รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

กลไกการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองชรา

The mechanism of estrogen biosynthesis in aged brain

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินราย

ได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รหัสโครงการ 376730
สัญญาเลขที่137/2560

รายงานวิจัยฉบับบสมบูรณ์

โครงการ

กลไกการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองชรา

The mechanism of estrogen biosynthesis in aged brain

หัวหน้าโครงการผู้รับทุน

ผศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 137/2560

Acknowledgements

This work was financially supported by the Research Grant of Burapha University through National Research Council of Thailand (Grant no. 137/2560)

บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันดีว่าไม่พียงแต่เอสโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นจากต่อมเพศ แต่รวมถึงเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสด้วยที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างความจำ อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของของการให้เอสโตรเจนเพื่อรักษาภาวะความจำเสื่อมลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น ซึ่งปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบถึงบทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากฮิปโปแคมปัสในภาวะชรา งานวิจัยครั้งนี้จึงมีสมมุติฐานว่าการที่ประสิทธิภาพของการให้เอสโตรเจนลดลงในภาวะชรานั้นขึ้นกับเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากฮิปโปแคมปัส คณะผู้วิจัยจึงทดสอบสมมุติฐานในหนูแรทเพศเมียอายุ 2 5 10 19 เดือน โดยการวัดปริมาณของเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อสมองทั้งส่วน ฮิปโปแคมปัส และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ การแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน และเอนไซม์ที่สำคัญต่อการกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอย์ด ได้แก่ StAR และ P450scc เนื่องจากการทดลองก่อนหน้านี้แสองให้เห็นว่าระดับของเอสโตรเจนในเลือดไม่สัมพันธ์กับระดับของความสามารถในการจำได้ในภาวะชรา ในทางตรงกันข้าม ระดับของเอสโตรเจน และตัวรับเอสโตรเจน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่มที่อายุน้อยกว่า มากไปกว่านี้การแสดงออกของ เอนไซม์ StAR และ P450scc มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่อายุ 19 เดือน เช่นเดียวกัน จากทั้งหมดนี้สามารถสรุปได้ว่าน่าจะมีปัจจัยบางอย่างเมื่อสมองเข้าสู่ภาวะชราและมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชรา ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถในการจำ ในที่สุด

Abstract

It is widely known that not only the gonadal estradiol (E2) but hippocampal E2 plays an essential role in memory process. However, the efficacy of E2 treatment for memory impairment decreases with age. The role of hippocampal E2 during aging is currently unknown. This study hypothesize that the decrease in E2 efficacy during aging is dependent on hippocampal E2 level. We test this hypothesis in 2-, 5-, 10-, and 19-month-old female rats by quantitating the amount of E2 concentration, the expression level of its receptors and key steroidogenic enzymes in hippocampus. Since previous study showed that serum E2 should not be associated with the reduced spatial memory performance. In contract, the level of E2 and the expressions of its receptors were significantly decreased in hippocampus of 19-month old females compared to younger females. Furthermore, the expressions of key hippocampal steroidogenic enzymes, steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450scc), also significant decreased with age which resulted in the decreased of hippocampal E2 level. Taken together, we summarized that there are aging factors inhibited hippocampal E2 synthesis in aged rats which in turn contributed to the deficit of spatial memory performance.

สารบัญเรื่อง

หน้า

1. บทนำ
    1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน 1
    1.2 การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 2
    1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย 4
    1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 4
    1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
2. เนื้อเรื่อง
    2.1 เนื้อเรื่อง 3
    2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย 6
    2.3 ผลการทดลอง 9
3. อภิปราย/วิจารณ์
    3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินงาน 14
    3.2 อภิปรายผลการทดลอง 14
4. สรุปและเสนอแนะ 15
5. ผลผลิต 15

บรรณานุกรม 16

ประวัติคณะผู้วิจัย 19

สารบัญภาพ

รูปที่ 1 อายุที่เพิ่มขึ้นลดระดับของ E2 ใน hippocampus แต่ไม่ลดระดับของ E2 ใน cerebral cortex 9
รูปที่ 2 การแสดงออกของ StAR และ P450scc ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย 10
รูปที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของ P450scc ด้วยวิธี Immunoperoxidase 12
รูปที่ 4 การแสดงออกของ ERα และ ERβ ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย 13

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

α	Alpha
β	Beta
uM	Micromolar
ml	Milliliter
ANOVA	One-way analysis of variance
DAB	Diaminobenzidine tetrahydrochloride
DIV	days in vitro
DMSO	Dimethyl sulfoxide
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ELISA	The enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Estrogen receptor
NaF	Sodium Fluoride
PBS	phosphate buffered saline
P450scc	Cytochrome P450 side-chain-clevage
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TMB	Tetramethylbenzidine

1. บทนำ (Introduction)

1.1 เนื้อหาของเรื่องที่เคยมีผู้ทำมาก่อน

เมื่อประชาการคนสูงอายุเพิ่มขึ้น การศึกษาเกี่ยวกับภาวะชราจึงเพิ่มขึ้นโดย การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญและมีผลกระทบมากอย่างหนึ่งคือ ภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ ดังนั้นการศึกษาภาวะสมองชรา ซึ่งเป็นหนึ่งในข้อมูลพื้นฐานสำคัญในการเข้าถึงการรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุที่ถูกต้องและมีประสิทธิภาพต่อไป จากข้อมูลการระบาดของโรคพบว่า ภาวะความจำเสื่อมพบในผู้สูงอายุเพศหญิงมากกว่าเพศชายถึง 3.5 เท่า ที่อายุเท่ากัน ทำให้งานวิจัยมุ่งไปสู่อิทธิพลของฮอร์โมนเพศที่เปลี่ยนแปลงในภาวะชรา เป็นที่ทราบกันดีว่าเพศหญิงอายุ 50 ปีโดยเฉลี่ยจะเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (menopause) โดยมีการฝ่อของรังไข่ ส่งผลให้เกิดการลดลงของฮอร์โมนที่สังเคราะห์จากรังไข่ ที่สำคัญได้แก่ ฮอร์โมนเอสโตรเจน และเป็นที่มาของสาเหตุของภาวะความจำเสื่อมในหญิงชราวัยหมดประจำเดือน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่จะมีความสามารถของความจำลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเมื่อให้เอสโตรเจนทดแทนพบว่าความจำกลับมาเป็นปรกติได้ นอกจากนี้การให้เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสามารถเพิ่มแขนงประสาท และเพิ่มจำนวน dendritic spine ของเซลล์เพาะลี้ยงได้ซึ่งถือเป็นกลไกการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในการสสร้างความจำ จึงสามารถสรุปได้ว่า เอสโตรเจนมีบทบาทโดยตรงต่อการสร้างความจำและ ภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุเพศหญิงเป็นผลจากการขาดเอสโตรเจนจากรังไข่

1.2 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การเปลี่ยนแปลงทางด้านเศรษฐกิจ สังคม รวมถึงความก้าวหน้าทางการแพทย์ ส่งผลทำให้ประชากรมีอายุยืนยาวขึ้น ซึ่งข้อมูลจากกระทรวงสาธารณสุขเปิดเผยว่าประชากรผู้สูงอายุในประเทศไทยเพิ่มขึ้นปีละ 5 แสนคน และคาดว่าในปี 2568 ประเทศไทยก้าวเข้าสู่การเป็น "สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์" [1] ปัญหาที่พบได้บ่อยและมีความสำคัญต่อคุณภาพชีวิตของผู้สูงอายุอย่างหนึ่ง คือ ภาวะความจำเสื่อม [2, 3] ซึ่งเกิดจากการทำงานผิดปกติของเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำได้แก่ บริเวณฮิปโปแคมปัส และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ [4] ดังที่ได้กล่าวไปข้างต้นว่าก่อนหน้านี้เชื่อกันว่าภาวะหมดประจำเดือน เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความจำเสื่อมในผู้สูงอายุเพศหญิง เนื่องจากการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากรังไข่ (ovary) โดย granulosa cell [4-14] ในภาวะปกติเอสโตรเจนทำหน้าที่ส่งเสริมและสนับสนุนการทำงานของเซลล์ประสาท [14] ช่วยปกป้องเซลล์ประสาทจากสารพิษและสารอนุมูลอิสระ [23] รวมทั้งส่งเสริมสนับสนุนกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาท อาทิเช่น การเพิ่มศักย์ไฟฟ้าบริเวณ postsynaptic membrane การเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซแนปส์ และการสร้างไซแนปส์ใหม่ของเซลล์ประสาท [6, 13] ดังนั้นหากไม่มีเอสโตรเจนจากต่อมเพศจึงนำไปสู่ความผิดปกติของกระบวนการสร้างความจำและทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในที่สุดจากข้อมูลงานวิจัยเหล่านี้จึงนำไปสู่การให้เอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy) เพื่อรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ แต่วิธีการดังกล่าวก็มีข้อจำกัดที่สำคัญ กล่าวคือหากได้รับเอสโตรเจนมากเกินไปโดยเฉพาะในเพศหญิง เป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก [14, 23, 26]

นอกจาก granulosa cell ในรังไข่แล้ว เอสโตรเจนถูกสังเคราะห์ในอวัยวะอื่นๆ อีกด้วย ได้แก่ รก เต้านม และสมอง [10] โดยมีรายงานว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองมีบทบาทโดยตรงต่อกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำของเซลล์ประสาท [11] งานวิจัยทางคลินิครายงานว่า หญิงชราวัยหมดประจำเดือนที่ได้รับตัวยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจน (aromatase inhibitor) อย่างต่อเนื่องมีความจำลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ aromatase inhibitor [22] งานวิจัยต่อมาแสดงให้เห็นว่าหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ aromatase inhibitor จะสูญเสียกระบวนการ long-term potentiation (LTP) และมีจำนวนไซแนปส์ลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับในหนูทดลองที่ถูกตัดรังไข่แต่ไม่ได้รับ aromatase inhibitor [17, 24, 27] ในปี ค.ศ. 2012 งานวิจัยของ Chamniansawat และคณะ พบว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาททำหน้าที่เตรียมความพร้อมของเซลล์ประสาทก่อนการตอบสนองต่อเอสโตรเจนในกระแสเลือด [7] นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่าในภาวะที่ถูกตัดรังไข่ สัตว์ทดลองระยะชราจะมีจำนวนไซแนปส์น้อยกว่าในระยะวัยรุ่น [27] บ่งชี้ว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากรังไข่อาจไม่ใช่ปัจจัยหลักของภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุเพียงอย่างเดียว เพราะหากการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองของผู้สูงอายุอยู่ในระดับสมดุล ก็น่าจะสามารถคงสภาพการทำงานของเซลล์ประสาทให้อยู่ในภาวะปกติได้ตลอดจนน่าจะป้องกันภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุได้ด้วยแต่ในความเป็นจริงภาวะความจำเสื่อมยังคงพบในผู้สูงอายุเป็นหลัก [3] ดังนั้นเป็นไปได้หรือไม่ว่าไม่ใช่แค่ฮอร์โมนเอสโตรเจนจากต่อมเพศ แต่รวมถึงเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทด้วยที่ได้รับผลกระทบจากภาวะชรา และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อม ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทของสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ ในแต่ละช่วงอายุ ตลอดจนกลไกการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในเซลล์ประสาทชราซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้น่าจะเป็นข้อมูลใหม่ที่มีประโยชน์สูงสุดในการนำไปศึกษาต่อยอดเพื่อรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุ

1.3 วัตถุประสงค์และขอบเขตการวิจัย

1.3.1 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.3.1.1 เพื่อศึกษาปริมาณเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนูชรา

1.3.1.2 เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัส และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูชรา

1.3.1.3 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ steroidogenic enzymes ในเซลล์ประสาทส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนูชรา

1.3.1.4 เพื่อศึกษาการแสดงออกของ Arc ยีนและโปรตีนในเซลล์ประสาทส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสของหนูชรา

1.3.2 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การทดลองของงานวิจัยครั้งนี้ครอบคลุมการศึกษากระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองหนูชรา ส่วนฮิปโปแคมปัส และ ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ตลอดจนการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ประสาทเมื่อเข้าสู่ภาวะชรา ที่มีความสัมพันธ์กับกระบวนการ synaptic plasticity ของเซลล์ประสาท

1.4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

สมมุติฐาน และกรอบแนวคิด

การลดระดับของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองน่าจะเกิดจากกระบวนการนำคอเรทเทอรอลเข้าเซลล์ ซึ่งเป็นกลไกสำคัญของการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมอง

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากสามารถหาวิธีการรักษาภาวะความจำเสื่อมโดยไม่ต้องให้เอสโตรเจนทดแทนหรือคงปริมาณของเอสโตรเจนให้อยู่ในสมดุล ก็จะเกิดประโยชน์สูงสุดในแง่การนำไปในการป้องกันและรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุได้ในที่สุด

2. เนื้อเรื่อง

2.1 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ

2.1.1 ภาวะชรา

องค์การสหประชาชาติได้ประเมินสถานการณ์ว่าปี พ.ศ. 2544-2643 จะเป็นศตวรรษแห่งผู้สูงอายุ หมายถึงการมีประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปมากกว่าร้อยละ 10 ของประชากรทั่วโลกและมีแนวโน้มว่าประชากรผู้สูงอายุเหล่านี้จะมีฐานะยากจน เป็นประเด็นท้าทายทั้งทางสังคมและเศรษฐกิจที่แต่ละประเทศจะต้องมีแผน

รองรับ สำหรับประเทศไทย สำนักงานสถิติแห่งชาติ สรุปว่าไทยกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุตั้งแต่ปี 2548 โดยมีประชากรผู้สูงอายุ ร้อยละ10.4 ของประชากรทั้งประเทศ และคาดว่าจะเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุโดยสมบูรณ์ในช่วงปี 2567-2568 [1] ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่พบในกลุ่มผู้สูงอายุ คือปัญหาสุขภาพที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท ที่สำคัญได้แก่ ภาวะสมองเสื่อม (dementia) ซึ่งเป็นกลุ่มอาการที่มีความผิดปกติในการทำงานของสมองแบบค่อยเป็นค่อยไป ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรม การแสดงออก การคิด และการตัดสินใจที่ผิดปกติ และมักเกิดภาวะความจำเสื่อมร่วมด้วย [2] โดยการสูญเสียความจำในระยะแรกเป็นแบบไม่รุนแรง เรียกว่า mild cognitive impairment และเป็นระยะที่สามารถทำให้ความจำกลับมาเป็นปกติได้ แต่หากไม่ได้รับการดูแลรักษาที่ถูกต้องก็จะนำไปสู่การเป็นโรคความจำเสื่อมแบบถาวร ซึ่งเกิดจากการทำงานที่ผิดปรกติของเซลล์ประสาทในบริเวณที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสร้างความจำ คือ ส่วนฮิปโปแคมปัสและแพร่กระจายต่อเนื่องไปยังซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ เมื่อผู้ป่วยมีอาการที่รุนแรงขึ้น [16] มีการรายงานว่าภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการลดลงของฮอร์โมนเพศโดยเฉพาะเอสโตรเจน [14, 23] ซึ่งนำไปสู่การให้เอสโตรเจนทดแทน หรือที่รู้จักกันทั่วไปว่า estrogen replacement therapy แต่อย่างไรก็ตามการได้รับเอสโตรเจนในปริมาณมากเกินไปจะเป็นการเพิ่มความเสี่ยงของมะเร็งเต้านม และมะเร็งปากมดลูก ซึ่งถือเป็นข้อจำกัดที่สำคัญของการรักษาภาวะความจำเสื่อม [26] ดังนั้นหากสามารถหาวิธีการรักษาภาวะความจำเสื่อมโดยไม่ต้องให้เอสโตรเจนทดแทนหรือคงปริฒาณของเอสโตรเจนให้อยู่ในสมดุล ก็จะเกิดประโยชน์สูงสุดในแง่การนำไปในการป้องกันและรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุได้ในที่สุด

2.1.2 ความจำ

ความจำ หมายถึงความสามารถของสมองในการเก็บข้อมูลและระลึกถึงสิ่งเหล่านั้นได้ ซึ่งจำเป็นต่อการเรียนรู้และการดำรงชีวิต ดังนั้นการสูญเสียความจำ หรือมีความผิดปกติเกี่ยวกับการสร้างความจำจึงเป็นปัญหาสำคัญที่จะกระทบต่อการดำรงชีวิตของผู้ป่วยและบุคคลรอบข้าง กลไกการสร้างความจำอาศัยการทำงานของเซลล์ประสาทในสมองทั้งส่วน ฮิปโปแคมปัส และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ซึ่งมีหน้าที่จำเพาะต่อชนิดของความจำโดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ประสาทโดยเฉพาะที่บริเวณไซแนปส์ (synapse) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการติดต่อกันระหว่างเซลล์ประสาทก่อน (presynaptic) และ หลัง (postsynaptic) เพื่อเปลี่ยนกระแสประสาท กล่าวคือมีการเพิ่มขนาด เพิ่มจำนวน และเพิ่มความแข็งแรงของ synapse อย่างถาวร เรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า synaptic plasticity [5, 15] ดังนั้นกระบวนการ synaptic plasticity ของเซลล์ประสาทจึงถือเป็นกลไกหลักและเป็นตัวบ่งชี้ของกระบวนการสร้างความจำ [5, 17] โปรตีนที่สำคัญในกระบวนการนี้ ได้แก่ activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) [6], postsynaptic density-95 (PSD-95) [15] และ synaptophysin [6] ซึ่งหากยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนเหล่านี้จะทำให้สูญเสียความสามารถในการสร้างความจำ [18] ดังนั้นโปรตีนเหล่านี้จึงถือเป็นโปรตีนบ่งชี้ของกระบวนการ synaptic plasticity และการสร้างความจำระดับเซลล์ โดยเฉพาะ Arc ซึ่งถือเป็นโปรตีนที่สำคัญมากเนื่องจากมีการตอบสนองต่อการตระตุ้นอย่างรวดเร็ว (immediate early protein) และมีการรายงานว่าน่าจะเป็น rate limiting protein หรือ master regulatory protein ของ กระบวนการ synaptic plasticity อีกด้วย [21] เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนทำหน้าที่ส่งเสริมกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาทได้ [11, 13-14] และหากทำการยับยั้งการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ที่เซลล์ประสาทส่งผลให้สูญเสียกระบวนการสร้างและ

การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไซแนปส์หลังการกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าความถี่สูง [23] นอกจากนี้ เอสโตรเจนยังสามารถเพิ่มการแสดงออกของ synaptic protein ที่สำคัญจำนวนมาก ได้แก่ Arc PSD-95 และ synaptophysin [8] แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการสร้างความจำของเซลล์ประสาท

2.1.3 ฮอร์โมนเอสโตรเจน

เอสโตรเจน คือ กลุ่มของสเตียรอยด์ฮอร์โมนในเพศหญิง ซึ่งส่วนมากถูกสร้างขึ้นจากต่อมเพศ เรียกว่า gonadal estrogen และหลั่งเข้าสู่กระแสเลือดเพื่อไปควบคุมการทำงานของอวัยวะเป้าหมาย [14] นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนซึ่งถูกสังเคราะห์ที่บริเวณอื่นนอกเหนือจากต่อมเพศ เรียกเอสโตรเจนในกลุ่มนี้ว่า extragonadal estrogen อวัยวะที่สามารถสังเคราะห์ เอสโตรเจนได้เอง ได้แก่ ต่อมหมวกไต รก เต้านม และสมอง [10] กระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนเริ่มจากการเปลี่ยนโคเรสเตอรอลเป็น pregnenolone ด้วยเอนไซม์ cytochrome P450 side-chain cleavage (P450scc) ภายในไมโตคอนเดรีย ซึ่งการส่งผ่านเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียต้องอาศัยโปรตีนตัวพาที่สำคัญคือ steroidogenic acute regulatory protein (StAR) และจัดเป็นขั้นตอนกำหนดอัตรา (rate-limiting step) ของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน จากนั้น pregnenolone จะถูกเปลี่ยนเป็น dehydroepiandrosterone (DHEA) และ DHEA ถูกเปลี่ยนเป็น testosterone ตามลำดับ สุดท้ายเอนไซม์ aromatase จะทำการเปลี่ยน testosterone ไปเป็นเอสโตรเจนภายในเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม [9, 20, 25] ดังนั้นการพบเอนไซม์ aromatase และ P450scc จึงบ่งชี้ว่ามีการสังเคราะห์เอสโตรเจนขึ้นภายในเซลล์นั้น ๆ

ในปี 1995 โดย Robel และคณะ แสดงให้เห็นว่ามีการคงอยู่ของเอสโตรเจนในสมองของสัตว์ทดลองขณะที่ยับยั้งการสร้าง gonadal estrogen โดยการตัดรังไข่ [19] ต่อมาในปี 2003 Prange-Kiel และคณะได้ตรวจพบเอสโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ของเซลล์ประสาท [16] และในปี 2004 Kretz และคณะ พบเอสโตรเจนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อประสาทส่วนฮิปโปแคมปัส [12] เซลล์ประสาทมีการแสดงออกของ steroidogenic enzymes ที่สำคัญจำนวนมาก อาทิเช่น StAR, P450scc และ aromatase [10, 16-18] ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าเซลล์ประสาทมีคุณสมบัติเป็น steroidogenic cell สามารถสังเคราะห์และหลั่งเอสโตรเจนได้ ทำให้มีการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงบทบาทและหน้าที่ของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทและพบว่าหากมีการยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากเซลล์ประสาทโดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aromatase โดยการให้ตัวยับยั้ง หรือ การทำให้สัตว์ทดลองไม่มียีน aromatase มีผลยับยั้งกระบวนการ synaptic plasticity ลดการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ synaptic plasticity และลดจำนวน synapse ในสมองในที่สุด [24, 28] นอกจากนี้หากให้เอสโตรเจนแก่เซลล์ประสาทที่ถูกยับยั้งการสังเคราะห์เอสโตรเจนด้วยการยับยั้งการทำงานของ aromatase พบว่าเอสโตรเจนไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ synaptic plasticity ได้ [12, 28] นอกจากนี้งานวิจัยของ Chamniansawat และคณะ ในปี 2012 แสดงให้เห็นว่าการคงอยู่ของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทมีบทบาทสำคัญต่อการเตรียมตัวและการปรับตัวของเซลล์ประสาท โดยการเพิ่มการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนเพื่อรองรับการกระตุ้นของเอสโตรเจนจากต่อมเพศในการส่งเสริมกลไกการสร้างความจำ และการปกป้องเซลล์ประสาท หากไม่มี เอสโตร

เจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทจะส่งผลลดจำนวนตัวรับเอสโตรเจนโดยเฉพาะชนิดบีต้า ซึ่งมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท และการสร้างความจำ ส่งผลให้สูญเสียกระบวนการ synaptic plasticity ในที่สุด [7] จากที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการส่งเสริมความจำ ดังนั้นภาวะชราซึ่งมีการลดลงของเอสโตรเจนจากต่อมเพศนั้นไม่น่าจะมีผลกระทบต่อการทำงานของสมองถ้ายังมี เอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากเซลล์ประสาทในระดับปกติ

2.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

งานวิจัยทั้งหมดในโครงการวิจัยนี้ทำการทดลอง เก็บข้อมูล วิเคราะห์ผลการทดลอง ณ อาคารวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เลขที่ 169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมือง จ. ชลบุรี

2.2.1. สัตว์ทดลอง

การทดลองครั้งนี้ทำการศึกษาในหนูแรท สายพันธ์ Sprague Dawley เพศเมีย ที่ได้รับมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 15 ตัว โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละ 5 ตัว ตามอายุ คือ กลุ่มที่ 1 อายุ 2 เดือน กลุ่มที่ 2 อายุ 5 เดือน และ กลุ่มที่ 3 อายุ 10 และ กลุ่มที่ 4 อายุ 19 เดือน เดือนทำการพักพื้นหนูทดลองเป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนทำการฆ่าด้วยการฉีดยา sodium pentobarbital overdose ที่ประมาณ 55-60 mg/kg bodyweight เข้าทางช่องท้องเพื่อให้สัตว์ทดลองสลบลึกอย่างสงบก่อนการเก็บสมอง เก็บด้วยวิธีการผ่าตัดด้วยชุดเครื่องมือผ่าตัด โดยการใช้กรรไกรตัดกระดูกเปิดจากบนของกระโหลกศรีษะ จากนั้นใช้ probe ค่อยๆเลาะสมองออกจากช่องกระโหลกศรีษะแล้วนำมาแยกซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสออกมาเพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไปตลอดการใช้สัตว์ทดลองดำเนินการตามหลักจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองทุกประการ โดยได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยบูรพา

2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจหาปริมาณของเอสโตรเจนในเนื้อเยื่อสมอง ด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (ELISA kit) โดยเริ่มจากการเคลือบพื้นผิวของ 96-well plate ด้วย anti-estrogen antibody (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเติม ELISA Blocking Buffer (R&D systems) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding จากนั้นจึงใส่ brain tissue lysed ที่ได้จากหนูทดลองกลุ่มต่างๆ เพื่อทำปฏิกิริยา จากนั้นจึงล้าง antigen ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม anti-estrogen antibody (ตัวเดียวกับที่ใช้เคลือบ 96-well-plate) บ่มไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงบ่มด้วย secondary antibody ซึ่งติดฉลากด้วยเอ็นไซม์ horseradish peroxidase (HRP) (R&D systems) เพื่อทำปฏิกิริยาอีกชั้นหนึ่ง จากนั้นจึงล้าง antibody ส่วนเกินด้วย 0.01M PBS แล้วเติม Tetramethylbenzidine (TMB) substrate

(R&D systems) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาด้วย 1M HCl ซึ่งหากมี estrogen สารน้ำจากการทดลองจะเปลี่ยนเป็นสีนำเงิน ซึ่งสามารถวัดค่าความดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (model UV-2550; Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่น 450 nm

2.2.3. Western blot analysis

นำเนื้อเยื่อสอมองส่วนซีรีบรัลคอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมปัสมาทำการสกัดโปรตีนด้วยการย่อยโดยใช้เอนไซม์ RIPA buffer (Tris 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM, 1% triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, EDTA 5 mM, Na2HPO4 30 mM, NaF 50 mM) บด (homogenized) และ lysed ด้วยการ sonication นำโปรตีนที่สกัดได้ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน 10% SDS-PAGE gel จากนั้นทำการย้ายโปรตีนไปยัง nitrocellulose membrane และนำ membrane ไปบ่มใน 5% non-fat milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding ก่อนนำไปบ่มด้วย anti-P450scc antibody, anti-StAR antibody, ERα, ERβ, หรือ anti-actin antibody (Abcam, Cambridge, UK) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำ membrane มาบ่มใน HRP-conjugated secondary antibody (Zymed, San Francisco, CA, USA) ทำการศึกษาปริมาณการแสดงออกของโปรตีนโดยใช้ chemiluminescent detection kit (Pierce, Rockford, IL, USA) แล้ววัดความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Scion Image

2.3.4. Immunohistochemistry

เริ่มจากการเก็บสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เมื่อหนูแรทแต่ละกลุ่มมีอายุครบจำนวนเดือนที่ต้องการ ทำการฆ่าหนูแรทด้วย CO_2 จนหนูเข้าสู่ระยะที่ 3 ของการสลบ จากนั้นเปิดกะโหลกด้านหลัง แล้วคีบเอาก้อนสมองออกมาจุ่มล้างใน normal saline และนำสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ 50 มิลลิลิตร แช่ใน 4% paraformaldehyde โดยเก็บไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการตัดสมองส่วนฮิปโปแคมปัส มาตัดแบ่งเป็นสามส่วน ตามแนวขวาง ด้วยมีดผ่าตัด

วิธีการย้อมสี Immunohistochemistry

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่จะย้อมสี immunohistochemistry มาละลายพาราฟินออกด้วยการแช่ใน Xylene จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที จากนั้นทำการเติมน้ำกลับเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยการแช่สไลด์ใน absolute ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามด้วย 95% ethanol และ 70% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ หลังจากลง 70% ethanol แล้ว ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที ต่อมาล้างน้ำกลั่น 5 นาที ด้วยเครื่อง shanker จากนั้นทำ antigen-retrive โดยใช้ citate buffer โดยใส่ในไมโครเวฟ 5 นาที แล้วนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็น 30 นาที จากนั้นบ่มด้วย 3% hydrogen peroxide ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 15 นาที จากนั้นนำมาล้างด้วย 0.1% PBST 1 ครั้ง 5 นาที บนเครื่อง shanker ก่อนที่จะบ่มด้วย 0.1% glycine buffer นาน 30 นาที เพื่อยับยั้ง non specific binding แล้วล้างด้วย 0.1% PBST 1 ครั้ง 5 นาที บนเครื่อง shanker ใช้ปากกาไว้ตีกรอบกันน้ำ ต่อมา Blocking อีกครั้ง ด้วย 4% BSA ใน PBST 1 ชั่วโมง จากนั้นเททิ้ง เช็ดสไลด์ให้แห้งสนิท แล้วลง primary (anti-cytochrome P450) incubate 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่อง shanker ลง secondary (Goat Anti-Rabbit IgG ที่ติดฉลากด้วย Horseradish peroxidase) incubate 1 ชั่วโมง ไว้อุณหภูมิห้อง แล้วล้างด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่อง shanker และลงในน้ำกลั่น 5 นาที

ตามลำดับ ย้อมสไลด์ด้วยสี 3, 3 Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 13 นาที ในที่มืด ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นย้อมสไลด์ในสารละลาย Mayer's hematoxylin 30 วินาที ลงน้ำประปาไหลผ่าน 15 นาที ดึงน้ำออกด้วย 70% ethanol, 95% ethanol อย่างละ 1 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และลงใน absolute ethanol จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ นำสไลด์เนื้อเยื่อไปแช่ในสาร xylene จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที สุดท้ายทำการ mount ด้วย permount

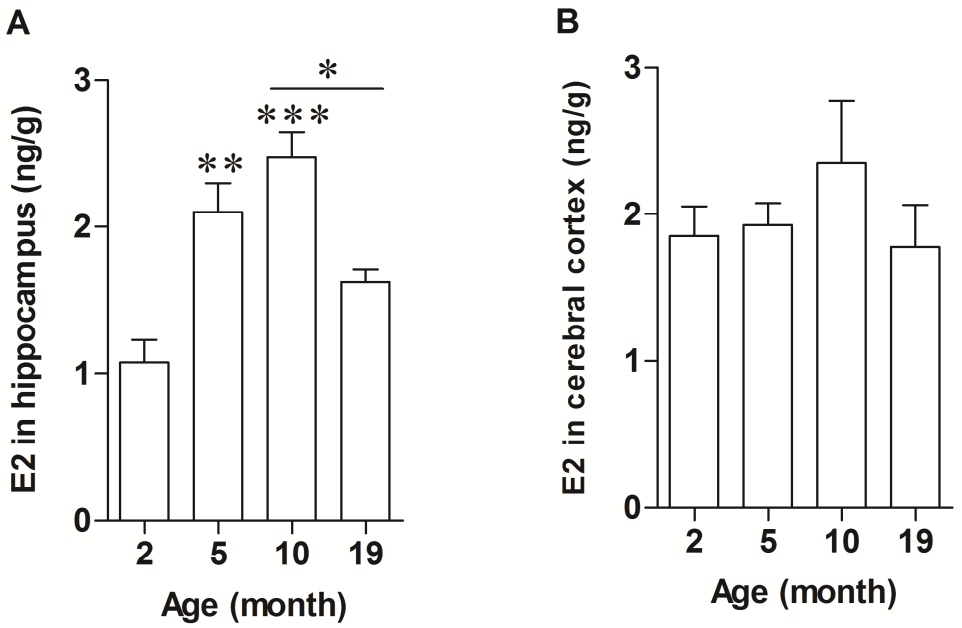
2.3.5 วิธีการประเมินผลและการสังเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำเสนอเป็นค่า means ± SE ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลสองชุดจะทดสอบโดย unpaired Student's t-test ความแตกต่างทางด้านสถิติของข้อมูลมากกว่าสองชุดจะถูกทดสอบด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) with Turkey multiple comparison test ความแตกต่างทางด้านสถิติของทุกการทดสอบต้องมีค่า $P \leq 0.05$ ประเมินผลข้อมูลโดย Graph-Pad Prism 5.0

2.3 ผลการทดลอง

2.3.1 ระดับของ E2 ในสมองส่วน hippocampus และ cerebral cortex ของหนูชราเพศเมีย

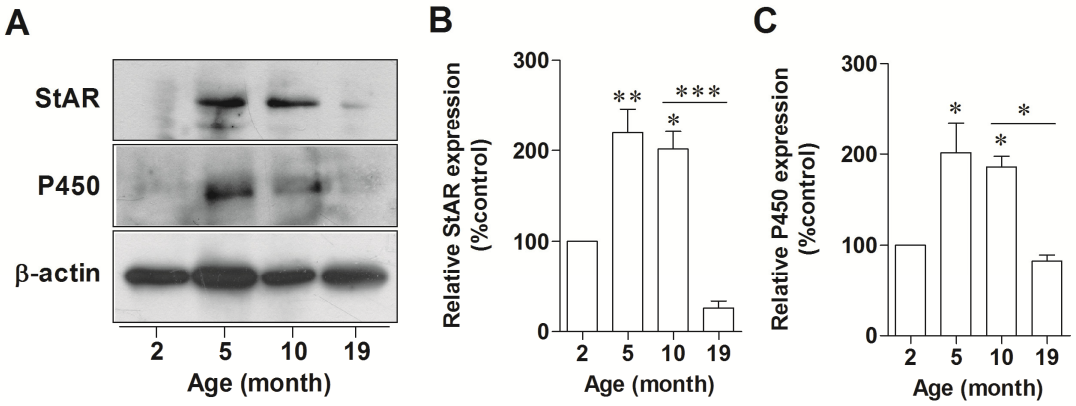
จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยทราบว่าระดับของ E2 ในเลือด ไม่ลดลงเมื่อหนูเข้าสู่ภาวะชรา ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงวัดระดับของ E2 ในเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus (รูปที่ 1A) และ cerebral cortex (รูปที่ 1B) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า E2 เพิ่มขึ้นเมื่ออายุ 5 และ 10 เดือน จากนั้น ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่อายุ 19 ปี เมื่อเทียบกับอายุ 10 ปี ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงของทุกช่วงอายุในสมองส่วน cerebral cortex ผลการทดลองนี้บ่งชี้ว่ากระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองมีความจำเพาะต่อบริเวณในแต่ละช่วงอายุ (region specific)



รูปที่ 1 อายุที่เพิ่มขึ้นลดระดับของ E2 ใน hippocampus แต่ไม่ลดระดับของ E2 ใน cerebral cortex กราฟแสดงระดับของ E2 จากสมองส่วน hippocampus (A) และส่วน cerebral cortex (B) ของหนูแรทเพศเมีย อายุ 2-19 ปี * P<0.005; ** P< 0.0005; *** P<0.0001, n=5

2.2.2 การแสดงออกของ steroidogenic acute regulatory enzymes **และ** P450scc **ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย**

ทำการศึกษาแสดงออกของเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนรวมทั้งเอสโตรเจนด้วย ที่สำคัญได้แก่ steroidogenic acute regulatory enzymes (StAR) ทำหน้าที่สนับสนุนการขนส่ง cholesterol เข้าสู่ inner mitochondrial membrane และ P450scc ทำหน้าที่เปลี่ยน cholesterol เป็น pregnenolone ซึ่งเป็นอนุพันธ์ตั้งต้นที่สำคัญของกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองนี้มีระดับการแสดงออกที่เปลี่ยนแปลงในแต่ช่วงอายุ กล่าวคือ มีการแสดงออกน้อยมากในช่วง 2 เดือน มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 5 และ 10 เดือน และ มีการแสดงออกลดลงเมื่อเข้าสู่วัยชรา (อายุ 19 เดือน) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหนูอายุ 10 เดือน พบว่ามีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการแสดงออกของ StAR คล้ายกับการแสดงออกของ P450scc คือมีการแสดงออกน้อยในหนูอายุ 2 เดือน เพิ่มขึ้นในช่วงอายุ 5-10 เดือน และลดลงเมื่อหนูเข้าสู่วัยชรา จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าน่าจะมีการสังเคราะห์สเตียรอยฮอร์โมนที่ไม่เท่ากันและแต่ละช่วงอายุ และที่สำคัญน่าจะมีการลดลงเมื่อเข้าสู่ภาวะชรา ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุของภาวะความจำเสื่อมที่พบในผู้สูงอายุ

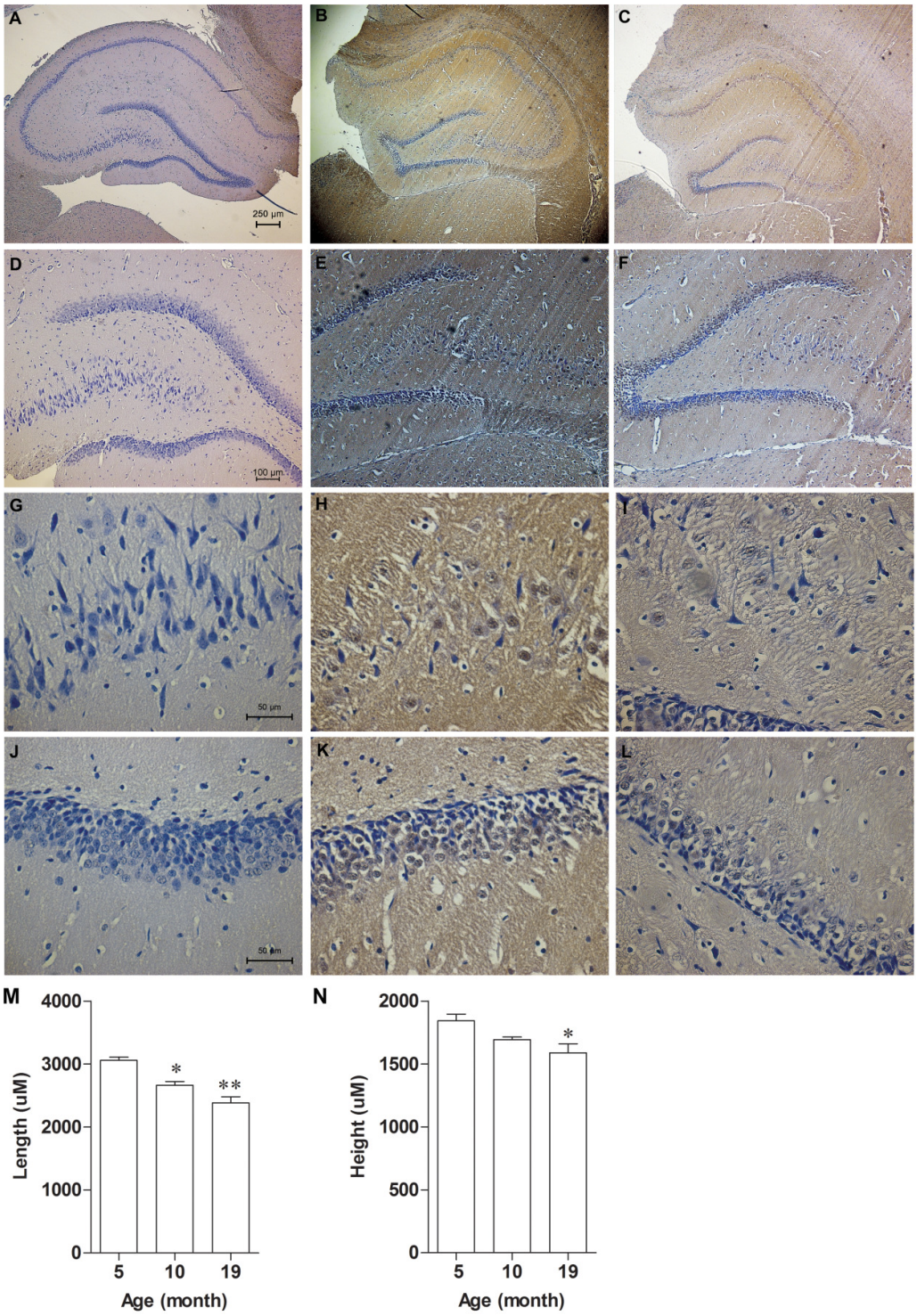


รูปที่ 2 การแสดงออกของ StAR และ P450scc ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย แถบความเข้มของโปรตีน (A) กราฟแสดงการแสดงออกของ StAR (B) และ กราฟแสดงการแสดงออกของ P450 (C) * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; ***$P < 0.001$ (n=5)

2.2.3 การแสดงออกของ P450scc **ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย**

จากการศึกษาด้วยเทคนิค immunohistochemistry เพื่อศึกษาการแสดงออกของ P450scc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย อายุ 5 10 และ 19 ปี พบว่า P450 มีการแสดงออกน้อย มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหนูอายุ 10 ปี จากนั้นลดลงในหนูอายุ 19 ปี ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับการศึกษาก่อนหน้าด้วยเทคนิค Western blot บ่งชี้ว่า P450 ลดลงเมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุ ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนน้อยลงไปด้วยตามลำดับ

เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองว่าที่อายุ 19 ปี หนูทดลองเข้าสู่ภาวะชรา ผู้วิจัยจึงได้ทำการวัดขนาดของฮิปโปแคมปัสด้วยโปรแกรม พบว่า ขนาดของฮิปโปแคมปัสเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม 5 เป็นไปได้ว่า ฮิปโปแคมปัสของหนูทดลองมีการเสื่อมสลายเมื่อเข้าสู่ภาวะชรา

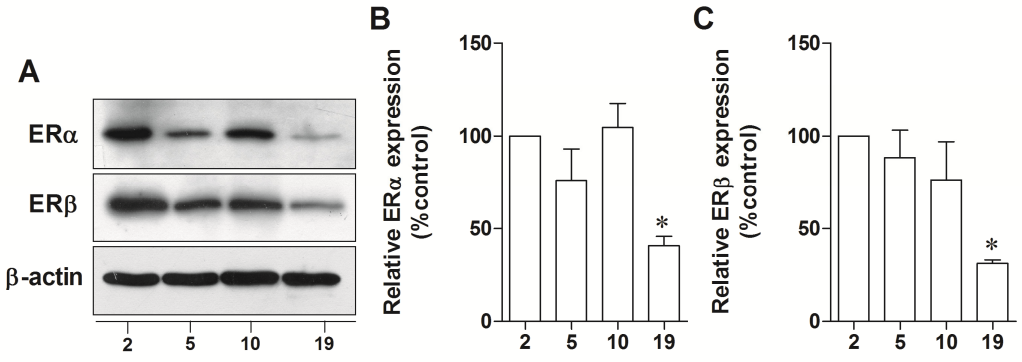


รูปที่ 3 การศึกษาการแสดงออกของ P450scc ด้วยวิธี Immunoperoxidase

ทำการศึกษาในสมองส่วน ฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย อายุ 5 (A D G J), 10 (B E H K) และ 19 (C F I L) เดือน สีน้ำตาลคือการย้อมติด P450scc ส่งน้ำเงิน คือ nucleus ทำการศึกษาขนาดของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสด้วยโปรแกรม โดยวัดความยาว (M) และ ความสูง (N) ของฮิปโปแคมปัส * $P<0.05$; ** $P< 0.005$, n=5

2.2.2 การแสดงออกของ steroidogenic acute regulatory enzymes **และ** P450scc **ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย**

ทำการศึกษาแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ซึ่งจะสะท้อนถึงการทำงานของเอสที่สำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ ERα และ ERβ ตัวรับทั้งสองนี้มีระดับการแสดงออกที่คลายกันในทุกช่วงอายุ กล่าวคือ มีการแสดงออกค่อยๆลดลงตามช่วงอายุ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อายุ 19 เดือน (เทียบกับกลุ่ม 2 เดือน) จากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าประสิทธิภาพการทำงานของเอสโตรเจนก็น่าจะลดลงตามอายุด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังมีความเป็นไปได้ว่า การลดการแสดงออกของ ER อาจจะเป็นผลมาจากการลดลงของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองก็ได้



รูปที่ 4 การแสดงออกของ ERα และ ERβ **ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย** แถบความเข้มของโปรตีน (A) กราฟแสดงการแสดงออกของ ERα (B) และ กราฟแสดงการแสดงออกของ ERβ (C) * P < 0.05; ** P< 0.005; ***P< 0.001 (n=5)

3. อภิปราย/วิจารณ์

3.1 ปัญหาและอุปสรรคในการดำเนินการ

เนื่องจากการได้รับงบประมาณจัดสรรลดลงผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีการทดลอง เปลี่ยนเทคนิคที่ใช้ โดยใช้การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนแบบง่ายๆ ไม่ซับซ้อน ด้วยเทคนิคที่เป็นที่ยอมรับกันอย่างยาวนาน ได้แก่ Western blot และ immunoperoxidase แทนเทคนิดที่ซับซ้อน และใช้งบประมาณมากอย่างอื่น ซึ่งก็ได้ผลการทดลองที่ดี อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงการศึกษาต่อยอดในการหาทางรักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุเพศหญิงต่อไป

3.2 อภิปรายผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์ชัดเจน คือ การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน โดยเฉพาะ เอสโตรเจน ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ในหนูทดลองเพศเมีย ตั้งแต่เด็กจนกระทั่งแก่ชรา โดยงานวิจัยนี้เลือกหนูทดลอง 4 ช่วงอายุ กล่าวคือ 2 5 10 และ 19 เดือน จากการศึกษาเรื่องการเทียบอายุของหนูแรทเทียบกับอายุคนที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า 1 เดือน หนู ใกล้เคียงกับ 3 ปีคน (30) ดังนั้น หากเทียบกลุ่มตัวอย่างที่ใช้จึงสามารถกล่าวได้ว่า มีค่าใกล้เคียงกับคนอายุ 6 15 30 และ 57 ปี ซึ่งเป็นช่วงวัย เด็ก วัยรุ่น วันกลางคน และวัยชรา ตามลำดับ และผลการทดลองครั้งนี้พบว่า มีการลดลงของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส มีการลดลงของตัวรับเอสโตรเจน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (StAR และ P450scc) ในหนูชราเพศเมีย (19 เดือน) และการศึกษาก่อนหน้าของผู้วิจัย และการศึกษาของ Chakraborty และ Gore (2004) พบว่าในหนูชราไม่มีการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด เช่นเดียวกับที่พบในคน (28, 29) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสามารถสรุปผลได้ว่าภาวะความจำเสื่อมในผู้สูงอายุไม่ได้ขึ้นกับระดับของเอสโตรเจนในเลือด แต่ขึ้นกับระดับของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ในสมองโดยเฉพาะ ส่วนฮิปโปแคมปัส

เนื่องจากเอสโตรเจนในเลือดกับเอสโตรเจนในสมองมีโมเลกุลและสูตรโครสร้างเดียวกัน ดังนั้น จึงจำเป็นต้องศึกษาบทบาทของเอนไซม์ที่สำคัญต่อกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน ซึ่งจะบ่งชี้ได้ว่า ผลของระดับเอสโตรเจนที่วัดได้จากการย่อยเนื้อเยื่อฮิปโปแคมปัสเป็นค่าของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์ขึ้นในฮิปโปแคมปัสจริงๆ และให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับระดับขอบเอสโตรเจน กล่าวคือ StAR และ P450scc มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อหนูทดลองเข้าสูวัยชรา ดังนั้นเป็นไปได้ว่า การบวนการนำ cholesterol เข้าสู่ inner mitochondrial membrane อาจจะเกิดความผิดปรกติ หรือ อาจจะเกิดจากการที่ cholesterol ไม่สามารถเปลี่ยนเป็น pregnenolone ก็เป็นได้ ซึ่งต้องศึกษาต่อไป เพื่อหาจุดเริ่มต้นของการเปลี่ยนแปลงในภาวะชรา งานนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ได้ทำการศึกษา ถึงการเปลี่ยนแปลงของเวลา ต่อการแสดงออกของ StAR และ P450scc ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอสโตรเจน โดยก่อนหน้านี้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีน P450scc พบการเปลี่ยนแปลงของยีน และมี variance splicing ที่อายุแตกต่างกัน (25) ซึ่งสนับสนุนว่าอายุมีอิทธิพลต่อ การเปลี่ยนแปลงของ p450scc ได้และอาจเป็นตัวแปรหลักของภาวะความจำเสื่อมอันเกิดจากการขาดเอสโตรเจนในถาวะชรา

4. สรุปและเสนอแนะ

งานวิจัยนี้สามารสรุปได้ว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน โดยเฉพาะเอสโตรเจน ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ในหนูทดลองเพศเมีย ตั้งแต่เด็กจนกระทั่งแก่ชรา ผ่านการลดลงของ StAR และ P450scc

และน่าจะนำไปสู่การเข้าถึงวิธีการรักษาภาวะความจำเสื่อมในหญิงชราได้ในที่สุด

5. ผลผลิต

โดยส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยในโครงการวิจัยนี้กำลังดำเนินการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Geroscience ในชื่อเรื่อง Age-related memory impairment associated with decreased endogenous estradiol in the hippocampus of female rat.

บรรณานุกรม

1. สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2555)
2. สุทธิชัย จิตะพันธ์กุล. (2546). คลินิกเวชปฏิบัติปริทัศน์: ปัญหาการดูแลผู้ป่วยสูงอายุที่มีสมองเสื่อม. วารสารคลินิก. 19 (6). กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณะสุข. (2546). แนวปฏิบัติบริการสุขภาพด้านการดูแลผู้สูงอายุ: การดูแลรักษาผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อม.
3. Alvarez V. A., Sabatini B. L. (2007). Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. Annu. Rev. Neurosci. 30, 79–97.
4. Arendt T. (2009) Synaptic degeneration in Alzheimer's disease. Acta Neuropathol. 118(1): 167-79.
5. Burke S.N. and Barnes C.A. (2006) Neural plasticity in the ageing brain. Nat Rev Neurosci.7, 30-40.
6. Chamniansawat S, Chongthammakun S. Genomic and non-genomic actions of estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cell. Neurosci Lett 2010; 470: 49–54.
7. Chamniansawat S, Chongthammakun S. A priming role of local estrogen on exogenous estrogen-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. Exp Mol Med. 2012; 44: 403-411.
8. Dong W, Cheng S, Huang F, Fan W, Chen Y, Shi H, He H Mitochondrial dysfunction in long-term neuronal cultures mimics changes with aging. Neurotox Res. 2012; 22(3): 231-248.
9. Guzowski JF, Lyford GL, Stevenson GD, Houston FP, McGaugh JL, Worley PF, Barnes CA. Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. J Neurosci 2000; 20: 3993–4001.
10. Honkura N., Matsuzaki M., Noguchi J., Ellis-Davies G. C., Kasai H. (2008). The subspine organization of actin fibers regulates the structure and plasticity of dendritic spines. Neuron 57, 719–729.
11. Lamprecht R, LeDoux J. Structural plasticity and memory. Nat Rev Neurosci 2004; 5(1): 45–54.
12. Kandel ER, Schwartz JH. Molecular biology of learning: modulation of transmitter release. Science1982; 218: 433–443.
13. Kasai H., Fukuda M., Watanabe S., Hayashi-Takagi A., Noguchi J. (2010). Structural dynamics of dendritic spines in memory and cognition. Trends Neurosci. 33, 121–129.
14. Kim MJ, Oh SJ, Park SH, Kang HJ, Won MH, Kang TC, Park JB, Kim JI, Kim J, Lee JY. Neuronal loss in primary long-term cortical culture involves neurodegeneration-like cell

death via calpain and p35 processing, but not developmental apoptosis or aging. Exp Mol Med. 2007; 39(1): 14-26.

15. Korobova F, Svitkina T. (2010). Molecular architecture of synaptic actin cytoskeleton in hippocampal neurons reveals a mechanism of dendritic spine morphogenesis. Mol Biol Cell. 21, 165-176.
16. Nicholson D.A., Yoshida R., Berry R.W., Gallagher M., and Geinisman Y. (2004) Reduction in size of perforated postsynaptic densities in hippocampal axospinous synapses and age-related spatial learning impairments. J Neurosci. 24, 7648-7653.
17. Nunomura A, Moreira PI, Castellani RJ, Lee HG, Zhu X, Smith MA, Perry G. Oxidative damage to RNA in aging and neurodegenerative disorders. Med Sci Monit. 2011; 17(4): BR91-96.
18. Penzes P., Cahill M. E., Jones K. A., Vanleeuwen J. E., Woolfrey K. M. (2011). Dendritic spine pathology in neuropsychiatric disorders. Nat. Neurosci. 14, 285–293.
19. Pollard T. D., Cooper J. A. (2009). Actin, a central player in cell shape and movement. Science 326, 1208–1212.
20. Rapp P.R., Deroche P.S., Mao Y., and Burwell R.D. (2002) Neuron number in the parahippocampal region is preserved in aged rats with spatial learning deficits. Cereb Cortex. 12, 1171-1199.
21. Rasmussen T., SchliemannT. Sorensen J.C. Zimmer J. and West M.J. (1996) Memory impaired aged rats: no loss of principal hippocampal and subicular neurons. Neurobiol. Aging 17, 143–147.
22. Rust M. B., Gurniak C. B., Renner M., Vara H., Morando L., Gorlich A., et al. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. EMBO J. 29, 1889–1902.
23. Seshadri M, Mazi-Kotwal N, Aguis M. (2013) Reversible mild cognitive impairment--a case report. Psychiatr Danub. ;25 Suppl 2:S358-61.
24. Steward O, Worley P. Local synthesis of proteins at synaptic sites on dendrites: role in synaptic plasticity and memory consolidation? Neurobiol Learn Mem 2002; **78**(3): 508–527.
25. Geng YQ, Guan JT, Xu XH, Fu YC Senescence-associated beta-galactosidase activity expression in aging hippocampal neurons. Biochem Biophys Res Commun. 2010; 11;396(4): 866-869.
26. Chih B, Afridi SK, Clark L, Scheiffele P. Disorder-associated mutations lead to functional inactivation of neuroligins. Hum Mol Genet. 2004; 13(14): 1471-1477.

27. Chih B, Engelman H, Scheiffele P. Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. Science. 2005; 307(5713): 1324-1328.

28. Chakraborty TR, Gore AC (2004) Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. Exp Biol Med 229: 977-987.

29. Chamniansawat S, Chongthammakun S (2015) Inhibition of hippocampal estrogen synthesis by reactive microglia leads to down-regulation of synaptic protein expression. Neurotoxicology 46: 25-34.

30. Sengupta P (2013) The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. Int J Med 4: 624-630.