

ผลของเอทานอลต่อการหลังสุติในซึ่งฮอร์โมนจาก เซลล์ต่อมได้สมองของหนูแรทในหลอดทดลอง



นางสาว อัมพร ทองภูเกียรติกุล

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยา
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

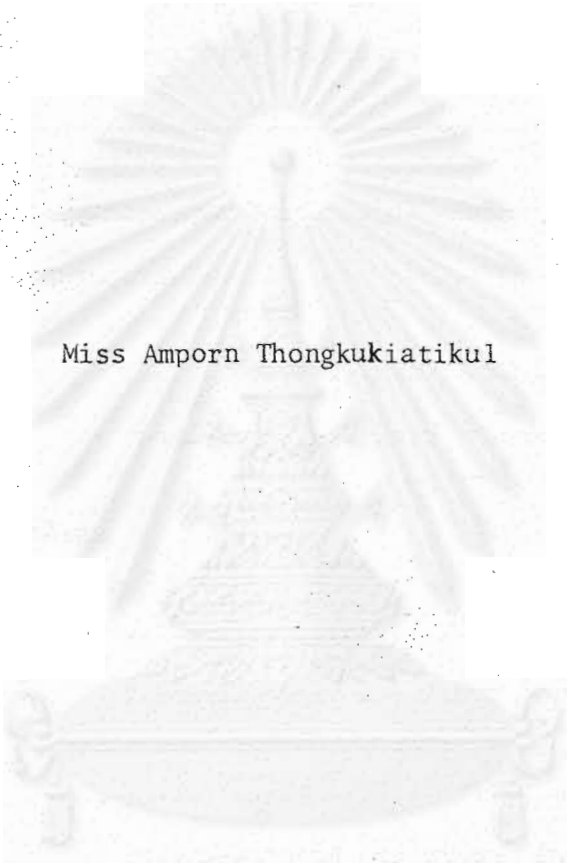
พ.ศ. 2531

ISBN 974-569-349-9

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

014424

Effect of Ethanol on the Secretion of Luteinizing Hormone
from Rat Pituitary Cells In vitro



Miss Amporn Thongkukiatikul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science

Department of Biology

Graduate School

Chulalongkorn University

1988

ISBN 974-569-349-9


หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของ เอทานอลต่อการหลังลูทีโนซึ่งสอร์โม่โนจาก เซลล์ค่อม ใต้สมยง
ของหนูแรทในหลอดทดลอง

โดย นางสาว อัมพร ทองภูเกียรติกุล


ภาควิชา ชีววิทยา


อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร. ทรรษา อัสวเรืองชัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้มอบวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ทรรษา อัสวเรืองชัย)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. เพ็ญใจ มุขประคอบ)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ทรรษา อัสวเรืองชัย)


.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรรรรณ สัตยาลัย)

สถาบันบัณฑิตพัฒนบริหารศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



อัมพร ทองภูเกียรติกุล : ผลของเอทานอลต่อการหลั่งลูทิไนซิงฮอร์โมนจากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูแรทในหลอดทดลอง (EFFECT OF ETHANOL ON THE SECRETION OF LUTEINIZING HORMONE FROM RAT PITUITARY CELLS IN VITRO) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร. พรรษา อัครเรืองชัย, 87 หน้า.

เพื่อที่จะศึกษาผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% (เทียบได้เท่ากับ 0.13 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว และ 0.2 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว ตามลำดับ) ต่อความสามารถในการหลั่งลูทิไนซิงฮอร์โมน (rLH) โดยใช้วิธีเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูแรทเพศเมียอายุ 150 - 200 วัน ทำการทดลองภายหลังจากพรีอินคิวเบชัน (preincubation) 48 ชั่วโมง การทดลองทำเริ่มเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.4% และ 0.6% ควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุม จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อครบ 24 ชั่วโมง แล้วเลี้ยงเซลล์ต่อไปในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีเอทานอลควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุมอีก 2 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 24 ชั่วโมง ตรวจหาระดับ rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ (Bioassay) และเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay) ผลการทดลองพบว่าเอทานอลทั้ง 2 ปริมาณ 0.4% และ 0.6% ไม่มีผลทำให้ค่าอิมมูโนแอกทวิตีเปลี่ยนแปลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่มีผลทำให้ค่าไบโอแอกทวิตีที่ตรวจได้ใน 24 ชั่วโมงแรกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยลดลงประมาณ 20% เมื่อให้เอทานอล 0.4% และลดลงประมาณ 50% เมื่อให้เอทานอล 0.6% และค่าไบโอแอกทวิตีจะเพิ่มขึ้นภายหลังจากล้างเอทานอลออก 24 ชั่วโมง (ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

เพื่อตรวจสอบว่าเอทานอลจะมีผลลดไบโอแอกทวิตีของ rLH อย่างต่อเนื่อง ถ้าให้เอทานอลต่อไปอีก 2 ครั้ง ซึ่งทำการทดลองที่ 2 โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีเอทานอล 0.4% และ 0.6% ควบคู่ไปกับกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยกลุ่มทดลองจะให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง จนครบทั้งหมด 6 ครั้ง แล้วตรวจหาระดับ rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ ผลการทดลองพบว่าเอทานอลมีผลลดค่าไบโอแอกทวิตีแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจะเพิ่มภายหลังจากล้างเอทานอลออก 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และค่าไบโอแอกทวิตีมีแนวโน้มจะลดลงในวันที่ 4 และ 6 เมื่อให้เอทานอลซ้ำอีก 2 ครั้ง ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเอทานอลปริมาณ 0.4% และ 0.6% มีผลโดยตรงต่อเซลล์ต่อมใต้สมองภายใน 24 ชั่วโมงแรกอย่างมีนัยสำคัญโดยไปลดค่าไบโอแอกทวิตีของ rLH แต่ไม่มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนทั้งหมดที่ส่งออกมา (วัดโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์) และการให้เอทานอลสลับกับการไม่ให้เอทานอลให้ผลยืนยันว่าเอทานอลมีผลลดไบโอแอกทวิตีประมาณ 11% (ให้เอทานอล 0.4%) และ 21% (ให้เอทานอล 0.6%)

ผลการวิจัยครั้งนี้จึงอาจสรุปได้ว่า แม้ว่าปริมาณลูทิไนซิงฮอร์โมนที่ส่งออกมาจากเซลล์ต่อมใต้สมองจะคงเดิม แต่คุณสมบัติทางชีวภาพของฮอร์โมนจะถูกเปลี่ยนไปอันเป็นผลเนื่องจากเอทานอล ทำให้ LH สูญเสียความสามารถในการไปกระตุ้นเซลล์เป้าหมาย

ภาควิชา ชีววิทยา
 สาขาวิชา สัตววิทยา
 ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

AMPORN THONGKUKIATIKUL : EFFECT OF ETHANOL ON THE SECRETION OF LUTEINIZING HORMONE FROM RAT PITUITARY CELLS IN VITRO.
THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. HANSA ASAWAROENGCHAI, Ph.D. 87 PP.

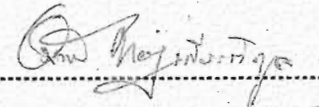

This investigation was carried out to determine the effect of ethanol at the concentration of 0.4% and 0.6%, equivalent to 0.13 and 0.2 gm./kgB.W. accordingly, on the ability of anterior pituitary cells to secrete luteinizing hormone (rLH). The experiment employed rat pituitary cells culture system harvested from 150 - 200 day old rat. Ethanol treatment was started after 48 hr. preincubation of pituitary cells in the plain medium. Experiment I, after 24 hr. incubation of the cells with ethanol, culture medium was collected along with the controls. The fresh medium was then added to all dishes. This incubation without ethanol was carried on for two more days with medium collected every 24 hr. rLH level in the medium was measured by mouse Leydig cells in vitro bioassay and double antibody radioimmunoassay. After 24 hr. exposure to ethanol, the result showed that ethanol did not cause any significant changes in radioimmunoactivity of rLH whereas it significantly decreased bioactivity by 20% and 50% for 0.4% and 0.6% ethanol respectively. LH bioactivity came back to the control level at the 24 hr. after removing ethanol.

To check whether the decrease in bioactivity of rLH caused by ethanol could be further suppressed if ethanol treatment was repeated for a few successions. The experiment II was designed for having pituitary cells exposed to ethanol at the same concentration used in experiment I. The treatment was repeated at every alternating day of medium change for the total of 3 treatments. Bioactivity of rLH in the medium was then measured in both the control and the treatment groups. Suppression on LH bioactivity was evidenced again as in the experiment I. Bioactivity of rLH still returned to the same level as in the control group within 24 hr. However it was noticed that there was a tendency of further bioactivity suppression on day 4 and 6 after repeating the treatments.

The finding indicated that ethanol has the direct effect on the pituitary cells' function by lowering bioactivity of rLH secreted at the first 24 hr. of exposure. Although the amount of rLH secreted was not changed this was indicated by no change in radioimmunoactivity of the hormone. Repeat the ethanol exposure for 3 consecutive rounds of with and without ethanol still confirmed the effect of ethanol on lowering rLH bioactivity by 11% and 21% for 0.4% and 0.6% ethanol by the end of 6 days.

In conclusion this study has shown that although pituitary cells secreted luteinizing hormone with constant amount in the presence of ethanol as indicated by radioimmunoassay, the bioactivity of this hormone was suppressed as shown by losing the ability to stimulate its target cells.

ภาควิชา ชีววิทยา
สาขาวิชา สัตววิทยา
ปีการศึกษา 2530

ลายมือชื่อนิสิต 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อ
รองศาสตราจารย์ ดร. ทรรษา อัสวเรืองชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้
คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยตั้งแต่เริ่มการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไข
วิทยานิพนธ์จนสำเร็จสมบูรณ์ และขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. พูลิพงศ์
วรวุฒิ หัวหน้าหน่วยวิจัยโพรเมต ภาควิชาชีววิทยา ตลอดจนคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชา
ที่ได้กรุณาให้ความรู้ทางวิชาการและความสะดวกในการใช้ห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พเยาว์ บุญประกอบ ที่ได้กรุณาเป็นประธาน
ในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ อรรวรรณ สัตยาลัย ที่ได้กรุณาเป็นกรรมการ
ในการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ สถาบัน National Institute of Child Health ที่ได้ให้ชอร์โมน
มาตรฐานและชอร์โมนสำหรับทดสอบ

ขอขอบคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์-นรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่ให้ใช้เครื่องแกมมาเคาน์เตอร์ คุณสมชัย ลีพิพัฒน์ไพบูลย์ และนักวิจัยทุกท่านในภาควิชา
ที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำ และให้กำลังใจด้วยดีมาตลอด

ขอขอบคุณ คุณจวีล เอกะวิภาต ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ ทนพระมหิตลาธิเบศร์ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยบางส่วน

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ที่ได้สนับสนุนทั้งทางด้านทุนทรัพย์
และกำลังใจแก่ผู้วิจัย เสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
การเผาผลาญเอทานอลในร่างกาย.....	1
พยาธิสรีรวิทยาของ เอทานอล.....	3
ความสัมพันธ์ระหว่างระบบประสาทไฮโปทาลามัส ต่อมไคสมองส่วนหน้า กับระบบสืบพันธุ์.....	5
ผลของเอทานอลต่อระบบการทำงานแบบประสานระหว่างไฮโปทาลามัส ต่อมไคสมองส่วนหน้า และระบบสืบพันธุ์.....	6
วัตถุประสงค์.....	10
2 สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ และสารเคมี.....	11
สัตว์ทดลอง.....	11
สารเคมี.....	12
อุปกรณ์.....	16
สารละลายที่ใช้และวิธีเตรียม.....	17
วิธีการทดลอง.....	22
การตรวจวัดหาปริมาณ rLH ด้วยวิธีไบโอแอสเสย์.....	27
การตรวจวัดหาปริมาณ เทสโทสเทอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนออสเสย์.....	30
การติดสลากด้วยไอโอดีน-125.....	34

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การตรวจวัด rIH ด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์.....	35
การแปลผลทางสถิติ.....	38
3 การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัด.....	40
4 ผลการทดลอง.....	46
5 สรุปและวิจารณ์.....	51
เอกสารอ้างอิง.....	56
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	72

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ตารางการทำไบโอแอสเสย์.....	29
2	แสดงการเติมสารละลายในหลอดต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน เทสโทส เตอโรน.....	31
3	วิธีทำเรดิโออิมมูนอแอสเสย์ (RIA) ของฮอร์โมน rLH.....	39
4	แสดงความจำเพาะของการตรวจหาปริมาณเทสโทส เตอโรนที่ทำปฏิกิริยากับ สารต่าง ๆ	41
5	แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี rLH _i ที่ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนอื่น ๆ	41
6	แสดงปริมาณสะสมค่า BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/5 x 10 ⁴ เซลล์) ตลอดการทดลองที่ 1 (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง) และการทดลองที่ 2 (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง).....	52

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	แผนผังแสดงการทดลองที่ 1 ผลระยะสั้นของเอทานอล 0.4% และ 0.6% (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง) ต่อการหลั่ง rLH จากเซลล์ต่อมไค้สมองส่วนหน้า.....	25
2	แผนผังแสดงการทดลองที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ต่อการหลั่ง rLH จากเซลล์ต่อมไค้สมองส่วนหน้า.....	26
3	กราฟของการคิดสลาทฮอร์โมน LH ด้วยไอโอดีน-125.....	36
4	กราฟแสดงผลการทดลองที่ 1 ผลของเอทานอลต่อการหลั่ง rLH จากเซลล์ต่อมไค้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก).....	49
5	กราฟแสดงผลการทดลองที่ 2 ผลของเอทานอลต่อค่า BA-rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมไค้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง).....	50

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



บทที่ 1

บทนำ

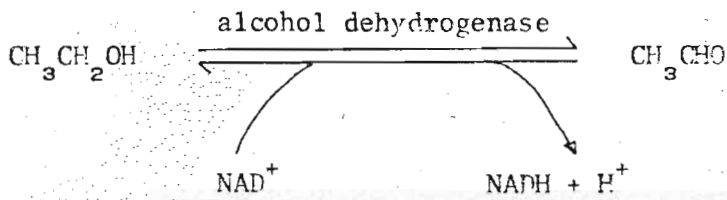
เอทานอล ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากในเครื่องดื่มเมานิคต่าง ๆ เป็นสารที่ได้จากขบวนการหมักหรือคองผลไม้ เอทานอลละลายได้ดีทั้งในน้ำและไขมัน จึงดูดซึมอย่างรวดเร็วจากทางเดินอาหาร และกระจายไปทั่วร่างกายอย่างรวดเร็วทางกระแสเลือด (Pawan, 1972) ไปออกฤทธิ์ที่ระบบหายใจ หลอดเลือด ระบบประสาท นอกจากนี้เอทานอลยังมีผลต่อการหลั่ง catecholamine ในสมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ซึ่งมีผลทำให้ผู้ดื่มคลายความเครียดได้ (Deturck และ Vogel, 1982) จึงทำให้เครื่องดื่มที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบเป็นที่นิยมกันอย่างกว้างขวาง

การเผาผลาญเอทานอลในร่างกาย

เอทานอลเป็นสารที่ถูกดูดซึมแล้วจะไม่มี การเก็บสะสมในร่างกาย แต่จะถูกกำจัดออกอย่างรวดเร็ว โดยประมาณ 95% จะถูกกำจัดโดยตับ ส่วนที่เหลือจะถูกกำจัดออกโดยทางปอดและผิวหนัง (Lieber, 1984)

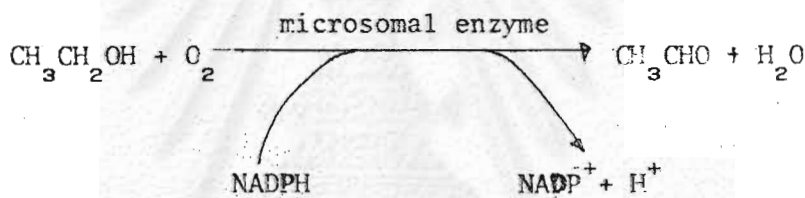
เอทานอลเมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์ตับจะถูกทำลายด้วยขบวนการออกซิเดชัน (oxidation) โดยเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์ (oxidize) เป็นอะเซตัลดีไฮด์ (acetaldehyde) โดยใช้เอนไซม์ (enzyme) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาซึ่งมีทั้งหมด 3 ขบวนการ

1. ขบวนการที่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase enzyme, ADH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ชนิดนี้จะพบมากในไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ของเซลล์ตับ และอาจพบได้บ้างในเซลล์บุทางเดินอาหาร โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนสจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นอะเซตัลดีไฮด์ โดยดึงไฮโดรเจนออกจากเอทานอล โดยมีโคเอนไซม์ (co-enzyme) Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD^+) เป็นตัวรับไฮโดรเจน ดังสมการ

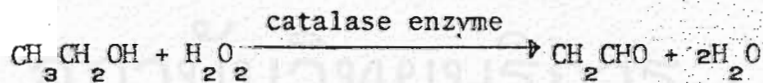


การกำจัดเอทานอลในตับส่วนใหญ่ใช้ขบวนการนี้ (Lieber, 1984)

2. ขบวนการที่ใช้ microsomal enzyme (Microsomal Ethanol Oxidizing System, MEOS) เป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์ตับ จะช่วยเร่งปฏิกิริยาในการดึงไฮโดรเจนออกจากแอลกอฮอล์ และมีออกซิเจนเป็นตัวรับไฮโดรเจน ดังสมการ



3. ขบวนการที่ใช้ catalase enzyme เป็นเอนไซม์ที่พบในเซลล์ตับ เอนไซม์นี้จะกระตุ้นการเผาผลาญเอทานอลได้ต่อเมื่อมี H_2O_2 อยู่ด้วยเท่านั้น ดังสมการ



สรุปได้ว่า การเผาผลาญเอทานอลในเซลล์ตับ ไม่ว่าจะเกิดจากการเร่งปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ แอลกอฮอล์ ดีไฮโดรจีเนส หรือ catalase enzyme หรือ microsomal enzyme ผลที่ได้คือ อะเซตัลดีไฮด์ซึ่งจะเกิดความรู้สึก NADH, H^+ , NADP^+ และพลังงานความร้อน แต่ไม่มีการเก็บพลังงานในรูป ATP จึงนับได้ว่าเป็นพลังงานสูญเสีย และผลิผลที่ได้ทั้งอะเซตัลดีไฮด์และไฮโดรเจนอิออนนั้นจะเป็นพิษและมีอันตรายต่อการทำงานของตับและอวัยวะต่าง ๆ อย่างมาก

พยาธิสรีรวิทยาของเอทานอล

ระบบประสาทส่วนกลาง

ผลของเอทานอลในกรณีเฉียบพลันนั้น จะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียร ตลอดจนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการรู้สติ จนถึงทำให้หมดสติ ชัก (Hofmann, 1983; Julien, 1974; Arena, 1979; Katzung, 1982) แต่ในผู้ดื่มที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรังนั้น เอทานอลจะทำให้มีอาการตกเลือดในสมอง ทำให้สมองส่วนซีรีบรัม (cerebrum) บวม และทำให้เซลล์สมองส่วน corpus collusum สลายตัวไป (Hofmann, 1983; Arena, 1974) และยังมีผลลด ion flux ในสมองอีกด้วย (Israel, et al. 1966)

ระบบโลหิต

การได้รับเอทานอลติดต่อกันนาน ๆ จะมีผลทำให้มีการสร้าง triglyceride และ fatty acid เพิ่มขึ้น อันเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เส้นเลือดอุดตัน (Boraona and Lieber, 1976; Harnell and Johnson, 1973 และ Lieber, 1984) และปริมาณ NADH และ H^+ ที่เพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้การสังเคราะห์กลูโคสผิดปกติ สลายไกลโคเจนได้น้อยลง ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ อาจทำให้ผู้ดื่มเกิดอาการช็อคและถึงแก่ความตายได้ (Freindel, 1962; Lumeng and Davis, 1970) นอกจากนี้ NADH และ H^+ ที่เพิ่มขึ้น ยังมีผลทำให้ acetyl CoA เปลี่ยนไปเป็น acetoacetic acid และ beta hydroxy butyrate มากขึ้น ทำให้มีสารคีโตน (ketone) ในเลือดสูงจนเกิด Ketoacidosis (Lieber, 1984) นอกจากนี้ปริมาณ LH^+ ที่เพิ่มขึ้นจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนของกล้ามเนื้อที่สำคัญ ได้แก่ กล้ามเนื้อหัวใจ อาจมีผลทำให้กล้ามเนื้อตาย หัวใจเต้นผิดปกติได้ (Katzung, 1982)

ตับ

เมื่อตับเผาผลาญเอทานอลจะทำให้อะเซตัลดีไฮด์เพิ่มขึ้น และอะเซตัลดีไฮด์ที่เพิ่มขึ้นนี้จะมีผลทำลายไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

(endoplasmic reticulum) ในเซลล์ตับ ทำให้เซลล์สร้างโปรตีนได้น้อยลง (Morland and Sjetnen, 1976; Rothschild et al. 1975) และมีผลทำให้เซลล์ตับไม่สามารถส่งโปรตีนที่เซลล์สังเคราะห์ขึ้น เข้าสู่กระแสเลือดได้ตามปกติ เกิดการสะสมไขมันและโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ยักนำไปเกิดภาวะตับอักเสบ (Schaffner and Pepper, 1970) และกลายเป็นตับแข็ง (Lieber, 1975)

โค

การได้รับเอทานอลปริมาณมาก ๆ จะมีผลทำให้โคซิมกรดยูริกได้น้อยลง ทำให้มีกรดยูริกตกค้างในกระแสเลือดมาก ซึ่งมีผลทำให้เกิดโรคเก๊าท์ (gout) ได้ (Lieber, 1976)

ระบบทางเดินอาหาร

เอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง ๆ จะทำลายระบบทางเดินอาหาร ทำให้กระเพาะเกิดการอักเสบ เนื่องจากเอทานอลจะทำลาย mucus ที่ทางเดินอาหาร การดื่มเอทานอลติดต่อกันนาน ๆ จึงทำให้ร่างกายขาดสารอาหารเพราะร่างกายจะดูดซึมสารอาหารและวิตามินได้น้อยลง (Tomasulo et al. 1968)

ผู้ดื่มเครื่องดื่มที่มีเอทานอลปริมาณมาก และเป็นระยะเวลาอนานนั้น นอกจากอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายจะทำงานผิดปกติแล้วนั้น เอทานอลยังมีผลต่อการทำงานของต่อมไร้ท่อ (Morgan, 1982; Van Thiel, 1980; Wright, 1976; Mark and Wright, 1977) ทำให้เกิดอาการผิดปกติต่าง ๆ ในร่างกาย เช่นมีผลกระตุ้นให้ต่อมหมวกไตทำงานผิดปกติสังเคราะห์คอร์ติซอล (cortisol) ออกมาผิดปกติ ทำให้คนไข้เป็นโรค pseudocushing syndrome มีอาการบวมบริเวณใบหน้า (Magraf et al. 1977; Bajpai et al. 1973; Kley et al. 1973) นอกจากนี้เอทานอลยังมีผลทำให้ต่อมพาราไทรอยด์ทำงานลดลง เกิดภาวะแคลเซียมในเลือดต่ำ (Morgan, 1982)

ผลของเอทานอลต่อระบบประสานงานระหว่างไฮโปทาลามัส ต่อมาได้สมองส่วนหน้า และ
ระบบสืบพันธุ์

เนื่องจากระบบประสาทจะควบคุมสมองส่วนไฮโปทาลามัสให้หลั่งโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง
ฮอร์โมน (Gonadotropin Releasing hormone, GnRH) (Everett, 1964) ซึ่งฮอร์โมนนี้จะไป
ควบคุมต่อมาได้สมองส่วนหน้าให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin hormone)
2 ชนิด คือ ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone, FSH) และ
ลูทีไนซิงฮอร์โมน (Luteinizing Hormone, LH) (Schally et al., 1971; Plant
et al., 1978) ซึ่งฮอร์โมนทั้ง 2 นี้จะร่วมกันควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ในทั้ง 2 เพศ

สำหรับในเพศชาย ต่อมาได้สมองส่วนหน้าจะหลั่งโกนาโดโทรปินฮอร์โมนเป็นแบบต่อ
เนื่อง (tonic) โดยมีระดับเท่า ๆ กันและสม่ำเสมอ ในเพศชายนี้ FSH จะเป็นฮอร์โมนที่
สำคัญต่อขบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) (Smith and Engle, 1927) และ
LH จะไปกระตุ้นเซลล์อินเตอร์สติเชียล (interstitial cells) ในถุงอัณฑะให้สร้างและ
หลั่งฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen hormone) (Evan et al., 1937; Fevold et al.,
1931)

แต่การทำงานของระบบสืบพันธุ์ในเพศหญิงจะสลับซับซ้อนกว่าเพศชาย โดยต่อมาได้
สมองส่วนหน้าจะหลั่ง FSH และ LH ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองนี้จะร่วมกันทำให้รังไข่เจริญเติบโต มี
ขนาดใหญ่ขึ้น และกระตุ้นฟอลลิเคิลให้สังเคราะห์ฮอร์โมนอีสตราไดออล (estradiol
hormone) ฮอร์โมนอีสตราไดออลที่สังเคราะห์ขึ้นจะมีผลย้อนกลับไปควบคุมการหลั่ง GnRH
จากไฮโปทาลามัส (Ferrin et al., 1983; Capple et al., 1981) ซึ่งจะควบคุม
การหลั่ง LH และ FSH จากต่อมาได้สมองอีกทอดหนึ่ง (Goodman and Karsch, 1980) เป็น
การควบคุมต่อมาได้สมองส่วนหน้ามิให้หลั่งฮอร์โมนออกมามากเกินไป เพื่อให้ฮอร์โมนเหล่านี้มี
ในระดับที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของฟอลลิเคิล เมื่อฟอลลิเคิลเจริญเติบโตเต็มที่ในช่วงก่อน
ตกไข่ ฮอร์โมนอีสตราไดออลจะถูกสร้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีผลย้อนกลับไปกระตุ้นต่อมา
ได้สมองส่วนหน้ามิให้หลั่ง LH และ FSH เพิ่มขึ้น (Knobil, 1980; Nakai et al., 1978)
เมื่อ LH มีระดับสูงสุด จะมีผลกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลแตกและมีไข่ตก (Schwartz et al.,
1972) ขณะเดียวกัน LH จะทำให้ฟอลลิเคิลเปลี่ยนแปลงรูปร่าง มีขนาดใหญ่ขึ้นเปลี่ยนไปเป็น

คอร์ปัส ลูเทียม (corpus luteum) และทำหน้าที่สังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการเตรียมสภาพภายในมดลูกให้เหมาะสมกับการฝังตัวของ Embryo (Short, 1961) ถ้าไข่ไม่ได้รับการผสม คอร์ปัส ลูเทียม จะสลายและฟอลลิเคิลก็จะเจริญเติบโตขึ้น

ด้วยความสัมพันธ์ดังกล่าวของฮอร์โมนจากอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ กับทั้งรายงานจำนวนมากที่กล่าวถึงผลกระทบของเอทานอลต่อระบบประสาทส่วนกลาง รวมทั้งสมองส่วนไฮโปทาลามัสด้วย ดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นจึงได้มีผู้สนใจถึงผลของเอทานอลต่อการทำงานของ hypothalamic-pituitary-gonadal-axis อย่างกว้างขวาง ทั้งในคนไข้ สัตว์ทดลอง ทั้งใน in vivo หรือ in vitro ทางด้านการแพทย์พบว่า 70% ถึง 80% ของคนไข้ชายที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง (alcoholism) จะมีการทำงานที่ผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ (Lester and Van Thiel, 1977; Willis et al. 1983; Van Thiel and Lester, 1978) อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดเล็ก seminiferous tubule มีจำนวนสเปิร์มลดลง สูญเสียความรู้สึกทางเพศ สูญเสีย secondary sex characteristic ขนบริเวณหน้าอกลดลง (Lindholm et al. 1978; Van Thiel and Lester, 1974; Van Thiel et al. 1975; Van Thiel and Lester, 1979; Gavalier et al. 1983) มีเต้านมขนาดใหญ่ (gynecomastia) (Van Thiel and Lester, 1979; Lloyd and William, 1948) มีการสร้างฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลง (Cobb et al. 1978; Mowat et al. 1976; Gordon et al. 1976) และในคนไข้หญิงที่เป็นโรคดังกล่าวก็จะมีรอบเดือนผิดปกติ ไม่มีการตกไข่ สูญเสียลักษณะเพศหญิง เป็นหมัน (Hugues et al. 1980; Cameron, 1957; Ryback, 1973) นอกจากนี้ยังมีการศึกษามากมายถึงผลของเอทานอลต่อการทำงานของต่อมใต้สมองส่วนหน้า และสมองส่วนไฮโปทาลามัส ทั้งในคนไข้ที่มีร่างกายแข็งแรงปกติและคนไข้ที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรัง ดังเช่น Toro และคณะ ในปี ค.ศ. 1973 ได้ศึกษาถึงผลของเอทานอลต่อระดับฮอร์โมนในเลือดที่ใช้วัดโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ (Radioimmuno assay) พบว่าระดับ LH และฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสเลือดในชายปกติไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 1.0 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ซึ่งผลดังกล่าว

จะตรงกับการทดลองของ Ylikaharie et al. 1978 และ Kent et al. 1973 แต่ในปี ค.ศ. 1977 Mendelson ได้ทำการวัดฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เช่นเดียวกันในชายปกติและให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 3 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (2.37 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) พบว่า ถ้าให้ดื่มเอทานอลปริมาณนี้ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจะค่อย ๆ เพิ่ม (ascending phase) ภายหลังจากเริ่มดื่ม 36 นาที และมีระดับสูงสุด (peak) เมื่อเวลา 84 นาที ภายหลังจากนี้ระดับแอลกอฮอล์ในเลือดจะค่อย ๆ ลดลง (decending phase) และเมื่อศึกษาระดับฮอร์โมน เทสโทส เทโรนพบว่า จะลดลงในช่วงที่ระดับแอลกอฮอล์ในเลือด อยู่ในช่วงที่กำลังเพิ่ม (ภายหลังจากเริ่มดื่มนาน 36 นาที) และลดต่ำสุดเมื่อระดับแอลกอฮอล์ ในเลือดสูงสุด (ภายหลังจากเริ่มดื่มนาน 84 นาที) แต่ระดับ LH จะเพิ่มขึ้นเฉพาะช่วงที่มี แอลกอฮอล์ในเลือดสูงสุด เท่านั้น (ภายหลังจากเริ่มดื่ม 84 นาที) เขาจึงได้เสนอว่า เอทานอลจะมีผลลดการสร้างฮอร์โมน เทสโทส เทโรนที่ Leydig cells โดยตรง โดยมีผล ทำให้ระดับฮอร์โมน เทสโทส เทโรนลดลง และมีผลย้อนกลับไปควบคุมสมองส่วนไฮโปทาลามัส และต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้มีการหลั่ง LH เพิ่มขึ้น (long loop mechanism) แต่ รายงานดังกล่าวข้างต้นจะแตกต่างจากการศึกษาของ Gordon et al. (1976) ที่วัดฮอร์โมน ด้วยวิธี เรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ เช่นกัน ในชายที่แข็งแรงปกติ และให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 3 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 25 วัน พบว่าปริมาณ LH และฮอร์โมน เทสโทส เทโรน ใน กระแส เลือดลดลงอย่างชัดเจน ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับผลการทดลองของ Van Thiel et al. (1976) ที่วัดฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ในคนไข้ชายที่เป็นโรคพิษสุราเรื้อรังและให้ ดื่มเอทานอลปริมาณ 2 มิลลิลิตร/กิโลกรัม น้ำหนักตัว (1.58 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) เพียง ครั้งเดียว

จากรายงานดังกล่าวข้างต้นจึงสรุปได้ว่า 1) ถ้าให้ดื่มเอทานอลปริมาณต่ำกว่า 2.3 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เอทานอลจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ LH ที่วัดโดยเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ในกระแสเลือด 2) ถ้าให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 2.3-3 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว เอทานอลจะมี ผลลด LH ที่วัดโดยเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ในกระแสเลือด 3) ผลของเอทานอลในระยะสั้นจะ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับ LH ในกระแสเลือดที่วัดฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ 4) ผลของเอทานอลในระยะยาวจะมีผลทำให้ระดับ LH ในกระแสเลือดที่วัดโดยเรดิโออิมมิวโน แอสเสย์ลดลง 5) ไม่สามารถบอกได้ว่าเอทานอลมีผลต่อการทำงานของส่วนไฮโปทาลามัสหรือ

มีผลต่อการทำงานของต่อมได้สมองส่วนหน้าหรือทั้งสองตำแหน่ง

การศึกษาในมนุษย์ยังคงไม่สามารถแสดงผลที่ชัดเจนได้ว่า เอทานอลไปมีผลโดยตรงต่อต่อมได้สมองส่วนหน้าหรือสมองส่วนไฮโปทาลามัส จึงมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของเอทานอลในสัตว์ทดลอง เช่น หนูแรทเพศเมียที่ได้รับเอทานอลปริมาณที่มากกว่า 2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในระยะเวลาที่นานกว่า 12 วัน พบว่ามีรังไข่ผ่อ วงฮีสตริส (estrous cycle) ผิดปรกติ ระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนลดลง (Gavaler et al. 1980; Eskay et al. 1981; Van Thiel et al. 1977) และในหนูแรทเพศผู้ที่ให้กินอาหารเหลวที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบ 36% (1.24 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) เป็นเวลานานกว่า 41 วัน ก็จะมีระดับฮอร์โมนเพศเทสโทสโตโรนลดลง มีการเปลี่ยนแปลงทางด้าน histology ของอวัยวะ seminiferous tubules มีขนาดเล็กลง มีจำนวน fiber เพิ่มขึ้น (Van Thiel et al. 1975; Anderson et al. 1980; Van Thiel et al. 1979; Gavaler et al. 1983) จากการศึกษาทั้ง *in vitro* และ *in vivo* พบว่า เอทานอลจะมีผลโดยตรงต่อ Leydig cells ทำให้สร้างฮอร์โมนเทสโทสโตโรนลดลง เนื่องจาก 1) เอทานอล (ปริมาณ 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) จะลดการทำงานของ (activity) ของ 3β -dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับขบวนการสังเคราะห์สเตอรอยด์ฮอร์โมน (Gordon et al. 1978; Johnston et al. 1981) 2) เอทานอล (3.9 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) จะมีผลลดจำนวน receptor ของ LH ที่ membrane ของ Leydig cells (Gnat et al. 1982; Bhalla et al. 1983; Gnanprakasam et al. 1979) 3) เอทานอล (2.1 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) จะมีผลทำให้ secondary messenger (cAMP) ลดลง (Ellingboe and Varanelli, 1979) เอทานอลนอกจากจะมีผลต่อ Leydig cells ดังกล่าวแล้ว ยังมีผลต่อดับอ่อน ทำให้ดับอ่อนสร้าง testosterone binding globulin เพิ่มขึ้น (Cicero et al. 1979) และมีผลเพิ่มเมตาบอลิซึม (metabolism) ของฮอร์โมนเทสโทสโตโรน ซึ่งเป็นการเสริมทำให้ระดับฮอร์โมนเทสโทสโตโรนในกระแสเลือดลดลงยิ่งขึ้น นอกจากนี้ เอทานอลไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะ สอดคล้องกับการลดระดับฮอร์โมนเทสโทสโตโรนในกระแสเลือด ซึ่งเหล่านี้อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผู้ดื่มเอทานอลในระยะเวลานานเป็นหมัน นอกจากนี้ในปี 1980 Redmond ได้ทำการศึกษาถึงผลของเอทานอลต่อการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัส และต่อมได้สมองส่วนหน้า โดยวัดปริมาณ LH ในกระแสเลือดด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ใน

หนูแรทเพศผู้ที่ได้รับเอทานอลปริมาณ 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทาง intra arterial ทุก 10 นาที นาน 240 นาที พบว่าระดับ LH ในกระแสเลือดลดลงอย่างชัดเจน แต่ระดับ FSH ไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งตรงกับผลการทดลองของ Dees et al (1985) ที่วัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ และให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าปริมาณ LH ในกระแสเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติภายหลังจากให้ดื่มเอทานอลนาน 15 ชั่วโมง แต่ปริมาณ FSH ไม่เปลี่ยนแปลง แต่การศึกษาดังกล่าวจะแตกต่างจากการศึกษาของ Badr et al. (1979) ที่วัดปริมาณฮอร์โมนในเลือดด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในหนูโมซัสเพศผู้ที่ได้รับเอทานอลปริมาณ 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าปริมาณ LH ในกระแสเลือดไม่เปลี่ยนแปลงภายหลังจากให้ดื่มเอทานอลนาน 1 ชั่วโมง

นอกจากจะมีการศึกษาในมนุษย์และหนูแล้วยังมีการศึกษาในลิง Mello และคณะ (1985) ได้วัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในลิงเพศผู้ (Macaca mulatta) ที่ให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 2.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 3.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าเอทานอลไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ LH ในกระแสเลือดตลอดระยะเวลาภายหลังจากดื่มเอทานอล 210 ชั่วโมง ซึ่งจะตรงกับผลการทดลองของ Pameter et al (1981) ที่วัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ในสุนัข เพศผู้ที่ถูกตัดต่อมเพศและให้ดื่มเอทานอลปริมาณ 1.92 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน นาน 28 วัน

การศึกษาดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นยังไม่สามารถสรุปได้ว่า ค่าค่าสุดของเอทานอลที่จะมีผลต่อปริมาณการหลั่ง LH จากต่อมใต้สมองเป็นเท่าใดแน่ อีกทั้งยังไม่อาจมั่นใจให้ชัดเจนได้ว่า เอทานอลไปมีผลที่เซลล์ต่อมใต้สมองหรือไม่อย่างไร เพราะรายงานดังกล่าวข้างต้นเป็นรายงานจากการทดลอง in vivo ที่มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องของหลายประการ ที่ทำให้การควบคุมสภาพการทดลองยุ่งยากและแปลผลเจาะจงไม่ได้ ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงผลของเอทานอลที่มีต่อต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยตรงในการหลั่ง LH โดยใช้ประโยชน์ของเทคนิคที่ทันสมัยกว่า ละเอียดกว่า ควบคุมสภาพการทดลองได้ง่ายกว่า และให้ผลที่ง่ายต่อการแปลข้อมูล ซึ่งได้แก่การเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูแรทเพศเมีย เป็นแบบจำลองในการศึกษา เพื่อจะได้ดูผลของเอทานอลต่อการทำงานของเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าโดยตรง โดยใช้หน้าที่การสร้างและการหลั่งฮอร์โมนเป็นตัวบ่งชี้ ซึ่งเชื่อว่าอาจเป็นแนวทางเพื่อนำไปสู่

ข้อสรุปที่แน่นอน เกี่ยวกับกลไกที่ เอทานอลมีต่อ เซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าในการหลั่ง LH

นอกจากนี้การวัดปริมาณฮอร์โมนจะวัดด้วย 2 วิธี คือ เรดิโออิมมูโนแอสเสย์และไบโอแอสเสย์ ซึ่งเป็นการวัดอิมมูโนแอกทिवิตีกับไบโอแอกทिवิตีของฮอร์โมน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาถึงผลโดยตรงของ เอทานอลต่อ เซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าในการหลั่ง LH ด้วยวิธีการวัดอิมมูโนแอกทिवิตีและไบโอแอกทिवิตีของฮอร์โมน
2. เพื่อสามารถอธิบายถึงกลไกที่ เอทานอลมีผลต่อการสร้างและการหลั่ง LH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สัตว์ทดลอง อุปกรณ์ และสารเคมี

สัตว์ทดลอง

ใช้สัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ

1. หนูแรท พันธุ์ Wistar เพศเมีย อายุ 2-3 เดือน (น้ำหนัก 150-200 กรัม) เพื่อใช้เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้ามาเพาะเลี้ยง
2. หนูไมซ์ (mice) พันธุ์สวิส เพศผู้ อายุ 28 วัน เพื่อใช้ Leydig cells จากอัณฑะสำหรับหาไบโอแอสเสย์ของลูทีไนซิงฮอว์โมน (Bioassay rLH)

สถานที่เลี้ยง หนูแรทและหนูไมซ์เลี้ยงในเรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งปรับให้มีอุณหภูมิห้องประมาณ $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ และความชื้นแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง ระหว่างเวลา 6.00-20.00 น. และมีด 10 ชั่วโมง โดยเครื่องควบคุมไฟฟ้าอัตโนมัติ และให้อาหารสำเร็จรูปมาตรฐานของบริษัท เจริญโภคภัณฑ์ อาหารสัตว์ และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลา

การเตรียมสัตว์ทดลอง การตรวจวงอัสตราัส การผสมพันธุ์ การตรวจการตั้งครรภ์ และการเลี้ยงลูกอ่อน

ห้องปฏิบัติการ

1. เรือนเลี้ยงหนูของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. ห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยโพรเมต ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. สารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมไทมัส
 - 1.1 Minimum Essential Medium (MEM) : Cat. No. 410-1100, Biological Company, U.S.A. สำหรับแยกเซลล์ (dissociation)
 - 1.2 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) : Cat. No. 4301600, Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., U.S.A.
 - 1.3 HEPES : (N-2 Hydroxyethyl piparazine-N-2-ethanesulfonic acid) No. H-3375, Sigma Chemical Company, U.S.A.
 - 1.4 Sodium bicarbonate (NaHCO_3) : E. Merck , Darmstadt, Germany.
 - 1.5 Penicillin-streptomycin solution (penicillin 10,000 U/ml. streptomycin 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$.) Cat. No. 600-5140, Gibco Laboratories Inc., U.S.A.
 - 1.6 Fungizone (Amphotericin B-250 g/ml.) Cat. No. 600-5295 Grand Island Biological Company. U.S.A.
 - 1.7 Fetal Bovine Serum (FBS) : Cat. No. 200-6140, Gibco New Zealand Ltd., U.S.A.
 - 1.8 Horse Serum (HS) Cat. No. 200-6050, Gibco Laboratories, U.S.A.
 - 1.9 Bovine Serum Albumin (BSA) fraction V. Cat. No. A 4378 Sigma Chemical Company. U.S.A.
 - 1.10 Trypsin (2.5%) Cat. No. 610-5095. Gibco Laboratories U.S.A.

2. อาหารเลี้ยง Leydig cells ในการทำ bioassay

2.1 Mediam 199 (M 199) : Cat. No. 400-1100, Grand Island Biological Company, U.S.A.

3. สารเคมีที่ใช้ในการติดสลาภ rLH ด้วยไอโอดีน-125

3.1 Sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) : E Merck, Darmstadt, Germany.

3.2 Disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

3.3 Sodium chloride (NaCl) : E. Merck, Darmstadt, Germany.

3.4 Thiomersal No. T 5152 Sigma Chemical Company, U.S.A.

3.5 Gelatin : Difco Laboratories, U.S.A.

3.6 EDTA : No.1-8993, Baker Chemical Co., U.S.A.

3.7 Sodium-meta-bisulfite : No. 1-3552, Baker Chemical Co., U.S.A.

3.8 Sucrose : E. May & Baker Ltd., England.

3.9 Potassium Iodide : A. R. (May & Baker Ltd., England)

3.10 Sephadex G-25 Fine : No. 17-0032-01, Pharmacia Fine

3.11 Chloramine-T (trihydrate) : E. Merck, Darmstadt, Germany

4. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณ rLH โดยวิธี RIA

4.1 Sodium dihydrogen phosphate ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) E. Merck, Darmstadt, Germany.

4.2 Disodium hydrogen phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) E. Merck, Darmstadt, Germany.

- 4.3 Sodium chloride (NaCl) : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- 4.4 Diethyl ether : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- 4.5 Charcoal reagent : Batch No. 82/83/R, WHO. RIA Reagent Programme, Switzerland.
- 4.6 Dextran reagent : Batch. No. 82/83/S., WHO, RIA Reagent Programme, Switzerland.
- 4.7 Gelatin : Difco Laboratory, U.S.A.
- 4.8 Toluene : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- 4.9 Dioxane : E. Merck, Darmstadt, Germany.
- 4.10 Liquiflour : No. NEF-903, New England Nuclear, U.S.A.

5. ฮอรโมน

- 5.1 Rat luteinizing hormone, NIDDK-rLH-RP-2 (AFP-566C) Pituitary Hormone & Antisera Center, California, U.S.A.
- 5.2 Rat luteinizing hormone antigen, NIDDK-rLH-I-6 (AFP-8034C), Pituitary Hormone & Antisera Center, California, U.S.A.
- 5.3 Testosterone Standard Batch No. 83/N., WHO RIA Reagent, Programme, Switzerland.

6. แอนติบอดี

- 6.1 Rat luteinizing hormone antiserum from rabbit (first antibody) NIDDK-anti-rLH-S-10, Pituitary Hormone & Antisera Center California, U.S.A.

6.2 Donkey anti-rabbit serum : WHO RIA Reagent Programme

6.3 Antiserum to testosterone : Batch No. K 888510,
WHO/RIA Reagent Programme, Switzerland.

7. สารกัมมันตรังสี

7.1 (1, 2, 6, 7-³H) testosterone : Batch No. B 5A,
Amersham International plc, England.

7.2 Na¹²⁵I Batch No. B 56, Amersham International,
England.

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight. W. M. Ainsworth & Son Inc.,
U.S.A.

2. เครื่องชั่งหยาบ : Mettler E 200 Metter Instrument, Switzerland.

3. Micropipetes : pipetteman M. 81 Gilson France, Eppendorf
3130 Germany; Pipette Gun Clay Adams, U.S.A.

4. Dry-Block Heater : Model DB 3, Tecan Laboratory and
Industrial Equipment, U.S.A.

5. Hood for cell culture Serial No. NBB-193, U.S.A.

6. Tissue Culture dish 60x15 mm/vents : Cat. No. 1-50288,
Numelon Delta SI, Denmark.

7. β -liquid scintillation counter Rackbeta LKB Wallac Co.,
Midel. BPL. U.S.A.

8. Magnetic stirrer : S-18520 Thermolyne Corporation Iowa,
U.S.A.

014424

9. Mixer : M 16715 Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.
10. pH meter : 5985, Cole Parmer Instrument Company,
U.S.A.
11. Refrigerated centrifuge : Model PR-J, International
Equipment Company, U.S.A.
12. Dynac Centrifuge : Clay adams. Becton Dickinson &
Company Parsippany, U.S.A.
13. Gamma Counter : 1 KB-Wallac No. 1260, Finland.
14. Fraction collector : Model 1850, Instrumentation
Specialties Company, U.S.A.
15. Incubator : UN-1 Trol-CO₂ incubator model 329, Forma
Scientific marietta, U.S.A.
16. Dessicator with pump : Model GL 32, Glaswerk Wortheim,
U.S.A.
17. Millipore size 0.22 μ Cat. No. G. SWP 04700, Millipore
Corp. Bedford, U.S.A.
18. Millipore size 0.45 Cat. No. G. SWP.02500, Millipore
Corp. Bedford, U.S.A.
19. Bellco Dissociating Flask : Belco Glass, Inc., U.S.A.
20. Multiwell tissue culture plate : Falcon, Sweden.
21. Dunoff-incubator-Shaker : Model 3575-1, Lab-Line
instrument Inc., U.S.A.
22. Phase contrast microscope : AO Series 10, American
Optical Co., U.S.A.

23. Inverted Microscope : Model CKP, Tokyo, Japan.
24. Hemacytometer : American optical scientific instrument,
U.S.A.
25. Counter : Laboratory counter, Clay Adams, Dickinson Co.,
U.S.A.

วิธีการทดลอง

สารละลายที่ใช้และวิธีการเตรียม

1. อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

1.1 อาหารเลี้ยงเซลล์สำหรับแยกเซลล์ต่อมไคสมอล

ละลายสารต่อไปนี้

MEM 1.14 กรัม

โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.035 กรัม

ในน้ำกลั่น (กลั่นซ้ำ 3 ครั้ง) ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 และเติมน้ำกลั่นจน
ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นจึงกรองผ่าน millipore ขนาด 0.22 μ และเก็บอาหาร
เลี้ยงเซลล์นี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทุกครั้งที่ใช้ต้องละลาย 0.1% BSA และ 0.1% trypsin ใส
ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้

1.2 อาหารเลี้ยงเซลล์ต่อมไคสมอลส่วนหน้า

ละลายสารต่อไปนี้

DMEM 20 กรัม

HEPES 11.96 กรัม

โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.74 กรัม

ในน้ำกลั่น แล้วเติมเพนนิซิลิน สเตรพโตมัยซิน 5 มิลลิลิตร และ
fungizone 0.4 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 และเติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ

1,750 มิลลิลิตร กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ได้ทั้งหมดผ่าน millipore ขนาด 0.22 μ แล้วเติม HS 200 มิลลิลิตร และ FBS 50 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาตรสุทธิของอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น 2 ลิตร จากนั้นแบ่งใส่ขวดขนาด 100 มิลลิลิตร และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

2. สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาฤทธิ์ในซิงฮอร์โมนด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ (bioassay)

2.1 อาหารสำหรับเลี้ยง Leydig cells

ละลาย M 199 0.992 กรัม

HEPES 0.596 กรัม

โซเดียมไบคาร์บอเนต 0.035 กรัม

สารละลายเพนนิซิลิน-สเตรพโตมัยซิน 1 มิลลิลิตร

ในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.3-7.4 และเติมน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวผ่าน millipore ขนาด 0.22 μ และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ทุกครั้งที่จะใช้จะต้องนำอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวมาเติม BSA 0.2 กรัม

2.2 สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธี RIA

ก. Assay buffer เตรียมโดยใช้สารต่อไปนี้

sodium dihydrogen phosphate 2.35 กรัม

disodium hydrogen phosphate 11.60 กรัม

sodium chloride 8.80 กรัม

thiomersal 0.10 กรัม

gelatin 1.00 กรัม

นำสารดังกล่าวมาละลายในน้ำกลั่น (โดยอุณหภูมิของน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตรให้ละลายจนหมดก่อน) แล้วปรับ pH สารละลายให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ใช้ได้นาน 1 เดือน

ข. Charcoal Suspension

ละลาย dextran 0.0625 กรัม ใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม กวนให้เข้ากันเป็นเวลา 30 วินาที เก็บไว้

ที่ 4 ช เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน เวลาที่จะใช้จะต้องนำไปกวนให้เข้ากัน และจะต้องวางอยู่บนถาดน้ำแข็งตลอดเวลาที่ใช้

ค. Counting Solution

เตรียมโดยใช้

toluene	3,000	มิลลิลิตร
liquiflour	128	มิลลิลิตร
dioxane	600	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บไว้ในขวดสีน้ำตาล

ง. การเตรียม Testosterone working tracer

จาก (1, 2, 6, 7-³H) testosterone ซึ่งละลายใน benzene : ethanol ในอัตราส่วน 9 : 1 เป็น testosterone stock tracer ที่มีความแรง 5 μ Ci/มิลลิลิตร นำ testosterone stock tracer จำนวน 1 มิลลิลิตร มาเป่าให้แห้งด้วย compressed air แล้วเติม assay buffer 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ testosterone working tracer ที่มีความแรง 100 nCi/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 ช เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

จ. การเตรียม Testosterone antisera

นำ testosterone antiserum จาก WHO ซึ่งอยู่ในสภาพที่ทำให้งแห้ง (lyophilized) มาเติม assay buffer 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายจนหมด เตรียมแล้วใช้ได้ทันที เก็บไว้ที่ 4 ช ขณะใช้เตรียมใหม่ทุกครั้ง

ฉ. การเตรียม Testosterone standard

Testosterone standard จาก WHO ซึ่งบรรจุอยู่ใน ampoule ซึ่งมีปริมาตร 500 μ l. และความเข้มข้น 220 nM/L นำมาเติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร ได้เป็น stock testosterone standard ที่มีความเข้มข้น 22 nM/L เก็บไว้ที่ 4 ช ขณะใช้เตรียมใหม่ทุกครั้ง

สำหรับการเตรียม standard curve ของ testosterone assay ทำโดยนำ Stock testosterone standard มา 500 μ l แล้วเติม assay buffer 4.5 มิลลิลิตร จะได้ testosterone standard ความเข้มข้นแรก 1,100 fm/500 μ l จากนั้นทำ serial dilution ลงไปอีก 7 ลำดับ ซึ่งจะให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8.59 fm/500 μ l

3. สารละลายสำหรับวิเคราะห์หาฤทธิ์ในซิงฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (Radioimmunoassay)

3.1 stock solution A โมโนเบส โซเดียม ฟอสเฟต 0.5 M

ละลายโซเดียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, M.W. 137.99) หนัก 69.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.2 stock solution B ไดเบส โซเดียม ฟอสเฟต 0.5 M

ละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, M.W. 177.99) หนัก 89.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.3 โซเดียม ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (PB 0.5 M, pH 7.5)

ผสม stock solution A 100 มิลลิลิตร กับ stock solution B 200 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเก็บไว้ในขวดเล็กตามปริมาณที่จะนำออกมาใช้ เก็บไว้ที่ -20°C

3.4 โซเดียมฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (PB 0.05 M, pH 7.5)

เจือจางโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 M ด้วยการเติมน้ำกลั่นลงในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.5 M 50 มิลลิลิตร จนปริมาตรครบ 500 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้นาน 6 เดือน

3.5 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (PBS 0.05 M, pH 7.0)

ละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 143.0 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร

เติม

stock solution A 151 มิลลิลิตร

stock solution B 239 มิลลิลิตร

thiomersal 1.75 มิลลิลิตร

ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 17.5 ลิตร

3.6 EDTA-PBS

ละลาย EDTA 18.0 กรัม ใน PBS 800 มิลลิลิตร โดยนำไปอุ่นบน hot plate ปรับ pH ให้ได้ 7.0 แล้วเติม PBS 0.05 M ให้ได้ปริมาตรครบ 1 ลิตร เก็บไว้ที่ 4 °C ได้นาน 6 เดือน

3.7 Gel-PBS (0.05 M, pH 7.0)

ละลาย gelatin 1 กรัม ใน PBS 1 ลิตร โดยนำไปอุ่นบน hot plates เก็บไว้ที่ -20 °C ได้นาน 6 เดือน ก่อนใช้ทุกครั้งต้องปรับ pH ให้ได้ 7

3.8 สารละลายคลอรามิน-ที (2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

ละลายคลอรามิน-ที 100 มิลลิกรัม ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 50 มิลลิลิตร สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.9 สารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์

ละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟท์ 100 มิลลิกรัม ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.5 สารละลายนี้ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

3.10 16% ซูโครสในสารละลาย Gel-PBS ที่มีโปตัสเซียมไอโอดด์ 1% (transfer solution)

ละลายซูโครส 16.0 กรัม และโปตัสเซียมไอโอดด์ (KI) 1.0 กรัม ใน Gel-PBS 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 °C

3.11 8% ซูโครสในสารละลาย Gel-PBS ที่มีโปตัสเซียมไอโอดด์ 1%

ละลายซูโครส 8 กรัม ในสารละลาย Gel-PBS 0.05 M pH 7.0 100 มิลลิลิตร ที่มีโปตัสเซียมไอโอดด์ละลายอยู่ 1 กรัม เก็บไว้ที่ -20 °C

3.12 ฮอร์โมนสำหรับติดสลาท

rLH-I-6 (AFP-8034 C) เป็นฮอร์โมนที่ใช้สำหรับติดสลาทด้วย ^{125}I ได้จาก NIADDK อยู่ในสภาพที่ทำให้แห้ง (lyophilized) บรรจุ 100 $\mu\text{g}/\text{vial}$ นำมาละลายใน phosphate buffer 0.5 M pH 7.5 10 มิลลิลิตร แบ่งเก็บใส่ขวดเล็ก ขวดละ 50 μl ซึ่งจะมี rLH-I-6 อยู่ 5 μg เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

3.13 ฮอร์โมนมาตรฐาน

rLH-RP-2 (AFP-566 C) จาก NIADDK เป็นฮอร์โมนมาตรฐาน ซึ่งอยู่ในสภาวะที่ถูกทำให้แห้งบรรจุ 5 $\mu\text{g}/\text{vial}$ นำมาละลายด้วย PBS 1 มิลลิลิตร แบ่งเก็บไว้ในขวดเล็กขวดละ 125 $\text{ng}/25 \mu\text{l}$ เป็น rLH มาตรฐานข้างต้น (stock standard rLH) เก็บไว้ที่ -20°C ได้นาน 6 เดือน

วิธีการทดลอง

การแยกเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูแรท

การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทเพศเมียอายุ 150-200 วัน ระยะ proestrus การแยกเซลล์ และเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้านี้คิดค้นมาจากวิธีของ Hymer (1975) ดังนี้คือ ใช้กิโกลินตัดคอหนูแรทแล้วเปิดกระดูกและพลิกสมองขึ้นทั้งหมด จะพบเยื่อ sella diaphragm คลุมต่อมสมองอยู่ และต่อมใต้สมองจะอยู่ในแอ่ง sella turcica ของ sphenoid bone อีกที จึงใช้ปากคีบที่ปลอดเชื้อ (โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% แล้วผ่านไบนอนเปลวไฟ) เขี่ยแยก sella diaphragm ออก ใช้ปากคีบเขี่ยเอาต่อมใต้สมองส่วนหลังออก แล้วจึงเขี่ยเอาต่อมใต้สมองส่วนหน้าออกมาล้าง 2 ครั้ง ในอาหารที่ใช้สำหรับแยกเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย Minimal Essential Medium, BSA 0.1%, NaHCO_3 0.035%, penicillin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. และ streptomycin 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. ที่ pH 7.2 แล้วจึงใช้ใบมีดโกนที่ปลอดเชื้อตัดและสับต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้ละเอียด นำกลุ่มเซลล์ที่ได้ใส่ใน Belco dissociating flask ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับแยกเซลล์ 10 มิลลิลิตร และ trypsin 0.1% และนำไปปั่นเบา ๆ ด้วย magnetic propelle

เพื่อให้สารละลายหมุนเวียนตลอดเวลาใน water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°ซ จากนั้น ทุก ๆ 20 นาทีจะใช้ pasture pipette ที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายดังกล่าวขึ้นลง 20 ครั้ง เพื่อช่วยให้เซลล์แยกกันได้ดีขึ้น ปล่อยให้เอนไซม์ทำงานต่อไปอีก 20-30 นาที จนสังเกตเห็นว่า ไม่มีเนื้อเยื่อที่เป็นชิ้นใหญ่ ๆ อยู่ (จะใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง) แล้วกรองเซลล์โดยการกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวทั้งหมดผ่าน nylon mesh (Nitex 102) เพื่อแยกเซลล์เดี่ยวออกจากเนื้อเยื่อที่ถุกย่อยซึ่งจะได้เซลล์เดี่ยว ๆ อยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่กรองแล้วนั้นไปปั่นที่ 100 x G (1,500 รอบต่อนาที) นาน 15 นาที แล้วดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง นำกลุ่มเซลล์ที่ได้ไปกระจายอีกครั้งในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งประกอบด้วย Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), horse serum 10%, fetal bovine serum 2.5%, penicillin 50 µg/ml., streptomycin 50 µg/ml. และ Fungizone 0.05 µg/ml. จากนั้นจะนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้อง phase contrast microscope โดยใช้ haemocytometer และตรวจหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (viability) ของเซลล์ด้วยการหยด 0.1% trypan blue 1 หยด และ cell suspension 1 หยด เขย่า ค้างทิ้งไว้นาน 30 นาทีแล้วจึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสี เซลล์ตายจะติดสี น้ำเงิน (แต่ละการทดลองเซลล์ที่ใช้มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตประมาณ 80-90% จากนั้นแบ่งเซลล์ใส่ภาชนะพลาสติกหลุมสำหรับเลี้ยงเซลล์ (Multidish 24 wells) จำนวน 10^5 เซลล์/2 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเซลล์/หลุม) นำภาชนะเลี้ยงเซลล์ไปใส่ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มีอุณหภูมิ 37°ซ 5% CO₂ ในอากาศที่มีความชื้น

การทดลอง

ภายหลังจากแยกเซลล์ต่อมได้ส่องส่วนหน้าของท่อนแตรและเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งถือว่าเป็นระยะ preincubation เป็นระยะที่ไม่มีการเติมสารใด ๆ ระยะเวลาดังกล่าวจะเป็นระยะเวลาที่เซลล์ที่แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ นั้น จะได้ซ่อมแซมตัวเอง และปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ เมื่อ preincubation ครบ 48 ชั่วโมงแล้ว นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้นี้มาตรวจสอบลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เซลล์จะมีรูปร่างคล้ายกระสวยสั้น ๆ และเกาะติดกับพื้นภาชนะพลาสติกหลุม และมีส่วนน้อยที่ยังมีรูปร่างเดิม (เซลล์กลม) และไม่เกาะติดกับพื้นภาชนะพลาสติกหลุม การเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จะนำอาหารเลี้ยงเซลล์ไปปั่นแยกเอาเซลล์ออกที่ 100 x G (1,500 รอบต่อนาที) นาน 15 นาที

แล้วเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไควไว้ที่ -20°C และต้องนำเซลล์ที่ไม่เกาะติดภาชนะพลาสติกหลุมเข้าหลุมเดิมทุกครั้งที่มีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

การทดลองที่ 1 ผลระยะสั้นของเอทานอล ให้เอทานอล 0.4% และ 0.6% 24 ชั่วโมง
ต่อการหลัง LH จากเซลล์ต่อมไคสมองส่วนหน้า

หลังจาก preincubation ครบ 48 ชั่วโมงแล้วเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และแบ่งกลุ่มที่เลี้ยงเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม

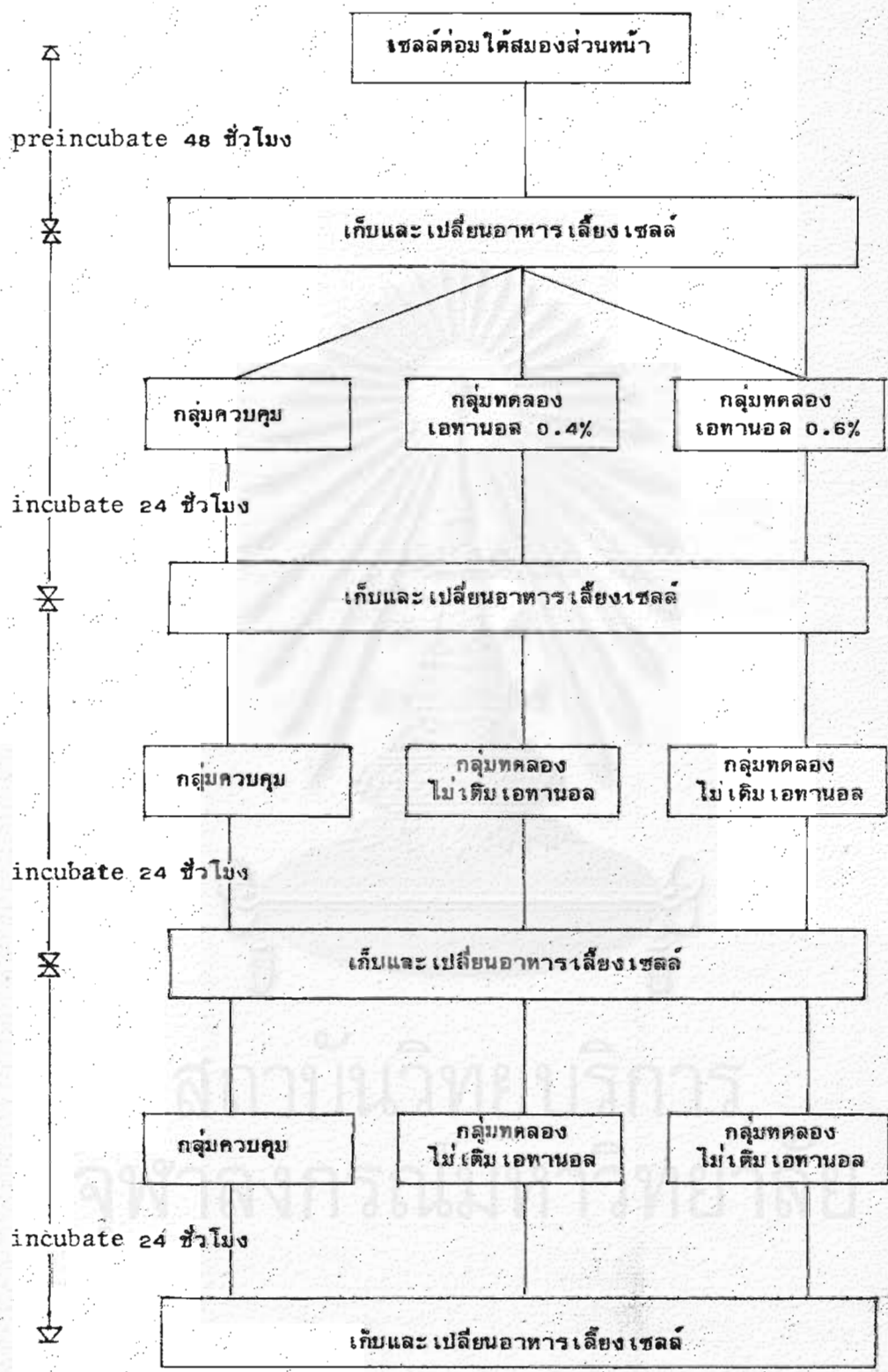
- 1.1 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ไม่เติมเอทานอล มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์
- 1.2 กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มที่เติมเอทานอล 0.4% เทียบได้เท่ากับ 0.13 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยมีเอทานอล 95% AR grade 8 ไมโครลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร
- 1.3 กลุ่มทดลอง เป็นกลุ่มที่เติมเอทานอล 0.6% เทียบได้เท่ากับ 0.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยมีเอทานอล 95% AR grade 12 ไมโครลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร

เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และเอทานอลครบแล้ว นำไปบ่มเลี้ยงไว้ตามเดิมเมื่อครบ 24 ชั่วโมงหลังจากให้เอทานอลจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 1 และเปลี่ยนต่อไปอีกทุก 24 ชั่วโมง (ไม่มีการเติมเอทานอล) จนครบ 3 ครั้ง จะทำการทดลองซ้ำ 3 ทบ และเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกครั้งไว้ที่ -20°C เพื่อสำหรับตรวจหาปริมาณ LH โดยวิธี เรคิโอบินิวในแอสเสย์และไบโอแอสเสย์ต่อไป ขั้นตอนการทดลองทำตามแผนผังรูปที่ 1

การทดลองที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงสลับกับการ
ไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ต่อการหลัง LH จากเซลล์ต่อมไคสมองส่วนหน้า

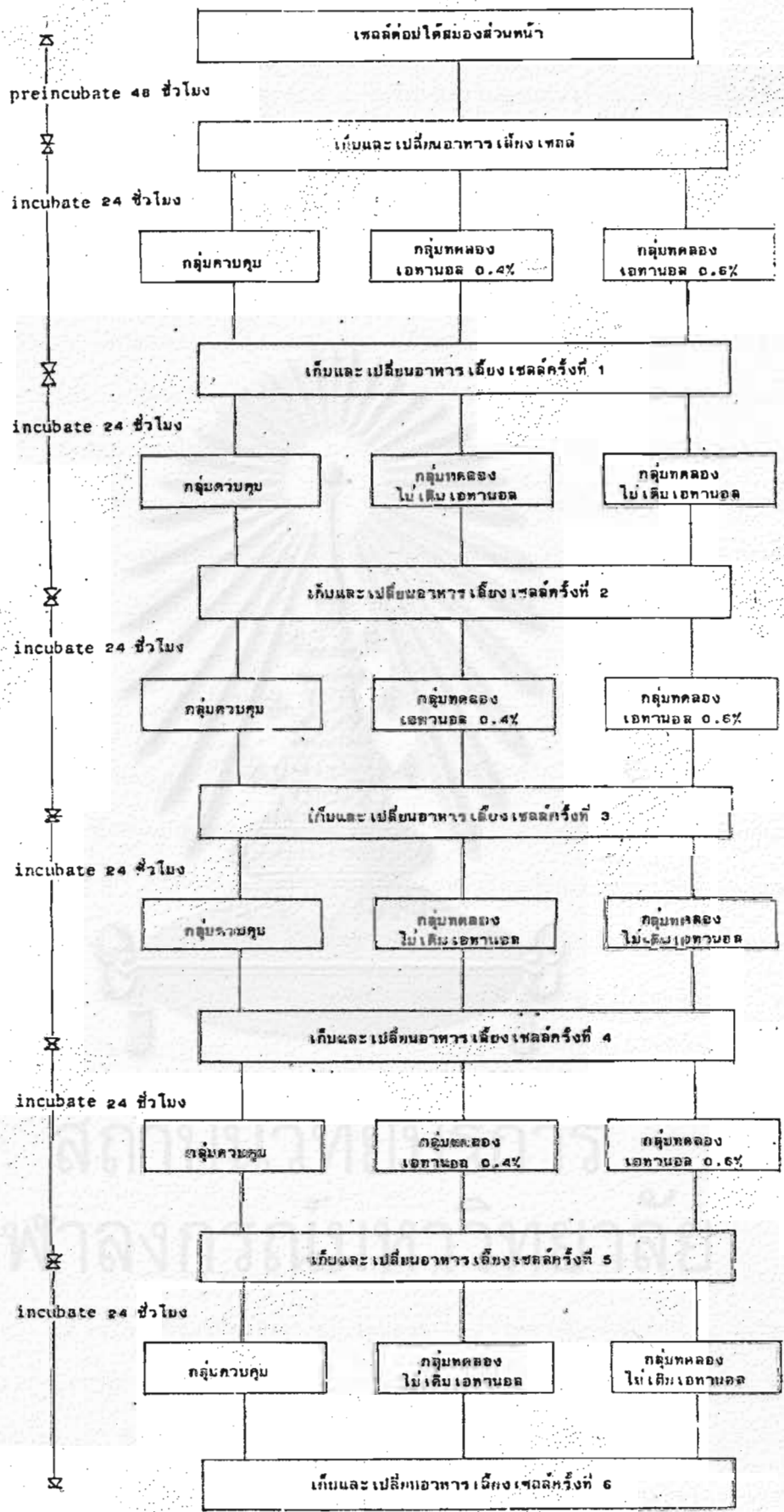
ภายหลังจาก preincubation ครบ 48 ชั่วโมงแล้ว เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์และแบ่งกลุ่มเซลล์ออกเป็น 3 กลุ่ม

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่ไม่เติมเอทานอล มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง ให้เอทานอล 0.4% เทียบได้เท่ากับ 0.13 กรัม/กิโลกรัม



รูปที่ 1 แผนผังแสดงการทดลองที่ 1 ผลระยะสั้นของเอทานอล 0.4% และ 0.6%

ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ต่อการหลั่ง rIH จากเซลล์ต่อมไคสมองส่วนหน้า



รูปที่ 2 แผนผังแสดงผลการทดลองที่ 2 ผลเอทานอล 0.4% และ 0.6% ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ต่อการหั่ง rLH จากเซลล์คอมไวด์สมองส่วนหน้า

น้ำหนักตัว โดยมีเอทานอล 95% AR grade 8 ไมโครลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร
กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดลอง ให้เอทานอล 0.6% เทียบได้เท่ากับ 0.20 กรัม/กิโลกรัม

น้ำหนักตัว โดยมีเอทานอล 95% AR grade 12 ไมโครลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2 มิลลิลิตร

เมื่อเติมอาหารเลี้ยงเซลล์และเอทานอลจนครบแล้ว นำไปบ่มเลี้ยงไว้ตามเดิม

เมื่อครบ 24 ชั่วโมง ภายหลังจากให้เอทานอลจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 1 แล้วนำ
ไปบ่มเลี้ยงไว้ตามเดิม (กลุ่มทดลองไม่เติมเอทานอล) เมื่อครบ 24 ชั่วโมงเปลี่ยนอาหารเลี้ยง
เซลล์ครั้งที่ 2 เติมเอทานอลในกลุ่มทดลอง แล้วนำไปบ่มเลี้ยงไว้ตามเดิม จะทำการทดลอง
ตามขั้นตอนข้างต้น (กลุ่มทดลองให้เอทานอล 24 ชั่วโมงสลับกับการไม่เติมเอทานอล 24 ชั่วโมง)
และ เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์จนครบทั้งหมด 6 ครั้ง ทำการทดลองซ้ำ 3 ทนและเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์
ทั้งหมดไว้ที่ -20°C เพื่อสำหรับตรวจหา LH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ต่อไป ขั้นตอนการทดลองทำตามแผนผัง
รูปที่ 2

การตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์

การตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ใช้วิธี Mouse Leydig cells
bioassay for LH ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีของ Dafau et al. (1977) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมและ
ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย วิธีนี้อาศัยคุณสมบัติของลูทิไนซิงฮอโมนที่มีผลกระตุ้นเซลล์เป้าหมายคือ
Leydig cells ของอวัยวะ (*in vitro*) ให้สร้างฮอโมนเทสโทสเตอโรน การสร้างฮอโมน
เทสโทสเตอโรนของ Leydig cells จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณลูทิไนซิงฮอโมน ฉะนั้น
การวัดค่าฮอโมนเทสโทสเตอโรนนี้ จึงสามารถใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ปริมาณลูทิไนซิงฮอโมนใน
สารตัวอย่างที่ต้องการทราบได้

1. การเตรียม Leydig cells culture

ใช้หนูไมซ์เพศผู้พันธุ์สวิสอายุ 28 วัน 2 ตัว นำเอา Leydig cells ออกจาก
ถุงอัณฑะด้วยการใช้กรรไกรปลอดเชื้อเปิดหน้าท้องหนูออก แล้วใช้ปากคีบดึงที่ Vas deferens
เอาอวัยวะออกจาก scrotal sac ตัดเฉพาะลูกอัณฑะเอาออกมาล้างใน culture dish (ขนาด
60 x 15 มิลลิเมตร) ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย M199 และ 0.2% BSA ปริมาณ 1
มิลลิลิตร และ culture dish นี้จะวางอยู่บนถาดน้ำแข็ง ในกรรไกรที่ปลอดเชื้อเจาะเยื่อบาง ๆ
ที่หุ้มอัณฑะออก แล้วใช้เข็มที่ปลอดเชื้อเขี่ย seminiferous tubules ที่อยู่ภายในให้กระจายออก
ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ตักกลุ่ม seminiferous tubules เหล่านี้จนละเอียด แล้วนำไปใส่

ในบีกเกอร์ที่ปลอดเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ 24 มิลลิลิตร นำไปกวน ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที เพื่อให้เนื้อเยื่อกระจายออกทั่ว ๆ ทุก 5 นาทีใช้ pasture pipette ตักกลุ่มเนื้อเยื่อนี้ขึ้นลงประมาณ 20 ครั้ง เพื่อช่วยให้เซลล์กระจายและแยกเป็น เซลล์เดี่ยว ๆ คี้น

กรองอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดผ่าน nylon mesh (Nitex 102) ลงใน Erlen Myer flask ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเลี้ยงใน Dubnoff Metabolic Shaker Incubator ที่อุณหภูมิ 34° ซ เขย่า 60 รอบต่อ 1 นาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทั้งนี้เพื่อเป็นการล้างซอร์โบนเทสโทสเคโรนที่อาจมีอยู่ภายในเซลล์ออกให้หมดก่อน เมื่อ incubate ครบ 1 ชั่วโมง แล้วปั่น 100 x G (1,500 รอบต่อนาที) ที่ 4° ซ นาน 15 นาที ตักส่วนที่เป็น อาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งไปกระจายในอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ 30 มิลลิลิตร (M199 ที่มี 0.2% BSA) นำเซลล์ที่เตรียมได้ทั้งหมดนี้ไปนับหาจำนวนเซลล์ภายใต้ phase contrast microscope โดยใช้ haemocytometer และตรวจนับหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด (viability) ด้วยการ หยด 0.1% trypan blue 1 หยดใน cell suspension 1 หยด เขย่าตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จึงนำไปตรวจนับเซลล์ที่ติดสีและไม่ติดสี เซลล์ที่ตายจะติดสีน้ำเงิน และมีอัตราการมีชีวิตรอดประมาณ 80-90% ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้ประมาณ 10,000 เซลล์/100 μ l อาหารเลี้ยงเซลล์ ถ้า ตรวจผลการมีชีวิตรอดได้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่านี้จะไม่ใช้ต้องเตรียมใหม่ นำเซลล์ที่เตรียมได้นี้ไปกวน ตลอดเวลาที่ 4° ซ ในขณะที่เติมเซลล์ลงในสารละลายมาตรฐาน rLH ที่เตรียมไว้ และในสารละลายตัวอย่างที่ต้องการตรวจหาปริมาณ rLH ดังตารางที่ 1

2. การเตรียม rLH มาตรฐาน

นำ rLH-RP-2 (AFP-566C) ที่มีความเข้มข้นขจัดละ 125 ng/25 μ l นำมาเจือจางด้วย M199 ที่มี 0.2% BSA ให้มีความเข้มข้นแรกเป็น 25 ng/100 μ l จากนั้นทำ serial dilution ลงไปอีก 5 ลำดับ จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.78 ng/100 μ l แบ่งซอร์โบนมาตรฐานนี้ที่เตรียมได้นี้แต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 100 μ l ซ้ำกัน 3 หลอดทุกความเข้มข้น

ขั้นตอนการทำไบโอแอสเสย์ของ rLH

การทำไบโอแอสเสย์มีขั้นตอนการทำดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ 1 ตารางการทำไบโอแอสเสย์

ชุดของการทดลอง	M199+0.2%BSA (μ l)	cell suspension (μ l)	อุณหภูมิ ($^{\circ}$ C)	incubation (ชั่วโมง)
Blank	200	-	34	2
0 ชั่วโมง	100	100	4	2
2 ชั่วโมง	100	100	34	2
LH มาตรฐาน	-	100	34	2
สารละลายตัวอย่าง	-	100	34	2

หมายเหตุ สารตัวอย่างที่นำมาตรวจวัดปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ใช้ 100 μ l หรือหากใช้ต่ำกว่านี้ใช้ M199+0.2% BSA ปริมาณให้ครบ 100 μ l

Quality control

ใช้ซีรัมหนูแรทเพศเมีย 100 μ l, 50 μ l และ 25 μ l ปริมาณให้ครบ 100 μ l ด้วย M199 0.2% BSA

Plain medium

เพื่อดูว่า Leydig cells จะสามารถสร้างเทสโทสเทอโรนได้ในปริมาณเท่าใดในหลอดที่ใส่แต่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจาก rLH จึงใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจำนวน 100 μ l เป็นสารละลายตัวอย่างด้วย

หลังจาก incubate ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว หยุดปฏิกิริยาด้วยการนำหลอดทุกหลอดแช่ในถาดน้ำแข็งทันที แล้วนำอาหารเลี้ยงเซลล์เหล่านี้ไปตรวจหาปริมาณเทสโทสเทอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

3. การตรวจหาปริมาณเทสโทส ไดไฮโดรโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การตรวจหาปริมาณเทสโทส ไดไฮโดรด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ดัดแปลงมาจากวิธีขององค์การอนามัยโลก (Sufi et al. 1986)

3.1 การสกัด

หลังจาก incubate หลอดทดลองที่บรรจุสารละลายตัวอย่างพวกหนึ่ง และสารละลาย rLH มาตรฐานอีกพวกหนึ่งกับ Leydig cells ของหนูโมซที่ 34⁺ ครบ 2 ชั่วโมงแล้ว นำแต่ละหลอดมาเติมไดเอทิล อีเทอร์ (diethyl ether) ทุก ๆ หลอด ๆ ละ 5 มิลลิลิตร เพื่อทำการสกัดฮอร์โมนเทสโทส ไดไฮโดร ซึ่งฮอร์โมนเทสโทส ไดไฮโดรจะถูกสกัดมาอยู่ในชั้นไดเอทิล อีเทอร์ ซึ่งเป็นชั้นที่เบากว่าและลอยอยู่ส่วนบน แยกชั้นไดเอทิล อีเทอร์ออกจากอาหารเลี้ยงเซลล์ด้วยการนำไปแช่ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่แช่อยู่ในเอทานอล 95% เพื่อให้ส่วนที่มี Leydig cells และอาหารเลี้ยงเซลล์แข็งตัว รินส่วนใสที่เป็นไดเอทิล อีเทอร์ลงในหลอดทดลองอีกชุดหนึ่งที่เตรียมไว้ แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย dry block heater ที่อุณหภูมิ 40-60^o C นำหลอดทดลองที่ทำให้ไดเอทิล อีเทอร์ ระเหยจนแห้งสนิทมาเติมไดเอทิล อีเทอร์ อีก 1 มิลลิลิตร เพื่อที่จะชะล้างฮอร์โมนที่ติดอยู่ข้างหลอดให้ลงไปรวมกันที่ก้นหลอด แล้วนำไปให้แห้งอีกครั้ง เมื่อหลอดทดลองทุกหลอดแห้งสนิทแล้วนำไปเติม assay buffer 500 μ l เพื่อชะล้างฮอร์โมนเทสโทส ไดไฮโดรที่อยู่ข้างหลอดให้มาอยู่ในบัฟเฟอร์ จากนั้นเตรียมฮอร์โมนมาตรฐาน แอนติบอดี และ working tracer เติม working tracer แอนติบอดีอย่างละ 100 μ l ตรวจหาปริมาณฮอร์โมนเทสโทส ไดไฮโดรโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ต่อไป โดยมีขั้นตอนการทำดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการเติมสารละลายในหลอดต่าง ๆ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนเทสโทส เดอโรน

ชุดของการวิเคราะห์	ปริมาณของสารที่ใช้ในการทดลอง					
	Tracer (μ l)	Antiserum (μ l)	Buffer (μ l)	Standard (μ l)	Sample (μ l)	charcoal suspension (μ l)
1. Tc	100	-	600	-	-	-
2. NSB	100	-	600	-	-	200
3. Bo	100	100	500	-	-	200
4. St	100	100	-	500	500	200
5. Sa	100	100	-	-	-	200

ตั้งทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง

หมายเหตุ Tc = total count, NSB = non specific binding, Bo = binding at zero concentration
 St = standard, Sa = sample

Quality control ใช้ซีรัมหนูแรทเพศเมีย 100 μ l, 50 μ l และ 25 μ l สกัดด้วย ไดเอซิล อีเทอร์ นาน 1 นาที แล้วเติม assay buffer tracer และ antibody

TCR (Total Count Recovery) ใช้ working tracer เจือจาง 10 เท่า จำนวน 100 μ l และ buffer 600 μ l ใส่ใน counting vial

RCE (Recovery of Extraction) ใช้ working tracer ที่เจือจางลง 10 เท่า จำนวน 100 μ l ผสมกับซีรัมหนูแรทเพศเมีย 10, 25 และ 50 μ l ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที แล้วนำไปสกัดด้วยไดเอซิล อีเทอร์ 1 นาที แยกส่วนที่เป็นน้ำและซีรัมออกไป ระเหยไดเอซิล อีเทอร์ ออกจนหมด เติม assay buffer 700 μ l เขย่าแล้วจึงใส่ counting vial

หลังจากเติม tracer และ antiserum แล้ว ตั้งค้างคืนไว้ที่ 4 °C แล้วจึงเติม charcoal suspension 200 μ l เขย่าตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที นำไปปั่นที่ 500 x G (2,500 รอบต่อนาที) ที่ 4 °C นาน 15 นาที เพื่อแยกเอาส่วน charcoal ที่กักส่วนใสที่เป็นส่วนของ bound form ใส่ counting vial และเติม counting solution 4.5 มิลลิลิตร เขย่าและนำไปตรวจวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง β -liquid-scintillation counter 5 นาทีต่อ vial

3.2 การคำนวณผลทางเรดิโออิมมูโนแอสเสย์และอ่านค่าฮอร์โมน

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับ เทสโทสเตอโรนแอสเสย์

นำปริมาณรังสีที่วัดได้ (count per minute, cpm) ของ testosterone standard แต่ละความเข้มข้นมาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกด้วยค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB ($\bar{X} - \text{NSB}$) แล้วนำแต่ละค่าไปคำนวณหา $B/B_0 \times 100$ (เปอร์เซ็นต์การเกาะเกี่ยว) แล้วนำไป plot กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเป็นเฟรมโตโมล/หลอด บนกระดาษกราฟ เซมิล็อก (semilog) ปริมาณ เทสโทสเตอโรนของสารตัวอย่างจะหาได้จากเส้นกราฟมาตรฐาน

3.2.2 การสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับ rLH

เขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน เทสโทสเทอโรน (เฟมโตโมล/หลอด) กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน LH (นาโนกรัม/หลอด) ลงบนกระดาษเซมิล็อก

4. การคำนวณหาปริมาณสารตัวอย่าง

นำค่า cpm ที่วัดได้ของแต่ละ vial ซึ่งจะทำซ้ำกันตัวอย่างละ 3 vial มาหาค่าเฉลี่ย cpm (\bar{X}) นำค่าเฉลี่ย cpm ของทุกตัวอย่าง ยกเว้นค่าเฉลี่ย cpm ของ Tc ลบด้วยค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐานสำหรับ เทสโทสเทอโรน แอสเสย์ได้ค่าเป็นเฟมโตโมล/หลอด และนำค่าความเข้มข้นที่ได้ (เฟมโตโมล/หลอด) ไปอ่านค่าความเข้มข้นของ rLH จากกราฟมาตรฐานสำหรับ rLH ก็จะได้ปริมาณ rLH เป็นนาโนกรัม/หลอด เปลี่ยนให้เป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร จากปริมาตรที่ใช้

Maximum binding (TBo) คำนวณได้จาก

$$\frac{(\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TBo} - \text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ NSB})}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ Tc}} \times 100\%$$

ในการตรวจวัด เทสโทสเทอโรน โดยวิธี เรดิโออิมมูโนแอสเสย์มี maximum binding ประมาณ 40-50%

เปอร์เซ็นต์ Recovery คำนวณได้จาก

$$\frac{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ RCE}}{\text{ค่าเฉลี่ย cpm ของ TCR}} \times 100\%$$

ในการตรวจวัดนี้มีค่าประมาณ 87 ± 3.40

การติดสลาก rLH ด้วย I-125

เตรียม เซฟาเดกซ์คอลัมน์

แช่เซฟาเดกซ์จี-25 ไลน์ 5 กรัมใน PBS 0.05 M 100 มิลลิลิตร ที่ค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย EDTA-PBS 0.05 M 3 ครั้ง แช่เซฟาเดกซ์อยู่ใน EDTA-PBS 100 มิลลิลิตร แล้วนำไปดูดอากาศเมื่อไม่ให้มีฟองอากาศอยู่ในเซฟาเดกซ์

คอลัมน์ ใช้คอลัมน์ขนาด 0.8 X 30 เซนติเมตร ใส่ลูกแก้วลงไปเพื่อลดปลายคอลัมน์ ล้างคอลัมน์ด้วย EDTA-PBS ต่อคอลัมน์เข้ากับเครื่อง fraction collector เทเซฟาเดกซ์ที่เตรียมไว้ลงในคอลัมน์จนถึงความสูงตามต้องการประมาณ 25 เซนติเมตร เพื่อให้เซฟาเดกซ์คอลัมน์อิ่มตัวด้วย Gel-PBS 0.05 M และความสูงของเซฟาเดกซ์ไม่ลดต่ำลงอีก และให้มีสารละลาย Gel-PBS อยู่เหนือระดับเซฟาเดกซ์เพียงเล็กน้อย

การติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125

วิธีที่ใช้ในการติดสลาก rLH ด้วยไอโอดีน-125 นี้ดัดแปลงมาจากวิธีของ Hunter and Greenwood (1962); Greenwood et al. (1963) ดังมีขั้นตอนต่อไปนี้

ใช้ Hamilton syringe สูดสารละลายต่อไปนี้

Na ¹²⁵ I	10	μl	(1 mCi)
Chloramine T	12.5	μl	(25 μg)
Sodium metabisulphite	30	μl	
transfer solution	100	μl	

เติม Na¹²⁵I ลงใน reaction vial ที่มี rLH-I-6 (AFP-6833C) 5 μg ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.05 M pH 7.5 50 μl เติม Chloramine T 12.5 μl เขย่าเบา ๆ และจับเวลาของการเกิดปฏิกิริยา 2 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติม sodium metabisulphite 30 μl เขย่าเบา ๆ แล้วเติม transfer solution 100 μl นำสารละลายทั้งหมดไปผ่านคอลัมน์เซฟาเดกซ์จี-25 ไลน์ ล้าง reaction ด้วย 8%

sucrose ใน Gel-PBS ที่มีโบแตสเซียมไอโอดด์ 0.1% จำนวน 20 มิลลิลิตร เก็บ fraction ทั้งหมด 36 fraction (12 ทวด/0.5 มิลลิลิตร/4 นาที)

แบ่งแต่ละ fraction มา fraction ละ 5 μ l นำไปวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง gamma counter แล้วนำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณรังสีและลำดับ fraction peak แรกจะเป็น rLH ที่ติดสลากรด้วย ^{125}I ซึ่งนำมาใช้เป็น tracer ดังรูปที่ 3

การคำนวณที่ได้จากการติดสลากร rLH ด้วยไอโอดีน-125

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณรังสีรวมของ rLH peak} &= \text{total count in } [^{125}\text{I}] - \text{count in } [^{125}\text{I}] \text{ iodide peak} \\ &= 7.41 \times 10^7 - 2.01 \times 10^7 \\ &= 5.40 \times 10^7 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \% \text{ Iodinated yeild} &= \frac{\text{counts in } [^{125}\text{I-rLH}] \text{ peak}}{\text{total count in } [^{125}\text{I}]} \times 100 \\ &= \frac{5.40 \times 10^7}{7.4 \times 10^7} \times 100 \\ &= 72\% \end{aligned}$$

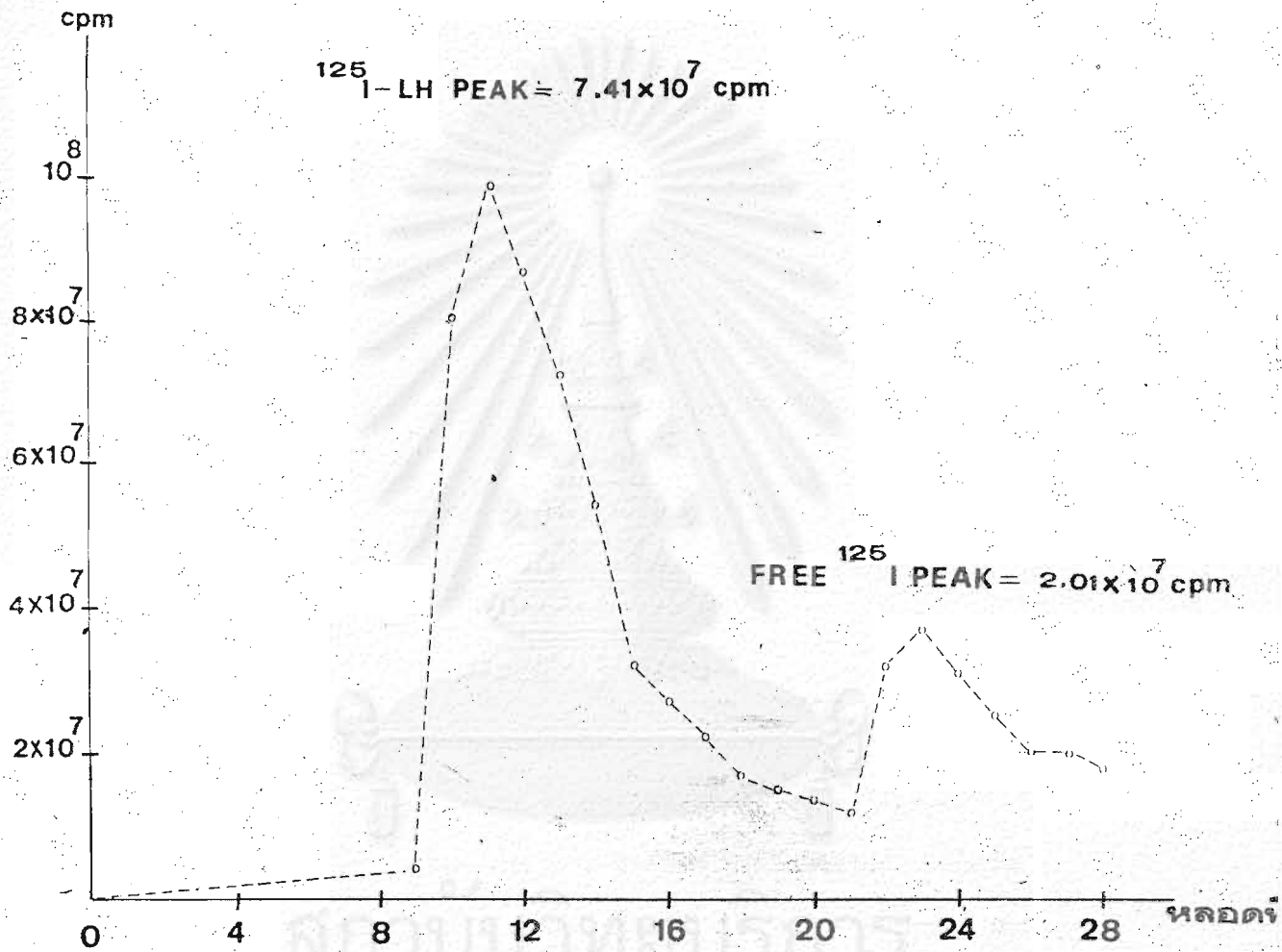
การตรวจวัด rLH ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

การตรวจหาปริมาณ rLH ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์โดยวิธี double antibodies ซึ่งดัดแปลงมาจากวิธีขององค์การอนามัยโลก (Sufi et al. 1986) โดยมีขั้นตอนการทำดังต่อไปนี้

1. เตรียมสารละลาย

1.1 tracer buffer

tracer buffer เตรียมโดยละลาย Normal Rabbit Serum (NRS) ใน Gel-PBS 0.05 M pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 400



รูปที่ 3 กราฟของการติดสลากร LH ด้วยไอโอดีน-125

1.2 working tracer

ใช้ tracer buffer ที่เตรียมได้ในข้อ 1.1 เจือจาง tracer (^{125}I -rLH) ปริมาตรรังสี 30,000 cpm/100 μl

1.3 first antibody buffer

ละลาย NRS ใน EDTA-Gel-PBS 0.05 M pH 7.0 ในอัตราส่วน 1 : 400 เป็น first antibody buffer

1.4 first antibody

ใช้ anti-rLH-S-10 เจือจางด้วย first antibody buffer (ข้อ 1.3) ในอัตราส่วน 1 : 5,000 แอนติบอดีเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

1.5 second antibody buffer

ใช้ EDTA-PBS 0.05 M pH 7.0 เป็น second antibody buffer

1.6 second antibody

ใช้ anti-rabbit IgG ซึ่งอยู่ในสภาพแห้ง (lyophilized) ละลายด้วยน้ำกลั่น (กลั่นซ้ำ 3 ทน ปริมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วเจือจางด้วย second antibody buffer ในอัตราส่วน 1 : 20 เก็บไว้ที่ 4 °C

1.7 Sample buffer หรือ Standard buffer

ใช้ EDTA-Gel-PBS 0.05 M pH 7.0 เป็นบัฟเฟอร์สำหรับเจือจางสารตัวอย่างหรือฮอร์โมนมาตรฐาน

2. ขั้นตอนการทำเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

2.1 การเตรียม rLH มาตรฐาน

ใช้ rLH-RP-2 ซึ่งเป็นชนิดเดียวกับที่ใช้ในวิธีไบโอแอสเสย์ ซึ่งมีความเข้มข้นขดละ 125 ng/25 μl นำมาเติมด้วย standard buffer ให้เป็น 1 มิลลิลิตร

จะได้ rLH มาตรฐานความเข้มข้นแรกเป็น 25 ng/200 μ l จากนั้นทำ serial dilution ลงไปอีก 5 ลำดับ จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.78 ng/200 μ l

2.2 วิธีการ assay ดำเนินตามตารางที่ 3

หมายเหตุ

Quality control ใช้ซีรัมหนูแรทเพศเมีย 100 μ l, 50 μ l และ 25 μ l ตามลำดับ คำนวณค่าซอร์โบนที่อ่านได้ แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ ดังหน้า 42

เมื่อนำตะกอนไขวัดปริมาณรังสีด้วยเครื่อง gamma counter (LKB Multigamma counter model 1260 Multigamma II) ซึ่งเครื่องตรวจวัดรังสีจะสร้างกราฟมาตรฐาน และอ่านค่าปริมาณซอร์โบนในสารตัวอย่างตามโปรแกรมที่ป้อนเข้าคอมพิวเตอร์ การทดลองนี้ เลือกใช้โปรแกรม logit transformation

ค่าปริมาณซอร์โบนที่ตรวจวัดได้ในส่วนที่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์คอมพิวเตอร์สมองต้องนำมา ลบด้วยค่ารบกวนของ phenol red ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งหาได้จากการนำ plain medium ไปตรวจวัดด้วย ในการตรวจวัดนี้มีค่า 0.15 ng/200 μ l

การแปรผลทางสถิติ

ปริมาณ rLH ที่ตรวจวัดได้ทั้งวิธีไบโอ.ออสเสย์และเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ นำมาตรวจหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้ ANOVA และ Duncan's Multiple Range Test โดยมีระดับความเชื่อมั่นที่ $p < 0.05$

ตารางที่ 3 วิธีทำเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) ของฮอร์โมน rLH

	วันที่ 1				เขย่าตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง	วันที่ 2	เขย่าให้กลับ ไว้ที่อุณหภูมิ 4° ซ 24 ชั่วโมง	วันที่ 3
	Sample หรือ STD	Sample buffer	tracer	1 st Ab (1.4)		2 nd Ab (1.6)		ทุกหลอดยกเว้นหลอด TC ดำเนินการ ดังนี้ - เติมน้ำกลั่นอุณหภูมิ 4 ซ 3 มิลลิลิตร - ปั่นใน centrifuge ที่อุณหภูมิ 4° ซ 3,200 rpm 45 นาที - เทส่วนซูเปอร์ เนคแตนท์ทิ้ง - คว่ำหลอดไว้บนกระดาษซับจนแห้ง** - นำไปวัดกัมมันตรังสีด้วย เครื่อง แกมมาเคาน์เตอร์
	µl	µl	µl	µl		µl		
TC	-	-	100	-	-	-	-	
NSB	-	200	100	100*	100	100	-	
Bo	-	200	100	100	100	100	-	
STD	200	-	100	100	100	100	-	
Sample	200	-	100	100	100	100	-	

TC = TOTAL COUNT

NSB = NON-SPECIFIC BINDING

Bo = MAXIMUM BINDING

STD = STANDARD

* = ใช้ antibody buffer แทน 1 Ab

** = อย่าให้สะท้อนส่วนที่ตกตะกอน

การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัด

การทดสอบความ เชื่อถือได้ของวิธีการตรวจวัดสารนั้น (reliability of method) Ekins (1970) และ Abraham (1974) ได้ให้ข้อเสนอว่า ควรจะมีการตรวจสอบความจำเพาะ (specificity), ความแม่นยำ (precision), ความถูกต้อง (accuracy) และความไวของการวัดปริมาณ (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่าวิธีการแต่ละวิธีนั้น มีความเชื่อถือได้ มากน้อยเพียงใด รายละเอียดของการประเมินผลในแต่ละหัวข้อมีดังนี้

1. ความจำเพาะ

ความจำเพาะของเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ หมายถึง ความจำเพาะในการปฏิกิริยา ของแอนติบอดีกับแอนติเจนหรือฮอร์โมน แอนติบอดีที่ได้จากการฉีดแอนติเจน กระตุ้นสัตว์ทดลอง ให้สร้างแอนติบอดีจะเป็น polyclonal ดังนั้นมักจะมีปฏิกิริยากับสารอื่น ในทางปฏิบัติจะทำการทดสอบปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับสารอื่นที่มีลักษณะ โครงสร้างโมเลกุลใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ ต้องการวิเคราะห์

% cross reaction

$$= \frac{\text{ปริมาณสารมาตรฐานของสารที่จะวิเคราะห์ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีได้ 50 \%}}{\text{ปริมาณของสารมาตรฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ ที่ทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่ 50\%}} \times 100$$

1.1 ความจำเพาะของการตรวจหาปริมาณเทสโทสเทอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์

แอนติบอดีของฮอร์โมน เทสโทสเทอโรนที่ใช้ในการทดลองได้จากองค์การอนามัยโลก (Sufi et al. 1986) ซึ่งทดสอบ % cross reaction ได้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงความจำเพาะของการตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนที่ทำปฏิกิริยากับสารต่าง ๆ

สาร	% cross reaction
Progesterone	100.0
Cortisol	0.0001
5 α -Dihydrotestosterone	14.0
Δ 4-Androstenedione	1.8
5 α -Androstenediol	6.0
Δ 5-Androstenediol	2.1

1.2 ความจำเพาะของการตรวจหาปริมาณ rLH โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์

แอนติบอดีของ rLH ที่ใช้ในการทดลองนี้ได้จาก Pituitary & Antisera Center U.S.A. ซึ่งทดสอบ % cross reaction ได้ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงความจำเพาะของแอนติบอดี rLH ที่ทำปฏิกิริยากับฮอร์โมนอื่น ๆ

ฮอร์โมน	cross reaction x 95%
rLH-I-6	1.00000
rLH-RP-2	1.00000
rTSH-I	0.05245
rFSH-I	0.00148
rPRL-I	0.00010
rGH-I	0.00040

2. ความแม่นยำ

หมายถึง ความสามารถในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำได้โดยการทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างหลาย ๆ ครั้ง แล้วคิดหาความแม่นยำได้โดยการทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างหลาย ๆ ครั้ง แล้วคิดหาความแม่นยำจากเปอร์เซ็นต์ของสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (coefficient of variation, C.V.) ซึ่งคำนวณได้จาก

$$\% \text{ C.V.} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของสาร}}{\text{ค่ามัธยัม เลขคณิต}} \times 100\%$$

2.1 ความแม่นยำของการตรวจหาปริมาณ เทสโทส เดอโรน โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ได้จากการตรวจวัดปริมาณ เทสโทส เดอโรน ในซีรัมหนูแรทเพศเมียซ้ำกันหลายครั้ง พบว่าภายในการทดลองเดียวกัน (intra assay) มี % C.V. เป็น 3.35 ± 1.45 ส่วน % C.V. ระหว่างการทดลองต่าง ๆ 3 ครั้ง (inter assay) มีค่า 7.32 ± 3.19 ดังตาราง

2.2 ความแม่นยำของการตรวจหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ ได้จากการทดลองหาปริมาณ rLH ในซีรัมหนูแรทเพศเมียซ้ำกันหลายครั้ง มี % C.V. ของ intra assay เป็น 3.81 ± 1.49 และ % C.V. ของ inter assay จากการตรวจวัดระหว่างการทดลองต่าง ๆ 3 ครั้ง เป็น 7.41 ± 2.61

2.3 ความแม่นยำของการตรวจหาปริมาณ rLH โดยวิธีเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ โดยทำการตรวจวัดหาปริมาณ rLH ในซีรัมหนูแรทเพศเมียซ้ำกันหลายครั้ง มี % C.V. ของ intra assay เป็น 2.05 ± 1.43 และ % C.V. ของ inter assay ตรวจวัดระหว่างการทดลอง 3 ครั้ง เป็น 6.41 ± 2.32 ค่า C.V. ของ inter assay ที่เป็นที่ยอมรับ % C.V. จะต้องมีค่าต่ำกว่า 15 และค่า C.V. ของ intra assay ที่เป็นที่ยอมรับนั้น % C.V. จะต้องมีค่าต่ำกว่า 10

3. ความถูกต้อง

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาได้จากสาร ที่ทราบปริมาณฮอร์โมนทำการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมนในสารตามขั้นตอนการทดลอง แล้วเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริง คิคออกมา เป็น เปอร์ เซนต์ ก็จะทราบ เปอร์ เซนต์ความถูกต้องของการวิเคราะห์

$$\% \text{ ความถูกต้อง} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ในการตรวจวัดครั้งนี้ได้หาความถูกต้องของการตรวจวัดปริมาณเทสโทสเตอโรน ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ ซึ่งทำได้โดยใช้เทสโทสเตอโรนมาตรฐานที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 275 เฟมโตโมล/100 ไมโครลิตร จากการตรวจวัด 10 ครั้ง ได้เปอร์เซนต์ความถูกต้องเฉลี่ย 93.42 ± 4.32 และได้ความถูกต้องของการตรวจวัดปริมาณ LH ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ โดยใช้ rLH มาตรฐานที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 12.5 นาโนกรัม/200 ไมโครลิตร ได้เปอร์เซนต์ความถูกต้องเฉลี่ย 90.51 ± 2.41 ได้ความถูกต้องของการตรวจวัดปริมาณ LH ด้วยวิธีไบโอแอสเสย์ โดยใช้ rLH มาตรฐานที่มีความเข้มข้นมาตรฐาน 12.5 นาโนกรัม/200 ไมโครลิตร ได้เปอร์เซนต์ความถูกต้องเฉลี่ย 91.42 ± 3.45

4. ความไวของการวิเคราะห์

ความไวของการวิเคราะห์ หมายถึง ค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่วิธีการวิเคราะห์นั้นสามารถวัดได้ ทำได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐาน โดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (B₀) ลบด้วย 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้ นำค่า cpm นี้ไปคำนวณหา $B/B_0 \times 100$ แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน

4.1 ความไวของการตรวจหาปริมาณเทสโทสเตอโรนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์มีค่าเป็น 17.18 เฟมโตโมล/100 ไมโครลิตร

4.2 ความไวของการตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีไบโอแอสเสย์ มีค่าเป็น 1.56 นาโนกรัม/100 ไมโครลิตร

4.3 ความไวของการตรวจวัดหาปริมาณ rLH โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์
มีค่าเป็น 1.56 นาโนกรัม/100 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ผลระยะสั้นของเอทานอล (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง) ต่อการหลั่ง LH จาก
เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ดูแผนผังการทดลองหน้า 25)

1.1 ปริมาณฮอร์โมน LH ที่หลั่งจาก เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าในกลุ่มควบคุม

ปริมาณ rLH ที่ตรวจวัดด้วยวิธีไบโอ อัสเสย์ (BA) และ เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ (RIA) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ของกลุ่มควบคุม พบว่าปริมาณ RIA-rLH มีปริมาณค่อนข้างคงที่ ตลอดการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ครั้ง คือ 25.61 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ส่วน BA-rLH มีปริมาณลดลงเรื่อยๆ คือ จาก 63.67 ± 3.06 เป็น 56.33 ± 6.53 และ 52.33 ± 6.43 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

1.2 ผลของเอทานอล 0.4% (เทียบได้กับ 0.13 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) และ
0.6% (เทียบได้กับ 0.20 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) ต่อปริมาณ RIA-rLH

ลักษณะรูปแบบของค่า RIA-rLH ตลอดการทดลองทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง มีลักษณะเหมือนกันคือ มีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลอง และปริมาณ RIA-rLH ในกลุ่มทดลองที่ให้เอทานอล 0.4% ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ต่อมใต้สมองในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ครั้ง คือ 25.33 ± 3.25 , 27.03 ± 1.34 และ 25.66 ± 3.69 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ และปริมาณ RIA-rLH ในกลุ่มทดลองที่ให้เอทานอล 0.6% ที่วัดได้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ครั้งคือ 27.50 ± 3.00 , 25.13 ± 3.10 และ 23.83 ± 1.71 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ RIA-rLH ในกลุ่มทดลองทั้งที่ให้เอทานอล 0.4% และ 0.6% ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 ครั้ง ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังตารางที่ 10. รูปที่ 4

1.3 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อปริมาณ BA-rLH

จากตารางที่ 14 และรูปที่ 4 เมื่อใส่เอทานอล 0.4% ลงในเซลล์ค่อมได้สมอง ส่วนหน้า 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณ BA-rLH ที่ตรวจได้ใน 24 ชั่วโมงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยลดลงประมาณ 24% ของกลุ่มควบคุม (50.00 ± 4.32 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 63.67 ± 3.06 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) แต่ปริมาณ BA-rLH ที่วัดได้หลังจากเปลี่ยนอาหารเซลล์ครั้งที่ 2 (48 ชั่วโมง) และครั้งที่ 3 (72 ชั่วโมง) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากตารางที่ 14 และรูปที่ 4 เมื่อใส่เอทานอล 0.6% ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ค่อมได้สมองส่วนหน้า ปริมาณ BA-rLH ที่ 24 ชั่วโมงจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงประมาณ 47% ของกลุ่มควบคุม (34.00 ± 4.00 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 63.67 ± 3.06 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) แต่ปริมาณ BA-rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เปลี่ยนครั้งที่ 2 (48 ชั่วโมง) และครั้งที่ 3 (72 ชั่วโมง) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณสะสม BA-rLH ตลอดการทดลอง กลุ่มที่ใส่เอทานอล 0.4% มีปริมาณ ค่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติลดลงประมาณ 12% (152.50 ± 10.23 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 172.33 ± 16.02 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และกลุ่มที่ใส่เอทานอล 0.6% มีระดับค่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติลดลงประมาณ 28% (124.33 ± 12.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 172.33 ± 16.02 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

การทดลองที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการ ไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง) ต่อปริมาณ BA-rLH ที่หลั่งจากเซลล์ค่อมได้ สมองส่วนหน้า (ดูแผนผังการทดลองหน้า 26)

2.1 ปริมาณ BA-rLH ที่หลั่งจากเซลล์ค่อมได้สมองส่วนหน้าในกลุ่มควบคุม

พบว่าปริมาณ BA-rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 และ 144 ชั่วโมงทั้ง 6 ครั้ง จะลดลงเรื่อย ๆ คือจาก 72.41 ± 2.01 , 70.74 ± 1.06 ,

96.16 ± 1.35, 68.32 ± 2.14, 64.31 ± 2.15 และ 63.25 ± 1.29 นาโนกรัม/
มิลลิลิตร ตามลำดับ

2.2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อปริมาณ BA-rLH

จากตารางที่ 18 และรูปที่ 5 เมื่อให้เอทานอล 0.4% และ 0.6% ลงในเซลล์
ต่อมใต้สมองส่วนหน้า 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณ BA-rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อเปลี่ยน
อาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 1 (24 ชั่วโมง) จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม
ควบคุมลดลงประมาณ 24% ของกลุ่มควบคุม: เมื่อให้เอทานอล 0.4% (55.32 ± 3.05
นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 72.41 ± 2.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และลดลงประมาณ 33%
ของกลุ่มควบคุม เมื่อให้เอทานอล 0.6% (48.68 ± 4.11 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ
 172.41 ± 2.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) แต่ค่า BA-rLH ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมี
นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 2 (เมื่อล้างเอทานอลออกไปแล้ว 24
ชั่วโมง) และเมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 3 (72 ชั่วโมง) ค่า BA-rLH ลดลงอย่าง
มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลงประมาณ 24% เมื่อเติมเอทานอล
0.4% (52.83 ± 3.12 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 69.16 ± 1.35 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)
ลดลงประมาณ 33% เมื่อเติมเอทานอล 0.6% (46.08 ± 2.31 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)
เทียบกับ 69.16 ± 1.35 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 4 (96
ชั่วโมง) ค่า BA-rLH ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่เมื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 5
(120 ชั่วโมง) ค่า BA-rLH จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลดลง
ประมาณ 30% เมื่อเติมเอทานอล 0.4% (45.32 ± 1.25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ
 64.31 ± 2.15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และลดลงประมาณ 37% เมื่อเติมเอทานอล 0.6%
(40.29 ± 2.18 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 64.31 ± 2.15 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) แต่ค่า
BA-rLH ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของการเปลี่ยน
อาหารเลี้ยงเซลล์ครั้งที่ 6 (144 ชั่วโมง)

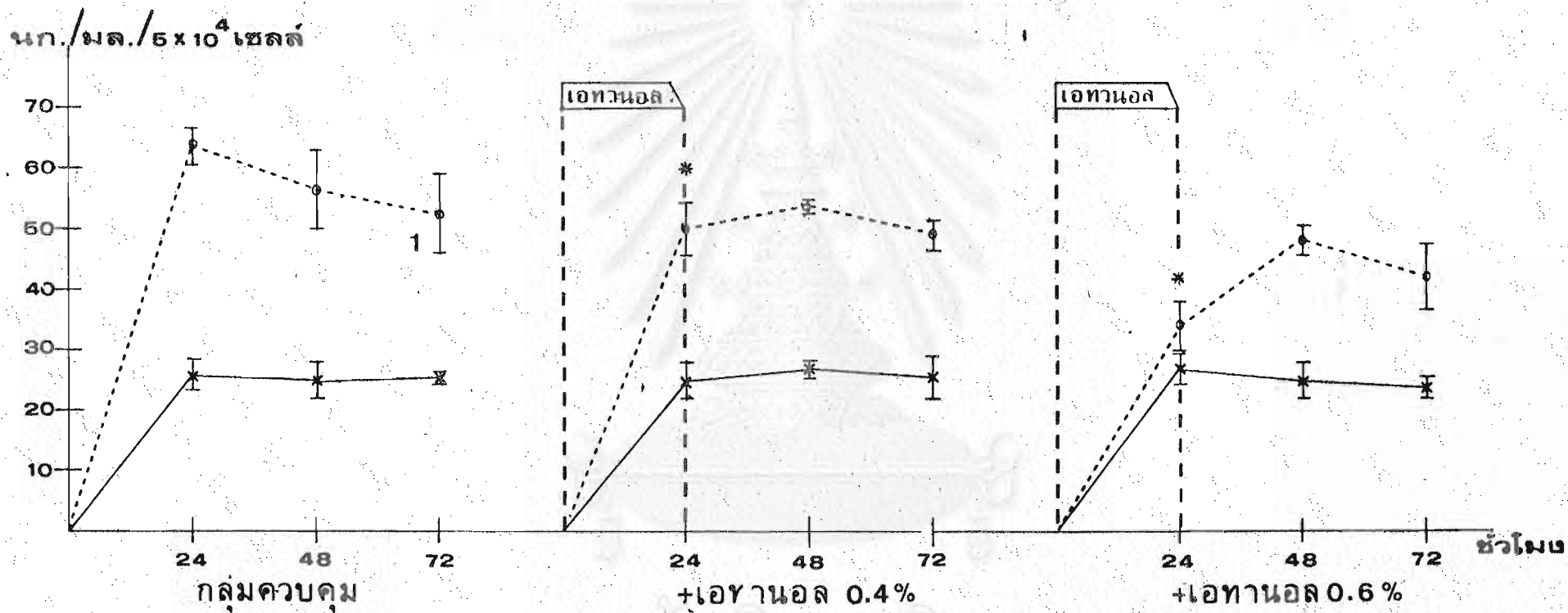
ปริมาณ BA-rLH ตลอดการทดลองในกลุ่มที่ให้เอทานอล 0.4% มีระดับ
ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยลดลงประมาณ 15% (346.42 ± 16.19
นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 408.11 ± 11.00 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) และกลุ่มที่ให้เอทานอล

0.6% มีระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติลดลงประมาณ 21% (323.26 ± 16.07 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เทียบกับ 408.11 ± 10.00 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)



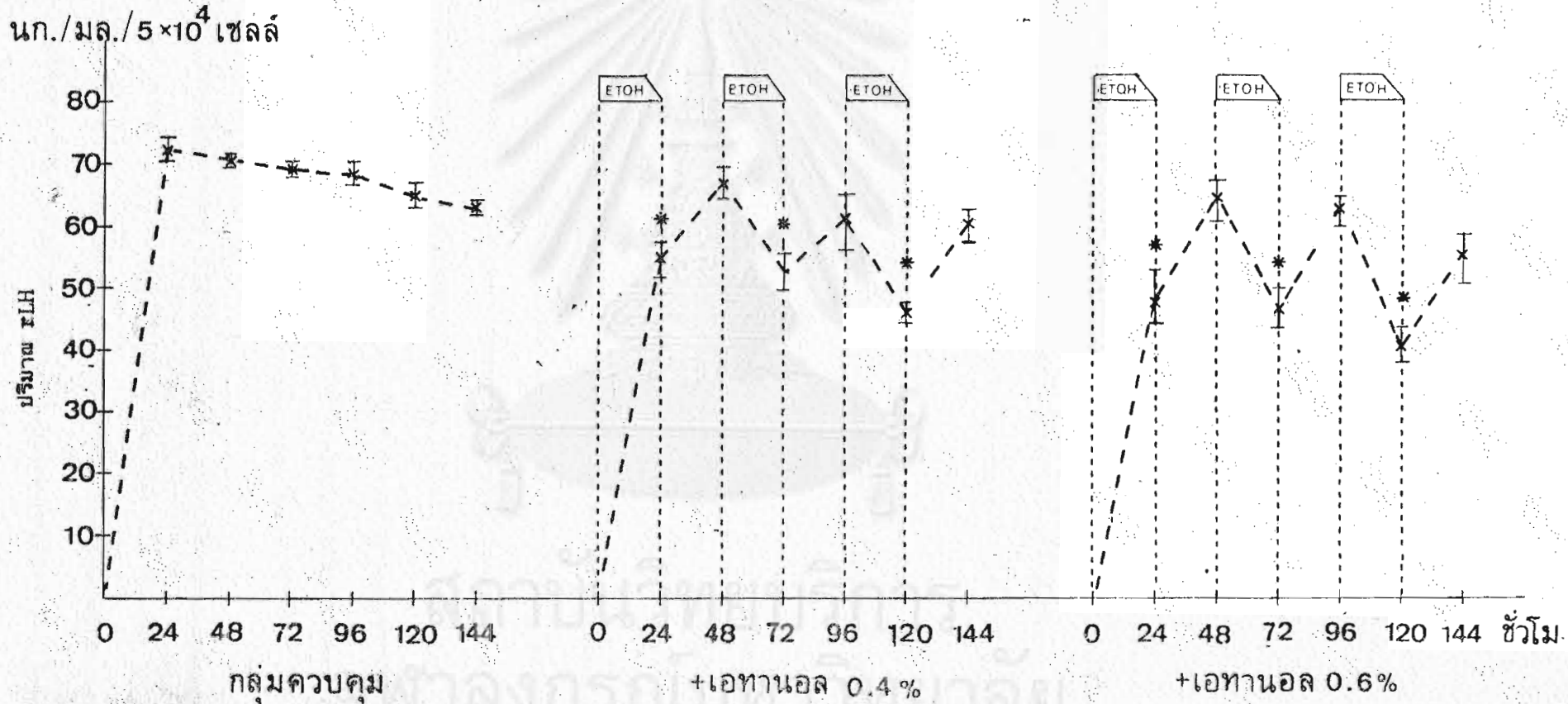
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 การทดลองที่ 1 แสดงผลของเอทานอลต่อการหลั่ง LH จากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูขาว ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48, และ 72 ชั่วโมง โดยซ้ำมือเป็น กลุ่มควบคุม เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองอีก 2 กลุ่มทางขวามือที่ให้ เอทานอล 0.4% และ 0.6% ตามลำดับ



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$
 o-----o แสดงค่าไลโอแอคทิวิตีของ rLH
 x-----x แสดงค่าอิมมูโนแอคทิวิตีของ rLH

รูปที่ 5 แสดงผลการทดลองที่ 2 ผลของเอทานอลต่อปริมาณ BA-rLH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมงโดยซ้ำมือเป็นกลุ่มควบคุม เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลอง 2 กลุ่มทางซ้ำมือที่ให้เอทานอล 0.4% และ 0.6% ตามลำดับ (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงช่วง 0-24, 48-72, และ 96-120 ชั่วโมง สลับกับไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงช่วง 24-48, 72-96 และ 120-144 ชั่วโมง)



* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

สรุปและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้ได้พบว่า เอทานอลปริมาณ 0.4% (เทียบเท่ากับ 0.3 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) และ 0.6% (เทียบเท่ากับ 0.20 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว) จะยับยั้งปริมาณ BA-rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปริมาณ RIA-rLH ไม่แตกต่าง จากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

การที่ค่าไบโอแอกติวิตีไม่สอดคล้องกับค่าอิมมิวโนแอกติวิตีของฮอร์โมนตัวเดียวกันนั้น มีไข้มองแปลก ได้เคยมีรายงานของความสัมพันธ์กันนี้ในโปรตีนฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมใต้สมอง เช่น ฮอร์โมนโพรแลคติน (Prolactin) (Aswaroengchai, 1978), โกรธฮอร์โมน (Growth hormone) (Goodman et al. 1974), โกลโคโปรตีนฮอร์โมน เช่น FSH (Storring, 1981) และ LH (Graesslin et al. 1973; Rabinowitz, 1974; Roos et al. 1975) โดยพบว่าฮอร์โมนเหล่านี้ปรากฏอยู่ในเซลล์ต่อมใต้สมองได้หลายรูปแบบ (form) ต่าง ๆ กัน ฮอร์โมนเหล่านี้ในกระแสเลือดหรือที่หลั่งมาในอาหารเลี้ยงเซลล์ก็ปรากฏได้หลายรูปแบบเช่นเดียวกัน ขึ้นอยู่กับสภาพทางสรีรวิทยาของสัตว์ทดลอง เช่น หนูที่มีวงฮิสตรัสปรกติจะมีค่าไบโอแอกติวิตีต่ออิมมิวโนแอกติวิตีของ LH ต่ำกว่าหนูที่ถูกตัดรังไข่ (Keel และ Grotjan, 1985) นอกจากนี้ Mukhopadyay et al. (1979) ยังพบว่า LH จากต่อมใต้สมองของหนูผสมสองต่อ GnRH in vitro ให้ค่าไบโอแอกติวิตีมากกว่าอิมมิวโนแอกติวิตี และได้เสนอว่าค่าอัตราส่วนไบโอแอกติวิตีต่ออิมมิวโนแอกติวิตีได้รับผลกระทบจากสเตรอยด์จากต่อมเพศด้วย

การที่พบว่า เอทานอลมีผลลดคุณสมบัติไบโอแอกติวิตีของ rLH แต่ไม่มีผลต่อคุณสมบัติอิมมิวโนแอกติวิตี ตรงกับที่เคยมีรายงานการศึกษา in vivo โดย Emnuele (1986) ว่า เอทานอลปริมาณ 4.51 มิลลิลิตร/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (3.57 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน) มีผลลดคุณสมบัติไบโอแอกติวิตีของ rLH แต่ไม่มีผลลดคุณสมบัติอิมมิวโนแอกติวิตีของ rLH ในซีรัมของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ แต่การทดลองครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่แสดงผลโดยตรงของเอทานอลต่อเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าและในปริมาณที่ต่ำกว่ารายงานของ Emnuele และจากรายงานของ

Brustein et al. (1971) ที่ได้ทดลองหาค่าส่วนของกรดซึอะลิก (sialic acid) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของสารคาร์โบไฮเดรตของโมเลกุลของ LH ของคนออก พบว่าคุณสมบัติไฮโอแอคทีวิตีของ LH ลดลงในขณะที่คุณสมบัติอิมมิวโนแอคทีวิตีไม่เปลี่ยนแปลง จากหลักฐานและรายงานเหล่านี้บ่งชี้ว่าเอทานอลมีผลลดคุณสมบัติไฮโอแอคทีวิตีของ rLH และเป็นไปได้ว่าเอทานอลไปลดปริมาณคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลของ LH อันเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง conformation หรือ tertiary structure

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณสะสมค่า BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/5 x 10⁴ เซลล์) ตลอดการทดลองที่ 1 (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง) และการทดลองที่ 2 (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง)

สภาพการเลี้ยง เซลล์	ปริมาณ BA-rLH ตลอดการทดลอง นก./มล./5 x 10 ⁴ เซลล์		% BA-rLH ที่ ลดลงเมื่อเทียบกับ กลุ่มควบคุม	
	การทดลองที่ 1 ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง (72 ชั่วโมง)	การทดลองที่ 2 ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้ เอทานอล 24 ชั่วโมง (144 ชั่วโมง)	การทดลอง ที่ 1	การทดลอง ที่ 2
กลุ่มควบคุม	172.33 ± 16.02	408.11 ± 10.00		
+ เอทานอล 0.4%	152.50 ± 10.23**	346.42 ± 16.19**	11%	15%
+ เอทานอล 0.6%	142.00 ± 5.57*	323.26 ± 16.09*	17%	21%

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p < 0.05

** แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p < 0.01

การทดลองครั้งนี้ยังได้ให้ข้อมูลที่สำคัญต่อไปอีกว่า เอทานอลมีผลแบบเฉียบพลันลดปริมาณไบโอแอคทิวิตีเฉพาะ 24 ชั่วโมงแรกเท่านั้น เมื่อปรวคจากเอทานอลเซลล์ต่อมได้สมองก็ยังสามารถหลั่ง rLH ที่มีทั้งคุณภาพและปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมโดยมีไบโอแอคทิวิตีและอิมมูโนแอคทิวิตีเท่ากับกลุ่มควบคุม ปริมาณฮอร์โมนทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 72 ชั่วโมง ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) เป็นผลเนื่องจาก 24 ชั่วโมงแรกเท่านั้น เป็นการชี้ให้เห็นว่า การให้เอทานอลเพียงช่วงสั้น ๆ (24 ชั่วโมง) ในปริมาณ 0.4% ถึง 0.6% นี้ไม่มีผลทำลายกลไกการสังเคราะห์และการหลั่งฮอร์โมนจากเซลล์ต่อมได้สมองแต่อย่างใด แต่อาจมีผลต่อ tertiary structure ของฮอร์โมนที่หลั่งออกมาเท่านั้น

ส่วนการทดลองที่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงสลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงต่อเนื่องกัน 3 รอบ เพื่อจะดูผลของเอทานอลต่อเซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าในการสร้างและหลั่งฮอร์โมน LH อย่างไรรั้น พบว่าภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเอาเอทานอลออก ปริมาณ BA-rLH จะกลับสูงขึ้นเท่ากลุ่มควบคุมทุกครั้ง แต่ค่า BA-rLH รวมเมื่อสิ้นสุดการทดลองจะต่ำกว่ากลุ่มควบคุมถึง 15% และ 21% สำหรับเอทานอล 0.4% และ 0.6% ตามลำดับ (ตารางที่ 9) ซึ่งเป็นการแสดงว่า แม้ว่าจะให้เอทานอลซ้ำครั้งละ 24 ชั่วโมง ถึง 3 ครั้ง ในช่วง 144 ชั่วโมง เอทานอลก็ยังไม่อาจมีผลต่อการทำงานของเซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าอย่างถาวรได้ อย่างไรก็ตาม การที่ค่าไบโอแอคทิวิตีลดลงในช่วงสั้น ๆ ซึ่งหมายความว่าฮอร์โมนสูญเสียคุณสมบัติทางชีวภาพไม่อาจกระตุ้นเซลล์เป้าหมายได้ตามปกติ ซึ่งอาจมีผลต่อการเสียสมดุลของการทำงานของฮอร์โมนภายในร่างกายได้

ผลการทดลองที่ 2 ก็ให้ผลยืนยันผลการทดลองที่ 1 ที่ว่า เอทานอลมีผลเฉียบพลันใน 24 ชั่วโมง โดยมีผลลดไบโอแอคทิวิตีของ rLH ที่หลั่งจากเซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้า และเอทานอล 0.4% ซึ่งเป็นปริมาณที่ต่ำสุดที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีผลลดไบโอแอคทิวิตีของ LH ลงประมาณ 24 - 26%

การศึกษาครั้งนี้ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้านั้น in vitro โดย Schade (1983) และ Gavalier (1983) ที่พบว่า เอทานอลปริมาณ 300 มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร (3.8 ไมโครลิตร/มิลลิลิตร) มีผลลดค่าอิมมูโนแอคทิวิตีที่หลั่งจากเซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าของหนูแรทเพศเมียภายใน 36 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ผลการทดลองครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Schade และ Gavalier เลี้ยงเซลล์ 500,000 เซลล์ในอาหาร

เลี้ยงเซลล์ 100 มิลลิลิตร ที่มี cytodex bead อยู่ด้วย การเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บแบบ
ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่มีการบินทุก 6 ชั่วโมง และมีการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาณ
เท่าเดิมทุกครั้งที่มีการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์

การศึกษา in vivo ทั้งในสัตว์ทดลองและชายปกติ (Mendelson, 1977;
Dees et al. 1985) ที่กล่าวไว้ในบทหน้า 7 และ 8 ว่า ใช้เอทานอลปริมาณ 2.3 กรัม/
กิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 3 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ตามลำดับ พบว่าปริมาณ LH ในกระแสเลือด
ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่วัดปริมาณฮอร์โมนด้วยวิธี เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่า
การทดลองนี้ซึ่งใช้เพียง 0.4% (เทียบได้กับ 0.13 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) และ 0.6%
(เทียบได้กับ 0.20 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว) นับได้ว่าเป็นปริมาณที่ต่ำมากที่จะไม่มีผลต่อเซลล์
สิ่งมีชีวิตใด ๆ

ผลของการศึกษาครั้งนี้อาจนำไปอธิบายเพิ่มเติม เกี่ยวกับการทดลองในไพรเมต
(Mello et al. 1985) ซึ่งได้สรุปไว้ดังที่กล่าวไว้ในบทหน้า 9 ว่า เอทานอลในปริมาณ
2.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว และ 3.5 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของ
LH ในกระแสเลือดที่ผู้ทดลองใช้วัดโดยวิธี เรดิโออิมมูโนแอสเสย์ รวมทั้งที่รายงานในสุนัข
(Pameter et al. 1981) ซึ่งได้สรุปเช่นเดียวกันว่า เอทานอลในปริมาณ 1.92 กรัม/
กิโลกรัมน้ำหนักตัว ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของ LH ในกระแสเลือดที่ผู้ทดลองวัดโดยเรดิโอ
อิมมูโนแอสเสย์ ซึ่งอาจอธิบายต่อไปได้ว่าปริมาณ LH ไม่เปลี่ยนแปลง มิได้หมายความว่า
เอทานอลไม่มีผลใด ๆ ต่อลิตินในซอร์โมน เพราะผู้วิจัยมิได้วัดไบโอแอกทิวิตีของซอร์โมน
ซึ่งแท้จริงแล้วแม้จะมีซอร์โมนในกระแสเลือดในปริมาณเดิม แต่ก็ไม่สามารถทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์
เป้าหมายได้เท่าเดิม เพราะอาจสูญเสียค่าไบโอแอกทิวิตีไปแล้ว ดังที่ได้ยืนยันจากผลการศึกษา
ครั้งนี้

จากผลการทดลองเหล่านี้พอที่จะรวบรวมมาสรุปเป็นประเด็นที่บรรลุตามวัตถุประสงค์
การศึกษาที่ตั้งไว้ดังต่อไปนี้คือ

1. เอทานอลมีผลโดยตรงต่อซอร์โมน LH ที่หลังจากเซลล์ต่อมได้สมองแม่ให้ได้รับ
ในระดับต่ำ 0.4 - 0.6% และในช่วงระยะเวลาสั้น (24 ชั่วโมง) ซึ่งเป็นระดับต่ำสุดของ
เอทานอลที่ไม่เคยมีผู้ใดรายงานว่ามีผลต่อไบโอแอกทิวิตีของซอร์โมนตัวนี้.

2. ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายกลไกที่เอทานอลมีผลต่อหน้าที่การทำงานของเซลล์
ต่อมได้สมอง คือ

2.1 ไม่มีผลต่อเซลล์ต่อมได้สมองส่วนหน้าในการสร้างและหลั่งฮอร์โมน

2.2 ผลเฉียบพลันของเอทานอลในช่วง 24 ชั่วโมง ต่อ LH โมเลกุลที่หลั่ง
ออกจากเซลล์จะมีคุณสมบัติทางไบโอแอกทिवิตีลดลง 24 - 26%

เป็นที่น่าสนใจว่า เอทานอลมีผลร่วมกับโกรนาโดโทรปินริลีสซิงฮอร์โมนในการ
ควบคุมการหลั่ง LH ในด้านปริมาณได้ นอกจากนี้เอทานอลยังอาจมีผลต่อความไว
(sensitivity) ของ receptors บน LH cells ที่มีต่อโกรนาโดโทรปินริลีสซิงฮอร์โมน
อีกด้วย ซึ่งเหล่านี้เป็นข้อคิดสำหรับงานวิจัยต่อไปที่จะใช้ประโยชน์จากการเลี้ยงเซลล์
ตรวจสอบทั้ง เอดีไอเอ็มเอ็มวี โนแอสเสย์และไบโอแอสเสย์ และวัดปริมาณกรดอะมิโนเพื่อหาค่าตอบ
ดังกล่าวอย่างเหมาะสมต่อไปได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

- Abraham, G. E., "Ovarian and Adrenal Contribution to Peripheral Androgens during the Menstrual Cycle," J. Clin. Endocrinol. Metab., 39, 340-346, 1974.
- Anderson, R. A., B. R. Willis, C. Oswald, J. M. Reddy, S. A. Beyley, and L. J. D. Zaneveld, "Hormonal Imbalance and Alterations in Testicular Morphology Induced by Chronic Ingestion of Ethanol," Biochem. Pharmacol., 29, 1409-1419, 1980.
- Arena, J. M., Poisoning, pp. 209-213, Springfield Illinois, U.S.A., 4th ed., 1979.
- Aswaroengchai, H., S. M. Russell, and C. S. Nicoll, "Electrophoretically Seperable Forms of Rat Prolactin with Different Bioassay and Radioassay Activities," Endocrinology, 102, 407-414, 1978.
- Badr, F. M., M. S. Smith, S. L. Daltroio, and A. Bartke, "Role of the Pituitary and the Adrenals in Mediating the Effect of Alcohol on Testicular Steroidogenesis in Mice," Steroid, 34, 477-482, 1979.
- Bajpai, H. S., R. K. Smith, K. S. S. Nair, J. P. M. Chansouria and K. M. Udupa, "Observation on Adrenocortical Function in Cirrhosis of Liver," J. Assoc. Physicians. India, 21, 761-766, 1973.
- Baraona, E., and C. S. Lieber, "Effect of Chronic Ethanol Feeding on Serum Lipoprotein Metabolism in the Rat," J. Clin. Invest., 49, 769-778, 1970.

- Bhalla, V. K., G. J. H. Chen, M. S. Gnanaprakasam, "Effect of In vivo Administration of Human Chorionic Gonadotropin and Ethanol on the Processes of Testicular Receptor Depletion and replenishment," Life Sci., 24, 1315-1324, 1983.
- Braustein, G. D., L. E. Reichert, E. V. Van Hall, J. L. Vaitukaitis, and G. Ross, "The Effect of Desialylation on the Biology and Immunology Activity of Human Pituitary Luteinizing Hormone," Biochem. Biophys. Res. Commun., 42, 962, 1971.
- Cameron, C. B., "Urinary Excretion of Estrone, Oestradiol-17 β and Oestradiol in Patients with Liver Disease," J. Endocrinol., 15, 199-205, 1957.
- Cappel, S. C., J. A. Resko, R. L. Norman, and H. G. Spies, "Studies in Rhesus Monkeys on the Site Where Estrogens Inhibit Gonadotropins : Delivery of 17- β Estrodiol to the Hypothalamus and Pituitary Gland," J. Clin. Endocrinol. Metab., 52, 1-8, 1981.
- Cicero, J. J., E. R. Meyer, and R. D. Bell, "Effect of Ethanol on the Hypothalamic Pituitary Luteinizing Hormone Axis and Testicular Steroidogenesis," J. Pharmacol. Exp. Ther., 208, 210-215, 1979.
- Cobb, C. F., D. H. Van Thiel, M. F. Ennis, J. S. Gavalier, and R. Lester, "Acetaldehyde and Ethanol are Testicular Toxin," Gastroenterology, 75, 958, 1978.
- Dafau, M. L., G. D. Hodgen, A. L. Goodman, and K. J. Catt, "Bioassay of Circulating Luteinizing Hormone in the Rhesus Monkey Comparison with Radioimmunoassay during Physiological Changes," Endocrinology, 100, 1557-1565, 1977.

- Dees, W. L., R. Valeria, K. P. Gerald, and M. M. Samuel, "Ethanol and Pulsatile Release of Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone and Prolactin in Ovariectomized Rats," Alcoholism, 1, 641-646, 1985.
- Deturck, K. H., and W. H. Vogel, "Effect of Acute Ethanol on Plasma and Brain Catecholamine Levels in Stressed and Unstressed Rats Evidence for an Ethanol Stress Interaction," J. Pharmacol. Exp. Ther., 223, 348-354, 1982.
- Ekin, R. P., "Theoretical Aspects of Saturation Analysis," In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine, pp. 325, International Atomic Energy Agency, Vienna, 1970.
- Ellingboe, J., and C. C. Varanelli, "Ethanol Inhibits Testosterone Biosynthesis by Direct Action on Leydig Cells," Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 24, 87, 1979.
- Emanuele, M. A., S. Hojvat, N. V. Emanuele, and S. Zelke, "The Effect of Alcohol on Quantitative and Qualitative Changes in Luteinizing Hormone (LH) in the Female Rat," Endocrine. Rev., 12, 123-136, 1986.
- Eskay, R. L., R. S. Ryback, M. Goodman and E. Majchrowicz, "Effect of Chronic Ethanol Administration on Plasma Levels of LH and the Estrous Cycle in the Female Rat," Endocrine. Rev., 12, 123-136, 1986.
- Evan, H. M., M. E. Sompson, and R. J. Pencharz, "An Anterior Pituitary Gonadotrophic Fraction (ICSH) Specifically Stimulating the Interstitial Tissue of Testis and Ovary," Cold. Spring Harbor. Symp. Quant. Biol., 5, 229-240, 1937.

- Everett, J. W., "Central Nervous Control of Reproductive Functions of Adenohypophysis," Physio. Rev., 44, 373-431, 1964.
- Ferrin, M., "Neuroendocrine Control of Ovarian Function in the Primate," J. Reprod. Fertil., 69, 369-381, 1983.
- Fevold, H. L., F. L. Hisaw, and S. L. Leonard, "The Gonad Stimulating and the Luteinizing Hormones of the Anterior Lobe of the Hypophysis," Am. J. Physiol., 97, 291-301, 1931.
- Freindel, N., "Studies on the Pathogenesis and Clinical Failures of Alcohol Hypoglycemia (abstract)," J. Clin. Invest., 41, 1359, 1962.
- Gavaler, J. S., D. H. Van Thiel, and R. Lester, "Ethanol : A Gonadal Toxin in the Mature Rat of Both Sexes," Alcoholism, 4, 271-176, 1980.
- Gavaler, J. S., T. Urso, and D. H. Van Thiel, "Ethanol : Its Adverse Effect Upon the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal-Axis," Substance and Alcohol Actions/Misuse, 4, 97-110, 1983.
- Gnanprakasam, M. S., J. H. Chen, J. H. Sutherland, and V. K. Bhalla, "Receptor Depletion and Replenishment Processes, In vivo Regulation of Gonadotropin Receptors by Luteinizing Hormone, Follicle Stimulating Hormone and Ethanol in the Rat Testis," Biol. Reprod., 20, 991-1000, 1979.
- Gnat, P. A., P. T. Tho, V. K. Bhalla, P. G. Mc Donough, A. Gostoff, and V. B. Mahesh, "Ethanol Induced Depletion of Gonadotropin Receptors in Rat Testis : A Comparative Study between Alcohol Fed and Isocalorically Fed Animals," J. Pharmacol. Exp. Ther., 223, 848-853, 1982.

- Goodman, A. D., R. Tanebaum, D. R. Wrigth, K. D. Trimble, and D. Rabinowitz, "Existence of "Big" and "Little" forms of Immunoreactive Growth Hormone in Human Plasma," Heterogeneity of Polypeptide Hormone, (Rabinowitz, D., and J. Roth, eds.) pp. 46-56, Academic Press, New York, 1974.
- Goodman, R. L., and F. J. Karch, "Pulsatile Secretion of LH Differential Suppression by Ovarian Steroids," Endocrinology, 170, 1283-1290, 1980.
- Gordon, G. G., K. Altman, A. L. Southern, E. Rubin, and C. S. Lieber, "Effect of Alcohol (Ethanol, Administration on Sex Hormone Metabolism in Normal Men," N. Eng. J. Med., 195, 793-797, 1976.
- Gordon, G. G., A. L. Southern, and C. S. Lieber, "The Effect of Alcohol Liver Disease and Alcohol Ingestion on Sex Hormone Levels," Alc. Clin. Exp. Res., 2, 259-264, 1978.
- Graesslin, D. A. Spies, H. C. Weise, and G. Bettendorf, "Properties of Human Pituitary and Urinary LH," Acta. Endocrinol., (kbh, suppl), 173, 56-60, 1973.
- Greenwood, F. C., W. M. Hunter, and J. S. Glover, "The Preparation of ¹³¹I-labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity," Biochem. J., 89, 114-123, 1963.
- Harnell, O., and O. Johnson, "Effect of Ethanol on Plasma Triglyceride in Male and Female Rats," Lipids, 8, 503-508, 1973.
- Hofman, F. G., A Handbook on Drug and Alcohol (the biomedical aspects), pp. 97-117, Oxford Univ. Press, New York, 2nd ed., 1983.

- Hugues, J. N., T. Coste, G. Perret, M. Jayle, J. Sebauoun, and E. Modigliani, "Hypothalamo-Pituitary-Ovarian Function in the Thirty-One Women with Chronic Alcoholism," Clin. Endocrinol., 12, 543-551, 1980.
- Hunter, W. M., and F. C. Greenwood, "Preparation of Iodine-131 Labelled Human Growth Hormone of High Specific Activity," Nature, 194, 495-496, 1962.
- Hymers, W. C., "Separation of Organelles and Cells from the Mammalian Adenohypophysis," The Anterior Pituitary (Tixier, Vidal, A., and M. G. Farquhar, eds,) pp. 137-180, Academic Press, New York, 1975.
- Israel, Y. H., A. Kalent, and A. E. LeBlanc, "Effects of Lower Alcohols on Potassium Transport and Microsomal Adenine-Tri-Phosphate Activity of the Rat Cerebral Cortex," Biochem. J., 100, 27-33, 1966.
- Johnston, D. E., Y-B. Chiao, J. S. Gavalier, and D. H. Van Thiel, "Inhibition of Testosterone Synthesis by Ethanol and Acetaldehyde," Biochem. Pharmacol., 30, 1827, 1981.
- Julien, R. M., A Primer of Drug Action, pp. 121-129, W. H. Freeman Co., San Francisco, 1981.
- Katzung, B. G., Basic of Clinical Pharmacology, pp. 231-238, Lange Medical Publication, California, 1982.
- Kell, B., and H. E. Grotzan, "Characterization of Rat Pituitary Luteinizing Hormone Change Microheterogeneity in Male and Female Rats Using Chromatofocusing : Effects of Castration," Endocrinology, 117, 354-360, 1985.

Kent, J. R., R. J. Scaramuzzi, W. Lauwers, A. F. Parlow, M. Hill, and R. Penardi, "Plasma Testosterone Estradiol and Gonadotropin in Hepatic Insufficiency," Gastroenterology, 64, 111-115, 1973.

Kley, H. K., E. Nieschlag, W. Wiegelman, H. Solback, and H. L. Kruskemper, "Steroid Hormones and Their Binding in Plasma of Male Patients with Fatty Liver, Chronic Hepatitis and Liver Cirrhosis," Acta. Endocrinol., 79, 275-285, 1973.

Knobil, E., T. M. Plant, L. Wildt, P. E. Belchetz, and G. Marshall, "Control of the Rhesus Monkey Menstrual Cycle : Permissive Role of Hypothalamic Gonadotropin Releasing Hormone" Science, 207, 1311-1373, 1980.

Lester, R., and D. H. Van Thiel, "Gonadal Function in Chronic Alcohol Men," Adv. Exp. Med. Biol., 85, 399-414, 1977.

Lieber, C. S., "Liver Disease and Alcohol, Fatty Liver, Alcohol Hepatitis, Cirrhosis, and Their Interrelationship," Ann. N. Y. Acad. Sci., 252, 63-84, 1975.

_____, "The Metabolism of Alcohol," Sci. Amer., 234, 25-33, 1976.

_____, "Metabolism and Metabolic Effect of Alcohol," Med. Clin. North. Am., 68, 3-31, 1984.

Lindholm, J., N. Fabricus-Bjerre, M. Bahnsen, P. Boiesen, L. Bangstrup, M. Lau Pedersen, C. Hagen, "Pituitary-Testicular Function in Patients with Chronic Alcoholism," Eur. J. Clin. Invest., 8, 269-272, 1978.

- Lloyd, C. W., and R. H. William, "Endocrine Changes Associated with Laennec's Cirrhosis of the Liver," Amer. J. Med., 4, 315-330, 1948.
- Lumeng, L., and E. J. Davis, "Mechanism of Ethanol Suppression Gluconeogenesis," J. Biol. Chem., 245, 3179-3185, 1970.
- Magraf, W., C. A. Moyer, L. E. Ashford, and L. W. Lavelle, "Adrenocortical Function in Alcoholics," J. Surgical. Research., 7, 55-62, 1977.
- Marks, V., and J. W. Wright, "Endocrinological and Metabolic Effect of Alcohol," Proc. Roy. Soc. Med., 70, 337-343, 1977.
- Mello, M. K., J. H. Mendelson, P. Mark, E. James, and A. S. T. Skupny, "Alcohol Effect on Luteinizing Hormone and Testosterone in Male Macaque Monkeys," J. Pharmacol. Exp. Ther., 233, 588-596, 1985.
- Mendelson, J. H., M. K. Mello, J. Ellingboe, "Effect of Acute Alcohol Intake in Pituitary-Gonadal-Hormone in Normal Human Males," J. Pharmacol. Exp Ther., 202, 676-682, 1977.
- Morgan, M. Y., "Alcohol and Endocrine System," Medical Bullenstein, 38, 35-42, 1982.
- Morland, J., and A. E. System, "Effect of Ethanol Intake on the Incorporation of Labelled Amino Acid into Liver Protein," Biochem. Pharmacol., 25, 2125-2130, 1976.
- Mowat, N. A. G., C. R. W. Edwards, R. Fisher, A. S. McNeilly, J. R. B. Green, and A. M. Dawson, "Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Function in Men with Cirrhosis of the Liver," Gut, 17, 345-350, 1976.

Mukhopadhyay, A. K., F. A. Leidenberger, and V. Lichtenberg,
 "A Comparison of Bioactivity and Immunoactivity of Luteinizing
 Hormone Stored in and Released In vitro from Pituitary Glands
 of Rats under Various Gonadal States," Endocrinology, 104,
 925-931, 1979.

Nakai, Y., T. M. Plant, D. L. Hess, E. J. Keogh, and E. Knobil,
 "On the Site of the Negative and Positive Feedback Actions
 of Estradiol in the Control of Gonadotropin Secretion in
 the Rhesus Monkey," Endocrinology, 102, 1008-1014, 1978.

Pameter, R. W., T. W. Bodden and M. A. Silvert, "Chronic Ethanol
 Ingestion Enhances GnRH Stimulated LH Response of Castrated
 Male Dogs," J. Reprod. Fertil., 93, 91-94, 1981.

Pawan, G. L. S., "Mechanism of Alcohol (Ethanol) in Man," Proc. Nutr.
 Soc., 31, 83-89, 1972.

Plant, T. M., L. C. Krey, J. Mossy, T. J. McCormack, D. L. Hess, and
 E. Knobil, "The Arcuate Nucleus and the Control of Gonadotropin
 Prolactin Secretion in the Female Rhesus Monkey (Macaca
 mulatta)," Endocrinology, 102, 52-62, 1978.

Rabinowitz, D., R. Benvenist, J. Bell, Heterogeneity of Human
 Luteinizing Hormone, In Rabinowitz D & Roth, J. (eds),
Heterogeneity of Polypeptide Hormone p. 90-97, Academic Press,
 New York, 1977.

Redmond, G. P., "Effect of Ethanol on Pulsatile Gonadotropin Secretion
 in the Male Rat," Alc. Clin Exp. Res., 4, 226-232, 1980.

- Roos, P., L. Nyberg, L. Wide, and C. Gemzell, "Human Pituitary Luteinizing Hormone Isolation and Characterization of Four Glycoprotein with Luteinizing Activity," Biochem. Biophys. Acta., 405, 363-379, 1975.
- Rothschild, M. A., S. S. Schreiber, and M. Oratz, "Alcohol Inhibition of Protein Synthesis," Clin. Toxicol., 8, 349-357, 1975.
- Ryback, R. S., "Chronic Alcohol Consumption and Menstruation," J. Am. Med. Assoc., 238, 2143-2150, 1973.
- Schade, R. R., G. Bonner, V. L. Gay, D. H. Van Thiel, "Evidence for a Direct Inhibitory Effect of Ethanol upon Gonadotropin Secretion at the Pituitary Level," Alcoholism, 7, 150-152, 1983.
- Schaffner, F., and H. Popper, "Alcoholic Hepatitis in Spectrum of Ethanol Induced Liver Injury," Gastroenterology, 5, 69-78, 1970.
- Short, R. V., and P. Eckstein, "Oestrogen and Progesterone Level in the Pregnant Rhesus Monkeys," J. Endocrinol., 22, 15-22, 1961.
- Smith, D. E., and E. T. Engle, "Experimental Evidence Regarding the Role of the Anterior Pituitary in the Development and Regulation of the Genital System," Am. J. Anat., 40, 159-217, 1927.

- Storring, P., A. A. Zaidi, Y. G. Mistry, Froyso, B., Stenning, B. E., and E. Diczfalusy, "A Comparison of Preparations of Highly Purified Human Pituitary Follicle Stimulating Hormone : Differences in the Follicle Stimulating Hormone Potencies as Determined by In Vivo Bioassay. In vitro Bioassay and Immunoassay, J. Endocrinol., 91, 353-362, 1981.
- Sufi, S., A. Donaldson, and S. L. Jeffcoate, WHO Method Manual of RIA, 10th ed., 1986.
- Tomasulo, P. A., R. M. H. Kater, and F. L. Iler, "Impairment of Thiamine Absorption in Alcoholism," Amer. J. Clin. Nutr., 21, 1340-1349, 1968.
- Toro, G., R. C. Kolodney, L. Jacobs, W. H. Master, and W. H. Daughaday, "Failure of Alcohol to Alter Pituitary and Target Hormone Levels," Clin. Res., 21, 503, 1973.
- Van Thiel, D. H., "Alcohol and Its Effect on Endocrine Functioning," Alcoholism, 4, 44-49, 1980.
- Van Thiel, D. H., J. S. Gavalier, J. Vaitukaitis, and R. Lester, "Evidence for an Isolated Defect in Pituitary Secretion of LH in Chronic Alcoholic Men," Gastroenterology, 72, 933-937, 1976.
- Van Thiel, D. H., J. S. Gavalier, and R. Lester, "Ethanol : A Gonadal Toxin in the Female," Drug Alcohol Depend, 2, 273-280, 1977.
- Van Thiel, D. H., J. S. Gavalier, R. Lester, and M. D. Goodman, "Alcohol Induced Testicular Atrophy," Gastroenterology, 69, 326-332, 1975.

Van Thiel, D. H., and R. Lester, "Further Evidence for Hypothalamic-Pituitary Dysfunction in Alcoholic Men," Alcoholism, 2, 265-270, 1978.

_____, "The Effect of Chronic Alcohol Abuse on Sexual Function," Endocrinol. Rev., 8, 499-511, 1979.

_____, "Sex and Alcohol," N. Eng. J. Med., 291, 251-253, 1974.

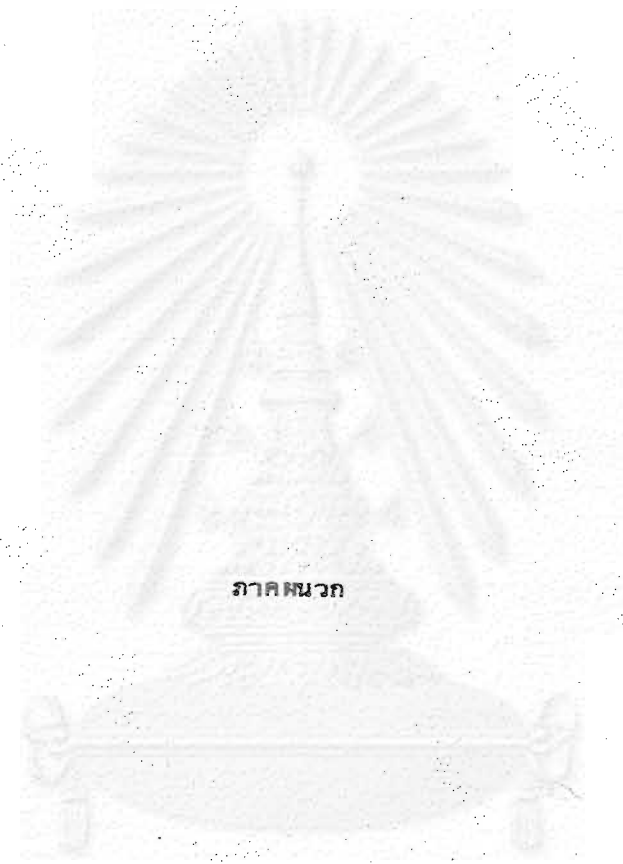
Wallgren, H., Barry III H 1970, Actions of Alcohol, Elsevier, Amsterdam, vol. 1.

Willis, B. R., R. A. Anderson, C. Oswald, and L. J. D. Zaneveld, "Ethanol Induced Male Reproductive Tract Pathology as a Function of Ethanol Dose and Duration of Exposure," J. Pharmacol. Exp. Ther., 225, 470-478, 1983.

Wright, J. W., D. E. Frey, J. Merry, V. Marks, "Abnormal-Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Function in Chronic Alcoholics," Br. J. Addict, 71, 211-215, 1976.

Ylikaharie, R. M., M. O. Huttunen, and M. Markonen, "Acute Effects of Alcohol on Anterior Pituitary Secretion of Tropic Hormone," J. Clin. Endocrinol. Metab., 46, 715-719, 1978.

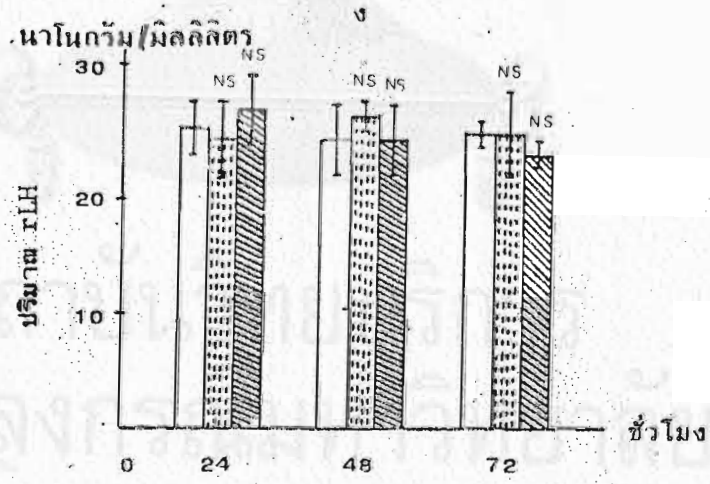
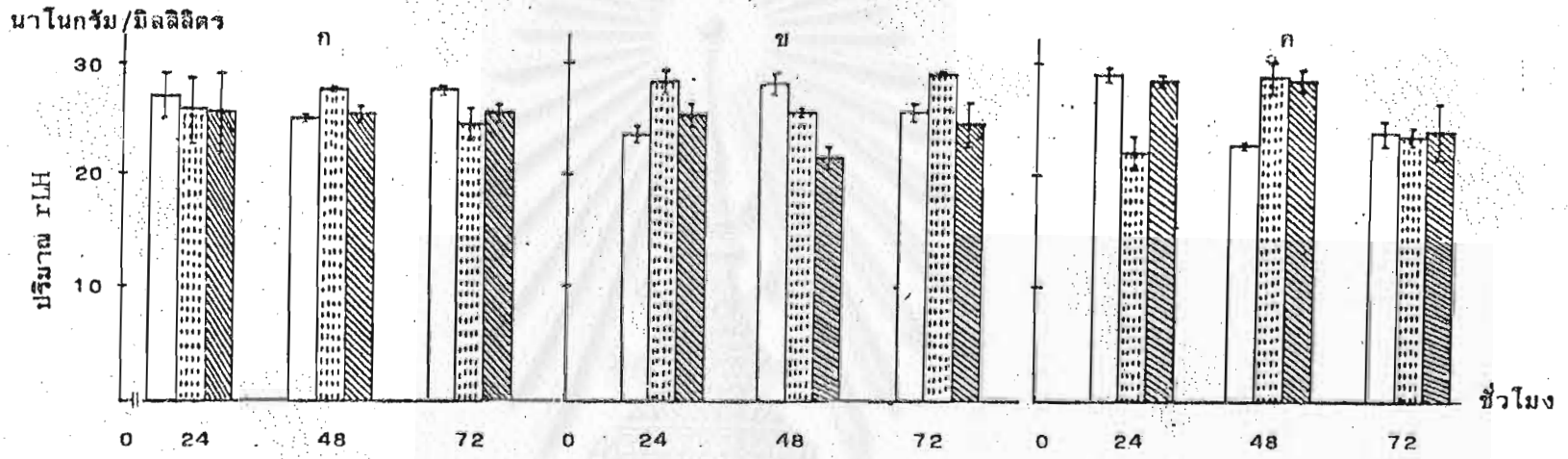
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 การทดลองที่ 1 แสดงผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ในเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการหลั่ง RIA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมอง ส่วนหน้าของหนูแรทในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ

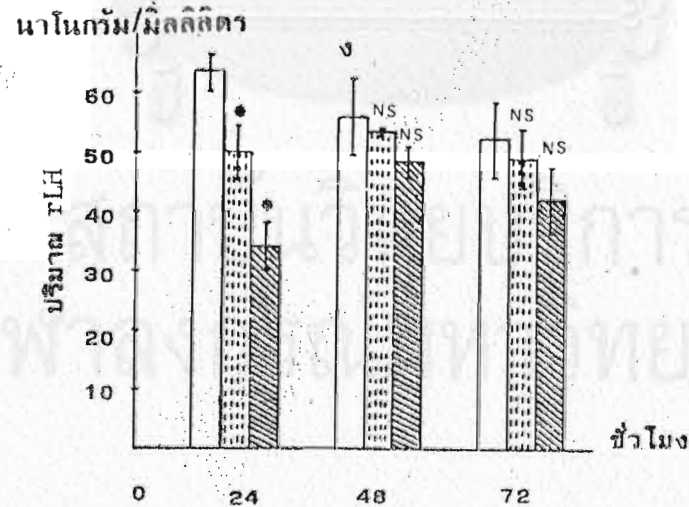
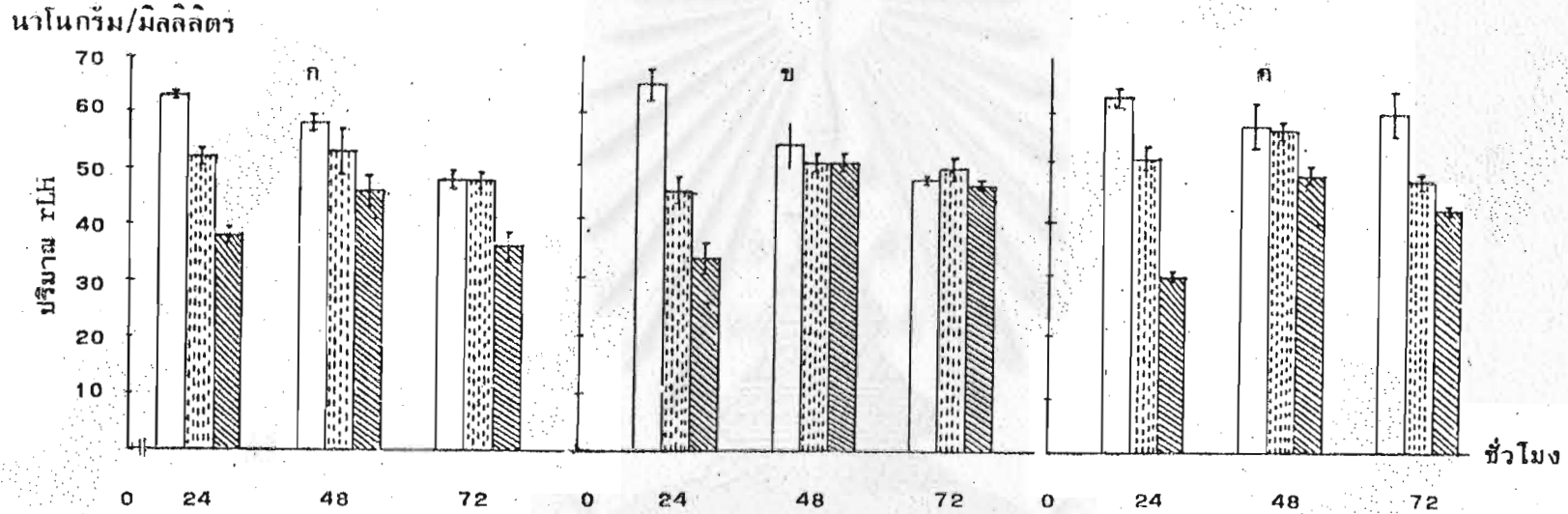


- หมายเหตุ**
- รูป ก. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 1 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D.$ ($n = 2$)
- รูป ข. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 2 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D.$ ($n = 2$)
- รูป ค. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 3 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D.$ ($n = 2$)
- รูป ง. แสดงผลการทดลองที่ 1 เป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง แสดงค่าเป็น $\bar{X} \pm S.D.$ โดยมี $n = 3$ ค่า p หาจาก Duncan's Multiple Range Test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $p < 0.05$
- NS ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
- กลุ่มควบคุม
- เอทานอล 0.4%
- เอทานอล 0.6%

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 การทดลองที่ 1 แสดงผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ในเวลา 24 ชั่วโมงต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองของหนูแรทในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ



หมายเหตุ รูป ก. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 1 ค่าที่ได้เป็น

$$\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$$

รูป ข. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 2 ค่าที่ได้เป็น

$$\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$$

รูป ค. แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 3 ค่าที่ได้เป็น

$$\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$$

รูป ง. แสดงผลการทดลองที่ 1 เป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง

3 ครั้ง แสดงค่าเป็น $\bar{X} \pm S.D.$ โดยมี $n = 3$ ค่า p ทาจาก

Duncan's Multiple Range Test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

$$p < 0.05$$

* แยกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$

NS ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ



กลุ่มควบคุม



เอทานอล 0.4%

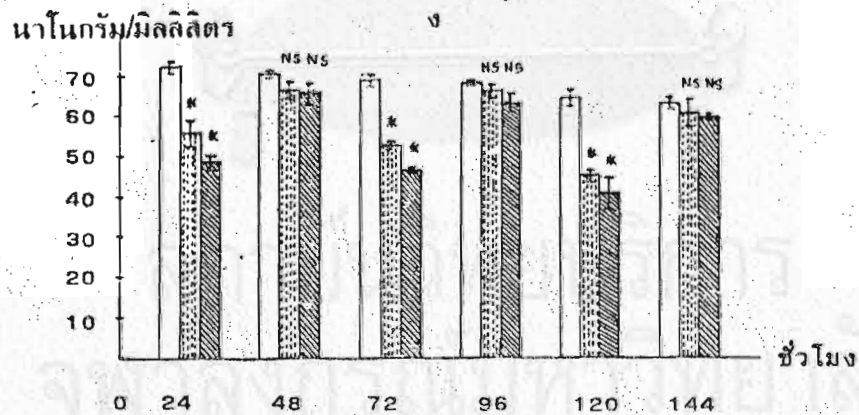
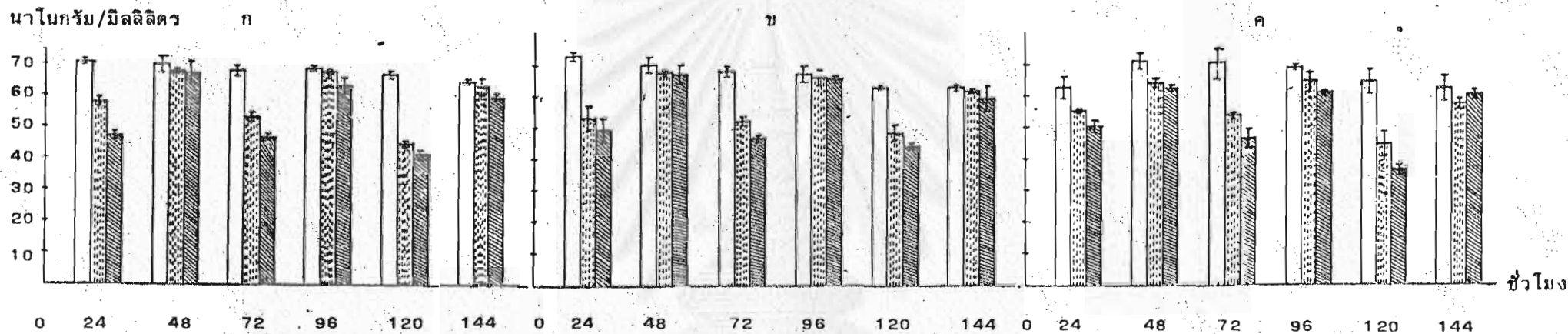


เอทานอล 0.6%

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 การทดลองที่ 2 แสดงผลเอทานอล 0.4% และ 0.6% (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง)ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้าของหนูแรทในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนที่ 24, 48, 72, 96, 120 และ 144 ชั่วโมง ตามลำดับ



- หมายเหตุ**
- รูป ก. แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 1 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$
- รูป ข. แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 2 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$
- รูป ค. แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 3 ค่าที่ได้เป็น $\bar{X} \pm S.D. (n = 2)$
- รูป ง. แสดงผลการทดลองที่ 2 เป็นค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง แสดงค่าเป็น $\bar{X} \pm S.D.$ โดยมี $n = 3$ ค่า p ทาจาก Duncan's Multiple Range Test เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม $p < 0.05$
- * แดกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ $p < 0.05$
- NS ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
- กลุ่มควบคุม
- เอทานอล 0.4%
- เอทานอล 0.6%

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า RIA-rLH ที่หลังจาก เซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ RIA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		27.0 \pm 2.12	25.0 \pm 0.44	27.6 \pm 0.28
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E)	25.6 \pm 3.18	27.6 \pm 0.28	24.5 \pm 0.84
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E)	25.5 \pm 3.54	25.0 \pm 0.57	25.5 \pm 0.99

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า RIA-rLH ที่หลังจากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ RIA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		23.5 \pm 1.41	28.0 \pm 0.14	25.5 \pm 0.85
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E)	28.3 \pm 1.27	25.5 \pm 0.42	29.0 \pm 0.14
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E)	28.5 \pm 2.26	21.5 \pm 1.13	24.2 \pm 1.98

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 3 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า BA-rLH ที่หลังจากเซลล์คอมไตสมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		28.0 \pm 0.71	22.6 \pm 0.28	23.9 \pm 0.99
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E)	22.2 \pm 2.4	28.8 \pm 1.98	23.5 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E)	27.5 \pm 0.42	27.5 \pm 1.27	24.1 \pm 2.55

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดลองที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า RIA-rLH ที่หลัง จากเซลล์ค่อมได้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ยของ ผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ RIA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 3)		26.16 \pm 2.36	25.00 \pm 3.00	25.67 \pm 1.26
+ เอทานอล 0.4% (n = 3)		(E) 25.33 \pm 3.25	27.03 \pm 1.34	25.66 \pm 3.69
+ เอทานอล 0.6% (n = 3)		(E) 27.50 \pm 3.00	25.13 \pm 3.10	23.83 \pm 1.71

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงผลการทดลองที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า RIA-rLH ที่หลัง จากเซลล์ค่อมได้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ยของ ผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ RIA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 3)		26.16 \pm 2.36	25.00 \pm 3.00	25.67 \pm 1.26
+ เอทานอล 0.4% (n = 3)		^(E) 25.33 \pm 3.25	27.03 \pm 1.34	25.66 \pm 3.69
+ เอทานอล 0.6% (n = 3)		^(E) 27.50 \pm 3.00	25.13 \pm 3.10	23.83 \pm 1.71

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยง เซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		63.0 \pm 0.71	56.0 \pm 1.41	48.0 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E)	52.0 \pm 1.41	52.5 \pm 4.24	48.0 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E)	38.0 \pm 1.41	46.0 \pm 2.83	36.0 \pm 2.83

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/บิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยง เซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/บิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		66.0 \pm 2.82	54.0 \pm 4.24	47.5 \pm 0.71
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)		(E) 46.0 \pm 2.82	51.0 \pm 1.41	49.5 \pm 2.12
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)		(E) 35.0 \pm 2.82	51.0 \pm 1.41	46.5 \pm 0.71

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 13 แสดงผลการทดลองที่ 1 ครั้งที่ 3 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/5 $\times 10^4$ เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/5 $\times 10^4$ เซลล์)		
		อาหารเลี้ยงเซลล์เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)		
		24	48	72
กลุ่มควบคุม (n = 2)		62.5 \pm 2.12	58.5 \pm 1.41	60.0 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E)	51.5 \pm 2.12	56.5 \pm 1.41	47.5 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E)	29.5 \pm 0.71	48.0 \pm 1.41	42.5 \pm 1.41

หมายเหตุ (E) ให้เอทานอล 0-24 ชั่วโมง

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงผลการทดลองที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อค่า BA-rLH ที่หลังจากเซลล์ค่อมได้ผสมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมงแรก) แสดงค่าเฉลี่ยของผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/5 \times 10⁴ เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/5 \times 10 ⁴ เซลล์)			ปริมาณ BA-rLH ตลอดการทดลอง
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)			
		24	48	72	
กลุ่มควบคุม (n = 3)	(E)	63.67 \pm 3.06	56.33 \pm 6.53	52.33 \pm 6.43	172.33 \pm 16.02
+ เอทานอล 0.4% (n = 3)	(E)	50.00 \pm 4.32*	53.50 \pm 0.71	49.00 \pm 5.29	152.50 \pm 10.23*
+ เอทานอล 0.6% (n = 3)	(E)	34.00 \pm 4.00*	48.33 \pm 2.52	42.00 \pm 5.57	124.33 \pm 12.09*

หมายเหตุ

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ p < 0.05

** แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ p < 0.01

(E) ให้เอทานอลช่วง 0-24 ชั่วโมง

ตารางที่ 15 แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 1 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมไคสมของส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 0-24, 48-72 และ 96-120 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 24-48, 72-96 และ 120-144 ชั่วโมง) แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH(นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)					
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)					
		24	48	72	96	120	144
กลุ่มควบคุม (n = 2)		70.5 \pm 3.54	70.0 \pm 2.83	68.0 \pm 4.95	68.5 \pm 0.71	66.5 \pm 4.24	64.5 \pm 4.24
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)	(E1)	58.0 \pm 0.71	67.5 \pm 1.41	(E2) 52.0 \pm 0.71	67.5 \pm 3.54	(E3) 44.5 \pm 4.24	63.0 \pm 1.41
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)	(E1)	47.0 \pm 1.41	67.0 \pm 0.71	(E2) 46.5 \pm 2.83	63.0 \pm 0.71	(E3) 41.0 \pm 1.41	59.5 \pm 1.41

หมายเหตุ E1 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง
 E2 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง
 E3 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 96-120 ชั่วโมง

ตารางที่ 16 แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 0-24, 48-72 และ 96-120 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 24-48, 72-96 และ 120-144 ชั่วโมง) แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)					
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)					
		24	48	72	96	120	144
กลุ่มควบคุม (n = 2)		73.0 \pm 0.71	70.0 \pm 2.83	68.0 \pm 1.41	67.0 \pm 0.71	62.5 \pm 0.71	62.5 \pm 0.71
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)		(E1) 53.0 \pm 1.41	67.5 \pm 0.71	(E2) 52.0 \pm 1.41	66.0 \pm 0.71	(E3) 47.0 \pm 0.71	61.5 \pm 2.83
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)		(E1) 49.0 \pm 1.41	67.0 \pm 4.24	(E2) 46.5 \pm 0.71	65.5 \pm 2.83	(E3) 44.5 \pm 1.41	59.0 \pm 0.71

หมายเหตุ E1 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง
 E2 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง
 E3 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 96-120 ชั่วโมง

ตารางที่ 17 แสดงผลการทดลองที่ 2 ครั้งที่ 3 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 0-24, 48-72 และ 96-120 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 24-48, 72-96 และ 120-144 ชั่วโมง แสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH(นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)					
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)					
		24	48	72	96	120	144
กลุ่มควบคุม (n = 2)		72.5 \pm 1.41	71.0 \pm 2.83	70.5 \pm 1.41	68.5 \pm 2.82	64.0 \pm 0.71	62.0 \pm 0.71
+ เอทานอล 0.4% (n = 2)		(E1) 55.5 \pm 4.24	64.0 \pm 0.71	(E2) 53.5 \pm 1.41	64.5 \pm 2.82	(E3) 44.0 \pm 2.82	57.0 \pm 0.71
+ เอทานอล 0.6% (n = 2)		(E1) 50.0 \pm 4.24	62.5 \pm 4.24	(E2) 46.0 \pm 0.71	60.5 \pm 1.41	(E3) 36.0 \pm 0.71	60.0 \pm 4.24

หมายเหตุ E1 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง
 E2 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง
 E3 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 96-120 ชั่วโมง

ตารางที่ 18 แสดงผลการทดลองที่ 2 ผลของเอทานอล 0.4% และ 0.6% ต่อการหลั่ง BA-rLH จากเซลล์ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 0-24, 48-72 และ 96-120 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้เอทานอล 24 ชั่วโมง ช่วงระยะเวลา 24-48, 72-96 และ 120-144 ชั่วโมง) แสดงค่าเฉลี่ยผลการทดลองทั้ง 3 ครั้ง \pm S.D. นาโนกรัม/มิลลิลิตรอาหารเลี้ยงเซลล์/ 5×10^4 เซลล์

สภาพการเลี้ยงเซลล์	preincubation 48 ชั่วโมง	ปริมาณ BA-rLH (นาโนกรัม/มิลลิลิตร/ 5×10^4 เซลล์)						ปริมาณ BA-rLH ตลอดการทดลอง
		อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เปลี่ยนเวลา (ชั่วโมง)						
		24	48	72	96	120	144	
กลุ่มควบคุม (n = 3)		72.93 \pm 2.01 (E1)	70.74 \pm 1.06	69.16 \pm 1.35 (E2)	68.32 \pm 2.14	64.31 \pm 2.15 (E3)	63.25 \pm 1.29	408.11 \pm 10.00
+ เอทานอล 0.4% (n = 3)		55.41 \pm 3.05* (E1)	67.12 \pm 2.51	52.33 \pm 3.12* (E2)	66.00 \pm 4.12	45.32 \pm 1.25* (E3)	60.24 \pm 2.14	346.42 \pm 16.19**
+ เอทานอล 0.6% (n = 3)		48.68 \pm 4.11* (E1)	65.21 \pm 2.14	46.08 \pm 2.31* (E2)	63.29 \pm 1.25	40.29 \pm 2.18* (E3)	59.71 \pm 4.10	323.26 \pm 16.09*

หมายเหตุ * แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

** แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$

E1 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 0-24 ชั่วโมง

E2 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง

E3 ให้เอทานอลช่วงระยะเวลา 96-120 ชั่วโมง

ประวัติผู้เขียน

นางสาวอัมพร ทองภูเกียรติกุล เกิดวันที่ 11 เมษายน 2504 สำเร็จปริญญา
 วิทยาศาสตรบัณฑิต จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2526 เข้าศึกษาปริญญา
 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2527
 ได้รับทุนโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์จากทบวงมหาวิทยาลัยตามความต้องการของภาควิชา
 ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตบางแสน และได้รับทุนวิจัย
 พระมหิตลาธิเบศรอดุลยเดชวิกรม พระบรมราชชนก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี 2530



สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย