

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

บทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสต่อการเรียนรู้และความจำของหนูแรทเพศเมีย

Effect of synthesis of estrogen in the hippocampus brain that is to learning and memory of female rats

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์

สาขาวิชา ชีวเวชศาสตร์

คณะสหเวชศาสตร์

รหัสโครงการ (AHS12/2562)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2562

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2563

หัวข้อวิจัย      บทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสต่อการเรียนรู้และ  
 ความจำของหนูแรทเพศเมีย  
 ชื่อผู้วิจัย      รศ.ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์  
 หน่วยงาน      คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
 ปีงบประมาณ      2562

### บทคัดย่อ

เป็นที่ทราบกันดีว่าภาวะสมองเสื่อมของหญิงชราวัยหมดประจำเดือนเป็นผลมาจากการลดลง อย่าง  
 ฉับพลันของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ถึงแม้ว่าเอสโตรเจนส่วนมากในร่างกายจะสร้างมาจากรังไข่แต่  
 อย่างไรก็ตามสมองก็สามารถสังเคราะห์เอสโตรเจนได้เช่นกัน จึงเป็นที่น่าสนใจว่าในภาวะชรา นั้นเอสโตรเจนที่  
 สังเคราะห์ในสมองมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรและความสัมพันธ์กับภาวะความจำเสื่อมหรือการสูญเสียความจำ  
 ที่พบในหญิงชราหรือไม่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาผลของอายุต่อการสังเคราะห์เอสโตร  
 เจนและการเปลี่ยนแปลงของตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) ในสมองฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นส่วนสำคัญ  
 ในการสร้างความจำ นอกจากนี้ยังศึกษาการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมในการจดจำได้ของหนูแรทเพศเมียด้วยวิธี  
 Morris water maze การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสผ่านการแสดงออก  
 ของโปรตีนบ่งชี้กระบวนการ synaptic plasticity ที่สำคัญ ได้แก่ Arc และ PSD-95 นอกจากนี้ยังศึกษา  
 โปรตีนบ่งชี้ภาวะสมองเสื่อม ได้แก่ amyloid- $\beta$  ในหนูแรทเพศเมีย อายุ 2, 5, 10 และ 19 เดือน ผลการ  
 ทดลองแสดงให้เห็นว่าหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีความสามารถในการจดจำที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับ  
 หนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับระดับของเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตร  
 เจนชนิดเบต้าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส กล่าวคือระดับของเอสโตรเจนและตัวรับเอสโตรเจนชนิดเบต้าของหนู  
 แรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน  
 ในขณะที่ระดับเอสโตรเจนในเลือดของหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ  
 เปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองส่วนฮิปโป  
 แคมปัสมีอิทธิพลสำคัญต่อกระบวนการสร้างความจำ ในวัยชราของเพศหญิง นอกจากนี้ผลการศึกษาระดับ  
 โมเลกุลด้วยวิธี western blot แสดงให้เห็นว่าหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีการแสดงออกของโปรตีน Arc  
 และ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2  
 เดือน และยังพบการแสดงออกของ Amyloid- $\beta$  มีปริมาณเพิ่มขึ้นในหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือนอย่างมี  
 นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังนั้นความจำเสื่อมในภาวะชราของเพศหญิง  
 น่าจะเป็นอิทธิพลของเอสโตรเจน ที่สังเคราะห์จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสนำไปสู่การลดลงของ Arc, PSD-95  
 และ amyloid- $\beta$  ซึ่งเป็นสาเหตุของการสูญเสียความจำในที่สุด

**คำสำคัญ:** ความจำ เอสโตรเจน สมองชรา

## Abstract

It is well known that for menopausal women dementia is a result of declining levels of estrogen. The main estrogen in the body derives from gonads, however estrogen can also be synthesized locally within the brain. Interestingly, this may be a fundamental reason causing memory loss during aging. Therefore, this research aims to study the effects of age on estrogen synthesis and changes in estrogen receptors in the hippocampus, which are an important part of the synaptic plasticity processed. In addition to the memory, the study on behavioral changes of recognizable female rats was conducted using the Morris water maze. In this molecular study the expression of important synaptic proteins including Arc and PSD-95 was analyzed. Furthermore this study also examined the protein indication of dementia, Amyloid- $\beta$  in female rats aged 2, 5, 10 and 19 months. The results showed that the 19-month-old-rat's increase in escape latency or reduced memory was significant in comparison to the 5-month-old-rats. This corresponds to the levels of estrogen and beta estrogen receptors in the hippocampus. In other words, estrogen levels and beta estrogen receptors of female 19 months old rats decreased significantly when compared to female rats at the age of 2 months. Nevertheless, the level of estrogen in the blood of female rats aged 19 months increased significantly when compared to female rats at 2 months of age. The increase in blood estrogen does not affect recognition in 19-months-old female rats, showing that estrogen synthesized from the hippocampus plays an important role in the process of synaptic plasticity of aging women. In addition, a molecular study by western blot showed that 19-month-old-rats have a statistically significant decrease of expression of Arc and PSD-95 in the hippocampus, compared with 2 months-old-rats. Moreover, the expression of Amyloid- $\beta$  was significantly increased in the 19-month-old female rats, compared to the 2 months-old female rats. Hence, the decrease in Arc, PSD-95 and Amyloid- $\beta$  expression in the hippocampus, lead to memory loss. The present study concluded that the decrease in local hippocampal estrogen affect to is Arc, PSD-95 dependent pathway.

**Keywords:** Memory, Estrogen, Aging brain

**กิตติกรรมประกาศ**

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้คณะสหเวชศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2562  
มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา AHS12/2562

**Acknowledgment**

This work was financially supported by the Research Grant of Faculty of Allied Health Sciences,  
Burapha University (Grant no. AHS12/2562)

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญภาพ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
1.4 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	
2.1 ความจำ .....	4
2.2 โรคเซลล์ประสาทเสื่อม (Neurodegenerative disorder) .....	8
2.3 เอสโตรเจน.....	10
2.4 การเปรียบเทียบอายุระหว่างหนูแรทและมนุษย์ .....	13
2.5 การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาทในหนูเมาส์ .....	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย .....	
3.1 การเตรียมตัวอย่าง .....	15
3.2 การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท .....	15
3.3 การเก็บสมองส่วน Hippocampus และ cerebral cortex .....	16
3.4 Protein extraction .....	16
3.5 การวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay .....	16
3.6 การแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า .....	17
3.7 การวัดปริมาณเอสโตรเจนในสมองส่วน Hippocampus .....	17
3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	18
3.9 กระบวนการจัดการ เกี่ยวกับซากสัตว์ .....	18
บทที่ 4 ผลการทดลอง .....	19
บทที่ 5 อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	29
บรรณานุกรม.....	33

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กระบวนการสร้างความจำ.....	4
ภาพที่ 2 รูปแบบการจัดเก็บความจำ .....	5
ภาพที่ 3 กลไกการเกิด synaptic plasticity 19 .....	6
ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของ PSD-95 และ AMPA receptor .....	7
ภาพที่ 6 การเกิด Amyloid processing 21 .....	8
ภาพที่ 7 การเกิด Neurofibrillary Tangles .....	9
ภาพที่ 8 การสังเคราะห์เอสโตรเจน .....	10
ภาพที่ 9 กลไกการทำงานของเอสโตรเจนผ่านทาง Genomic และ Nongenomic action .....	12
ภาพที่ 10 การทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ .....	14
ภาพที่ 11 อุปกรณ์ทดสอบการเรียนรู้และความจำ เกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ .....	14
ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบการเรียนรู้และความจำ (Escape latency) .....	17
ภาพที่ 13 การเปรียบเทียบการเรียกคืนความจำเก่า (Retention time) ของหนูแรทเพศเมีย .....	18
ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบการแสดงออก ER $\beta$ ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย .....	19
ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบการแสดงออก ER $\beta$ ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูแรทเพศเมีย .....	20
ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแรทเพศเมีย .....	21
ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมอง ของหนูแรทเพศเมีย .....	22
ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส .....	23
ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ PSD95 ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูแรท .....	24
ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรท .....	25
ภาพที่ 21 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Arc ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศอายุ .....	26
ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Amyloid $\beta$ ในฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย .....	27
ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Amyloid $\beta$ ใน Cortex ของหนูแรทเพศเมีย.....	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของอายุหนู และมนุษย์ในช่วงชีวิต.....	13
ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบอายุหนูและอายุมนุษย์ในช่วง Social maturity phase .....	13

## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อายุเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้มีความผิดปกติของเซลล์ประสาท โดยงานวิจัย พบว่าเซลล์ประสาทจะค่อย ๆ เสื่อมตายเมื่อมีอายุ 20 ปีขึ้นไป และจะลดลงเรื่อย ๆ เฉลี่ย 2-3% ทุก ๆ 10 ปี จนถึงอายุ 80 ปี ปัจจุบันทั่วโลกได้ก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ โดยในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีประชากรผู้สูงอายุ 10,666,803 ล้านคน คิดเป็น 16.06% จากประชากร 66,413,979 ล้านคนทั่วประเทศ จากสำรวจของสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุขโดยการตรวจร่างกายครั้งล่าสุดในปี พ.ศ. 2557 โดยพบผู้สูงอายุ 60 ปีขึ้นไป มีภาวะสมองเสื่อมร้อยละ 8.1 คาดว่าขณะนี้ประมาณ 8 แสนกว่าคนทั่วประเทศ พบในผู้หญิงมากกว่าชาย พบในเพศหญิงร้อยละ 15.1 และเพศชาย ร้อยละ 9.8 ความรุนแรงของภาวะสมองเสื่อม ก่อให้เกิดผลกระทบต่อครอบครัว สังคม และ เศรษฐกิจของประเทศ โดยพบอัตราการเกิดโรคในผู้สูงอายุเป็นแบบทวีคูณ คือ พบประมาณ ร้อยละ 2 ในประชากรอายุ 60-69 ปี ร้อยละ 8 ในประชากรอายุ 70-79 ปี และร้อยละ 50 หรือ 1 ใน 2 ของผู้สูงอายุที่อายุ 85 ปีขึ้นไป (ลลิตา พนาคร, สุธรรม นันทมงคลชัย, ศุภชัย ปิติกุลตั้ง, โชคชัย หมั่นแสงทรัพย์ และพิมพ์สุรางค์ เตชะบุญเสริมศักดิ์, 2558) โดยผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อม (Dementia) จะมีการเสื่อมถอยความสามารถของสมองในด้านต่าง ๆ เช่น สูญเสียความจำ และสมาธิ ความสามารถทางสติปัญญาลดลง คิดและจำเรื่องที่เป็นปัจจุบันไม่ได้ มีอาการหลงลืม ส่งผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน ซึ่งอาการหลงลืมนั้นสามารถเกิดขึ้นในคนทั่วไปที่มีความเครียด วิตกกังวล หรือเร่งรีบได้ เรียกว่าสมองเสื่อมเทียม อาการจะเกิดขึ้นชั่วคราวแล้วจะค่อย ๆ นึกได้ในภายหลัง แต่ในผู้ที่สมองเสื่อมจะไม่สามารถเรียกคืนความจำได้เลย ภาวะสมองเสื่อมที่พบมากที่สุด คือ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD) เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative disorder) เซลล์ประสาทของผู้ป่วยจะเสื่อมมากขึ้นเรื่อย ๆ ประกอบกับมีการกระจายของพยาธิสภาพโดยทั่วทั้งใน Cerebral cortex (Martin et al., 1994) Temporal lobe (Armstrong et al., 1996; Tsuchiya et al., 2005) รวมไปถึง Amygdale ซึ่งเป็นบริเวณควบคุมอารมณ์ (Schmidt, Martin, Lee, & Trojanowski, 1996) แต่พบการกระจายมากที่สุด ใน Hippocampus ส่งผลให้เนื้อสมองฝ่อเล็กลง (Fox et al., 1996) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ป่วย AD นอกจากไม่สามารถสร้างความจำใหม่ได้แล้ว ยังมีปัญหาด้านสภาวะอารมณ์แปรปรวน สับสน ไม่เข้าใจเหตุผล ไม่เข้าใจภาษา สูญเสียความสามารถในการคิดวิเคราะห์ มีปัญหาด้านการเคลื่อนไหว อีกทั้งเมื่อเป็นแล้วยังไม่สามารถรักษาให้หายกลับสู่สภาวะปกติได้ จึงเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาต่อมา (Burns & Iliffe, 2009) พยาธิสภาพที่พบ คือ อะไมลอยด์ เบต้า (amyloid- $\beta$ ) และโปรตีนเทาที่มีความผิดปกติจากสถิติภาวะสมองเสื่อมเพศหญิงมากกว่าเพศชาย มาจากอิทธิพลของฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) ที่มีมากในเพศหญิง และ ลดลงอย่างฉับพลันเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น มีงานวิจัยจำนวนมากรายงานว่า เอสโตรเจนมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทมีผลโดยตรงต่อกระบวนการสร้างความจำ ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ Synaptic plasticity คือ มีการเพิ่มความแข็งแรงของ Synapse การเพิ่มการแสดงออกของ Synaptic protein (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010; Chamniansawat, 2013) เอสโตรเจนถูกสร้างจาก ต่อมเพศ (Gonadal estrogen) และบริเวณอื่นนอกเหนือจากต่อมเพศ (Extra gonadal estrogen) เช่น รก เต้านม ต่อมหมวกไต และสมอง (Fester et al., 2011) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) เป็นบริเวณที่มีการสร้างเอสโตรเจนที่สำคัญต่อกระบวนการสร้างความจำ มีรายงานว่าหากไม่มีการสังเคราะห์ เอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะไม่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน ที่สังเคราะห์จากต่อมเพศ (Chamniansawat, 2013) เอสโตรเจนเป็น Steroid hormone มี



กลไกการออกฤทธิ์ภายในเซลล์โดยจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังเซลล์ของอวัยวะเป้าหมาย และจับกับตัวรับที่นิวเคลียส หรือ ไฮโดรฟอสฟิลิซึม ตัวรับของเอสโตรเจน (Estrogen receptor) ที่พบมากบริเวณสมอง คือ ชนิดแอลฟา (ER $\alpha$ ) และ บีต้า ER $\beta$  โดย ER $\alpha$  และ ER $\beta$  เป็นตัวรับชนิดที่ออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (Genomic action) (Christiane et al., 2008) โดยเฉพาะตัวรับเอสโตรเจนชนิด ER $\beta$  เป็นชนิดที่พบมากที่สุดบริเวณสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ซึ่งส่งผลต่อกระบวนการ Synaptic plasticity และกระบวนการสร้างความจำในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Chamniansawat, 2013; Liu et al., 2008) บทบาทของเอสโตรเจนต่อระบบประสาทนั้นเกี่ยวข้องกับ การควบคุมระดับของ การผลิตและการปล่อยสารสื่อประสาท การทำงานของเอนไซม์ ความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การแตกแขนงของ Dendrite และกระบวนการ synaptogenesis ในสมองส่วน Cortex และ Hippocampus (Desmond & Levy, 1997; McEwen & Alves, 1999) Chamniansawat และคณะ ได้ทำการศึกษาในปี ค.ศ. 2009 พบว่า เอสโตรเจนเข้าจับกับตัวรับแล้วกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนที่ Postsynaptic ได้ เช่น Activity-regulated cytoskeleton protein (Arc) และ Postsynaptic density 95 (PSD-95) ซึ่งเป็นโปรตีนโครงสร้างที่จำเป็นสำหรับกระบวนการ Synaptic plasticity ทำให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์ส่งเสริมกระบวนการ Synaptic plasticity และกระบวนการสร้างความจำ (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009) มีการค้นพบความเกี่ยวข้องของ Arc และ PSD-95 โดยจากการศึกษาพบว่า Arc หรือ PSD-95 นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของ Long-term potentiation (LTP) ของสมองฮิปโปแคมปัสที่มีผลโดยตรงต่อการเรียนรู้และความจำ การเปลี่ยนแปลงกระบวนการ Synaptic plasticity อาศัยการเพิ่มของโปรตีนโครงสร้างได้แก่ Arc (Lyford et al., 1995) และ Postsynaptic density-95 (PSD-95) (Chamniansawat & Chongthammakun, 2009, 2010; Chamniansawat, 2013) มีการศึกษาการ Knockdown Arc ในสัตว์ทดลอง พบว่า การสูญเสีย Arc นำไปสู่การลดลงอย่างมีนัยสำคัญของ Pines (Peebles et al., 2010) PSD-95 เป็นส่วนหนึ่งของ Membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs) ซึ่งเป็น Major scaffolding proteins ของ PSD ใน glutamatergic excitatory synapses ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Synaptic plasticity และมีการศึกษาการ Knockdown PSD-95, PSD-93, and synapse-associated protein (SAP)102 พบว่า ทำให้เกิดการลดลงอย่างเฉียบพลันของ MAGUK โดยการลดลงของ Synaptic transmission mediated คือ  $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-5-methyl-3-isoxazole-propionate receptors (AMPA) and N-methyl-d-aspartate receptors (NMDARs) มีผลโดยตรงต่อกระบวนการสร้างความจำ (Chen, 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของเอสโตรเจนต่อกระบวนการ Synaptic plasticity และพฤติกรรมความจำในภาวะชรา ดังนั้นงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาหนูแรทเพศเมีย อายุ 2 เดือน, 5 เดือน, 10 เดือน และ 19 เดือนต่อกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจน ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่สัมพันธ์กับการเรียนรู้ และความจำของหนูแรทเพศเมีย โดยศึกษาความสัมพันธ์ของตัวรับเอสโตรเจน ER $\beta$  และระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจน ที่สัมพันธ์กับพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ การแสดงออกของโปรตีน Arc และ PSD-95 ในกระบวนการสร้างความจำ (synaptic plasticity) และการแสดงออกของโปรตีนอะไมลอยด์ เบต้า Amyloid- $\beta$  ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของอายุต่อความสามารถในการจดจำของหนูแรทเพศเมียด้วยวิธี MWM test
2. เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองส่วน Hippocampus ในหนูแรทเพศเมีย
3. เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการแสดงออก synaptic protein ในสมองส่วน Hippocampus ในหนูแรทเพศเมีย

4. เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการแสดงออกของ Amyloid- $\beta$  ในสมองส่วน Hippocampus ในหนูแรทเพศเมีย

### 1.3 สมมติฐานของการทดลอง

อายุที่เพิ่มขึ้นทำให้การสังเคราะห์เอสโตรเจนภายในเซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียลดลงนำไปสู่การยับยั้งกระบวนการ Synaptic plasticity และทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อม

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการทดลอง

1. ทราบผลของอายุต่อความจำเสื่อมในหนูแรทเพศเมีย
2. ทราบผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองส่วน

Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย (ER $\beta$ , E2 level)

3. ทราบผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงของ Synaptic protein ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย (PSD-95, Arc)

4. ทราบผลของอายุต่อการแสดงออกของ Amyloid- $\beta$  ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย

### 1.5 ขอบเขตของการทดลอง

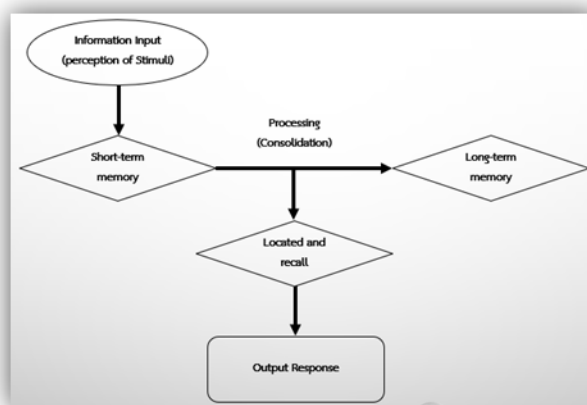
งานวิจัยนี้มีทั้งส่วนที่ศึกษาด้านพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Morris Water Maze test (MWM) และศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมียที่มีอายุต่างกัน 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน โดยศึกษาการแสดงออกของโปรตีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอสโตรเจน ได้แก่ ER $\beta$  และปริมาณเอสโตรเจนในเลือดและ ในสมองฮิปโปแคมปัส ศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ Synaptic plasticity ได้แก่ Arc, PSD-95 นอกจากนี้ยังศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Amyloid- $\beta$  ที่เป็นโปรตีนบ่งชี้ภาวะสมองเสื่อมร่วมด้วย

## บทที่ 2 วรรณกรรมและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 1. ความจำ (Memory)

ความจำ คือ หน้าที่ขั้นสูงของสมอง มีความจำเป็นต่อการเรียนรู้และการดำรงชีวิต ความจำเป็นการเก็บข้อมูลหรือความรู้ที่ได้จากการเรียนรู้หรือประสบการณ์ และสามารถเรียกคืนกลับมาใช้เพื่อการดำเนินชีวิตและกิจวัตรประจำวัน ความจำเป็นกระบวนการที่ไม่ได้เกิดขึ้นเดี่ยว ๆ สมองมีหน้าที่ดำเนินการเก็บ และเรียกคืนข้อมูล ในวิธีต่าง ๆ กันเพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการที่ต่างกัน โดยผู้ที่มีภาวะสมองเสื่อมจะสูญเสียความสามารถของสมอง โดยเฉพาะความจำ ความจำจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่งสำหรับการดำรงชีวิต ชนิดของความจำ (type of memory) ส่วนใหญ่แล้วการแบ่งความจำมักยึดตามระยะเวลา โดยแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ ความจำระยะสั้น (short-term memory: STM) และ ความจำระยะยาวหรือ ความจำถาวร (Long-term memory: LTM)

**1.1 ความจำระยะสั้น (Short-term memory: STM)** เป็นการเก็บความจำไว้ได้ในช่วงสั้น ๆ เป็นความจำช่วงสั้น 10 วินาที จนถึง 2-3 นาที หลังจากได้รับข้อมูล สามารถเกิดขึ้นได้จากการตั้งใจทำสิ่งกระตุ้นที่ได้รับผ่านทาง SM จนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระหว่างเซลล์ประสาท แบบชั่วคราว สามารถอยู่ได้นานระดับวินาทีจนถึงนาทีก่อนกลับเข้าสู่สภาพเดิม จึงสามารถเรียกความจำประเภทนี้ออกมาใช้ได้ในระยะหนึ่งเท่านั้น อย่างไรก็ตาม STM สามารถถูกรบกวนจากสิ่งแวดล้อมรอบข้างได้ง่าย จึงยากต่อการศึกษาในระดับโครงสร้างระดับเซลล์ (Jonides et al., 2008) ความจำระยะสั้นนั้นอาจเปลี่ยนเป็นความจำระยะยาวได้ โดยกระบวนการ Consolidation ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ synaptic connection ของวงจรเกี่ยวกับการเรียนรู้



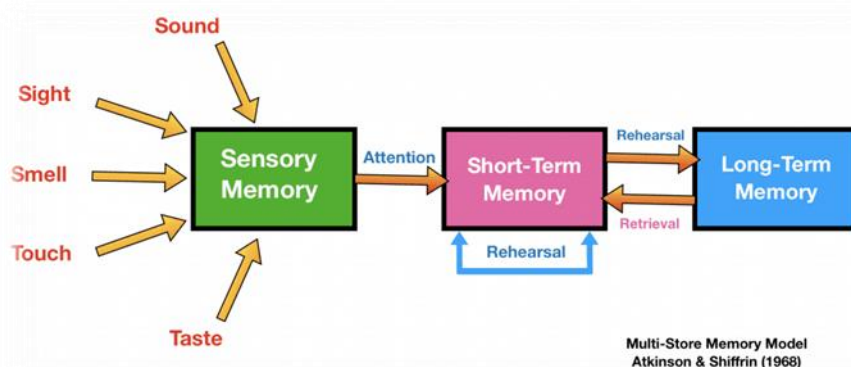
ภาพที่ 1 กระบวนการสร้างความจำ (Silverthorn, 2007)

**1.2 ความจำระยะยาวหรือ ความจำถาวร (Long-term memory: LTM)** เป็นการเก็บความจำไว้ได้ในเวลานาน (วัน-ปี) การเก็บความจำระยะยาวนั้นมีจำนวนมาก ทำให้การเรียกคืนข้อมูลจึงใช้เวลานานกว่าความจำระยะสั้น สามารถจำได้เป็นเวลานานตั้งแต่ 1 วันจนกระทั่งเป็นปีหรือตลอดชีวิต เกิดขึ้นจากการทบทวนข้อมูลจาก STM จนเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ประสาทอย่างถาวร (Lamprecht & LeDoux, 2004) โดยอาศัยการสร้างโปรตีนตัวใหม่ และการปรับเปลี่ยนการจัดเรียงตัวของโปรตีนที่มีอยู่เดิม (Yuste &

Bonhoeffer, 2001) เพื่อช่วยในการยึดโครงสร้างของจุดประสานประสาท (Synapse) ให้แข็งแรง ความจำระยะยาวแบ่งออกเป็น 2 ชนิด

Reflexive (Implicit) memory เป็นความจำที่เกิดขึ้นโดยอัตโนมัติ ไม่ต้องการความคิด สามารถเรียกคืนความจำได้อัตโนมัติ เช่น ทักษะการเคลื่อนไหว จึงเรียกความจำชนิดนี้ว่า Procedural memory เพราะมีความเกี่ยวข้องกับทักษะหรือการที่จะทำสิ่งต่าง ๆ อย่างไร สมอองส่วนอมิกดาลา (Amygdala) และซีรีเบลลัมมีบทบาทเกี่ยวกับความจำชนิดนี้

Declarative (Explicit) memory เป็นความจำระยะยาวที่มีการเรียกกลับโดยรู้สึกตัว ขึ้นอยู่กับความคิดในระดับสูง เช่น การเปรียบเทียบ การอนุมาน เป็นความจำที่ต้องคิด มีสติเอาใจใส่ ตั้งใจเพื่อที่จะเรียกข้อมูลที่เก็บไว้ เอามาอธิบายเป็นคำพูด หรือการเขียนบรรยายได้ สามารถเปรียบเทียบหรือแปลผลได้ อาจกล่าวได้ว่า Declarative memory เป็นการจดจำเกี่ยวกับ องค์ความรู้ต่าง ๆ ความจำระยะยาวชนิดนี้เกี่ยวข้องกับสมอองส่วน temporal lobe และความจำระยะนี้ยังแบ่งได้อีก 2 ชนิด คือ Semantic memory ความจำที่เกี่ยวข้องกับความจริง และ Episodic memory ความจำที่เกี่ยวข้องกับเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นในชีวิต



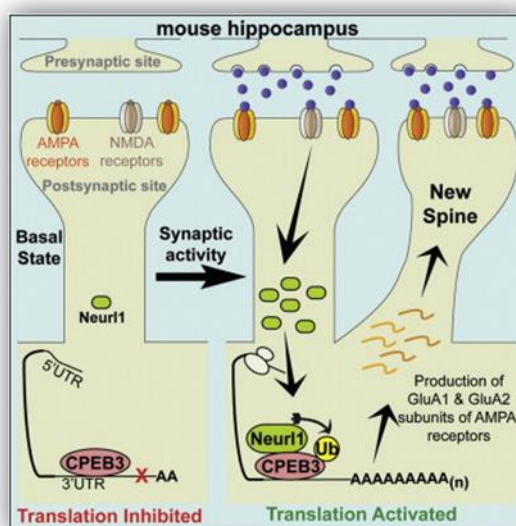
ภาพที่ 2 รูปแบบการจัดเก็บความจำ (Saul, 2017)

### 1.3 กลไกการเกิดความจำ (mechanism of memory)

กลไกทางสรีรวิทยาของความจำระยะสั้นและ ความจำระยะยาวนั้นแตกต่างกัน กลไกทางสรีรวิทยาของความจำระยะสั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ของ Presynapse อย่างชั่วคราว เช่น มีการหลั่งสารสื่อประสาทจาก Presynapse ลดลงหรือเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีการตอบสนองที่ Postsynapse ลดลงหรือเพิ่มขึ้นตามลำดับ ส่วนกลไกทางสรีรวิทยาของความจำระยะยาวจะเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงหน้าที่และโครงสร้างของเซลล์ประสาท กระบวนการเรียนรู้และการสร้างความจำนั้นมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ในปัจจุบันนักวิจัยพยายามศึกษากระบวนการ หรือกลไกการตอบสนองของเซลล์ประสาทต่อการสร้างความจำ ซึ่งกระบวนการ Synaptic plasticity เป็นกระบวนการตอบสนองของเซลล์ในการสร้างความจำในสมอง (Skrebitsky & Chepkova, 1998; Cooper, 2005) โดยหลังจากได้รับการกระตุ้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ Synapse สมอองส่วน Hippocampus จะมีบทบาทสำคัญในการสร้างและ เก็บความรู้ใหม่นั้น ในรูปแบบของ LTM

กลไกการเกิด Synaptic plasticity (Mechanism of synaptic plasticity) เริ่มจาก Presynaptic neuron ได้รับ Action potential จนเกิด Depolarization กระตุ้น การทำงานของ Voltage-gate calcium channels (VGCCs) ทำให้เกิด  $Ca^{2+}$  ไหลเข้าสู่ Presynaptic terminal และกระตุ้นการหลั่ง Glu จาก Presynaptic neuron จากนั้น Glu เข้าจับกับ Glutamate receptors ทั้ง AMPAR ( $\alpha$ -amino-3-hydroxyl-4-isoxazole-propionate receptor) และ NMDAR

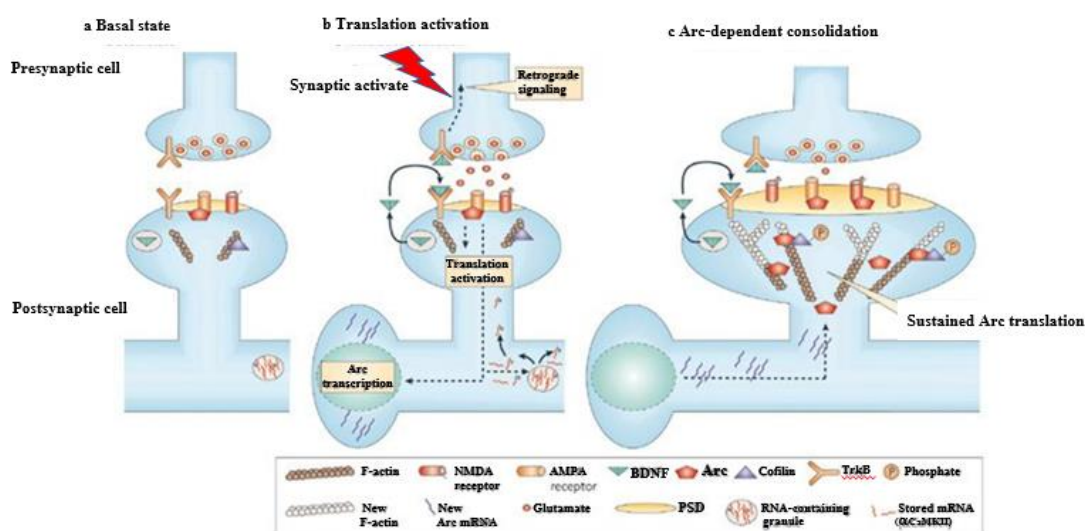
(N-methyl-D-aspartic acid receptor) บนผิวของ Postsynaptic neuron หรือ dendritic spine เมื่อ Glu เข้าจับกับทั้ง AMPAR และ NMDAR แล้ว AMPAR จะยอมให้  $\text{Na}^+$  ไหลผ่านเข้าไปใน Dendritic spine ในขณะที่ NMDAR ซึ่งถูก  $\text{Mg}^{2+}$  ปิดกั้นการทำงานไว้จะยอมให้ประจุใด ๆ ไหลผ่านแต่เมื่อ  $\text{Na}^+$  ไหลผ่านเข้าเซลล์มากขึ้นจนเกิด Depolarization จนกระตุ้นให้เกิดศักย์ไฟฟ้าของ Postsynaptic เกิดเป็น Excitatory postsynaptic potential (EPSP) ส่งผลให้  $\text{Mg}^{2+}$  บน NMDAR หลุดออก และยอมให้  $\text{Ca}^{2+}$  รวมถึง  $\text{Na}^+$  ไหลผ่าน NMDAR เข้าสู่ Dendritic spine อย่างรวดเร็ว เมื่อ  $\text{Ca}^{2+}$  ไหลเข้าไปใน Dendritic spine จะกระตุ้นการทำงานของ Kinase enzymes เช่น Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) และ Kinase protein C (PKC) เป็นต้น CaMKII ที่ถูกกระตุ้นนั้นจะไปกระตุ้น AMPAR ต่อซึ่งส่งผลให้ AMPAR มีความไวต่อการถูกกระตุ้นมากขึ้นและเกิด AMPAR insertion บนผิว Dendritic spine ทำให้ประจุบวกไหลเข้าเซลล์มากขึ้น เมื่อวัดค่าศักย์ไฟฟ้าของบริเวณ Postsynaptic จะได้ค่า EPSP ที่คงค่านานประมาณ 1 ชั่วโมง ระยะเวลาเรียกว่า Early-long-term potentiation (E-LTP)



ภาพที่ 3 กลไกการเกิด synaptic plasticity (Elias et al., 2011)

หลังจากระยะของ E-LTP แล้ว หากมีการกระตุ้นเซลล์ประสาทต่อไปจะมี  $\text{Ca}^{2+}$  รวมทั้ง  $\text{Na}^+$  ไหลเข้า Dendritic spine มากขึ้นจนเกิด Depolarization ของ Postsynaptic neuron นานประมาณ 3 ชั่วโมง เป็นอย่างน้อย ส่งผลให้การทำงานของ Kinase enzymes คงอยู่ได้นานขึ้น จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ Extracellular signal-regulated kinase (ERK) ซึ่งเป็น Enzyme ในตระกูล Mitogen-activated protein kinase (MAPK) ที่มีหน้าที่ควบคุม Gene expression, Mitosis, Differentiation, Proliferation, Cell survival และ apoptosis โดย ERK จะกระตุ้นการทำงานของ Transcription factor CREB (cAMP response element binding) ที่มีหน้าที่ควบคุมการสร้างโปรตีนตัวใหม่ที่ใช้ในการช่วยคงโครงสร้างในบริเวณจุดประสานประสาทในระยะนี้จะสามารถวัดศักย์ไฟฟ้าได้สูง และคงอยู่ได้นานอย่างน้อย 3 ชั่วโมง เรียกระยะนี้ว่า Late long-term potentiation (L-LTP) จากนั้น L-LTP จะกระตุ้นให้เกิดการจัดเรียงตัวของ Cytoskeleton protein ใหม่ เกิด Action polymerization ทำให้ Dendritic spine มีการเปลี่ยนแปลงทั้งขนาด รูปร่าง และจำนวน อีกทั้งมีการเพิ่มขึ้นของ Receptors, Adhesion molecules, Signaling molecules และ Channels เรียกทั้งหมดว่า Postsynaptic density (PSD) ใช้บ่งชี้การเกิดการสร้างจุดประสานประสาท

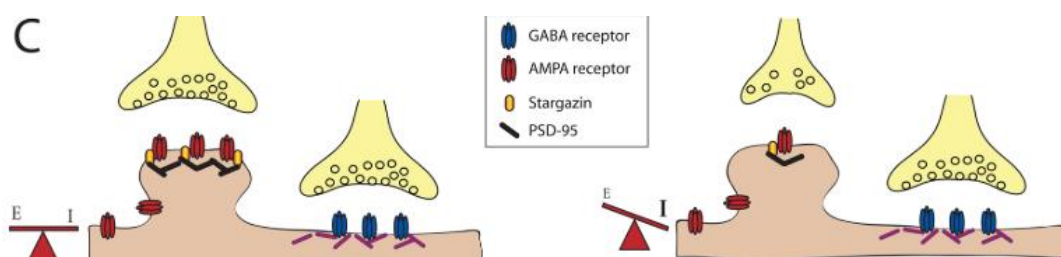
**Activity-regulated cytoskeleton protein (Arc)** จัดอยู่ใน Effector group ของ Immediately early genes (IEGs) ถูกพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1995 โดย Lyford และคณะ (Lyford et al., 1995) ประกอบด้วยกรดอะมิโน 396 ตัว น้ำหนักโมเลกุล 55 kDA พบได้มากใน Hippocampus และ Cerebral cortex (Lyford et al., 1995) Arc เป็นโปรตีนที่ควบคุมการทำงานของโปรตีนในเซลล์ประสาท แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดเกี่ยวกับปฏิกิริยาและ การรวมกันของ Multiprotein complexes และ บทบาทต่อโรคและ กระบวนการรับรู้ของมนุษย์ จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ประสาทด้วยกระแสไฟฟ้าจนเกิด LTP เหนี่ยวนำให้เกิดให้มีการขนส่ง mRNA ของ Arc ไปยังบริเวณจุดประสานประสาทที่มีการกระตุ้นให้เกิดการทำงานและเกิดการสร้างโปรตีน Arc อย่างรวดเร็ว (Steward et al., 1998; Guzowski et al., 2000; Rodriguez et al., 2005; Plath et al., 2006) และเมื่อมีการกระตุ้นด้วย Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ทำให้เพิ่มการสร้างโปรตีน Arc อย่างรวดเร็ว (Yin et al., 2002) อีกทั้งเมื่อทำการลดการแสดงออกของโปรตีน Arc แล้วจะทำให้ไม่สามารถคงสภาพของจุดประสานประสาทที่สร้างขึ้นใหม่ได้ (Guzowski et al., 2000; Rodriguez et al., 2005; Plath et al., 2006) นอกจากนี้โปรตีน Arc ยังมี โครงสร้างบางส่วนคล้ายกับ Spectrin จึงทำหน้าที่เป็น Actin-binding protein (Lyford et al., 1995) และ ช่วยควบคุมสมดุลของ AMPAR (Chowdhury et al., 2006; Plath et al., 2006; Rial Verde et al., 2006; Shepherd et al., 2006) อีกทั้งสนับสนุนการเกิด Neurite outgrowth โดยทำงานร่วมกับ CaMKII (Donai et al., 2003)



ภาพที่ 4 แบบจำลองการทำงานของโปรตีน Arc ในการยึดโครงสร้างภายใน Postsynaptic neuron (Bramham & Wells, 2007)

**PSD 95 (Postsynaptic density-95)** หรือ SAP-90 เป็นโปรตีนที่ได้รับการศึกษามากที่สุดใน MAGUK-family of PDZ domain-containing proteins หรือ MAGUK-family proteins โครงสร้างพื้นฐานประกอบด้วย PDZ domain 3 domain ,SH 3 domain และ Guanylate kinase-like domain (GK) ซึ่งตั้งอยู่ในบริเวณของ Post synaptic density ของ Neuron และมีส่วนเกี่ยวข้องกับโปรตีน Synaptic และ PSD 95 ยังเป็น Marker ที่สำคัญใน Post synaptic mechanisms การกระตุ้นเซลล์ประสาทแต่ละตัวบอกถึงการกระตุ้นโดยรวมของสมองอย่างจำเพาะโดยกระบวนการ นี้ได้รับการควบคุมโดยโมเลกุลที่ควบคุมจำนวนรูปร่าง และ ความแข็งแรงของระบบประสาท และยังมีอิทธิพลจากจำนวนของ Neurotransmitter receptor

และ Signaling molecule ไว้ใน Particular synaptic site การศึกษาล่าสุดเผยให้เห็นบทบาทสำหรับ PSD-95 โมเลกุลที่เติมไปด้วย Synapses glutamatergic และการจัดกลุ่มของ Neurotransmitter receptor, Adhesion molecule, Ion channel, Cytoskeletal element และ Signaling molecule ที่ Postsynaptic site กลไกการควบคุมการกำหนดเป้าหมายของ PSD-95 ที่ Synapse ได้อธิบายว่าโมเลกุลที่ทำให้เกิดการสะสม และการจัดกลุ่มของ Synaptic protein หลากหลายชนิด เพื่อควบคุมโครงสร้างและความแข็งแรงของ Synaptic นอกจากนี้ PSD-95 สามารถรักษาสมดุลระหว่างการกระตุ้นและการยับยั้งในสมอง และวิธีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะสมดุลนี้อาจจะทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาท (Keith & Husseini, 2008)



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ของ PSD-95 และ AMPA receptor (Keith & Husseini, 2008)

## 2. โรคเซลล์ประสาทเสื่อม (Neurodegenerative disorder)

### โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease: AD)

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative disorder) และเป็นสาเหตุหลักของภาวะจิตเสื่อม (Dementia) เซลล์ประสาทของผู้ป่วยจะเสื่อมมากขึ้นเรื่อย ๆ ประกอบกับการกระจายของพยาธิสภาพโดยทั่วทั้งใน Cerebral cortex (Martin et al., 1994) Temporal lobe (Armstrong et al., 1996; Tsuchiya et al., 2005) รวมไปถึง Amygdale ซึ่งเป็นบริเวณควบคุมอารมณ์ (Schmidt et al., 1996) แต่พบการกระจายมากที่สุด ใน Hippocampus ส่งผลให้เนื้อสมองฝ่อเล็กน้อย (Fox et al., 1996) ด้วยเหตุนี้จึงทำให้ผู้ป่วย AD นอกจากไม่สามารถสร้างความจำใหม่ได้แล้ว ยังมีปัญหาด้านสมาธิ อารมณ์แปรปรวน สับสน ไม่เข้าใจเหตุผล ไม่เข้าใจภาษา สูญเสียความสามารถในการคิดวิเคราะห์ มีปัญหาด้านการเคลื่อนไหว อีกทั้งเมื่อเป็นแล้วยังไม่สามารถรักษาให้หายกลับสู่สภาวะปกติได้ จึงเป็นเหตุให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในเวลาต่อมา (Burns & Iliffe, 2009)

### อาการของ AD สามารถแบ่งได้เป็น 5 ระยะ ดังนี้

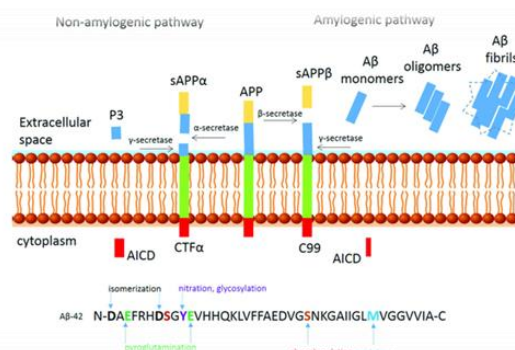
1. Mild cognitive impairment ระยะนี้จะมีอาการหลงลืมบ้างเล็กน้อย ยังไม่กระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวัน และยังไม่มีความผิดปกติบ่งบอกว่าเป็น AD
2. Mild Alzheimer's disease ระยะนี้จะเริ่มมีอาการหลงลืมมากขึ้น เริ่มที่จะสูญเสียความจำระยะสั้น ผู้ป่วยจะสนใจสิ่งต่าง ๆ น้อยลง และเริ่มกระทบต่อการใช้ชีวิตประจำวัน
3. Moderate Alzheimer's disease ระยะนี้ผู้ป่วยจะสูญเสียการรับรู้ ต้องมีผู้อื่นคอยให้การช่วยเหลือ เริ่มแสดงอาการของภาวะจิตเสื่อม
4. Severe Alzheimer's disease ระยะนี้ผู้ป่วยจะมีสภาวะทางอารมณ์แปรปรวนอย่างมาก ผู้ป่วยไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองด้านความต้องการพื้นฐานได้เลย มีการแสดงอาการของภาวะจิตเสื่อมอย่างชัดเจน เช่น อาการซึมเศร้า เก็บตัว โกรธเกรี้ยว หงุดหงิด เป็นต้น

5. Very severe Alzheimer's disease ระยะนี้ผู้ป่วยจะไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้อีก พูดไม่ได้ ไม่สามารถเคลื่อนไหวได้ ต้องนอนอยู่บนที่นอนตลอด และผู้ป่วยจะเสียชีวิตในเวลาต่อมา

โรคอัลไซเมอร์จัดเป็นโรคจากความผิดปกติของการม้วนพับของโปรตีน (Protein misfolding disease) เกิดจากการสะสมของอะมัยลอยด์ บีตาและโปรตีนเทา (Tau protein) ที่ม้วนพับผิดปกติภายในสมอง (Priller et al., 2006) พลาแกเกิดจากเพปไทด์ขนาดเล็กยาวประมาณ 39-43 กรดอะมิโน ชื่อว่า อะมัยลอยด์ บีตา (Amyloid beta; อาจเขียนว่า A-beta หรือ A $\beta$ ) โดยอะมัยลอยด์ บีตาเป็นชิ้นส่วนหนึ่งของโปรตีนต้นกำเนิดอะมัยลอยด์ (Amyloid precursor protein; APP) โปรตีนนี้เป็นทรานสมเมมเบรนโปรตีน (Transmembrane protein) ที่แทรกทะลุผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ประสาท โปรตีน APP มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต การดำรงชีวิต และการซ่อมแซมของเซลล์ประสาท (Turner, O'Connor, Tate, & Abraham, 2003) ในโรคอัลไซเมอร์จะมีการสลายโปรตีน (Proteolysis) โดยตัด APP ออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ด้วยเอนไซม์ (Hooper, 2005) ชิ้นส่วนชิ้นหนึ่งที่เกิดขึ้นจะกลายเป็นเส้นใยอะมัยลอยด์ บีตา ซึ่งจับตัวเป็นก้อนตตะกอนหนาแน่นอยู่นอกเซลล์ประสาท เรียกว่า ซีไนล์ พลาแก (Senile plaques) (Ohnishi & Takano, 2004)

### โปรตีนอะมัยลอยด์ เบต้า (A $\beta$ )

โปรตีนอะมัยลอยด์ เบต้า (A $\beta$ ) ซึ่งเป็นเพปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวน 40 หรือ 42 ตัว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4 kDa เพปไทด์เหล่านี้ได้มาจากการเมแทบอลิซึมของโปรตีน Amyloid precursor protein (APP) (Glennner & Wong, 1984) ซึ่งเป็น Integral transmembrane protein ที่มี C-terminal อยู่ใน Cytoplasm และ N-terminal จะอยู่ใน Extracellular ตามปกติสายโปรตีน APP ที่อยู่ในสมอง เป็นตัวสร้าง A $\beta$  ผ่าน 2 กลไก คือ Amyloidogenic pathway จะใช้เอนไซม์ 2 ชนิดคือ  $\beta$ -secretase และ  $\gamma$ -secretase ได้เป็น A $\beta$  ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งการตัดด้วย  $\beta$ -secretase ทำให้ได้ปลายด้านที่มีหมู่อะมิโน (N-terminal) ส่วนการตัดด้วย  $\gamma$ -secretase จะเป็นตัวกำหนดความยาวของ A $\beta$  (เช่น ได้เป็น A $\beta$ 1-40 หรือ A $\beta$ 1-42) จะได้ Peptide ซึ่งเป็น Nonamyloidogenic หลังจากนั้น A $\beta$  ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำจะเกาะกลุ่มกันเป็น A $\beta$  oligomer และ หลาย ๆ A $\beta$  oligomers เกาะกลุ่มกันกลายเป็น A $\beta$  fibrils หรือ Amyloid plaques ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท โดยปกติ A $\beta$ 1-40 เป็นเพปไทด์ที่พบมากกว่าแต่มีพิษน้อยกว่า A $\beta$ 1-42 (Querfurth & LaFerla, 2010; Gotz & Ittner, 2008) นอกจากนี้โปรตีน APP ยังสามารถถูก เมแทบอลิซึมด้วยกลไก Non-amyloidogenic pathway โดยเอนไซม์  $\alpha$ -secretase จะตัดสายโปรตีน APP ภายใน A $\beta$  domain จึงไม่ทำให้เกิดการสร้างเพปไทด์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

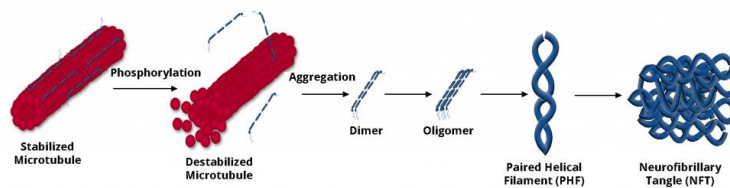


ภาพที่ 6 การเกิด Amyloid processing (Sumner, Edwards, Asuni & Teeling, 2018)

นอกจากการสะสมของพลาแกแล้ว โรคอัลไซเมอร์ยังเกิดการรวมกลุ่มผิดปกติของโปรตีนเทา (Tau protein) เซลล์ประสาททุกเซลล์จะมีไซโทสเกเลตอน (Cytoskeleton) หรือโครงเซลล์ ที่ค้ำจุนภายใน ซึ่ง



บางส่วนประกอบด้วยไมโครทิวบูล (Microtubules) ไมโครทิวบูลนี้จะทำหน้าที่เหมือนรางรถไฟกล่าวคือเป็นเส้นทางลำเลียงสารอาหารและโมเลกุลจากตัวเซลล์ไปยังปลาย แอกซอน (Axon) หรือแกนประสาทและนำกลับเข้ามาในทางกลับกัน โปรตีนที่ชื่อว่า เทา (Tau) ทำหน้าที่ช่วยให้ไมโครทิวบูลเสถียรหลังเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชัน จึงเรียกโปรตีนเทาว่าเป็น Microtubule-associated protein (MAPs) ในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์โปรตีนเทาจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมี คือ มีปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันมากกว่าปกติ ทำให้โปรตีนจับคู่กันเกิดเป็นนิวโรไฟบริลลารี แทงเกิล (Neurofibrillary tangles) และรบกวนระบบการขนส่งของเซลล์ประสาท (Avila, Lucas, Perez & Hernandez, 2004)



ภาพที่ 7 การเกิด Neurofibrillary Tangles (<https://www.stressmarq.com/amyloid-hypothesis-vs-tau-hypothesis/?v=5b79c40fa7c2>)

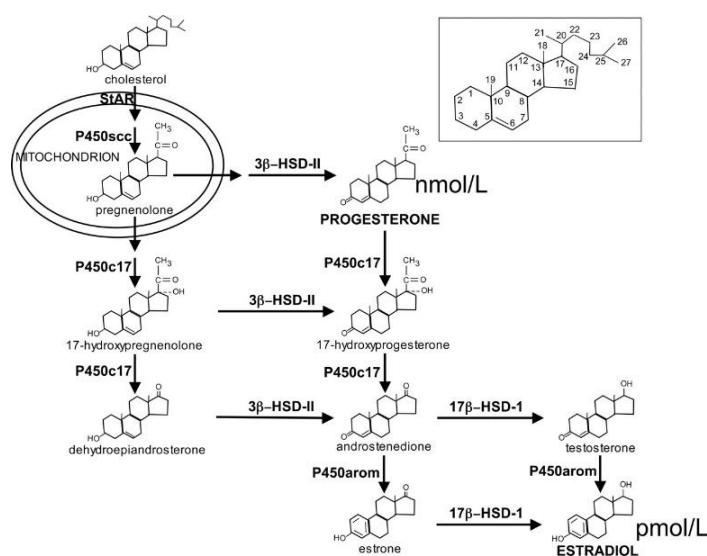
### 3. เอสโตรเจน

#### การสังเคราะห์เอสโตรเจน

เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ ที่มีความสำคัญทั้งในเพศหญิงและเพศชาย ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมเพศและเข้าสู่สมองโดยระบบไหลเวียนเลือด นอกจากนี้ยังมีเอสโตรเจนบางส่วนที่สังเคราะห์ขึ้นในอวัยวะอื่น เช่น ต่อมหมวกไต ตับ เต้านม และสมอง (Fang et al., 2001) ซึ่งเอสโตรเจนที่สร้างขึ้นนอกระบบสืบพันธุ์นั้นมีความสำคัญต่อหญิงวัยหมดประจำเดือน และสามารถกระตุ้นอวัยวะเป้าหมายที่อยู่ใกล้เคียงนั้นได้ (Purohit & Reed, 2002; Mukai et al., 2006) ช่วงวัยหลังหมดประจำเดือนคือช่วงที่เพศหญิงมีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง (อายุประมาณ 50-80 ปี) ทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดโรคต่าง ๆ อาทิเช่น โรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease) (Bauer & Podesser, 2008) โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) (Purohit & Reed, 2002) โรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative disease) และการสูญเสียความทรงจำ (Joshi & Morley, 2006)

เอสโตรเจนสังเคราะห์มาจากคอเลสเตอรอล โดยคอเลสเตอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็น Pregnenolone โดยเอนไซม์ Cholesterol side-chain cleavage cytochrome (P450<sub>sc</sub>) ภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งการส่งคอเลสเตอรอลข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ต้องอาศัยโปรตีนตัวพาที่สำคัญ คือ Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) และจัดเป็นขั้นกำหนดอัตรา (Rate-limiting step) ของกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากนั้น Pregnenolone จะถูกเปลี่ยนเป็น Dehydroepiandrosterone (DHEA) แล้วเปลี่ยนเป็น Testosterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่สำคัญในเพศชาย ส่วนในเพศหญิงนั้น Testosterone จะถูกเอนไซม์ Aromatase ใน Endoplasmic reticulum (Fang et al., 2001; Saldanha et al., 2009) เปลี่ยนให้เป็นสารประกอบเอสโตรเจนที่มีคาร์บอน 18 อะตอม และมีวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ได้แก่ Estradiol, Estriol และ Estrone (Purohit & Reed, 2002) รูปแบบของเอสโตรเจนที่ออกฤทธิ์ คือ 17 $\alpha$ -estradiol และ 17 $\beta$ -estradiol (Fang et al., 2001) โดย 17 $\beta$ -estradiol เป็นรูปแบบที่มี

การศึกษากันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากสามารถจับกับ Estrogen receptor (ER) ได้เป็นอย่างดี กลายเป็น ER-17 $\alpha$ -estradiol complex ควบคุมการแสดงออกของยีน (Green et al., 1997)



ภาพที่ 8 การสังเคราะห์เอสโตรเจน (Serdar et al., 2005)

จากข้อมูลดังกล่าวจะเห็นได้ว่า กระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนนั้นมีเอนไซม์สำคัญ มาเกี่ยวข้อง อาทิเช่น P450scc และ Aromatase เป็นเอนไซม์ในตระกูล Cytochrome P450 superfamily ซึ่งพบในเนื้อเยื่อที่จำเพาะ แต่ในกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนนี้ การทำงานของ เอนไซม์ดังกล่าวอยู่ภายใต้การควบคุมของโปรตีนในชั้นกำหนดอัตรา หรือโปรตีน StAR ดังที่กล่าวไปข้างต้น

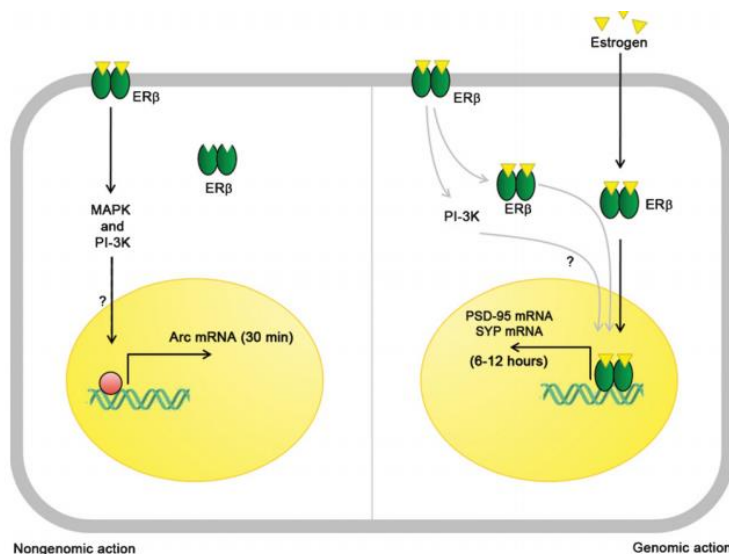
### Estrogen receptors (ERs)

ER มี 3 ชนิดคือ ER $\alpha$  ER $\beta$  และ GPR30 ซึ่งสังเคราะห์มาจากยีนที่แตกต่างกัน ER $\alpha$  สังเคราะห์มาจากยีนที่อยู่บนโครโมโซม 6q25.1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 595 ตัว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 67 kDa ในขณะที่ ER $\beta$  สังเคราะห์มาจากยีนที่อยู่บนโครโมโซม 14q23-24.1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 530 ตัว น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 55 kDa (Enmark & Gustafsson, 1998) และ GPR30 mRNA แต่แสดงให้เห็นในเนื้อเยื่อจำนวนมากทั่วร่างกาย (เช่น รก, ตับปอด, ต่อมลูกหมาก, รังไข่, รก) (Carmeci et al., 1997; Owman et al., 1996; Takada et al., 1997) แต่ GPR 30 กลไกไม่ทราบแน่ชัด ในงานนี้จะกล่าวเฉพาะ ER $\alpha$  และ ER $\beta$

ERs พบได้ทั้งภายในเซลล์และ เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดการทำงานที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ Classical genomic และ Non-genomic (Pappas et al., 1995) ERs ที่อยู่ใน Cytosol เป็น Nuclear receptor family หรือ Nuclear receptor ซึ่งมีหน้าที่เป็น Transcription factor (King & Greene, 1984) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า Cytosolic ER สามารถเปลี่ยนตำแหน่งเข้าไปอยู่ในนิวเคลียสได้ เมื่อได้รับเอสโตรเจน นอกจากนี้ยังพบว่า ER ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์สามารถจับกับสารที่มีคอเลสเตอรอลสูงได้ และมีการทำงานแบบ G-protein couple receptor (Anderson, 1998) จากการศึกษาพบว่า ER $\alpha$  และ ER $\beta$  มีการกระจายตัวอยู่บนบริเวณต่าง ๆ บนสมอง (Laflamme et al., 1998; Lindberg et al., 2003) การออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนนั้นจะขึ้นอยู่กับ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ที่กระจายอยู่บนเซลล์ประสาท เมื่อเอสโตรเจนจับกับตัวรับจะทำให้เกิดการรวมกลุ่มของโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับ Signal transduction ภายในเซลล์ (Morissette et al., 2008)

### การออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน

เอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน ER เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย ในปัจจุบันจำแนกตัวรับออกเป็น 2 กลุ่ม ตามตำแหน่งการแสดงออก ได้แก่ Nuclear ER และ Membrane ER เมื่อเอสโตรเจนจับกับ Nuclear ER ภายในเซลล์ Nuclear ER นั้นจะทำหน้าที่เป็น Transcription factor เคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสของเซลล์เป้าหมายเพื่อกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (Transcription) โดยจับกับตำแหน่งที่จำเพาะเจาะจงบนสายดีเอ็นเอของเซลล์เป้าหมาย (Estrogen responsive element) เพื่อสังเคราะห์ยีนและโปรตีนชนิดใหม่ เรียกกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกแบบผ่านยีน (Genomic action) ได้แก่ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  หากเอสโตรเจนออกฤทธิ์ผ่าน Membrane ER จะนำไปสู่การกระตุ้นกลไกการสื่อสารภายในเซลล์ (Intracellular signaling pathway) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมายอย่างรวดเร็ว เรียกกกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวว่า กลไกแบบไม่ผ่านยีน (Non-genomic action) ได้แก่ GPR30 (Chamniansawat & Chongthammakun, 2010)



ภาพที่ 9 กลไกการทำงานของเอสโตรเจนผ่านทาง Genomic และ Nongenomic action (Chamniansawat and Chongthammakun, 2010)

### ความสัมพันธ์ระหว่างเอสโตรเจน กระบวนการ Synaptic plasticity และการสร้างความจำ

Dendritic spine และ Pyramidal cell ใน CA1 มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนของเอสโตรเจน จากงานวิจัยของ Gould และคณะในปี ค.ศ. 1990 พบว่า ในหนูแรทที่มีการตัดรังไข่ออก มีความหนาแน่นของ Pyramidal cell ใน Dendritic spine ที่บริเวณ Hippocampus ลดลง แต่การได้รับเอสโตรเจนทดแทนนั้นทำให้ Dendritic spine เกิดการเหี่ยว (Woolley et al., 2007) ซึ่งในระยะ Estrous ระดับของเอสโตรเจน และความหนาแน่นของ Spine น้อยที่สุด ขณะที่ระยะ Diestrus ระดับของเอสโตรเจนและความหนาแน่นของ Spine จะค่อยๆเพิ่มขึ้น และ ในระยะ Proestrus ระดับของเอสโตรเจนและความหนาแน่นของ Spine จะเพิ่มขึ้นสูงสุดในวงจรของการมีรอบประจำเดือนปกติ การได้รับเอสโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของจำนวน synapse และมีการขยายของแขนงเดนไดรต์ นอกจากนี้เอสโตรเจนยังสามารถเพิ่ม การแสดงออกของโปรตีนที่ synapse ได้ อาทิเช่น PSD-95 และ Spinophilin (Akama & McEwan, 2003), Presynaptic marker protein เช่น Syntaxin, Synaptotagmin และ Synaptophysin (Chindewa et al., 2008) ซึ่งการเพิ่มเหล่านี้บ่งชี้ถึง กระบวนการ Synaptogenesis และ Synaptic plasticity ได้ และจากการศึกษาของ Terasawa และ Timiras ในปี ค.ศ. 1968 เมื่อใช้ Electrodes วัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นใน Hippocampus (Hippocampus seizure threshold) ของหนูแรท

เพศเมียที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนและหนูแรทที่อยู่ระยะ proestrus จะพบว่า มีการลดลงของ Hippocampus seizure threshold ในหนูทดลองที่กลุ่มที่ 2 ซึ่งระยะ Estrous จะมีปริมาณของ Hippocampus seizure threshold ต่ำกว่าระยะ proestrus ลักษณะเช่นนี้เป็นสิ่งที่ทำให้มีความแตกต่างกันของความหนาแน่นและปริมาณของ Synapse ใน Hippocampus (Woolley & McEwen, 1994) นอกจากนี้ มีการศึกษาความไวของ LTP ต่อการขึ้นลงของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่า เอสโตรเจนสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นใน hippocampus อีกทั้งยังมีการศึกษา พบว่า เอสโตรเจนสามารถเพิ่มการแสดงออกของ NMDA receptor ซึ่งเป็นกลไกที่สำคัญในการเกิด L-LTP และกระบวนการ Synaptic plasticity (Caroline et al., 2005)

#### 4. การเปรียบเทียบอายุระหว่างหนูแรทและมนุษย์

อายุขัยเฉลี่ยของหนูแรทในห้องทดลอง คือ 3 ปี ในขณะที่มนุษย์มีอายุขัยเฉลี่ยอยู่ที่ 80 ปี โดยมีปัจจัยอื่น ๆ ส่งผลต่ออายุขัยด้วย เช่น สภาวะแวดล้อมและสังคม โภชนาการ เป็นต้น (Sengupta, 2012) งานวิจัยของ Sengupta (2013) ได้รวบรวมงานวิจัยมากมาย โดยค้น พบว่า หนูมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยช่วงวัยเด็กจนกระทั่งเจริญพันธุ์ เมื่ออายุ 6 สัปดาห์ และช่วงที่เป็นสัตว์สังคม เมื่ออายุ 5-6 เดือน โดยอายุ หนู 1 วัน เท่ากับ อายุมนุษย์ 34.8 วัน หรือ สรุปลคือ 1 เดือนของหนูเปรียบเทียบกับได้กับอายุ 3 ปีของมนุษย์

#### ตารางที่ 1 ความสัมพันธ์ของอายุหนู และมนุษย์ในช่วงชีวิต

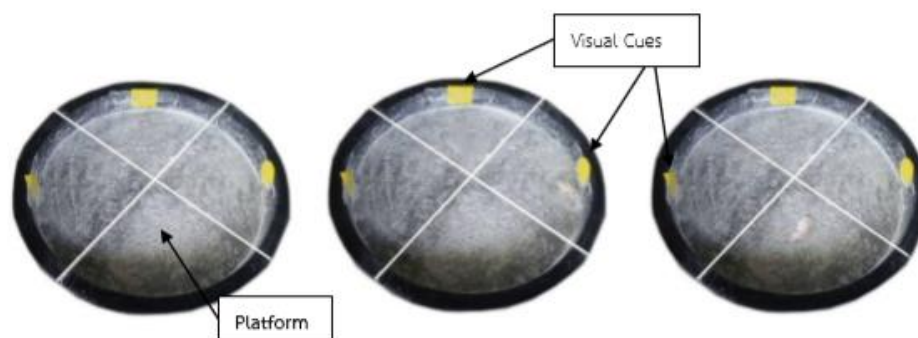
Entire life span	13.20 rat days = 1 human year
Weaning period	42.40 rat days
Pre-pubertal period	03.30 rat days
Adolescent period	10.50 rat days
Adulthood	11.80 rat days
Aged phase	17.10 rat days
Average	16.40 rat days

#### ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบอายุหนูและอายุมนุษย์ในช่วง Social maturity phase

Rat age (years)	Human age (years)
6 months (0.5)	18
12 months (1.5)	30
18 months (1.5)	45
24 months (2.0)	60
30 months (2.5)	75
36 months (3.0)	90
42 months (3.5)	105
45 months (3.75)	113
48 months (4.0)	120

## 5. การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาทในหนูเมาส์ (Neurological behavioral tests in mice)

การวิจัยทางระบบประสาทในสัตว์ทดลองนิยมใช้สัตว์ฟันแทะ (Rodents) คือ หนูเมาส์ (Mouse) และหนูแรท (Rat) ทั้งหนูเมาส์ และหนูแรท เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีรูปแบบพฤติกรรมที่หลากหลายที่เกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดกับมนุษย์ ในยุคแรกของการวิจัยพฤติกรรมทางระบบประสาท หนู เป็นสิ่งมีชีวิตที่ถูกใช้ในการวิจัยมากที่สุด และกลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการวิจัยทางเภสัชวิทยา ทางระบบประสาทการทดสอบพฤติกรรมที่นิยมใช้กันอย่างมากในการศึกษาทางสรีรวิทยาทางระบบประสาท คือ การทดสอบพฤติกรรมเกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อ ลักษณะของกระบวนการจำที่แตกต่างกัน อาทิ เช่น Passive Avoidance test, Morris Water Maze test, Radial Arm Maze test, Spontaneous Alternation test และ Novel Object Recognition test เป็นต้น ในการวิจัยนี้ ใช้วิธีการทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท ด้านการเรียนรู้และความจำ Morris Water Maze test (MWM) เป็นอุปกรณ์ทดสอบความจำเกี่ยวกับทิศทาง และสถานที่ (Spatial memory) โดยการว่ายน้ำ ซึ่งเป็นความจำระยะยาวถูกคิดค้นโดย Morris ในปี ค.ศ. 1984 ซึ่งในการทดสอบนี้จะปล่อยให้หนูว่ายน้ำในอ่างทรงกลมเพื่อหาแท่นใต้น้ำ โดยแบ่งอ่าง ทรงกลมออกเป็น 4 โซน (Zone) และมีสัญลักษณ์บอกทิศทาง (Visual cue) ติดไว้ที่ อ่างทรงกลม 3 โซน ยกเว้นโซนที่มีแท่นใต้น้ำอยู่ การวัดความสามารถในการเรียนรู้และความจำ โดยการจับเวลาที่หนู หาแท่นใต้น้ำเจอ หลังจากนั้นวันสุดท้ายของการทดสอบจะนำเอาแท่นใต้น้ำออก (Retention test) เพื่อทดสอบการเรียกคืนความจำเก่ากลับคืน (Recognition) จับเวลาที่หนูว่ายอยู่ในโซนที่มีแท่นใต้น้ำอยู่ (Morris, 1984; Charles & Michael, 2006)



ภาพที่ 10 การทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับทิศทางและสถานที่ (Morris Water Maze)

### บทที่ 3 การดำเนินการวิจัย

#### การเตรียมตัวอย่าง

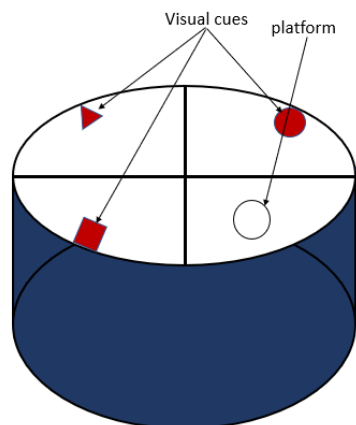
ที่ได้รับหนูแรทเพศเมียสายพันธุ์ Sprague dawley อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักตัวประมาณ 200-300 กรัม จำนวน 20 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ โดยนำมาพักพัก และปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่เป็นเวลา 7 วัน หนูแรททุกตัวถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีการควบคุมการปิดเปิดแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ภายใต้อุณหภูมิห้อง 25 °C หนูแรททุกตัวจะได้รับอาหารเม็ด จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ การเปลี่ยนวัสดุรองนอน เปลี่ยนใหม่ทุก 2 วัน หรือเมื่อตรวจสอบพบว่า วัสดุรองนอนมีความชื้น หรือ สกปรก โดยวัสดุรองนอนที่ใช้ คือ ขี้เลื่อยอบแห้งปราศจากเชื้อ

การแบ่งกลุ่มหนูแรทโดยการสุ่มอย่างง่าย (Simple random assignment) เข้ากลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธีจับฉลากแบบไม่คืนที่ จำนวน 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว แต่ละกลุ่มถูกไว้ในกรงพลาสติก กรงละ 2 ตัว 2 กรง และ 1 ตัว 1 กรงดังนี้

1. กลุ่ม 1 ควบคุม (Control group) อายุ 2 เดือน
2. กลุ่ม 2 อายุ 5 เดือน
3. กลุ่ม 3 อายุ 10 เดือน
4. กลุ่ม 4 อายุ 19 เดือน

#### การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท

เครื่องมือทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท ด้านการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Morris water maze (MWM) เป็นการทดสอบการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับ ทิศทาง และสถานที่ (Spatial memory) โดยการว่ายน้ำแท่นไดน้ำในอ่างทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 150 cm ความสูงอ่าง 60 เซนติเมตร ความลึกของน้ำ 45 เซนติเมตร แบ่งอ่างทรงกลมเป็น 4 โซนและมีสัญลักษณ์ (Visual cue) ที่ขอบอ่างแตกต่างกัน 3 จุด ยกเว้น จุดที่มีแท่นไดน้ำ (Platform) แท่นไดน้ำมีความสูง 44 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแท่น 10 เซนติเมตร น้ำมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง บนผิวหน้ามีผงแป้งที่ไม่เป็นพิษ (Nontoxic powder) สีขาวโรยบนผิวน้ำเพื่อปิดแท่นไดน้ำระหว่างการทดลอง โดยวิธีการทดสอบการเรียนรู้และความจำแบบมีทิศทางเรียก Escape latency โดยการปล่อยหนู บริเวณที่มีสัญลักษณ์ใดก็ได้ จับเวลาที่หนูหาแท่นไดน้ำเจอในเวลา 60 วินาที ถ้าหนูหาแท่นไดน้ำไม่เจอให้เอาหนูไว้ที่แท่นไดน้ำเป็นเวลา 10 วินาที ในช่วงฝึกการทดสอบ การเรียนรู้และความจำแบบการเรียกคืนความจำเก่า ก่อนการทดสอบให้นำแท่นไดน้ำออก แล้วปล่อยหนูบริเวณสัญลักษณ์ใดก็ได้จับเวลาที่หนูว่ายบริเวณที่เคยมีแท่นไดน้ำ จับเวลารวม 60 วินาที (Dinesh & Varun, 2012, pp. 3-4)



### Escape latency

1. เริ่มปล่อยหนูตรงบริเวณที่มี Visual cues ใดก็ได้
2. เริ่มจับเวลาตั้งแต่ปล่อยหนูจนหา Platform เจอหรือครบกำหนด 60 วินาที

### Retention Time

1. เอา Platform ออก
2. ปล่อยหนูตรงบริเวณที่มี Visual cues ใดก็ได้ จับเวลา 60 วินาที
3. นับเวลาที่หนูว่ายบริเวณที่เคยมี Platform

**ภาพที่ 11** อุปกรณ์ทดสอบการเรียนรู้และความจำ เกี่ยวกับทิศทางและสถานที่

### การเก็บสมองส่วน Hippocampus และ cerebral cortex

เมื่อทำการทดลองพฤติกรรมทางระบบประสาทเรียบร้อยแล้ว ทำการการุณฆาตหนูแรทด้วย CO<sub>2</sub> จนหนูเข้าสู่ระยะที่ 3 ของการสลบ จากนั้นทำการเก็บเลือดที่หัวใจ ตรงหลอดเลือดดำ 5 ml (นำส่งตรวจปริมาณระดับเอสโตรเจนในเลือดโดย บริษัท กรุงเทพ อาร์ไอเอ แล็บ จำกัด) แล้วทำการเปิดกะโหลกด้านหลัง แล้วคีบเอาก้อนสมองออกมาจุ่มล้างใน Normal saline และ นำสมองส่วน Hippocampus ใส่ในหลอดไมโครเซนติพิวก์ 1 ml แช่ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### Protein extraction

การสกัดโปรตีนจากสมองจะต้องควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 4 °C ตลอดการทดลอง การสกัดโปรตีนเริ่มต้นด้วยการผสม Protease inhibitor cocktail กับ RIPA buffer ในอัตราส่วน 1:100 แล้วใส่ลงใน Microcentrifuge tube ที่บรรจุชิ้นสมอง จากนั้นนำไปผ่านกระบวนการ ในเชิงกลโดยใช้ Homogenizer ที่ความแรงระดับ 2 ใช้เวลาประมาณ 1 นาที จากนั้นนำมาผ่าน Sonicator ที่ความแรง 100 % Amplitude ประมาณ 1 นาที จนได้สารที่มีความเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นนำไป Centrifuge ที่ 12,000 rpm อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำการดูดเก็บ Supernatant ซึ่งเป็นส่วนของโปรตีนที่ต้องการใส่ใน Micro centrifuge tube เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อทำการทดลองต่อไป

### การวัดปริมาณโปรตีนด้วย Bradford protein assay

Bradford protein assay สามารถวัดปริมาณของโปรตีนได้โดยอาศัยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่เกิดขึ้นเมื่อสี Coomassie G-250 dye ซึ่งมีสีน้ำตาลแดง มีค่าดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 465 นาโนเมตร เกิดปฏิกิริยาเข้าจับกับโปรตีนแล้วเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ซึ่งมีค่าดูดแสงสูงสุดที่ 610 นาโนเมตร โดยความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดในการวัดค่าดูดกลืนแสงอยู่ที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงแล้วนำมาสร้างกราฟเส้นตรงจะได้กราฟมาตรฐาน โดยมีขั้นตอนการปฏิบัติดังนี้ ผสม Bradford reagent กับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ต่อ 1 Cuvette จากนั้น เติมน้ำละลาย Bovine serum albumin ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร, 62.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นคงที่ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นใช้ Bradford reagent แทนโปรตีน BSA บ่มในที่มืดเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลา ผสมสารละลายใน Cuvette ให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectrophotometer เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงแล้วนำมาสร้างกราฟเส้นตรงจะได้กราฟมาตรฐาน เมื่อได้กราฟ

มาตรฐานแล้วจึงทำการวัดค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนที่ต้องการ โดยใช้ปริมาตรสารละลายโปรตีนเป็น 5 ไมโครลิตร เช่นเดียวกับสารละลาย BSA เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงแล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน จะได้ความเข้มข้นที่แท้จริงของสารละลายโปรตีนที่ต้องการ

### การแยกโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า

#### โดยวิธี Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

การแยกด้วยวิธี SDS-PAGE จะเป็นการผลักโปรตีนให้เคลื่อนที่ไปตามความต่างศักย์ไฟฟ้าจากขั้วบวกไปขั้วลบผ่านเจลซึ่งมีรูพูนคล้ายฟองน้ำ โดยโปรตีนขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปตามรูพูนได้ง่ายกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ โดยขนาดของรูพูนสามารถปรับได้ตามความเข้มข้นของ Acrylamide ความเข้มข้นของ Acrylamide เพิ่มขึ้น ขนาดของรูพูนจะเล็กลง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ ขั้นตอนการแยกด้วยวิธี SDS-PAGE มีดังนี้

#### การเตรียมโปรตีนที่ใช้ในการแยก SDS-PAGE

1. ผสมโปรตีนใน RIPA buffer โดยใช้ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อเวลล์ ในปริมาตร 32 ไมโครลิตร ร่วมกับ 6x loading dye 8 ไมโครลิตร จะได้ปริมาตรรวมเป็น 40 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรที่ต้องการไหลใน 1 well
2. หลังจากผสมโปรตีนเข้ากับสารอื่น ๆ ในอัตราส่วนที่คำนวณได้แล้ว นำโปรตีนไปต้มภายใต้อุณหภูมิ 95 °c เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ Denature โปรตีน
3. จากนั้นไหลลงใน well ของ 10 % Acrylamide gel แล้วเริ่มระบบการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า โดยคงที่ค่าความต่างศักย์เป็น 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที
4. เมื่อครบเวลาให้ล้างเจลด้วย 1x transfer buffer เขย่าเบา ๆ ก่อนนำเจลไปประกบลงแผ่น Nitrocellulose ต่อไป

#### วิธีการย้ายโปรตีนลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane

แผ่นเจลที่ได้จากเทคนิค SDS-PAGE และยังไม่ได้อ้อมสี Coomassie blue แล้วนำมาย้ายโปรตีนลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane ด้วยเทคนิค Western blotting เพื่อตรวจหาโปรตีนที่สนใจ การย้ายโปรตีนลงบนแผ่น Nitrocellulose membrane อาศัยหลักการ SDS ซึ่งเป็น Anionic detergent ที่เคลือบอยู่บนโปรตีน เมื่อโปรตีนเป็นประจุลบทั้งหมด ทำให้ปัจจัยด้านความแตกต่างทางด้านประจุหมดไป ดังนั้นโปรตีนจะเคลื่อนที่ในสนามไฟฟ้าตามน้ำหนักโมเลกุลจากแผ่นเจลที่เป็นขั้วลบ ไปยังแผ่น Nitrocellulose membrane ที่เป็นขั้วบวกเท่านั้น เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำแผ่น Nitrocellulose membrane มาอ้อมด้วย 0.1% Ponceau S เพื่อติดตามผลการย้ายโปรตีน หลังจากได้ผลแล้ว ให้ล้าง 0.1% Ponceau S ด้วย TBST (Tris-buffer saline-tween) 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หรือจนสีอ้อมจะหายไป เพื่อจะได้นำ Nitrocellulose membrane ไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

#### วิธีการอ้อมโปรตีนบนแผ่น Nitrocellulose membrane ลงแผ่นฟิล์ม

การอ้อม Protein ที่อยู่บนแผ่น Nitrocellulose membrane อาศัยปฏิกิริยาที่จำเพาะของ Antibody ที่จับกับ Antigen และ นำสัญญาณนั้นมาขยายจนสามารถตรวจวัดได้วิธีดังกล่าวสามารถปฏิบัติได้ดังต่อไปนี้

1. ทำการ Block protein โดยการจับกันระหว่าง Antibody กับ Non-specific protein บนแผ่น Nitrocellulose membrane โดยใช้ 5% Skim milk ใน TBST 24 ชั่วโมง เนื่องจากเราต้องการที่จะไม่ให้ Antibody ไปจับกับ Nitrocellulose membrane แต่ต้องการให้ไปจับอย่างจำเพาะกับ Antigen บน Nitrocellulose membrane
2. เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้นำมาล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที



3. จากนั้นเติม 1:1000 ไมโครลิตร Rat monoclonal antibody to StAR หรือ Rat monoclonal-antibody to Arc หรือ Rat monoclonal-antibody to estrogen receptor beta หรือ Rabbit pAb ต่อ PSD-95 หรือ Mouse monoclonal-antibody anti-amyloid beta A4 protein ซึ่งเป็น Primary antibody ที่เจือจางใน TBST แล้วเก็บภายใต้อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4. เมื่อครบเวลาให้ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

5. เติม 1:5000  $\mu$ l pAb to RAT, Goat pAb to Ms IgG (HRP) หรือ Goat pAb to rabbit IgG(HRP) ซึ่งเป็น Secondary antibody ที่ถูกเจือจางด้วย TBST จากนั้นเขย่าเบา ๆ บน Shaker และนำไปไว้ภายใต้อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

6. ขั้นตอนการย้ายจาก Nitrocellulose membrane ไปที่แผ่นฟิล์ม นำ Nitrocellulose membrane จากขั้นตอนที่ 5 ไปไว้ในห้องมืด จากนั้นดูด Luminata TM classico western HRP substrate ใส่บนแผ่น Nitrocellulose membrane แล้วปิดด้วยแผ่นฟิล์มใส (x-ray film) เป็นเวลา 5 นาที (โดยพิจารณาจากความเข้มของการเรืองแสง) เมื่อครบเวลานำไปจุ่มใน Developer น้ำสะอาด และหยุดปฏิกิริยาฟิล์มด้วย Fixer ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นฟิล์มใสไปตากให้แห้ง หลังจากขั้นตอนการประกบแผ่นฟิล์มแล้ว หากต้องการเปลี่ยน Primary antibody ให้เป็น Mouse monoclonal-antibody ต่อ Actin สามารถทำได้ โดยนำ Nitrocellulose membrane ที่ผ่าน การประกบของแผ่นฟิล์มแล้วนำมา Incubate กับ Stripping buffer และปรับอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 50-60 °C จากนั้น Incubate เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงเท Stripping ออกให้เหลือเพียงแค่ Nitrocellulose membrane ล้างด้วย TBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นนำไปทำซ้ำในขั้นตอน Block non-specific protein ด้วย 5% Skim milk และสุดท้ายนำไปวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Image J

### การวัดปริมาณเอสโตรเจนในสมองส่วน Hippocampus

#### ด้วย Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

การตรวจหาปริมาณ เอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ด้วยวิธี Direct ELISA เริ่มจากการนำ เอสโตรเจนในความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมแถวแรกเป็น Control แถวที่ 2 ใส่ตัวอย่างบวกเอสโตรเจนความเข้มข้น 25 ไมโครลิตร หลังจากนั้นใส่ Conjugate บ่มไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 °C หลังจากนั้นล้าง และใส่ Substrate และบ่ม 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20-25 °C หลังจากนั้น Termination และนำไปวัดหาปริมาณเอสโตรเจนที่ตัวอย่างที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Spectrophotometer

#### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำฟิล์มที่ฝั่งไว้จนแห้ง ทำการ Scan ฟิล์มที่ได้ แล้วนำไปวิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนโดยใช้โปรแกรม ImageJ ข้อมูลทั้งหมดที่ได้จะถูกนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้สถิติทดสอบ ด้วย One way analysis of variance (ANOVA) โดยการเปรียบเทียบพหุคูณ (Multiple comparisons) จะใช้ Least-significant different (LSD) ซึ่งความแตกต่างทางสถิติของการทดสอบจะต้องมีค่า  $p < 0.05$  โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics vision 23

#### กระบวนการจัดการ เกี่ยวกับซากสัตว์

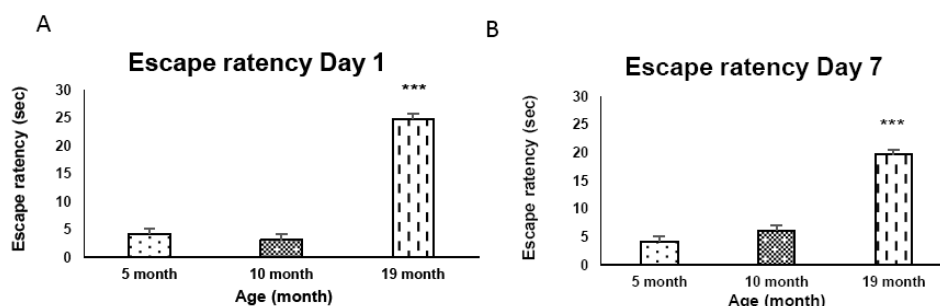
หนูแรททุกตัวที่ทำการการุณยฆาต (Euthanasia) พร้อมทั้งเก็บสมองไปทำการวิจัยแล้ว ซากหนูแรททุกตัวจะถูกแช่แข็งเพื่อรอส่งไปทำการเผาที่ สำนักงานสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### ผลของอายุต่อพฤติกรรมความจำและการเรียนรู้ แบบมีทิศทาง (Spatial memory)

ในหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน

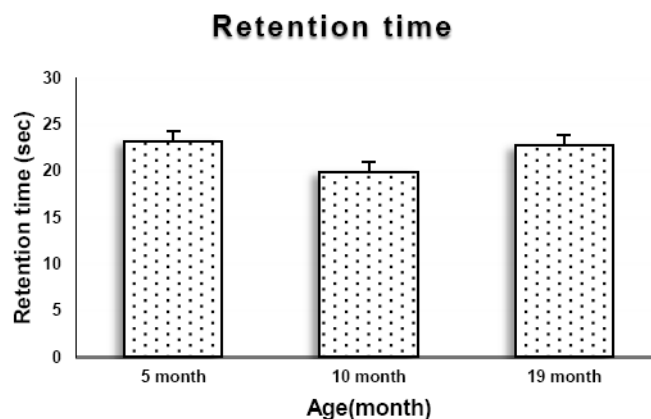
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความจำและการเรียนรู้ (Escape latency) โดยการวัดการใช้เวลา ในการหาตำแหน่งใต้น้ำ (Platform) ภายในเวลา 60 วินาที บันทึกผลการทดลองในวันที่ 1 และวันที่ 7 ของการทดสอบดังแสดงในภาพที่ 18A และ 18B ตามลำดับ พบว่า หนูแรทอายุ 19 เดือน ใช้เวลา ในการหาตำแหน่งใต้น้ำนานที่สุด (ทำเวลาเฉลี่ย 24.83 วินาที และ 19.67 วินาที) ทั้งวันที่ 1 และวันที่ 7 ของการทดสอบ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $***p < 0.000$  และ  $***p < 0.000$  เมื่อเปรียบเทียบกับ หนูแรทที่มีอายุ 5 เดือน (ทำเวลาเฉลี่ย 4.25 วินาที และ 4.17 วินาที) แสดงให้เห็นว่าหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีการสูญเสียความจำและการเรียนรู้แบบมีทิศทาง (Spatial memory) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่ามีผลมาจากการที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลงเมื่อเข้าสู่ภาวะชรา ดังภาพที่ 18



ภาพที่ 12 การเปรียบเทียบการเรียนรู้และความจำ (Escape latency) ในวันที่ 1 (A) และวันที่ 7 (B) ด้วย MWM ของหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน 10 เดือน และ 5 เดือน  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลอง 5 เดือน

### ผลของอายุต่อพฤติกรรมการเรียกคืนความจำ ในหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน

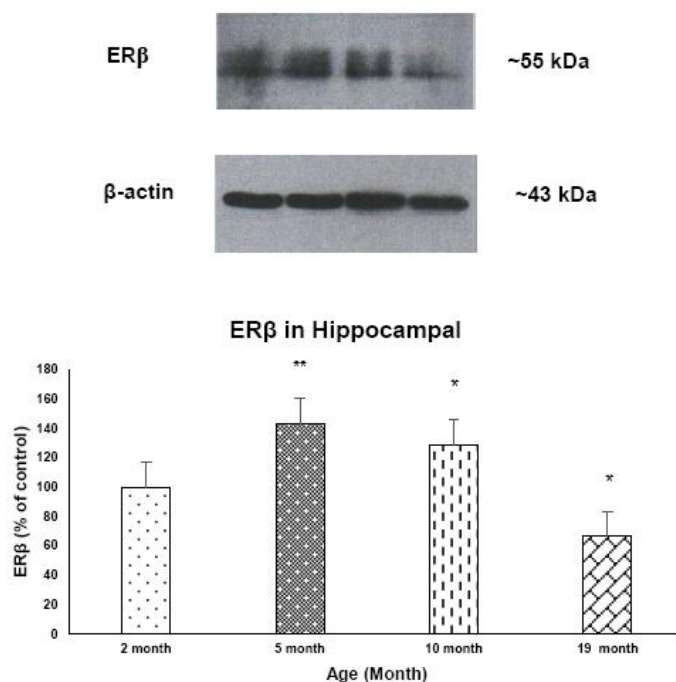
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษากระบวนการเรียกคืนความจำเก่า (Retention time) โดยการนำแท่งใต้น้ำออกในวันที่ 8 ของการทดสอบ และจับเวลาที่หนูแรทเพศเมียว่ายน้ำใน Quadrant ที่เคยมีแท่งใต้น้ำ ภายในเวลา 60 วินาที ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า หนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน 19 เดือน ใช้เวลาวว่ายน้ำอยู่ใน Quadrant ที่เคยมีแท่งใต้น้ำไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังภาพที่ 19 แสดงให้เห็นว่า ในภาวะชราไม่มีผลต่อ Retention time ของหนูทดลอง



**ภาพที่ 13** การเปรียบเทียบการเรียกคืนความจำเก่า (Retention time) ของหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอายุ 5 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

**ผลการศึกษาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดบีต้า (ER $\beta$ ) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน**

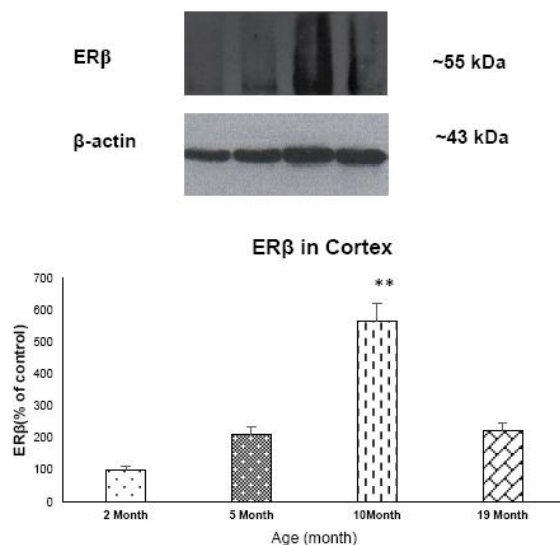
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของระดับการแสดงออกของ ER $\beta$  ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ ER $\beta$  ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \*\* $p < 0.005$  และ \* $p < 0.034$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน แสดงให้เห็นว่ามีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ในทางตรงกันข้ามมีการแสดงออกของ ER $\beta$  ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \* $p < 0.018$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน แสดงให้เห็นว่า หนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสน้อยลงเมื่อหนูแรทเพศเข้าสู่วัยชรา ดังภาพที่ 20



ภาพที่ 14 การเปรียบเทียบการแสดงออก ERβ ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

#### ผลการศึกษาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดบีต้า (ERβ) ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ หนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน

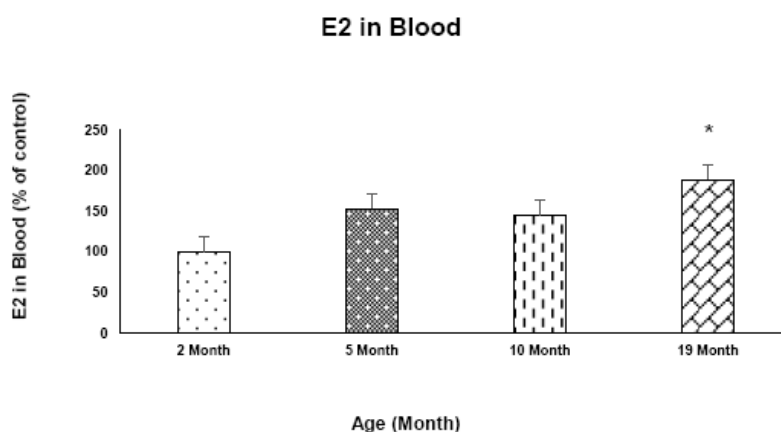
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของระดับการแสดงออกของ ERβ ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ ERβ ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \*\* $p < 0.007$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน แสดงให้เห็นว่ามีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนที่สมองส่วนเพิ่มขึ้นเมื่ออายุเพิ่มขึ้น ในหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ เมื่อเปรียบ เทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังภาพที่ 21



ภาพที่ 15 การเปรียบเทียบการแสดงออก ERβ ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

ผลการศึกษาระดับปริมาณเอสโตรเจนในเลือด ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน

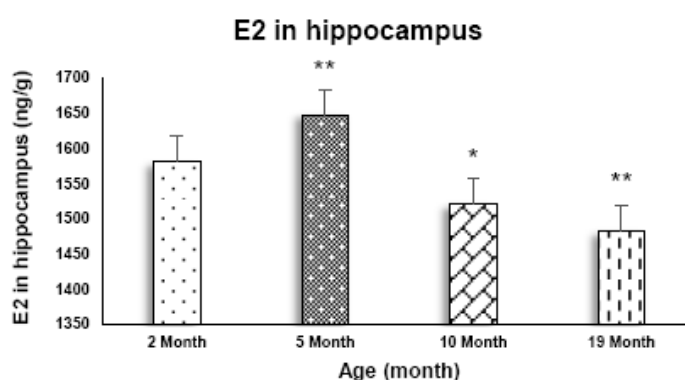
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \* $p < 0.044$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังภาพที่ 22



ภาพที่ 16 การเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือด ของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### ผลการศึกษาระดับปริมาณเอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน

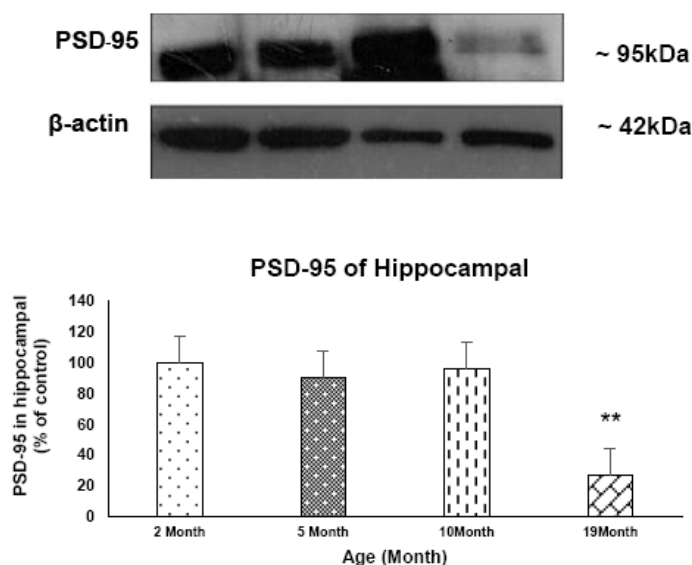
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $**p < 0.006$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน และมีการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $*p < 0.033$  และ  $**p < 0.002$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีการสังเคราะห์ฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงเมื่อหนูแรทเพศเมียเข้าสู่ระยะกลางจนถึงอายุที่เริ่มเข้าสู่วัยชรา ซึ่งตรงกันข้ามกับการสังเคราะห์เอสโตรเจนที่ต่อมเพศ ดังภาพที่ 23



ภาพที่ 17 การเปรียบเทียบระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมอง ของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$

### ผลการศึกษาอายุต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำ (Synaptic plasticity)

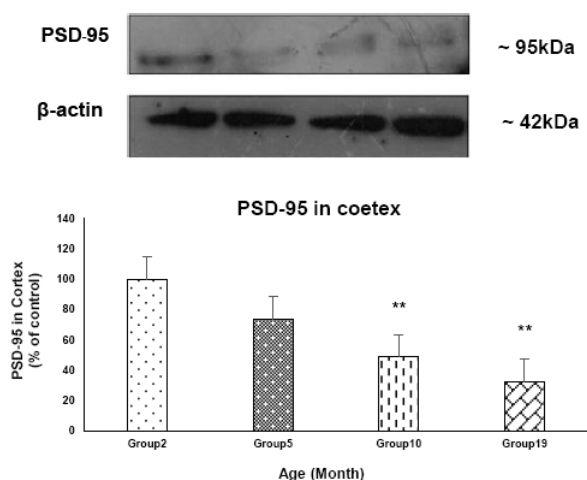
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการลดลงของปริมาณ PSD-95 ในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $**p < 0.002$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 แสดงให้เห็นหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน มีกระบวนการสร้างความจำที่ลดลง เนื่องจากพบการแสดงออกของโปรตีน PSD-95 ที่เป็นโปรตีนโครงสร้างที่สำคัญในกระบวนการสร้างความจำ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา การแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิด เบต้า และปริมาณเอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ดังภาพ



ภาพที่ 18 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ของหนูแรทเพศ อายุ 5 เดือน 10 เดือนและ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

ผลการศึกษาอายุต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ PSD-95 ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำ (synaptic plasticity)

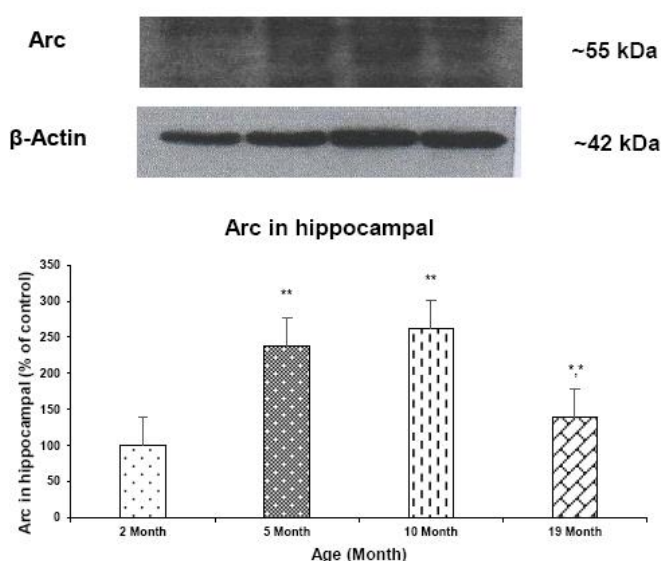
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการลดลงของปริมาณ PSD-95 ในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \*\* $p < 0.008$  และ \*\* $p < 0.002$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังภาพที่ 25



ภาพที่ 19 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ PSD95 ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรท เพศอายุ 5 เดือน 10 เดือนและ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### ผลการศึกษาอายุต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำ (Synaptic plasticity)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Arc ในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $**p < 0.006$  และ  $**p < 0.003$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน และมีการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 19 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $*p < 0.029$  และ  $*p < 0.011$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน ดังภาพที่ 26

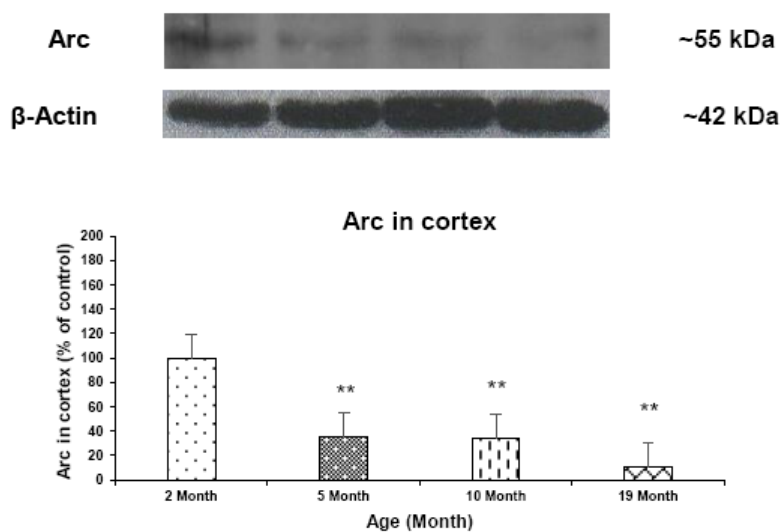


ภาพที่ 20 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรท เพศอายุ 5 เดือน 10 เดือนและ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$

### ผลการศึกษาอายุต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Arc ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำ (Synaptic plasticity)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการลดลงของปริมาณ Arc ในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $*p < 0.01$ ,  $**p < 0.009$  และ  $**p < 0.002$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังภาพที่ 27

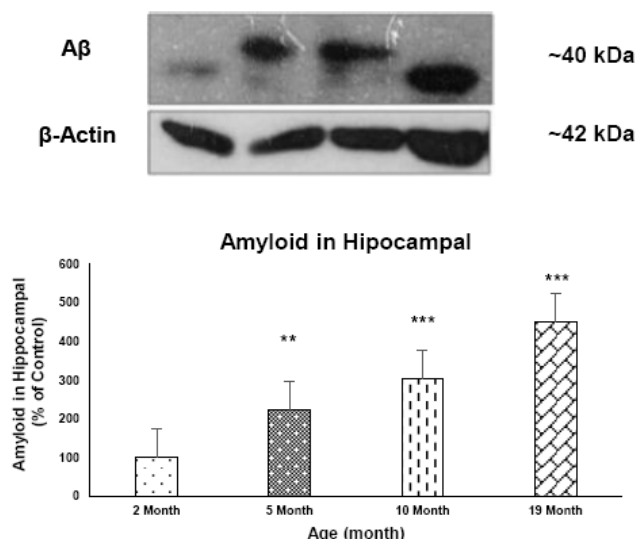




**ภาพที่ 21** การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Arc ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศอายุ 5 เดือน 10 เดือนและ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

### ผลการศึกษาอายุต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ อะมัยลอยด์ เบต้า (Amyloid $\beta$ ) ในสมองส่วน ฮิปโปแคมปัสซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้บ่งชี้ภาวะสมองเสื่อม (Dementia)

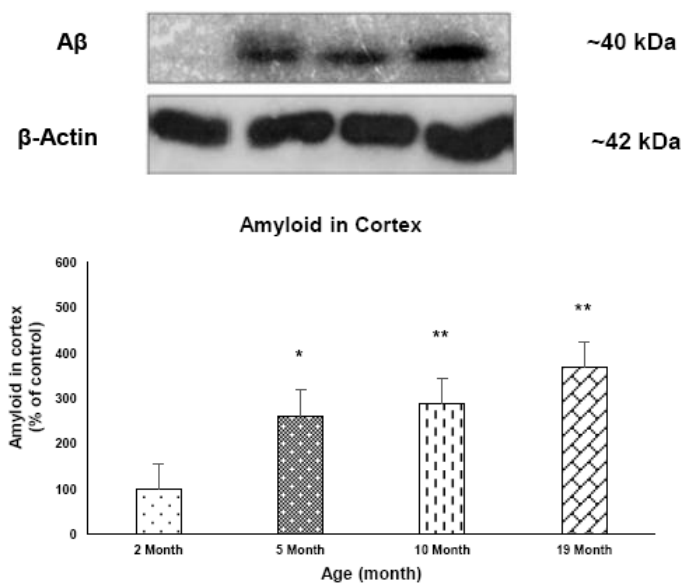
ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาผลของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ผลการศึกษาพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \*\* $p < 0.002$ , \*\*\* $p < 0.000$  และ \*\*\* $p < 0.000$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน แสดงให้เห็นว่า ปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า เพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่มขึ้น และหนูแรทเพศเมียที่มีอายุ 19 เดือนมีปริมาณอะมัยลอยด์เบต้า มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาด้านพฤติกรรม การเรียนรู้และความจำที่พบว่า หนูอายุ 19 เดือนมีความบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำด้านทิศทาง และสอดคล้องกับปริมาณ เอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ดังภาพที่ 28



ภาพที่ 22 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Amyloid  $\beta$  ในฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมีย อายุ 5 เดือน 10 เดือนและ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมีย อายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

ผลการศึกษายุ่ต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ อะมัยลอยด์ เบต้า (Amyloid  $\beta$ ) ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้บ่งชี้ภาวะสมองเสื่อม (Dementia)

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาค่าผลของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ผลการศึกษา พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองของหนูแรทเพศเมียเมื่ออายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ \* $p < 0.019$ , \*\* $p < 0.009$  และ \*\*\* $p < 0.001$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ดังภาพที่ 29



ภาพที่ 23 การเปรียบเทียบการแสดงออกของปริมาณ Amyloid  $\beta$  ใน Cortex ของหนูแรทเพศเมีย อายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

## บทที่ 5

### อภิปราย สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาบทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูแรทเพศเมีย มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาผลของอายุต่อความจำเสื่อมในหนูแรทเพศเมีย 2) เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์ เอสโตรเจนในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย ( $ER\beta$ ,  $E_2$  level) 3) เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงของ Synaptic protein ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย (PSD-95, Arc) 4) เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการแสดงของ Amyloid- $\beta$  ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย

เพื่อศึกษาผลของอายุต่อความจำเสื่อมในหนูแรทเพศเมีย ด้วยอุปกรณ์ Morris Water Maze test โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง ช่วงแรกเป็นช่วงการเรียนรู้และความจำแบบมีทิศทาง Escape latency โดยมีสัญลักษณ์ เป็นตัวบอกทิศทาง ใช้เวลาในการหาแท่งได้น้ำเป็นเวลา 60 วินาที ผลการศึกษา จำแนกหนูแรทเพศเมียตามอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า หนูแรทอายุ 19 เดือน ใช้เวลาในการหาแท่งได้น้ำนานที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 5 เดือน และ 10 เดือน ทั้งในวันที่ 1 และ วันที่ 7 ของการทดสอบ แสดงให้เห็นว่าหนูแรท 19 เดือน มีความบกพร่องของความจำและการเรียนรู้แบบมีทิศทาง (spatial memory) ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย ช่วงที่ 2 เป็นการทดสอบการเรียกคืนความจำเก่า Retention time โดยการนำแท่งได้น้ำออก และทำการวัดเวลาที่ใช้ในการว่ายน้ำในตำแหน่งที่เคยมีแท่งได้น้ำ อยู่ภายในเวลา 60 วินาที พบว่า หนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน อายุ 10 เดือน และ 19 เดือน มีการเรียกคืนความจำเก่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย ( $ER\beta$ ,  $E_2$  level) 1) การศึกษาผลของระดับการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดปีต้าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของตัวรับเอสโตรเจนชนิดปีต้าของ หนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน และมีการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิด ปีต้าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสลดลงในหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน และ 10 เดือน ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย ส่วนการศึกษาการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิดปีต้า ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ พบการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน และ หนูแรทอายุ 5 เดือน และ 19 เดือน ไม่มีการแสดงออกที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 2) การศึกษาผลของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน ในเลือดของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 3) ผลการศึกษาการแสดงออกของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน และมีการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการเปลี่ยนแปลงของ synaptic protein ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทเพศเมีย (PSD-95, Arc) 1) การศึกษาการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน พบว่า มีการลดลงของปริมาณ PSD-95 ในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย และการศึกษาการแสดงออกของ

ระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ PSD-95 ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ พบว่า มีการลดลงของปริมาณ PSD-95 ในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $**p < 0.008$  และ  $**p < 0.002$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 2) การศึกษาการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ผลการศึกษาพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ Arc ในสมองของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 2 เดือน และมีการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน และ 10 เดือน ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย และมีการแสดงออกของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณ Arc ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ของหนูแรทเพศเมีย อายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทอายุ 2 เดือน เพื่อศึกษาผลของอายุต่อการแสดงของ Amyloid- $\beta$  ในสมองส่วน hippocampus ของ หนูแรทเพศเมีย 1) การศึกษาผลของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ผลการศึกษา พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองของหนูแรทเพศเมียอายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน ซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย การศึกษาผลของระดับการเปลี่ยนแปลงปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองส่วนคอร์เทกซ์ ของหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ผลการศึกษา พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณอะมัยลอยด์ เบต้า ในสมองของหนูแรทเพศเมียเมื่ออายุ 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทเพศเมียที่อายุ 2 เดือนซึ่งตรงกับสมมติฐานงานวิจัย

### อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาบทบาทของเอสโตรเจนที่สังเคราะห์จากสมองส่วน ฮิปโปแคมปัสต่อการเรียนรู้และความจำของหนูแรทเพศเมีย โดยใช้อายุเป็นตัวแปรสำคัญ ในการศึกษา เนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนจะลดลงเฉียบพลันเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเอสโตรเจน ที่สังเคราะห์จากแหล่งใดเป็นสำคัญที่มีผลกระทบต่อกระบวนการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง งานวิจัยของ Chamniansawat (2013) ได้ศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด H19-7 hippocampus neuron พบว่า ถ้าหากไม่มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนในฮิปโปแคมปัส เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัส จะไม่ตอบสนอง ถึงแม้จะมีการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากต่อมเพศมากเพียงใดก็ตาม อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง ทั้งในเชิงพฤติกรรมและระดับโมเลกุล ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษา หนูแรทเพศเมียที่ใช้อายุ 2 เดือน 5 เดือน 10 เดือน และ 19 เดือน ซึ่งอ้างอิงอายุของหนูแรท เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ในสัปดาห์ที่ 6 หลังคลอด ช่วงที่เป็นระยะสัตว์สังคมเมื่ออายุ 5-6 เดือน และเข้าสู่ระยะหมดประจำเดือนในอายุ 15-20 เดือน (Durbin et al., 1996; Sengupta, 2013) ซึ่งระยะเป็นสัตว์ของหนูแรทในหนูกินเวลาประมาณ 5 วันและวงจรเป็นสัดเกิดขึ้นตลอดปี (Polyestrous) วงจรเป็นสัดแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ โพรเอสโตรัส (Proestrous) เอสโตรัส (Estrous) เมทเอสโตรัส (Metestrous) และ ไดเอสโตรัส (Diestrous) (CH, DL & JR, 2005) ผู้วิจัยใช้ช่วงอายุดังกล่าวและระยะเป็นสัตว์ที่ระยะ เอสโตรัส (Estrous) ในการศึกษาผลของอายุต่อการเรียนรู้และความจำทั้งในเชิงพฤติกรรมและ ในระดับโมเลกุล ดังต่อไปนี้ ผลของอายุต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำของหนูแรทเพศเมีย การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาทมีหลายวิธีแต่ละวิธีมีความจำเพาะต่อ ลักษณะของกระบวนการจำที่แตกต่างกัน อาทิเช่น Passive Avoidance test, Morris

Water Maze test, Radial Arm Maze test, Spontaneous Alternation test และ Novel Object Recognition test เป็นต้น ในการวิจัยนี้ใช้วิธีการทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาทด้านการเรียนรู้และความจำ Morris Water Maze test (MWM) เป็นอุปกรณ์ทดสอบความจำเกี่ยวกับทิศทาง และ สถานที่ (Spatial memory) โดยการว่ายน้ำ ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาทดสอบความจำระยะยาว ถูกคิดค้นโดย Richard Morris ในปี ค.ศ. 1984 ผลการศึกษาพบว่า มีการบกพร่องของสมองฮิปโปแคมปัสที่มีผลโดยตรงต่อการเรียนรู้และความจำ เนื่องจากพบว่า หนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน ใช้เวลาในการหาแท่งได้น้ำนานที่สุด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 5 เดือน ทั้งในวันที่ 1 และวันที่ 7 ของการทดสอบแสดงให้เห็นว่าหนูแรท 19 เดือน มีการสูญเสียความจำและการเรียนรู้แบบมีทิศทาง (Spatial memory) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Fletcher et al. (2014) พบว่า หนูแรทที่มีอายุ 24 เดือน ใช้เวลาในการหาแท่งได้น้ำนานกว่าหนูแรทที่อายุ 6 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หรืออาจเป็นไปได้ว่ามีผลจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ฮิปโปแคมปัสลดลงอย่างเฉียบพลันเมื่อหนูแรทเพศเมียเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษา ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่า มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรทอายุ 19 เดือนที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 2 เดือน และ ระดับที่ลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนยังสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนชนิด ER $\beta$  ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรทอายุ 19 เดือน ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 2 เดือน และสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีน PSD-95 ในหนูแรทอายุ 19 เดือน ในฮิปโปแคมปัสและคอร์เทกซ์ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 2 เดือน และการแสดงออกของ Arc ในฮิปโปแคมปัส พบว่า มีการแสดงออกที่ลดลงในหนูแรทอายุ 19 เดือนอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูอายุ 5 เดือน และ 10 เดือน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Chamniansawat and Chongthammakun (2009) พบว่า Arc เป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นเมื่อมีการเกิด Synaptic plasticity และการเพิ่มความจำ โดยในเซลล์เพาะเลี้ยงฮิปโปแคมปัสพบการแสดงออกของ Arc, PSD-95, SYP และ ER $\beta$  ที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยเมื่อเอสโตรเจนในฮิปโปแคมปัสน้อยในหนูอายุ 19 เดือน ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ Arc และ PSD-95 ลดลงด้วยถึงแม้จากการได้รับการฝึกพฤติกรรมทางระบบประสาท MWM แล้วก็ตาม ในทางตรงกันข้ามเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของ Arc ในหนูแรทอายุ 19 เดือน และหนูแรท 2 เดือน พบการแสดงออก Arc ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งยังน้อยกว่า หนูแรทเพศเมียที่อายุ 5 เดือน และ 10 เดือน เนื่องมาจากไม่ได้นำหนูแรทที่อายุ 2 เดือนไปทำ การทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท ซึ่งสอดคล้องกับงานของ Carter, Mifsud and Reul (2015) พบว่า หนูแรทที่ไม่ได้รับฝึก MWM ไม่มีความแตกต่างของการแสดงออก Arc เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และสอดคล้องกับ Fletcher et al. (2014) พบหนูแรท 6 เดือน และ 24 เดือน มีการแสดงออกของ Arc เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับการฝึกและทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท MWM ทั้งบริเวณ CA1 ในฮิปโปแคมปัส เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ Arc ในบริเวณ CA3 ไม่แตกต่างกันเมื่อได้รับการฝึกและทดสอบพฤติกรรมทางระบบประสาท MWM เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจากการบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ การแสดงออกของ ER $\beta$  การลดลงของเอสโตรเจนในฮิปโปแคมปัส การแสดงออกของ PSD-95 และ Arc ในหนูแรทเพศเมียอายุ 19 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของโปรตีน อะไมลอยด์ เบต้า ที่สมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแรทอายุ 19 เดือนมีเพิ่มมากขึ้นอย่างมีระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ ในทางตรงกันข้ามปริมาณเอสโตรเจนในเลือดที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากต่อมเพศมีระดับปริมาณที่สูงขึ้นในหนูแรทเพศเมียที่อายุ 19 เดือน

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทที่มีอายุ 2 เดือน ในพฤติกรรมความจำได้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาดังกล่าวสรุปได้ว่าระดับเอสโตรเจนในสมองที่ลดลงเป็นผลมาจาก การสังเคราะห์เอสโตรเจนที่ลดลงในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และการสังเคราะห์เอสโตรเจน ในฮิปโปแคมปัสที่ลดลงนั่นเอง ส่งผลต่อกระบวนการสร้างความจำ Synaptic plasticity ถึงแม้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในเลือดที่ถูกสังเคราะห์จากต่อมเพศจะมีปริมาณที่สูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่อกระบวนการสร้างความจำ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chamniansawat (2013) มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนจากต่อมเพศมากเพียงใดก็ตาม ถ้าหากไม่มีการสังเคราะห์เอสโตรเจนในสมอง ส่วนฮิปโปแคมปัส เซลล์ประสาทฮิปโปแคมปัสจะไม่ตอบสนอง

### ข้อเสนอแนะ

1. จากผลการวิจัยพฤติกรรมความจำและการเรียนรู้ ควรศึกษากลุ่มหนูแรทเพศเมีย 2 เดือน ที่ทำการทดสอบพฤติกรรมความจำและการเรียนรู้ และควรมีการเพิ่มอายุหนูแรทจาก 19 เดือน เป็นอายุที่เพิ่มขึ้น เพื่อยืนยันผลการทดลอง
2. ด้านการวิเคราะห์โมเลกุล ควรหาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เอสโตรเจน และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างความจำ เพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลการทดลอง

## บรรณานุกรม

- บุญเรือง ไตรเรืองวรวัฒน์. (2562). อธิปไตยกรมสุขภาพจิต/ กรมสุขภาพจิต เผยผู้สูงวัยไทย “สมองเสื่อม” 8 แสนกว่าคน. เข้าถึงได้จาก [www.bangkokbiznews.com/news/detail/805124](http://www.bangkokbiznews.com/news/detail/805124)
- ลลิตา พนาคร, สุธรรม นันทมงคลชัย, ศุภชัย ปิติกุลตั้ง, โชคชัย หมั่นแสงทรัพย์ และพิมพ์สุรางค์ เตชะบุญเสริมศักดิ์. (2558). ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อภาวะสมองเสื่อมในผู้สูงอายุหญิงจังหวัด ลำพูน. *วารสารสาธารณสุข, 45(2)*, 197-209.
- สมฤดี สายหยุดทอง. (2558). *ประสาทสรีรวิทยาพื้นฐาน*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.
- Akama, K. T., & McEwan, B. S. (2003). Estrogen stimulates postsynaptic density-95 rapid protein synthesis via the Akt/protein kinase B pathway. *Journal of Neuroscience, 8*, 2333- 2339.
- Anderson, R. G. (1998). The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem, 67*,199-225.
- Armstrong, R. A., Cairns, N. J., Myers, D., Smith, C. U., Lantos P. L., & Rossor M. N., (1996). A comparison of beta-amyloid deposition in the medial temporal lobe in sporadic Alzheimer's disease, Down's syndrome and normal elderly brains. *Neurodegeneration, 5(1)*, 35-41.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., & Hernandez, F. (2004). Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. *Physiol Rev, 84(2)*, 361-84.
- Barrette, K. E., Barman, S. M., Boitang, S., & Brooks, H. G. (2009). *Review of medical physiology*. New York: McGraw-Hill.
- Bauer, M., & Podesser, B. K., (2008). Sex-specific differences in ischemic heart failure: Role of estrogen. *Gend Med, 5(3)*, 239-243.
- Bonnie, R. F., Gordon, S. H., Jeffrey, M. L., Michela, G., Matthew, L. S., & Peter, R. R. (2014). A fine balance: Regulation of hippocampal Arc/Arg3.1 transcription, translation and degradation in a rat model of normal cognitive aging. *Neurobiol Learn Mem, 58-67*.
- Bramham, C. R., & Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: Transport, translation and function. *Nature Reviews Neuroscience, 8(10)*, 776-789.
- Burns, A., & Iliffe, S. (2009). Alzheimer's disease. *BMJ, 338*, 158.
- Carmeci, C., Thompson, D. A., Ring, H. Z., Francke, U., & Weigel, R. J. (1997). Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics, 45*, 607-617.
- Carol, L., Peebles, J., Yoo, M. T., Thwin, J. J., Palop, J. L. N., & Steven, F. (2010). Arc regulates spine morphology and maintains network stability in vivo. *PNAS, 107(42)*, 18173-18178.
- Caroline, C. S., & Lori, L. M. (2005). Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *The Journal of Neuroscience, 25*, 7780-7791.
- Chamniansawat, S. (2013). The role of hippocampal estrogen and gonadal estrogen on hippocampal neuronal functions. *Burapha Sci. J., 18(1)*, 234-239.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2009). Estrogen stimulates activity-regulated cytoskeleton associated protein (Arc) expression via the MAPK- and PI-3K-dependent pathways in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett, 452(2)*, 130-135.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2010). Genomic and non-genomic actions of



- estrogen on synaptic plasticity in SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 470(1), 49-54.
- Chamniansawat, S., & Chongthammakun, S. (2012). A priming role of local E2 on exogenous E2-mediated synaptic plasticity and neuroprotection. *Experimental and Molecular Medicine*, 44, 403-411.
- Charles, V. V., & Michael, T. W. (2006). Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *PMC*, 1(2), 848-858.
- Chindewa, R., Lapanantasin, S., Sanvarinda, Y., & Chongthammakun, S. (2008). Puerauamirifica, phytoestrogen- induce change in synaptophysin expression via estrogen receptor in rat hippocampal neuron. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 91, 208-214.
- Chowdhury, S., Shepherd, J. D., Okuno, H., Lyford, G., Petralia, R. S., Plath, N., Kuhl, D., Haganir, R. L., & Worley, P. F. (2006). Arc/ Arg3.1 interacts with the endocytic machinery to regulate AMPA receptor trafficking. *Neuron*, 52(3), 445-459.
- Christiane, O., Beate, R., Gilda, S, Iris, F., Mario, K., Dominic, B., Gernot, L., Benjamin, B., Katja, P., & Reinhard, N. (2008). G protein-coupled receptor 30 localizes to the endoplasmic reticulum and is not activated by estradiol. *Endocrinology*, 149(10), 4846-4856.
- Clark, B. J., Wells, J., King, S. R., & Stocco, D. M. (1994). The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells. Characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (StAR). *J Biol Chem*, 269(45), 28314-28322.
- Cooper, S. J. (2005). Donald O. Hebb's synapse and learning rule: A history and commentary. *Neurosci Biobehav Rev*, 28(8), 851-874.
- Del, M., Cárdenas-Aguayo, C., Silva-Lucero, C., Cortes-Ortiz, M., Jiménez-Ramos, B., Gómez-Virgilio, L., Ramírez-Rodríguez, G., Vera-Arroyo, E., Fiorentino-Pérez, R., García, U., Luna-Muñoz, J., & Meraz-Ríos, M. A. (2014). *Physiological role of amyloid beta in neural cells: The cellular trophic activity chapter 9*. Retrieved from [www.intechopen.com/books/neurochemistry/physiological-role-of-amyloid-beta-in-neural-cells-the-cellular-trophic-activity](http://www.intechopen.com/books/neurochemistry/physiological-role-of-amyloid-beta-in-neural-cells-the-cellular-trophic-activity)
- Desmond, N. L., & Levy, W. B. (1997). Ovarian steroidal control of connectivity in the female hippocampus: an overview of recent experimental findings and speculations on its functional consequences. *Hippocampus*, 7(2), 239-245.
- Dinesh, D., & Varun, K. (2012). Memory-Enhancing Activity of Palmatine in Mice Using Elevated Plus Maze and Morris Water Maze. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2, 7.
- Donai, H., Sugiura, H., Ara, D., Yoshimura, Y., Yamagata, K., & Yamauchi, T. (2003). Interaction of Arc with CaM kinase II and stimulation of neurite extension by Arc in neuroblastoma cells expressing CaM kinase II. *Neurosci Res*, 47(4), 399-408.
- Durbin, P. W., Williams, M. H., Jeung, N., & Arnold, J. S. (1966). Development of spontaneous mammary tumors over the life-span of the female Charles River (Sprague-Dawley) rat: The influence of ovariectomy, thyroidectomy, and adrenalectomy-ovariectomy. *Cancer Res*, 26(3), 400-411.
- Elias, P. (2011). Neuralized1 activates CPEB3: A function for nonproteolytic ubiquitin in

- synaptic plasticity and memory storage. *Cell*, *147*, 1369-1383.
- Enmark, E., & Gustafsson, J. A. (1998). Newly discovered estrogen receptor new therapeutic possibilities in postmenopausal symptoms, osteoporosis, cancer of the breast and prostate. *Lakartidningen*, *95*(17), 1945-1949.
- Fang, H., Tong, W. L., Shi, M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B. S., Xie, Q. S., Dial, L., Moland, C. L., & Sheehan, D. M. (2001). Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol*, *14* (3), 280-294.
- Fester, L., Prange-Kiel, J., Jarry, H., & Rune, G. M. (2011). Estrogen synthesis in the hippocampus. *Cell and Tissue Research*, *345*, 285-294.
- Fivush, R., Gray, J. T., & Fromhoff, F. A. (1987). Two-year-olds talk about the past. *Cognitive Development*, *2*, 393-409.
- Flom, R., Janis, R. B., Garcia, D. J., & Kirwan, C. B. (2014). The effects of exposure to dynamic expressions of affect on 5-month-olds' memory. *Infant Behav Dev*, *37*(4), 752-759.
- Fox, N. C., Warrington, E. K., Freeborough, P. A., Hartikainen, P. A., Kennedy, M. J., Stevens, M., & Rossor, M. N. (1996). Presymptomatic hippocampal atrophy in Alzheimer's disease a longitudinal MRI study. *Brain*, *119*(6), 2001-2007.
- Furukawa, A., Miyatake, A., Ohnishi, T., & Ichikawa, Y. (1998). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transcripts constitutively expressed in the adult rat central nervous system: Colocalization of StAR, cytochrome P-450SCC (CYP XIA1), and 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat brain. *J Neurochem*, *71*(6), 2231-2238.
- Glenner, G. G., & Wong, C. W. (1984). Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *120*(3), 885-900.
- Gotz, J., & Ittner, L. M. (2008). Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci*, *9*(7), 532-544.
- Gould, E., Woolley, C. S., Frankfurt, M., & McEwen, B. S. (1990). Gonadal steroids regulate dendritic spine density in hippocampal pyramidal cells in adulthood. *J Neurosci*, *10*, 1286-1291.
- Green, P. S., Bishop, J., & Simpkins, J. W. (1997). 17 alpha-estradiol exerts neuroprotective effects on SK-N-SH cells. *J Neurosci*, *17*(2), 511-515.
- Guzowski, J. F., Lyford, G. L., Stevenson, G. D., Houston, F. P., McGaugh, J. L., Worley, P. F., & Barnes, C. A. (2000). 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*, *20*(11), 3993-4001.
- Hooper, N. M. (2005). Roles of proteolysis and lipid rafts in the processing of the amyloid Precursor protein and prion protein. *Biochemical Society Transactions*, *33*(2), 335-338.
- Howe, M. L., & O'Sullivan, J. T. (1997). What children's memories tell us about recalling our childhoods: A review of storage and retrieval processes in the development of long-term retention. *Developmental Review*, *17*, 148-204.

- Hubscher, C. H., Brooks, D. L., & Johnson, J. R. (2005). A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotech Histochem*, *80*, 79-87.
- Isabelle, L. S., Ross, A. E., Ayodeji, A. A., & Jessica, L. T. (2008) Antibody Engineering for optimized immunotherapy in Alzheimer's Disease. *Front Neurosci*, *12*, 254.
- Jonides, J., Lewis, R. L., Nee, D. E., Lustig, C. A., Berman, M. G., & Moore, K. S. (2008). The mind and brain of short-term memory. *Annu Rev Psychol*, *59*, 193-224.
- Joshi, S., & Morley, J. E. (2006). Cognitive impairment. *Med Clin North Am*, *90*(5), 769-787.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., & Jessell, T. M. (2000). *Principle of neural science*. New York: McGraw-Hill.
- Keith, D., & Husseini, A. E. (2008). Excitation control: Balancing PSD-95 function at the synapse front mol. *Neurosci*, *1*, 4.
- King, W. J., & Greene, G. L. (1984). Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, *307*(5953), 745-747.
- Kronenberg, G. (2006). Physical exercise prevents age-related decline in precursor cell activity in the mouse dentate gyrus. *Neurobiology of Aging*, *27*, 05-13.
- Laflamme, N., Nappi, R. E., Drolet, G., Labrie, C., & Rivest, S. (1998). Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol*, *36*(3), 357-378.
- Lamprecht, R., & LeDoux, J. (2004). Structural plasticity and memory. *Nat Rev Neurosci*, *5*(1), 45-54.
- Lin, D., Gitelman, S. E., Saenger, P., & Miller, W. L. (1991). Normal genes for the cholesterol side chain cleavage enzyme, P450scc, in congenital lipoid adrenal hyperplasia. *J Clin Invest*, *88*(6), 1955-1962.
- Lin, D., Sugawara, T., Strauss, J. F., Clark, B. J., Stocco, D. M., Saenger, P., Rogol A., & Miller, W. L. (1995). Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. *Science*, *267*(5205), 1828-1831.
- Lindberg, M. K., Moverare, S., Skrtic, S., Gao, H., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J. A., & Ohlsson, C. (2003). Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol*, *17*(2), 203-208.
- Liu, F., Day, M., Muniz, L. C., Bitran, D., Arias, R., Revilla-Sanchez, R., Grauer, S., Zhang, G., Kelley, C., Pulito, V., Sung, A., Mervis, R. F., Navarra, R., Hirst, W. D., Reinhart, P. H., Marquis, K. L., Moss, S. J., Pangalos, M. N., & Brandon, N. J. (2008). Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci*, *11*(3), 334-343.
- Lyford, G. L., Yamagata, K., Kaufmann, W. E., Barnes, C. A., Sanders, L. K., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Lanahan, A. A., & Worley, P. F. (1995). Arc, a growth factor and activity-regulated gene, encodes a novel cytoskeleton-associated protein that is enriched in neuronal dendrites. *Neuron*, *14*(2), 433-445.
- Mandler, J. M., Fivush, R., & Reznick, J. S. (1987). The development of contextual categories. *Cognitive Development*, *2*, 339-354.

- McEwen, B. S., & Alves, S. E. (1999). Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr Rev*, *20*(3), 279-307.
- Morissette, M., Saux, M., Le D'Astous, M., Jourdain, S., Al Sweidi, S., Morin, N., Estrada-Camarena, E., Mendez, P., Garcia-Segura, L. M., & Di Paolo, T. (2008). Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *108*(3-5), 327-338.
- Morris, R. G. (1984). Development of a Water-Maze procedure for studying spatial learning in rat. *J. Neurosci Methods*, *11*(1), 47-80.
- Mukai, H., Tsurugizawa, T., Ogiue-Ikeda, M., Murakami, G., Hojo, Y., Ishii, H., Kimoto, T., & Kawato, S. (2006). Local neurosteroid production in the hippocampus: Influence on synaptic plasticity of memory. *Neuroendocrinology*, *84*(4), 255-263.
- Ohnishi, K. S. T. (2004). Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *61*(5), 511-524
- Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., & Lolait, S. J. (1996). Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun*, *228*, 285-292.
- Pappas, T. C., Gametchu, B., & Watson, C. S. (1995). Membrane estrogen receptor-enriched GH(3)/B6 cells have an enhanced non-genomic response to estrogen. *Endocrine*, *3*(10), 743-749.
- Patricia, T. (2018). Amyloid Hypothesis vs Tau Hypothesis. Retrieved from [www.stressmarq.com/amyloid-hypothesis-vs-tau-hypothesis/?v=5b79c40fa7c2](http://www.stressmarq.com/amyloid-hypothesis-vs-tau-hypothesis/?v=5b79c40fa7c2)
- Plath, N., Ohana, O., Dammermann, B., Errington, M. L., Schmitz, D., Gross, C., Mao, X., Engelsberg, A., Mahlke, C., Welzl, H., Kobalz, U., Stawrakakis, A., Fernandez, E., Waltereit, R., Bick-Sander, A., Therstappen, E., Cooke, S. F., Blanquet, V., Wurst, W., Salmen, B., Bosl, M. R., Lipp, H. P., Grant, S. G., Bliss, T. V., Wolfer, D. P., & Kuhl, D. (2006). Arc/Arg3.1 is essential for the consolidation of synaptic plasticity and memories. *Neuron*, *52*(3), 437-444.
- Priller, C., Bauer, T., Mitteregger, G., Krebs, B., Kretzschmar, H. A., & Herms, J. (2006). Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience*, *26*(27), 7212-7221.
- Purohit, A., & Reed, M. J. (2002). Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids*, *67*(12), 979-983.
- Querfurth, H. W., & LaFerla, F. M. (2010). The neurobiology of antiepileptic drugs for the treatment of nonepileptic conditions. *Nat Med*, *10*, 685-692.
- Quinn, R. (2005). Comparing rat's to human's age: How old is my rat in people years?. *Nutrition*, *21*(6), 775-777.
- Rial Verde, E. M., Lee-Osbourne, J., Worley, P. F., Malinow, R., & Cline, H. T. (2006). Increased expression of the immediate-early gene arc/arg3.1 reduces AMPA receptor-mediated synaptic transmission. *Neuron*, *52*(3), 461-474.
- Rodriguez, J. J., Davies, H. A., Silva, A. T., De Souza, I. E., Peddie, C. J., Colyer, F. M., Lancashire, C. L., Fine, A., Errington, M. L., Bliss T. V., & Stewart, M. G. (2005). Long-term potentiation in the

- rat dentate gyrus is associated with enhanced Arc/Arg3.1 protein expression in spines, dendrites and glia. *Eur J Neurosci*, 21(9), 2384-2396.
- Saldanha, C. J., Duncan, K. A., & Walters, B. J. (2009). Neuroprotective actions of brain aromatase. *Front Neuroendocrinol*, 30(2), 106-118.
- Sanes, J. R., & Lichtman, J. W. (1999). Can molecules explain long-term potentiation. *Nature Neuroscience* volume, 2, 597-604.
- Saul, M. (2017). *Multi store model of memory*. Retrieved from [www.simplypsychology.org/multi-store.html](http://www.simplypsychology.org/multi-store.html)
- Schmidt, M. L., Martin, J. A., Lee, V. M., & Trojanowski, J. Q. (1996). Convergence of Lewy bodies and neurofibrillary tangles in amygdala neurons of Alzheimer's disease and Lewy body disorders. *Acta Neuropathol*, 91(5), 475-481.
- Sengupta, P. (2013). The laboratory rat: Relating its age with human's. *Int J Prev Med*, 4(6), 624-630.
- Serdar, E. B., Gonca, I. Y., Hiroki, U. T., Steven, T. (2005) Aromataz in endometriosis and uterine leiomyomata. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 95(1-5), 57-62 .
- Shepherd, J. D., Rumbaugh, G., Wu, J., Chowdhury, S., Plath, N., Kuhl, D., Haganir R. L., & Worley, P. F. (2006). Arc/Arg3.1 mediates homeostatic synaptic scaling of AMPA receptors. *Neuron*, 52(3), 475-484.
- Sherwood, L. (2013). *Introduction to human physiology* (8<sup>th</sup> ed.). Australia: Brooks/ Cole CengageLearning.
- Silverthorn, D. U. (2007). *Human physiology: An integrated approach* (4<sup>th</sup> ed.). San Francisco: Pearson Benjamin Cummings.
- Skrebitsky, V. G., & Chepkova, A. N. (1998). Hebbian synapses in cortical and hippocampal pathways. *Rev Neurosci*, 9(4), 243-264.
- Steward, O., Wallace, C. S., Lyford, G. L., & Worley, P. F. (1998). Synaptic activation causes the mRNA for the IEG Arc to localize selectively near activated postsynaptic sites on dendrites. *Neuron*, 21(4), 741-751.
- Stocco, D. M. (2000). The role of the StAR protein in steroidogenesis: Challenges for the future. *J Endocrinol*, 164(3), 247-253.
- Stocco, D. M. (2001). Tracking the role of a star in the sky of the new millennium. *Mol Endocrinol*, 15(8), 1245-1254.
- Stocco, D. M., & Clark, B. J. (1996). Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev*, 17(3), 221-244.
- Sugawara, T., Holt, J. A., Driscoll, D., Strauss, J. F., Lin, D., Miller, W. L., Patterson, D., Clancy, K. P., Hart, I. M., & Clark, B. J. (1995). Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(11), 4778-4782.

- Sylvia, D. C., Karen, R. M., Johannes, M. H., & Reul, M. (2015). Distinct epigenetic and gene expression changes in rat hippocampal neurons after Morris water maze training. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, *9*, 156.
- Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R., & Ando, J. (1997). Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem Biophys Res Commun*, *240*, 737-741.
- Tsuchiya, K., Nakayama, H., Haga, C., Oshima, K., Niizato, K., Arai, T., Matsushita M., & Akiyama, H. (2005). Distribution of cerebral cortical lesions in diffuse neurofibrillary tangles with calcification: A clinicopathological study of four autopsy cases showing prominent parietal lobe involvement. *Acta Neuropathol*, *110*(1), 57-68.
- Turner, P. R., O'Connor, K., Tate, W. P., & Abraham, W. C. (2003). Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol*, *70*(1), 1-32.
- Woolley, C. S. (2007). Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, *47*, 657-680.
- Woolley, C. S., & McEwen, B. S. (1994). Estradiol regulates hippocampal dendritic spine density via an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism. *Journal of Neuroscience*, *14*, 7680-7687.
- Xiaobing, C., Jonathan, M. L., Austin, H., Christine, W., Rita, A., Alioscka, A., Sousac, R., Leapmanc, D., Roger, A. N., & Thomas, S. R. (2015). PSD-95 family MAGUKs are essential for anchoring AMPA and NMDA receptor complexes at the postsynaptic density. *PNAS December*, *112*(50), E6983-E6992.
- Yuste, R., & Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, *24*, 1071.