endometrium) ต่อมในผนังมดลูก (endometrial gland) เยื่อบุโพรงมดลูก (luminal epithelium) และ เยื่อบุต่อมในมดลูก (glandular epithelium) แตกต่างกันไป

ระยะแอนเอสโตรัส (anoestrus) และอินเตอเอสโตรัส (interoestrus)

ในระยะ anoestrus และ interoestrus ซึ่งไม่มีการทำงานของรังไข่ มีชั้น endometrium บาง โพรงมดลูก (uterine lumen) กว้าง luminal epithelium เป็นเซลล์มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ทรงเตี้ย (low simple columnar) หรือรูปร่างลูกบาศก์ (cuboid) มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียว (single layer) endometrial gland มีลักษณะสั้น ตรง เส้นผ่านศูนย์กลางของต่อมแคบ มีจำนวนต่อมเพียงเล็กน้อย การเรียงตัวของ endometrial gland เป็น 2-3 ชั้นจากผิวของ endometrium glandular epithelium ประกอบด้วยเซลล์รูปร่างลูกบาศก์ มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียว นิวเคลียสเป็นทรงกลม โดยนิวเคลียสของเซลล์ luminal epithelium มีลักษณะที่แบนราบกว่า glandular epithelium (Dawson and Koster 1944)

ระยะเอสโตรัส (oestrus)

มีการขยายใหญ่ของมดลูกและเส้นผ่านศูนย์กลางปีกมดลูกเพิ่มมากขึ้น เมื่อเทียบกับระยะ interoestrus endometrial gland ยืดยาวขึ้น และมีการคดงอ luminal epithelium มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้า (columnar) มีการจัดเรียงตัวชั้นเดียว endometrial gland บางต่อมขยายใหญ่และแผ่ขยาย glandular epithelium มีรูปร่างสี่เหลี่ยมผืนผ้าทรงสูง นิวเคลียสกลมไม่อยู่ในระดับเดียวกัน แต่สูงต่ำตามการเบียดตัวของเซลล์ เรียกลักษณะนี้ว่าการเรียงตัวเบียดกันในชั้นเดียว (pseudostratified) ลักษณะการเรียงตัวของเซลล์ luminal epithelium และ glandular epithelium พบได้ 3 ลักษณะ คือ การเรียงตัวแบบ single layer pseudostratified และการเรียงตัวเป็นหลายชั้นๆ (hyperplasia) จากการที่มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น (Dawson and Koster 1994)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่สร้างจากคอร์ปัสลูเทียม

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติถูกสร้างจาก corpus luteum มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{21}H_{30}O_2$ มีน้ำหนักโมเลกุล 314.47 กรัม/โมล มีสูตรทางเคมีคือ pregn-4-ene-3,20-dione (รูปที่ 2.1ก และ 2.2ก) เป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่สำคัญในการเตรียม endometrium ให้เหมาะสมสำหรับการฝังตัวของตัวอ่อน และรักษาสภาพการตั้งท้อง ในเลือดฮอร์โมนนี้จะจับกับโปรตีน คือ cortisol binding globulin และ albumin มีเพียงส่วนน้อยที่จะอยู่ในรูปฮอร์โมนอิสระซึ่งจะไปออกฤทธิ์ที่เนื้อเยื่อเป้าหมายได้ ในคนมีค่าครึ่งชีวิตในเลือด 5 นาที (อร่าม, 2532, Arias et al., 2004) มีกลไกการออกฤทธิ์โดย โปรเจสเตอโรนอิสระจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของเนื้อเยื่อเป้าหมายโดยกระบวนการ simple diffusion ภายในเซลล์ โปรเจสเตอโรนจะจับกับตัวรับในไซโตพลาสซึม รวมตัวเป็น progesterone-receptor complex แล้วเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส ชักนำให้เกิดการสังเคราะห์ RNA และการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะมีผลทำให้จำนวนตัวรับของตัวเองลดลง (Friedman et al., 1982) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะออกฤทธิ์ต่ออวัยวะสืบพันธุ์โดย กระตุ้นให้มีการหลั่งสารคัดหลั่งเป็นจำนวนมาก จนกระทั่งมีการฝังตัวในระหว่างวันที่ 18-23 หลังจากนั้นจะมีฤทธิ์ยับยั้งการบีบตัวของมดลูกจนกระทั่งถึงวันที่ 65 หรือวันสุดท้ายของการตั้งท้องในสุนัขและแมว (Fieni et al., 2000) เนื้อเยื่อที่มีความไวในการตอบสนองต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คือ เนื้อเยื่อเต้านมและมดลูก (Loretti et al., 2005) ในคนทำให้เมื่อกบบริเวณปากมดลูกเหนียวขึ้น ทำให้ผนังมดลูกหนาตัว กล้ามเนื้อมดลูกคลายตัว และมีการเจริญของ alveoli ในเต้านม (อร่าม, 2532) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดใช้บ่งบอกการเกิดการตกไข่ในแมวได้ โดยเมื่อมีระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.15 นาโนกรัม/เดซิลิตร แสดงถึงการทำงานของรังไข่ในระยะ follicular phase หรือ interoestrus ระดับโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงกว่า 3 นาโนกรัม/เดซิลิตร แสดงถึงมีการตกไข่เกิดขึ้น และการทำงานของรังไข่อยู่ในระยะ luteal phase (Tsutsui and Stabenfeldt, 1993)

ฮอร์โมนเม็ดดอกซีโปรเจสเตอโรนอะซิเตต (Medroxyprogesterone acetate - MPA)

สำหรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสังเคราะห์ที่ใช้เพื่อการคุมกำเนิด เช่น ยาคุมกำเนิด MPA มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{24}H_{34}O_4$ (รูปที่ 2.1ข) น้ำหนักโมเลกุลคือ 386.25 กรัม/โมล มีสูตรทางเคมีคือ Pregn-4-ene-3,20-dione,17-(acetoxy)-6-methylpregn-4-ene-3,20-dione (6a) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในธรรมชาติมากที่สุด (Lobo, 1987) ออกฤทธิ์ได้ดีทั้งโดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อและการกิน ในรูปแบบยาฉีด คือ Depo-medroxyprogesterone acetate (DMPA) อยู่ในรูปของ "microcrystalline" ทำให้มีการดูดซึมเข้ากระแสเลือดช้าลงและสามารถออกฤทธิ์ในร่างกายได้นานขึ้นเมื่อฉีดเข้ากล้ามเนื้อ อัตราเร็วของการดูดซึมขึ้นอยู่กัขนาด microcrystalline ในตัวยา (Elder, 1984) ในคนเมื่อให้โดยการกิน ยาจะถูก

ดูดซึมจากทางเดินอาหารได้ดี (Lobo, 1987; Victor and Johansson, 1976; Cornette et al., 1971) แต่มีเพียง 20% เท่านั้นที่จะไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมายได้ (Vorys, 1986) ภายหลังจากได้รับทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงขึ้น (Ortiz et al., 1997) เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีฤทธิ์ต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายคือ สร้างสารคัดหลั่งบริเวณ luminal epithelium เพิ่มสารคัดหลั่งจากต่อมสร้างและกระตุ้นการทำงานของต่อมน้ำนม ทำให้กล้ามเนื้อเรียบของมดลูกคลายตัว (Friedman et al., 1982) ในคนทำให้รังไข่มีขนาดเล็กลง ยับยั้งการเจริญของ follicle และ corpus luteum (อร่าม , 2532)

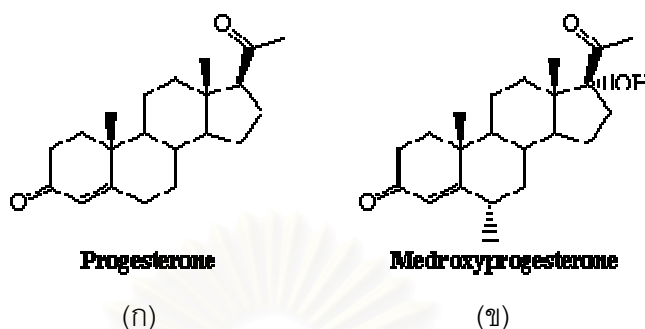
สำหรับยาฉีดคุมกำเนิดที่นิยมใช้ในสุนัขและแมวนั้น เป็นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแบบสังเคราะห์ (Depo-Provera, Pfizer, New York, USA) เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อระบบสืบพันธุ์เช่นเดียวกับในคน คือ มีการหนาตัวของ endometrium การขยายใหญ่ของต่อม และการหลั่งสารคัดหลั่งบริเวณ endometrium (Nelson et al., 1982) ยับยั้งการบีบตัวของกล้ามเนื้อมดลูก กระตุ้นการงอกขยายของเนื้อเยื่อเต้านม (Nelson et al., 1982; Mol et al., 1995^{a,b}, Mol et al., 1996) แนะนำให้ใช้ในขนาด 50-100 มก./ตัว ในสุนัขและแมว โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังทุก 3-6 เดือน

ฮอร์โมน MPA มีผลต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายมากกว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติถึง 45 เท่า (King and Whitehead, 1986) การศึกษาพบว่าการฉีดยาคุมกำเนิด MPA เข้ากล้ามเนื้อเพียงครั้งเดียวทำให้มีฮอร์โมนชนิดนี้อยู่ในเลือดนานถึง 6 เดือน การใช้เกินขนาดหรือในระยะที่ไม่ใช่ระยะ anoestrus ทำให้เกิดการขยายใหญ่ของมดลูกและเต้านมในสุนัขได้ (Concannon and Meyers-Wallen, 1991) และการฉีดยาคุมกำเนิด MPA ในสุนัขเพียงครั้งเดียวในขนาด 10-25 มก./กก. ทำให้ endometrium เกิดการหนาตัวได้ (Loretti et al., 2005)

ในลิง Rhesus เมื่อให้ยาคุมกำเนิด MPA ฉีดในขนาด 10 เท่าของที่ใช้ในคน (150 มก.) เป็นเวลานาน 10 ปี ทำให้เกิดมะเร็งที่เยื่อบุโพรงมดลูกได้ (Richard and Lasagna, 1987) แต่ในคนพบว่ายาคุมกำเนิด MPA ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งรังไข่และเยื่อบุโพรงมดลูก (Gambrell et al., 1983; Vessey, 1984)

ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงทั้ง glandular epithelium และ luminal epithelium จากการศึกษพบว่าหลังจากแมวได้รับยาคุมกำเนิด MPA จะมี endometrial gland ที่มีความยาวมากขึ้นและมีการคดเคี้ยวบิดงอ มีการเพิ่มจำนวนชั้นของ luminal epithelium และ glandular epithelium มีจำนวน endometrial gland หนาแน่น มีการสะสมของสารคัดหลั่งในต่อม และมีการขยายใหญ่ของ endometrial gland นอกจากนี้ชั้นกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก (myometrium) มีความหนาเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับมดลูกในระยะ interoestrus (Chatdarong et al., 2005) ซึ่งการหนาตัวของมดลูก (endometrial hyperplasia) เป็นความผิดปกติที่พบได้ในแมวที่มี

อายุมากกว่า 5 ปี และแมวที่ได้รับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอก (exogenous progesterone) (Dow, 1962; Lawer et al., 1991; Potter et al., 1991)



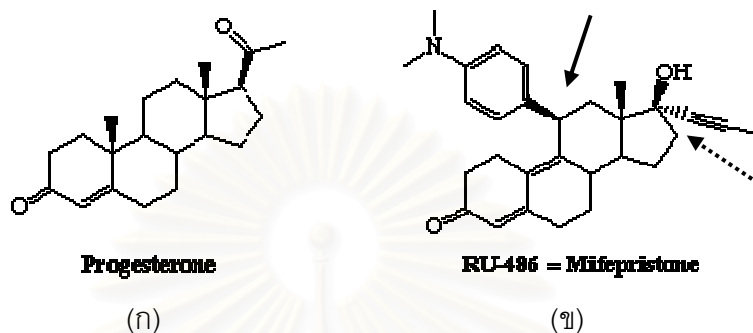
รูปที่ 2.1 ความคล้ายคลึงกันของโครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติที่ผลิตจากร่างกาย (ก) และ เมดดอกซีโปรเจสเตอโรน อะซิเตท (medroxyprogesterone acetate - MPA) ที่ใช้เป็นยาคุมกำเนิดในสุนัขและแมว (ข)

ขนาดของยาคุมกำเนิด MPA ที่ใช้ในแมวที่มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ ขนาด 50 มก./ตัว ทุก 6 เดือน แต่ในบางประเทศใช้การคำนวณตามน้ำหนักตัว อย่างไรก็ตามมีข้อแนะนำให้ใช้ยาในขนาดต่ำที่สุดที่เหมาะสมในแมว คือ ขนาด 20 มก./กก. ทุก 5 เดือน (Romagnoli and Concannon, 2003) ปัจจุบันไม่มีการอนุญาตให้ใช้ยาชนิดนี้ในประเทศสหรัฐอเมริกาและอังกฤษ (Noakes et al., 2001) แต่เป็นที่นิยมในประเทศอื่นๆ ในแถบยุโรป (Romagnoli and Concannon, 2003) มีรายงานการฉีดยาคุมกำเนิด MPA ชนิดฉีดเข้าเส้นเลือดดำในสุนัขในขนาด 1 มก. พบว่ามีค่าครึ่งชีวิต (half-life) นาน 21.6 ชม. (Smith et al., 1993) โดยการเกิดพยาธิสภาพของมดลูกขึ้นอยู่กับขนาดของยาคุมกำเนิด MPA ที่ให้ไป (Romagnoli and Concannon, 2003) แต่ยังไม่มียารายงานค่าครึ่งชีวิตในสุนัขหรือแมวเมื่อใช้ยาคุมกำเนิด MPA ฉีดเข้ากล้ามเนื้อหรือใต้ผิวหนัง

สารยับยั้งตัวรับโปรเจสเตอโรน (Progesterone-receptor blocker หรือ antiprogestin)

คือสเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroid hormone) มีลักษณะพิเศษคือ มีประสิทธิภาพสูงในการแย่งจับกับตัวรับโปรเจสเตอโรน (PR) ตัวรับจะไม่มี การเปลี่ยนแปลงรูปร่างที่นำไปสู่กระบวนการแปรสัณฐาน (transcription) ทำให้ฮอร์โมนตัวที่แย่งจับไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ ความสามารถในการจับกับตัวรับ (binding-affinity) มีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด และขึ้นอยู่กับขนาดที่ใช้ (Hoffmann and Schuler, 2000) ผลิตออกมาหลายรูปแบบที่มีการนำมาใช้ทางคลินิก ได้แก่ ไมฟีพริสโตน (mifepristone-RU38486) โอนาพริสโตน (onapristone-ZK98299) อะกลีพริสโตน (aglepristone-RU46534) และอื่นๆ สารทั้ง 3 ชนิด ออกฤทธิ์ยับยั้งสารที่มีโครงสร้างคล้ายกัน

ตัวอย่างโครงสร้างทางเคมีของ mifepristone ซึ่งเป็นสารที่มีโครงสร้างเป็น aromatic ring มีคาร์บอนตำแหน่งที่ 17 เป็น hydrophobic side chain และคาร์บอนตำแหน่งที่ 11 มีกลุ่ม dimethyl-amino group มีความสามารถสูงในการจับกับตัวรับโปรเจสเตอโรน (high-affinity receptor binding) (รูปที่ 2.2ข) เมื่อจับกับตัวรับ

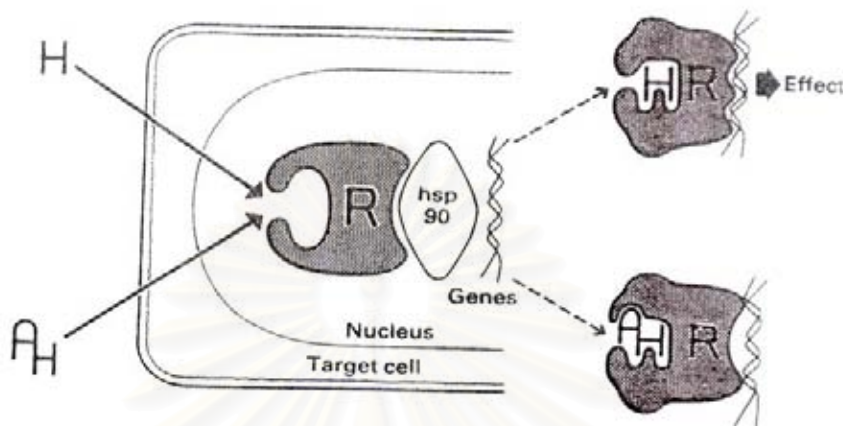


รูปที่ 2.2 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (ก) และ Mifepristone (ข) โครงสร้างหลักเป็น aromatic ring ประกอบด้วย hydrophobic side chain ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 17 (C17) (ลูกศรทึบ) และ dimethyl amino group ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 11 (C11) (ลูกศรประ)

Mifepristone (Molecular formular: $C_{29}H_{35}NO_2$) มีสูตรทางเคมีคือ 11 β -[p-(Dimethylamino)phenyl]-17 β -hydroxy-17-(1-propynyl)estra-4,9-dien-3-one (รูปที่ 2.4ก) มีน้ำหนักโมเลกุล 429.60 กรัม/โมล มีค่าครึ่งชีวิต 18 ชม. สังเคราะห์มาจาก norethindrone โดยมีการเติม phenylic nucleus เข้าที่ตำแหน่ง C11 beta แต่ขาด C(19)-methyl group และ 2-carbon side chain ที่ C(17) และมี conjugated C(9)-C(10) เป็น double bond บริเวณ 1-propynyl chain ที่ตำแหน่ง 17 α -position accounts สำหรับ high binding affinity ต่อ PR (รูปที่ 2.2ข) (Baulieu, 1989) mifepristone เป็น antiprogestin ชนิดแรกที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน รู้จักกันในชื่อของ RU 486 (Philibert et al., 1981)

Mifepristone ออกฤทธิ์ต้านฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยการแย่งจับกับตัวรับที่เซลล์เป้าหมาย PR ภายในนิวเคลียสของเซลล์ โดยแบ่งเป็น 2 subunits คือ R และ hsp 90 ตามปกติเมื่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจับกับ receptor จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยกระตุ้น R subunit แล้วปล่อย hsp 90 ออกไป หลังจากนั้น R subunit ที่ถูกกระตุ้นแล้วจะกระตุ้น specific genes อีกต่อหนึ่งให้เกิดการทำงาน แต่สำหรับ mifepristone นั้นจะสามารถจับกับ R subunit และทำให้เกิดการปล่อย hsp 90 ออกไปได้ แต่จะไม่กระตุ้น R subunit ให้ทำงาน (รูปที่ 2.3) ดังนั้น mifepristone จึงสามารถยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนได้ การออกฤทธิ์ของ mifepristone จะมากหรือน้อยขึ้นกับปัจจัย 2 ประการ คือ ความสามารถในการจับ (affinity) และปริมาณของสาร

mifepristone ที่จะแย่งจับกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Garfield and Baulieu 1987) จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าในคน mifepristone มีความสามารถในการจับกับ PR ได้ดีกว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 5 ถึงเท่า (วิชิต และอร่าม, 2532)



รูปที่ 2.3 แสดงการจับของฮอร์โมน และสารต้านฮอร์โมน ในนิวเคลียสของเซลล์ ทำให้ยีนมีการสร้างกรดอะมิโนเพื่อออกฤทธิ์ได้ ในขณะที่สารต้านฮอร์โมน (AH) เมื่อจับกับตัวรับในนิวเคลียส จะไม่สามารถทำให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนต่อไปได้

ในคนมีการศึกษาถึง pharmacodynamic ของ mifepristone พบว่าหลังจากกินยาในขนาด 4 มก./กก. ครั้งเดียว ระดับของ mifepristone ในเลือดจะสูงสุดประมาณ 90 นาที่ ระยะเวลาครึ่งชีวิตของยานี้ประมาณ 53.7 ± 6.9 ชม. เมื่อให้ยานี้ในหญิงตั้งครรภ์ระยะแรกพบระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงขึ้น (Yang et al., 1998) เช่นเดียวกับในหนูเมื่อที่ให้ยาเป็นเวลานาน 3 เดือน (Zhu et al., 2005) แต่มีบางรายงานพบระดับฮอร์โมนลดต่ำลงภายหลังให้ในสตรี (Spitz and Bartin, 1993) Mifepristone จะจับกับ PR ที่ endometrium ได้ดี มีรายงานการให้ในสตรีในขนาด 2 มก. และ 5 มก. เป็นเวลา 120 วัน พบ PR ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในวันที่ 60 หลังการให้ยา (Narvekar et al., 2004) และจะยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ในสตรีทำให้ endometrium เกิดการลอกหลุด (Schaison et al., 1985; Healy et al., 1983; Hodgen 1985; Koering et al., 1985; Herrmann et al., 1982) ยับยั้งการขยายของเยื่อบุมดลูก (Cameron et al., 1996) สำหรับผลต่อการตกไข่ในสตรีนั้น พบว่า การให้ mifepristone ในขนาด 2 มก./วัน อย่างต่อเนื่อง (Croxatto et al., 1993) หรือ 10 มก. สัปดาห์ละครั้ง (Gemzell et al., 1997) จะเกิดการยับยั้งการตกไข่ได้ การให้ในขนาดต่ำเป็นเวลา 120 วัน ทำให้ยับยั้งการตกไข่ได้ โดยได้ผล 90% เมื่อให้ในขนาด 2 มก. และ 95% เมื่อให้ในขนาด 5 มก. (Brown et al., 2002) และการให้ในขนาด 2 มก. เป็นเวลา 120 วัน หรือ 5 มก. เป็นเวลา 60 วัน ได้ผลมากกว่า 90% (Baird et al., 2003)

ในสตรีที่มีการศึกษาการใช้ mifepristone ในระยะต่างๆ ของการตั้งครรภ์ สำหรับการทำให้การตั้งครรภ์สิ้นสุดลง ให้ผลดีที่สุดในระยะตั้งครรภ์ไม่เกิน 49 วัน (Spitz et al., 1998) การให้ในไตรมาสแรกของการตั้งครรภ์ (1-12 สัปดาห์) ตอบสนองได้ 80% (Couzinet et al., 1986) มีการใช้ mifepristone ในขนาดต่างๆ กัน และระยะเวลาที่ต่างกัน พบว่า การใช้ยาในขนาด 400 มก./วัน ติดต่อกัน 2 วัน มีอัตราการแท้ง 85% (Couzinet et al., 1986) ใช้ยาในขนาด 200 มก./วัน ติดต่อกัน 4 วัน มีอัตราการแท้ง 73% (Herrmann et al., 1982) ใช้ยาในขนาด 100 มก./วัน ติดต่อกัน 7 วัน อัตราการแท้งคือ 73% (Mishell et al., 1987) ใช้ยาในขนาด 50 หรือ 100 มก./วัน ติดต่อกัน 7 วัน อัตราการแท้งไม่แตกต่างกันคือ 61% (Bigerson and Odland, 1987) ใช้ยาในขนาด 50 มก./วัน ติดต่อกัน 7 วัน อัตราการแท้งคือ 50% (Mishell et al., 1987)

ต่อมาได้มีการพัฒนาการใช้ antiprogesterin ร่วมกับยาชนิดอื่นๆ เพื่อให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยพบว่าในสตรีที่มีการใช้ mifepristone ร่วมกับ prostaglandin ต่างชนิดและในขนาดต่างๆ กันในการตั้งครรภ์ไตรมาสแรก พบอัตราการแท้งที่แตกต่างกัน คือ การใช้ mifepristone 50 มก./วัน ติดต่อกัน 2 วัน และ sulprostone 0.25 มก. อัตราการแท้งคือ 96% (Bygdeman and Swahn, 1985) การใช้ mifepristone 50 มก./วัน ติดต่อกัน 2 วัน ร่วมกับ gemeprost 1.0 มก. อัตราการแท้งคือ 96% (Cameron et al., 1986) การใช้ mifepristone 600 มก.ครั้งเดียว และ gemeprost 1.0 มก. อัตราการแท้งคือ 100% (Dubois et al., 1988) ซึ่งพบว่าการแท้งได้มากกว่าการใช้ยาเพียงอย่างเดียวอย่างหนึ่ง และมีอาการแทรกซ้อนน้อยกว่าการใช้ prostaglandin เพียงอย่างเดียว โดย mifepristone ร่วมด้วย จะลดขนาดของ prostaglandin ที่ใช้ลงได้ถึง 5 เท่า (Cameron et al., 1988)

ผลของการใช้ mifepristone ต่อการแท้งในไตรมาสที่ 2 (อายุครรภ์ 13-27 สัปดาห์) ไม่ดีนัก โดย mifepristone ทำให้เกิดการแท้งเพียง 2 ใน 8 ราย แต่ถ้าใช้ร่วมกับ prostaglandin ทำให้อัตราการแท้งสูงขึ้น (Cabrol et al., 1985) และการใช้ยาทั้ง 2 ชนิดร่วมกัน จะเกิดการแท้งได้เร็วกว่าในกรณีที่ใช้เพียงอย่างเดียว และระดับของยา prostaglandin ที่ใช้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อใช้ร่วมกับ mifepristone (Urquhart and Templeton, 1987) โดยการใช้ mifepristone ร่วมกับ prostaglandin สังเคราะห์ต่างชนิดกัน ได้แก่ sulprostone (Bahzad et al., 1989) และ misoprostal (Spitz et al., 1998) พบว่ามีประสิทธิภาพในการทำให้การตั้งครรภ์สิ้นสุดลง 88 และ 92% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าการใช้ mifepristone ร่วมกับ prostaglandin มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ mifepristone เพียงอย่างเดียว

ส่วนผลของการแท้งในระยะท้าย (อายุครรภ์ 28 ถึงสิ้นสุดการตั้งครรภ์) mifepristone จะมีผลต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อมดลูก โดยการชักนำให้เกิด gap junction ระหว่างเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกซึ่งจำเป็นสำหรับการหดตัวของมดลูกระหว่างการตั้งครรภ์ (Garfield and Baulieu, 1987)

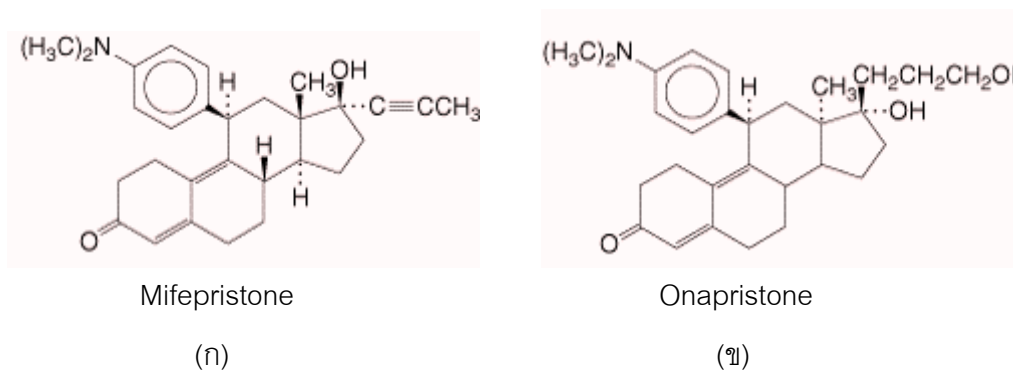
การศึกษาการใช้ mifepristone ในคนหลังได้รับยาคุมกำเนิด DMPA ครั้งแรก พบว่ามีการงอกขยาย (proliferation) ของชั้น endometrium มากขึ้น แต่จะมีการลดลงของกระบวนการ apoptosis ของ stromal epithelium ในระยะเวลา 1 สัปดาห์ต่อมา (Jain et al., 2006) และได้มีการศึกษาพบว่า mifepristone ยังสามารถใช้คุมกำเนิดในคนได้เมื่อให้ในขนาด 1 มก./วัน ติดต่อกันนาน 150 วัน โดยยืดระยะเวลาของการมีประจำเดือนให้นานออกไป และไม่รบกวนการทำงานของรังไข่ แต่มีผลทำให้ endometrium หนาตัวขึ้น และมีการขยายขนาดของต่อมมดลูกได้ (Croxatto et al., 1998)

การศึกษาผลของ mifepristone ต่อเซลล์มะเร็งเต้านมพบว่า สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ในกรณีที่มีเซลล์นั้นมี PR (Bardon et al., 1985) และทำการทดลองในสตรีที่เป็นมะเร็งระยะท้ายโดยการให้ mifepristone 200 มก. เป็นเวลา 1-3 เดือน พบว่ามี remission 22% โดยไม่มีผลข้างเคียงของยา (Romieu et al., 1987)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ mifepristone ในคนร่วมกับยาชนิดอื่น เช่น antioestrogen (tamoxifen) พบการลดลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดอย่างไม่มีนัยสำคัญ mifepristone จะยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยแย่งจับกับ PR ในนิวเคลียสทั้งของ glandular epithelium และ stromal epithelium ใน endometrium ของสตรี (Mäentausta et al., 1993)

มีการศึกษาการใช้ mifepristone ในสัตว์หลายๆ ชนิดในการใช้เพื่อสิ้นสุดการตั้งท้องพบว่าในสุนัขให้ผลเช่นเดียวกับในคน โดยจะได้ประสิทธิภาพดีถ้าใช้ในรายตั้งท้อง 30 วันขึ้นไป (Concannon et al., 1990; Linde-Forsberg et al., 1992) ในขนาดแนะนำคือ 2.5 มก./กก. วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 4-5 วัน การตั้งท้องจะสิ้นสุดลงภายใน 3-4 วัน หลังจากการรักษา (Fieni et al., 2001^{a,c})

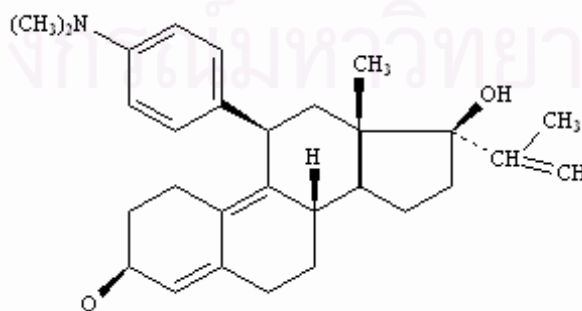
Onapristone เป็น antiprogestin อีกชนิดหนึ่ง เรียกอีกอย่างหนึ่งว่า ZK-98299 มีสูตรทางเคมี คือ 11β -(4-methylaminophenyl)- 17α -hydroxy- 17β -(3-hydropropinyl)- 13α -methyl-4,9-gonadiene-3-one (รูป 2.4ข) แต่ไม่นิยมเท่า mifepristone เพราะมีประสิทธิภาพน้อยกว่า mifepristone และพบว่าภายหลังได้รับยานี้ในคนที่ป่วยด้วยมะเร็งเต้านมส่งผลข้างเคียงต่อดับ (Klijin et al., 2000; Cameron et al., 2003; Croxatto et al., 1994) การใช้ onapristone ในขนาดต่ำ 5 มก./คน มีฤทธิ์เป็นยาคุมกำเนิดที่ไม่รบกวนการมีประจำเดือนและการตกไข่ (Katkam et al., 1995) แต่เมื่อใช้ในขณะตั้งครรภ์อาจทำให้เกิดการขยายใหญ่ของคอมดลูกได้ (Imada et al., 2002)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของ Mifepristone (น) และ Onapristone (ข)

นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาการใช้ antiprogesterin ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมชนิดอื่น ๆ ด้วย เช่น การศึกษาในลิง rhesus พบว่าการให้ antiprogesterin (ZK137316, Schering, Argentina) ในขนาดต่ำ (0.03 มก./กก) จะลดการงอกขยายของชั้น endometrium โดยไม่พบผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายภายหลังจากการใช้เป็นประจำทุกวันเป็นเวลา 5 เดือน (Borman et al., 2003)

สำหรับ antiprogesterin ที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในสัตว์ คือ aglepristone เป็นสเตียรอยด์สังเคราะห์ชนิดหนึ่ง ที่มีการใช้ในประเทศฝรั่งเศส นอร์เวย์ และสวีเดน (Fieni et al., 2001^a) aglepristone มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า RU 46534 หรือ RU 534 (11 β ,17 β ,Z)-[4-(Dimethylamino) phenyl]-17-hydroxy-17-(1-propenyl)-estro-4,9 dien-3-one) มีสูตรโมเลกุลคือ $C_{29}H_{37}NO_2$ (รูปที่ 2.5) นำมาใช้ครั้งแรกในสุนัขในปี ค.ศ. 1988 โดยแย่งจับกับ PR ทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ (รูปที่ 2.6) มีความสามารถสูงในการจับกับ PR ในเนื้อเยื่อมดลูก ใช้ป้องกันการตั้งท้องโดยยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนหลังได้รับการผสมพันธุ์ ใช้เหนี่ยวนำการแท้งในสุนัขท้องในระยะต่างๆ (Fieni et al., 2001^{c,d}) ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ endometrium ทำให้เยื่อมดลูกของสุนัขเจริญช้าลง และลดสารคัดหลั่งในมดลูก รักษาปัญหาที่เกิดจากการขยายใหญ่ของมดลูกและเต้านม และอื่นๆ อันมีผลมาจากฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Philibert et al.,1982)



รูปที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของ aglepristone



รูปที่ 2.6 การทำงานของ aglepristone ในการแย่งจับกับตัวรับโปรเจสเตอโรน

การใช้ aglepristone เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้ง

มีการนำ aglepristone ไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้งทั้งในสุนัขและแมว โดยทดลองให้ยาในระยะเวลาต่างๆ ของการตั้งท้อง การเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้งในสุนัขโดยฉีด aglepristone 2 ครั้ง 10 มก./กก. วันละครั้ง ห่างกัน 24 ชม. การให้ในสุนัขที่ตั้งท้องต่ำกว่า 28 วัน มีประสิทธิภาพในการป้องกันการตั้งท้อง 98.8% ผลข้างเคียงเล็กน้อยที่พบได้คือ อาการคันบริเวณที่ฉีด พบเมื่อกจากช่องคลอด และความอยากอาหารลดลง (Hubler and Arnold, 2000) การให้ aglepristone 2 ครั้งห่างกัน 9 ชม. ในวันที่ 58 ของการตั้งท้อง พบการขับออกของลูกตัวแรกภายใน 32-56 ชม. หลังจากการให้ยาเข็มแรก สุนัขมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงใกล้เคียงกับสุนัขที่ตั้งท้อง แต่มีผลข้างเคียงคือ มีการหนาตัวของ subdermis และเป็นเนื้อตายเฉพาะที่บนผิวหนังที่ฉีด (Baan et al., 2005) การทดลองให้ในการตั้งท้องระยะกลาง (ประมาณ 30 วัน) พบสุนัขทุกตัวมีการขับออกของตัวอ่อนภายใน 3-7 วัน หลังจากการฉีดครั้งแรก มีเมือกสีน้ำตาลจากช่องคลอดที่สังเกตได้ใน 24 ชม. ก่อนที่จะมีการขับออกของตัวอ่อน (Galac et al., 2000; Fieni et al., 2000) การให้ aglepristone 3 ครั้ง/สัปดาห์ พบการแท้งได้ใน 4-6 วัน หลังจากเริ่มให้ยาครั้งแรก พบผลข้างเคียงคือ มีเมือกออกจากช่องคลอดเพียงเล็กน้อยในสัปดาห์แรก (Trasch et al., 2003)

การให้ aglepristone ขนาดแนะนำในสุนัขที่ตั้งท้องระยะกลางและท้าย (วันที่ 22-45) ได้ผลสำเร็จ 95.7% โดยไม่มีผลข้างเคียงของการใช้ยาและไม่พบการติดเชื้อของทางเดินระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งไม่มีผลต่อการทำงานของตับ ไต และไขสันหลัง แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติในการป้องกันการตั้งท้องได้ดีกว่าฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งใช้ได้เพียงในระหว่าง 0-3 วัน หลังผสมพันธุ์ และดีกว่าการใช้ prostaglandin (PGF_{2α}) ซึ่งมีผลกับการตั้งท้องระหว่าง 30-45 วันเท่านั้น (Fieni et al., 2001^{a,c})

นอกจากนั้นยังมีการศึกษาถึงประสิทธิภาพของ aglepristone ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้งในแมวที่ตั้งท้องระยะแรก สามารถเหนี่ยวนำการแท้งได้ ในวันที่ 25-26 หลังการผสมพันธุ์ โดย

การให้ aglepristone 10 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. พบว่าเกิดการแท้ง 87% และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดไม่แตกต่างจากแมวที่ไม่ได้รับยา (Georgiev and Wehrend, 2006) การให้ในแมวตั้งท้องระยะกลาง (33.3±4.2 วัน) ขนาด 15 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. พบว่าเกิดการแท้ง 50% และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน 60 ชม. หลังการให้ยา (Fieni et al., 2007)

การใช้ aglepristone เพื่อเหนี่ยวนำการคลอด

มีการใช้ aglepristone เพื่อเหนี่ยวนำการคลอดในสุนัขที่ตั้งท้อง 58 วัน โดยการฉีดขนาด 15 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 9 ชม. พบว่ามีการคลอดเกิดขึ้นในช่วง 32-56 ชม. หลังจากฉีดเข็มแรก ใช้เวลาสั้นกว่าการคลอดตามธรรมชาติ อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และยังไม่พบภาวะแทรกซ้อนที่รุนแรง น้ำหนักเฉลี่ยแรกเกิด ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการคลอดตามธรรมชาติ (Baan et al., 2005) นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้ยา aglepristone ร่วมกับยาชนิดอื่น ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ มีรายงานการใช้ aglepristone ในขนาด 15 มก./กก. ในสุนัขที่มีการตั้งท้อง 58 วัน ร่วมกับ prostaglandins (PGF_{2α}) ชนิด alfaprostol ในกลุ่มแรก และ oxytocin ในกลุ่มที่ 2 พบว่า สุนัขกลุ่มที่ 2 มีเวลาการขับออกของตัวอ่อนสั้นกว่ากลุ่มแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีจำนวนลูกแรกคลอดที่รอดชีวิต ในอัตรา 86% และ 93% ตามลำดับ แต่หลังคลอดไป 48 ชม. พบว่าอัตราการรอดเหลือเพียง 68% และ 86% ตามลำดับ แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของการใช้ aglepristone ร่วมกับยาชนิดอื่นๆ ขึ้นกับชนิดของยาที่นำมาใช้ร่วมด้วย (Fieni et al., 2001^d)

การใช้ aglepristone รักษาภาวะมดลูกเป็นหนอง (pyometra)

Aglepristone มีประสิทธิภาพดีในการรักษาการหนาตัวของเยื่อบุมดลูกแบบมีถุงน้ำ (CEH-cystic endometrial hyperplasia) และ pyometra การเกิด pyometra ในสุนัขมักเริ่มต้นใน ระยะ dioestrus ซึ่งมีระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 1.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร หรือ 3.179 นาโนโมล/ลิตร การให้ aglepristone ในสุนัขในขนาด 10 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. พบว่าโพรงมดลูกที่ขยายขนาดในระยะ dioestrus มีขนาดเล็กลงภายใน 7 วัน โดยไม่พบเมือกจากช่องคลอดเป็นผลข้างเคียง (Hoffmann et al., 2000)

ในสุนัขที่เป็น pyometra พบว่าการให้ aglepristone ได้ผิวหนัง ในขนาด 10 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. หรือครั้งที่ 3 ในวันที่ 7 สุนัข 48 ตัว ใน 52 ตัว (92.8%) หายจาก pyometra ภายใน 3 สัปดาห์แรก มีเพียง 4 ตัว (9.8%) กลับมาเป็น pyometra อีกครั้งภายในระยะเวลา 3 เดือน และ 7 ตัว เกิด pyometra ขึ้นมาอีกภายหลัง 3 เดือนไปแล้ว พบสุนัข 3 ตัว มีถุงน้ำรังไข่ (ovarian cyst) และภาวะถุงน้ำและเยื่อบุมดลูกหนาตัว (CEH-cystic endometrial hyperplasia) (Trasch et al.,

2003) หรือการให้ aglepristone ในขนาด 5-6 มก./กก. ฉีดเข้าใต้ผิวหนังในวันแรก และขนาด 3 มก./กก. ในวันที่ 2 3 4 8 และ 16 ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะตลอด 16 วัน พบว่าสุนัขทุกตัวมีอาการกลับเป็นปกติได้ภายใน 8 วัน โดยไม่พบผลข้างเคียงจากการใช้ยา และ 2 ใน 5 สามารถที่จะผสมพันธุ์และให้ลูกที่แข็งแรงได้ (Breitkopf et al., 1997)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ aglepristone ในการรักษาการอักเสบของมดลูก (metritis) มดลูกเป็นหนองชนิดคอมดลูกเปิด (open-cervix pyometra) และ มดลูกเป็นหนองชนิดคอมดลูกปิด (closed-cervix pyometra) ได้มีการทดลองในสุนัข 34 ตัว โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม จากการตรวจโดยใช้อัลตราซาวด์ กลุ่มที่ 1 สุนัขที่เป็น metritis มีเมือกออกจากช่องคลอด แต่ไม่มีการขยายใหญ่ของโพรงมดลูก กลุ่มที่ 2 สุนัขที่เป็น open-cervix pyometra มีเมือกออกจากช่องคลอดและมีการขยายใหญ่ของโพรงในมดลูก และในกลุ่มที่ 3 สุนัขที่เป็น closed-cervix pyometra ไม่พบเมือกจากช่องคลอด มีการขยายใหญ่ของโพรงมดลูก โดยกลุ่มแรกให้ aglepristone ในขนาด 10 มก./กก. เข้าใต้ผิวหนัง เท่านั้น กลุ่มที่ 2 และ 3 ให้ aglepristone ขนาดเดียวกันเพียงชนิดเดียว หรือร่วมกับ clopostenol ทำการตรวจสอบเมือกบริเวณช่องคลอด และการขยายใหญ่ของโพรงมดลูก พบว่าในราย closed-cervix pyometra มีการเปิดของคอมดลูกหลังจากที่ได้รับ aglepristone 2 ครั้ง ภายใน 26 ± 13 ชม. ประสิทธิภาพของการรักษาระหว่างการให้ aglepristone เพียงอย่างเดียว และการให้ aglepristone ร่วมกับ clopostenol ให้ผลการรักษาในวันที่ 14 ที่ระดับ 15.8% และ 37.5% ในวันที่ 28 ที่ระดับ 47.4% และ 49.2% ในวันที่ 90 ที่ระดับ 63.3% และ 87.5% และพบว่าการใช้ clopostenol ร่วมกับ aglepristone เปรียบเทียบการหายจากโรคระหว่าง closed และ open-cervix pyometra นั้น ในวันที่ 14 พบ 50% และ 20% ในวันที่ 28 พบ 70% และ 80% และในวันที่ 90 พบ 86% และ 96% ตามลำดับ (Fieni et al., 2001^b) ภายหลังจากการศึกษารักษาชนิดนี้ร่วมกับ clopostenol เฉพาะในสุนัขที่เป็น open-cervix pyometra โดยการให้ aglepristone และ clopostenol ในขนาดเดียวกัน แต่ระยะเวลาต่างกัน พบว่าสุนัขทั้งสองกลุ่มให้ผลการรักษาเหมือนกันคือ ไม่พบโพรงในมดลูกและไม่มีเมือกจากช่องคลอดเลย เมื่อทำการตรวจสอบโดยการอัลตราซาวด์ ภายหลังจากการรักษา 15 วัน แต่พบสารคัดหลั่งจากช่องคลอดเพิ่มขึ้นหลังเริ่มรักษา 24-48 ชม. จากนั้นค่อยๆ ลดลง จนไม่พบของเหลวในโพรงมดลูก เส้นผ่านศูนย์กลางมดลูกลดลงทั้งสองกลุ่ม อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าสุนัขจำนวนร้อยละ 20 มีการกลับเป็น pyometra อีกในวรอบการเป็นสัปดาห์ต่อไป (Gobello et al., 2003)

สำหรับแมวยังไม่พบการใช้ aglepristone เพื่อรักษา pyometra หรือ CEH โดยก่อนหน้านี้ไม่มีรายงานผลของ aglepristone ที่ส่งผลต่อมดลูก (Wedhrend et al., 2001; Meisl et al. 2003) นอกจากรายงานล่าสุดที่สามารถทำให้เกิดการแท้งในการตั้งท้องระยะต่างๆ ได้ ตามที่กล่าวข้างต้นเท่านั้น

การใช้ aglepristone รักษาการขยายใหญ่ของเต้านม (mammary gland tumor)

มีการใช้ aglepristone เพื่อรักษาการขยายใหญ่ของเต้านม อันเป็นผลมาจากฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คือ เนื้องอกของเต้านมชนิดไฟโบรอะดรีโนมา (FMFH) ที่เกิดจากการใช้ยาคุมกำเนิด MPA หรือ proligestone (Covinan, Intervet, Cambridge, UK) โดยให้ในแมวที่มีประวัติการใช้ยาคุมกำเนิด MPA แมวกลุ่มแรกได้รับยา aglepristone ในขนาด 10 มก./กก./วัน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. จากนั้นฉีดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง และกลุ่มที่สอง ให้ในขนาด 20 มก./กก. สัปดาห์ละ 1 ครั้ง รักษาต่อเนื่องจนกระทั่งเต้านมมีขนาดเล็กลงอย่างสมบูรณ์ ผลของการรักษาไม่แตกต่างกันระหว่างสองกลุ่ม คือ สามารถลดการขยายใหญ่ของเต้านมจนกลับสู่สภาพปกติภายใน 1-4 สัปดาห์ (Gorlinger et al., 2002) หรือให้ขนาด 10 มก./กก. ในวันที่ 1 2 7 14 และ 21 ฉีดเข้าได้ผิวหนังในแมวที่ได้รับ proligestone มา 4 สัปดาห์ พบว่าเต้านมกลับมีขนาดปกติภายใน 6 สัปดาห์ (Vitásek and Dendisová, 2006) ในขณะที่มีรายงานการใช้ในขนาดเดียวกัน ให้ในวันที่ 1 2 และ 7 ในแมวที่ได้รับ MPA มา 2 สัปดาห์ พบว่าภายหลังให้ aglepristone เต้านมกลับมีขนาดปกติภายใน 21 วัน (Seyrek-Intas et al., 2004) ส่วนการให้ในแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA มา 1 สัปดาห์ หรือ proligestone มา 2 สัปดาห์ โดยให้ห่างกัน 24 ชม. สามารถลดการขยายใหญ่ของเต้านม และทำให้เต้านมกลับเข้าสู่สภาวะปกติได้ในเวลา 5-11 สัปดาห์ (Meisl et al., 2003)

การใช้ aglepristone และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการใช้ยา aglepristone และระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดนั้น มีการทดลองพบว่า aglepristone สามารถลดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในสุนัขที่เป็น pyometra ได้ (Blendinger et al., 1997) แต่บางการทดลองพบว่าหลังจากฉีด aglepristone ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในช่วงวันที่ 1 2 4 และ 8 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง สุนัขทุกตัวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดการแท้งยังคงมีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในระดับสูง อย่างไรก็ตาม ภายใน 8-34 วัน (เฉลี่ย 19 ± 4 วัน) หลังการรักษา ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะลดลงอยู่ในระดับต่ำกว่า 1 นาโนกรัม/เดซิลิตร (3.179 นาโนโมล/ลิตร) (Galac et al., 2000) เช่นเดียวกับกับการให้ aglepristone ในช่วงต้นของระยะ luteal phase ในสุนัขที่ไม่ตั้งท้องโดยให้กินวันละครั้งต่อเนื่องกัน 2 วันในขนาด 10 มก./กก. พบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดก่อนและหลังการรักษาไม่แตกต่างกัน การให้ยา aglepristone ในช่วงต้นของระยะลูทีล (luteal phase) พบระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่าเฉลี่ยก่อนการรักษาในระดับ 106 ± 13 นาโนโมล/ลิตร ในระหว่างการรักษา 124 ± 13 นาโนโมล/ลิตร และภายหลังการรักษา 130 ± 16 นาโนโมล/ลิตร อย่างไรก็ตาม ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูงขึ้น 64 นาโนโมล/ลิตร ประมาณวันที่ 28 ± 2 ของการรักษา

นอกจากนี้ยังพบว่าระยะ anoestrus ในสุนัขสั้นลงภายหลังจากการรักษาด้วย aglepristone (Galac et al., 2004) รวมทั้งมีรายงานความไม่แตกต่างของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแมวที่ท้อง 25-26 วัน ภายหลังจากได้รับ aglepristone (Georgiev et al., 2006) แต่มีการทดลองที่ให้ผลขัดแย้งกันโดยพบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีระดับสูงขึ้น ภายหลังจากการให้ aglepristone ในสุนัขตั้งท้อง (Fieni et al., 2001³)

ตัวรับโปรเจสเตอโรน (progesterone receptor-PR)

Progesterone receptor หรือ PR ซึ่งเป็น steroid receptor ชนิดหนึ่ง ในคนมีการนำวิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) เพื่อตรวจหาการแสดงออกของ PR ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้กันเป็นประจำในห้องปฏิบัติการของคน โดยใช้มดลูกของแมวและเนื้อเยื่อเต้านมในคนเป็นตัวควบคุมชนิดบวก (positive control) และเนื้อเยื่อของหัวใจปอด ม้าม ของคนเป็นตัวควบคุมชนิดลบ (negative control) (Martin de las Mulas et al., 2002) PR มีประโยชน์ในการใช้ทำนายการตอบสนองต่อการรักษามะเร็งเต้านมในระยะรุนแรง (Clark and McGuire, 1983) หรือเพื่อศึกษาพยาธิกำเนิดและพยากรณ์โรคที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งเต้านม (breast carcinoma) (Martin et al., 1984) นอกจากนี้เนื้อเยื่อเต้านมแล้ว ยังพบ PR ได้ในเซลล์ endometrium และใน endometrial gland ชั้นลึกในมดลูกสุนัข แต่ไม่พบใน endometrial gland ชั้นผิว และในเซลล์ค้ำจุน (stromal cell) (Dhaliwal et al., 1997)

สำหรับในสัตว์ ได้นำการตรวจการแสดงออกของ PR มาใช้ในรายที่เป็นเนื้อเยื่อเต้านมระยะเริ่มต้นในสุนัข (Sartin et al., 1992) และในแมว (Pérez-Alenza et al., 2004) พบว่าในแมวที่เป็น FMFH พบ PR ได้ใน epithelial cell และใน stromal cell ของเต้านม (Martin de las Mulas et al., 2000) โดยพบว่าการตรวจหา PR ในเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านมของแมวโดยวิธีแช่ชิ้นเนื้อในฟอร์มาลิน (formalin-fixed) ฝังชิ้นเนื้อในพาราฟิน (paraffin wax-embedded) มีความจำเพาะ (specificity: true negative) และความไว (sensitivity: true positive) ของการทดสอบคือ 89.4% และ 87.5% ตามลำดับ ซึ่งได้ผลดีกว่าวิธี radiolabeled ligand dextran coated charcoal หรือ DCC ในชิ้นเนื้อตัวอย่างแมวตัวเดียวกัน (Martin de las Mulas et al., 2002) มีการติดสีมากที่สุด ใน stromal cell ของเนื้อเยื่อมะเร็งเต้านม (Hamilton et al., 1976; Johnston et al., 1984) ในสุนัขมีรายงานการตรวจหาการแสดงออกของ PR ในเนื้อเยื่อเต้านม โดยใช้ clone 10A9 เป็น monoclonal antibody และใช้มดลูกสุนัขในระยะ oestrus เป็นตัวควบคุมบวก ในการวินิจฉัยแยกเต้านมปกติและเต้านมที่เป็นเนื้อเยื่อ พบว่า PR จะพบมากในชั้นเยื่อบุผิวของเนื้อเยื่อของต่อม (glandular tissue) ที่อยู่ในระยะงอกขยาย (proliferative phase) และพบเซลล์ที่ให้ผลบวกเพียง

เล็กน้อยในเนื้อเยื่ออื่นๆ ของเต้านม โดยไม่พบการติดสีของ PR ในบริเวณเซลล์ stroma และ myoepithelium (Lantingavan Leeuwen et al., 2000)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษา PR ในมดลูกสุนัขที่เป็น pyometra และสุนัขปกติในระยะ dioestrus และ anoestrus พบ PR ในส่วนของ stromal cell ของสุนัขที่เป็น pyometra มากกว่ามดลูกสุนัขปกติ โดยกลุ่มสุนัขที่เป็น pyometra พบการติดสีเด่นชัดในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ติดสีปานกลางในกล้ามเนื้อมดลูก (myometrium) ติดสีจางๆ หรือไม่ติดสีเลยบริเวณ glandular epithelium และไม่ติดสีเลยบริเวณ luminal epithelium สำหรับสุนัขปกติในระยะ dioestrus ไม่พบการติดสีเลยบริเวณ glandular epithelium และ myometrium ติดสีเพียงจางๆ หรือไม่ติดสีเลยบริเวณ luminal epithelium และพบการติดสีเพียงจางๆ บริเวณ เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และสุนัขปกติในระยะ anestrus มีการติดสีเข้มในบริเวณ luminal epithelium ติดสีเพียงจางๆ บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ติดสีเพียงจางๆ หรือไม่ติดสีเลยบริเวณ myometrium และไม่พบการติดสีเลยบริเวณ glandular epithelium (ก้องเกียรติ และคณะ, 2005)

ในแมว มีรายงานการตรวจการแสดงออกของ PR ในมดลูกภายหลังที่ได้รับฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนเป็นเวลานาน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ PR ในนิวเคลียส (P nuclear receptor: PnR) (Verhage and Jaffe, 1986) และเมื่อให้โปรเจสเทอโรนเข้าเส้นเลือด พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ PR ในนิวเคลียส เช่นเดียวกัน (Verhage et al., 1983) การทดลองให้ฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนโดยการฝังได้ผิวหนัง (silastic implant) ของแมว และให้มีการปล่อยตัวยาในกระแสเลือดขนาดต่ำ คือ 30 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในระยะ dioestrus นาน 14-21 วัน ทำให้ PR มีจำนวนลดลง ขณะที่การกระจายตัวของ PR มีอยู่ในชั้นเฉพาะบริเวณ stromal fibroblasts จึงเชื่อว่าฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนทำงานผ่าน PR ที่อยู่ในชั้น stromal fibroblasts และสร้างปัจจัยบางชนิดไปทำให้เกิดการขยายใหญ่ของมดลูก ทั้งการหนาตัวของผนังเยื่อและ的增加จำนวนและขยายใหญ่ของต่อม (Li et al., 1992)

ในสัตว์ชนิดอื่นๆ พบว่า มีการศึกษามดลูกสุกรในระยะเป็นสัด พบ PR ในระดับสูง บริเวณเซลล์เนื้อเยื่อค้ำจุน (stromal cell) (Sukjumlong et al., 2006)

ความสัมพันธ์ของการให้ aglepristone และการแสดงออกของ PR ได้มีรายงานในแมวที่เป็น feline fibroadenomatous hyperplasia ภายหลังที่ทำการรักษาด้วย aglepristone แล้วทำการตรวจจสอบ PR พบว่าค่าเฉลี่ยของ PR ก่อนและหลังทำการรักษา 72.8% และ 80.4% ให้ผลแตกต่างที่ไม่ชัดเจนนัก แสดงให้เห็นว่าการรักษาด้วย aglepristone ในระยะเวลาที่นานขึ้นเป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาต่อไป จนกว่าผลจากฮอร์โมนโปรเจสเทอโรนที่ได้รับจากภายนอก (exogenous progesterone) จะหมดฤทธิ์ไป (Wehrend et al., 2001) การจับกันอย่างจำเพาะของฮอร์โมนโปรเจสเทอโรน และ PR ในมดลูกได้ใช้ศึกษาในสัตว์หลายชนิด ดังเช่นการศึกษาในสัตว์ตระกูล

primate พบว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและ antiprogesterin ที่สังเคราะห์ขึ้นชนิดใหม่ J912 มีความจำเพาะที่คล้ายกับ RU 38486 (mifepristone) และ ZK 98299 (onapristone) และมีประสิทธิภาพดีในการเข้าแทนที่ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากตำแหน่ง receptor (Verhage et al., 1983) เนื่องจาก aglepristone เป็น antiprogesterin ที่ทำงานผ่าน PR การศึกษาการแสดงออกของ PR ในมดลูกแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ซึ่งมีฤทธิ์มากกว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในร่างกาย (endogenous progesterone) หลายเท่า นั่น จึงเป็นที่น่าสนใจซึ่งยังไม่เคยมีข้อมูลมาก่อน

ดัชนีการงอกขยาย (proliferative cell nuclear antigen-PCNA)

นอกจากการตรวจ PR และการตรวจทางพยาธิวิทยาเพื่อใช้ในการประเมินการเปลี่ยนแปลงของมดลูกแล้ว การตรวจดัชนีการงอกขยาย (proliferative index) เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถบ่งบอกการเปลี่ยนแปลงในระยะเริ่มต้นได้ antigen ที่เกี่ยวกับการงอกขยายของเซลล์ (proliferative cell nuclear antigen : PCNA) เป็นโปรตีนในนิวเคลียสที่มีความเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็น auxillary protein ของ DNA polymerase- δ (Bravo et al, 1987; Löhner et al., 1997) ช่วยในการสังเคราะห์และซ่อมแซม DNA โดยมีการสังเคราะห์ แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการงอกขยายของเซลล์ (PCNA) เพิ่มมากขึ้นในระยะ S phase ซึ่งเซลล์อยู่ในช่วงที่มีการแบ่งตัวและเพิ่มจำนวน แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการงอกขยายของเซลล์ (PCNA) นี้ตรวจพบได้โดยอาศัยการย้อม immunohistochemical ด้วยแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการงอกขยายของเซลล์แอนติเจนที่เกี่ยวข้องกับการงอกขยายของเซลล์

มีรายงานการใช้ PCNA เป็นตัวตรวจสอบในมดลูกของหนู (Lai et al., 2000) และในมดลูกของแมว (Chatdarong et al., 2005) มีการศึกษาการตรวจสอบการงอกขยายของมดลูกหนูในวัยเจริญพันธุ์ (mature rats) ภายหลังจากการใช้ antiestrogen: Clomiphene Citrate โดย PCNA ถูกนำไปใช้ในการประเมินอัตราการงอกขยายใน luminal and glandular epithelium และในเนื้อเยื่อค้ำจุนของเยื่อบุมดลูก (endometrial stroma) โดยใน luminal and glandular epithelium การงอกขยายพบมากในระยะ prooestrus และน้อยที่สุดในระยะ oestrus (Canpolat et al.,1999) และมีรายงานว่าแสดงออกของ PCNA ในมดลูกหนูเพิ่มขึ้นในระยะ dioestrus ถึง prooestrus และไม่สามารถตรวจหาได้ในระยะ oestrus (Lai et al., 2000)

นอกจากนี้ PCNA ยังนำมาใช้ประโยชน์ในคนโดยใช้ในการวินิจฉัยการหนาตัวของมดลูก (endometrial hyperplasia) และการเกิดมะเร็ง adenocarcinoma ของมดลูกในสตรีด้วย PCNA ที่ให้ผลบวกสามารถพบได้ใน ต่อมและเนื้อเยื่อค้ำจุน (glands and stroma) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของดัชนีการงอกขยาย (PCNA index) ที่ตรวจในเยื่อบุมดลูกที่มีการหนาตัวขึ้น (hyperplasia) และมดลูกที่เป็น adenocarcinoma (Ito et al.,1993) ในสตรีค่า PCNA index ของ

glandular epithelium สูงขึ้นในระยะ follicular phase และลดลงในระยะ luteal phase (Moyer and Felix, 1998)

การประเมินการเปลี่ยนแปลงของมดลูกหลังฉีดยาคุมกำเนิด MPA และ antiprogesterin นั้น สามารถทำได้โดยวิธีทางพยาธิวิทยา ทั้งทางทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา ช่วยแยกมดลูกแมวในระยะต่างๆ ของการเป็นสัดกับมดลูกแมวที่มีพยาธิสภาพ รวมทั้งมดลูกแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ได้ นอกจากนี้การตรวจเยื่อบุมดลูกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวัดความหนาของชั้นต่างๆ ของมดลูก ได้แก่ ชั้นเยื่อบุมดลูก (endometrium) กล้ามเนื้อมดลูก (myometrium) ความสูงของเซลล์ในชั้นเยื่อผนังโพรงมดลูก (luminal epithelium) และเยื่อผนังต่อมมดลูก (glandular epithelium) พบว่ามีความแตกต่างกันของมดลูกแมวที่อยู่ในระยะต่างๆ มดลูกแมวที่มีพยาธิสภาพ และมดลูกแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA และเนื่องจากยาคุมกำเนิด MPA มีฤทธิ์ในการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนต่อมในมดลูก รวมทั้งสารถัดหลังจากต่อม จึงใช้การประเมินระดับการเพิ่มจำนวน การขยายใหญ่ของต่อม และสารถัดหลังเป็นตัวบ่งชี้ระยะต่างๆ ของมดลูกภายใต้การทำงานของฮอร์โมนเพศ คือ เอสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรนได้ด้วย (West et al., 1976; West et al., 1977; Chatdarong et al., 2005)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

แมวเพศเมียที่มีเจ้าของ มีสุขภาพแข็งแรง จำนวน 18 ตัว อายุ 7-18 เดือน (10.3 ± 2.7) ผ่านการเป็นสัดมาแล้วอย่างน้อย 1 ครั้ง ไม่เคยมีลูก และไม่เคยได้รับยาคุมกำเนิดมาก่อน น้ำหนัก 2.2-4.1 กก. (2.8 ± 0.4) เลี้ยงแมวในกรงเดี่ยวขนาด $50 \times 70 \times 50$ ซม. (กว้าง×ยาว×สูง) เพื่อกักโรคและดูอาการ เป็นเวลา 14 วัน แล้วจึงฉีดวัคซีนป้องกันโรคพิษสุนัขบ้า (Rabisin, Merial, France) ใช้หัดและหวัดแมว (Leucoliferin, Merial, France) ถ่ายพยาธิภายในและกำจัดพยาธิภายนอก แล้วจึงนำแมวเข้าสู่กรงทดลอง ซึ่งเป็นกรงขนาด $2 \times 3 \times 2$ ม. โดยเลี้ยงแมวกรงละ 2-3 ตัว ให้แสงสว่างจากธรรมชาติ และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (Science diet, Hill's Pet Nutrition Inc., Topeka, USA) วันละครั้ง ให้น้ำกินตลอดเวลา วางกระบะทรายเพื่อรองรับสิ่งขับถ่าย

2. แผนการทดลอง

แบ่งกลุ่มแมวทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : กลุ่มควบคุม

ทำการผ่าตัดทำหมันโดยเอามดลูกและรังไข่ออก (ovariohysterectomy-OVH) เก็บตัวอย่างมดลูกแมวเมื่ออยู่ในระยะ interoestrus

กลุ่มที่ 2 : กลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA

ฉีดฮอร์โมนคุมกำเนิด MPA (Depo-gestin, A.N.B.Laboratory, Bangkok, Thailand) 50 มก. เข้ากล้ามเนื้อแมวที่อยู่ในระยะ interoestrus หลังจากนั้น 20 วัน ทำการผ่าตัด OVH เก็บตัวอย่างมดลูก

กลุ่มที่ 3 : กลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA และ aglepristone

ฉีดฮอร์โมนคุมกำเนิด MPA ขนาด 50 มก. เข้ากล้ามเนื้อแมวที่อยู่ในระยะ interoestrus หลังจากนั้น 20 วัน ฉีดฮอร์โมน aglepristone (Alizine, Virbac, Carros Cedex, France) ขนาด 10 มก./กก. เข้าใต้ผิวหนัง 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. เก็บตัวอย่างมดลูกในวันที่ 14 หลังฉีด aglepristone เข็มสุดท้าย

3. การตรวจหาระยะ interoestrus

แมวที่ใช้ในการทดลอง ได้รับการยืนยันระยะ interoestrus ของวงจรการเป็นสัด โดยทำการสังเกตพฤติกรรมวันละ 1 ครั้ง ไม่พบอาการร้อง กิ่งไปมา โกงหลังหรือย่ำเท้า เมื่อไม่พบอาการ

เป็นสัด ยืนยันโดยตรวจเซลล์เยื่อของคลอด โดยใช้ไม้พันสำลีขนาดเล็กป้ายเซลล์บนสไลด์ แล้วย้อมสี Modified Wright's Giemsa Staining (Dip Quick, Clinag Co., Ltd. Bangkok, Thailand) พบเซลล์เยื่อหลายๆ ชนิด ได้แก่ parabasal cells intermediate cells cornified cells มีเศษเซลล์และ mucous บนพื้นสไลด์ ซึ่งไม่ใช่ลักษณะเฉพาะของเยื่อของคลอดของแมวในระยะเป็นสัด เจาะเลือดตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด พบมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่ำกว่า 5 นาโนโมล/ลิตร (1.57 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

4. การตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด

เก็บเลือดแมว นำมาปั่นแยกซีรัม นำมาตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมในการวิเคราะห์เพื่อยืนยันระยะ interoestrus โดยเจาะเลือดแมวทุกตัวก่อนทำการทดลอง ทำการตรวจด้วยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) (Architect, Abbott laboratories, USA)

5. การเก็บตัวอย่างมดลูก

วางยาสลบแมวโดยใช้ atropine sulphate (Atropine, A.N.B. Laboratory, Bangkok, Thailand) ขนาด 0.04 มก./กก. xylazine hydrochloride (Rompun, Bayer, Seoul, Korea) ขนาด 3 มก./กก. และ ketamine hydrochloride (Keta-hameln, Astrapin Pharma GmbH&Co.th, Hameln, Germany) ขนาด 10 มก./กก. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ผ่าตัดทำหมัน OVH เก็บตัวอย่างมดลูกและรังไข่ ตรวจลักษณะโครงสร้างต่างๆ บนรังไข่ที่พบเพื่อยืนยันระยะ interoestrus

6. การตรวจลักษณะทางมหกายวิภาคของมดลูก (Macroscopic examination)

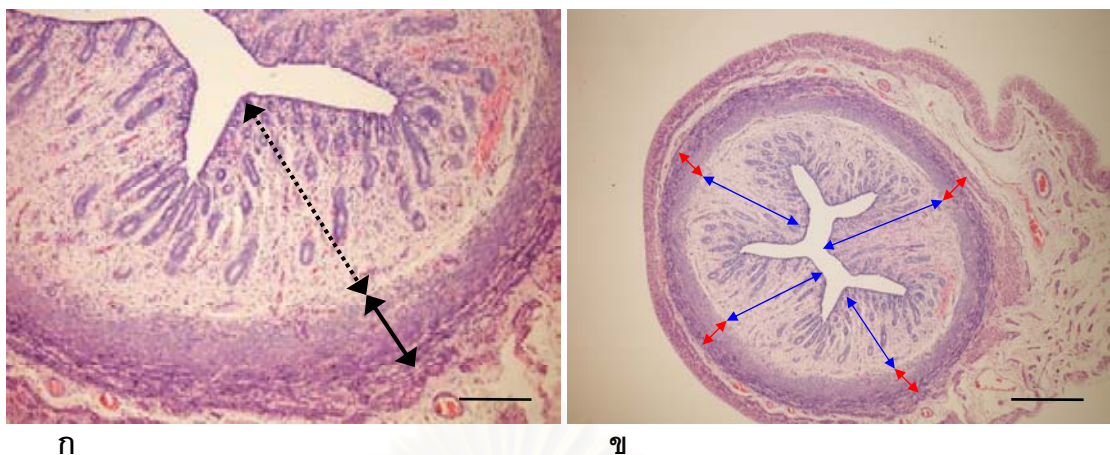
ใช้กรรไกรตัดเลาะเยื่อเกี่ยวพันและเส้นเลือดที่อยู่ด้านข้างมดลูกออกทั้งหมด ซึ่งน้ำหนักมดลูกแมวแต่ละตัวโดยใช้เครื่องชั่ง (BP300S, Sartorius, New York, USA) คำนวมน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูกจากน้ำหนักมดลูกหารด้วยน้ำหนักตัวของแมว และ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของปีกมดลูกแต่ละข้าง ที่บริเวณ 3 ตำแหน่ง คือ ปลายบนปีกมดลูก กึ่งกลางปีกมดลูก และก่อนถึงส่วนแยกของปีกมดลูก (bifurcation) บันทึกเป็นค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

7. การตรวจลักษณะทางจุลกายวิภาคของมดลูก (Microscopic examination)

เก็บตัวอย่างมดลูกโดยตัดปีกมดลูกอีกข้างตามขวาง (cross-section) ให้มีความยาว 1 ซม. ที่ 3 ตำแหน่งเดียวกับที่วัดปีกมดลูก ตรึงสภาพในสารละลาย 4% paraformaldehyde เป็น

เวลา 36 ชม. นำไปผ่านกระบวนการทางฮิสโตเทคนิค ซึ่งเริ่มจากดิ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้ แอลกอฮอล์ 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ นำไปจุ่มผ่านไซลีนและฝังเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน หลังจากนั้นตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาขนาด 5 ไมครอน ตำแหน่งละ 3 ชิ้น วางลงบนแผ่นสไลด์ ชิ้นที่ 1 นำไปย้อมด้วยสี Mayer's haematoxylin (British Drug House, Leicestershire, UK) 10 นาที differentiate ชิ้นเนื้อในน้ำยา 0.25% HCl แล้วล้างด้วยน้ำประปานครึ่ง 5 นาที นำมาย้อมด้วยสี eosin (British Drug House, Leicestershire, UK) นาน 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที จากนั้นผ่านขั้นตอนเติมน้ำเข้าดิ่งน้ำออกจากชิ้นเนื้ออย่างรวดเร็ว โดยแช่ในแอลกอฮอล์จาก 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ ปิดทับชิ้นเนื้อที่ย้อมสีแล้วด้วยแผ่นปิดสไลด์ นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง

แบ่งชิ้นต่างๆ ของผนังมดลูกที่จะทำการตรวจออกเป็น ชิ้นเยื่อบุมดลูก (endometrium) และกล้ามเนื้อมดลูก (myometrium) หาค่าเฉลี่ยความหนาของชิ้นต่างๆ ของผนังมดลูกโดยการวัดชิ้นต่างๆ จากบริเวณ 4 ตำแหน่ง (รูปที่ 3.1) ในแต่ละชิ้นเนื้อ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง หาค่าเฉลี่ย และหาสัดส่วน endometrium/myometrium ratio (E/M ratio) บันทึกรูปร่างของเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ของ luminal และ glandular epithelium บันทึกระดับการหนาตัวชิ้นเยื่อบุผิว (Degree of luminal epithelial proliferation) และเยื่อบุต่อมมดลูก (Degree of glandular epithelial proliferation) โดยกำหนดให้การจัดเรียงตัวของเยื่อบุผิว 1 ชั้น 2 ชั้น 3 ชั้น และมากกว่า 3 ชั้น เท่ากับระดับ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ บันทึกระดับการขยายใหญ่ของต่อม (Degree of glandular proliferation) โดยกำหนดให้การจัดเรียงตัวของเยื่อบุผิว 1 ชั้น 2 ชั้น 3 ชั้น และมากกว่า 3 ชั้น เท่ากับระดับ +1, +2, +3 และ +4 ตามลำดับ บันทึกระดับการขยายใหญ่ของต่อม (Degree of glandular dilatation) เปรียบเทียบกับมดลูกของแมวในกลุ่มควบคุม โดยกำหนดให้ขนาดของต่อมมดลูกแมวในกลุ่มควบคุมมีระดับเป็น +1 และต่อมที่มีขนาด 1-2 เท่า, 3-4 เท่า และมากกว่า 4 เท่า เป็นระดับ +2, +3 และ +4 ตามลำดับ บันทึกความมากน้อยของสิ่งคัดหลั่งในต่อมมดลูก (Degree of glandular secretion) เปรียบเทียบกับมดลูกของแมวในกลุ่มควบคุม โดยพบมีสารคัดหลั่งเพียงเล็กน้อย ในมดลูกกลุ่มควบคุม ให้เป็นระดับ +1 และพบสารคัดหลั่ง 1-2 เท่า, 3-4 เท่า และ มากกว่า 4 เท่า ให้เป็นระดับ +2, +3 และ +4 ตามลำดับ บันทึกความมากน้อยของการคั่งของเลือดคั่ง และเลือดออกในมดลูก (Degree of subepithelial congestion and hemorrhage) โดยลักษณะที่ไม่มีมีการคั่งของเลือดและการไหลออกของเลือดบริเวณหลอดเลือดในมดลูก หรือมีเพียงเล็กน้อย ในมดลูกกลุ่มควบคุม ให้เป็นระดับ +1 ที่มีเป็น 1-2 เท่า, 3-4 เท่า และมากกว่า 4 เท่า ให้เป็นระดับ +2, +3 และ +4 ตามลำดับ



รูปที่ 3.1 แสดงการวัดเพื่อหาสัดส่วน endometrium/ myometrium ratio (E/M ratio)
 ก. วัดจากส่วนที่ยื่นกว้างที่สุดของ endometrium (ลูกศรประ) และ วัดส่วนของ myometrium (ลูกศรทึบ) ที่ตำแหน่งเดียวกัน (bar = 100 μ m)
 ข. แสดงตำแหน่งที่วัด 4 ตำแหน่ง (bar = 250 μ m)

8. การตรวจทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry)

8.1 การหาค่าดัชนีการงอกขยายของเซลล์ภายในชั้นต่างๆ ของผนังมดลูก (proliferative cell nuclear antigen-PCNA index)

ทำการย้อมชิ้นเนื้อโดยอิมมูโนฮิสโตเคมีแบบ Avidin-biotin peroxidase complex : ABC (Simoes et al., 1994; Chatdarong et al., 2005) นำตัวอย่างมาละลายพาราฟินออกจากชิ้นเนื้อโดยแช่ในไซลีนและจุ่มในแอลกอฮอล์ 100 95 80 และ 70% ล้างด้วยน้ำ ทำการเผยแพร่แอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยวิธี ให้ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ 121°C ความดัน 15 บาร์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 5 นาที ในสารละลาย Tris-EDTA buffer (pH 8.0) ยับยั้งปฏิกิริยาจาก endogenous peroxidase ด้วยสารละลาย 3% H₂O₂ ใน methanol (W/W) นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บ่มอบชิ้นเนื้อด้วย 1% bovine serum albumin ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยากับ monoclonal mouse anti-PCNA antibody ความเข้มข้น 1:200 (Dako, Glostrup, Denmark) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 12-14 ชม. ทำปฏิกิริยากับ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody ความเข้มข้น 1:400 (Dako, Glostrup, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาทำปฏิกิริยาจับตัว (conjugation) ด้วยสารละลาย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดสีโดยใช้ DAB:3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride ใน Tris-HCl 0.01 M 0.05% (DAB, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 นาที ย้อมทับด้วยสี Mayer's haematoxylin ทำการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ

อย่างรวดเร็วโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 80 95 และ 100% ตามลำดับ แล้วปิดทับด้วยแผ่นสไลด์ นับเซลล์ที่ย้อมติดสีน้ำตาลในนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ดัชนีการงอกขยาย (PCNA index) คือจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลในนิวเคลียสจากการนับเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ โดยนับที่กำลังขยาย $\times 40$ จำนวน 5 บริเวณโดยการสุ่ม บริเวณละ 100 เซลล์ โดยเปรียบเทียบกับแผ่นสไลด์ควบคุมบวก (positive control) ของเนื้ออกเต้านมสุนัข ทำการหาค่าดัชนีการงอกขยาย (PCNA index) ในชั้นต่างๆ คือเยื่อบุโพรงมดลูก (luminal epithelium) และเยื่อบุต่อมมดลูก (glandular epithelium)

8.2 การตรวจหาการแสดงออกของ PR

นำตัวอย่างมาละลายพาราฟินโดยการแช่ในไซลีน 5 นาที 2-3 ครั้ง แล้วนำมาแช่ในแอลกอฮอล์ 100 95 80 และ 70% ตามลำดับ ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการเผยแพร่แอนติเจน (antigen retrieval) ด้วยวิธีไมโครเวฟในสารละลาย citric acid buffer (pH 6.0) ระดับความร้อนที่ 750 วัตต์ ครั้งละ 2-5 นาที จำนวน 5 ครั้ง เติมสารละลาย citric acid buffer ทุกครั้งเพื่อให้ท่วมแผ่นสไลด์ ทำการยับยั้งปฏิกิริยาจาก endogenous peroxidase ด้วยสารละลาย 3% H_2O_2 ใน methanol (W/W) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง บ่มอบชิ้นเนื้อใน bovine serum albumin 3 % ใน phosphate buffer saline (PBS) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับตัวรับโปรเจสโตโรนความเข้มข้น 1:100 (PR clone 10A9, Immunotech, Marseille, France) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชม. นำไปทำปฏิกิริยาต่อกับ biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (ความเข้มข้น 1:400) (Dako, Glostrup, Denmark) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำมาทำปฏิกิริยาจับตัว (conjugation) ด้วย avidin-biotin peroxidase solution (ABC kit, Dako, Denmark) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำให้เกิดสีโดยใช้ DAB:3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride ในสารละลาย Tris-HCl 0.01 M 0.05% (DAB, Sigma-Aldrich, St.Louis, USA) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 3-5 นาที ย้อมทับด้วยสี Mayer's haematoxylin แล้วนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นับจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวก (ติดสีน้ำตาล) โดยนับเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ต่อหนึ่งบริเวณ หาค่าเฉลี่ยของจำนวนร้อยละของเซลล์ที่ให้ผลบวกในสี่บริเวณของชิ้นเนื้อ ในชั้นต่างๆ ของผนังมดลูก คือ luminal epithelium และ glandular epithelium ที่กำลังขยาย $\times 400$ เปรียบเทียบกับเนื้อเยื่อควบคุมบวก (positive control) คือมดลูกของแมวที่เป็นสัตว์ ให้คะแนนตัวรับโปรเจสโตโรน (PR score) ใช้สูตรคำนวณ $P1+(2 \times P2)+(3 \times P3)$ โดย P1, P2 และ P3 เป็นร้อยละจำนวนเซลล์ที่มีระดับความเข้มของการติดสีต่ำ ปานกลาง และมาก ตามลำดับ (Snead et al., 1993)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ค่าตัวแปรต่างๆ แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ได้แก่ น้ำหนักมดลูก น้ำหนักสัมพัทธ์ เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนาของชั้น endometrium ความหนาของชั้น myometrium สัดส่วนความหนาของชั้น endometrium ต่อชั้น myometrium การงอกขยาย (PCNA) และตัวรับโปรเจสเทอโรน (PR) หาความแตกต่างของตัวแปรต่างๆ ในมดลูกแต่ละกลุ่ม โดยใช้ ANOVA ด้วยวิธี GLM (SAS version 9.0, SAS Institute Inc., Cary, NC) ทดสอบการกระจายปกติของข้อมูลโดยใช้วิธี UNIVARIATE (NORMAL) เปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ระหว่างแมวแต่ละกลุ่ม โดยใช้ t-test

ตรวจระดับการหนาตัวของชั้น luminal และ glandular epithelium ความหนาแน่น และการขยายของ endometrial gland สารคัดหลั่งใน endometrial gland รวมทั้งการคั่งเลือดและเลือดออกในมดลูก หาความแตกต่างของตัวแปรต่างๆ ในมดลูกแต่ละกลุ่ม โดยใช้ Wilcoxon Scores (Rank Sums) ด้วยวิธีเปรียบเทียบตัวแปรต่างๆ ระหว่างแมวแต่ละกลุ่ม โดยใช้ Kruskal-Wallis Test

บทที่ 4

ผลการศึกษา

ก่อนการจัดแมวเข้ากลุ่มทดลอง แมวทุกตัว (n=16) อยู่ในระยะ interoestrus ยืนยันได้จากค่าฮอร์โมนอยู่ในระดับต่ำกว่า 5 นาโนโมล/ลิตร (1.57 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โดยผลของโปรเจสเทอโรนในเลือดแมวทุกตัวอยู่ที่ค่าเฉลี่ย 1.0 ± 0.6 นาโนโมล/ลิตร

ลักษณะทางพยาธิวิทยา

1. ลักษณะทางมหพยาธิวิทยา

มดลูกแมวในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีน้ำหนักมดลูก น้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูก และเส้นผ่านศูนย์กลางปีกมดลูก มากกว่าแมวในกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยไม่พบพยาธิเมอร์ต่างๆ ดังกล่าวระหว่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 น้ำหนัก น้ำหนักสัมพัทธ์ และเส้นผ่านศูนย์กลาง ของมดลูกแมวทั้ง 2 ข้างในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) (n=6) กลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 2) (n=6) และได้รับยา aglepristone หลังได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 3) (n=6) (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

แมว	น้ำหนักมดลูก (กรัม)	น้ำหนักสัมพัทธ์	เส้นผ่านศูนย์กลาง (เซนติเมตร)
กลุ่มที่ 1	0.9 ± 0.2^a	0.3 ± 0.1^a	0.3 ± 0.04^a
กลุ่มที่ 2	3.5 ± 1.7^b	1.3 ± 0.6^b	0.7 ± 0.2^b
กลุ่มที่ 3	3.2 ± 1.6^b	1.1 ± 0.6^b	0.6 ± 0.1^b

a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

2. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา

ความหนาของชั้น endometrium ของแมวกลุ่มที่ 1 2 และ 3 ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ในขณะที่ความหนาของชั้น myometrium และ E/M ratio ของแมวในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีค่ามากกว่าแมวกลุ่มที่ 1 ($P < 0.05$) โดยความหนาของชั้น myometrium และ E/M ratio ของแมวกลุ่มที่ 2 และ 3 ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ความหนาของชั้น endometrium, myometrium และสัดส่วนความหนาของชั้น endometrium ต่อชั้น myometrium (E/M ratio) ของมดลูกแมวกุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) (n=6) กลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 2) (n=6) และกลุ่มที่ได้รับยา aglepristone หลังได้รับคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 3) (n=6) (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

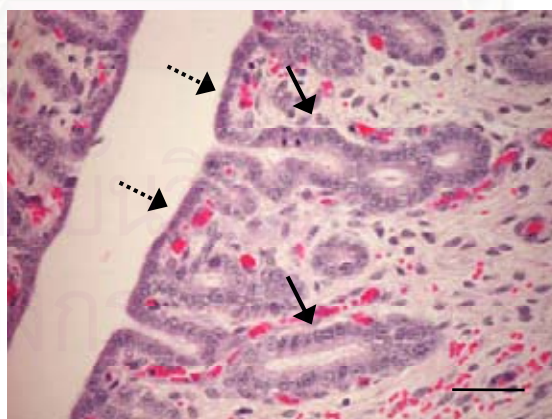
แมวกุ่ม	ความหนาของชั้น endometrium (ไมโครเมตร)	ความหนาของชั้น myometrium (ไมโครเมตร)	สัดส่วนความหนาของชั้น endometrium ต่อชั้น myometrium (E/M ratio)
กลุ่มที่ 1	208.9±40.3 ^a	129.0±3.2 ^a	1.7±0.3 ^a
กลุ่มที่ 2	325.8±139.6 ^a	360.2±141.2 ^b	1.0±0.3 ^b
กลุ่มที่ 3	331.4±98.8 ^a	341.4±141.2 ^b	1.1±0.4 ^b

a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

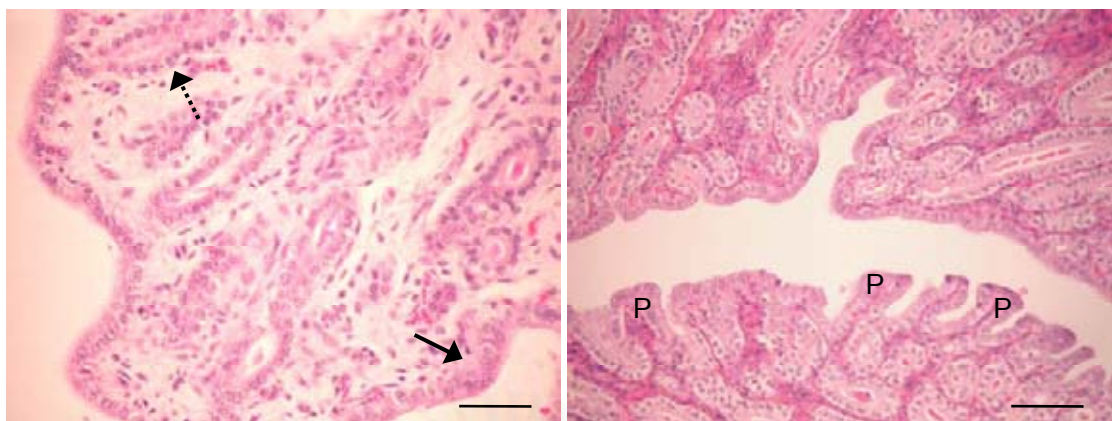
แมวกุ่มในกลุ่มควบคุมทุกตัว (กลุ่มที่ 1) มีรูปร่างของเซลล์ในชั้น luminal และ glandular epithelium เรียงตัวชั้นเดียว (single layer) (รูปที่ 4.1) ผนังมดลูกแมวกุ่มบางตัวในกลุ่มที่ 2 มีเซลล์ชั้น luminal epithelium เป็น cuboidal (3/6) และในบางตัวที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็น columnar (3/6) ในขณะที่เซลล์ในชั้น glandular epithelium เปลี่ยนเป็น high columnar (6/6) การจัดเรียงเซลล์ในชั้น luminal epithelium เป็น pseudostratified ชั้นเดียว (2/6) (รูป 4.2 ก) โดยบางตัวพบการงอกยื่นของชั้น luminal epithelium (polyps) ร่วมด้วย (4/6) (รูป 4.2 ข) ในขณะที่ glandular epithelium มีการเรียงตัวเป็น single layer (4/6) และ pseudostratified (2/6) ภายใน glandular epithelium เปลี่ยนแปลงเป็น columnar (3/6) และ high columnar (3/6) มีการจัดเรียงของเซลล์ในชั้น luminal epithelium เป็น single layer (3/6) pseudostratified ร่วมกับ polyps (2/6) hyperplasia ร่วมกับ polyps (1/6) ในขณะที่ glandular epithelium มีการเรียงตัวเป็น single layer (3/6) และ pseudostratified (3/6) (ตารางที่ 4.3) พบการอักเสบของมดลูกโดยพบเม็ดเลือดขาวและแบคทีเรียในโพรงมดลูกแมวกุ่ม 1 ตัว ในกลุ่มที่ 3 หลังได้รับ aglepristone (รูปที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 รูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงตัวของ luminal epithelium และ glandular epithelium ในผนังมดลูกแมวกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) (n=6) กลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 2) (n=6) และกลุ่มที่ได้รับ aglepristone หลังได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 3) (n=6)

แมว	Luminal epithelium		Glandular epithelium	
	รูปร่างเซลล์ (Morphology)	การจัดเรียงตัว (Cell arrangement)	รูปร่างเซลล์ (Morphology)	การจัดเรียงตัว (Cell arrangement)
กลุ่มที่ 1	Cuboid (6/6)	Single layer (6/6)	Cuboid (5/6) Columnar (1/6)	Single layer (6/6)
กลุ่มที่ 2	Cuboid (3/6) Columnar (3/6)	Pseudostratified (2/6) Pseudortratified and Polyps (4/6)	High columnar (6/6)	Single layer (4/6) Pseudostratified (2/6)
กลุ่มที่ 3	Columnar (6/6)	Single layer (3/6) Pseudostratified and Polyps (2/6) Hyperplasia and Polyps (1/6)	Columnar (3/6) High columnar (3/6)	Single layer (3/6) Pseudostratified (3/6)

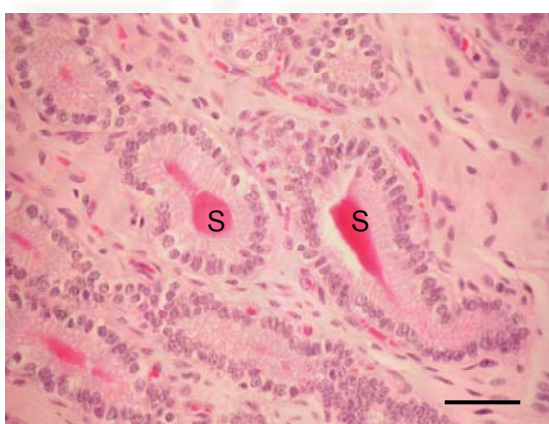


รูปที่ 4.1 รูปร่างเซลล์ luminal epithelium (ลูกศรประ) และ glandular epithelium (ลูกศรทึบ) เป็น cuboid และมีการจัดเรียงตัวแบบ single layer ของผนังมดลูกแมวในกลุ่มควบคุมที่อยู่ในระยะ interoestrus (H&E staining) (bar = 25 μ m)



ก

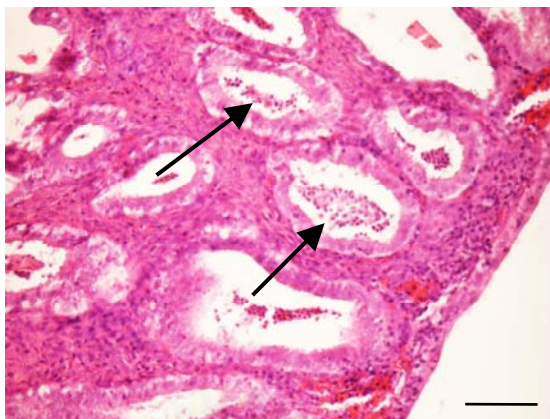
ข



ค

รูปที่ 4.2 แสดงการจัดเรียงตัวและรูปร่างเซลล์ luminal epithelium และ glandular epithelium ที่พบได้ในมดลูกแมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA, H&E staining

- ก luminal epithelium มีลักษณะเซลล์เยื่อบุรูปร่าง high columnar และการจัดเรียงแบบ pseudostratified (ลูกศรประ) glandular epithelium มีลักษณะเซลล์เยื่อบุรูปร่าง high columnar และการจัดเรียงแบบ single layer (ลูกศรทึบ), H&E staining (bar = 25 μ m)
- ข การจัดเรียงตัวแบบงอกยื่น (polyps) ของเซลล์ luminal epithelium (P), H&E staining (bar = 50 μ m)
- ค สารคัดหลั่ง (secretion) ใน glandular epithelium (S), H&E staining (bar = 25 μ m)



รูปที่ 4.3 ผนังมดลูกแมวดัวหนึ่งในกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับ aglepristone หลังจากยาคุมกำเนิด MPA แสดงกลุ่มแบคทีเรียและเม็ดเลือดขาวที่พบภายใน endometrial gland (ลูกศร), H&E staining (bar = 25 μ m)

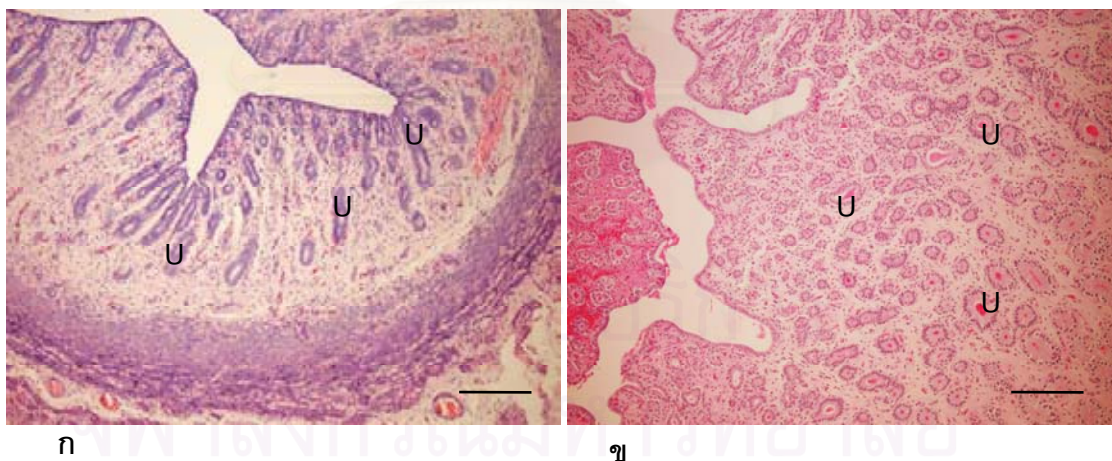
แมวกกลุ่มที่ 2 และ 3 มีการหนาตัวของชั้น glandular epithelium ความหนาแน่นของ endometrial gland การขยายของ endometrial gland สารคัดหลั่งใน endometrial gland (รูปที่ 4.2ค) การคั่งเลือดและเลือดออก ในระดับที่มากกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยไม่พบพารามิเตอร์ต่างๆ ระหว่างกลุ่มที่ 2 และ 3 ส่วนระดับการหนาตัวของชั้น luminal epithelium มีค่าไม่แตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม (ตารางที่ 4.4)

แมวกกลุ่มควบคุมมี uterine gland จำนวนน้อย และมีขนาดเล็ก (รูปที่ 4.4ก) และแมวกกลุ่มที่ 2 พบ uterine gland ขนาดใหญ่จำนวนมาก (รูปที่ 4.4ข)

ตารางที่ 4.4 ระดับการหนาตัวของ luminal และ glandular epithelium ของผนังมดลูก ระดับความหนาแน่นของ endometrial gland ระดับการขยายของ endometrial gland การหลังสิ่งคัดหลั่งจาก endometrial gland และการคั่งของเลือดและเลือดออกในมดลูกของแมวในกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) (n=6) แมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 2) (n=6) และแมวที่ได้รับยา aglepristone ภายหลังได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 3) (n=6) (+1 ถึง +4 น้อยไปมากตามลำดับ) (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

แมว	การหนาตัวของชั้น luminal epithelium	การหนาตัวของชั้น glandular epithelium	ความหนาแน่นของ endometrial gland	การขยายของ endometrial gland	สารคัดหลั่งใน endometrial gland	การคั่งเลือดและเลือดออก
กลุ่มที่ 1	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.0±0.0 ^a	1.2±0.4 ^a	1.0±0.0 ^a
กลุ่มที่ 2	1.0±0.0 ^a	2.2±0.4 ^b	2.7±1.0 ^b	2.5±0.8 ^b	2.2±0.8 ^b	2.0±0.6 ^b
กลุ่มที่ 3	1.5±0.8 ^a	1.7±0.5 ^b	2.5±0.8 ^b	2.3±0.5 ^b	2.0±0.0 ^b	1.8±0.8 ^b

a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



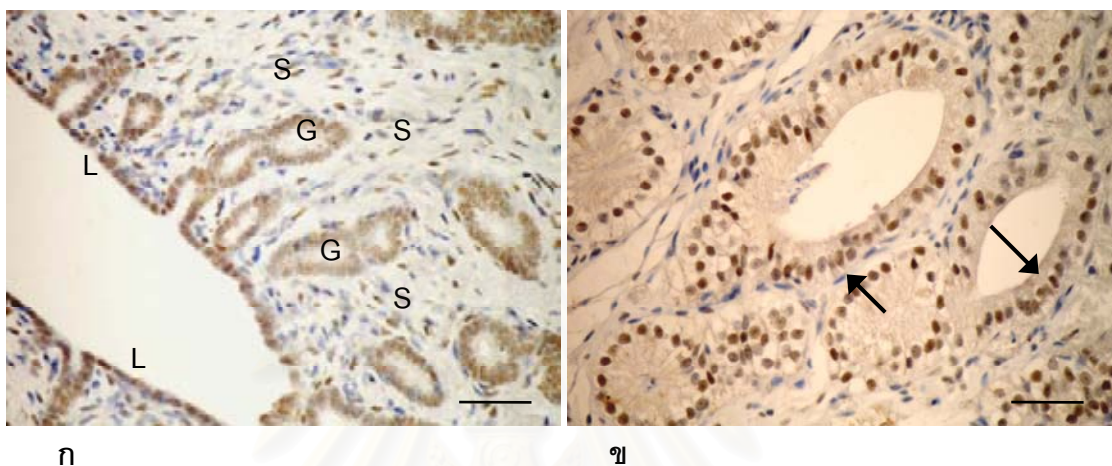
รูปที่ 4.4 ลักษณะของ uterine gland (U) (H&E staining)

ก มดลูกกลุ่มควบคุม ที่มี uterine gland จำนวนน้อย และมีขนาดเล็ก (bar = 100 μ m)

ข มดลูกกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด ที่พบ uterine gland ขนาดใหญ่จำนวนมาก (bar = 100 μ m)

ดัชนีการออกขยาย

เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA จะพบการติดสีน้ำตาลในนิวเคลียส ซึ่งพบเซลล์ที่ให้ผลบวกได้ในทุกชั้นของผนังมดลูก (รูปที่ 4.5) โดยดัชนี PCNA ของชั้น luminal epithelium และ glandular epithelium ในกลุ่มที่ 2 มีค่ามากกว่าในกลุ่มที่ 1 ($P<0.05$) และดัชนี PCNA ของ luminal และ glandular epithelium ในกลุ่มที่ 3 ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 4.5)



รูปที่ 4.5 ผนังมดลูกแมวที่ได้รับการข้อมสีกด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อดูดัชนีการออกขยาย (PCNA index)

ก พบนิวเคลียสติดสีน้ำตาลในเซลล์ที่ให้ผลบวกได้ในชั้น luminal epithelium (L) submucosa (S) และ glandular epithelium (G) ในผนังมดลูก (bar = 25 μ m)

ข ภาพขยายของเซลล์ในชั้น glandular epithelium ที่ติดสีน้ำตาล (bar = 25 μ m) (ลูกศรชี้)

ตารางที่ 4.5 ดัชนี PCNA และ PR score ในชั้น luminal และ glandular epithelium ของผนังมดลูกแมวกุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) (n=6) แมวที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA (กลุ่มที่ 2) (n=6) และแมวที่ได้รับยา aglepristone ภายหลัง MPA (กลุ่มที่ 3) (n=6) (ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

แมว	PR score		ดัชนี PCNA	
	Luminal epithelium	Glandular epithelium	Luminal epithelium	Glandular epithelium
กลุ่มที่ 1	112.1 \pm 14.2 ^a	110.4 \pm 15.7 ^a	28.7 \pm 17.5 ^a	38.7 \pm 13.5 ^a
กลุ่มที่ 2	63.7 \pm 23.1 ^b	82.1 \pm 8.7 ^b	56.1 \pm 19.1 ^b	73.0 \pm 7.4 ^b
กลุ่มที่ 3	75.8 \pm 34.7 ^b	93.2 \pm 30.7 ^{a,b}	48.6 \pm 16.3 ^{a,b}	56.3 \pm 24.5 ^{a,b}

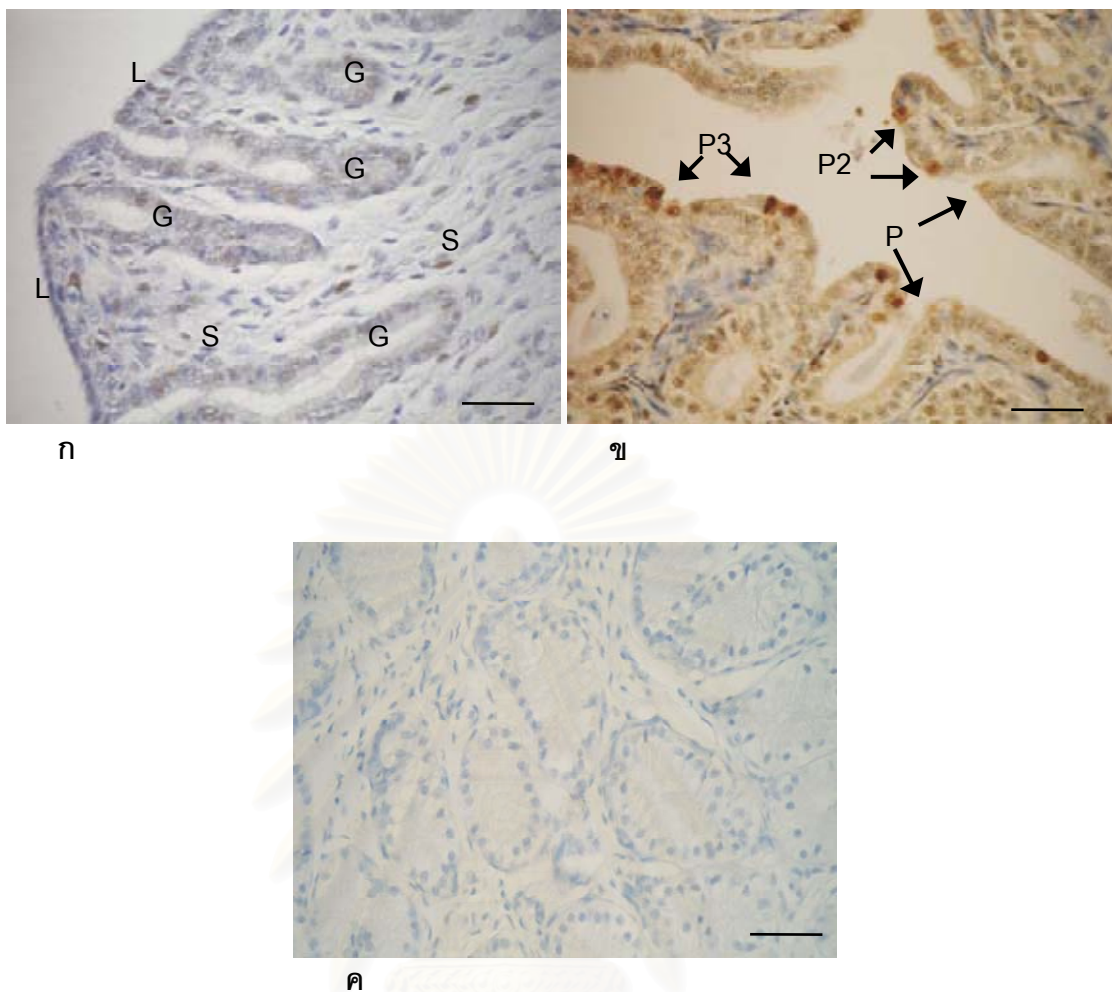
a, b ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การแสดงผลของตัวรับโปรเจสเทอโรน

การตรวจหาการแสดงผลของตัวรับโปรเจสเทอโรน โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมีนั้น พบว่ามี การติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียสของเซลล์ในทุกๆชั้น (รูปที่ 4.6ก) แต่มีจำนวนเซลล์ต่างกัน ที่ติดสี ความเข้มระดับต่างๆ กันในแต่ละชั้น (รูปที่ 4.6ข) ขณะที่ในกลุ่มควบคุมจะไม่พบการติดสี น้ำตาลภายในนิวเคลียส (รูปที่ 4.6ค) โดย PR score ของ glandular epithelium ในกลุ่มควบคุมมี ค่ามากกว่ากลุ่มที่ 2 ($P<0.05$) และ PR score ของกลุ่มที่ 2 ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ 3 ($P=0.37$) (ตารางที่ 4.5)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.6 ลักษณะของผนังมดลูกแม่วที่มีการแสดงออกของ PR ในชั้นต่างๆ เซลล์ที่ให้ผลบวกจะติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียส

ก เซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PR ในชั้น luminal epithelium (L) submucosa (S) และ glandular epithelium (G) (bar = 25 μ m)

ข ระดับความเข้มของการติดสีในนิวเคลียสของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PR เซลล์ที่มีความเข้มของการติดสีต่ำ (P1) และ เซลล์ที่มีความเข้มของการติดปานกลาง (P2) และเซลล์ที่มีความเข้มของการติดสีมาก (P3)

ค เซลล์ที่ไม่ติดสีน้ำตาลในนิวเคลียส (ตัวควบคุมลบ)

บทที่ 5

อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การให้ยา aglepristone ตามขนาดที่แนะนำ 10 มก./กก. ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. ตามรายงานที่แนะนำ (Fieni et al., 1996; Galac et al., 1999; Georgiev and Wehrend et al., 2005) ให้กับแมวที่มีการหนาตัวของผนังมดลูกอันเป็นผลมาจากการได้รับยาคุมกำเนิด MPA เปรียบเทียบกับแมวกุ่มควบคุมที่อยู่ในระยะ interoestrus พบว่า น้ำหนัก น้ำหนักสัมพัทธ์ และ เส้นผ่านศูนย์กลาง ของมดลูกมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเป็นผลมาจากการออกฤทธิ์ของยา aglepristone ในการยับยั้ง การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่อการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุมดลูก สอดคล้องกับการทดลองในลิง rhesus macaques ที่ได้รับ mifepristone (Brenner et al., 2002) แมวกุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA พบว่าน้ำหนักมดลูก น้ำหนักสัมพัทธ์ และเส้นผ่านศูนย์กลางของปีกมดลูก มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นผลโดยตรงของการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สอดคล้องกับไนสตรี (Connor et al., 2000) และแมว (Chatdarong, 2003) ในกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ขนาดมาตรฐาน

ความหนาของชั้น endometrium และ myometrium ของแมวทดลองภายหลังที่ได้รับ aglepristone ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ให้ผลสอดคล้องกับรายงานในสุนัขที่เป็น pyometra ภายหลังได้รับยา aglepristone ในขนาดที่ต่ำกว่าขนาดแนะนำ (6 มก./กก. 2 ครั้ง ในวันแรก และวันละครั้งในอีก 3 วันต่อมา) (Blendinger et al., 1997) อธิบายโดยขนาดของยา aglepristone และจำนวนครั้งที่ได้รับยา ในการทดลองนี้ ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งผลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอกที่มีผลต่อมดลูกได้ (Kloosterboer et al., 2000) แต่มีบางรายงานพบว่า antiprogestin ชนิดต่างๆ มีฤทธิ์ในการกดหรือยับยั้งการเจริญของ endometrium ได้ (Cameron et al., 1997; Spitz et al., 1998; Brenner et al., 2002) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า ขนาดของยา aglepristone ที่แนะนำให้ใช้ในแมวคือ 10 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. นั้นควรเพิ่มจำนวนครั้งในการให้ยาแก่แมว เพื่อเป็นการรักษาระดับของยาในเลือด และการออกฤทธิ์ที่ยาวนานขึ้น

แมวที่ได้รับการฉีดยาคุมกำเนิด MPA มีค่าเฉลี่ยของสัดส่วนความหนาชั้น endometrium ต่อ myometrium มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงผลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอกทำให้เกิดการหนาตัวของเยื่อบุมดลูก (endometrial hyperplasia) (Lawler et

al., 1991, Potter et al., 1991, Li et al., 1992) โดยเฉพาะการหนาตัวของชั้น myometrium ซึ่งเกิดจากผลของยาคุม MPA เช่นเดียวกับการทดลองที่มีรายงานมาก่อนหน้านี้ (Chatdarong et al., 2005) แมวกุ่มที่ได้รับยา aglepristone หลังยาคุมกำเนิด MPA มีความหนาของชั้น endometrium และ myometrium ไม่แตกต่างจากแมวกุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA นั้นเป็นไปได้ว่าการใช้ aglepristone ในขนาด และระยะเวลาที่ทำการทดลอง ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากยาคุมกำเนิด MPA ที่ส่งผลกระทบต่อเยื่อเป้ำหมาย คือ มดลูกได้ ดังนั้นการใช้ antiprogesterin ควรวิเคราะห์ช่วงเวลา และขนาดในการให้ยา ให้สัมพันธ์กับระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด เพื่อให้ได้ผลการออกฤทธิ์ที่เหมาะสม (Kloosterboer et al., 2000) หรือ การใช้ antiprogesterin ในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น จะส่งผลให้ฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอก (exogenous progesterone) ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกหมดลง (Wehrend et al., 2001)

การจัดเรียงตัวและรูปร่างของเซลล์ luminal epithelium ภายหลังจากได้รับยา aglepristone นั้น พบการเรียงตัวแบบ single layer หรือ pseudostratified สอดคล้องกับการศึกษาที่ให้ mifepristone ในคนและสัตว์ primate อื่นๆ (Hamilton and Else, 1976; Johnston et al., 1984) แมวกุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA พบการจัดเรียงตัวแบบ pseudostratified ร่วมกับ polyps รูปร่างเซลล์ cuboid และ columnar นั้นสอดคล้องกับการศึกษาที่ก่อนหน้านี้ (Dawson and Koster 1994, Chatdarong et al., 2003) แมวกุ่มที่ได้รับ aglepristone จำนวน 1 ราย พบการอักเสบของเยื่อมดลูกจากการติดเชื้อที่เรีย (endometritis) โดยมีรายงานถึงสภาพการขยายใหญ่ของ endometrial gland แล้วสามารถพัฒนาเป็นถุงน้ำรังไข่ ร่วมกับการอักเสบและติดเชื้อแบคทีเรีย ภายหลังจากที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ในสุนัข (Bhatti et al., 2007) เป็นไปได้ว่าภายหลังจากที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพดังกล่าวโดยการให้ aglepristone ภายหลัง ในขนาดและระยะเวลาที่กำหนดไม่สามารถเปลี่ยนแปลงให้กลับมากเป็นปกติได้ โดยมีรายงานในคนว่ายาคุมกำเนิด MPA มีผลต่อเนื้อเยื่อเป้ำหมายมากกว่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนธรรมชาติถึง 45 เท่า (King and Whitehead, 1986) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของมดลูกได้

การหนาตัวของชั้น glandular epithelium ความหนาแน่นของ endometrial gland ระดับการขยายใหญ่ของ endometrial gland สารคัดหลั่งของ endometrial gland และการคั่งเลือดและเลือดออกในมดลูก ภายหลังจากได้รับยา aglepristone พบว่ามีระดับไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ฉีดยาคุมกำเนิด MPA แต่ต่างกับแมวกุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อธิบายโดยยาคุมกำเนิด MPA มีผลต่อการหนาตัวของ glandular epithelium ความหนาแน่นของ endometrial gland ระดับการขยายใหญ่ของ endometrial gland สารคัดหลั่งของ endometrial gland และการคั่งเลือดและเลือดออกในมดลูก เช่นเดียวกับรายงานในแมว (Chatdarong et al., 2005; Li et al., 1992) และในสุนัข (Bhatti et al., 2007) แต่มีบางรายงานพบว่า การให้ mifepristone มีผลยับยั้ง

การเปลี่ยนแปลงการหลังสารคัดหลั่ง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gemzell et al., 1997; Trasch et al., 2003) โดยที่ทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างของระดับการหนาตัวของ luminal epithelium อธิบายได้ว่ายา aglepristone ในขนาดและเวลาที่ให้ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงนี้ แต่มีบางรายงานพบการงอกขยายของชั้น luminal epithelium ในสุนัขภายหลังการได้รับ MPA (Bhatti et al., 2007) หรือสตรีที่ได้รับ mifepristone ส่งผลยับยั้งการหลังสารคัดหลั่งของต่อมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gemzell et al., 1997; Trasch et al., 2003)

จะเห็นว่าความสำเร็จจากการประยุกต์ใช้ aglepristone ในสัตว์ที่เป็นเนื้องอกเต้านมและมดลูกอักเสบนั้น มีความเกี่ยวข้องกับขนาด ระยะเวลา ชนิดสัตว์ และปัจจัยอื่นๆ เช่นการให้ aglepristone ในขนาดที่แนะนำคือ 10 มก./กก. 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. ในแมวที่เป็น feline fibroepithelial hyperplasia เต้านมกลับมาขนาดเดิมในเวลา 5-11 สัปดาห์ (Meisl et al., 2003) แมวที่เป็น feline fibroadenomatous hyperplasia ให้ยา 1-4 สัปดาห์ เต้านมกลับมาขนาดเดิมในเวลา 4 สัปดาห์ (Gorlinger et al., 2002) หรือ ใช้ขนาดดังกล่าวทุก 4-5 วัน พบขนาดเต้านมมีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน 5 วันหลังจากการฉีดครั้งแรก (Wehrend et al., 2001) ส่วนในสุนัขที่เป็น pyometra ให้ยาในขนาดดังกล่าว และอาจฉีดเพิ่มในวันที่ 7 พบว่าสุนัขมีอาการดีขึ้นภายใน 2 วันแรกหลังการใช้และหายภายใน 3 สัปดาห์หลังการรักษา (Trasch et al., 2003) หรือการฉีดเพิ่มในวันที่ 7 หรือ 14 พบสุนัขหายภายใน 14 วันหลังการรักษา (Gobello et al., 2003; Gurbulak et al., 2005)

จากการศึกษาค่าดัชนี PCNA ภายหลังที่ได้รับยา aglepristone พบค่าไม่แตกต่างกับแมวกลุ่มที่ฉีดยาคุมกำเนิด MPA ทั้งใน luminal and glandular epithelium อธิบายได้จากผลของยา aglepristone ตามขนาดและเวลาในการทดลอง ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่มีผลต่อการงอกขยายของ epithelium ได้ แมวกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งใน luminal and glandular epithelium เนื่องจากยาคุมกำเนิด MPA ไปมีผลต่อการงอกขยาย (ส่งผลให้เกิดการหนาตัวมดลูกตามผลของสัดส่วนความหนาชั้น endometrium ต่อชั้น myometrium) มีรายงานก่อนหน้านี้ว่า ดัชนี PCNA สามารถใช้ในการวินิจฉัยการงอกขยายของเซลล์มดลูก (endometrial hyperplasia) และการเกิด adenocarcinoma ของมดลูกในสตรีได้ (Ito et al., 1993) ส่วนในสัตว์มีรายงานที่ใช้ตรวจสอบการงอกขยายในมดลูกของหนู (Lai et al., 2000) และในมดลูกของแมว (Chatdarong et al., 2005)

ผลของ PR score ในแมวภายหลังที่ได้รับยา aglepristone พบว่าทั้งใน luminal and glandular epithelium มีค่าไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA อาจเป็นไปได้ว่ามดลูกยังมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่อยู่ในระดับสูงในเลือด โดยการให้ aglepristone ภายหลังในขนาดและระยะเวลาที่กำหนด ยังไม่ส่งผลต่อตัวรับโปรเจสเตอโรนได้ ให้ผลต่างจากการ

ทดลองก่อนหน้านี้นี้ในสตรีภายหลังที่ได้รับ mifepristone ในขนาด 0.5 มก./วัน พบจำนวนของ PR เพิ่มขึ้นทั้งในเยื่อบุผิว (epithelium) และ เซลล์เนื้อเยื่อค้ำจุน (stromal cell) แสดงให้เห็นว่าการได้รับ antiprogesterin ในขนาดที่เพียงพอจะไปมีผลต่อหน้าที่ของเยื่อบุมดลูก (endometrium) (Gemzell et al.,1997) แมวกลุ่มที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA พบว่ามีค่า PR score ต่ำกว่าแมวในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งใน luminal and glandular epithelium อธิบายโดยเป็นไปตามการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการจับกับตัวรับ แต่มีรายงานพบ PR ในมดลูกสุนัขที่อยู่ในภาวะมดลูกอักเสบเป็นหนอง มากกว่าสุนัขปกติในระยะ diestrus โดยพบในส่วนของเนื้อเยื่อค้ำจุน (stromal cell) และส่วนของกล้ามเนื้อมดลูก (myoepithelium) (ก้องเกียรติ และคณะ, 2005) อาจเกี่ยวข้องกับอิทธิพลของ down-regulation ภายหลังที่ได้รับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากยาคุมกำเนิด MPA ส่งผลให้มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเนื้อเยื่อเป้าหมายสูงเกินกว่าตัวรับ ทำให้ตัวรับ inactive หรือลดลงได้ สอดคล้องกับรายงานในสตรีที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ในขนาด 600 มก./วัน เป็นระยะเวลา 8-14 สัปดาห์ พบจำนวน PR ในเซลล์ต่อมมดลูก (glandular cell) และเซลล์เนื้อเยื่อค้ำจุน (stromal cell) มีจำนวนน้อยลงเมื่อเทียบกับก่อนได้รับยา (Masuzawa et al., 1994) หรือในสตรีที่เป็นเนื้องอกเต้านมภายหลังที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA พบการแสดงออกของ PR ลดลงอย่างมาก (Noguchi et al., 1989) ในสัตว์ทดลองพบว่าหนูมีระดับ PR ลดต่ำลงภายหลังได้รับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Blaustein and Olster, 1989)

ผลของการได้รับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และผลของการทดลองที่ให้พบความแตกต่างที่ไม่ชัดเจนนัก อาจมีสาเหตุมาจากการระยะเวลาที่ไม่เพียงพอในการให้ aglepristone ภายหลังที่ได้รับยาคุมกำเนิด MPA ดังเช่นการทดลองในแมวที่เป็น Feline fibroadenomatous hyperplasia ที่ทำการรักษาด้วย antiprogesterin ให้ค่าเฉลี่ยของ PR ก่อนและหลังทำการรักษาอยู่ที่ 72.8% และ 80.4% โดยที่ antiprogesterin ไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์ PR ที่มีการแสดงออกให้เห็น แต่ถ้าให้การรักษาด้วย antiprogesterin ในระยะเวลายาวนานและให้ซ้ำๆ อาจส่งผลให้ฤทธิ์ของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอก (exogenous progesterone) ถูกทำให้หมดไปได้ (Wehrend et al.,2001)

5.2 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การให้ยา aglepristone ตามขนาดที่แนะนำ 10 มก./กก. ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. ภายหลังจากได้รับยาคุมกำเนิด MPA ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของมดลูกแมว ได้แก่ น้ำหนักมดลูก น้ำหนักสัณพัตร์ เส้นผ่านศูนย์กลาง ความหนาของชั้น endometrium และ myometrium E/M ratio ระดับความหนาตัวของชั้น luminal และ glandular epithelium ระดับความหนาแน่น การขยายขนาด และสารคัดหลั่งใน endometrial gland การคั่งเลือดและเลือดออก ในมดลูก PCNA index และ PR score

อย่างไรก็ตามในอนาคตอาจทำการทดลองต่อไป เพื่อให้ได้ผลการทดลองที่ชัดเจนขึ้น และเพื่อหาข้อมูลมาสนับสนุนผลของการใช้ยา aglepristone ต่อการเปลี่ยนแปลงของมดลูกแมว



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- ก้องเกียรติ ศรีสุวรรณสกุล ศยามณ สุขจำลอง สุตสรวิ ศิริไวยพวงศ์ และ ศิลป์ชัย เพียรชอบ.
2005. การศึกษาตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของสุนัขที่มีภาวะมดลูกอักเสบแบบเป็น
หนองเปรียบเทียบกับสุนัขปกติในระยะไดเอสตรัส. Thai. J. Vet. Med. 35(2) (June 2005)
วิจิต วิเศษธนากร และอร่าม โรจนสกุล, 2532. การใช้สารต้าน progesterone ในทางสูติ-นรีเวช
กรรม. ใน: การวิจัยในวิทยาเอนโดครินนรีเวช, อร่าม โรจนสกุล, (บรรณาธิการ)
กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ข้าวฟ่าง. 387-407.
- อร่าม โรจนสกุล. 2532. การใช้ progesterone และ progestogen ทางคลินิก. ใน: การวิจัยใน
วิทยาเอนโดครินนรีเวช. อร่าม โรจนสกุล, (บรรณาธิการ) กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ข้าว
ฟ่าง. 285-307.
- Arias, R., Ballagh, S. and Wysocki, S. 2004. Administration of hormonal contraceptive
drugs. A Quick Reference Guide for Clinicians. 1-23.
- Baan, M., Taverne, M.A.M., Kooistra, H.S., Gier, J.D., Dieleman, S.J. and Okkens, A.C.
2005. Induction of parturition in the bitch with the progesterone-receptor blocker
aglepristone. Theriogenology 63(7): 1958-1972.
- Bahzad, C., Wyssling, H., Saraya, L., Yong-en, S., Prasad, R.N.V., Swahn, M.L., Kovacs,
L., Belsey, E.M. and Van Look, P.F.A. 1989. Termination of early human pregnancy
with RU 486 (mifepristone) and the prostaglandin analogue sulprostone : a multi-
centre, randomized comparison between two treatment regimens. Human. Reprod.
4(6): 718-725.
- Baird, D.T., Brown, A., Critchley, H.O.D., Williams, A.R., Lin, S. and Cheng, L. 2003.
Effect of long-term treatment with low-dose mifepristone on the endometrium.
Human. Reprod. 18(1): 61-68.
- Bardon, S., Vignon, F., Chalbos, D. and Rockefeller, H. 1985. RU 486, a progestin and
glucocorticoid antagonist, inhibit growth of breast cancer cells via the progesterone
receptor. J. Clin. Endocrinol. Metab. 60: 692-697.
- Baulieu, E.E. 1989. Contragestion and other clinical applications of RU486, an
antiprogestagen at the receptor. Science. 245(4924): 1351-1357.

- Berchtold, M. 1997. Pyometra der Hündin. In: Freudiger, U., Grünbaum, E.G., Schimke, E. (Hrsg.) Klinik der Hundekrankheiten. 2., überarb. Enke, Aufl. – Stuttgart.
- Bhatti, S.F.M., Rao, N.A.S., Okkens A.C., Mol, J.A., Duchateau, L., Ducatelle, R., van den Ingh, T.S.G.A.M., Tshamala, M., Van Ham, L.M.L., Coryn, M., Rijnberk, A. and Kooistra, H.S. 2007. Role of progestin-induced mammary-derived growth hormone in the pathogenesis of cystic endometrial hyperplasia in the bitch. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33(3): 294-312.
- Bigerson, L. and Odland, V. 1987. Early pregnancy termination with antiprogestins: a comparative clinical study of RU 486 given in two dose regimens and Epostane. *Fertil. Steril.* 48(4): 565-570.
- Blaustein, J.D. and Olster, D.H. 1989. Gonadal steroid hormone receptors and social behaviors. In: J. Balthazart. (ed.) *Advances in comparative and environmental physiology.* Berlin: Springer-Verlag. pp. 31-104.
- Blendinger, K., Bostedt, H. and Hoffmann, B. 1997. Hormonal state and effects of the use of an antiprogestin in bitches with pyometra. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 317-325.
- Boomsma, R.A., Jaffe, R.C., Verhage, H.G., 1982. The uterine progestational response in cats: changes in morphology and progesterone receptors during chronic administration of progesterone to estradiol primed and non primed animals. *Biol. Reprod.* 26: 511-521.
- Boomsma, R.A., Mavrogianis, P.A. and Verhage, H.G. 1991. Changes in endometrial and placental protein synthesis and morphology during pregnancy and pseudopregnancy in the cat. *Biol. Reprod.* 44: 345-356.
- Borman, S.M., Chwalisz, K., Stouffer, R.L. and Zelinski-Wooten, M.B. 2003. Chronic low-dose antiprogestin impairs preimplantation embryogenesis, but not oocyte nuclear maturation or fertilization in rhesus monkeys. *Steroids.* 68(10-13): 1041-1051.
- Bravo, R., Frank, R., Blundell, P.A. and McDonald-Bravo, H. 1987. Cyclin-PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature.* 326: 515-517.

- Breitkopf, M., Hoffmann, B. and Bostedt, H. 1997. Treatment of pyometra (cystic endometrial hyperplasia) in bitches with and antiprogestin. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 327-331.
- Brenner, R.M., Nayak, N.R., Slayden, O.D., Critchley, O.D. and Kelly R.W. 2002. Premenstrual and Menstrual Changes in Macaque and Human Endometrium. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 955(1): 60–74.
- Brown, A., Cheng, L., Lin, S. and Baird, D. T. 2002. Daily Low-Dose Mifepristone Has Contraceptive Potential by Suppressing Ovulation and Menstruation: A Double-Blind Randomized Control Trial of 2 and 5 mg per day for 120 Days. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87(1): 63-70.
- Bygdeman, M. and Swahn, M. L. 1985. Progesterone receptor blockage : effect on uterine contractility and early pregnancy. *Contraception* 32: 45-51.
- Cabrol, D., Bouvier, M., Mermet, E. Cedard, L., Sureau C. and Baulieu, E.E. 1985. Induction of labour with mifepristone after intrauterine fetal death. *Lancet.* 2: 1019.
- Cameron, I.T., Michie, A.F. and Baird, D.T. 1986. Therapeutic abortion in early pregnancy with antiprogestogen RU 486 alone or in combination with prostaglandin analogue (gemeprost). *Contraception* 34(5): 459-468.
- Cameron, I.T. and Baird, D.T. 1988. Early pregnancy termination : a comparison between vacuum aspiration and medical abortion using prostaglandin (16,16 dimethyl-trans-delta 2-PGE1 methyl ester) or the antiprogestogen RU 486 . *Br. J. Obstet Gynaecol.* 95: 271-276.
- Cameron, S.T., Critchley, H.O.D., Thong, K.J., Buckley, C.H., Williams, A.R. and Baird, D.T. 1996. Uterus and endometrium: Effects of daily low dose mifepristone on endometrial maturation and proliferation. *Hum. Reprod.* 11(11): 2518-2526.
- Cameron, S.T., Glasier, A.F., Narvekar, N., Gebbie, A., Critchley, H.O. and Baird, D.T. 2003. Effects of onapristone on postmenopausal endometrium. *Steroids.* 68(7): 1053–1059.
- Canpolat, L., Özenrcan, I.H., Bozlak, N. and Dogan, C. 1999. Immunohistochemical Study On the PCNA–Immunoreactivity in the Uterus of Rats Ovariectomized or Treated With Antiestrogen Clomiphene Citrate. *Tr. J. Med. Sci.* 393-399.

- Chatdarong, K., Rungsipipat, A., Axné, E. and Linde-Forsberg C. 2005. Hystero-graphic appearance and uterine histology at different stages of the reproductive cycle and after progestagen treatment in the domestic cat. *Theriogenology* 64(1): 12-29.
- Clark, G.M. and McGuire, W.L. 1983. Progesterone receptors and human breast cancer. *Breast cancer Res. Treat.* 3: 157-163.
- Concannon, P. W., Yeager, A., Frank, D. and Iyampillai, A. 1990. Termination of pregnancy and induction of premature luteolysis by the antiprogestagen, mifepristone, in dogs. *J. Reprod. Fertil.* 88: 99-104.
- Concannon, P.W. and Meyers-Wallen, V.N. 1991. Current and proposed methods for contraception and termination of pregnancy in dogs and cats. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 198: 1214-1225.
- Cornette, J.C., Kirton K.T. and Duncan, G.W. 1971. Measurement of medroxyprogesterone acetate by radioimmunoassay. *J. Clin. Endocrinol. Metab;* 14: 319-329.
- Couzinnet, B., Start, N.L., Ulman, A. Baulieu, E.E. and Schaison. 1986. Termination of early pregnancy by the progesterone antagonist RU 486 (Mifepristone). *New. Eng. J. Med.* 315(25): 1565-1570.
- Croxatto, H.B., Salvatierra, A.M., Croxatto, H.D. and Fuentealba, B. 1993. Effects of Continuous treatment with low dose mifepristone throughout one menstrual cycle. *Hum. Reprod.* 8(2): 201–207.
- Croxatto, H.B., Salvatierra, A.M., Fuentealba, B, et al. 1994. Effect of the antiprogestin onapristone on follicular growth in women. *Hum. Reprod.* 9(8):1442–1447.
- Croxatto, H.B., Fuentealba, G., Salvatierra, A.M. 1997. Clinical strategies for the achievement of endometrial contraception with progesterone antagonists. In Beier, H.M., Harper, M.J.K. and Chwalisz, K. (eds). *The Endometrium as a Target for Contraception*. Berlin: Springer-Verlag. pp. 259–278.
- Croxatto, H.B., Kovács, L., Massai, R., Resch, B.A., Fuentealba, B., Salvatierra, A.M., Croxatto, H. D., Zalányi, S., Viski, S. and Krenács, L. 1998. Effects of long term low-dose mifepristone on reproductive function in women. *Hum. Reprod.* 13(4): 793-798.

- Davidson, A.P., Feldman, E.C. and Nelson, R.W. 1992. Treatment of pyometra in cats, using prostaglandin F2 alpha: 21 cases (1982-1990). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 200(6): 825-828.
- Davidson, A.P. 1995. Medical management of pyometra with prostaglandin F2 alpha in the dog and cat. In: J.D. Bonagura. (ed.) *Kirk's Current Veterinary Therapy XII Small Animal Practice*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 1081-1083.
- Dawson, A.B. and Koster, B.A. 1944. Preimplantation changes in the uterine mucosa of the cat. *Am. J. Anat.* 75(1): 1-31.
- De Bosschere, H., Ducatelle, R., Vermeirsch, H., Simoens, P. and Coryn, M. 2002. Estrogen- α and progesterone receptor expression in cystic endometrial hyperplasia and pyometra in the bitch. *Anim. Reprod. Sci.* 70(3): 251-299.
- Dhaliwal, G. K., England, G. C. and Noakes, D. E. 1997. Immunocytochemical localization of oestrogen and progesterone receptors in the uterus of the normal bitch during oestrus and metoestrus. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 167-176.
- Dow, C. 1962. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the cat. *Vet. Rec.* 74: 141-147.
- Dubois, C., Ulmann, A and Baulieu, E.E. 1988. Contraception with late luteal administration of RU 486 (Mifepristone). *Fertil. Steril.* 50: 593-596.
- Elder, M.G. 1984. Injectable contraception. *Clin. Obstet. Gynaecol.* 11: 723-741.
- England, G.W. 1998. Pharmacological control of reproduction in the dog and bitch. In: G. Simpson, G.C. England, M. Harvey. (eds.) *Manual of small animal reproduction and neonatology*. BSAVA, Cheltenham, pp. 197-218.
- Feldman, E.C. and Nelson, R.W. 1996. Feline reproduction. In: *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*, 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 741-768.
- Fieni, F., Marnet, P. G., Martal, J., Siliart, B., Bernard, F., Tainturier, D., Bruyas, J. F. 2000. Efficacy, safety and hormonal kinetics in pregnancy termination in bitches with an antiprogestin: Aglepristone (RU 534). *Advances in dog cat and exotic carnivore reproduction*. Oslo Norway. 81

- Fieni, F., Bruyas, J.F., Battut, I. and Tainturier, D. 2001^a. Clinical use of anti-progestins in the bitch. In: Concannon P.W., England, E. and Verstegen, J. (eds.) Recent Advances in Small Animal Reproduction. New York, USA. pp. 1-4.
- Fieni, F., Bruyas, J.F., Tainturier, D. and Battui, I. 2001^b. Clinical use of antiprogestins in the treatment of metritis/pyometra in the bitch. In: Proceedings of the Fifth Annual Conference of the European Society of Domestic Animal Reproduction. Vienna, Australia. p. 29.
- Fieni, F., Martal, J., Marnet, P.G., Siliart, B., Bernard, F., Riou, M., Bruyas, J.F. and Tainturier, D. 2001^c. Hormonal variation in bitches after early or mid-pregnancy termination with aglepristone (RU534). *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 243-248.
- Fieni, F., Marnet, P.G., Martal, J., Siliart, B., Touzean, N., Bruyas, J.F. and Tainturier, D. 2001^d. Comparison of two protocols with a progesterone antagonist aglepristone (RU534) to induce parturition in bitches. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 57: 237-242.
- Fieni, F., Martal, J., Marnet, P.G., Siliart, B. and Guittot, F. 2007. Clinical, biological and hormonal study of mid-pregnancy termination in cats with aglepristone. *Theriogenology* 67(7):1305.
- Friedman, C.L., McKnight, P.F., and Kim, M.H. 1982. Therapeutic use of estrogens and progestins. In: W.F. Rayburn, F.P. Zuspan, (eds.) *Drug Therapy in Obstetrics and Gynaecology*. Norwalk, Connecticut, Appleton-Century-Crofts. pp. 224-244.
- Galac, S., Kooistra, H.S., Butinar, J., Bevers, M.M., Dieleman, S.J., Voorhout, G. and Okkens, A.C., 2000. Termination of mid-gestation pregnancy in bitches with Aglepristone, A progesterone receptor antagonist. *Theriogenology* 53(4): 941-950.
- Galac, S., Kooistra H.S., Dieleman, S.J., Cestnik, V. and Okkens, A.C. 2004. Effect of Aglepristone, a progesterone antagonist, administered during the early luteal phase in non-pregnant bitches. *Theriogenology* 62: 494-500.
- Gambrell, R.D., Bagnell, C.A. and Greenblatt, R.B. 1983. Role of estrogen and progesterone in the etiology and prevention of endometrial cancer : review. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 146(7): 969-707.
- Garfield, R.E. and Baulieu, E.E. 1987. The antiprogestosterone steroid RU 486 : a short pharmacological and clinical review, with emphasis on the interruption of pregnancy. *Bailliere's Clinical. Obstet. Gynaecol.* 1: 207-221.

- Gemzell-Danielsson, K., Swahn, M.L., Westlund, P., Johannisson, E., Seppälä, M. and Bygdeman, M. 1997. Effect of low daily doses of mifepristone on ovarian function and endometrial development. *Hum. Reprod.* 12(1): 124-131.
- Georgiev, P. and Wehrend, A., 2006. Mid-gestation pregnancy termination by the progesterone antagonist aglepristone in queens. *Theriogenology* 65(7): 1401-1406.
- Gobello, C., Castex, G., Klima, L., Rodriguez, R. and Corrada, Y. 2003. A study of two protocols combining aglepristone and cloprostenol to treat open cervix pyometra in the bitch. *Theriogenology* 60: 901-908.
- Gorlinger, S., Kooistra, H.S., van den Broek, A. and Okkens, A.C. 2002. Treatment of fibroadenomatous hyperplasia in cats with aglepristone. *J. Vet. Intern. Med.* 16: 710-713.
- Gudermuth, D.F., Newton, L., Daels, P. and Concannon, P.W. 1997. Incidence of spontaneous ovulation in young, group housed cats based on serum and fecal concentrations of progesterone. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 51: 177-184.
- Gurbulak, K., Pancarci, M., Ekici, H., Konuk, C., Kirsan, I, Ucmak, M. and Toydemir, S. 2005. Use of aglepristone and aglepristone +intrauterine antibiotic for the treatment of pyometra in bitches. *Act. Vet. Hung.* 53: 249-255.
- Healy, D.L., Baulieu, E.E. and Hodgen, G.D. 1983. Induction of menstruation by an antiprogestosterone steroid (RU 486) in primates : site of action, dose-response relationships, and hormone effects. *Fertil. Steril.* 40: 253-257.
- Herrmann, W., Wyss, R. and Riondel, A. 1982. The effect of anti-progesterone steroid in women : interruption of the menstrual cycle and of early pregnancy. *Compts. Rendus.* 294: 933-938..
- Hodgen, G.D. 1985. Pregnancy prevention by intravaginal delivery of progesterone antagonist : RU 486 tampon for menstrual induction and absorption. *Fertil. Steril.* 45: 263-267.
- Hoffmann, B. and Schuler, G. 2000. Receptor blockers – general aspects with respect to their use in domestic animal reproduction. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 295-312.

- Hoffmann, B., Lemmer, W., Bostedt, H. and Failing, K. 2000. Application of the antiprogestin Aglepristone for conservative treatment of pyometra in the dog. *Tierz. Praxis. Ausb.* 28: 323-329.
- Hubler, M. and Arnold, S. 2000. Prevention of pregnancy in bitches with the progesterone antagonist aglepristone (Alizine). *Schweizer Archiv Tierheilkunde.* 142(7): 381-386
- Imada, K., Sato, T., Hashizume, K., Tanimoto, A., Sasaguri, Y. and Ito, A. 2002. An Antiprogestone, Onapristone, Enhances the Gene Expression of Promatrix Metalloproteinase 3/Prostromelysin-1 in the Uterine Cervix of Pregnant Rabbit. *Bio & Pharmaceutical Bulletin.* 25(9): 1223-1227.
- Ito, K., Sasano, H., Watanabe, K., Ozawa, N., Sato, S. and Yajima, A. 1993. Immunohistochemical study of PCNA (proliferating cell nuclear antigen) in normal and abnormal endometrium. *Int. J. Gynaecol. Cancer.* 3: 122-127.
- Jain, J.K., Li, A., Yang, W., Minoo, P. and Felix, J.C. 2006. Effects of mifepristone on proliferation and apoptosis of human endometrium in new users of medroxyprogesterone acetate. *Hum. Reprod.* 21(3): 798-809.
- Johnston, S.D., Hayden, D.W., Kiang, D.T., Handschin, B. and Johnson, K.H. 1984. Progesterone receptor in feline mammary adenocarcinomas. *Am. J. Vet. Res.* 45(2): 379-384.
- Katkam, R.R., Gopalkrishnan, K., Chwalisz, K., Schillinger, E. and Puri, C.P. 1995. Onapristone (ZK 98.299): a potential antiprogestin of endometrial contraception. *Am. J. Obstet. Gynaecol.* 173: 779-787.
- Kim, K.S. and Kim, O. 2005. Cystic endometrial hyperplasia and endometritis in a dog Following prolonged treatment of medroxyprogesterone acetate. *J. Vet. Sci.* 6(1): 81-82.
- King, R.J.B. and Whitehead, M.I. 1986. Assessment of the potency of orally administered progestin in women. *Fertil. Steril.* 46(6): 1062-1066.
- Klijn, J.G., Setyono, Han. B. and Foekens, J.A. 2000. Progesterone antagonists and progesterone receptor modulators in the treatment of breast cancer. *Steroids.* 65: 825-830.

- Kloosterboer, H.J., Deckers, G.H., Schoonen, W.G.E.J., Hanssen, R.G.J.M., Rose, U.M., Verboost, P.M., Hsiu, J.G., Williams, R.F. and Hodgen, G.D. 2000. Preclinical experience with two selective progesterone receptor modulators on breast and endometrium. *Steroids*. 65: 733-740.
- Koering, M.J., Healy, D.L. and Hodgen, G.D. 1985. Morphological response of Endometrium to a progesterone receptor antagonist, RU 486 in monkeys. *Fertil. Steril.* 45: 280-287.
- Lai, M.D., Lee, L.R., Cheng, K.S. and Wing, L.Y. 2000. Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *Endocrinology* 166: 87-93.
- Lantingavan Leeuwen, I.S., van Garderen, E., Rutteman, G.R, Mol, J.A. 2000. Cloning and cellular localization of the canine progesterone receptor: co-localization with growth hormone in the mammary gland. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 75(4-5): 219-228.
- Lawler, D.F., Evans, R.H., Reimers, T.J., Colby, E.D. and Monti, K.L. 1991. Histopathologic features, environmental factors, and serum estrogen, progesterone, and prolactin values associated with ovarian phase and inflammatory uterine disease in cats. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1747-1753.
- Lawler, D.F., Johnston, S.D., Hegstad, R.L., Keltner, D.G. and Owens, S.F. 1993. Ovulation without cervical stimulation in domestic cats. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 57-61.
- Lein, D.H. and Concannon, P.W. 1983. Infertility and fertility treatments and management in the queen and tomcat. In: R.W. Kirk. (ed). *Current Veterinary Therapy VIII*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 936-987.
- Leyva, H., Addiego, L. And Stabenfeldt, G.H. 1985. The effect of different of photoperiods on plasma concentrations of melatonin, prolactin and cortisol in the domestic cat. *Endocrinology* 115: 1729-1736.
- Leyva, H., Madley, T. and Stabenfeldt, G.H. 1989. Effect of melatonin on photoperiod responses, ovarian secretion of oestrogen, and coital responses in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 39: 135-142.

- Li, W., Boomsma, R.A. and Verhage, H.G. 1992. Immunocytochemical analysis of estrogen and progestin receptors in uteri of steroid-treated and pregnant cat. *Biol. Reprod.* 47: 1073-1081.
- Linde-Forsberg, C., Kindahl, H. and Madel, A. 1992. Terminate of mid-term pregnancy in the dog with oral RU 486. *J. Small. Anim. Pract.* 33: 331-336.
- Lobo, R.A. 1987. Absorption and metabolic effects of different types of estrogens and progestogens. *Obstet. Gynaecol. Clin. North. Am.* 14(1): 143-167.
- Löhr, C.V., Teifke, J.P. and Weiss, E. 1997. Characterization of the Proliferation State in Canine Mammary Tumors by the Standardized AgNOR Method with Postfixation and Immunohistologic Detection of Ki-67 and PCNA. *Vet. Pathol.* 34: 212-221.
- Loretti, A.P., Ilha, M.R.S., Ordás J., Martín de las Mulas, J. 2005. Clinical, pathological and immunohistochemical study of feline mammary fibroepithelial hyperplasia following a single injection of depot medroxyprogesterone acetate. *J. Feline. Med. Surg.* 7(11): 43-52.
- Mäentausta, O., Svalander, P., Danielson, G.K., Bygdeman, M. and Vihko, R. 1993. The Effect of Antiprogestin, Mifepristone, and an Antiestrogen, Tamoxifen, on Endometrial 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Progestin and Estrogen Receptors during the Luteal Phase of the Menstrual Cycle: An Immunohistochemical Study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77(4): 913-918.
- Martin, P.M., Cotard, M., Mialot, J.P., Andre, F. and Raynaud, J.P. 1984. Animal models for hormone dependent human breast cancer. Relationship between steroid receptor profile in canine and feline mammary gland tumors and survival rate. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 12(1): 13-17.
- Martin de las Mulas, J., Millán, Y., Bautista, M.J., Perez, J. and Carrasco, L. 2000. Oestrogen and progesterone receptors in feline fibroadenomatous change: an immunohistochemical study. *Res. Vet. Sci.* 68: 15-21.
- Martín de las Mulas. J., Van Niel. M., Millán, Y., Ordás, J., Blankenstein, M.A., Van Mil, F. and Misdorp, W. 2002. Progesterone receptors in normal, dysplastic and tumourous feline mammary glands. Comparison with oestrogen receptors status. *Res. Vet. Sci.* 72(2): 153-161.

- Masuzawa, H., Badokhon, N.H., Nakayama, K., Konishi, I., Nikaido, T. and Fuji, S. 1994 Failure of down regulation of estrogen receptors and progesterone receptors after medroxyprogesterone acetate administration for endometrial hyperplasia. *Cancer* 74:2321–2328.
- Meisl, D., Hubler, M. and Arnold, S. 2003. Treatment of fibroepithelial hyperplasia (FEH) of the mammary gland in the cat with progesterone antagonist aglepristone (Alizine). *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 145(3): 130-136.
- Mishell, D.R., Shoupe, D., Brenner, P.F., Lacarra, M. Horenstein, J. Lahteenmaki, P. and Spitz, I.M. 1987. Termination of early gestration with the anti-progestin steroid RU 486: medium versus low dose. *Contraception* 35(4): 307-321.
- Mol, J.A , Garderen, E., Rutteman, G.R, Rijnberg, A. 1996. New insights in the molecular mechanism of progestin-induced proliferation of mammary epithelium:induction of the local biosynthesis of growth hormone (GH) in the mammary glands of dogs, cats and humans. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 57(1-2): 67-71.
- Mol, J.A., Hensen-Logman, S.C., Hageman, P., Misdorp, W., Blankenstein, M.A., Rijnberk A. 1995^a. Expression of the gene encoding growth hormone in the human mammary gland. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3094-3096.
- Mol, J.A., Garderen, E., Selman, P.J., Wolfswinkel, J., Rijnberk, A., and Rutteman, G.R. 1995^b. Growth hormone mRNA in mammary gland tumors of dogs and cats. *J. Clin. Invest.* 95(5): 2028-2034.
- Moyer, D.L. and Felix, J.C. 1998. The effects of progesterone and progestins on endometrial proliferation. *Contraception* 57(6): 399-403.
- Nelson, R.W., Feldman, E.C. and Stabenfeldt, G.H. 1982. Treatment of canine pyometra and endometritis with prostaglandin F2 alpha. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 181(9): 899-903.
- Noakes, D.E., Parkinson, T.J. and England, G.C.W. 2001. *Arthur's Veterinary Reproduction and obstetrics*, 8th ed. W. B. Saunders, London. 839-848.
- Noguchi, S., Yamamoto, H., Inaji, H., Imaoka, S. and Koyama, H. 1989. Inability of medroxyprogesterone acetate to down regulate estrogen receptor level in human breast cancer. *Cancer* 65(6): 1375-1379.

- Narvekar, N., Cameron, S., Critchley, H. O. D., Lin, S., Cheng, L. and Baird, D. T. 2004. Low-Dose Mifepristone Inhibits Endometrial Proliferation and Up-Regulates Androgen Receptor. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89(5): 2491-2497.
- Ortiz, A., Hirol, M., Stanczyk, F.Z., Goebelsmann, U. and Mishell, D.R. 1977. Serum medroxyprogesterone acetate (MPA) concentrations and ovarian function following intramuscular injection of depo-MPA. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44: 32-38.
- Pérez-Alenza, M.D., Jiménez, A., Nieto, A.I. and Peña, L. 2004. First description of feline inflammatory mammary carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical characteristics of three cases. *Breast Cancer Res.* 2004; 6(4): 300-307.
- Philibert, D., Deraedt, R. and Teutsch, G. 1981. RU 38486, a potent antiglucocorticoid in vivo. In : The 8th International Congress of Pharmacology, Tokyo, Japan. 1463.
- Philibert, D., Deraedt, R., Tournemine, C. Mary, I., Teutsch, G. 1982. RU 38486—a potent antiprogestosterone. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 17: 204.
- Potter, K., Hancock, D.H. and Gallina, A.M. 1991. Clinical and pathologic features of endometrial hyperplasia, pyometra and endometritis in cats: 79 case (1980-1985). *J. Amer. Vet. Med. Assoc.* 198(8): 1427-1431.
- Robert, G., 1994. *The Cat: Diseases and Clinical Management*. 2nd ed. Sherting: W.B. Saunders. pp. 1855-1875.
- Richard, B.W. and Lasagna, L. 1987. Drug regulation in the United States and United Kingdom: the Depo-Provera story. *Annals of Internal Medicine.* 106(6):886-891.
- Romagnoli, S. and Concannon, P.W. 2003. Clinical use of progestins in bitches and queens: a review. In: *Recent advances in small animal reproduction*. In: P.W. Concannon, G. England, J. Verstegen, C. Linde Forsberg (eds.) International veterinary information service. (<http://www.ivis.org>), Ithaca, NY, USA, A1206.0903.
- Romieu, G., Maudelonde, T. Ulamann, A., Pujol, H., Grenier, J. and Cavalie, G. 1987. The antiprogestin RU 486 in advanced breast cancer : preliminary clinical trial. *Bull Cancer.* 74(4): 455-461.
- Sartin, E.A., Barnes, S., Kwapien, R.P. and Wolfe, L.G. 1992. Estrogen and progesterone receptor status of mammary carcinomas and correlation with clinical outcome in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 53: 2196-2200.

- Schaison, G., and George, M., Lestrat, N., Reinberg, A. and Baulieu, E.E. 1985. Effects of the antiprogestone steroid RU 486 during midluteal phase in normal woman. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 61: 484-489.
- Seyrek-Intas, K., Nak, Y., Nak, D., and Kumru, I. H. 2004. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with aglepristone. *Aus. Vet. Pract.* 34(4): 161-162.
- Shille, V.M. and Sojka, N.J. 1995. Feline reproduction. In: S.J. Ettinger, E.C. Feldman, (eds.) *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia: W.B. Saunders. pp. 1690-1698.
- Simoës, J.P.C., Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.* 31: 637-647.
- Smith, D., Enever, R., Dey, M., Latta, D. and Weierstall, R. 1993. Pharmacokinetics and bioavailability of medroxyprogesterone acetate in the dog and the rat. *Biopharm. Drug Dispos.* 14: 341-355.
- Snead, D.R.J., Bell, J.A., Dixon, A.R., Nicholson, R.I., Elston, C.W., Blamey, R.W. and Ellis, I.O. 1993. Methodology of immunohistological detection of oestrogen receptor in human breast carcinoma in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue: a comparison with frozen section methodology. *Histopathology* 23(3): 233-238.
- Spitz, I.M. and Bardin, C.W. 1993. Clinical pharmacology of RU486-an antiprogestin and antiglucocorticoid. *Contraception* 48: 403-444.
- Spitz, I. M., Bardin, C. W., Benton, L. and Robbins, A. 1998. Early Pregnancy Termination with Mifepristone and Misoprostol in the United States. *N. Eng. J. Med.* 338(18): 1241-1247.
- Sukjumlong, S., Dalin, A.M., Sahlin, L. and Persson, E. 2006. Immunohistochemical Studies on the progesterone receptor (PR) in the sow uterus during the oestrus cycle and in inseminated sows at oestrus and early pregnancy. *Reproduction* 129(3): 349-359.
- Trasch, K., Wehrend, A. and Bostedt, H. 2003. Follow-up Examinations of Bitches after conservative Treatment of Pyometra with the Antigestagen Aglepristone. *J. Vet. Med.* 50(7): 375-379.
- Tsutsui, T. and Stabenfeldt, G.H. 1993. Biology of ovarian cycles, pregnancy and pseudopregnancy in the domestic cat. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 47: 29-36.

- Urquhart, D.R. and Templeton, A.A. 1987. Mifepristone (RU 486) and second trimester termination. *Lancet*. 2: 1405.
- Verhage, H.G., Boomsma, R.A., Murray, M.K. and Jaffe, R.C. 1983. Subcellular compartmentalization of the progesterone receptor in cat uteri following the acute administration of progesterone. *Biol. Reprod.* 28: 545-550.
- Verhage, H.G. and Jaffe, R.C. 1986. Regulation of estradiol and progesterone receptor concentrations in cat uteri following chronic progesterone administration. *J. Steroid. Biochem.* 24(2): 587-590.
- Verstegen, J.P. 1998. Physiology and endocrinology of reproduction in female cats. In: G. Simpson, G.C. England, M. Harvey. (eds.) *Manual of small animal reproduction and neonatology*, BSAVA, Cheltenham, pp. 11-16.
- Verstegen, J.P. 2000. Feline reproduction. In: S.J. Ettinger, E.C. Feldman, (eds). *Textbook of veterinary internal medicine II*. 5th ed., W. B. Saunders, Philadelphia. p. 1585-1598.
- Vessey, M.P. 1984. Exogenous hormones in the etiology of cancer in women. *J. Roy. Soc. Med.* 77: 541-549.
- Victor, A and Johansson, E.D.B. 1976. Pharmacokinetic observation on medroxy-progesterone acetate administered orally and intravaginally. *Contraception* 14: 319-329.
- Vitásek, R. and Dendisová, H. 2006. Treatment of Feline Mammary Fibroepithelial Hyperplasia Following a Single Injection of Proligestone. *Acta. Vet. Brno.* 75: 295-297.
- Vorys, N. 1986. Oral contraceptives. In : W.F. Rayburn, F.P. Zuspan. (eds.) *Drug therapy in Obstetrics and Gynecology*. 2nd ed. Connecticut: Appleton-Century-Crofts, pp. 285-315.
- Yang, Q., Yang, X. and Xu, W. 1998. Effect of mifepristone on the concentration of epidermal growth factor in serum and villi of early preagnant women. *Chinese. J. Obstet. Gynecol.* 5: 271-273.
- Wehrend, A., Hospes, R. and Gruber, A.D. 2001. Treatment of feline mammary fibroadenomatous hyperplasia with a progesterone-antagonist. *Vet. Rec.* 148: 346-347.

- West, N.B., Verhage, H.G. and Brenner, R.M. 1976. Suppression of the estradiol receptor system by progesterone in the oviduct and uterus of the cat. *Endocrinology* 99: 1010-1016.
- West, N.B., Verhage, H.G. and Brenner, R.M. 1977. Changes in nuclear estradiol receptor and cell structure during oestrus cycles and pregnancy in the oviduct and uterus of cats. *Biol. Reprod.* 17: 138-143.
- Wildt, D.E., Chan, S., Seager, S.W.J. and Chakraborty, P.K. 1981. Ovarian Activity, Circulating Hormones and Sexual Behavior in the Cat: I. Relationships during the coitus-induced luteal phase and the oestrus period without mating. *Biol. Reprod.* 25(1): 15-28.
- Zhu, Shun-Fa., Fang, Ma-Rong., and Jin, Li-Zheng, 2005. Effect of long-term administration of lower administration of lower-dosage mifepriston on ultrastructure and Incretion of rat ovary. *Hum. Reprod.* 18(1): 61-68.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 1

การย้อมสีชิ้นเนื้อมดลูกตามขั้นตอนทางจุลพยาธิวิทยา

1. การย้อมสี hematoxylin และ eosin stain

- ล้างน้ำยาบัพเฟอร์ฟอร์มาลินออกด้วยน้ำเปล่า (Washing) โดยปล่อยให้น้ำไหลผ่านชิ้นเนื้อ ประมาณ ½ ชั่วโมง
- ตั้งน้ำออกจากเนื้อเยื่อ โดยแช่ชิ้นเนื้อผ่านลงในเมทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 30, 40, 60% และ absolute alcohol ตามลำดับ (ความเข้มข้นละ 40 นาที)
- ทำให้ชิ้นเนื้อใส (Clearing) ด้วยไซลีนอีก 40 นาที
- แช่ชิ้นเนื้อลงในพาราฟินซึ่งเนื้อเยื่อจะถูกฝังอยู่ในบล็อกพาราฟินนี้
- ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4-5 μm
- ย้อมสีชิ้นเนื้อให้ผ่านขั้นตอนการละลายพาราฟินออกจากเนื้อเยื่อ (Deparaffinization) โดยใช้ไซลีนเติมน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (Rehydration) และแช่ใน absolute alcohol จาก 95, 85 และ 70% ตามลำดับ
- ทำการย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยสี Hematoxylin and Eosin (H&E stain)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวกที่ 2

เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

1. การเคลือบสไลด์สำหรับการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี (slide preparation)

- แอสไลด์เปล่าลงในภาชนะที่น้ำประปาไหลผ่านนาน 30 นาที
- แอสไลด์ในน้ำกลั่นนาน 5 นาที 2 ครั้ง
- แสในแอลกอฮอล์ (95% ethanol) นาน 5 นาที จำนวน 2 ครั้ง
- ฝึ้งในอากาศให้แห้งประมาณ 10 นาที
- เรียงสไลด์ลงในตัวแขวนจุ่มลงในภาชนะที่บรรจุ 3-aminopropyltriethoxysilane ความเข้มข้น 2% ใน acetone นาน 30-60 วินาที
- ล้างด้วย acetone ประมาณ 2 ครั้ง
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วอบให้แห้งในตู้อบ 40-60 °ซ

2. การระบบ Avidin Biotin Complex (ABC)

วิธีการย้อม ABC ที่ใช้เป็นการจับกันของสาร glycoprotein avidin กับ biotin สาร avidin เป็นโปรตีนจากไข่ขาว ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 67 กิโลดาลตัน ประกอบด้วย 4 ยูนิตย่อย เป็น hydrophobic socket ที่สามารถจับกับ biotin ได้ 4 โมเลกุล และจับกับแอนติบอดี และเอมไซม์ที่เป็นตำแหน่ง (marker) แอนติบอดี 1 โมเลกุลสามารถจับกับ biotin ได้ถึง 150 โมเลกุล โดยใช้ spacer arms ซึ่งทำให้ avidin มีที่ว่างพอที่จะจับกับ biotin ได้อย่างแข็งแรง เป็นผลให้เพิ่มความไวเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้เอนไซม์ และสามารถเจือจางแอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) ได้มากขึ้น (Miller, 1996)

3. วิธีการตรวจติดตามแอนติเจน (Antigen retrieval method)

ในขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยานั้น แอนติเจนอาจถูกทำลายได้ง่ายหรือหายไป ขั้นตอนนี้จึงมีความจำเป็น วิธีการมีหลายวิธีไม่ว่าจะเป็นการใช้เอนไซม์ย่อย หรือใช้ความร้อน ในการศึกษาในการตรวจหาการงอกขยาย (PCNA) และตัวรับโปรเจสเทอโรน (PR) จึงมีวิธีการเลือกใช้ความร้อนเพื่อการตรวจติดตามแอนติเจนที่มีประสิทธิภาพสูง ซึ่งมีวิธีการสองรูปแบบดังนี้

- การตรวจติดตามแอนติเจนของการงอกขยาย (PCNA) ใช้สารละลาย Tris-EDTA buffer pH 8.0 ให้ความร้อนจากวิธี autoclave ความร้อนที่อุณหภูมิคงที่ 121°ซ ความดัน 15 บาร์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

- การตรวจติดตามแอนติเจนของตัวรับโปรเจสเทอโรน (PR) ใช้สารละลาย citric acid buffer, pH 6.0 ให้ความร้อนจากวิธี ไมโครเวฟ ในระดับความร้อนที่ 750 วัตต์ ครั้งละ 2-5 นาที จำนวน 5 ครั้ง

4. การระงับ endogenous enzymes

เอนไซม์เหล่านี้อาจมีปฏิกิริยากับสาร substance ที่ใช้ในการย้อม ทำให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) เอนไซม์ peroxidase และ substances ทำให้เกิดปฏิกิริยา pseudoperoxidase reaction ในเนื้อเยื่อ เอนไซม์เหล่านี้พบได้ในเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว การบ่มเนื้อเยื่อตัวอย่าง ด้วย 0.5% H_2O_2 ในเมทานอล สามารถระงับปฏิกิริยานี้ได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการจับแอนติเจนของแอนติบอดี

5. การระงับการย้อมติดสีของพื้น (blocking background staining)

ขั้นตอนนี้ลดการติดสีของพื้นหลัง ที่เป็นผลมาจากการจับที่ไม่จำเพาะของแอนติเจนที่เกิดจากการจับแบบไม่จำเพาะของอิมมูน โดยแรง hydrophobic และ electrostatic ในบางตำแหน่งของชิ้นเนื้อ ซึ่งมีลักษณะมีสีพื้นหลังแบบไม่สม่ำเสมอ โดยเฉพาะในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในการศึกษานี้ ได้ใช้ 10% bovine serum albumin (BSA) เพื่อลดการจับตัวที่ไม่จำเพาะ (non-specific binding) และช่วยลดปัญหาในกรณีที่เนื้อเยื่อมีการอักเสบ หรือบริเวณที่มีเนื้อตาย

6. ตัวควบคุม

ในการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีต้องมีตัวควบคุม (control) สำหรับการทดลองโดยแบ่งเป็น ตัวควบคุมลบ (negative control) และ (positive control)

- ตัวรับโปรเจสเทอโรน (PR) ใช้มดลูกแมวระยะเป็นสัด เป็นตัวควบคุมบวก และใช้การหยดบัพเฟอร์แทนที่แอนติบอดีปฐมภูมิ เป็นตัวควบคุมลบ

- การงอกขยาย (PCNA) ใช้เนื้ออกเต้านมสุนัข เป็นตัวควบคุมบวก และใช้การหยดบัพเฟอร์แทนที่แอนติบอดีปฐมภูมิ เป็นตัวควบคุมลบ

ภาคผนวกที่ 3

การเตรียมสาร 4% Paraformaldehyde (PFA) Fixative

1. เติมน้ำกลั่นลงในบีกเกอร์ นำไปอุ่นให้ได้อุณหภูมิ 60°ซ บน hot plate ใส่แท่งแม่เหล็กช่วยในการหมุนปั่นของน้ำ
2. ระหว่างที่หมุนปั่น เติมผง paraformaldehyde ปริมาณ 20 กรัม ปั่นต่อที่อุณหภูมิคงที่
3. เติม 2N NaOH 5 หยด (1 หยด/100 มล.) ปั่นต่อเนื่องจนตะกอนละลายหมด (อย่าให้อุณหภูมิเกิน 70°ซ เพราะ PFA จะถูกทำลายได้)
4. นำออกจาก hot plate เติม 10xPBS ปริมาณ 50 มล. ลงไป แล้วปรับให้ได้ pH 7.2 (อาจใช้ HCl) จะได้สารปริมาตรสุดท้าย 500 มล.
5. กรองสารละลายที่ได้ แล้วเก็บไว้ในที่เย็น ปิดด้วยฟลอยเพื่อป้องกันแสงแดด
6. นำมาใช้ได้ทันที หรือเก็บไว้ในที่เย็น -20° เมื่อนำมาใช้ ต้องปรับให้เป็นอุณหภูมิห้องก่อน

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

สัตวแพทย์หญิง วรณี หมูผึ้ง เกิดวันที่ 1 กุมภาพันธ์ 2516 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อปี การศึกษา 2541 และทำการศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาสัตวศาสตร์ เหนือเวชวิทยาและวิทยาการสืบพันธุ์ สาขาวิชาวิทยาการสืบพันธุ์สัตว คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2547

ในปี 2541-2542 เป็นสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลสัตว์เล็ก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ต่อมาปี 2543-2547 เป็นสัตวแพทย์ประจำโรงพยาบาลสัตว์เพชรเกษม ปี 2541-ปัจจุบันทำงาน เป็นสัตวแพทย์ที่โรงพยาบาลสัตว์ของหล่อ สาขาของหล่อ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย