การศึกษาเปรียบเทียบการหลั่งคอร์ติซอลจากอะดรีนัลเซลล์ในสภาพที่แยกเป็นเซลล์และสภาพที่หั่นเป็นชิ้นในแฮมสเตอร์

นางสาวเกวลิน เค้ามูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-231-6

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

COMPARATIVE STUDY OF CORTISOL RELEASED FROM ISOLATED ADRENAL CELLS AND ADRENAL SLICES IN HAMSTERS

Miss Keawalin Kaomoon

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirments

for the Degree of Master of Science

Interdepartment of Physiology

Graduate School

Chulalongkorn University

1995

ISBN 974-631-231-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์ : การศึกษาเปรียบเทียบการหลั่งคอร์ติซอลจากอะดรีนัลเซลล์ในสภาพที่แยกเป็นเซลล์และสภาพที่หั่นเป็นชิ้นในแฮมสเตอร์

โดย นางสาวเกวลิน เค้ามูล

สหสาขา สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ พญ.ดร. บังอร ชมเดช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษา)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ราตรี สุดทรวง)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เกวลิน เค้ามูล : การศึกษาเปรียบเทียบการหลั่งคอร์ติซอลจากอะดรีนัลเซลล์ในสภาพที่แยกเป็นเซลล์ และสภาพที่หั่นเป็นชิ้นในแฮมเตอร์(COMPARATIVE STUDY OF CORTISOL RELEASED FROM ISOLATED ADRENAL CELLS AND ADRENAL SLICES IN HAMSTERS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.พัชนี สิงห์อาษา, 56 หน้า ISBN 974-631-231-6

การศึกษานี้จะดูผลของ ฮอร์โมนคอร์ติโคโธปินรีลีซซิ่ง(ซีอาร์เอช) และอินเตอร์ลิวคิน-1 เบต้า(ไอแอล-1เบต้า) เปรียบเทียบกับฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโธปิน(เอซีทีเอช) ในการกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอล และใช้ฮอร์โมนคอร์ติโคโธปินอินฮิบิติ้งเปปไทด์(ซีไอพี) เป็นตัวยับยั้งการหลั่งคอร์ติซอล ที่เกิดจากการกระตุ้นของ เอซีทีเอช โดยทดลองกับเซลล์ต่อมหมวกไตในสภาพที่แยกเป็นเซลล์ กับสภาพที่หั่นเป็นชิ้นในแฮมสเตอร์

ผลการวิจัยพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ เอซีทีเอช,ซีอาร์เอช และ อินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ในการกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอล จากเซลล์ต่อมหมวกไตในสภาพที่หั่นเป็นชิ้น ในน้ำยาเพาะเลี้ยง M 199 พบว่าความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ จะทำให้มีปริมาณการหลั่งคอร์ติซอล มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % และความเข้มข้นของ ซีไอพี ที่ยับยั้งการหลั่งคอร์ติซอล ที่เกิดจากการกระตุ้นของ เอซีทีเอช ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ ได้อย่างสมบูรณ์ คือ 10^{-6} โมลาร์ เช่นกัน

พบว่า เอซีทีเอช,ซีอาร์เอช และอินเตอร์ลิวคิน-1เบต้า ที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมลาร์ สามารถกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอลจากเซลล์ต่อมหมวกไตในสภาพที่หั่นเป็นชิ้นเมื่อเลี้ยงได้ 1ชั่วโมงแรก โดยมีปริมาณการหลั่งคอร์ติซอล คือ 41.08 ± 8.53, 18.31 ± 4.86 และ 13.19 ± 0.69 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 2 สามารถกระตุ้นการหลั่งคอร์ติซอลเพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณ 76.34 ± 10.04, 56.16 ± 5.70 และ 16.87 ± 1.57 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % แต่เมื่อทดลองกับเซลล์ต่อมหมวกไตในสภาพที่แยกเป็นเซลล์ ปริมาณการหลั่งคอร์ติซอลจะลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 % นอกจากนี้พบว่า ซีไอพี ที่ความเข้มข้น 10^{-6} โมล่าร์ สามารถยับยั้งการหลั่งคอร์ติซอลที่เกิดจากการกระตุ้นของ เอซีทีเอช จากเซลล์ต่อมหมวกไตได้ทั้งในสภาพที่แยกเป็นเซลล์ และสภาพที่หั่นเป็นชิ้น

ภาควิชา ..... ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

C545485 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD : CORTISOL/ ISOLATED ADRENAL CELLS/ ADRENAL SLICES/ HAMSTERS
KEAWALIN KOAMOON : COMPARATIVE STUDY OF CORTISOL RELEASED FROM ISOLATED ADRENAL CELLS AND ADRENAL SLICES IN HAMSTERS
THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PATCHANEE SINGH-ASA,Ph.D.56 pp.
ISBN 974-631-231-6

The effects of Corticotropin releasing hormone(CRH) and Interleukin-1β(IL-1β) were studied,comparing to the Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in stimulation of cortisol release. In addition, Corticotropin inhibiting peptide(CIP) was used as an inhibitor for the release of ACTH-stimulated cortisol in isolated adrenal cells and adrenal slices of hamsters.

The optimal concentration of ACTH, CRH and IL-1β for the stimulation of cortisol released from adrenal slices in medium M199 was found to be 10^{-6} M.This concentration induced the highest release of cortisol, significantly ($P<0.01$) and the concentration of CIP completely reversed the increases in cortisol production by ACTH was 10^{-6} M.

It was found that ACTH,CRH and IL-1β each at concentration of 10^{-6} M could stimulate cortisol release from adrenal slices at the end of the first hour in media.The amounts of cortisol were 41.08±8.53, 18.31±4.86 and 13.19±0.69 pmol/ml respectively. While at the end of the second hour,the amount of cortisol was increase to be 76.34±10.04, 56.16±5.70 and 16.87±1.57 pmol/ml,significantly($P<0.01$).In the isolated adrenal cell, the amounts of cortisol stimulated by ACTH, CRH and IL-1β were smaller than these products by adrenal slices at the same intervals. CIP at 10^{-6} M inhibited the ACTH-stimulated cortisol release both from isolated adrenal cells and adrenal slices.

ภาควิชา สัตวศาสตร์ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต เกวลิน เกษียร
สาขาวิชา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

หน่วยบริการสารสนเทศ สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงต่อ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พัชนี สิงห์อาษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำทางด้านวิชาการ และกำลังใจ ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตปริญญาโท ประจำปีงบประมาณ 2536 สำหรับการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ส.อ.เวียงชัย มุงบัง ที่ให้การช่วยเหลือด้านการจัดทำและเป็นกำลังใจด้วยดีตลอดมา ขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้

นอกจากนี้ ผู้เขียนยังได้รับความช่วยเหลือด้วยมิตรไมตรีที่ดียิ่งจากเจ้าหน้าที่ทุกคนที่ห้องปฏิบัติการไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งได้มีส่วนช่วยให้งานสำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบคุณในน้ำใจจากเจ้าหน้าที่ทุกคน

ท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณมารดาเป็นอย่างสูงที่ได้ให้การสนับสนุน และเป็นกำลังใจด้วยดีแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

ค่าอธิบายค่าย่อ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 7

3 ผลการทดลอง..... 26

4 สรุปและวิจารณ์ผล..... 44

รายการอ้างอิง..... 48

ประวัติผู้เขียน..... 56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัมคอร์ติซอลที่ทำปฏิกริยากับสารต่าง ๆ..... 19

2. ผลการแยกเซลล์ต่อมหมวกไตและ % จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viability)..... 43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่

1. แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH,CRH และ IL-1β ต่อปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 27

2. แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CIP ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 29

3. แสดงผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30

4. แสดงผลของ CIP ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 32

5. แสดงผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ต่อการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก isolated adrenal cell เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 33

6. ผลของ CIP ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก isolated adrenal cell เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 35

7. ผลการเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 36

สารบัญภาพ(ต่อ)

หน้า

รูปที่

8. ผลการเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 38
9. เปรียบเทียบผลการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell ของการ incubate ชั่วโมงที่ 1 39
10. เปรียบเทียบผลการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell ของการ incubate ชั่วโมงที่ 2 41

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	คำเต็ม
ACTH	Adrenocorticotrophic hormone
CIP	Corticotropin inhibiting peptide
CRH	Corticotropin releasing hormone
EDTA	Ethylenediaminetetra acetic acid
IL-1β	Interleukin-1β
KRBGA	Kreb ringer bicarbonate buffer
M	Molar
PPO	2,5-Diphenyl Oxazol
POPOP	1,4-bis [5-phenyl 1-2-Oxzazol]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

บทบาทที่สำคัญทางสรีรวิทยาของต่อมหมวกไต เริ่มเป็นที่สนใจจากการค้นพบของ Addison ในปี ค.ศ.1855 ซึ่งพบความผิดปกติทางร่างกายในคนไข้ที่ต่อมหมวกไตถูกทำลาย ต่อมาจึงเรียกชื่อและลักษณะอาการนี้ว่า Addison's disease (Bethune, 1975) ผลจากการค้นพบนี้ทำให้ Brow Seguard ซึ่งเป็นนักสรีรวิทยา ทำการทดลองตัดต่อมหมวกไตออกจากสัตว์ทดลอง (adrenalectomy) พบว่าสัตว์ทดลองนั้นอ่อนแอลง การควบคุมเกลือแร่ในร่างกายไม่สมดุล ต่อมาปี ค.ศ. 1930 จึงสรุปได้ว่าต่อมหมวกไตส่วนนอก (adrenal cortex) มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตมากกว่าต่อมหมวกไตส่วนใน (adrenal medulla) ต่อมหมวกไตส่วนนอกทำหน้าที่ควบคุมเกี่ยวกับ เมตาบอลิสมต่าง ๆ ของร่างกาย และความทนต่อสภาวะเครียดต่าง ๆ ต่อมหมวกไตส่วนในไม่จัดเป็นส่วนที่จำเป็นต่อชีวิตโดยตรง ฮอร์โมนจากต่อมหมวกไตในส่วนนี้จะหลั่งออกมาเมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะฉุกเฉิน ตื่นเต้น เคร่งเครียด ต่อสู้ ตกใจ กลัว หิวกระหาย เจ็บปวดหรือเมื่อออกกำลังกาย (Gorbman et al., 1984)

ต่อมหมวกไตในหนูแรทพบอยู่เหนือไตทั้ง 2 ข้าง มีน้ำหนักประมาณ 42 มิลลิกรัม (Sparrow and Coupland, 1987) แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนนอกสุดเรียก adrenal cortex ประกอบด้วย 3 ชั้นคือ zona glomerulosa อยู่ชั้นนอกสุดสร้างสารพวก mineralocorticoids ที่สำคัญได้แก่ aldosterone ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ ควบคุมสมดุลของน้ำและเกลือแร่ในร่างกาย ชั้นกลางเรียก zona fasciculata สร้างสารพวก glucocorticoids ได้แก่

cortisol,cortisone และ corticosterone ฮอร์โมนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่ควบคุมเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ชั้นในเรียก zona reticularis สร้างฮอร์โมนเพศ (sex hormone) ได้แก่ estrogen, progesterone และ testosterone ซึ่งเหมือนกับที่สร้างจากอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนชั้นในสุดของต่อมหมวกไต ซึ่งเรียก adrenal medulla สร้างสาร catecholamines เช่น epinephrine และ norepinephrine (Ganong, 1993) เมื่ออยู่ในภาวะฉุกเฉิน ทำให้หัวใจเต้นเร็วพร้อมที่จะสู้หรือหนี (fight or flight) โดยกระตุ้นกลัยโคเจนที่อยู่ในตับสลายเป็นกลูโคส เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับกล้ามเนื้อโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน และกระตุ้นกลัยโคเจนที่สะสมในกล้ามเนื้อเป็นแลคเตต ในกระบวนการกลัยโคลัยซิส ทำให้มี ATP เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้หลอดลมขยายตัว จึงนำมาใช้รักษาโรคหืด

ต่อมหมวกไตจะหลั่งฮอร์โมนได้ต้องได้รับการกระตุ้นด้วย adrenocorticotropic hormone (ACTH) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) (Guyton, 1993) ซึ่งการหลั่ง ACTH ต้องได้รับการกระตุ้นจาก corticotropin releasing hormone (CRH) ซึ่งเป็นโพลีเปปไทด์ประกอบด้วย กรดอะมิโน 41 ตัว สร้างจาก neurosecretory cell ในสมองส่วนไฮโปธาลามัส (hypothalamus) เมื่อต่อมหมวกไตได้รับการกระตุ้น ส่วนของ zona fasciculata จะสร้าง glucocorticoid เมื่อมี glucocorticoid ออกมามากทำให้เกิด negative feedback มาควบคุมการหลั่งของ CRH จาก ไฮโปธาลามัส และ ACTH จากต่อมใต้สมองอีกทีหนึ่ง นอกจากนี้ Kaneko และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาในหนูแรทพบว่า ช่วงเวลาของวันและความเครียดจะควบคุมการหลั่งของ ACTH และ cortisol เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการศึกษาผลของ CRH ต่อต่อมหมวกไตโดยตรง พบว่าต่อมหมวกไตของหนูแรทสามารถหลั่ง corticosterone ได้โดยไม่ต้องอาศัยการกระตุ้นของ ACTH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Bornstein et al.,

1990; Fehn et al., 1988; Mazzocchi et al., 1989) อย่างไรก็ตาม ได้มีการศึกษาพบว่า มีตัวรับ (receptor) ของ CRH อยู่ที่ส่วน adrenal medulla (Aguilera et al., 1987 ; Dave et al.,1985) และยังพบ CRH บรรจุอยู่ใน adrenal chromaffin cells ของสัตว์หลายชนิด เช่น วัวและสุนัข (Hashimoto et al., 1984, Minamino et al., 1988; Suda et al.,1984) CRH นี้จะหลั่งออกมาเมื่อกระตุ้น splanchnic nerve (Edwards and Jones,1988 ; Edwards et al.,1986)ได้มีผู้ศึกษาพบว่าการหลั่ง cortisol จากต่อมหมวกไตนอกจากจะเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนจากไฮโปธาลามัส และต่อมใต้สมองส่วนหน้าแล้ว ยังเกี่ยวข้องกับ splanchnic nerve ที่พบในสัตว์หลายชนิด เช่น หนูแรท สุกร ลิง และแกะ (Unsicker, 1969; Robinson et al., 1977; Uno, 1977; Purwar, 1978 ; Migally,1979) รวมทั้งในคนด้วย (Mikhail and Amin, 1969) glucocorticoids ที่หลั่งในหนูแรทส่วนมากเป็น corticosterone ส่วนใน hamster คือ cortisol เช่นเดียวกับลิงและคน (Hoffman et al.,1968) Bruhn และคณะ (1987) พบว่าในสภาวะเสียเลือดจะกระตุ้นการหลั่ง cortisol ด้วย เนื่องจากในสภาวะที่เสียเลือด จะมีปริมาณเลือดไหลผ่านต่อมหมวกไตน้อย จึงทำให้มีการหลั่ง cortisol ออกมาน้อย ซึ่งจะไปกระตุ้นไฮโปธาลามัสให้มีการหลั่ง CRH เป็นการควบคุมแบบ positive feedback

หลอดเลือดที่มาเลี้ยงต่อมหมวกไตทั้ง 2 ข้าง จะแยกออกมาจากหลอดเลือดแดงใหญ่บริเวณช่องท้อง (abdominal aorta) สาขาของหลอดเลือดแดงจะกระจายทั่วส่วนนอก capsule ของตัวต่อม จากนั้นจะแทงทะลุลงไปแตกแขนงเป็นร่างแหภายในบริเวณรอยต่อระหว่างต่อมทั้ง 2 ส่วน (cortico medulla junction) ก่อนนำเลือดไปเลี้ยงต่อมส่วนใน จากนั้นเลือดดำจากต่อมส่วนในจะกลับเข้าสู่ central vein ใน adrenal cortex และ inferior vena cava ที่บริเวณ central vein จะมีกล้ามเนื้อเรียบเรียงกันเป็นสันตามยาว ทำให้เลือดคั่งอยู่บริเวณนี้ชั่วคราว ซึ่งเป็นผลดีทำให้เซลล์ในส่วนของ adrenal

cortex สัมผัสกับฮอร์โมนที่มาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า มากขึ้น (Edwards et al., 1986; Engeland and Gann, 1989)

Vinson และ Whitehouse (1973) ได้รายงานว่าเมื่อวัดอัตราการไหลของน้ำยาเพาะเลี้ยง ซึ่งฉีดเข้าไปในต่อมหมวกไต พบว่าจะมีความสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งของ glucocorticoid ที่เพิ่มขึ้น ผลเช่นเดียวกับการเพิ่มขึ้นของ ACTH และจากการทดลองได้สรุปว่า ปริมาณการหลั่งของ glucocorticoid จากต่อมหมวกไตจะเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับระบบประสาทและการไหลเวียนของเลือดร่วมด้วย

ได้มีการศึกษาพบว่าปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงต่อมหมวกไตจะมีส่วนในการสร้างฮอร์โมนสเตรียรอยด์ (steroid hormone) (Silbley et al., 1987; Van Oers et al., 1992) การกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเธติคจะมีผลทำให้ CRH หลั่งออกมามากเช่นกัน (Hinson, 1990) ต่อมาได้มีการศึกษาถึงกลไกการตอบสนองต่อการหลั่งฮอร์โมน corticosterone ภายในต่อมหมวกไตเอง ซึ่ง Andreis และคณะ (1991a) ได้ศึกษาผลของ CRH ต่อการกระตุ้นต่อมหมวกไตโดยตรง โดยศึกษาเปรียบเทียบ <u>in vivo</u> และ <u>in vitro</u> พบว่าเมื่อฉีด CRH 10 μg เข้าไปในหนูที่ตัดต่อมใต้สมองออก สามารถหลั่ง corticosterone ได้ และใน <u>in vitro</u> ได้ศึกษาเปรียบเทียบการหลั่งฮอร์โมนจากเซลล์ต่อมหมวกไตที่แยกออกเป็นเซลล์ (isolated adrenal cells) (Kloppenborg et al., 1968) และต่อมหมวกไตที่หั่นเป็นชิ้น (adrenal slices) (Belloniet al., 1990) พบว่าใน isolated adrenal cells ที่ได้จากต่อมหมวกไตส่วน zona fasciculata และ zona reticularis ไม่สามารถหลั่ง corticosterone เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย CRH แต่ adrenal slice ซึ่งมีส่วนของ adrenal cortex และ adrenal medulla สามารถหลั่ง corticosterone ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าใน adrenal slices ซึ่งมีส่วนของ adrenal cortex และ adrenal medulla สามารถสร้าง CRH จากส่วน adrenal medulla ได้ ดังนั้นภายใน

adrenal gland จึงสามารถสร้างและหลั่ง corticosterone ได้และถ้าใส่ corticotropin inhibiting peptide (CIP) ซึ่งเป็น competitive inhibitor ของ ACTH (Li et al.,1978) ลงใน media ที่เลี้ยง adrenal slice ที่ใส่ ACTH ลงไปด้วย พบว่าเซลล์ของ adrenal slicesไม่สามารถหลั่ง corticosterone ได้ เนื่องจาก CIP จะแย่งจับกับ ACTH ที่บริเวณตัวรับที่ผนังเซลล์ ในขณะเดียวกันได้มีผู้ทำการทดลอง โดยใช้ interleukin-1-β (IL-1β) ฉีดเข้าไปในหนูที่ตัดต่อมใต้สมองออก (hypophysectomized rat) พบว่าต่อมหมวกไตยังหลั่ง corticosterone ได้เพิ่มขึ้น (Gwasdow et al., 1990; Helle et al., 1988; Roh et al., 1987)

Interleukin-1(IL-1)เป็นสาร polypeptide monokine ที่หลั่งออกมาสู่กระแสเลือดโดย เซลล์แมคโคฟาจ และ ลิมโฟซัยต์ (Besedovsky et al., 1986) Andreis และคณะ (1991b)ได้ทำการศึกษายืนยันความสามารถของ IL-1β ต่อการกระตุ้น hypothalamo-hypophyseal adrenal axis ในหนูแรท พบว่าสามารถกระตุ้นต่อมหมวกไตให้หลั่ง corticosterone ได้เช่นเดียวกับ CRH นอกจากนี้ยังได้มีผู้ศึกษาผลของ IL-1 ต่อเซลล์ต่อมใต้สมองของกระต่าย พบว่าจะไปกระตุ้น phospholipase A_2 ให้เพิ่มขึ้น (Chang et al., 1986) อย่างไรก็ตามมีการศึกษายืนยันว่า IL-1 จะมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของ proopiomelanocortin ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของ ACTH ในระหว่างการเกิดปฏิกิริยาการอักเสบ ซึ่งได้แนะนำว่า IL-1 นี้ ออกฤทธิ์คล้ายกับ CRF ซึ่งจะมีบทบาทในการควบคุมการทำงานของ pituitary-adrenal axis เช่นเดียวกัน (Besedovsky et al., 1986; Natarajan et al., 1989 ; Navara et al., 1990 ;Spangelo et al.,1990 ;Gwasdow et al., 1993 ; Winter et al., 1990)

จากที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่า มีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการหลั่งฮอร์โมนจากต่อมหมวกไต เช่น ฮอร์โมนจากไฮโปธาลามัส ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง หรือจากเซลล์แมคโคฟาจ ลิมโฟซัยต์ ระบบประสาท รวมทั้งระบบการ

ไหลเวียนเลือด สิ่งเหล่านี้จึงทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจ จะทำการศึกษาต่อไป โดยเลือกใช้สารดังกล่าว เช่น ACTH, CRH, IL-1β ในการกระตุ้นการทำงานของต่อมหมวกไต และ CIP เป็นตัวยับยั้งการทำงานของ ACTH จากต่อมหมวกไตของแฮมสเตอร์

ในการศึกษา การทำงานบางอย่างของเซลล์ที่เฉพาะเจาะจง เช่น เซลล์ต่อมหมวกไตจำเป็นจะต้องแยกเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อที่ประกอบอยู่ และเพื่อให้การศึกษาแบบ quantitative ได้ผลดีที่สุดจำเป็นจะต้องแยกเป็นเซลล์เดี่ยว (Butler and Dawson, 1992) เพื่อประโยชน์ในการนับจำนวนเปรียบเทียบได้ถูกต้องแม่นยำกว่าการชั่งน้ำหนัก และใช้เนื้อเยื่อเป็นชิ้น Kohen และคณะ (1973) ได้รายงานว่าวิธีการแยกเซลล์ต่อมหมวกไตเป็นเซลล์เดี่ยว จะทำให้เซลล์เสี่ยงต่ออันตรายทั้งทางชีวเคมี และ รูปร่าง ได้มีผู้ที่ทำการทดลองเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์ต่าง ๆ ในการแยกเป็นเซลล์เดี่ยว เช่น trypsin (Kloppenborg et al., 1968) trypsin ร่วมกับ DNase หรือ trypsin ร่วมกับ hyaluronidase และต่อมา Black และคณะ (1982) ได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า การแยกเซลล์ต่อมหมวกไตของหนูตะเภาโดยใช้ collagenase ร่วมกับ trypsin จะทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยวได้มาก และได้เซลล์ที่มีชีวิตมีความสามารถในการหลั่งฮอร์โมนได้ดี โดยเปรียบเทียบกับการใช้ EDTA (ethylendiaminetetra acetic acid) ร่วมด้วย นอกจากนี้ Haning และคณะ (1970) ได้ศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง capsular gland cell และ decapsular gland cell พบว่าการเอา capsule ออกจะทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนมากขึ้น

ในการศึกษาครั้งนี้จะดูผลของ CRH และ IL-1β เปรียบเทียบกับ ACTH ในการกระตุ้นการหลั่ง คอร์ติซอล และใช้ CIP เป็นตัวยับยั้งการหลั่งคอร์ติซอล ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH โดยใช้ adrenal gland ของแฮมสเตอร์ ที่หั่นเป็นชิ้นและในสภาพที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยว

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. สัตว์ทดลอง

หนูแฮมสเตอร์เลี้ยงในห้องทดลอง ของภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อยู่ในห้องปรับอากาศที่มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียสให้ได้รับแสงสว่าง 14 ชั่วโมง(ตั้งแต่เวลา 06.00-20.00 น.) และมืด 10 ชั่วโมง (ตั้งแต่เวลา 20.00-06.00 น.) โดยใช้สวิทช์อัตโนมัติ กินอาหารมาตรฐานซึ่งส่งจากบริษัท F.E. Znelling (Gold Coil Mills) และมีน้ำประปาให้ดื่มตลอดเวลาเลือกใช้แฮมสเตอร์เพศผู้ที่มีอายุประมาณ 60 วัน น้ำหนักประมาณ 130 กรัม จำนวน 150 ตัว

2. ฮอร์โมนและสารเคมี

2.1 ฮอร์โมน

Adrenocorticotropic hormone (ACTH):(A0423), Sigma Chemical Company.U.S.A.

Corticotropin releasing hormone (CRH):Lot 42 H-49511,Sigma Chemical Company, U.S.A.

Corticotropin releasing hormone antagonist (Corticotropin inhibiting peptide, CIP): Lot 52 H 49521, Sigma Chemical Company,U.S.A.

Interleukin-1β (IL-1β) : Lot 32 04021, Sigma Chemical Company, U.S.A.

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการแยกเซลล์และเลี้ยงเซลล์

Bovine serum albumin : Lot 11 H-1040, Sigma Chemical Compamy, U.S.A.

Collagenase Type V : Lot 129 FE 825, Sigma Chemical Company, U.S.A.

Ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA): Sigma Chemical Company, U.S.A.

Glucose : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Lactate : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Medium M. 199 : Cat No. 400-1100 EB., Sigma Chemical Company, U.S.A.

Potassium chloride : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Sodium bicarbonate : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Sodium chloride : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Sodium pyruvate : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Trypsin Type I From Bovine Pancreas : Sigma Chemical Company, U.S.A.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 <u>สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน</u>
<u>ด้วยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์</u>

Antiserum to cortisol : Batch No. K 907010, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

^{3}H-Cortisol : Amersham International PLC. England

Cortisol Standard : Batch No.K 079510, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Charcoal Reagent : Batch No. K 220520, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Dextran Reagent : Batch No. 82/83/5, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Dioxane : E Merck, Darmstadt, Germany.

Disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) : E. Merck, Darm Stadt, Germany

Gelatin : difco laboratory, U.S.A.

PPO (2,5-Diphenyl Oxazole) : Sigma Chemical Company, U.S.A.

POPOP (1,4-bis [5-Phenyl 1-2-Oxazolyl] benzene : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Sodium Chloride (NaCl) : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Thiomersal (merthiolate) : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Toluene : E Merck, Darmstadt, Germany

อุปกรณ์

เครื่องมือผ่าตัด

เครื่องชั่งละเอียด : Right A Weight, W.M. Ainworth and Sons Inc, U.S.A.

Beta-liquid Scintillation Counter: Model BPL, Packard Instrument,Co,U.S.A.

Conical tube ขนาด 50 มิลลิตร : Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co, Ltd.

Counting vial ขนาด 5 มิลลิตร : Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co, Ltd.

Dunoff Incubator Shaker Model 35 75-1 Instrument Inc., U.S.A.

Dynac Centrifuge : Clay adams, Becton Dickinson and Company Parsippany, U.S.A.

Hemocytometer : Becthai Bangkok Equipment & Chemical Co., Ltd.

Magnetic Stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation lowa, U.S.A.

Microcentrifuge Tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร : Becthai Bangkok Equipement & Chemical Co., Ltd.

Micropipette : Pipetteman M. 81 Gilson France, Eppendortt 3130 Germany : Pipette Gun Clay Adsms. U.S.A.

Millipore paper ขนาด 0.22 μ : Becthai Bangkok Equipement & Chemical Co., Ltd.

Refrigerated Centrifuge Model PR-J, International Equipment Company, U.S.A.

Syringe ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร : Terumo Corporation, Tokyo, Japan

Vortex mixer : M16715 Thermolyne Corporation U.S.A.

การเตรียมการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายสำหรับแยกเซลล์ (Kreb Ringer Bicarbonate Buffer หรือ KRBGA)

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

NaCl	5.83	กรัม
KCl	4.78	กรัม
KH_2PO_4	1.19	กรัม
$NaHCO_3$	1.19	กรัม
Lactate	21.58	กรัม
Na Pyruvate	0.5	กรัม
Glucose	2.0	กรัม
BSA	4.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่นให้เป็น 1000 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรอง ขนาด 0.22 μ จากนั้นแบ่ง KRBGA มา 50 มิลลิลิตร ใส่ 0.1 % trypsin (0.050 กรัม) และ 0.3 % collagenase (0.15 กรัม) เพื่อใช้ในการแยกเซลล์ต่อไปในขั้นตอนที่ 1 จากนั้นเตรียมแบ่ง KRBGA มา 100 มิลลิลิตร เติม EDTA 0.2 กรัม เพื่อใช้ในการแยกเซลล์ในขั้นตอนที่ 2 ต่อไป

2. <u>การเตรียมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์</u>

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

M 199	0.99	กรัม
$NaHCO_3$	0.22	กรัม
BSA	0.30	กรัม

นำมาละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร วัด pH ให้ได้ 7.4 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μ เก็บไว้ในขวดปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3. <u>การแยกเซลล์ต่อมหมวกไต</u> (isolated adrenal cell)

ฆ่าแฮมสเตอร์ครั้งละ 10 ตัว โดยวิธีดึงคอต่อ ผ่าหน้าท้องตัดเอาต่อมหมวกไตออก ตัดเลาะเอาเนื้อเยื่อ ไขมัน ออกให้หมด ล้างต่อมหมวกไตใน KRBGA 2 ครั้ง นำไปชั่งน้ำหนักแล้วนำมาสับให้ละเอียดด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วในฝาด้านบนของ petri dish จากนั้นใช้ pasteur pipette ดูดเอาต่อมหมวกไตที่สับแล้วใส่ใน conical tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มี KRBGA 30 มิลลิลิตร เพื่อล้างเลือดออกให้หมด โดยนำไปปั่นที่ 300 g นาน 3 นาที ทิ้งน้ำส่วนบน นำส่วนที่ตกตะกอนก้นหลอดมาใส่ในสารละลายแยกเซลล์ ซึ่งมี 0.3 % collagenase และ 0.1 % trypsin จำนวน 15 มิลลิลิตรต่อต่อมหมวกไต 20 ต่อม นำไปเขย่าใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที ใช้ pasteur pipette ที่ลนปลายให้มนเพื่อไม่ให้ทำลายเซลล์ ดูดเป่าน้ำยาเข้าออก 20 ครั้ง แล้วรอจนชิ้นเนื้อเยื่อที่มีขนาดใหญ่ตกลงมาอยู่ที่ก้นหมด จึงใช้ pasteur pipette ดูดน้ำส่วนบนซึ่งมีเซลล์ที่แยกแล้วใส่ใน conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร อันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 600 g นาน 10 นาที ส่วนเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ที่ตกอยู่ก้นหลอด นำไปเติมสารละลายแยกเซลล์ ซึ่งมี 0.3 % collagenase และ 0.1 % trypsin 15 มิลลิลิตร ทำเช่นเดียวกับรอบแรก

แต่ลดเวลาที่เขย่าใน water bath เป็น 8 นาที ในรอบที่ 2 นำเซลล์ที่ตกตะกอนจากการปั่นเหวี่ยงจากหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 มาละลายใน KRBGA นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งเพื่อล้างสารละลายที่มีเอนไซม์ออก ป้องกันเซลล์ถูกทำลาย จากนั้นนำเซลล์ที่ตกตะกอนทั้ง 2 หลอด มาละลายรวมกันในน้ำยาเพาะเลี้ยง เพื่อรอนับเซลล์รวมทั้งหมด สำหรับชิ้นเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ ซึ่งแยกด้วยเอนไซม์ไม่หมด จะนำมาแยกต่อด้วยสารละลายแยกเซลล์ชนิดที่ 2 คือสารละลาย KRBGA ที่มี EDTA โดยแบ่งจาก stock มา 15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 10 นาที ใช้ pasteur pipette ที่ลนปลายแล้วดูดเป่าเข้าออก 20 ครั้ง รอจนเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ตกลงอยู่ที่ก้นหลอด ใช้ pasteur pipette ดูดน้ำส่วนบนซึ่งมีเซลล์ที่แยกแล้วใส่ใน conical tube อันใหม่ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 600 g นาน 10 นาที รวบรวมเซลล์ที่แยกไว้ด้วยกันในหลอดอันใหม่ ส่วนเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ที่ตกอยู่ก้นหลอดจะเติมสารละลาย KRBGA ที่มี EDTA เพื่อแยกเซลล์ต่อไปอีกทำซ้ำเช่นเดียวกันนี้จนกว่าเซลล์จะแยกหมด ประมาณ 4-5 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่แยกได้ทั้งหมดจากสารละลายแยกเซลล์ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มารวมกัน เติม medium M. 199 6 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันดี แบ่งมา 0.05 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.05 % trypan blue 0.05 มิลลิลิตร นำไปนับเซลล์โดยใช้ hemocytometer นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี)(Tennant, 1964) เทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมด ในการคำนวณปริมาณเซลล์ที่แยกได้ในแต่ละครั้ง จะนับเซลล์จากพื้นที่ 5 ช่อง ของ hemocytometer แล้วหาค่าเฉลี่ย ได้จำนวนเซลล์ใน 1 ช่องคูณด้วย 10^4 จะได้เป็น จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร (Butler and Dawson, 1992)

4. <u>การเตรียม adrenal slice</u>

ฆ่าแฮมสเตอร์โดยวิธีดึงคอต่อผ่าหน้าท้องตัดเอาต่อมหมวกไตออกมาใส่ใน KRBGA ตัดเลาะ capsule ที่หุ้มออกและล้างด้วย KRBGA ให้สะอาดแล้วนำต่อมหมวกไตมาหั่นด้วยมีดที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ 4 ชิ้นเท่ากัน

5. การเตรียม buffer solution

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนด ดังนี้

NaH_2PO_4 H_2O	3.10	กรัม
Na_2HPO_4	11.60	กรัม
NaCl	8.50	กรัม
Thiomersal	0.10	กรัม
Gelatin	1.00	กรัม

ละลาย gelatin ในน้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร โดยอุ่นในอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เติมสารละลายที่เหลือลงไป ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 9.2-7.4 เติมน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน

6. การเตรียม charcoal suspension

เตรียมโดยใช้ dextran 0.0625 กรัม ละลายใน buffer solution จากข้อ 5 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม ผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เก็บไว้ได้นาน 1 เดือน เมื่อจะใช้ต้องทำให้อยู่ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเสมอ โดยแช่ไว้ในน้ำแข็งตลอดเวลา

7. การเตรียม counting solution

ชั่งสารต่าง ๆ ตามจำนวนที่กำหนดดังนี้

PPO	5	กรัม
POPOP	0.3	กรัม
Toluene	1	ลิตร
1.4 dioxan	200	มิลลิลิตร

8. การเตรียม cortisol standard

เตรียมโดยใช้ cortisol standard ซึ่งละลายอยู่ใน ether มีความเข้มข้น 6 ไมโครโมลต่อลิตร ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร ใส่ vial เป่าให้แห้งด้วย compressor air จากนั้นเติม buffer solution 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลายให้หมด นำไปอินคิวเบทที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ใน water bath จะได้สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 60 นาโนโมลต่อลิตร หรือ 60 พิโครโมลต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 สัปดาห์ เมื่อจะใช้ต้องทำ serial dilution ให้มีความเข้มข้น 6,000, 3,000, 1,500, 750, 375 และ 187 เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร

9. การเตรียม cortisol working tracer (^{3}H-cortisol)

ปิเปต ^{3}H cortisol ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรีต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ vial เป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม buffer solution 7.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดย vortex mixer ปิเปตมา 100 ไมโครลิตร จากที่เตรียมไว้มาใส่ใน counting vial แล้วเติม counting solution 5 มิลลิลิตร นำไปวัดหาค่า CPM ให้อยู่ระหว่าง 8,000-10,000 โดยเครื่อง β-Liquid Scintillation Counter

10. การเตรียม cortisol antiserum

เตรียมโดยใช้ แอนติซีรัม ซึ่งอยู่ในสภาพที่ระเหยแห้งจาก WHO นำมาเติม buffer solution จากข้อ 5 จำนวน 10 มิลลิลิตรเขย่าให้ละลาย เวลาใช้นำมา 100 ไมโครลิตร จะมีความเข้มข้น 1 : 28,000

11. การหาปริมาณคอร์ติซอลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์

เตรียมหลอดทดลองดังนี้

หลอดใส่สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานปิเปตสารละลายคอร์ติซอลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 6,000, 3,000, 1,500, 750, 375 และ 187 เฟมตาโมล ต่อ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้นละ 3 หลอด หลอดละ 100 ไมโครลิตร

หลอดใส่สารตัวอย่าง ใส่สารละลาย media ที่ต้องการหาปริมาณ cortisol 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลอด

หลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ ใส่สารละลาย media ที่ไม่มีการเลี้ยงเซลล์ 100 ไมโครลิตร จำนวน 3 หลอด

ปิเปต buffer solution 400 ไมโครลิตร ลงในหลอดใส่สารละลายคอร์ติซอลมาตรฐาน หลอดใส่สารตัวอย่างและหลอดใส่สารควบคุมคุณภาพ vortex mixer เติม cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไป incubate นาน 18-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อครบกำหนดจึงเติม charcoal suspension ที่ปั่นอยู่ในภาชนะที่ใส่น้ำแข็งตลอดเวลา จำนวน 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอดทดลองที่วางไว้บนถาดน้ำแข็ง วอร์เทกซ์แล้วทิ้งไว้ 15 นาที จึงนำไปปั่นด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เทส่วนใสลงใน counting vial จากนั้นเติม counting solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปวัดรังสีเบต้าด้วยเครื่อง β-liquid Scintillation Counter

ในการทำเอสเสย์ นอกจากจะประกอบด้วย หลอดใส่สารมาตรฐาน หลอดใส่สารตัวอย่าง และหลอดใส่สารควบคุมคุณภาพแล้ว ยังมีหลอด non specific binding (NSB) หลอด maximum binding และหลอด total count อีกอย่างละ 3 หลอด

หลอด non specific binding เตรียมโดยเติม buffer

solution 600 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วทำตามข้อ 3.11 ต่อไปจนสิ้นสุดกระบวนการเพื่อทดสอบว่า tracer ที่จับกับสารอื่นที่ไม่ใช่ antibody เมื่อใช้ผงถ่านดูดซับแล้วจะมีปริมาณเท่าไร

หลอด maximum binding เตรียมโดยเติม buffer solution 500 ไมโครลิตร cortisol antiserum 100 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำตามขั้นตอนในข้อ 3.11 จนสิ้นสุดกระบวนการเพื่อทดสอบดูว่า cortisol tracer จับกับ cortisol antiserum มากที่สุดจะมีปริมาณรังสีเท่าไร

หลอด total count เตรียมโดยเติม buffer solution 800 ไมโครลิตร และ cortisol tracer 100 ไมโครลิตร แล้วทำตามข้อ 3.11 (ยกเว้นไม่ต้องใส่ charcoal suspension) จนสิ้นสุดกระบวนการเพื่อทดสอบดูปริมาณรังสีเท่าไร

<u>การคำนวณ</u>

กราฟมาตรฐานของ cortisol ได้จากการเขียนกราฟระหว่าง % bound (แกน Y) กับความเข้มข้นของ cortisol หน่วยเป็น เฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตร (แกน X) บนกระดาษกราฟ semilog การหาค่า unknown sample คำนวณได้โดยเทียบค่า % bound กับกราฟมาตรฐานจะได้ค่าความเข้มข้นเป็นเฟมตาโมลต่อ 100 ไมโครลิตรแล้วคำนวณให้เป็นพิโครโมลต่อมิลลิลิตร

12. <u>การประเมินผลวิธีที่ใช้ในการตรวจวัด</u>

การทดลองความเชื่อได้ของวิธีการตรวจวัดสารนั้น Ekin(1970) และ Abraham (1974) ได้ให้ข้อเสนอว่า ควรมีการทดสอบความจำเพาะ (specificity) ความแม่นยำ (precision) ความถูกต้อง (accuracy) และความไวในการวิเคราะห์ (sensitivity) เพื่อเป็นข้อบ่งชี้ว่า วิธีการนี้มีความน่าเชื่อถือได้มากน้อยเพียงใดดังรายละเอียดของการประเมินผลในแต่ละข้อดังนี้

12.1. ความจำเพาะ (Specificity)

ความจำเพาะของวิธีเรดิโออิมมิวโนแอสเสย์ หมายถึง ความสามารถของแอนติซีรัม ที่มารถทำปฏิกริยากับฮอร์โมน แอนติเจน หรือสารอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกันกับฮอร์โมนหรือสารนั้น 100 %

การหาความจำเพาะของแอนติซีรัม ทำได้โดย ใช้แอนติซีรัมนั้นทำปฏิกริยากับฮอร์โมนที่ต้องการจะวิเคราะห์ พร้อมกับฮอร์โมนอื่นที่มีสูตรโครงสร้างใกล้เคียงกับฮอร์โมนที่ต้องการจะวิเคราะห์ และหาความจำเพาะของแอนติซีรัมคิดเป็น % cross reaction

% cross reaction

$$= \frac{\text{ปริมาณสารมาตราฐานของสารที่จะวิเคราะห์ทำปฏิกริยากับแอนติซีรัม 50 \%}}{\text{ปริมาณสารมาตราฐานที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับสารที่ต้องการวิเคราะห์ที่ทำปฏิกริยากับแอนติซีรัม 50\%}} \times 100$$

ความจำเพาะของการตรวจหาปริมาณคอร์ติซอลโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์แอนติซีรัม ของฮอร์โมนคอร์ติซอล ที่ใช้ทำการทดสอบได้จาก องค์การอนามัยโลก (Sufi et al.,1986) ซึ่งทดสอบ % cross reaction ได้ดังตารางที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงความจำเพาะของแอนติซีรัม คอร์ติซอล ที่ทำปฏิกริยากับสารต่างๆ

สาร	% cross reaction
Cortisol	100.00 %
Cortisone	0.10 %
Corticosterone	9.20 %
11 Deoxycortisol	27.10 %
Progesterone	0.20 %
17 α - Hydroxyprogesterone	0.80 %
11 α - Hydroxyprogesterone	0.07 %
Testosterone	0.08 %

12.2 ความแม่นยำ (Precision)

หมายถึงความสามารถ ในการวิเคราะห์สารแต่ละครั้งได้ไม่แตกต่างกัน ซึ่งจะทดสอบความแม่นยำได้โดยทำการวิเคราะห์สารตัวอย่างชนิดเดียวกันหลาย ๆ ครั้งแล้วหาความแม่นยำ โดยการคำนวนเปอร์เซนต์สัมประสิทธิ์ความแปรปรวน (% coefficient of variation, % cv)

$$\% \text{ cv} = \frac{\text{ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐานของสาร}}{\text{มัชฌิมเลขคณิต}} \times 100$$

การทดสอบความแม่นยำโดยการทำ QC หลาย ๆ ค่าในแต่ละชุดการทดลองเดียวกันเรียกว่า intrassay variation และในต่างชุดกันเรียกว่า interassay variation % cv ของ interassay ที่เป็นที่ยอมรับจะต้องมีค่าต่ำกว่า 10 ความแม่นยำของการ ตรวจหาปริมาณ คอร์ติซอล โดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ ซึ่งความแม่นยำภายในการตรวจวัดเดียวกันคือ 2.03$\pm$ 0.72 และความแม่นยำระหว่างการตรวจวัดคือ 7.90$\pm$1.12

12.3 ความถูกต้อง (accuracy)

ความถูกต้องของการวิเคราะห์หาได้จากการนำสารหรือฮอรโมนที่ทราบปริมาณแน่นอนทำการวิเคราะห์หาปริมาณเทียบกับปริมาณฮอร์โมนที่แท้จริงคิดเป็นเปอร์เซนต์

$$\% \text{ accuracy} = \frac{\text{ค่าฮอร์โมนที่ตรวจวัดได้}}{\text{ค่าฮอร์โมนจริง}} \times 100$$

ในการตรวจวัดครั้งนี้ได้หาความถูกต้องของการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมิวโนเอสเสย์ ได้ค่า % ความถูกต้องของ คอร์ติซอล เฉลี่ย 83.88 $\pm$ 3.12 %

12.4 ความไวของการวิเคราะห์ (sensitivity)

ความไวของการวิเคราะห์หมายถึงค่าที่น้อยที่สุดของฮอร์โมนที่สามารถตรวจวัดได้โดยการวิเคราะห์จากกราฟมาตรฐานโดยใช้ค่าเฉลี่ย cpm จากจุดที่ไม่มีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (B_0) - 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานที่จุดนี้นำค่า count per minute (cpm) ไปคำนวณหา $B/B_0 \times 100$ แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งความไวของการวิเคราะห์ฮอร์โมนคอร์ติซอล คือ 230 pmol/ml

13. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ unpair student's t-test ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± standard deviation เลือกระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $\alpha = 0.01$

วิธีการทดลอง

1. การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH, CRH, IL-1β และ ACTH + CIP ในการกระตุ้น และ/หรือยับยั้งการหลั่ง cortisol

1.1 ACTH

นำ ACTH ความเข้มข้น 10^{-10} M, 10^{-8} M หรือ 10^{-6} M ใส่ใน media จำนวน 2 มล. ที่เลี้ยง adrenal slices incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณ cortisol เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดที่ทำให้มีจำนวนของ cortisol หลั่งมามาก ก็จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป (n=6)

1.2 CRH

นำ CRH ความเข้มข้น 10^{-10} M, 10^{-8} M หรือ 10^{-6} M ใส่ใน media จำนวน 2 มล. ที่เลี้ยง adrenal slices incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณ cortisol เพื่อดูว่าความเข้มข้นใดที่ทำให้มีจำนวนของ cortisol หลั่งมามาก ก็จะนำมาใช้ ในการทดลองต่อไป (n=6)

1.3 IL-1β

นำ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-10} M, 10^{-8} M หรือ 10^{-6} M ใส่ใน media จำนวน 2 มล. ที่เลี้ยง adrenal slices incubate ที่อุณหภูมิ

37 °C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณ cortisol เพื่อดูว่าความเข้มข้นใด ที่ทำให้มีจำนวนของ cortisol หลั่งมามาก ก็จะนำมาใช้ ในการทดลองต่อไป (n=6)

1.4 CIP + ACTH

นำ CIP ความเข้มข้น 10^{-10} M, 10^{-8} M หรือ 10^{-6} M ใส่ใน media จำนวน 2 มล. ที่เลี้ยง adrenal slices ที่มี ACTH 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media เมื่อสิ้นสุดการทดลอง มาวัดปริมาณ cortisol เพื่อดูว่าความเข้มข้นใด ที่ทำให้มีจำนวนของ cortisol หลั่งมาน้อยก็จะนำมาใช้ในการทดลองต่อไป (n=6)

2. การหาปริมาณ cortisol จาก adrenal slice ที่เลี้ยงใน media ที่ใส่ ACTH, CRH IL-1β หรือ ACTH + CIP

2.1 การทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม นำ adrenal slices ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (จำนวน 4 ชิ้น) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media โดยเก็บ media หลังจาก incubate 1 ชั่วโมงแรกและใส่ media ใหม่เลี้ยงต่อไปอีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=16)

2.2 การทดลองที่ 2 นำ adrenal slices ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (จำนวน 4 ชิ้น) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media หลังจาก incubate 1 ชั่วโมงแรก และใส่ media ที่มี ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M ใหม่ เลี้ยงต่อไปอีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพื่อหา

cortisol โดยวิธี RIA (n=14)

2.3 การทดลองที่ 3 นำ adrenal slices ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (จำนวน 4 ชิ้น) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ CRH ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยเก็บ media หลังจาก incubate 1 ชั่วโมงแรกและใส่ media ที่มี CRH ความเข้มข้น 10^{-6} M ใหม่เลี้ยงต่อไปอีก 1 ชั่วโมงและเก็บ media อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=10)

2.4 การทดลองที่ 4 นำ adrenal slices ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (จำนวน 4 ชิ้น) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยเก็บ media หลังจาก incubate 1 ชั่วโมงแรก และใส่ media ที่มี IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M ใหม่เลี้ยงต่อไปอีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=8)

2.5 การทดลองที่ 5 นำ adrenal slices ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (จำนวน 4 ชิ้น) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M และ ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยเก็บ media หลังจาก incubate 1 ชั่วโมงแรกและใส่ media ที่มี CIP+ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M ใหม่เลี้ยงต่อไปอีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเมื่อสิ้นสุดการทดลองเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=11)

3 <u>การหาปริมาณ cortisol จาก isolated adrenal cell ที่เลี้ยงใน media ที่ใส่ ACTH, CRH, IL-1β หรือ ACTH + CIP</u>

3.1 การทดลองที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม นำ isolated adrenal

cells ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (ประมาณ 10^6 เซลล์) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 หลังจาก incubate ไปแล้ว 1 ชั่วโมง ดูด media ใส่หลอดทดลองนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ออกแล้วเก็บ media ไว้ เติม media ใหม่ 2 ml incubate อีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=16)

3.2 การทดลองที่ 2 นำ isolated adrenal cells ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (ประมาณ 10^6 เซลล์) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 หลังจาก incubate ไปแล้ว 1 ชั่วโมง ดูด media ใส่หลอดทดลองนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ออก แล้วเก็บ media ไว้ เติม media ที่มี ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M 2 มล.ใหม่ incubate อีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=9)

3.3 การทดลองที่ 3 นำ isolated adrenal cells ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (ประมาณ 10^6 เซลล์) มาเลี้ยงใน medium M 199 2 มล. ที่ใส่ CRH ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 หลังจาก incubate ไปแล้ว 1 ชั่วโมง ดูด media ใส่หลอดทดลองนำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ออก แล้วเก็บ media ไว้ เติม media ที่มี CRH ความเข้มข้น 10^{-6} M 2 มล. ใหม่ incubate อีก 1 ชั่วโมง และเก็บ media อีกครั้งเพื่อหา cortisol โดยวิธี RIA (n=14)

3.4 การทดลองที่ 4 นำ isolated adrenal cells ที่ได้จากต่อมหมวกไต 1 ต่อม (ประมาณ 10^6 เซลล์) มาเลี้ยงใน 2 มล. ที่ใส่ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M incubate ที่อุณหภูมิ 37°C บรรยากาศ 95 % O_2 และ 5 % CO_2 หลังจาก incubate ไปแล้ว 1 ชั่วโมง ดูด media หลอดทดลอง นำไปปั่นเพื่อแยกเซลล์ออก แล้วเก็บ media ไว้ เติม media ที่มี IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M 2 มล. ใหม่ incubate อีก 1 ชั่วโมง

ต้นฉบับไม่มีหน้านี้

NO THIS PAGE IN ORIGINAL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

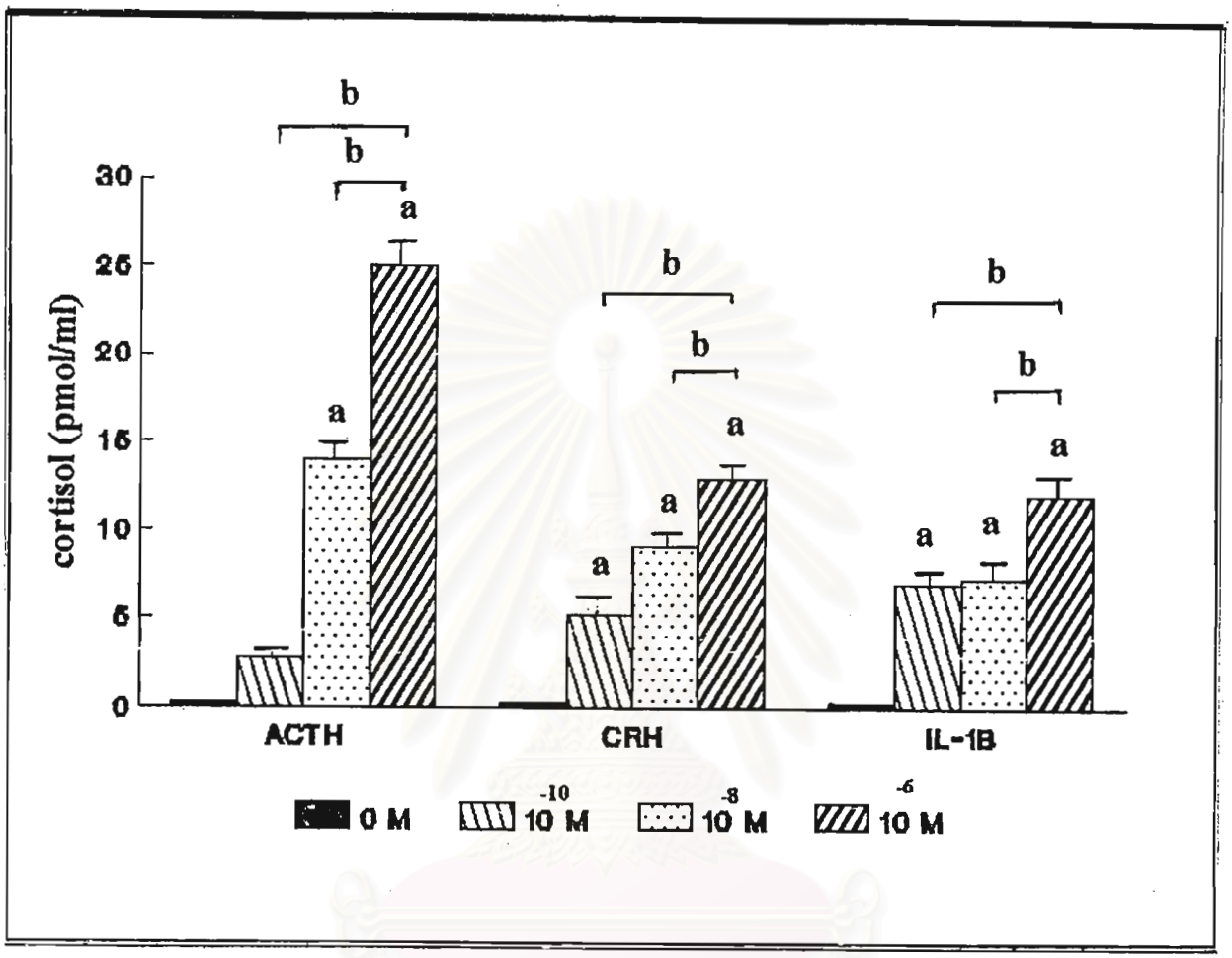
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

<u>ผลของการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH, CRH, และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง</u> (รูปที่ 1)

จากการทดลองโดยใช้ ACTH, CRH และ IL-1β ที่ความเข้มข้น 0, 10^{-10}, 10^{-8} และ 10^{-6} M พบว่าทั้ง ACTH, CRH และ IL-1β ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถกระตุ้นการหลั่ง คอร์ติซอล จาก adrenal slice ที่เลี้ยงใน media มากกว่าที่ความเข้มข้น 10^{-10} หรือ 10^{-8} M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) โดยปริมาณ cortisol ที่ได้จากการกระตุ้นของ ACTH จะเท่ากับ 0 pmol/ml (n=6), 2.8±1.5 pmol/ml (n=6), 14.0±4.2 pmol/ml (n=6) และ 25.0±3.8 pmol/ml (n=6) ตามลำดับ ส่วนปริมาณ cortisol ที่ได้จากการกระตุ้นของ CRH จะเท่ากับ 0 pmol/ml (n=6), 5.2±3 pmol/ml (n=6) 9.0±5.1 pmol/ml (n=6) และ 13.0±5.0 pmol/ml (n=6) ตามลำดับและปริมาณ cortisol ที่ได้จากการกระตุ้นของ IL-1β จะเท่ากับ 0 pmol/ml (n=6), 7.0±0.1 pmol/ml (n=6), 7.2±0.1 pmol/ml (n=6) และ 12.0±1.0 pmol/ml (n=6) ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้น และหลั่งออกมาใน media นี้ทุกกลุ่ม จะมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)



รูปที่ 1 แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubate ใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและ b = $P<0.01$ เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มเดียวกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

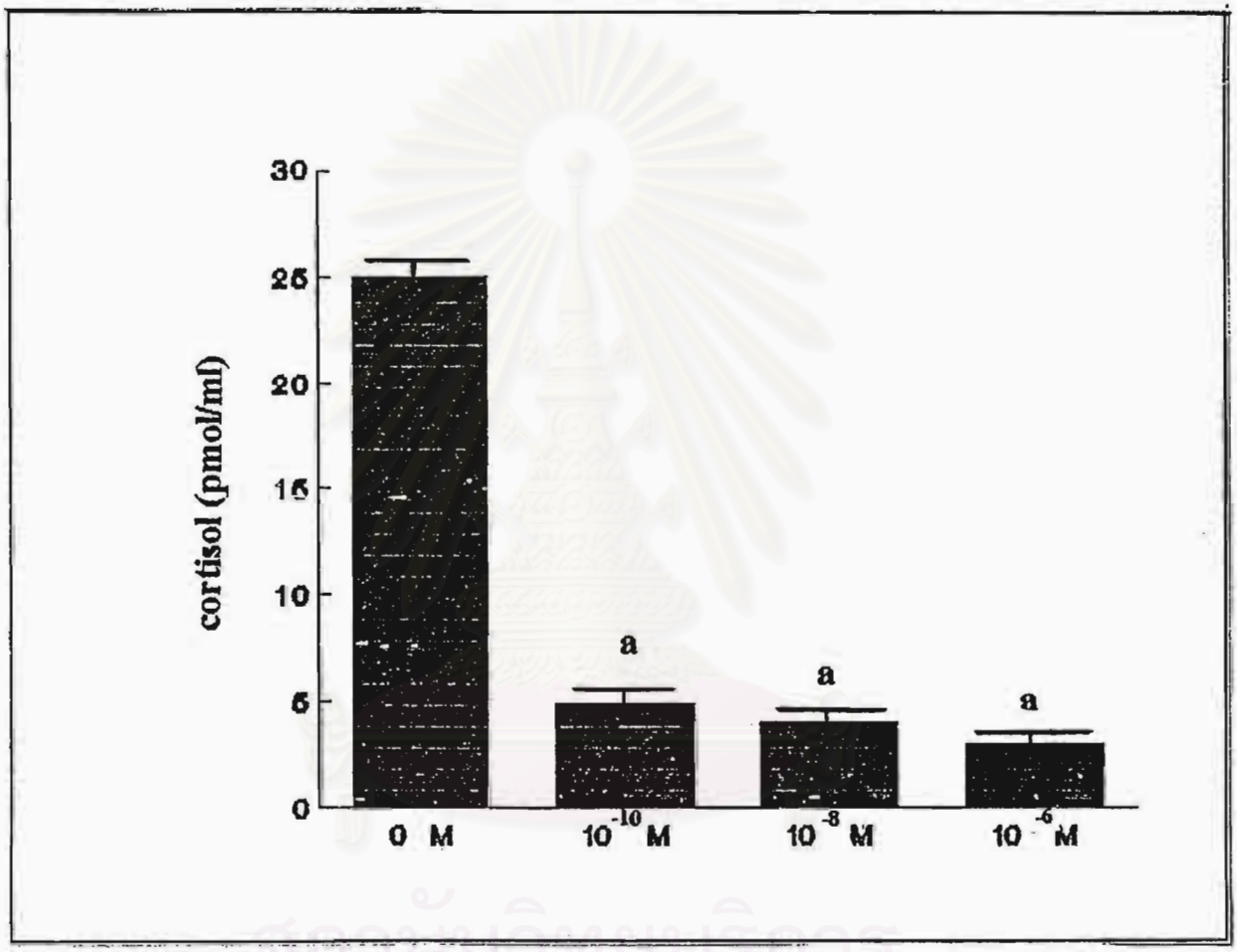
ผลการหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CIP ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 2)

จากการทดลองเมื่อใส่ CIP ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 10^{-10}, 10^{-8}, 10^{-6} M ลงใน media M 199 ที่มี ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M อยู่ด้วยพบว่า CIP ที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถลดปริมาณการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH 10^{-6} M ได้จาก 25.0±3.8 pmol/ml(n=6) เหลือ 3.0 ± 1.2 pmol/ml (n=6) ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น 10^{-10} และ 10^{-8} M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ยังสามารถลดปริมาณการหลั่ง Cortisol ได้น้อยกว่ากลุ่มที่ใส่ CIP ความเข้มข้น 10^{-8} และ 10^{-10} M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

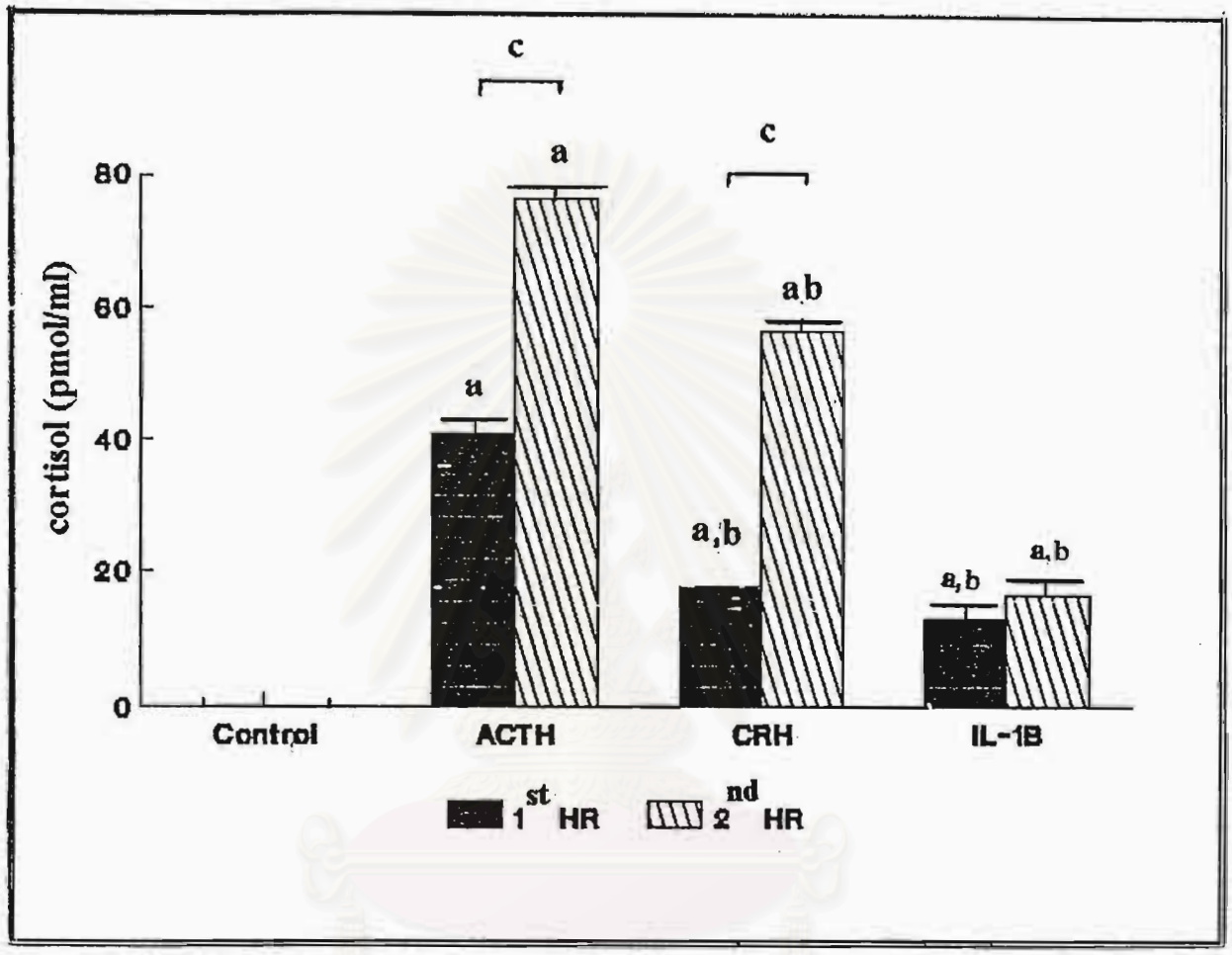
ผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

จากการทดลองพบว่า ACTH, CRH และ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อเลี้ยงใน media M 199 ภายใน 1 ชั่วโมงแรก โดยมีปริมาณการหลั่ง 41.08 ± 8.56 pmol/ml (n=11), 18.31 ± 4.86 pmol/ml (n=10) และ 13.19 ± 0.69 pmol/ml (n=8) ตามลำดับ และเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงชั่วโมงที่ 2 สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol เพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณ 76.34 ± 10.04 pmol/ml (n=14), 56.16 ± 5.7 pmol/ml (n=11) และ 16.87 ± 1.57 pmol/ml (n=12) ตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีปริมาณการหลั่งเป็น 0 pmol/ml ตลอดการเลี้ยงทั้ง 2 ชั่วโมง กลุ่มที่ใส่ CRH ปริมาณการหลั่ง cortisol จะน้อยกว่า ACTH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ส่วนกลุ่ม IL-1β จะกระตุ้นการหลั่ง cortisol ได้น้อยกว่า ACTH และ CRH เมื่อเปรียบเทียบการหลั่ง cortisol ในระหว่างชั่วโมงแรก และชั่วโมงที่ 2 ของการ

incubate ปริมาณการหลั่ง cortisol เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH และ CRH ในชั่วโมงที่ 2 จะเพิ่มมากกว่าชั่วโมงแรก อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)



รูปที่ 2 แสดงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M จาก adrenal slice เมื่อ incubate ใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ใส่ CIP



รูปที่ 3 แสดงผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อ incubateใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวัดหาปริมาณ cortisol ที่หลั่งใน media แต่ละชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, b = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม ACTH และ c = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่างชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2

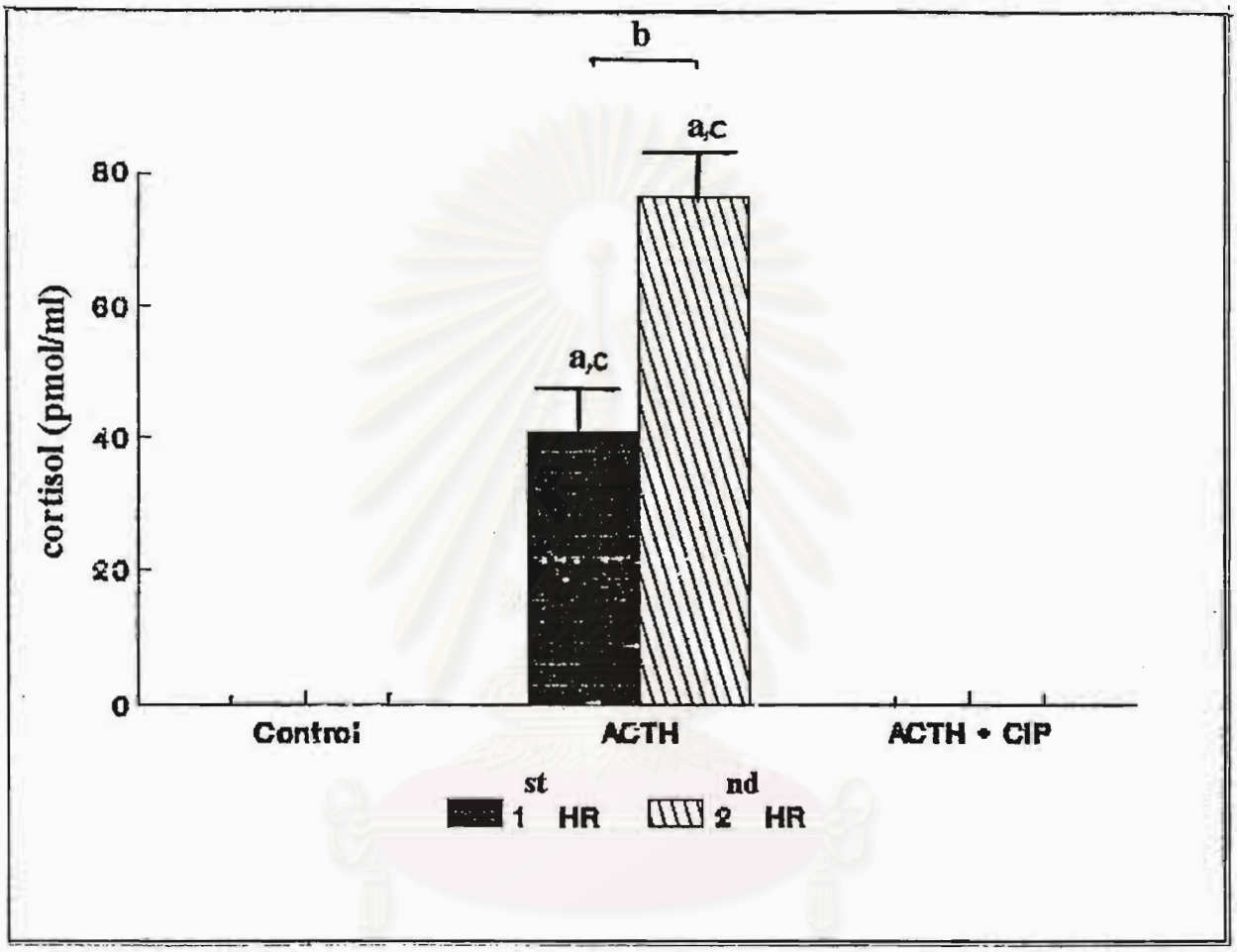
ผลของ CIP ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมง(รูปที่ 4)

จากการทดลองพบว่า ACTH ความเข้มข้น 10^{-8} M สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol ได้ 41.08 $\pm$ 8.56 pmol/ml (n=11) และ 76.36 $\pm$ 10.04 pmol/ml (n=14) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2 ตามลำดับ แต่ใน media ที่ใส่ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ลงไปด้วยจะยับยั้งการหลั่ง cortisol ได้อย่างสมบูรณ์ (0 pmol/ml,n=10) ไม่ว่าจะหลั่งภายใน 1 ชั่วโมงแรกหรือชั่วโมงที่ 2 ก็ตาม ซึ่งค่าที่ได้จะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 5)

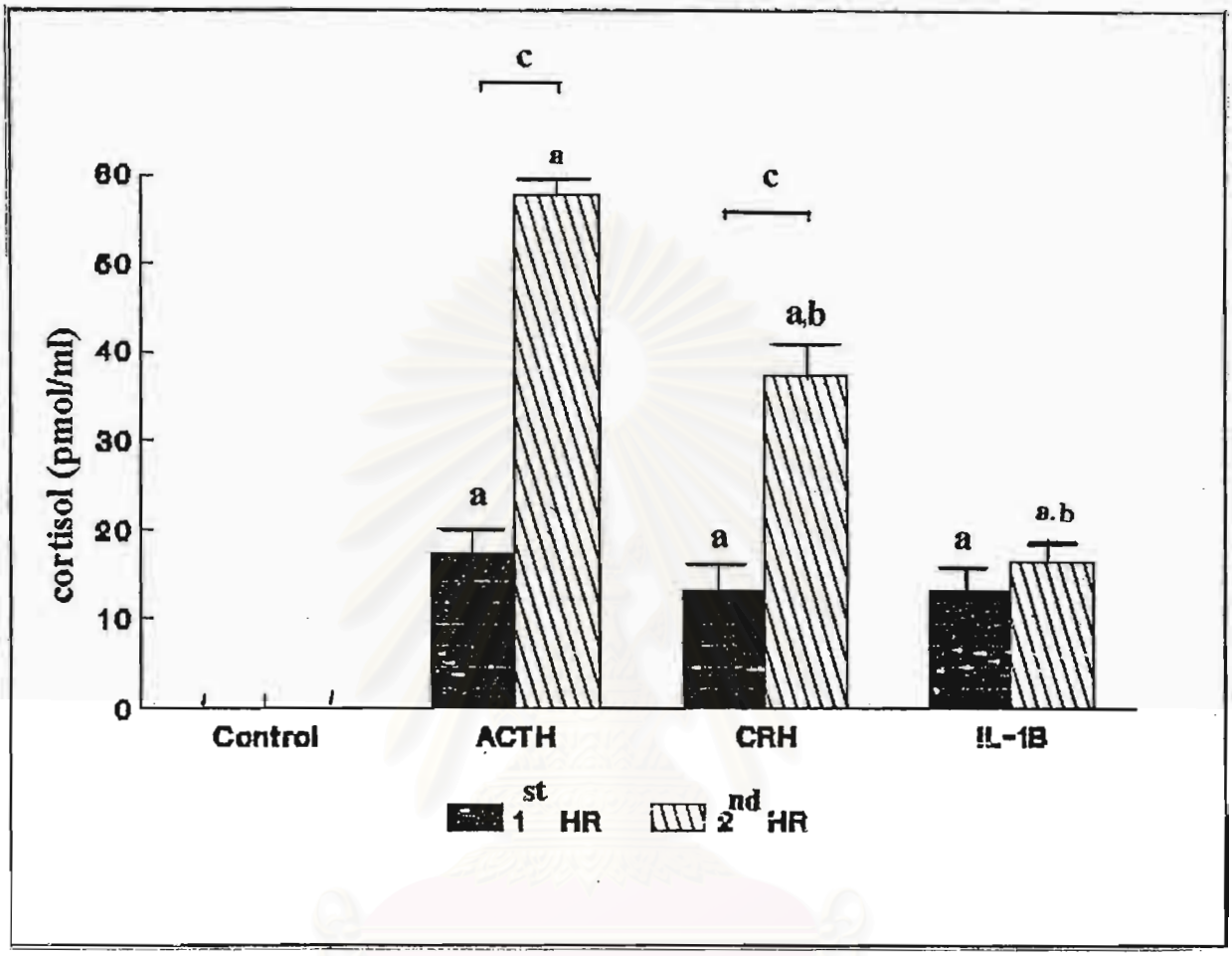
จากการทดลอง พบว่า ACTH,CRH และ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-8} M สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงได้ 1 ชั่วโมงแรกใน media M 199 โดยมีปริมาณการหลั่ง 17.15 $\pm$ 3.14 pmol/ml (n=11),13.17 $\pm$ 2.6 pmol/ml (n=12) และ 12.95 $\pm$ 5.04 pmol/ml (n=10) ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 2 สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol เพิ่มขึ้นโดยมีปริมาณ 57.37 $\pm$ 4.41 pmol/ml (n=11), 37.17 $\pm$ 12.90 pmol/ml (n=8)และ 16.48 $\pm$ 1.89 pmol/ml (n=10) ตามลำดับซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแทบจะไม่มีการหลั่ง cortisol ออกมาใน media เลย กลุ่มที่ใส่ CRH ปริมาณการหลั่ง cortisol จะน้อยกว่า ACTH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ส่วนกลุ่ม IL-1β จะกระตุ้นการหลั่ง cortisol ได้น้อยกว่า ACTH และ CRH เมื่อเปรียบเทียบการหลั่ง cortisol ในระหว่างชั่วโมงแรก และชั่วโมงที่ 2 ของการ incubate ปริมาณการหลั่ง cortisol ในชั่วโมงที่ 2 เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH และ CRH จะมากกว่าชั่วโมงแรกอย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 4 แสดงผลของ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M จาก adrenal slice เมื่อ incubate ใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่างชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2



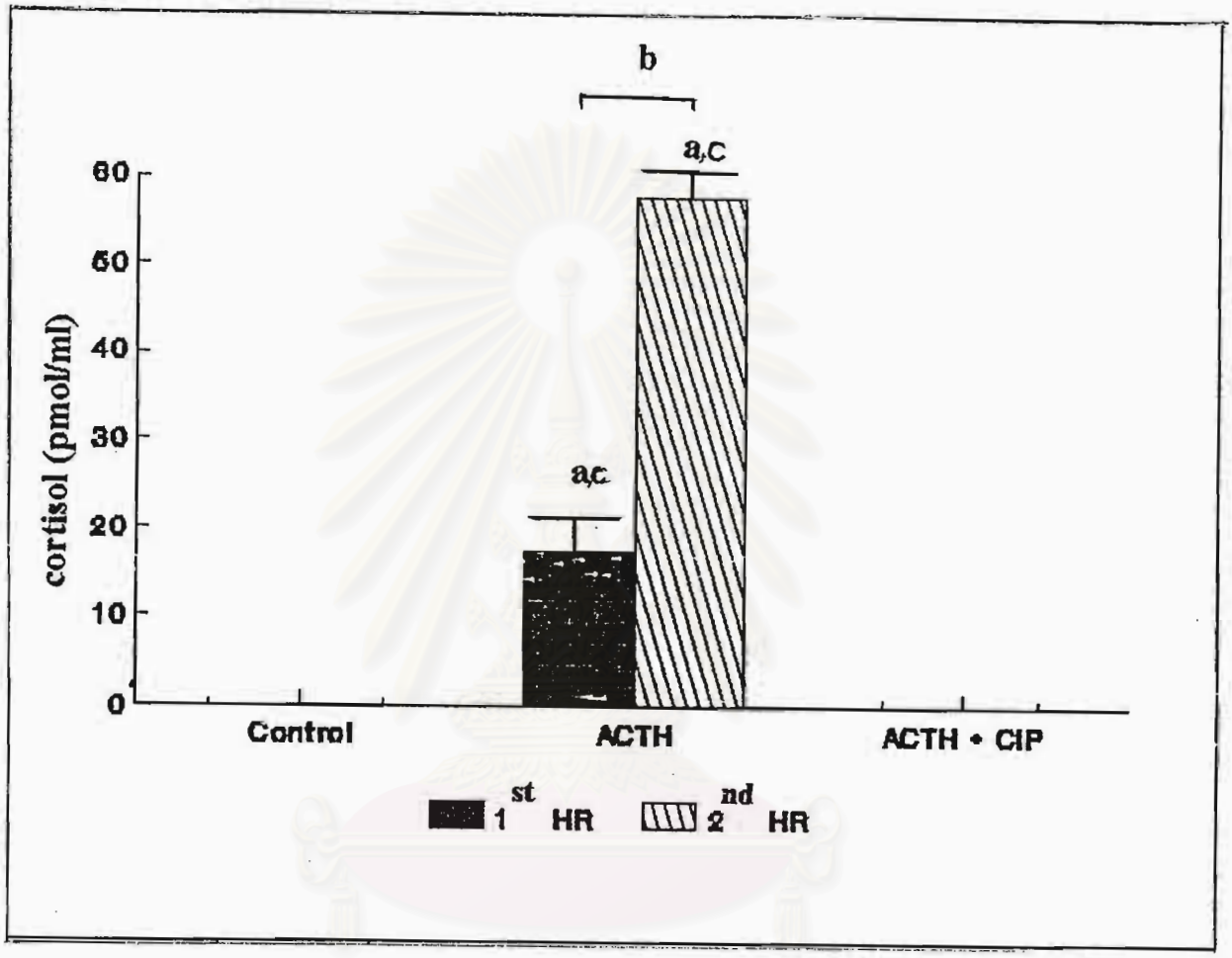
รูปที่ 5 แสดงผลของ ACTH, CRH และ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-8} M ต่อการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก isolate adrenal cells เมื่อ incubate ใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยวัดหาปริมาณ cortisol ที่หลั่งใน media แต่ละชั่วโมงค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม, b = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม ACTH และ c = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่างชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2

ผลของ CIP ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH จาก isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 6)

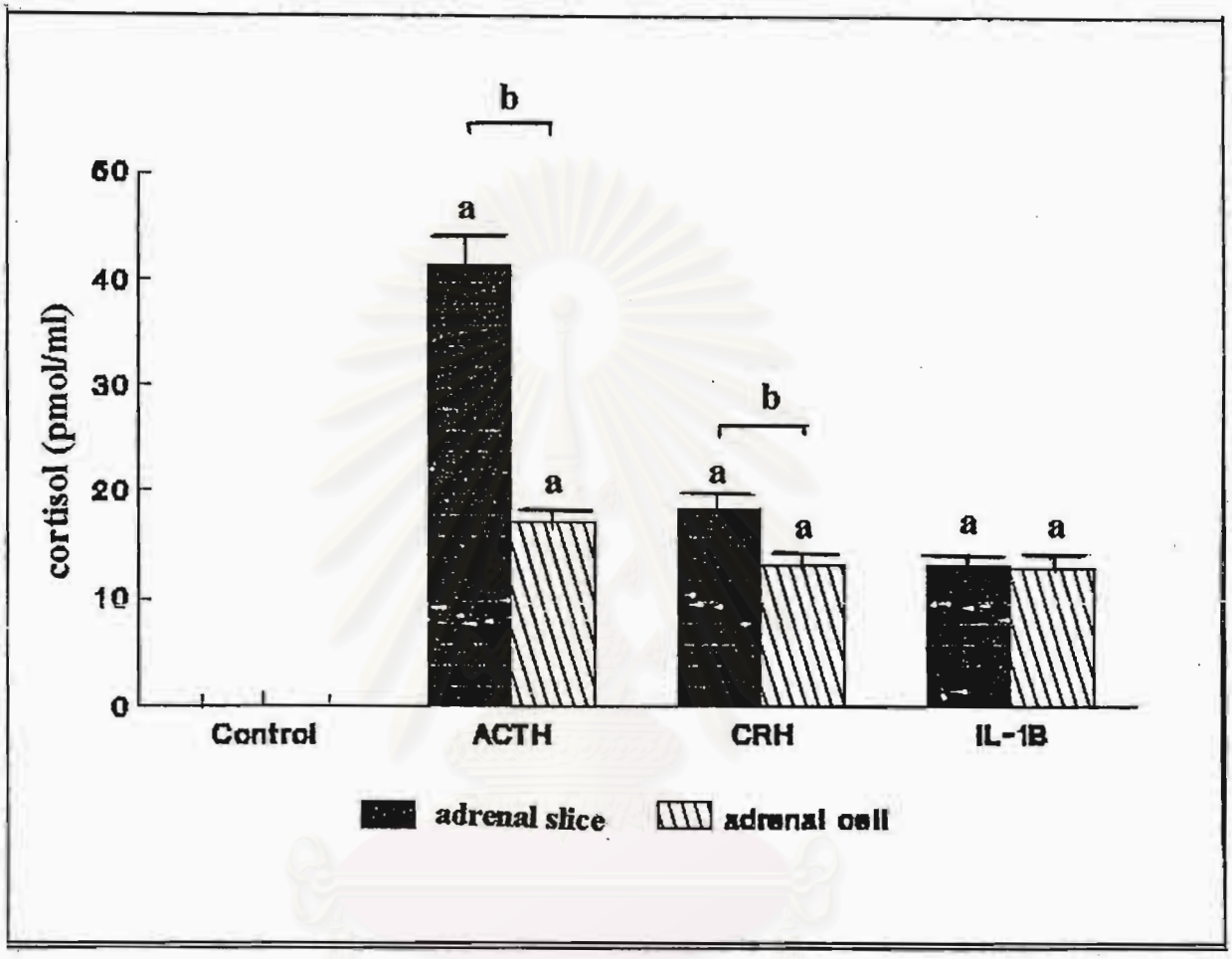
จากการทดลองพบว่า ACTH 10^{-6} M สามารถ กระตุ้นการหลั่ง cortisol ได้ 17.15 $\pm$ 3.14 pmol/ml (n=11) และ 57.37 $\pm$ 4.41 pmol/ml (n=11) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงในชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2 ตามลำดับ แต่ใน media ที่ใส่ CIP 10^{-6} M จะยับยั้งการหลั่ง cortisol ได้อย่างสมบูรณ์ (0 pmol/ml,n=10) ไม่ว่าจะหลั่งภายใน 1 ชั่วโมงแรก หรือชั่วโมงที่ 2 ก็ตาม ซึ่งค่าที่ได้จะไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (รูปที่ 7)

จากการทดลองพบว่าปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH ความเข้มข้น 10^{-6} M จะมีปริมาณเท่ากับ 41.08 $\pm$ 8.56 pmol/ml (n=14) ซึ่งมากกว่าการหลั่งจาก isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 17.15 $\pm$ 3.14 pmol/ml (n=9) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และถ้ากระตุ้นด้วย CRH ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 18.37 $\pm$ 4.86 pmol/ml (n=11) มากกว่าจาก isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 13.17 $\pm$ 2.60 pmol/ml (n=8) ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และถ้ากระตุ้นด้วย IL-1β ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 13.19 $\pm$ 0.69 pmol/ml (n=8) ซึ่งใกล้เคียงกับจาก isolated adrenal cell คือ 12.15 $\pm$ 5.04 pmol/ml (n=10)



รูปที่ 6 แสดงผลของ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ต่อการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH ความเข้มข้น 10^{-8} M จาก isolate adrenal cell เมื่อ incubate ใน M 199 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่ง ระหว่าง ชั่วโมงที่ 1 และชั่วโมงที่ 2



รูปที่ 7 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate ด้วย ACTH, CRH หรือ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-8} M ใน M 199 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่าง adrenal slice และ isolated adrenal cell

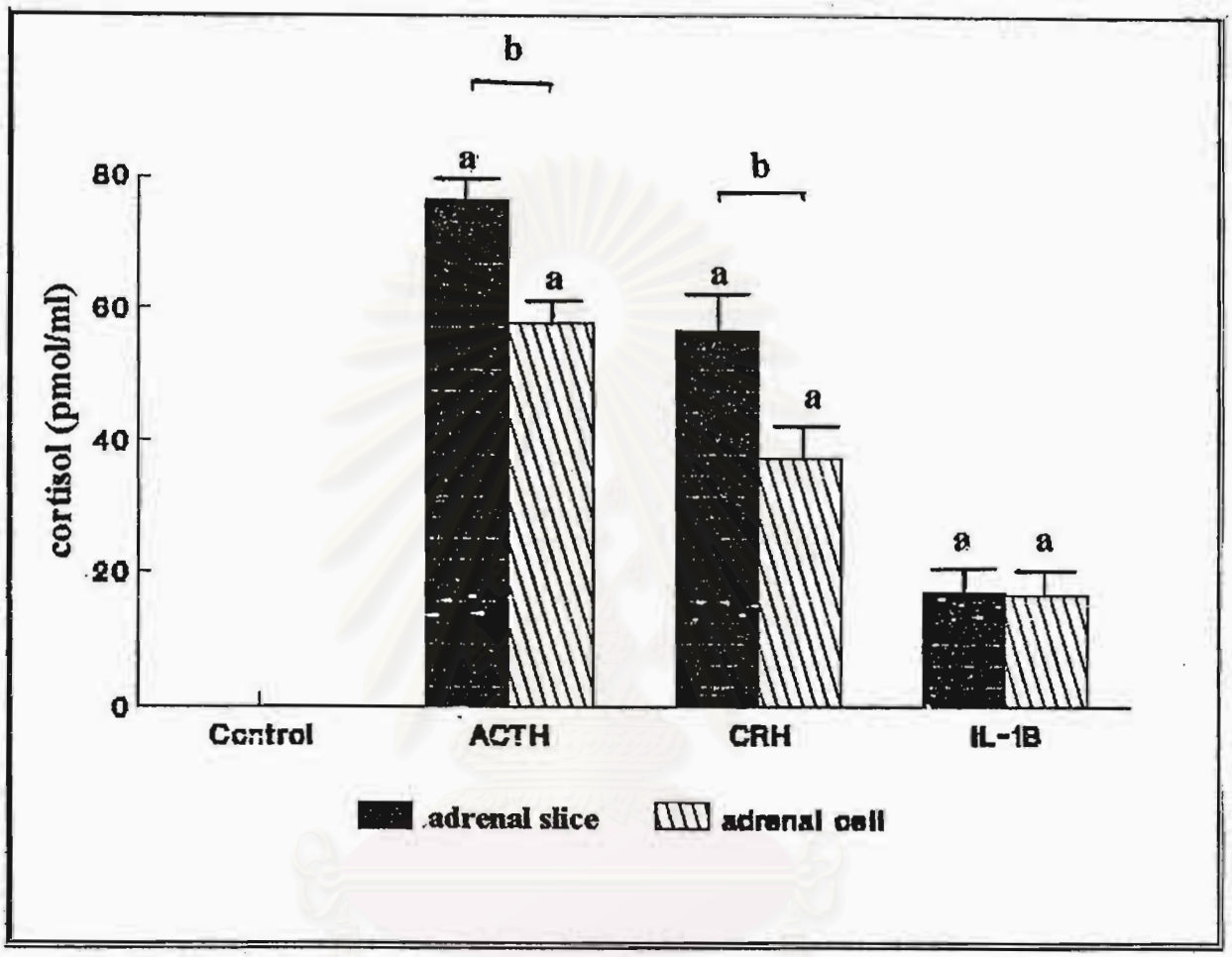
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการเปรียบเทียบการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงชั่วโมงที่ 2 (รูปที่ 8)

จากการทดลองพบว่า ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH ความเข้มข้น 10^{-8} M จะมีปริมาณเท่ากับ 76.36 $\pm$ 10.04 pmol/ml (n=14) ซึ่งมากกว่าการหลั่งจาก isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 57.32 $\pm$ 4.41 pmol/ml (n=11) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และถ้ากระตุ้นด้วย CRH ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 56.16 $\pm$ 5.0 pmol/ml (n=11) มากกว่าจาก isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 37.17 $\pm$ 12.90 pmol/ml (n=8) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) และถ้ากระตุ้นด้วย IL-1β ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 16.87 $\pm$ 1.57 pmol/ml (n=12) ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณการหลั่งจาก isolated adrenal cell คือ 16.48 $\pm$ 1.89 pmol/ml (n=10)

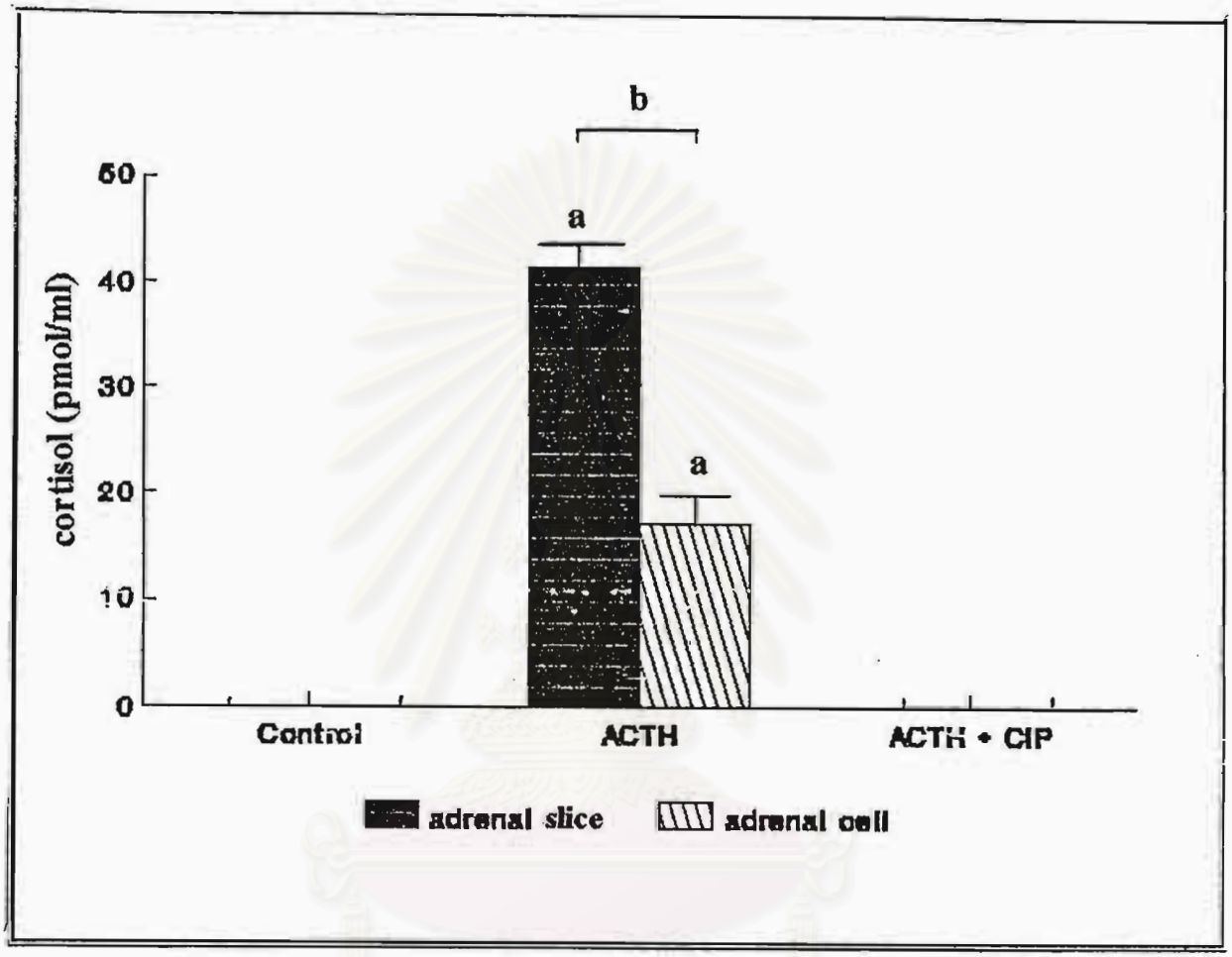
เปรียบเทียบผลของการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงชั่วโมงที่ 1 (รูปที่ 9)

จากการทดลองพบว่าปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH 10^{-8} M จะมีปริมาณเท่ากับ 41.08 $\pm$ 8.56 pmol/ml (n=14) ซึ่งมากกว่าการหลั่งจาก isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 17.15 $\pm$ 3.14 pmol/ml (n=14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แต่ถ้าใส่ CIP ความเข้มข้น 10^{-8} M ลงไป ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 0.14 $\pm$ 0.12 pmol/ml (n=10)และใน isolated adrenal cell จะมีปริมาณเท่ากับ 0.00 pmol/ml (n=12) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ผลการเปรียบเทียบ ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate ด้วย ACTH, CRH หรือ IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M ใน M 199 ใน ชั่วโมงที่ 2 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่าง adrenal slice และ isolated adrenal cell



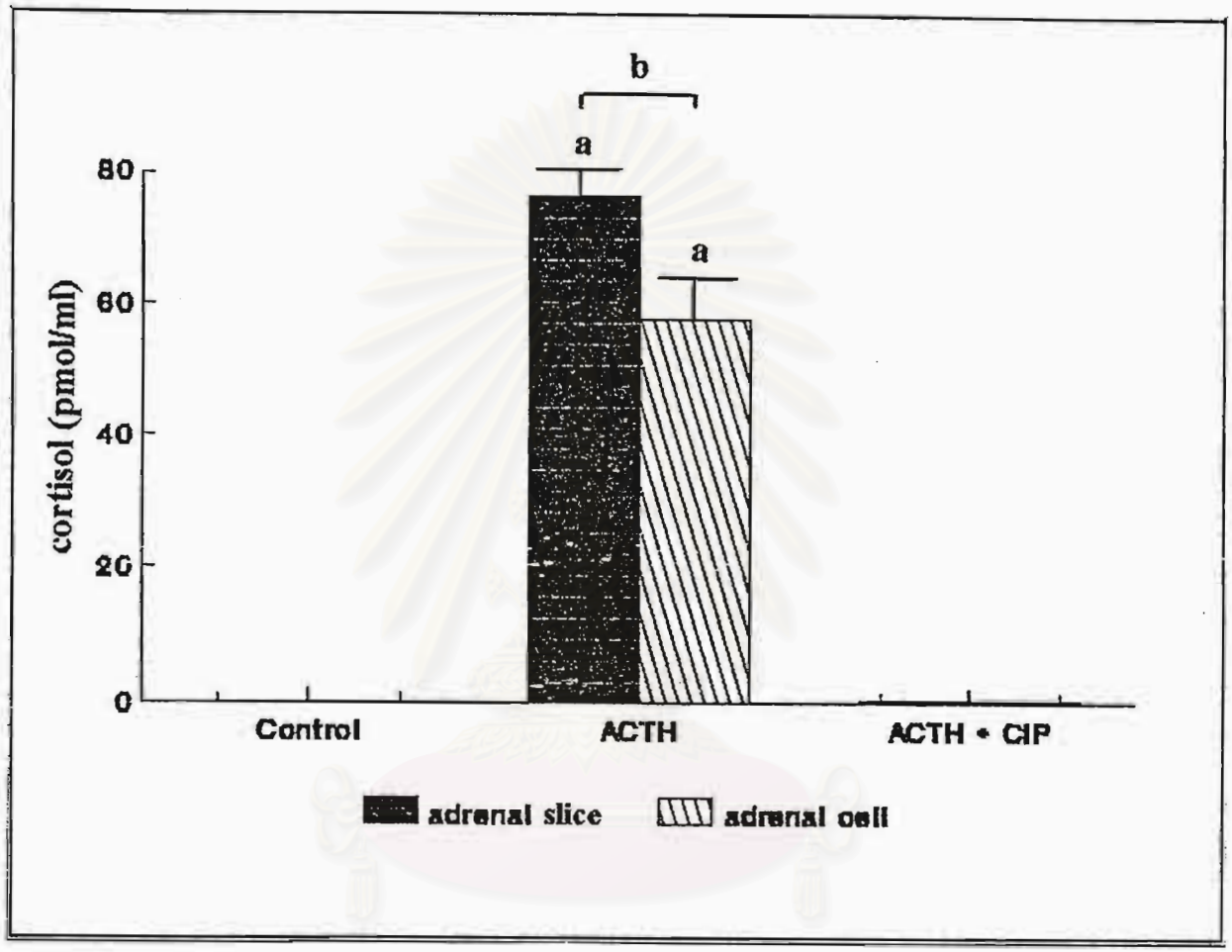
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 เปรียบเทียบผลของ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate ใน M 199 ในชั่วโมงที่ 1 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่าง adrenal slice และ isolated adrenal cell

<u>เปรียบเทียบผลของการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อเลี้ยงชั่วโมงที่ 2</u> (รูปที่ 10)

จากการทดลองพบว่า ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH 10^{-8} M จะมีปริมาณเท่ากับ 76.36 $\pm$ 10.04 pmol/ml (n=14) ซึ่งมากกว่า isolated adrenal cell ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ 57.32 $\pm$ 4.41 pmol/ml (n=11) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) แต่ถ้าใส่ CIP 10^{-8} M ลงไป ปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมีปริมาณเท่ากับ 0.50 $\pm$ 0.19 pmol/ml(n=11)และใน isolated adrenal cell จะมีปริมาณเท่ากับ 0.78 $\pm$ 0.13 pmol/ml (n=14) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 10 เปรียบเทียบผลของ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell เมื่อ incubate ใน M 199 ในชั่วโมงที่ 2 ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ standard deviation, a = $P<0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ b = $P<0.01$ เมื่อเทียบการหลั่งระหว่าง adrenal slice และ isolated adrenal cell

ผลการแยกเซลล์ต่อมหมวกไต และ % จำนวนเซลล์มีชีวิต (viability)

จากการแยกเซลล์ต่อมหมวกไต ของแฮมสเตอร์ ครั้งละ 10 ตัว โดยใช้เอนไซม์ 0.3 % collagenase & 0.1 % trypsin และ EDTA พบว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แยกได้ เท่ากับ $40.58 \times 10^{6} \pm 10.00$ เซลล์ต่อ 6 มิลลิลิตร และมี % viability เท่ากับ 63.19 ± 3.14 จากจำนวน 13 ครั้ง (ตารางที่ 2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงผลการแยกเซลล์ต่อมหมวกไตของแฮมสเตอร์ครั้งละ 10 ตัว และ % จำนวนเซลล์มีชีวิต (viability)

ครั้งที่	จำนวนเซลล์ที่นับได้ (Total cell count) (cell/6 ml) x 10^6	% จำนวนเซลล์มีชีวิต (viability)
1	50	61
2	38	68
3	28.5	65.5
4	20	63
5	37	63
6	50	62.5
7	37	61
8	35	67
9	57	60
10	46	58
11	50	61
12	40	68
13	39	63.5
ค่าเฉลี่ย $\pm$ S.D.	40.58 $\pm$ 10.0	63.19 $\pm$ 3.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผล

จากผลการทดลอง เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จาก adreanl slice เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (รูปที่ 1) พบว่าที่ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถกระตุ้นการหลั่ง cortisol ออกมาใน media มากกว่าความเข้มข้นอื่น เช่น 10^{-8} M หรือ 10^{-10} M แสดงว่าความเข้มข้น 10^{-6} M เป็นความเข้มข้นที่พอเหมาะต่อการกระตุ้นการหลั่ง cortisol ในแฮมสเตอร์ และจากการศึกษาของ Andreis และคณะ (1991b)ได้ทดลองใช้ IL-1β ความเข้มข้นระหว่าง 10^{-10} ถึง 10^{-5} M ฉีดเข้าไปในหนูที่ตัดต่อมใต้สมองออก พบว่า IL-1β ความเข้มข้น 10^{-6} M จะกระตุ้นการหลั่ง corticosterone ได้มากที่สุด นอกจากนี้ได้มีผู้ทำการทดลองใน <u>in vitro</u> ศึกษาถึงความสัมพันธ์ของจำนวนความเข้มข้นของ ACTH ต่อปริมาณการหลั่ง corticosterone ในต่อมหมวกไตของหนูแรทที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยว (cell suspension) เทียบกับ homogenized cell suspension พบว่าจำนวนความเข้มข้นต่างกัน จะมีผลต่อปริมาณการหลั่งของ corticosterone ต่างกันด้วย (Kloppenborg et al., 1968)

สำหรับความเข้มข้น ที่เหมาะสมของ CIP ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH 10^{-6} M จาก adrenal slice เมื่อ incubate เป็นเวลา 2 ชั่วโมงนั้น จากการศึกษา ดังรูปที่ 2 พบว่า CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M สามารถยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Andreis และคณะ

(1991a) ที่พบว่า CIP หรือ corticotropin inhibiting peptide ($ACTH^{7-38}$) เป็น competitive inhibitor ของ ACTH เมื่อใส่ใน media ที่เลี้ยงเซลล์ต่อมหมวกไตของหนูแรทที่ใส่ ACTH ด้วย CIP จะไปแย่งจับที่ receptor ของ ACTH ทำให้ ACTH ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่ง corticosterone ได้

จากการเปรียบเทียบผลของตัวกระตุ้นการหลั่ง cortisol ดังรูปที่ 3 และ 5 พบว่าปริมาณการหลั่ง cortisol เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH, CRH หรือ IL-1β จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งใน adrenal slice และ isolated adrenal cell สำหรับ ACTH นั้นเป็นตัวกระตุ้นต่อมหมวกไตให้สร้างและหลั่ง cortisol โดยตรง (Guyton, 1981) ส่วน CRH นั้น สามารถกระตุ้นต่อมหมวกไตให้หลั่ง corticosterone ได้ในหนูแรท โดยไม่ต้องอาศัย การกระตุ้นของ ACTH จากต่อมใต้สมอง (Bornstein et al., 1990; Fehn et al., 1988; Hashimoto et al., 1984; Minamino et al., 1988; Suda et al., 1984) รวมทั้ง Aguilera (1987) ได้พบ receptor ของ CRH ที่ adrenal medulla ของหนูแรท จึงเป็นไปได้ว่า CRH สามารถกระตุ้น adrenal cell ได้โดยตรงให้หลั่ง cortisol ได้ นอกจากนี้ Gwasdow และคณะ (1990) ได้ศึกษาพบว่า IL-1β สามารถกระตุ้นต่อมหมวกไตของหนูแรทให้หลั่ง glucocorticoid ได้เช่นเดียวกัน

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการหลั่ง cortisol ระหว่าง adrenal slice และ isolated adrenal cell ดังรูปที่ 7 และ 8 เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH, CRH และ IL-1β พบว่าปริมาณการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice จะมากกว่า isolated adrenal cell อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า การแยกเป็นเซลล์เดี่ยว ทำให้เซลล์ได้รับการกระทบกระเทือนมากกว่า ดังเช่น Black และคณะ (1982) ได้ทำการแยกเซลล์ต่อมหมวกไตของหนูตะเภาโดยใช้เอนไซม์ต่าง ๆ พบว่าการใช้ collagenase

(2.5 mg/ml) ร่วมกับ trypsin (1 mg/ml) สามารถให้เซลล์ที่มีชีวิตได้สูงถึงร้อยละ 81.4 $\pm$ 12.6 และได้เซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละชั้นของต่อมหมวกไต ดังนี้ Zona glomerulosa (ZG) 17.84 %, Zona fasciculata (ZF) 4.50 % และ Zona reticularis (ZR) 1.50 % ต่อต่อม ซึ่งพบว่าได้เซลล์ในชั้น ZF ซึ่งจะสร้าง glucocorticoid ต่ำกว่าจำนวนเซลล์ ชนิดนั้นใน intact adrenal gland มาก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในชั้นลึก ๆ ของต่อมหมวกไตชั้นนอก จะมี gap junction ใหญ่มาก ในขณะเดียวกันถ้าแยกเซลล์ด้วย collagenase (2.5 mg/ml) เพียงอย่างเดียว จะให้เซลล์มีชีวิตได้สูงกว่าใช้ทั้ง collagenase และ trypsin แต่เมื่อนำไปทดลองโดยกระตุ้นด้วย ACTH ปริมาณการหลั่ง cortisol ออกมาจะน้อยกว่าการให้ทั้งสองอย่างร่วมกัน Black และคณะ (1982) ได้ทำการทดลองศึกษาเกี่ยวกับ การใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ พบว่าจะมีผลต่อปริมาณเซลล์ที่แยกอิสระ จากการทดลองนี้ได้ใช้ 0.3 % collagenase ร่วมกับ 0.1 % trypsin แยกเซลล์ต่อมหมวกไต ได้จำนวนเซลล์เฉลี่ย 1.2×10^6 เซลล์ต่อต่อม และเมื่อตรวจสอบดูจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยการย้อมสี tryppan blue จะได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เฉลี่ยร้อยละ 63.19 (ดังตารางที่ 2) ทั้งนี้อาจเกิดจากการแยกเซลล์โดยใช้ mechanical force ด้วยการเป่าดูดด้วย pipette แรง ๆ อาจไปทำให้ junction เหล่านี้ฉีกขาด และทำให้เซลล์ได้รับการกระทบกระเทือน Bruhn และคณะ (1987) พบว่าตำแหน่งของเซลล์ที่ผลิต corticotropin releasing factor นอกจากจะพบที่ hypothalamus แล้วยังพบตรงขอบเขตระหว่าง adrenal medulla และ adrenal cortex ซึ่งจากการทดลองนี้ปริมาณการหลั่ง cortisol จะมากใน adrenal slice (ซึ่งจะมีทั้ง adrenal cortex และ adrenal medulla)

ปริมาณการหลั่ง cortisol ในชั่วโมงที่ 1 เทียบกับชั่วโมงที่ 2 เมื่อกระตุ้นด้วย ACTH, CRH หรือ IL-1β อ พบว่าการหลั่ง cortisol เพิ่มมากขึ้นในชั่วโมงที่ 2 ทั้งจาก adrenal slice และ isolated adrenal

cell (รูปที่ 3 และ 5) นอกจากนี้จากการทดลองเปรียบเทียบผลของการยับยั้งการหลั่ง cortisol จาก adrenal slice และ isolated adrenal cell โดยใช้ CIP ความเข้มข้น 10^{-6} M (รูปที่ 9 และ 10) พบว่าปริมาณการหลั่ง cortisol น้อยมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า CIP สามารถยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH ได้อย่างสมบูรณ์ สอดคล้องกับการทดลองของ Andreis และคณะ (1991a)

Chang และคณะ (1986) ได้ศึกษา Time course ของ IL-1β ต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมน prostaglandin พบว่าจะเพิ่มมากขึ้นในหนูแรท จากหลักฐานนี้อาจเป็นไปได้ ว่าฮอร์โมนแต่ละชนิดจะใช้เวลาในการเกิดปฏิกิริยารับ receptor บนเซลล์เป้าหมายและเกิดกลไกในการสร้างและหลั่งฮอร์โมนต่างกัน

จากการทดลองนี้สรุปได้ว่า

1. เซลล์ต่อมหมวกไตที่เลี้ยงในระยะเวลาสั้น ๆ โดยไม่มีสารกระตุ้นจะไม่สามารถหลั่ง cortisol ได้จนกว่าจะมีตัวกระตุ้นเช่น ACTH, CRH หรือ IL-1β

2. CRH และ IL-1β สามารถกระตุ้นเซลล์ต่อมหมวกไตให้มีการหลั่ง cortisol ได้เช่นเดียวกับ ACTH แต่มีปริมาณน้อยกว่า

3. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ ACTH, CRH และ IL-1β ในการกระตุ้นการหลั่ง cortisol จากต่อมหมวกไตของหนูแฮมสเตอร์ คือ 10^{-8} M

4. ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ CIP ในการยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่เกิดจากการกระตุ้นของ ACTH คือ 10^{-6} M

5. CIP สามารถยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่หลั่งเนื่องจากการกระตุ้น ของ ACTH ได้อย่างสมบูรณ์

6. ปริมาณการหลั่ง cortisol จากต่อมหมวกไตที่หั่นเป็นชิ้น จะมากกว่าจากต่อมหมวกไตที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7. ปริมาณการหลั่ง cortisol จากอะดรีนัลเซลล์ โดยตัวกระตุ้นต่าง ๆ ที่เลี้ยงในชั่วโมงที่ 2 จะมากกว่าชั่วโมงแรก

รายการอ้างอิง

Abraham, G.E. Ovarian and Adrenal contribution to Peripheral Androgen during the Mestrual Cycle. J.Clin. Endrocrinol. Metab. 39 (1974) : 340-346.

Aguilera, G., Millan, M.A., Hanger, R.L.,and Catt, K.J. Corticotropin releasing factor receptors: distribution and regulation in brain, pituitary and peripheral tissues. Am. NYA cad Sci 512 (1987) : 48-66.

Andreis, P.G., Neri, G. and Nussdorfer, G.E. corticotropin releasing hormone (CRH) directly stimulates corticosterone secretion by the adrenal gland. Endocrinol. 123 (1991a) : 1198-1200

————, P.G., Neri, G., Belloni, A.S., Mazzocchi, G., Kasprzak, A., and Nussdarfor, G.G. Interleukin-1β enhances corticosterone secretion by acting directly on the rat adrenal gland. Endocrinol. 129 (1991b) : 53-57.

Belloni, A.S., Neri, G., Musajo, F.G., Andreis, P.G., Boscaro, M., Agotino, D., rebuffat, P., Boshier, D.P., Gottardo, G., Nazzocchi, G. and Nussdorfer G.G. Investigations on the morphology and function of adrenocortical tissue regenerated from gland capsular fragments autotransplanted in the musculus gracilis of the rat. Endocrinol. 126 (1990) : 3251-3262.

Besedovsky, H., Delrey, A., Sorkin, E., and Dinarello, C.A. Immuno regulatory feedback between Interleukin-1 and glucocorticoid hormone. Science. 233(1986) : 652-654.

Bethune, J.E. The adrenal cortex. Kalamazoo, Michigan: Upjohn, 1975.

Black, V.H., Mierlak, J., Katz, T., Huima, T., Miao, P. and McNanara, N. Isolated Guine Pig Advenocrotical Cell in Vitro : Morphology and Stevoidogenesis in Control and ACTH Treated Cultures. Am. J. Anat. 165 (1982) : 225-248.

Bornstein, S.R., Ehrhart,M., Sherbaum, W.A., and Pfriffer, E.F. Adreno cortical atrophy of hypophysectomized rats can be reduced by corticotropin releasing hormone (CRH). Cell Tissue Res. 260(1990) : 161-166.

Bruhn, T.O., Engeland, W.C., Anthony, E.L., Gann, D.S., and Jackson, L.M. Corticotropin Releasing Factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage. Endocrinol. 120 (1987) : 25-33.

Butler, M., and Dawson, M. Cell culture. Oxford : Information press Ltd, 1992.

Chang, J., Gilman, S.C. and Levis, A.J. Interleukin-1 activates phospholipase A_2 in Rabbit chondrocytes : a possible signal for IL-1 action J. Immunol. 136 (1986) : 1283-1287.

Dave, J.R., Eiden, L.E. and Eskay, r.L. Corticotropin releasing factor binding to peripheral tissue and activation of the adenylate cyclase adenosine 3',5' monophosphate system. Endocrinol. 176 (1985) : 2152-2159.

Edwards, A.V., Jones, C.T., and Bloom, S.R. Reduced adrenal cortical sensitivity to ACTH in lambs with cut splanchnic nerves. J. Endocrinol. 110 (1986): 81-85.

————, A.V., and Jones, C.T. Secretion of corticotropin releasing factor from the adrenal during splanchnic nerve stimulation in concious calves. J. Physiol (London). 400 (1988) : 89-100.

Ekin, R.p."Theoretical Aspects of Saturation Analysis" In Vitro Procedures with Radioisotopes in Medicine International Atomic Energy Agency, Vienna, 325,1970.

Engeland, W.C., and Gann, D.S. Splanchnic nerve stimulation modulates steroid secretion in hypophysectomized dogs. Neuroendocrinol. 50(1989) : 124-131.

Fehn, H.L., Holl, R., Spatsch walbe, E., born, T., and Voight, K.H. Ability of corticotropin releasing hormone to stimulate cortisol secretion independent from pituitary adrenocorticotropin. Life sci. 42 (1988) : 679-686.

Ganong, W.F. Review of medical physiology. 12th ed. Singapore : Lange Medical Pub., Maruzen Asian Edition, 1993.

Gorbman, A., Dickhoff, W.W., Vigna, S.R., Clark, N.B., and Ralph, C.L. Comparative Endocrinol. New York: John Wiley & Sons, 1984.

Guyton, A.C. Medical Physiology. Philadelphia : W.B. Saunders Company, 1993.

Gwasdow, A.R., Kumar, M.S.A., and Bode, N.H. Interleukin-1β stimulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis. Am. J. Physiol. 258 (1990) : E 65-E 70.1

————, A.R., Spensor, J.A., O'Couneil, N.A. and Abousamra, A.B. Interleukin-1 activates Protein Kinase A and stimulation adrenocorticotropic hormone release from AtT-20 cells. Endocrinol. 132 (1993) : 710-714.

Haning, R., Tait, S.A.S. and Tait, J.f. In vitro effect of ACTH, Angiotensin, Serotonin and potassium on steroid output and conversion of corticosterone to Aldosterone by isolated adrenal cells. Endocrinol. 87 (1970) : 572 - 576.

Hashimoto, K., Murakami, K., Hattori, T., Nimi, M., and Fujimo, K.O. corticotropin releasing factor like immunoreactivity in the adrenal medulla : Peptides. 5 (1984) : 707-712.

Helle, M., Brakenhoff, J.P.J., DeGrort, E.R., and Acreden, L.A. Interleukin 6 is involved in interleukin-1 induced activities. J. Immunol. 18 (1988) : 957-960.

Hinson, J.P. Paracrine control of adrenocortical finction: a new role for the medulla J. Endocrinol. 124(1990) : 7-9.

Hoffman, R.A., Robinson, P.I. and Magalhaes, H. The golden hamster. U.S.A. The loaa state University Press, 1968.

Kaneko, M., Kaneko, K., Shinsako, J. and Dallman, M.F. Adrenal sensitivity to Adrenocroticotropin varies Diurnally Endocrinol. 109 (1981) : 70-75.

Kloppenborg, P.O.W., Island, G.W., Liddel, G.W., Mcchelakis, A.M., and Nicholson, N.E. A method of preparing adrenal cell suspensious and its applicability to in vitro study of adrenal metabolism. Endocrinol. 82 (1968) : 1053-1058.

Kohen, E., Kohen, C., and Thorell, B. Enzymatic and mechanical requirements for dissociation of cortical cells from rat adrenal glands. Exp.cell res. 74(1973) : 263-274.

Li, C.H., Chung, D., Yamashiero, D., and Lee, D.Y. Isolation, characterization and synthesis of a corticotropin inhibiting peptide from human pituitary gland. Proc. Nat. Acad. Sci. 75 (1978) : 4306-4309.

Mazzocchi, G., Rebuffat, P., Meuoghelli, U., and Nussdorfer, G.G. Effect of infusion with ACTH or CRH on the secretory activity of the rat adrenal cortex. J. Steroid Biochem. 32 (1989) : 841-843.

Migally, N., The innervation of the mouse adrenal cortex. Anatomical Record. 194(1979) : 105-112.

Mikhail, Y. and Amin, F. Intrinsic innervation of the human adrenal gland. Acta Anatomica. 72(1969) : 25-32.

Minamino, N., Vehara, A., and Arimura, A. Biological and immunological characterization of corticotropin releasing activity in the adrenal medullar. Reptides. a (1988) : 37-45.

Natarajan, R., Ploszai, S., Harton, R. and Nadler, J. Tumor necrosis factor and IL-1 are potent inhibitors of angiotenson II induced aldosterone synthesis. Endocrinol. 125 (1989) : 3084-3089.

Navara, P., Tsagarakis, S., Faria, M.S., Rees, L.H., Besser, G.M. and Grossman, A.B. Interleukin-1 and -6 stimulate the release of corticotropin releasing hormone-41 from rat hypothalamus in vitro via the eicosanoid cyclooxygenase pathway. Endocrinol. 128 (1990) : 37-44.

Purwar, R.S. Neuro-histochemical study of the adrenal gland of Rattus rattus rufescens (Indian black rat) as revealed by cholinesterase technique. Acta Anatomica. 102(1978) : 29-32.

Robinson, P.M., Perry, R.A., Hardy, K.J., Coghlan, G.P., and Scoggins, B.A. The innervation of the adrenal cortex in the sheep, Ovis ovis. J. Anat. 124(1977) : 117-129.

Roh, M.S., Drag Enovich, K.A., Barbase, J.J., Dinavello, C.A., and Cobb, C.F. Directly stimulation of the adrenal cortex by IL-1β. Surgery. 102 (1987) : 140-146.

Silbley, C.P., Whitehouse, B.J., Vinson, G.P., Goddard, C., and MeGrediec, E. Studies on the mechanism of secretion of corticosteroids by the isolated perfused adrenal of the rat. J. Endocrino. 93 (1987) : 313-323.

Spangelo, B.L., Isakson, P.C. and Macleod, R.M. Production of interleukin-6 by anterior pituitary cell. is stimulated by increased intracellular adenosine 3',5'-monophosphate and vasoactive intestinal peptide Endocrinol. 127 (1990) : 403-409.

Sparrow, R.A., and Coupland, K.E. Blood flow to the adrenal gland of the rat. J. Anat. 155 (1987) : 51-61.

Suda, T., tomori, N., Tozawa, F., Momi, T., Demura, H., and Shizume, K. Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin releasing factor in human tissue. J. Clin. Endocrinol. Metab. 59 (1984) : 861-867.

Sufi, S., Donaldson, A. and Jeffcoate, S.L. "WHO Method Manual for RIA." 10th ed.,1986

Tadeschi, C.T. Cell Physiology. De robertis CH 21 : Academic Press, 1974.

Tennant, J.R. evaluation of the trypan blue technique for determination of cell viability. Transplantation. 2 (1964) : 685-694.

Unsicker, K. Innervation der Nebennierenrinde vom Goldhamster [Innervation of the adrenal cortex of the syrian hamster] J.Anat. 95(1969) : 608-619.

Uno, H. Catecholaminergic terminals in the perisinusoidal spaces of the hepatic acini and adrenal cortex of macaques. Anatomical Record. 187(1977) : 735 (Abstract).

Van Oers, J.W.A.M., Himon, J.P., Bennekade, R. and Tilderr, F.J. Physiology role of corticotropin releasing factor in the control of adrenocorticotropin mediated corticosterone release from the rat adrenal gland. Endocrinol. 130 (1992) : 282-288.

Vinson, G.P. & Whitehouse, B.J. Compartmental arrangement of steroids formed from [(I-^{14}C)] acetate by rat adrenal zona glomerulosa, and the effect of corticotrophin. Acta Endocrinol. 72(1973):737-745.

Winter, J.S.D., Gow, K.W., Perry, Y.S. and Greenberg, A.H.A. Stimulatory effect of interleukin-1 on adreno-cortical secretion mediated by prostaglandin. Endocrinol. 127 (1990) : 1904-1909.

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเกวลิน เค้ามูล เกิดวันที่ 13 มิถุนายน 2512 ได้รับปริญญาพยาบาลศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อปีการศึกษา 2533 เข้าศึกษาในหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ในบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2535 ได้รับทุนผู้ช่วยวิจัยของภาควิชาสหสาขาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย