



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การปรับตัวของระบบเซโรโทนินในสมองหลังได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนปริมาณต่ำ
ร่วมกับยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโทนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” ในหนูที่ขาดเอสโตรเจน:
ศักยภาพในการประยุกต์เพื่อใช้ลดอาการวิตกกังวล ในหญิงหลังหมดประจำเดือน

โดย อ.ดร.จันทริมา เจริญพันธุ์

มีนาคม 2554

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การปรับตัวของระบบเซโรโทนินในสมองหลังได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนปริมาณต่ำ
ร่วมกับยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโทนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” ในหนูที่ขาดเอสโตรเจน:
ศักยภาพในการประยุกต์เพื่อใช้ลดอาการวิตกกังวล ในหญิงหลังหมดประจำเดือน

ผู้วิจัย

อ.ดร.จันทริมา เจริญพันธุ์

สังกัด

สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ ม.ธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ และคำสำคัญ	4
Abstract and keywords	5
Executive Summary	6
เนื้อหางานวิจัย	11
Output ที่ได้จากโครงการ	32
ภาคผนวก	33

บทคัดย่อ

ฤทธิ์ต้านอาการวิตกกังวลของยาฟลูอ็อกซีทีนมีผลลดประสิทธิภาพลงในผู้ป่วยที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน และ/หรือในผู้ที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน อย่างไรก็ตาม ปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เคยได้รับการทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในโมเดลที่ใช้หนูขาวเพศเมียที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน ในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาพฤติกรรมกังวลในหนูขาดเอสโตรเจนจากการตัดรังไข่ขนาด 4 สัปดาห์ ซึ่งได้รับยาเอสโตรเจนเสริม (10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนัง) และ/หรือ ยาฟลูอ็อกซีทีน (10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปาก) เนื่องจากเป็นที่ทราบดีว่าฟลูอ็อกซีทีนมีผลลดอาการวิตกกังวลในหนูเพศผู้ ผู้วิจัยจึงทดสอบผลของยาฟลูอ็อกซีทีนในหนูเพศผู้ก่อน ผลการวิจัยพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับยาฟลูอ็อกซีทีนมีระดับความกังวลลดลง ซึ่งเป็นการยืนยันว่ายานี้มีประสิทธิภาพในการต้านอาการวิตกกังวลจริง แต่การวิจัยในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่กลับพบว่าระดับความกังวลไม่มีความแตกต่างกันในหนูที่ได้และไม่ได้รับยานี้ ส่วนเอสโตรเจนที่ให้เสริมในหนูที่ตัดรังไข่สามารถลดความกังวลได้ และการให้ยาฟลูอ็อกซีทีนในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนเสริมไม่ทำให้ความกังวลลดลงมากขึ้น ซึ่งเป็นการยืนยันว่า ยาฟลูอ็อกซีทีนใช้ไม่ได้ผลในหนูที่ตัดรังไข่แม้ว่าจะได้รับเอสโตรเจนเสริมอยู่ด้วยก็ตาม นอกจากนี้ เอสโตรเจนมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีนเอสอีอาร์ที (ซึ่งสร้างโปรตีนขนส่งซีโรโทนินกลับเข้าเซลล์) และยีนทีพีเอช (ซึ่งสร้างโปรตีนทริปโตแฟนไฮดรอกซิเลสสำหรับสังเคราะห์ซีโรโทนิน) ในสมองหนูส่วนดอร์ซัลราเฟ แต่ไม่มีผลต่อยีนดังกล่าวในสมองส่วนฟรอนทัลคอร์เท็กซ์, ฮิปโปแคมปัส, เซปตัม, อะมิกดาลา และ เพอร์อะเควติกัล-เกรย์ ผลการวิจัยสรุปได้ว่า ยาฟลูอ็อกซีทีนมีผลลดความกังวลในหนูเพศผู้ แต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่แม้ว่าจะได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเสริมอยู่ อย่างไรก็ตามฮอร์โมนเอสโตรเจนเองกลับมีผลลดความกังวลในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากการปรับเมแทบอลิซึมของซีโรโทนินในสมองส่วนดอร์ซัลราเฟโดยฮอร์โมนเอสโตรเจน

คำสำคัญ : ความกังวล; ยาฟลูอ็อกซีทีน; ทริปโตแฟนไฮดรอกซิเลส; elevated plus-maze; elevated T-maze; open field

Abstract

The anxiolytic effect of fluoxetine (Flx) was often ineffective in postmenopausal and estrogen-deficient patients, but such effect had not been experimentally demonstrated, particularly in the female rat model of estrogen deficiency. Here we determined the anxietylike behaviors in ovariectomized (Ovx) rats treated for 4 weeks with 10 µg/kg 17β-estradiol s.c. (Ovx+E2), 10 mg/kg Flx p.o. (Ovx+Flx) or a combination of both (Ovx+E2+Flx). Since Flx is known to induce anxiolysis in males, we first evaluated the Flx regimen in male rats. The results showed that anxiety-like behaviors were reduced in Flx-treated male rats. In contrast, Ovx+Flx rats still exhibited the same anxiety-like behaviors as in Ovx rats. Both Ovx+E2 and Ovx+E2+Flx rats, however, showed comparable reductions in anxiety-like behaviors, suggesting that Flx had no anxiolytic-like effect. Furthermore, E2 and E2+Flx similarly upregulated the mRNA expression of serotonin reuptake transporter (SERT) and tryptophan hydroxylase-2 in the dorsal raphe of Ovx rats, while having no effect on SERT expression in the frontal cortex, hippocampus, septum, amygdala and periaqueductal gray. In conclusion, Flx induced anxiolytic-like action in male rats. In Ovx rats, it was E2 and not Flx that exerted the anxiolytic-like action, which was mediated, in part, by altering serotonin metabolism in the dorsal raphe.

Keywords : anxiety; elevated plus-maze; elevated T-maze; open field; real-time PCR; selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI); tryptophan hydroxylase (TPH)

6. ปัญหาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

เป็นที่ทราบกันดีว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทในการควบคุมระดับความกังวลของผู้หญิงตั้งแต่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จนกระทั่งถึงวัยหมดประจำเดือน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนต่ำ พบว่าผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนมักมีความผิดปกติของความกังวลเพิ่มสูงขึ้นกว่าช่วงก่อนหมดประจำเดือน เนื่องจากมีรายงานว่าเอสโตรเจนมีบทบาทควบคุมการทำงานของระบบสารสื่อประสาทในสมองหลายส่วนที่เกี่ยวข้องกับความกังวล ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า ความผิดปกติของระบบสารสื่อประสาทนี้จะเป็สาเหตุสำคัญของการเกิดความผิดปกติของความกังวล ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโทนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” (selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs) เช่น fluoxetine (Flx) ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเป็นยาคลายกังวล เป็นที่น่าสนใจว่า ยาในกลุ่มนี้ไม่สามารถลดอาการซึมเศร้าในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ แต่การให้ร่วมกับเอสโตรเจนทำให้ยา SSRIs สามารถออกฤทธิ์เพื่ลดอาการซึมเศร้าในผู้หญิงเหล่านี้ได้ จากข้อมูลทางคลินิกแสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ของยา SSRIs ต่อการลดอาการซึมเศร้าในเพศหญิงพึ่งพาการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย อย่างไรก็ตาม สำหรับฤทธิ์คลายกังวลของยา Flx ยังไม่ทราบแน่ชัดว่า Flx จะสามารถออกฤทธิ์คลายกังวลได้หรือไม่ในผู้ป่วยหญิงที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน

เป็นที่น่าสนใจว่าทั้งเอสโตรเจนและ SSRI สามารถยับยั้งการทำงานของ serotonin reuptake transporter (SERT) ได้ ซึ่งจะมีผลให้การทำงานของเซโรโทนินเกิดได้นานขึ้น นอกจากนี้ทั้งเอสโตรเจนและ SSRI ต่างก็สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ tryptophan hydroxylase (TPH) ส่งผลให้มีการสร้างเซโรโทนินเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามผลของทั้งเอสโตรเจนและ Flx ต่อปริมาณของ SERT และ TPH ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ทดลองเพศเมียที่ขาดเอสโตรเจน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนและ Flx ต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมกังวลในหนูขาวเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ โดยใช้ elevated plus-maze (EPM), elevated T-maze (ETM) และ open field นอกจากนี้ยังทำการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT ในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับความกังวล ได้แก่ frontal cortex, hippocampus, septum, amygdala, periaqueductal gray และ dorsal raphe และวัดระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง TPH1 และ TPH2 โดยเฉพาะที่ dorsal raphe

7. ระเบียบวิธีวิจัย

7.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศเมีย น้ำหนัก 170-190 กรัม และเพศผู้ น้ำหนัก 180-210 กรัม สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ควบคุมแสงสว่าง-มืด 12 ชั่วโมง ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลองหนูทุกตัวจะถูกชั่งน้ำหนักตัว และน้ำหนักมดลูก

7.2 ขั้นตอนดำเนินการวิจัยและการควบคุมการวิจัย

ภายหลังการปรับตัวของหนู 1 สัปดาห์ ในหนูเพศผู้ ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ป้อนน้ำปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Control) และกลุ่มป้อน Flx ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Flx) ทั้งน้ำและ Flx ถูกป้อนทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูเพศเมีย หนูทุกตัวถูกตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้อยู่ในภาวะขาดเอสโตรเจน ภายหลังการผ่าตัดรังไข่ หนูถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ หนูตัดรังไข่ (Ovx) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน (Ovx+E2) หนู

ตัดรังไข่ที่ได้รับยา Flx (Ovx+Flx) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนร่วมกับยา Flx (Ovx+E2+Flx) หลังจากสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บมดลูกเพื่อชั่งน้ำหนัก และเก็บสมองเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบเซโรโทนิน

7.3 วิธีการทดสอบพฤติกรรมกังวล

การทดสอบด้วย elevated plus-maze

EPM ทำจากไม้ทาสีดำทึบ ประกอบด้วยแขนเปิด 2 แขน และแขนปิด 2 แขน วางตั้งฉากกันคล้ายเครื่องหมายบวก มีความกว้าง 10 ซม. และยาว 50 ซม. โดยที่แขนปิดจะมีกำแพงสูง 50 ซม. ทั้งหมดยกสูงจากพื้น 50 ซม. เริ่มต้นทำการทดลองโดยวางหนูไว้ตรงกลางของ maze แล้วเริ่มจับเวลา 5 นาที พฤติกรรมของหนูที่จะนำไปวิเคราะห์ได้แก่ จำนวนครั้งที่เข้า และเวลาที่หนูใช้ในทุกแขนเปิด และแขนปิด นำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าจำนวนครั้งทั้งหมดที่หนูเข้าไปในแขนทั้ง 2 ข้าง ถ้าหนูตัวใดใช้เวลา และเข้าไปในแขนเปิดมากกว่า จะแสดงให้เห็นว่าหนูมีความกังวลน้อยกว่าหนูตัวอื่น และจำนวนครั้งทั้งหมดที่เข้าไปในแขนทั้ง 2 ข้าง และจำนวนครั้งทั้งหมดที่เข้าไปในแขนปิด จะแสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของหนู

การทดสอบด้วย elevated T-maze

ETM ทำจากไม้ทาสีดำทึบ ประกอบด้วยแขนเปิด 2 แขน และแขนปิด 1 แขน วางตั้งฉากกันคล้ายตัว T โดยมีความกว้าง 10 ซม. และยาว 50 ซม. โดยที่แขนปิดจะมีกำแพงสูง 50 ซม. ทั้งหมดยกสูงจากพื้น 50 ซม. การทดสอบจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ inhibitory avoidance และ one-way escape เริ่มต้นจาก inhibitory avoidance โดยวางหนูไว้ด้านในสุดของแขนปิด แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งหนูออกมาจากแขนปิด ทั้ง 4 ขา นับเวลาครั้งนี้เป็น baseline latency time แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นับเวลาครั้งที่ 2 และ 3 เป็น avoidance 1 และ 2 จากนั้นทำการทดสอบ one-way escape โดยวางหนูไว้ด้านในสุดของแขนเปิด แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งหนูเข้าไปในแขนปิดทั้ง 4 ขา นับเวลาครั้งนี้เป็น escape latency time

การทดสอบด้วย open field

open field เป็นกล่องไม้ทาสีดำทึบ มีขนาดกว้าง 57x76 ซม. และสูง 35 ซม. พื้นกล่องขีดเป็นตารางขนาด 9.5x9.5 ซม. จำนวน 48 ช่อง กำหนดให้ 24 ช่องรอบนอกเป็นส่วนของ outer zone และ 24 ช่องด้านในเป็นส่วนของ inner zone เริ่มต้นทำการทดลองโดยวางหนูไว้ตรงมุมด้านใดด้านหนึ่งของกล่อง แล้วเริ่มจับเวลา 5 นาที โดยที่พฤติกรรมของหนูที่นำไปวิเคราะห์ได้แก่ จำนวนครั้งทั้งหมดที่หนูข้ามช่อง เพื่อดูความสามารถในการเคลื่อนที่ของหนู และเวลาที่หนูใช้ใน inner zone และ outer zone ถ้าหนูตัวใดใช้เวลาใน inner zone มากกว่าหนูตัวอื่น จะแสดงให้เห็นว่าหนูตัวนั้นมีความกังวลน้อยกว่าหนูตัวอื่น

7.4 การวัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

หลังจากการทดสอบพฤติกรรม สมองของหนูทุกตัวถูกเก็บ และแยกส่วนของ frontal cortex, hippocampus, amygdala, septum, periaqueductal gray และ dorsal raphé สมองที่แยกส่วนแล้วนำมาศึกษาแสดงออกของยีนด้วยวิธี qRT-PCR โดยการนำส่วนของสมองที่สนใจมา extract RNA จากนั้นนำ 1 µg ของ total RNA มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA เพื่อการศึกษาการแสดงออกของยีน SERT, TPH1 และ TPH2 เนื่องจากทั้ง E2 และ Flx ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT และ TPH ถูก

normalize ด้วยการแสดงออกของ GAPDH

7.5 การวิเคราะห์ข้อมูล รายละเอียดของวิธีการทางสถิติที่ใช้

ผลการทดสอบพฤติกรรมแสดงในรูป mean $\pm$ SE ขณะที่ผลการศึกษาด้วย qRT-PCR แสดงในรูป log2 means $\pm$ SE. และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ 2 กลุ่มใช้ Student's t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของหลายกลุ่มใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และตามด้วย Newman-Keuls post-test ผลการศึกษาด้วยวิธี qRT-PCR เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ nonparametric Kruskal-Wallis test และตามด้วย Dunn's multiple comparison test กำหนดให้ความแตกต่างทางสถิติอยู่ที่ค่า $p < 0.05$

8. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

8.1 ปริมาณของ Fix ที่ใช้ สามารถลดพฤติกรรมกังวลได้

การทดสอบปริมาณของยา Fix ในหนูเพศผู้ เพื่อยืนยันว่าปริมาณที่ให้เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ ผลการทดสอบพฤติกรรมกังวลโดยใช้ EPM พบว่า หนูกลุ่มที่ป้อนยา Fix เดินเข้าไปในแขนเปิด และใช้เวลาในแขนเปิด นานกว่าหนูกลุ่มควบคุม ในการทดสอบด้วย ETM พบการลดลงของเวลา avoidance1 และ 2 ในหนูที่ได้รับยา Fix เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเวลาดังกล่าวสัมพันธ์กับ conditioned fear ของหนู สำหรับผลของการข้ามช่องทั้งหมดใน open field ไม่มีความแตกต่างกันในหนูทั้ง 2 กลุ่ม แสดงให้เห็นว่าพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในหนูที่ได้รับยา Fix เกิดขึ้นจากฤทธิ์คลายกังวล ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนที่

8.2 การให้เอสโตรเจนทดแทนสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและการลดลงของน้ำหนักมดลูกของหนูที่ถูกตัดรังไข่ได้

เมื่อเริ่มต้นการทดลองหนูเพศเมียทุกตัวมีน้ำหนักไม่แตกต่างกัน น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ พบว่าหนู Ovx มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 รวมทั้งมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวันมากกว่าด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ยังพบอีกว่าหนูกลุ่ม Ovx+Fix มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูกลุ่ม Ovx ขณะที่หนูกลุ่ม Ovx+E2+Fix มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนสามารถป้องกันการลดลงของน้ำหนักมดลูกในหนูตัดรังไข่ได้

8.3 เอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่ แต่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวจากยา Fix

จากการทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย EPM ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 ใช้เวลาในแขนเปิดมากกว่า และมีจำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนเปิดมากกว่าหนูกลุ่ม Ovx แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่ สำหรับผลของยา Fix กลับไม่พบฤทธิ์คลายกังวล โดยพบว่าหนูกลุ่ม Ovx+Fix มีจำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนเปิด และใช้เวลาในแขนเปิด ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่ม Ovx ในขณะที่หนูกลุ่ม Ovx+E2+Fix ก็ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของเอสโตรเจนและ Fix แสดงให้เห็นว่า Fix ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่แม้ว่าจะมีการให้เอสโตรเจนทดแทน

ผลการทดสอบพฤติกรรมด้วย ETM พบว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 และ Ovx+E2+Fix มีพฤติกรรมกังวลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx แต่ไม่พบผลดังกล่าวในหนูกลุ่ม Ovx+Fix พฤติกรรมกังวลที่เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ มีค่า inhibitory avoidance ลดลงทั้งค่า avoidance 1 และ 2 สำหรับค่าการ escape ไม่พบความ

แตกต่างกันในหนูทุกกลุ่ม จากผลการทดสอบเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนเท่านั้นที่มีผลคลายกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ แต่ไม่พบผลดังกล่าวจากยา Flx

8.4 เอสโตรเจนและ Flx ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนูตัดรังไข่

เมื่อทดสอบด้วย open field ไม่พบความแตกต่างของพฤติกรรมกังวลในหนูทุกกลุ่ม โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในเวลาที่ใช้ใน outer zone และ inner zone สำหรับความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนู พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในหนูทุกกลุ่ม โดยดูจากค่าจำนวนทั้งหมดที่หนูข้ามช่อง ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า E2 และ Flx ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนูตัดรังไข่

8.5 เอสโตรเจนและ Flx เพิ่มการแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA ที่สมองส่วน dorsal raphe

การให้เอสโตรเจนทดแทนในหนูกลุ่ม Ovx พบว่าทำให้มีการแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA เพิ่มขึ้นที่บริเวณ dorsal raphe อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่การให้ E2+Flx ก็เพิ่มการแสดงออกของ SERT mRNA และ TPH2 mRNA เช่นกัน แต่การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม Ovx+E2 และ Ovx+E2+Flx ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ขณะที่การแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA ที่บริเวณ dorsal raphe ของหนูกลุ่ม Ovx+Flx ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Ovx

9. สรุปผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยา Flx ไม่สามารถออกฤทธิ์คลายกังวลได้ในหนูเพศเมียที่อยู่ในภาวะพร่องเอสโตรเจน (Ovx+Flx) หรือแม้แต่ในกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนแล้ว (Ovx+E2+Flx) โดยการทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย EPM และ ETM ในทางกลับกันฤทธิ์ดังกล่าวของยา Flx สามารถเกิดขึ้นได้ในหนูเพศผู้ นอกจากนี้ยังพบว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนในหนูที่ถูกตัดรังไข่ สามารถคลายกังวลได้เมื่อทดสอบด้วย ETM โดยดูจากค่า inhibitory avoidance ที่ลดลง ซึ่งพฤติกรรมกังวลนี้จะมีลักษณะเป็น conditioned หรือ learned fear จะมีลักษณะคล้ายผู้ป่วยในกลุ่ม generalized anxiety disorder ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า one-way escape แสดงให้เห็นว่า E2 ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลที่เกิดจาก unconditioned หรือ innate fear ซึ่งมีลักษณะคล้ายผู้ป่วยในกลุ่ม panic disorder ทั้ง E2 และ Flx ต่างไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนที่ของสัตว์ทดลอง โดยดูได้จากไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนครั้งของการข้ามช่อง เมื่อทดสอบด้วย open field ฤทธิ์คลายกังวลของ E2 อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT และ TPH2 ที่ตำแหน่ง dorsal raphe ซึ่งเป็นตำแหน่งของการสร้างสารสื่อประสาทเซโรโทนิน โดยสรุปผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ แต่ยา Flx กลับไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวทั้งหนูในกลุ่ม Ovx หรือ Ovx+E2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทางคลินิกที่ผ่านมาว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนสามารถลดกังวลได้ ยิ่งไปกว่านั้น กลไกคลายกังวลของเอสโตรเจนอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน เช่น การเพิ่มปริมาณ TPH และ SERT ส่งผลให้เพิ่มการสร้างเซโรโทนิน และเพิ่มการ turnover

เนื้อหางานวิจัย

1. ชื่อโครงการ

การปรับตัวของระบบเซโรโทนินในสมองหลังได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนปริมาณต่ำ ร่วมกับยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโทนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” ในหนูที่ขาดเอสโตรเจน: ศักยภาพในการประยุกต์เพื่อใช้ลดอาการวิตกกังวล ในหญิงหลังหมดประจำเดือน

Brain serotonergic adaptation after combined administration of low-dose estrogen and selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) in estrogen-deficient rats: potential application as combined treatment for anxiety symptoms in postmenopausal women.

2. ปัญหาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงถึงความสำคัญของฮอร์โมนเอสโตรเจน ในแง่ของบทบาทในการควบคุมระดับความกังวลของผู้หญิงตั้งแต่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จนกระทั่งถึงวัยหมดประจำเดือน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนต่ำจะทำให้เกิดความเครียดต่อการเกิดความคิดปกติกังวลเพิ่มสูงขึ้น (Arpels, 1996) พบว่าผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนโดยธรรมชาติ (Bromberger et al., 2001; Colenda et al., 2010) หรือจากการผ่าตัด (Rocca et al., 2008) ต่างก็มีความผิดปกติของความกังวล รวมทั้งมีอาการแปรปรวน โดยอาการที่เกิดขึ้นคือ ซึมเศร้า กระวนกระวาย เพิ่มขึ้นกว่าช่วงก่อนหมดประจำเดือน เนื่องจากมีรายงานยืนยันว่าเอสโตรเจนมีบทบาทควบคุมปริมาณตัวรับเซโรโทนิน เช่น ตัวรับ 5-HT_{1A} และเมตาบอริซึมของเซโรโทนิน ในหลายส่วนของสมอง เช่น hippocampus, amygdala และ frontal cortex (Amin et al., 2005; Österlund et al., 2000) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า ความผิดปกติของระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนินในสมองจะเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความคิดปกติกังวล ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน และการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนน่าจะเป็นแนวทางการรักษาอาการกังวลผิดปกติในผู้ป่วยกลุ่มนี้ได้ (Strickler et al., 2000; von Mühlen et al., 1995)

ยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโทนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” (selective serotonin reuptake inhibitors; SSRIs) เช่น fluoxetine (Flx), citalopram และ sertraline ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเป็นยาคลายกังวล และลดอาการซึมเศร้า (Kent et al., 1998; Vaswani et al., 2003) อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า ยาในกลุ่มดังกล่าวไม่สามารถลดอาการซึมเศร้าในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนและผู้หญิงที่มีระดับเอสโตรเจนต่ำได้ (Pinto-Meza et al., 2006; Schneider et al., 1997) และพบว่าทำให้เอสโตรเจนทดแทนทำให้ยา SSRIs สามารถออกฤทธิ์เพื่อลดอาการซึมเศร้าในผู้หญิงเหล่านี้ได้ (Westlund and Perry, 2003; Zanardi et al., 2007) จากข้อมูลทางคลินิกเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า ฤทธิ์ของยา SSRIs ต่อการลดอาการซึมเศร้าในเพศหญิงพึ่งพาการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วย นอกจากนี้ อายุ ระยะเวลาของการขาดเอสโตรเจน และช่วงเวลาของการเริ่มต้นได้รับเอสโตรเจนทดแทน ก็อาจมีผลต่อประสิทธิภาพของการออกฤทธิ์ของยา Flx เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตาม แม้ว่าจะมีรายงานยืนยันว่า Flx สามารถออกฤทธิ์คลายกังวลได้ในผู้ป่วยหนุ่มสาว (Fairbanks et al., 1997) แต่ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดว่า Flx จะสามารถออกฤทธิ์คลายกังวลได้หรือไม่ในผู้ป่วยหญิงที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าทั้งเอสโตรเจนและ Flx ต่างมีผลคลายกังวลผ่านทางระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (Bethea et al., 2002a; Kent et al., 1998) ในระดับเซลล์ เอสโตรเจนออกฤทธิ์คลายกังวลผ่านทางตัวรับ

เอสโตรเจนชนิดเบต้า (Lund et al., 2005; Tomihara et al., 2009) เป็นที่น่าสนใจว่าทั้งเอสโตรเจนและ SSRI สามารถยับยั้งการทำงานของ serotonin reuptake transporter (SERT) ได้ ซึ่งจะมีผลให้การทำงานของเซโรโตนินเกิดได้นานขึ้น (Chang and Chang, 1999; Apparsundaram et al., 2008) การที่จะทำให้ผลของเซโรโตนินเกิดได้นานขึ้นนอกจากการยับยั้ง SERT แล้ว การเพิ่มประสิทธิภาพของเซโรโตนินอาจเกิดขึ้นจากการเพิ่มการสร้างก็ได้ โดยการออกฤทธิ์ที่เอ็นไซม์ tryptophan hydroxylase (TPH) เช่นเดียวกันทั้งเอสโตรเจนและ SSRI ต่างก็สามารถเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์นี้ได้ (Betha et al., 2002b; Kim et al., 2002) อย่างไรก็ตามผลของทั้งเอสโตรเจนและ Flx ต่อปริมาณของ SERT ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ทดลองเพศเมียที่ขาดเอสโตรเจน ซึ่งเป็นไปได้ว่าการที่ทั้งเอสโตรเจนและ Flx มีผลทำให้มีเซโรโตนินมากใน synaptic cleft เป็นเวลานานจะส่งผลต่อเนื่องให้มีการปรับตัวโดยเพิ่มการแสดงออกของ SERT มากขึ้นเพื่อเพิ่มการกำจัดเซโรโตนิน

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของเอสโตรเจนและ Flx ว่าจำเป็นต้องออกฤทธิ์ร่วมกันหรือไม่ ต่อพฤติกรรมกังวลในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ โดยใช้ elevated plus-maze (EPM), elevated T-maze (ETM) และ open field เนื่องมาจากพฤติกรรมกังวลหลายอย่างเปลี่ยนแปลงที่ 4 สัปดาห์ภายหลังการตัดรังไข่ (Ho et al., 2007) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเลือกช่วงเวลา 4 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังทำการวัดระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT ในสมองส่วนที่สำคัญเกี่ยวข้องกับความเสี่ยง ได้แก่ frontal cortex, hippocampus, septum, amygdala, periaqueductal gray และ dorsal raphe สำหรับยีน TPH1 และ TPH2 ซึ่ง TPH2 จะพบมากกว่าในระบบประสาทส่วนกลาง (Sakowski et al., 2006) ทั้ง TPH1 และ TPH2 ทำการวัดเฉพาะที่ dorsal raphe เนื่องจากเป็นตำแหน่งของตัวเซลล์เซโรโตนิน

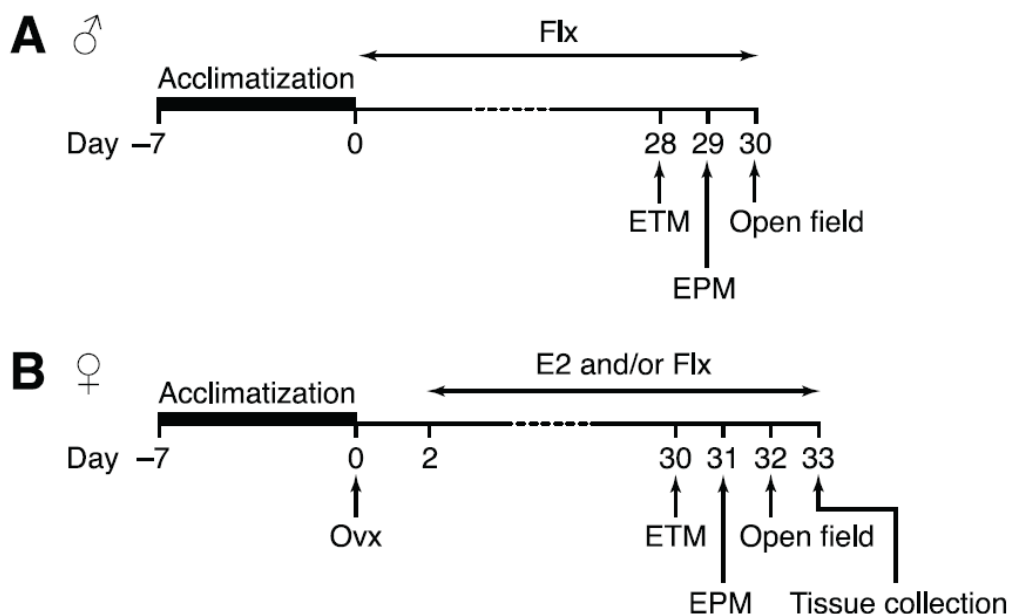
3. ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Wistar (*Rattus norvegicus*) เพศเมียโตเต็มวัย น้ำหนัก 170-190 กรัม และเพศผู้ น้ำหนัก 180-210 กรัม สืบเชื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จ.นครปฐม นำมาเลี้ยงในห้องสัตว์ทดลองที่ควบคุมสภาวะแวดล้อมให้มีอุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60% ควบคุมแสงสว่าง-มืด 12 ชั่วโมง โดยช่วงเวลากลางวันเวลา 06.00 – 18.00 น. ความเข้มแสง 200 lux ให้อาหารและน้ำไม่จำกัดปริมาณ เลี้ยงสัตว์อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง ภายหลังเสร็จสิ้นการทดลองหนูทุกตัวจะถูกชั่งน้ำหนักตัว และน้ำหนักมดลูก โดยโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านความเห็นชอบของคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์แล้ว

3.2 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยและการควบคุมการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัยแสดงดังภาพที่ 1 ภายหลังการปรับตัวของหนู 1 สัปดาห์ ในหนูเพศผู้ (ภาพที่ 1A) หนูถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ทำการป้อนน้ำปริมาณ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Control) และกลุ่มที่ป้อน Flx ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Flx) ทั้งน้ำและ Flx ถูกป้อนทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ช่วงเวลาประมาณ 13.00 – 14.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งในวันที่ทดสอบพฤติกรรมทั้ง 3 วัน



ภาพที่ 1. แสดงช่วงเวลาที่จะดำเนินการวิจัยทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย (A) ในหนูเพศผู้ ภายหลังให้ สัตว์ทดลองปรับตัว 7 วัน หนูถูกป้อน Flx ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม หรือป้อนน้ำในหนูกลุ่มควบคุม ติดต่อกัน 28 วัน หลังจากนั้นหนูทุกตัวถูกทดสอบพฤติกรรม กังวลด้วย ETM, EPM และ open field ในวันที่ 28, 29 และ 30 ตามลำดับ (B) ในหนูเพศ เมีย ถูกตัดรังไข่ในวันที่ 0 หลังการปรับตัว และเริ่มให้ E2 วันที่ 2 ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อ น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Ovx+E2) ให้ Flx 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม (Ovx+Flx) และกลุ่มที่ได้ร่วมกัน (Ovx+E2+Flx) ติดต่อกัน 28 วัน หลังจากนั้นหนูทุกตัวถูก ทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย ETM, EPM และ open field ในวันที่ 30, 31 และ 32 ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บมดลูกเพื่อชั่งน้ำหนัก และเก็บสมองเพื่อนำไป ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบเซโรโทนิน

ในหนูเพศเมีย (ภาพที่ 1B) หนูทุกตัวถูกตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง เพื่อให้อยู่ในภาวะขาดเอสโตรเจน โดยดมยาสลบ และยาสลบที่ใช้คือ isoflurane หนูที่ถูกตัดรังไข่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนจะลดต่ำลงเหลือน้อยกว่า 15 pg/mL ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่อยู่ในช่วง proestrous มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนอยู่ที่ประมาณ 55 pg/mL (Albert et al., 1991; Heaney et al., 2002) ภายหลังการผ่าตัดรังไข่หนูถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่

กลุ่มที่ 1 หนูตัดรังไข่ (Ovx)

กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน (Ovx+E2) ละลายใน propylene glycol ปริมาณ 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ทางใต้ผิวหนังบริเวณหลังคอ

กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่ที่ได้รับยา Flx (Ovx+Flx) ละลายในน้ำ ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม โดยการป้อนทางปาก

กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนร่วมกับยา Flx (Ovx+E2+Flx)

ปริมาณยา Flx ที่ใช้ในการวิจัยนี้เป็นปริมาณที่ให้ผลคลายกังวลในหนูเพศผู้ (Zhang et al., 2000) ในขณะที่ปริมาณเอสโตรเจนที่ใช้ จะมีผลให้หนูมี พฤติกรรมคล้ายหนูที่อยู่ในมีระยะการเป็นสัด

ในช่วง estrous (Diaz-Veliz et al., 1991)

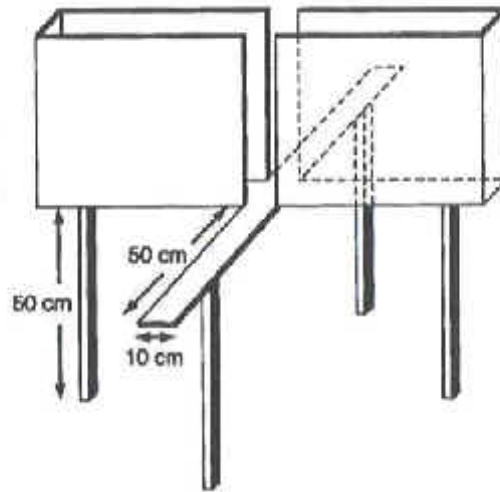
ในแต่ละวันหนูทุกตัวถูก handle คล้ายกัน ดังนี้คือ ป้อนยา (Flx หรือ น้ำ) ฉีดยาเข้าใต้ชั้นผิวหนัง (E2 หรือ propylene glycol) ปริมาณน้ำที่ป้อนในกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2 คือ 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม และปริมาณ propylene glycol ในกลุ่ม Ovx และ Ovx+Flx ที่ฉีดคือ 0.25 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ทั้ง E2 และ Flx รวมทั้ง vehicle ถูกฉีดและป้อนทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ช่วงเวลาประมาณ 13.00 – 14.00 น. ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ รวมทั้งในวันที่ทดสอบพฤติกรรมทั้ง 3 วัน หลังจากสิ้นสุดการทดลอง ทำการเก็บมดลูกเพื่อชั่งน้ำหนัก และเก็บสมองเพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระบบเซโรโทนิน

หนูทุกตัวถูก handle โดยผู้วิจัยคนเดียวกันตลอดการทดลองตั้งแต่ช่วงการปรับตัว 7 วัน และตลอดช่วงการทดลอง 4 สัปดาห์ เพื่อลดความเครียด สำหรับลำดับการทดสอบพฤติกรรมใน 3 วันสุดท้ายเป็นดังนี้ เริ่มต้นวันแรกทดสอบด้วย ETM วันที่ 2 เป็น EPM และวันสุดท้ายเป็น open field โดยทำการทดสอบในช่วงเวลา 08.00 – 11.00 น. หนูแต่ละตัวจะถูกทดสอบทั้ง 3 test เพียง test ละ 1 ครั้ง เท่านั้น ไม่มีการทำซ้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการเรียนรู้ซึ่งจะมีผลทำให้ผลการทดลองไม่ถูกต้อง ในห้องทดสอบพฤติกรรมมีหนูที่ถูกทดสอบอยู่เพียงตัวเดียว ไม่มีหนูตัวอื่นอยู่ในห้องเดียวกัน

3.3 วิธีการทดสอบพฤติกรรมกังวล

การทดสอบด้วย elevated plus-maze

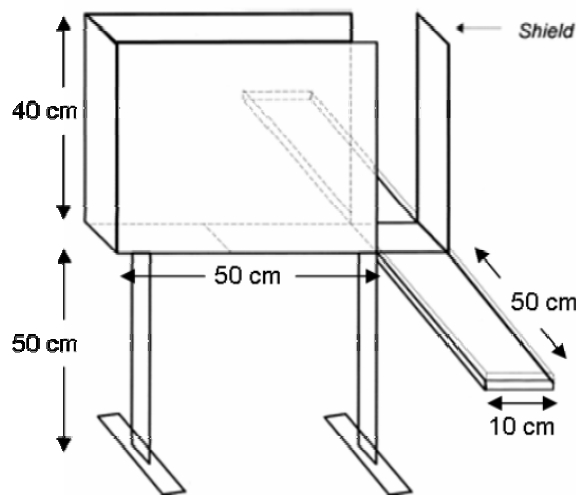
EPM (ภาพที่ 2) ทำจากไม้ทาสีดำทึบ ประกอบด้วยแขนเปิด 2 แขน และแขนปิด 2 แขน วางตั้งฉากกัน คล้ายเครื่องหมายบวก มีความกว้าง 10 ซม. และยาว 50 ซม. โดยที่แขนปิดจะมีกำแพงสูง 50 ซม. และทั้งหมดยกสูงจากพื้น 50 ซม. ในช่วงเวลาทดสอบพฤติกรรมห้องต้องเงียบ ใช้ความเข้มแสง 20 lux เริ่มต้นทำการทดลองโดยวางหนูไว้ตรงกลางของ maze แล้วเริ่มจับเวลา 5 นาที โดยใช้กล้องวิดีโอบันทึกภาพไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการทดลองต่อไป พฤติกรรมของหนูที่จะนำไปวิเคราะห์ได้แก่ จำนวนครั้งที่เข้า และเวลาที่หนูใช้ในทั้งในแขนปิด และแขนเปิด และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า จำนวนครั้งทั้งหมดที่เข้าไปในแขนทั้ง 2 ข้าง ถ้าหนูตัวใดใช้เวลา และเข้าไปในแขนเปิดมากกว่า จะแสดงให้เห็นว่าหนูมีความกังวลน้อยกว่าหนูตัวอื่น สำหรับจำนวนครั้งทั้งหมดที่เข้าไปในแขนทั้ง 2 ข้าง และจำนวนครั้งทั้งหมดที่เข้าไปในแขนปิด จะแสดงความสามารถในการเคลื่อนที่ของหนู อย่างไรก็ตามพฤติกรรมของหนูที่เกิดขึ้นใน EPM นี้ยังขึ้นอยู่กับ ชนิดของความกังวล และสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองด้วย (Hogg, 1996) และ open field เหมาะสมมากกว่าที่จะใช้วัดการเคลื่อนที่ของหนู (Schmitt and Hiemke, 1998)



ภาพที่ 2. elevated plus-maze

การทดสอบด้วย elevated T-maze

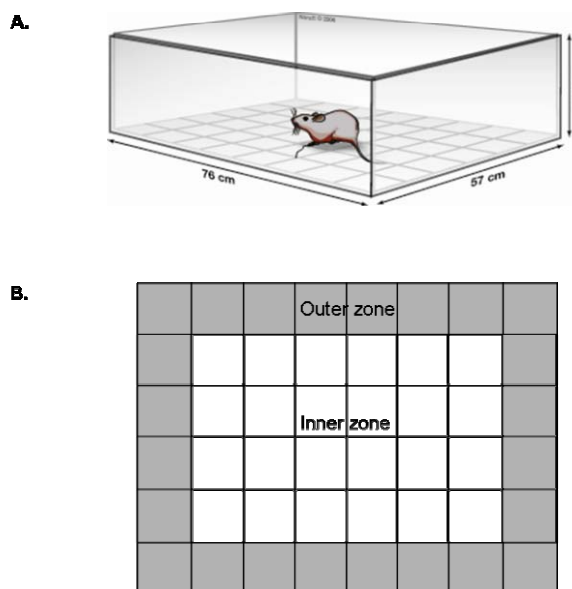
ETM (ภาพที่ 3) ทำจากไม้ทาสีดำทึบ ประกอบด้วยแขนเปิด 2 แขน และแขนปิด 1 แขน วางตั้งฉากกัน คล้ายตัว T โดยมีความกว้าง 10 ซม. และยาว 50 ซม. โดยที่แขนปิดจะมีกำแพงสูง 50 ซม. และทั้งหมดยกสูงจากพื้น 50 ซม. ความเข้มแสงในช่วงเวลาทดสอบประมาณ 20 lux การทดสอบจะประกอบด้วย 2 ส่วนคือ inhibitory avoidance และ one-way escape เริ่มต้นจาก inhibitory avoidance โดยวางหนูไว้ด้านในสุดของแขนปิด แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งหนูออกมาจากแขนปิดทั้ง 4 ขา นับเวลาครั้งนี้เป็น baseline latency time แล้วทำซ้ำอีก 2 ครั้ง นับเวลาครั้งที่ 2 และ 3 เป็น avoidance 1 และ 2 จากนั้นทำการทดสอบ one-way escape โดยวางหนูไว้ด้านริมสุดของแขนเปิด แล้วเริ่มจับเวลาจนกระทั่งหนูเข้าไปในแขนปิดทั้ง 4 ขา นับเวลาครั้งนี้เป็น escape latency time การทดสอบแต่ละครั้งห่างกัน 30 วินาที โดยนำหนูไปใส่ไว้ในกล่องพลาสติกใส ถ้าหนูตัวใดใช้เวลา avoidance 1 และ 2 น้อยกว่าหนูตัวอื่นแสดงให้เห็นว่าหนูตัวนั้นมีความกังวลแบบ generalized anxiety disorder น้อยกว่าหนูตัวอื่น และถ้าหนูตัวใดใช้เวลา escape latency มากกว่าหนูตัวอื่นแสดงให้เห็นว่าหนูตัวนั้นมีความกังวลแบบ panic disorder น้อยกว่าหนูตัวอื่น (Graeff et al., 1993)



ภาพที่ 3. elevated T-maze

การทดสอบด้วย open field

open field (ภาพที่ 4A) เป็นกล่องไม้ทาสีดำทึบ มีขนาดกว้าง 57x76 ซม. และสูง 35 ซม. พื้นกล่องขีดเป็นตารางขนาด 9.5x9.5 ซม. จำนวน 48 ช่อง (ภาพที่ 4B) กำหนดให้ 24 ช่องรอบนอกเป็นส่วนของ outer zone และ 24 ช่องด้านในเป็นส่วนของ inner zone ความเข้มแสงในช่วงเวลาทดสอบประมาณ 20 lux เริ่มต้นทำการทดลองโดยวางหนูไว้ตรงมุมด้านใดด้านหนึ่งของกล่อง แล้วเริ่มจับเวลา 5 นาที โดยใช้กล้องวิดีโอบันทึกภาพไว้เพื่อนำไปวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยที่พฤติกรรมของหนูที่จะนำไปวิเคราะห์ได้แก่ จำนวนครั้งที่หนูข้ามช่อง ซึ่งจะแสดงถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของหนู และเวลาที่หนูใช้ใน inner zone และ outer zone ถ้าหนูตัวใดใช้เวลาใน inner zone มากกว่าหนูตัวอื่น จะแสดงให้เห็นว่าหนูตัวนั้นมีความกังวลน้อยกว่าหนูตัวอื่น อย่างไรก็ตาม การทดสอบฤทธิ์คลายกังวลของยาในกลุ่มเซโรโทนินอาจไม่เหมาะสมที่จะใช้อุปกรณ์นี้ เนื่องจากมีรายงานว่า open field จะมีความไวต่อยาในกลุ่ม benzodiazepines (Prut and Belzung, 2003) ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงใช้ open field เพื่อการทดสอบการเคลื่อนที่ของหนูเท่านั้น



ภาพที่ 4. open field

3.4 การวัดการแสดงออกของยีนด้วยวิธี quantitative real-time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR)

หลังจากการทดสอบพฤติกรรม สมองของหนูทุกตัวถูกเก็บ และนำมาแยกส่วนเพื่อนำไปศึกษาดังนี้ สมองส่วน frontal cortex, hippocampus, amygdala, septum, periaqueductal gray และ dorsal raphé ตามวิธีของ Heffner และคณะ (1980) สมองที่แยกส่วนแล้วนำมาศึกษาแสดงออกของยีนด้วยวิธี qRT-PCR ซึ่งขั้นตอนการทำดัดแปลงมาจากวิธีของ Charoenphandhu และคณะ (2009) โดยการนำส่วนของสมองที่สนใจมา extract RNA ด้วย TRIZOL วิเคราะห์ความบริสุทธิ์ของ RNA ทำโดยการวัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ใช้ความยาวคลื่นแสงที่ 260 และ 280 nm ซึ่งอยู่ในช่วงระหว่าง 1.8-2.0 จากนั้นนำ 1 µg ของ total RNA มาเปลี่ยนให้เป็น cDNA (reverse transcription) ด้วย iScript kit โดยเครื่อง thermal cycler ลำดับเบสของ TPH (isoform 1 และ 2) และ SERT ได้จาก The National Center for Biotechnology Information database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) การออกแบบ primer ใช้โปรแกรม

OLIGO 6 เมื่อได้ primer แล้ว จึงนำมาทดสอบหาสภาพที่เหมาะสมด้วย PCR ธรรมดา ก่อน หลังจากได้ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ PCR นำมาตรวจสอบโดยวิธี electrophoresis โดย load ใน 1.5% agarose gel และย้อมด้วย 1.0 µg/mL ethidium bromide ดู band ภายใต้เครื่อง UV transilluminator สุดท้ายจึงสกัดผลิตภัณฑ์ PCR ออกจาก gel ด้วย HiYield Gel/PCR DNA Extraction kit และนำไปหาลำดับเบส ด้วย ABI Prism 3100 Genetic Analyzer ถ้าได้ลำดับเบสที่ถูกต้อง จึงจะนำ primer นั้นไปใช้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่สนใจด้วย qRT-PCR การศึกษาด้วย qRT-PCR และการหา melting curve ของการแสดงออกของยีน SERT, TPH1 และ TPH2 ใช้เครื่อง Bio-rad MiniOpticon real-time PCR system ร่วมกับการใช้ iQ SYBR Green SuperMix และ specific primer เนื่องจากทั้ง E2 และ Flx ไม่มีผลต่อการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ซึ่งเป็น housekeeping gene ดังนั้นระดับการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT และ TPH ถูก normalize ด้วยการแสดงออกของ GAPDH การศึกษาด้วย qRT-PCR นี้ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล รายละเอียดของวิธีการทางสถิติที่ใช้

ผลการทดสอบพฤติกรรมแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความผิดพลาดมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ standard error, SE.) ขณะที่ผลการศึกษาดูด้วย qRT-PCR แสดงในรูป log2 means $\pm$ SE. และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของ 2 กลุ่มใช้ Student's t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของหลายกลุ่มใช้ one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และตามด้วย Newman-Keuls post-test ผลการศึกษาดูด้วยวิธี qRT-PCR เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติโดยใช้ nonparametric Kruskal-Wallis test และตามด้วย Dunn's multiple comparison test กำหนดให้ความแตกต่างทางสถิติอยู่ที่ค่า $p < 0.05$ การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรม GraphPad Prism 4.0

4. ผลงานวิจัยที่ได้รับ

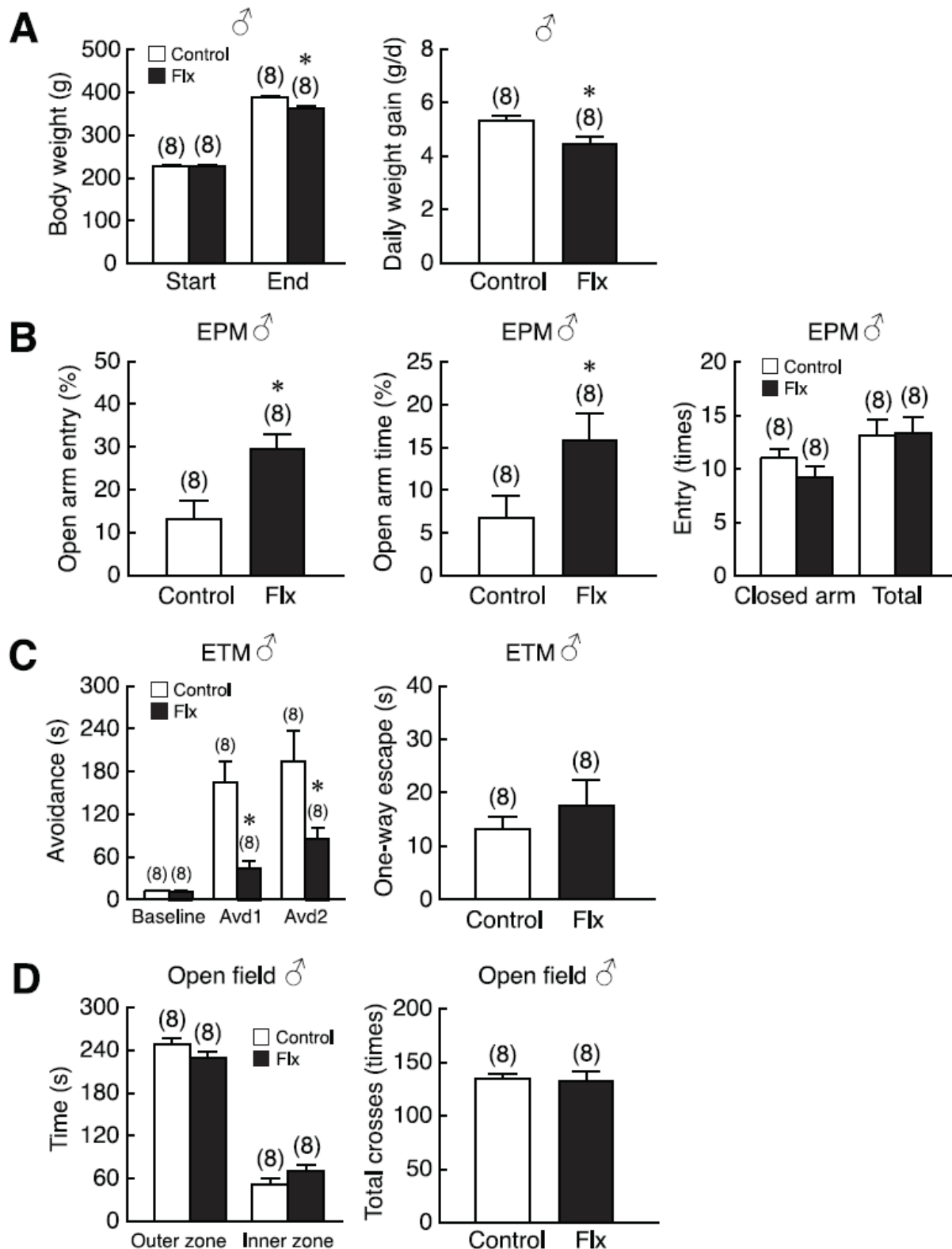
4.1 ปริมาณของ Flx ที่ใช้ สามารถลดพฤติกรรมกังวลได้

ที่ผ่านมาได้มีรายงานถึงผลคลายกังวลของยา Flx ในหนูเพศผู้ (De Vry et al., 2004; Zhang et al., 2000) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลดังกล่าวในหนูเพศเมียที่ตั้งครรภ์ ดังนั้นก่อนเริ่มงานวิจัย ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบปริมาณของยา Flx ในหนูเพศผู้ก่อน เพื่อยืนยันว่าปริมาณที่ให้เพียงพอต่อการออกฤทธิ์ เมื่อเริ่มต้นการทดลองสัตว์ทดลองทั้งกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ให้ Flx มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกัน ($t = 0.447$, $df = 14$, $p > 0.05$) (ภาพที่ 5A) แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ พบว่าหนูที่ได้รับยา Flx มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุม ($t = 2.774$, $df = 14$, $p < 0.05$) และมีค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวันลดลงด้วย ($t = 2.830$, $df = 14$, $p < 0.05$) (ภาพที่ 5A) จากผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานอื่นที่ผ่านมา (Leibowitz and Alexander, 1998) ผลการทดสอบพฤติกรรมกังวลโดยใช้ EPM พบว่า หนูกลุ่มที่ป้อนยา Flx เดินเข้าไปในแขนเปิด ($t = 2.927$, $df = 14$, $p < 0.05$) และใช้เวลาในแขนเปิด ($t = 2.187$, $df = 14$, $p < 0.05$) นานกว่าหนูกลุ่มควบคุม ขณะที่จำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนปิด ($t = 1.354$, $df = 14$, $p > 0.05$) และผลรวมทั้งหมดที่หนูเข้าไปในทั้งแขนเปิดและปิด ($t = 0.118$, $df = 14$, $p > 0.05$) ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 5B) ในการทดสอบด้วย ETM พบว่าค่า baseline ในช่วงการทดสอบ avoidance ไม่มีความแตกต่างกันของหนูทั้ง 2 กลุ่ม ($t = 0.376$, $df = 14$,

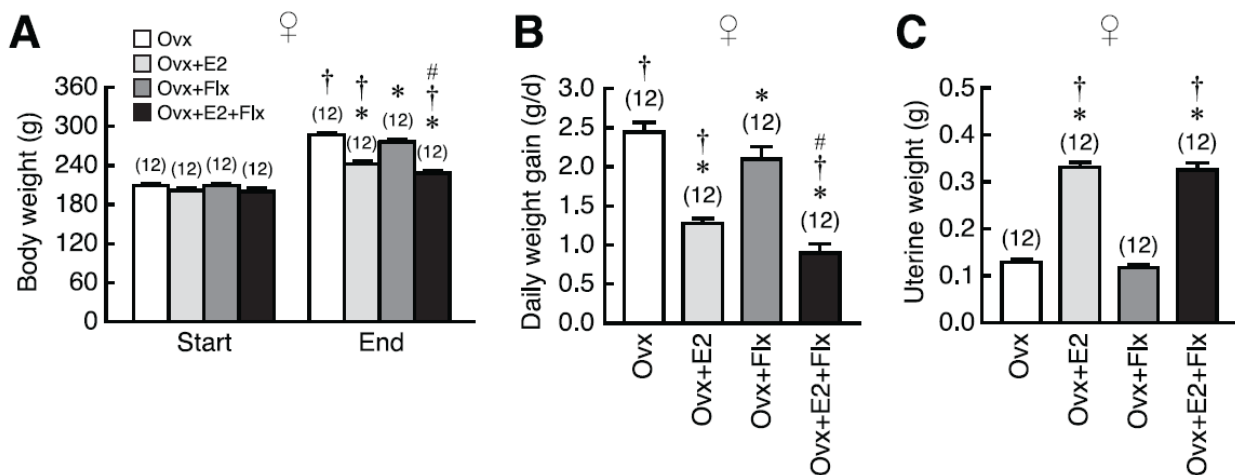
$p>0.05$) พบการลดลงของเวลา avoidance1 และ 2 ในหนูที่ได้รับยา Flx เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งเวลาดังกล่าวสัมพันธ์กับ conditioned fear ของหนู (avoidance 1: $t=3.711$, $df=14$, $p<0.05$; avoidance 2: $t=2.429$, $df=14$, $p<0.05$) ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า one-way escape ($t=0.763$, $df=14$, $p>0.05$) (ภาพที่ 5C) หนูทั้งในกลุ่มที่ได้รับยา Flx และหนูกลุ่มควบคุม ต่างก็ใช้เวลาที่ outer zone ของ open field มากกว่า inner zone และเมื่อเปรียบเทียบเวลาที่หนูใช้ใน outer zone ($t=1.489$, $df=14$, $p>0.05$) และ inner zone ($t=0.167$, $df=14$, $p>0.05$) ไม่พบความแตกต่างของหนูทั้ง 2 กลุ่ม (ภาพที่ 5D) แสดงให้เห็นว่า การทดสอบด้วย open field ไม่สามารถแสดงฤทธิ์คลายกังวลของยา Flx ได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Prut และ Belzung (2003) สำหรับผลของการข้ามช่องทั้งหมด ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของสัตว์ทดลองพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในหนูทั้ง 2 กลุ่ม ($t=0.210$, $df=14$, $p>0.05$) (ภาพที่ 5D) แสดงให้เห็นว่าพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปในหนูที่ได้รับยา Flx เกิดขึ้นจากฤทธิ์คลายกังวล ไม่ได้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนที่

4.2 การให้เอสโตรเจนทดแทนสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและการลดลงของน้ำหนักมดลูกของหนูที่ถูกตัดรังไข่ได้

เมื่อเริ่มต้นการทดลองหนูเพศเมียทุกตัวมีน้ำหนักไม่แตกต่างกัน ($F_{3,43}=1.626$, $p>0.05$) (ภาพที่ 6A) น้ำหนักตัวเมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ พบว่าหนู Ovx มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 ($F_{3,43}=50.621$, $p<0.05$) รวมทั้งมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวันมากกว่าด้วยเช่นกัน ($F_{3,43}=35.514$, $p<0.05$) (ภาพที่ 6A และ B) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าหนูกลุ่ม Ovx+Flx มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูกลุ่ม Ovx ขณะที่หนูกลุ่ม Ovx+E2+Flx มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าหนูกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2 (ภาพที่ 6A และ B) นอกจากนี้ ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนสามารถป้องกันการลดลงของน้ำหนักมดลูกในหนูที่ตัดรังไข่ได้ ($F_{3,43}=155.612$, $p<0.05$) (ภาพที่ 6C)



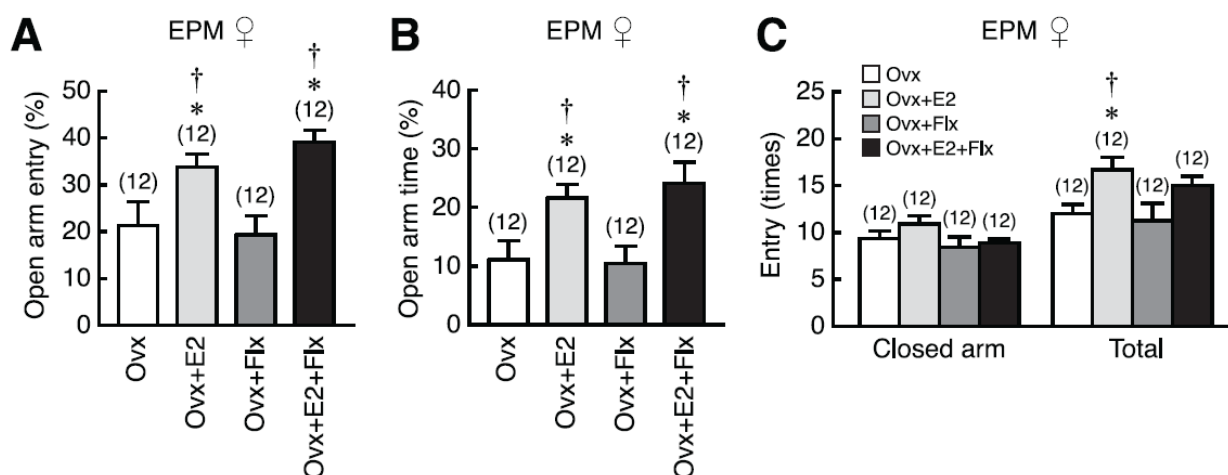
ภาพที่ 5. (A) น้ำหนักตัวและน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน (B-D) พฤติกรรมกังวลในหนูเพศผู้ภายหลังป้อนน้ำ (control) และ ป้อนยา Flx 10 mg/kg (Flx) ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ โดยการทดสอบด้วย EPM, ETM และ open field ค่า total entry เมื่อทดสอบด้วย EPM คือผลรวมของ open และ closed arm entry ค่า Avd1 และ Avd2 หมายถึง avoidance 1 และ 2 ตามลำดับ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู และ * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control



ภาพที่ 6. (A) น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง (B) น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นในแต่ละวัน และ (C) น้ำหนักมดลูก ของหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ vehicles (Ovx) เอสโตรเจนทดแทน ปริมาณ 10 µg/kg (Ovx+E2) ยา Flx ปริมาณ 10 mg/kg (Ovx+Flx) หรือได้รับทั้งเอสโตรเจนและ Flx (Ovx+E2+Flx) vehicle ที่ใช้คือ น้ำปริมาณ 5 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2) และ propylene glycol ปริมาณ 0.25 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+Flx) น้ำหนักตัววัดตอนเริ่มต้นการทดลองและสิ้นสุดการทดลองที่ 4 สัปดาห์ ขณะที่น้ำหนักมดลูกวัดเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู และ * $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control, † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx+Flx, # $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx+E2

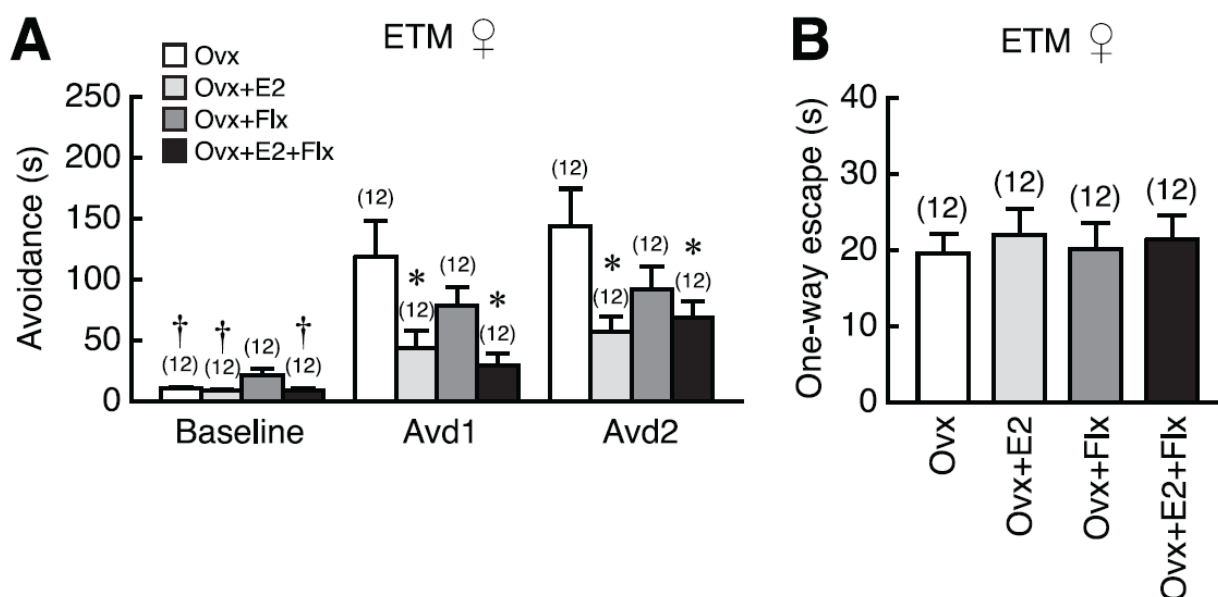
4.3 เอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่ แต่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวจากยา Flx

จากการทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย EPM ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 ใช้เวลาในแขนเปิดมากกว่า ($F_{3,43}=5.424$, $p < 0.05$) และมีจำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนเปิดมากกว่า ($F_{3,43}=6.255$, $p < 0.05$) หนูกลุ่ม Ovx แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่ (ภาพที่ 7A และ B) สำหรับผลของยา Flx กลับไม่พบฤทธิ์คลายกังวล ซึ่งต่างจากในเพศชาย โดยพบว่าหนูกลุ่ม Ovx+Flx มีจำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนเปิด และใช้เวลาในแขนเปิด ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่ม Ovx (ภาพที่ 7A และ B) ในขณะที่หนูกลุ่ม Ovx+E2+Flx ก็ไม่พบการเสริมฤทธิ์กันของเอสโตรเจนและ Flx (ภาพที่ 7A และ B) แสดงให้เห็นว่า Flx ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลในหนูตัดรังไข่แม้ว่าจะมีการให้เอสโตรเจนทดแทน E2 และ Flx ไม่เปลี่ยนแปลงจำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนปิด ($F_{3,43}=1.626$, $p > 0.05$) ขณะที่จำนวนครั้งที่หนูเข้าไปในแขนเปิดและปิดรวมกันเพิ่มขึ้นในหนู Ovx+E2 ($F_{3,43}=3.571$, $p < 0.05$) (ภาพที่ 7C)



ภาพที่ 7. การทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย EPM (A) จำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนเปิด (B) เวลาที่ใช้ในแขนเปิด และ (C) จำนวนครั้งที่เข้าไปในแขนปิดและจำนวนครั้งที่ทั้งหมดที่เข้าไปในแขนเปิดและปิดรวมกัน ของหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ vehicles (Ovx) เอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10 µg/kg (Ovx+E2) ยา Flx ปริมาณ 10 mg/kg (Ovx+Flx) หรือได้รับทั้งเอสโตรเจนและ Flx (Ovx+E2+Flx) vehicle ที่ใช้คือ น้ำปริมาณ 5 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2) และ propylene glycol ปริมาณ 0.25 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+Flx) ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู และ * $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control, † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx+Flx

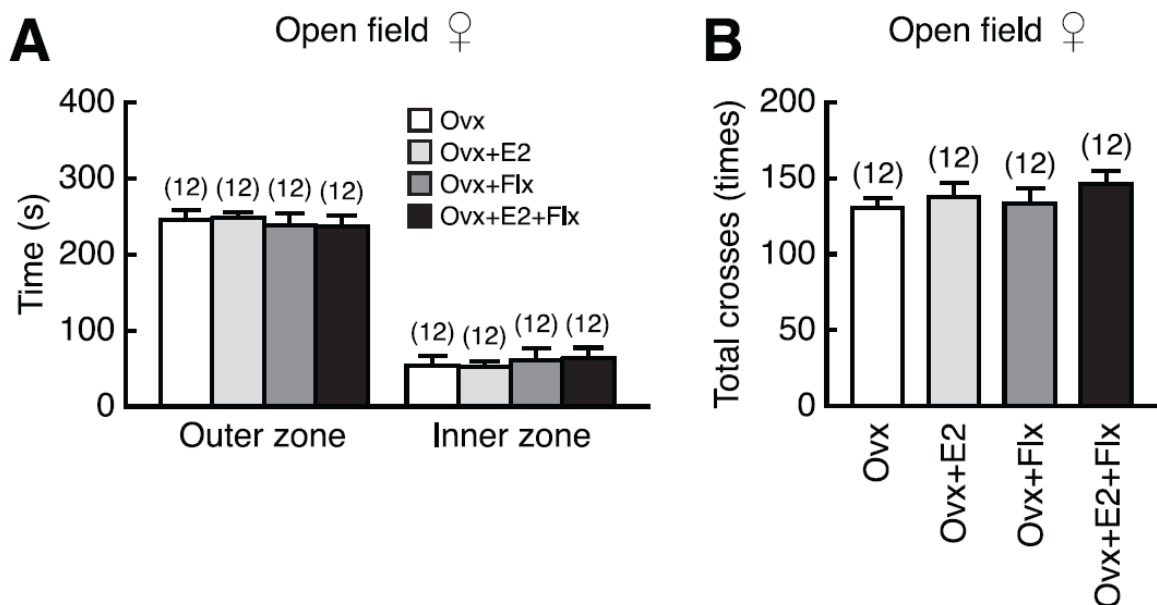
ผลการทดสอบพฤติกรรมด้วย ETM ให้ผลสอดคล้องกับการทดสอบด้วย EPM คือพบว่าหนูกลุ่ม Ovx+E2 และ Ovx+E2+Flx มีพฤติกรรมกังวลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx แต่ไม่พบผลดังกล่าวในหนูกลุ่ม Ovx+Flx พฤติกรรมกังวลที่เปลี่ยนแปลงไปได้แก่ มีค่า inhibitory avoidance ลดลงทั้งค่า avoidance 1 และ 2 (avoidance 1: $F_{3,43}=4.409$, $p<0.05$; avoidance 2: $F_{3,43}=3.574$, $p<0.05$) (ภาพที่ 8A) ค่า baseline avoidance ของหนูกลุ่ม Ovx, Ovx+E2 และ Ovx+E2+Flx ต่ำกว่าหนูกลุ่ม Ovx+Flx ($F_{3,43}=4.104$, $p<0.05$) (ภาพที่ 8A) เป็นไปได้ว่ายา Flx ลดพฤติกรรมการสำรวจของหนู สำหรับค่าการ escape ไม่พบความแตกต่างกันในหนูทุกกลุ่ม ($F_{3,43}=0.126$, $p>0.05$) (ภาพที่ 8B) จากผลการทดสอบเหล่านี้ แสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนเท่านั้นที่มีผลคลายกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ แต่ไม่พบผลดังกล่าวจากยา Flx



ภาพที่ 8. การทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย ETM (A) ระยะเวลาของการ avoidance และ (B) ระยะเวลาของการเกิด one-way escape ของหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ vehicles (Ovx) เอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10 µg/kg (Ovx+E2) ยา Flx ปริมาณ 10 mg/kg (Ovx+Flx) หรือได้รับทั้งเอสโตรเจนและ Flx (Ovx+E2+Flx) vehicle ที่ใช้คือ น้ำปริมาณ 5 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2) และ propylene glycol ปริมาณ 0.25 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+Flx) ค่า Avd1 และ Avd2 หมายถึง avoidance 1 และ 2 ตามลำดับ ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู และ * $P < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control, † $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม Ovx+Flx

4.4 เอสโตรเจนและ Flx ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนูตัดรังไข่

เมื่อทดสอบด้วย open field ไม่พบความแตกต่างของพฤติกรรมกังวลในหนูทุกกลุ่ม โดยพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในเวลาที่หนูใช้ใน outer zone ($F_{3,43}=0.186$, $p>0.05$) และ inner zone ($F_{3,43}=0.149$, $p>0.05$) (ภาพที่ 9A) สำหรับความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนู พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในหนูทุกกลุ่ม โดยดูจากค่าจำนวนทั้งหมดที่หนูข้ามช่อง ไม่มีความแตกต่างกัน ($F_{3,43}=0.638$, $p>0.05$) (ภาพที่ 9B) แสดงให้เห็นว่า E2 และ Flx ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนไหวของหนูตัดรังไข่



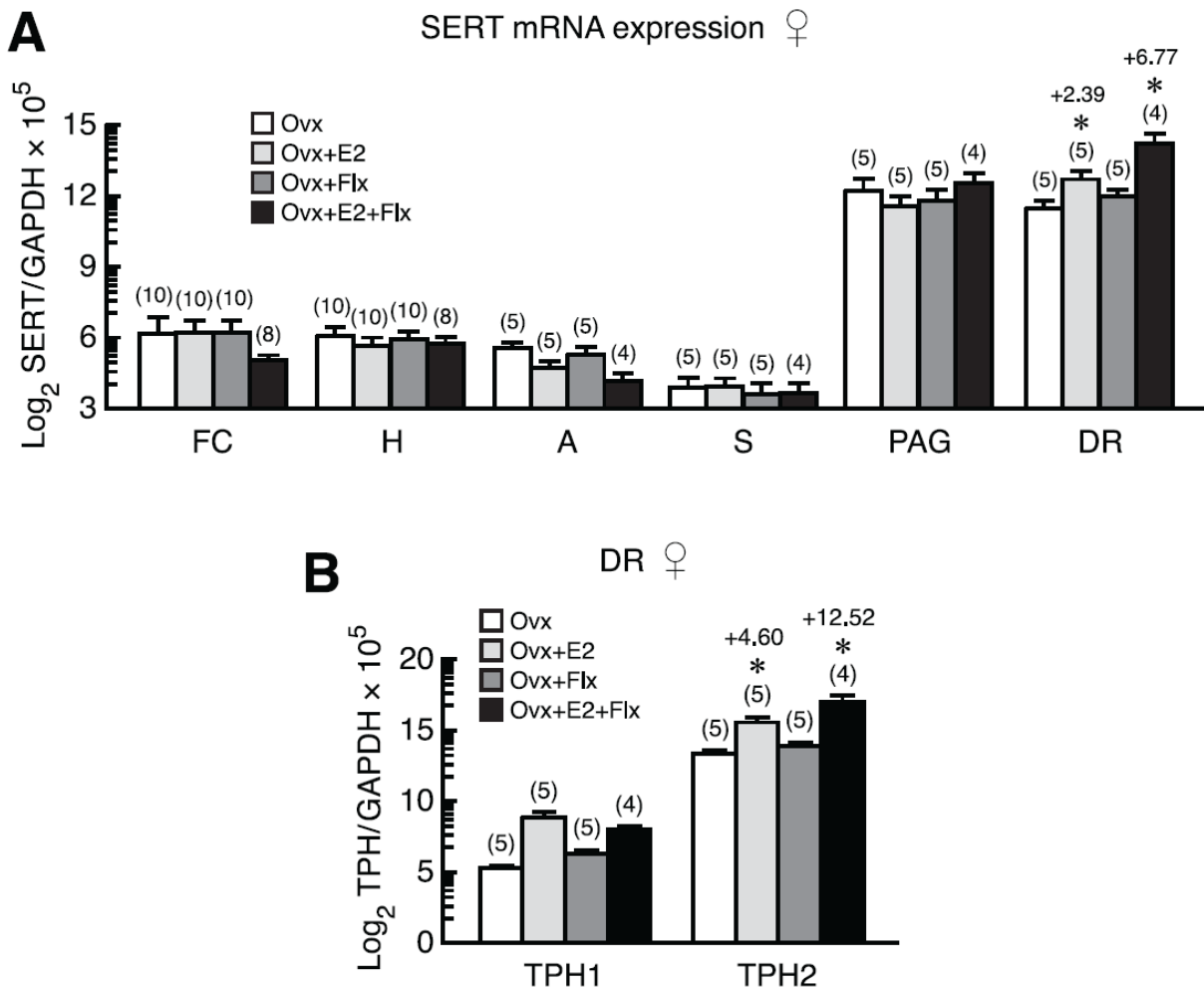
ภาพที่ 9. การทดสอบพฤติกรรมกังวลและความสามารถในการเคลื่อนที่ด้วย open field (A) เวลาที่หนูใช้ใน outer และ inner zone (B) จำนวนครั้งทั้งหมดที่หนูข้ามช่อง ของหนูที่ถูกตัดรังไข่ และได้รับ vehicles (Ovx) เอสโตรเจนทดแทนปริมาณ 10 $\mu\text{g/kg}$ (Ovx+E2) ยา Flx ปริมาณ 10 mg/kg (Ovx+Flx) หรือได้รับทั้งเอสโตรเจนและ Flx (Ovx+E2+Flx) vehicle ที่ใช้คือ น้ำ ปริมาณ 5 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+E2) และ propylene glycol ปริมาณ 0.25 mL/kg (สำหรับกลุ่ม Ovx และ Ovx+Flx) ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู

4.5 เอสโตรเจนและ Flx เพิ่มการแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA ที่สมองส่วน dorsal raphé

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้แสดงว่าสารสื่อประสาทเซโรโทนินมีบทบาทสำคัญต่อการควบคุมระดับความกังวลทั้งในคนและสัตว์ (Eison and Eison, 1994) ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้วัดการแสดงออกของ SERT mRNA ในหลายส่วนของสมองที่เกี่ยวข้องกับความกังวล ได้แก่ frontal cortex, hippocampus, septum, amygdala, periaqueductal gray และ dorsal raphé ขณะที่การแสดงออกของ TPH mRNA ทำการวัดที่ dorsal raphé เนื่องจากเป็นตำแหน่งหลักที่มีการสร้างเซโรโทนิน (Frazer and Hensler, 1999) ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธี qRT-PCR พบว่าการแสดงออกของ SERT mRNA มากที่สมองส่วน periaqueductal gray และ dorsal raphé (ภาพที่ 10A) ที่บริเวณ dorsal raphé พบว่าการแสดงออกของ TPH2 มากกว่า TPH1 mRNA (ภาพที่ 10B)

การให้เอสโตรเจนทดแทนในหนูกลุ่ม Ovx พบว่าทำให้มีการแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA เพิ่มขึ้นที่บริเวณ dorsal raphé อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย SERT mRNA เพิ่มขึ้น 2.39 เท่า และ TPH2 mRNA เพิ่มขึ้น 4.06 เท่า (ภาพที่ 10A และ B) ขณะที่การให้ E2+Flx เพิ่มการแสดงออกของ SERT mRNA 6.77 เท่า และเพิ่มการแสดงออกของ TPH2 mRNA 12.52 เท่า อย่างไรก็ตาม การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นในหนูกลุ่ม Ovx+E2 และ Ovx+E2+Flx ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ขณะที่การแสดงออกของ SERT และ TPH2 mRNA ที่บริเวณ dorsal raphé ของหนูกลุ่ม Ovx+Flx ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Ovx (ภาพที่ 10A และ B) สุดท้าย E2 และ Flx ไม่เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ TPH1 mRNA ในสมองส่วน dorsal raphé และการแสดงออกของ SERT

mRNA ในบริเวณของสมองส่วนอื่น ๆ (ภาพที่ 10A และ B) จากผลการศึกษาเหล่านี้ แสดงให้เห็นถึงความ เป็นไปได้ว่า เอสโตรเจนมีกลไกลดความกังวล โดยการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบสารสื่อประสาทเซโรโทนิน



ภาพที่ 10. จากการวัดด้วยวิธี qRT-PCR (A) การแสดงออกของ SERT mRNA ในสมองส่วน frontal cortex (FC), hippocampus (H), amygdala (A), septum (S), periaqueductal gray (PAG) และ dorsal raphe (DR) (B) การแสดงออกของ TPH1 และ TPH2 mRNA ในสมองส่วน dorsal raphe ของหนูที่ถูกตัดรังไข่และได้รับ vehicles (Ovx) เอสโตรเจนทดแทน ปริมาณ 10 µg/kg (Ovx+E2) ยา Flx ปริมาณ 10 mg/kg (Ovx+Flx) หรือได้รับทั้งเอสโตรเจนและ Flx (Ovx+E2+Flx) vehicle ที่ใช้คือ น้ำปริมาณ 5 mL/kg (สำหรับกลุ่ม OvX และ OvX+E2) และ propylene glycol ปริมาณ 0.25 mL/kg (สำหรับกลุ่ม OvX และ OvX+Flx) ค่าระดับการแสดงออกของแต่ละยีนถูก normalized ด้วยการแสดงออกของ GAPDH และ จำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลงแสดงอยู่เหนือสัญลักษณ์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ สัญลักษณ์ (+) หน้าต่อจำนวนเท่าของการเปลี่ยนแปลง หมายถึงการเพิ่มขึ้นของยีน ตัวเลขในวงเล็บแสดงจำนวนหนู * p<0.05 เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม OvX (Kruskal-Wallis test)

5. อภิปรายผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า ยา Flx ไม่สามารถออกฤทธิ์คลายกังวลได้ในหนูเพศเมียที่อยู่ในภาวะพร่องเอสโตรเจน (Ovx+Flx) หรือแม้แต่ในกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทนแล้ว (Ovx+E2+Flx) โดยการทดสอบพฤติกรรมกังวลด้วย EPM และ ETM ในทางกลับกันฤทธิ์ดังกล่าวของยา Flx สามารถเกิดขึ้นได้ในหนูเพศผู้ (ภาพที่ 5B) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ ที่ผ่านมา (De Vry et al., 2004; Zhang et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนในหนูที่ถูกตัดรังไข่ สามารถคลายกังวลได้เมื่อทดสอบด้วย ETM โดยดูจากค่า inhibitory avoidance ที่ลดลง ซึ่งพฤติกรรมกังวลนี้มีลักษณะเป็น conditioned หรือ learned fear โดยลักษณะดังกล่าวคล้ายผู้ป่วยในกลุ่ม generalized anxiety disorder (Graeff et al., 1993; 1996) ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า one-way escape แสดงให้เห็นว่า E2 ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลที่เกิดจาก unconditioned หรือ innate fear ซึ่งมีลักษณะคล้ายผู้ป่วยในกลุ่ม panic disorder Graeff et al., 1993) ทั้ง E2 และ Flx ต่างไม่มีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถในการเคลื่อนที่ของสัตว์ทดลอง โดยดูได้จากไม่มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนครั้งของการข้ามช่อง เมื่อทดสอบด้วย open field ฤทธิ์คลายกังวลของ E2 อาจเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT และ TPH2 ที่ตำแหน่ง dorsal raphe ซึ่งเป็นตำแหน่งของการสร้างสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (Frazer and Hensler, 1999) แม้ว่าจะไม่พบฤทธิ์คลายกังวลของ Flx ในหนูที่ตัดรังไข่ แต่พบว่าในหนูกลุ่มนี้ Flx สามารถลดการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวได้ โดยดูจากหนูกลุ่ม Ovx+E2+Flx เปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Ovx+E2 ซึ่งมีรายงานว่า เป็นผลมาจาก Flx ลดปริมาณการกินอาหารของหนู ผ่านทางการเปลี่ยนแปลงระบบเซโรโทนินที่ medial นิวเคลียสของ hypothalamus (Leibowitz and Alexander, 1998)

ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการวิจัยในสัตว์ทดลองเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ ถึงฤทธิ์คลายกังวลของยาในกลุ่ม SSRI ว่าเกี่ยวข้องกับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน อย่างไรก็ตามความเกี่ยวข้องดังกล่าวได้มีการรายงานหลายฉบับกล่าวถึงฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ต่อการลดอาการซึมเศร้า (Estrada-Camarena et al., 2004; Sell et al., 2008) โดยพบว่าฤทธิ์การลดอาการซึมเศร้าของยาในกลุ่ม SSRI จำเป็นต้องให้ร่วมกับการให้ E2 ทดแทนในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบพฤติกรรมด้วยวิธี forced swimming แล้วพบว่า มีเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ E2 และ Flx ร่วมกันเท่านั้นที่สามารถลด immobility และเพิ่ม swimming ได้ (Estrada-Camarena et al., 2004; Sell et al., 2008) ยิ่งไปกว่านั้นผลการวิจัยในสัตว์ทดลองนี้ยังสอดคล้องกับอีกหลายรายงานในทางคลินิก (Pae et al., 2009; Pinto-Meza et al., 2006; Schneider et al., 1997) ตัวอย่างเช่น การศึกษาของ Schneider และคณะ (1997) พบว่าการให้ยา Flx เพียงอย่างเดียวและไม่มีการให้เอสโตรเจนทดแทนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน มีประโยชน์ในการรักษาน้อยมากต่อการลดอาการซึมเศร้า ในทางกลับกันการให้เอสโตรเจนทดแทนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของการลดอาการซึมเศร้าของยาในกลุ่ม SSRI ได้ (Nagata et al., 2005; Schneider et al., 2001; Westlund and Parry, 2003; Zanardi et al., 2007) และการให้ร่วมกันของเอสโตรเจนและ SSRI จะมีประสิทธิภาพในการลดอาการซึมเศร้ามากกว่าการให้เอสโตรเจนทดแทนเพียงอย่างเดียวในผู้ป่วยที่ตัดรังไข่ (Nagata et al., 2005) ในทางตรงกันข้ามกับผลของการลดอาการซึมเศร้า ผลการวิจัยของผู้วิจัยกลับไม่พบฤทธิ์คลายกังวลในหนูกลุ่มตัดรังไข่แม้ว่าจะได้รับหรือไม่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน

การเพิ่มการทำงานของระบบเซโรโทนินในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับความกังวล เช่น amygdala มีรายงาน

ว่าเป็นกลไกหนึ่งของกระบวนการลดกังวลทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (Inoue et al., 2004) กลไกคลายกังวลของยาในกลุ่ม SSRI ก็เช่นเดียวกัน คือการเพิ่มการทำงานของระบบเซโรโโทนินผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ SERT แล้วมีผลให้มีปริมาณเซโรโโทนินคั่งอยู่ใน synaptic cleft (Izumi et al., 2006) อย่างไรก็ตามผลการวิจัยในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นฤทธิ์ของยา Flx ว่าจะมีความแตกต่างกันระหว่างเพศหญิงและเพศชาย เนื่องจากพบฤทธิ์คลายกังวลในหนูเพศผู้ แต่ไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ แม้ว่าจะให้เอสโตรเจนทดแทน ซึ่งการออกฤทธิ์ของ Flx ในหนูเพศผู้อาจขึ้นอยู่กับฮอร์โมนเพศชายของหนู (Fink et al., 1999) แต่อาจไม่ใช่ testosterone โดยตรงที่มีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์คลายกังวลของยา Flx ในหนูเพศผู้ เนื่องจากรายงานของ Martínez-Mota และคณะ (2008) พบว่าประสิทธิภาพของยา Flx ในการลดอาการซึมเศร้าในหนูเพศผู้จะลดลงเมื่อได้รับสารที่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aromatase ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นความสำคัญของ E2 ที่ถูกเปลี่ยนมาจาก testosterone ดังนั้นในหนูเพศผู้ เอสโตรเจนก็เป็นฮอร์โมนที่สำคัญในการออกฤทธิ์ลดอาการซึมเศร้าของยา Flx เช่นเดียวกับที่พบในเพศเมีย

สำหรับผลของเอสโตรเจน ในงานวิจัยนี้ได้แสดงให้เห็นผลคลายกังวลที่ชัดเจน มีหลายงานวิจัยที่แสดงถึงกลไกคลายกังวลของเอสโตรเจน งานวิจัยหนึ่งแสดงให้เห็นว่า หนูที่ถูกตัดรังไข่มีระดับของตัวรับเซโรโโทนินลดลงในหลายส่วนของสมอง ได้แก่ frontal cortex, striatum และ nucleus accumbens และเมื่อให้ E2 ทดแทนก็สามารถทำให้ระดับของตัวรับเหล่านี้กลับขึ้นมาเท่าปกติได้ (Cyr et al., 2000) จากหลายการศึกษาแบบ in vitro แสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนสามารถยับยั้งการทำงานของ SERT ได้ ทำให้มีการคั่งของเซโรโโทนินที่ synaptic cleft ซึ่งคล้ายผลของยาในกลุ่ม SSRI (Chang and Chang, 1999; Koldzic-Zivanovic et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าเอสโตรเจนเพิ่มการทำงานของเซโรโโทนินที่บริเวณ synaptic cleft โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการ desensitization ของตัวรับ 5-HT_{1A} และ 5-HT_{1B} ที่ presynaptic neuron (Hiroi and Neumaier, 2009; Raap et al., 2000) ซึ่งเป็นตัวรับที่มีหน้าที่ยับยั้งการหลั่งของเซโรโโทนิน การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ TPH2 ที่บริเวณ dorsal raphé ก็เป็นอีกกลไกหนึ่งที่ทำให้มีการสร้างเซโรโโทนินมากขึ้นและมีผลให้เซโรโโทนินทำงานได้มากขึ้น ผลดังกล่าวพบทั้งในการวิจัยครั้งนี้ (ภาพที่ 10B) และจากงานวิจัยอื่นทั้งที่ศึกษาในหนู (Hiroi et al., 2006) และในลิง (Bethea et al., 2002b) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้มีลักษณะเป็น site-specific เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่บริเวณ midbrain (Pandaranandaka et al., 2009) มีรายงานว่า การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ TPH2 mRNA พบที่บริเวณ caudal subregion ของ dorsal raphé แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวที่บริเวณ rostral dorsomedial subregion และการเปลี่ยนแปลงนี้สัมพันธ์กับพฤติกรรมกังวลที่ลดลง (Hiroi et al., 2006) นอกจากเอสโตรเจนจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ TPH2 แล้วส่งผลให้มีปริมาณเซโรโโทนินเพิ่มขึ้นแล้ว ยังพบอีกว่าเอสโตรเจนสามารถยับยั้งเอนไซม์ monoamine oxidase ชนิด A ซึ่งส่งผลให้มีการทำลายเซโรโโทนินลดลงด้วย (Holschneider et al., 1998; Ma et al., 1995) จากรายงานทั้งหมดนี้แสดงให้เห็นว่า กลไกคลายกังวลของเอสโตรเจนเป็นผลมาจากการเพิ่มการทำงานของเซโรโโทนินที่ synaptic cleft และการเพิ่มจำนวนตัวรับของเซโรโโทนินที่ postsynaptic neuron ในส่วนของสมองที่สัมพันธ์กับความกังวล จะเห็นได้ว่ากลไกดังกล่าวคล้ายกับกลไกการออกฤทธิ์ของยาในกลุ่ม SSRI

การเพิ่มการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน (ภาพที่ 10A) อาจเกิดขึ้นจากการปรับตัวเมื่ออยู่ในภาวะที่มีเซโรโโทนินมากที่ synaptic cleft เป็นเวลานาน

แต่ในทางกลับกัน จากการศึกษาโดยวิธี culture เซโรโตนินนิวรอน พบว่าการคั่งของเซโรโตนินในเวลาสั้น ๆ ที่ 4 ชั่วโมง ทำให้โปรตีน SERT เกิด internalization (Kittler et al., 2010) การแสดงออกของยีน SERT ที่เพิ่มขึ้นนี้ แสดงถึงการเปลี่ยนแปลงการ turnover ของเซโรโตนินในสมองส่วนที่ถูก innervate โดย นิวเคลียสจาก dorsal raphé ผลการวิจัยในครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่นที่ผ่านมา คือพบว่าการให้เอสโตรเจนมีผลคล้ายกับการทำให้เกิด positive feedback และตามด้วย gonadotropin surge ในภาวะดังกล่าว พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของจำนวน SERT ในหลายส่วนของสมอง เช่น septum, basolateral amygdala และ นิวเคลียส ventromedial ของ hypothalamus (McQueen et al., 1997) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาวิจัยใน ครั้งนี้ยังมีอาจสรุปได้ว่า การแสดงออกของยีน SERT ที่เพิ่มขึ้น เป็นการ compensate เพื่อเพิ่มเซโรโตนิน turnover หรือเป็นผลของเอสโตรเจนที่ทำให้เกิดการลดลงของพฤติกรรมกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่

ผลของการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้าง SERT และ TPH2 ในหนูกลุ่ม Ovx+Flx พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งสอดคล้องกับผลของการทดสอบพฤติกรรมกังวลที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกัน จาก ผลดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า Flx ไม่มีฤทธิ์คลายกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ แม้ว่าจะได้รับเอสโตรเจนทดแทน อย่างไรก็ตามบทบาทของฮอร์โมนเพศหญิงอื่นคือ progesterone (Bethea et al., 2002a) ก็มีโอกาสที่จะตัดทิ้ง ได้ หรืออาจเป็นไปได้ว่าการไม่พบความแตกต่างของกลุ่ม Ovx+E2 และ Ovx+E2+Flx เป็นผลมาจากทั้ง E2 และ Flx ต่างก็ใช้กลไกเดียวกันในการออกฤทธิ์คลายกังวล พฤติกรรมกังวลที่เกิดขึ้นจึงเป็นการลดลงเต็มที่ แล้ว

โดยสรุปผลการวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า เอสโตรเจนมีฤทธิ์คลายกังวลในหนูที่ถูกตัดรังไข่ แต่ยา Flx กลับไม่พบฤทธิ์ดังกล่าวทั้งหนูในกลุ่ม Ovx หรือ Ovx+E2 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาทางคลินิกที่ผ่านมา ว่า การให้เอสโตรเจนทดแทนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนสามารถลดกังวลได้ (Schneider et al., 1997; Westlund and Perry, 2003; Zanardi et al., 2007) ยิ่งไปกว่านั้น กลไกคลายกังวลของเอสโตรเจนอาจ เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงระบบสารสื่อประสาทเซโรโตนิน เช่น การเพิ่มปริมาณ TPH และ SERT ส่งผล ให้เพิ่มการสร้างเซโรโตนิน และเพิ่มการ turnover

6. เอกสารอ้างอิง

- Albert DJ, Jonik RH, Gorzalka BB, Newlove T, Webb B, Walsh ML. Serum estradiol concentration required to maintain body weight, attractivity, proceptivity, and receptivity in the ovariectomized female rat. *Physiol Behav* 1991;49:225–31.
- Amin Z, Canli T, Epperson CN. Effect of estrogen-serotonin interactions on mood and cognition. *Behav Cogn Neurosci Rev* 2005;4:43–58.
- Apparsundaram S, Stockdale DJ, Henningsen RA, Milla ME, Martin RS. Antidepressants targeting the serotonin reuptake transporter act via a competitive mechanism. *J Pharmacol Exp Ther* 2008;327:982–90.
- Arpels JC. The female brain hypoestrogenic continuum from the premenstrual syndrome to menopause. A hypothesis and review of supporting data. *J Reprod Med* 1996;41:633–9.
- Bethea CL, Lu NZ, Gundlach C, Streicher JM. Diverse actions of ovarian steroids in the serotonin

- neural system. *Front Neuroendocrinol* 2002a;23:41–100.
- Bethea CL, Mirkes SJ, Su A, Michelson D. Effects of oral estrogen, raloxifene and arzoxifene on gene expression in serotonin neurons of macaques. *Psychoneuroendocrinology* 2002b;27:431–45.
- Bromberger JT, Meyer PM, Kravitz HM, Sommer B, Cordal A, Powell L, et al. Psychologic distress and natural menopause: a multiethnic community study. *Am J Public Health* 2001;91:1435–42.
- Chang AS, Chang SM. Nongenomic steroidal modulation of high-affinity serotonin transport. *Biochim Biophys Acta* 1999;1417:157–66.
- Charoenphandhu N, Nakkrasae LI, Kraidith K, Teerapornpuntakit J, Thongchote K, Thongon N, et al. Two-step stimulation of intestinal Ca²⁺ absorption during lactation by long-term prolactin exposure and suckling-induced prolactin surge. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009;297:E609–19.
- Colenda CC, Legault C, Rapp SR, DeBon MW, Hogan P, Wallace R, et al. Psychiatric disorders and cognitive dysfunction among older, postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Memory Study. *Am J Geriatr Psychiatry* 2010;18:177–86.
- Cyr M, Landry M, Di Paolo T. Modulation by estrogen-receptor directed drugs of 5-hydroxytryptamine-2A receptors in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2000;23:69–78.
- De Vry J, Schreiber R, Melon C, Dalmus M, Jentzsch KR. 5-HT_{1A} receptors are differentially involved in the anxiolytic- and antidepressant-like effects of 8-OHDPAT and fluoxetine in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 2004;14:487–95.
- Diaz-Veliz G, Urresta F, Dussaubat N, Mora S. Effects of estradiol replacement in ovariectomized rats on conditioned avoidance responses and other behaviors. *Physiol Behav* 1991;50:61–5.
- Eison AS, Eison MS. Serotonergic mechanisms in anxiety. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1994;18:47–62.
- Estrada-Camarena E, Fernández-Guasti A, López-Rubalcava C. Interaction between estrogens and antidepressants in the forced swimming test in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;173:139–45.
- Fairbanks JM, Pine DS, Tancer NK, Dummit ES, 3rd, Kentgen LM, Martin J, et al. Open fluoxetine treatment of mixed anxiety disorders in children and adolescents. *J Child Adolesc Psychopharmacol* 1997;7:17–29.
- Fink G, Sumner B, Rosie R, Wilson H, McQueen J. Androgen actions on central serotonin neurotransmission: relevance for mood, mental state and memory. *Behav Brain Res* 1999;105:53–68.

- Frazer A, Hensler JG. Serotonin. In: Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD, editors. *Basic neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1999. p. 263–92.
- Graeff FG, Viana MB, Mora PO. Opposed regulation by dorsal raphe nucleus 5-HT pathways of two types of fear in the elevated T-maze. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;53:171–7.
- Graeff FG, Viana MB, Tomaz C. The elevated T maze, a new experimental model of anxiety and memory: effect of diazepam. *Braz J Med Biol Res* 1993;26:67–70.
- Heaney AP, Fernando M, Melmed S. Functional role of estrogen in pituitary tumor pathogenesis. *J Clin Invest* 2002;109:277–83.
- Heffner TG, Hartman JA, Seiden LS. A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1980;13:453–6.
- Hiroi R, McDevitt RA, Neumaier JF. Estrogen selectively increases tryptophan hydroxylase-2 mRNA expression in distinct subregions of rat midbrain raphe nucleus: association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Biol Psychiatry* 2006;60:288–95.
- Hiroi R, Neumaier JF. Estrogen decreases 5-HT_{1B} autoreceptor mRNA in selective subregion of rat dorsal raphe nucleus: inverse association between gene expression and anxiety behavior in the open field. *Neuroscience* 2009;158:456–64.
- Ho YJ, Wang CF, Hsu WY, Tseng T, Hsu CC, Kao MD, et al. Psychoimmunological effects of dioscorea in ovariectomized rats: role of anxiety level. *Ann Gen Psychiatry* 2007;6:21. doi:10.1186/1744-859X-6-21
- Hogg S. A review of the validity and variability of the elevated plus-maze as an animal model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1996;54:21–30.
- Holschneider DP, Kumazawa T, Chen K, Shih JC. Tissue-specific effects of estrogen on monoamine oxidase A and B in the rat. *Life Sci* 1998;63:155–60.
- Inoue T, Li XB, Abekawa T, Kitaichi Y, Izumi T, Nakagawa S, et al. Selective serotonin reuptake inhibitor reduces conditioned fear through its effect in the amygdala. *Eur J Pharmacol* 2004;497:311–6.
- Izumi T, Inoue T, Kitaichi Y, Nakagawa S, Koyama T. Target brain sites of the anxiolytic effect of citalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor. *Eur J Pharmacol* 2006;534:129–32.
- Kent JM, Coplan JD, Gorman JM. Clinical utility of the selective serotonin reuptake inhibitors in the spectrum of anxiety. *Biol Psychiatry* 1998;44:812–24.
- Kim SW, Park SY, Hwang O. Up-regulation of tryptophan hydroxylase expression and serotonin synthesis by sertraline. *Mol Pharmacol* 2002;61:778–85.
- Kittler K, Lau T, Schloss P. Antagonists and substrates differentially regulate serotonin transporter cell surface expression in serotonergic neurons. *Eur J Pharmacol* 2010;629:63–7.

- Koldzic-Zivanovic N, Seitz PK, Watson CS, Cunningham KA, Thomas ML. Intracellular signaling involved in estrogen regulation of serotonin reuptake. *Mol Cell Endocrinol* 2004;226:33–42.
- Leibowitz SF, Alexander JT. Hypothalamic serotonin in control of eating behavior, meal size, and body weight. *Biol Psychiatry* 1998;44:851–64.
- Lund TD, Rovis T, Chung WC, Handa RJ. Novel actions of estrogen receptor- α on anxiety related behaviors. *Endocrinology* 2005;146:797–807.
- Ma ZQ, Violani E, Villa F, Picotti GB, Maggi A. Estrogenic control of monoamine oxidase A activity in human neuroblastoma cells expressing physiological concentrations of estrogen receptor. *Eur J Pharmacol* 1995;284:171–6.
- Martínez-Mota L, Cruz-Martínez JJ, Márquez-Baltazar S, Fernández-Guasti A. Estrogens participate in the antidepressant-like effect of desipramine and fluoxetine in male rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2008;88:332–40.
- McQueen JK, Wilson H, Fink G. Estradiol-17 β increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 1997;45:13–23.
- Nagata H, Nozaki M, Nakano H. Short-term combinational therapy of low-dose estrogen with selective serotonin re-uptake inhibitor (fluvoxamine) for oophorectomized women with hot flashes and depressive tendencies. *J Obstet Gynaecol Res* 2005;31:107–14.
- Österlund MK, Halldin C, Hurd YL. Effects of chronic 17 β -estradiol treatment on the serotonin 5-HT_{1A} receptor mRNA and binding levels in the rat brain. *Synapse* 2000;35:39–44.
- Pae CU, Mandelli L, Kim TS, Han C, Masand PS, Marks DM, et al. Effectiveness of antidepressant treatments in pre-menopausal versus post-menopausal women: a pilot study on differential effects of sex hormones on antidepressant effects. *Biomed Pharmacother* 2009;63:228–35.
- Pandaranandaka J, Poonyachoti S, Kalandakanond-Thongsong S. Differential effects of exogenous and endogenous estrogen on anxiety as measured by elevated T-maze in relation to the serotonergic system. *Behav Brain Res* 2009;198:142–8.
- Pinto-Meza A, Usall J, Serrano-Blanco A, Suarez D, Haro JM. Gender differences in response to antidepressant treatment prescribed in primary care. Does menopause make a difference? *J Affect Disord* 2006;93:53–60.
- Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety like behaviors: a review. *Eur J Pharmacol* 2003;463:3–33.
- Raap DK, DonCarlos L, Garcia F, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G, et al. Estrogen desensitizes 5-HT_{1A} receptors and reduces levels of G α_z , G α_{i1} and G α_{i3} proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology* 2000;39:1823–32.
- Rocca WA, Grossardt BR, Geda YE, Gostout BS, Bower JH, Maraganore DM, et al. Longterm risk

- of depressive and anxiety symptoms after early bilateral oophorectomy. *Menopause* 2008;15:1050–9.
- Sakowski SA, Geddes TJ, Thomas DM, Levi E, Hatfield JS, Kuhn DM. Differential tissue distribution of tryptophan hydroxylase isoforms 1 and 2 as revealed with monospecific antibodies. *Brain Res* 2006;1085:11–8.
- Schmitt U, Hiemke C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1998;22:1197–215.
- Schneider LS, Small GW, Clary CM. Estrogen replacement therapy and antidepressant response to sertraline in older depressed women. *Am J Geriatr Psychiatry* 2001;9:393–9.
- Schneider LS, Small GW, Hamilton SH, Bystritsky A, Nemeroff CB, Meyers BS. Estrogen replacement and response to fluoxetine in a multicenter geriatric depression trial. Fluoxetine Collaborative Study Group. *Am J Geriatr Psychiatry* 1997;5:97–106.
- Sell SL, Craft RM, Seitz PK, Stutz SJ, Cunningham KA, Thomas ML. Estradiol-sertraline synergy in ovariectomized rats. *Psychoneuroendocrinology* 2008;33:1051–60.
- Strickler R, Stovall DW, Merritt D, Shen W, Wong M, Silfen SL. Raloxifene and estrogen effects on quality of life in healthy postmenopausal women: a placebo-controlled randomized trial. *Obstet Gynecol* 2000;96:359–65.
- Tomihara K, Soga T, Nomura M, Korach KS, Gustafsson JÅ, Pfaff DW, et al. Effect of ER- β gene disruption on estrogenic regulation of anxiety in female mice. *Physiol Behav* 2009;96:300–6.
- Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2003;27:85–102.
- von Mühlen DG, Kritz-Silverstein D, Barrett-Connor E. A community-based study of menopause symptoms and estrogen replacement in older women. *Maturitas* 1995;22:71–8.
- Westlund TL, Parry BL. Does estrogen enhance the antidepressant effects of fluoxetine? *J Affect Disord* 2003;77:87–92.
- Zanardi R, Rossini D, Magri L, Malaguti A, Colombo C, Smeraldi E. Response to SSRIs and role of the hormonal therapy in post-menopausal depression. *Eur Neuropsychopharmacol* 2007;17:400–5.
- Zhang Y, Raap DK, Garcia F, Serres F, Ma Q, Battaglia G, et al. Long-term fluoxetine produces behavioral anxiolytic effects without inhibiting neuroendocrine responses to conditioned stress in rats. *Brain Res* 2000;855:58–66.

Output ที่ได้จากโครงการ

1. ผลงานตีพิมพ์ระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

Charoenphandhu J*, Teerapornpuntakit J, Nuntapornsak A, **Krishnamra N****, Charoenphandhu N, Anxiety-like behaviors and expression of SERT and TPH in the dorsal raphe of estrogen- and fluoxetine-treated ovariectomized rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 2011; 98: 503–510.

Impact Factor 2010: 2.967

* หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ** นักวิจัยที่ปรึกษา

2. การเสนอผลงานระดับนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

ได้นำเสนอผลงานบางส่วนแบบโปสเตอร์ ณ ที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติ 36th International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) ประเทศญี่ปุ่น ระหว่างวันที่ 27 กรกฎาคม – 1 สิงหาคม พ.ศ. 2552 ในหัวข้อ Estrogen (E2)-dependent effect of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on anxiety-like behaviors in female rats

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่

การใช้ยาฟลูออซิทินเพื่อคลายกังวลในภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน

โดย จันทริมา เจริญพันธุ์

ระดับความกังวลของผู้หญิงตั้งแต่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จนกระทั่งถึงวัยหมดประจำเดือน พบว่ามีความสัมพันธ์กับระดับของฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ในช่วงที่มีระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนต่ำจะทำให้เกิดความเครียดต่อการเกิดความผิดปกติของความกังวลเพิ่มสูงขึ้น ผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนส่วนใหญ่มีความผิดปกติของความกังวล รวมทั้งมีอาการมึนงง แปรปรวน โดยอาการที่เกิดขึ้นคือ มีอาการซึมเศร้า กระวนกระวาย มากกว่าช่วงก่อนหมดประจำเดือน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการที่เอสโตรเจนมีบทบาทควบคุมปริมาณตัวรับเซโรโตนิน และการเมตาบอริซึมของเซโรโตนิน ในหลายส่วนของสมอง เช่น hippocampus, amygdala และ frontal cortex เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดความผิดปกติของความกังวล ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ยาในกลุ่ม “ตัวยับยั้งการนำเซโรโตนินกลับเข้าเซลล์อย่างจำเพาะ” เช่น ยาฟลูออซิทิน เป็นยาตัวหนึ่งที่ถูกใช้กันอย่างกว้างขวางเพื่อเป็นยาคลายกังวล และลดอาการซึมเศร้า อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าฤทธิ์คลายวิตกกังวลของยาฟลูออซิทินมักลดประสิทธิภาพลงในผู้ป่วยที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน อย่างไรก็ตาม ปรากฏการณ์ดังกล่าวยังไม่เคยได้รับการทดสอบในสัตว์ทดลอง โดยเฉพาะในโมเดลที่ใช้หนูขาวเพศเมียที่ขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน

ผู้วิจัยจึงได้วางแผนเพื่อศึกษาพฤติกรรมกังวลในหนูขาดเอสโตรเจนจากการตัดรังไข่ 4 สัปดาห์ แล้วได้รับยาเอสโตรเจนเสริม และ/หรือ ยาฟลูออซิทิน จากนั้นวัดการแสดงออกของยีน SERT (ซึ่งสร้างโปรตีนขนส่งซีโรโตนินกลับเข้าเซลล์) และยีน TPH (ซึ่งสร้างโปรตีนทริปโตเฟนไฮดรอกซิเลสสำหรับสังเคราะห์ซีโรโตนิน) ผลการวิจัยพบว่า ยาฟลูออซิทินไม่มีฤทธิ์คลายกังวลในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ส่วนเอสโตรเจนที่ให้เสริมในหนูที่ตัดรังไข่สามารถลดความกังวลได้ ยิ่งไปกว่านั้นการให้ยาฟลูออซิทินในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับเอสโตรเจนเสริมไม่สามารถทำให้ความกังวลลดลงมากกว่าการได้รับเอสโตรเจนเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ เอสโตรเจนมีผลเพิ่มการแสดงออกของยีน SERT และยีน TPH ในสมองหนูส่วน dorsal raphe แต่ไม่มีผลต่อยีนดังกล่าวในสมองส่วน frontal cortex, hippocampus, septum, amygdala และ periaqueductal gray ในขณะที่ยาฟลูออซิทินไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนทั้งยีน SERT และยีน TPH ในสมองทุกส่วนที่ทำการวัด และการให้ยาฟลูออซิทินร่วมกับฮอร์โมนเอสโตรเจนก็ไม่ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของยีนดังกล่าวมากขึ้นจากการให้เอสโตรเจนเพียงอย่างเดียว ผลการวิจัยทั้งหมดจึงสรุปได้ว่า ยาฟลูออซิทินไม่มีผลคลายกังวลในหนูเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่แม้ว่าจะได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนเสริมอยู่ อย่างไรก็ตามฮอร์โมนเอสโตรเจนเองกลับมีผลคลายความกังวลในหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ ซึ่งอาจเป็นผลสืบเนื่องจากฮอร์โมนเอสโตรเจนไปปรับเมแทบอลิซึมของซีโรโตนินในสมองส่วน dorsal raphe

ข้อมูลเหล่านี้อาจทำให้ต้องคำนึงถึงการใช้ยาคลายกังวลในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนมากยิ่งขึ้นว่ายาดังกล่าวมีประสิทธิภาพเพียงพอหรือไม่