รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-24

รายงานการวิจัย

ผลของกรดไขมันต่อการหดตัวของมดลูกในโคนม
(Effects of Fatty Acids on Uterine Contractions from Dairy Cow)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT1-104-48-24-24

รายงานการวิจัย

ผลของกรดไขมันต่อการหดตัวของมดลูกในโคนม
(Effects of Fatty Acids on Uterine Contractions from Dairy Cow)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ. สพ.ญ. ดร. ศจีรา คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

-

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2548

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548 ผู้วิจัยขอขอบคุณแผนกโคนม ฟาร์มมหาวิทยาเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างมดลูกโคนมท้อง ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือด้านสถานที่ รวมทั้งวัสดุอุปกรณ์ในการวิจัยเพิ่มเติม ทำให้การวิจัยในครั้งนี้ลุล่วงไปด้วยดี

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

สิงหาคม 2553

บทคัดย่อภาษาไทย

มีรายงานว่าการเสริมกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว [polyunsaturated fatty acids (PUFAs)] ในอาหาร มีผลต่อหน้าที่ของระบบสืบพันธุ์ และความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมใน *in vivo* แต่ยังไม่มีการศึกษาโดยตรงใน *in vitro* ถึงกลไกที่เกี่ยวข้อง วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อทดสอบผลของ PUFAs ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic (DHA), linolenic acid และ linoleic acid ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกที่หดตัวโดยธรรมชาติและที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน ได้แก่ พรอสต้าแกลนดิน $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) เอสโตรเจน ออกซิโตซิน และโปรเจสเตอโรน โดยทำการทดสอบผลของ PUFAs ต่อความแรงและความถี่ในการหดตัว พบว่า PUFAs สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมไม่ท้องและโคนมท้องได้ โดย EPA ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ สามารถลดความแรงในการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนไม่ว่าจะเป็น $PGF_{2\alpha}$ เอสโตรเจน หรือออกซิโตซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังพบอีกด้วยว่า EPA มีผลไปเสริมฤทธิ์โปรเจสเตอโรนซึ่งทำให้มดลูกคลายตัวมากยิ่งขึ้น การเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์กล้ามเนื้อไม่สามารถยับยั้งผลของ EPA ได้ PUFAs อีก 3 ชนิด ให้ผลในการยับยั้งเช่นเดียวกันกับ EPA สรุปได้ว่า PUFAs สามารถลดความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก ไม่ว่าจะเป็นการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติหรือที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมน และมีผลทั้งในโคนมไม่ท้องและโคนมท้อง ซึ่งกลไกการยับยั้งนี้ ไม่น่าจะเกิดจากการที่ PUFAs ไปยับยั้งการเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อมดลูกของแคลเซียมผ่านทางประตู L-type และไม่ได้เกิดจากเมทาบอไลต์ของ PUFAs เนื่องจากสารยับยั้งเมตาบอไลต์ของ PUFAs คือ eicosatetraynoic acid ไม่สามารถหักล้างฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของ PUFAs ได้ ฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโดย PUFAs สามารถหักล้างด้วยการให้ bovine serum albumin จึงสรุปได้ว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของมดลูก PUFAs น่าจะเกิดจากการที่ PUFAs ไปรบกวนโครงสร้างผนังเซลล์ทำให้มดลูกไวต่อสิ่งเร้าน้อยลง ผลการวิจัยสรุปได้ว่า การให้ PUFAs แก่โคนมอาจมีประโยชน์ในการป้องกันการแท้งและทำให้เกิดการยอมรับการตั้งท้องได้ดียิ่งขึ้น

คำสำคัญ: กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว, กล้ามเนื้อเรียบมดลูก, การหดตัว, โคนม

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Growing evidence indicates that the supplemental polyunsaturated fatty acids (PUFAs) may target reproductive tissues to alter reproductive function and fertility in dairy cows. However, there is no direct evidence demonstrating the underlying mechanisms of PUFAs. The aim of the study was to investigate the effects of PUFAs [eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), linolenic acid and linoleic acid] on myometrial contractility arising either spontaneously or agonist stimulation, including prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$), estrogen, oxytocin, and progesterone in non-pregnant and pregnant dairy cows. Myometrial tissues were obtained from slaughtered dairy cows and longitudinal myometrial strips were isolated. The strips were mounted in organ baths for a measurement of contractility and the effects of PUFAs were examined. PUFAs inhibited myometrial contractility in both non-pregnant and pregnant dairy cows. EPA at 10 μM significantly reduced the amplitude of spontaneous and hormones ($PGF_{2\alpha}$, estrogen and oxytocin)-induced contractions. Interestingly, EPA enhanced relaxing effect on the uterus produced by progesterone. Increased in external calcium concentration did not reverse the effect of the fatty acid. Three other PUFAs also exhibited similar effects compared with EPA. Thus, PUFAs can reduce myometrial contractility in the dairy cows, irrespective of how it is produced, they can also affect the contractility at any stage of reproduction. The underlying mechanism is unlikely to occur due to the inhibition of Ca entry via L-type calcium channels and may not involve PUFAs metabolites since the inhibitor of PUFAs metabolites, eicosatetraynoic acid, could not reverse the inhibitory effects of PUFAs. However, the inhibitory effects of PUFAs were deteriorated when bovine serum albumin was present. Thus, the inhibitory effects of PUFAs may possibly due to an alteration of membrane structure leading to less excitability of the myometrium. In conclusion, PUFAs may be beneficial to prevent early abortion and promote maternal recognition in the dairy cows.

Key words: polyunsaturated fatty acids, myometrium, contractility, dairy cow

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญรูป	จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	ช
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	5
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
แหล่งที่มาของข้อมูล	6
วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล	8
วิธีวิเคราะห์ข้อมูล	8
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	9
บทที่ 4 สรุปผลการวิจัย และการอภิปรายผล	
สรุปผลการวิจัย	26
ข้อเสนอแนะ	30
บรรณานุกรม	31
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างมดลูก	35
ภาคผนวก ข วิธีเตรียมสารละลาย Physiological Saline Solution	37
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญรูป

รูปที่	เรื่อง	หน้า
3.1	การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้อง	9
3.2	การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้องในสภาพที่มีและไม่มีแคลเซียมนอกเซลล์	10
3.3	ผลของ EPA ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมที่ไม่ตั้งท้อง	11
3.4	ผลของ PUFAs ต่อความแรงในการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง	12
3.5	ผลของ PUFAs ต่อความถี่ในการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง	12
3.6	ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้อง	13
3.7	ผลของ PUFAs ต่อแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่ถูกกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ในโคนมไม่ท้อง	14
3.8	ผลของ DHA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจน	15
3.9	ผลของ PUFAs ต่อความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่ถูกกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน	16
3.10	ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่กระตุ้นด้วยออกซิโตซิน	17
3.11	ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่ได้รับโปรเจสเตอโรน	18
3.12	ผลของการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมไม่ท้องด้วย EPA	19
3.13	ผลของ EYTA ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมไม่ท้องด้วย EPA	20
3.14	ผลของ bovine serum albumin ต่อการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดย PUFAs	20

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	เรื่อง	หน้า
3.15	การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมท้องระยะแรก	21
3.16	การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมท้องระยะท้าย	22
3.17	ผลของ EPA ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมท้อง	23
3.18	ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมท้องที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$	24
3.19	ผลของการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมท้องด้วย EPA	25

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

มม.	มิลลิเมตร
ATP	Adenosine 5-triphosphate
$CaCl_2$	Calcium chloride
DHA	Docosahexaenoic acid
EGTA	Ethylene glycol bis (β-aminoethyl-rther)-N,N,N',N,-tetraacetic acid
EPA	Eicosapentaenoic acid
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid
Mg_2SO_4	Magnesium sulphate
NaCl	Sodium chloride
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandin F_{2alpha}
°C	Degree Celsius
g	Gram
L	Liter
min	Minute, time
mM	Millimolar, concentration
μM	Micromolar, concentration
n	Sample size
p	Probability
pH	-log of hydrogen concentration
S.E.M	Standard error of mean

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

มดลูกจัดเป็นอวัยวะที่สำคัญของระบบสืบพันธุ์และมีระบบการทำงานที่ซับซ้อน โดยมีกลไกการทำงานอยู่ที่การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก (myometrium) ซึ่งมี Ca^{2+} เป็นตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการหดตัว (Wray, 1993) เมื่อกล้ามเนื้อถูกกระตุ้น Ca^{2+} จะเคลื่อนเข้าสู่เซลล์โดยผ่าน Ca^{2+} channel และจะรวมตัวกับโปรตีน calmodulin ซึ่งการรวมตัวนี้จะมีผลทำให้เอนไซม์ myosin light chain kinase เคลื่อนย้ายฟอสเฟตจาก ATP ไปให้ light myosin ทำให้ไมโอซิน อยู่ในสภาวะที่สามารถจับกับแอคตินได้ มีผลทำให้กล้ามเนื้อหดตัว ซึ่งกลไกการหดตัวที่อาศัย Ca^{2+} เป็นตัวกระตุ้นเช่นนี้เรียกว่า Ca^{2+}-calmodulin myosin light chain kinase pathway และเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นกลไกหลักที่ทำให้เกิดการหดตัวในกล้ามเนื้อเรียบของมดลูกและชนิดอื่นๆ อย่างไรก็ตามกล้ามเนื้อเรียบสามารถจะหดตัวได้โดยไม่ต้องอาศัย Ca^{2+} (non- Ca^{2+}-calmodulin myosin light chain kinase pathway) ได้เช่นกัน (Wray, 1993) ในกรณีของการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนหรือ agonist พบว่า สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวได้ทั้ง 2 ทาง นอกจากนี้แล้วฮอร์โมนหรือ agonist ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง Ca^{2+} ออกมาจากแหล่งเก็บแคลเซียมภายในเซลล์ร่วมด้วย นอกเหนือไปจากการเหนี่ยวนำให้ Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ (Wray, 1993) อาจกล่าวได้ว่า การหดตัวของมดลูกอย่างมีประสิทธิภาพนั้นต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของ ฮอร์โมน ion channels และ intracellular Ca^{2+} store (Wray et al., 2003) ดังนั้น ปัจจัยใดก็ตาม ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระบบการทำงานดังกล่าวย่อมมีผลต่อประสิทธิภาพ การทำงานของมดลูก และเกี่ยวเนื่องไปยังระบบสืบพันธุ์ได้

ในประเทศไทยธุรกิจการเลี้ยงโคนมกำลังมีการเจริญเติบโตและพัฒนาอย่างรวดเร็ว รัฐบาลได้เล็งเห็นความสำคัญของการเลี้ยงโคนมทั้งในด้านผู้ผลิตและผู้บริโภค อันจะเห็นได้จากการสนับสนุนให้มีการเลี้ยงโคนมเพิ่มขึ้น และการส่งเสริมประชาชน โดยเฉพาะเยาวชนให้หันมาดื่มนมโคและผลิตภัณฑ์จากนม อย่างไรก็ตามในการที่จะส่งเสริมการเลี้ยงโคนมให้บรรลุเป้าหมายนั้น ยังมีปัญหาในด้านการจัดการ และด้านสุขภาพของโคนมหลายประการ ที่ต้องได้รับการแก้ไขอย่างเร่งด่วน เช่น ปัญหาของระบบสืบพันธุ์ อัตราการผสมติดต่ำ การแท้ง และการคลอดยาก เป็นต้น อัตราการผสมติดและจำนวนวันที่แม่โคกลับมาเป็นสัดหลังคลอด ถือได้ว่าเป็นดัชนีหนึ่ง ที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จในการเลี้ยงโคนม การมีค่าอัตราการผสมติดที่ต่ำ และจำนวนวันที่แม่โคกลับมาเป็นสัดหลังคลอด ที่สูงกว่าค่าเฉลี่ย จะบ่งบอกถึงปัญหาการจัดการด้านการสืบพันธุ์ หรือปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ของแม่โค ในปัจจุบันวงการสัตวแพทย์ตระหนักถึงวิธีการป้องกัน และรักษาโรคที่หลีกเลี่ยงการใช้สารเคมี ฮอร์โมน ยา และยาปฏิชีวนะ มีการนำระบบการจัดการการผลิตสัตว์แบบ “ปศุสัตว์อินทรีย์” มาปฏิบัติ การใช้ PUFAs เพื่อเพิ่มอัตราการผสมติด หรือเพื่อเร่งการกลับสัดให้เร็วขึ้น จึงเป็นทางเลือกหนึ่ง ที่ทำได้ง่ายด้วยตัวเกษตรกรผู้เลี้ยงเอง มี

ความปลอดภัยและสนับสนุนนโยบาย “ปศุสัตว์อินทรีย์” ของรัฐ ดังนั้นการศึกษาวิจัยพื้นฐานเพื่อให้ได้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของ PUFAs ต่อระบบสืบพันธุ์ จึงมีความสำคัญยิ่ง และควรค่าต่อการสนับสนุน ให้มีการพัฒนาควบคู่ไปกับการศึกษาและวิจัยในด้านเสริมอาหารของ PUFAs ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาวิจัยหลายๆด้าน จึงจะสามารถนำไปอธิบายการทำงานของ PUFAs ได้อย่างถูกต้อง เพื่อที่จะนำ PUFAs ไปใช้ในการ แก้ไขปัญหาด้านการสืบพันธุ์ในโคนม

ในต่างประเทศมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับกลไกทางสรีรวิทยาของ PUFAs มากมาย (Kris-Etherton et al., 2002) ตัวอย่างเช่น PUFAs กับการป้องกันและรักษาโรคหัวใจ มีการศึกษาและวิจัยทั้งทางด้านการเสริมอาหาร (Nair, 1997) และทางสรีรวิทยา (Kang & Leaf, 1994; Negretti et al., 2000; O’Neill et al., 2002) ควบคู่กันไป โดยในทางสรีรวิทยานั้นได้มีการศึกษาลึกลงไปถึงกลไกการทำงานและการออกฤทธิ์ของ PUFAs ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ (Kang & Leaf, 1994; Negretti et al., 2000; O’Neill et al., 2002) ซึ่งพบว่า PUFAs สามารถป้องกันการเกิดการเต้นของหัวใจที่ผิดปกติได้ โดยไปลดการทำงานของ ion channels และ intracellular Ca^{2+} store (Kang & Leaf, 1994; Negretti et al., 2000; O’Neill et al., 2002) ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับกลไกทางสรรีรวิทยาอันเป็นพื้นฐานการทำงานของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกโดยตรง อย่างเช่นการศึกษาในหัวใจ สำหรับโครงการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของ PUFAs ต่อสรรีวิทยาการหดตัวของมดลูกและได้ทำการทดสอบทาง *in vitro* เท่านั้น โดยวัดผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous contraction) และที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน

ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน

กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acids ;PUFAs) จัดเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acids) แต่โคนมไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้ในร่างกาย จำเป็นต้องได้รับจากอาหาร ตัวอย่างของ PUFAs ที่มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), linoleic acid และ linolenic acid โดยทั่วไปแล้วปริมาณของ PUFAs ในร่างกายโคมีจำนวนน้อย เนื่องจาก PUFAs ที่ได้จากอาหารถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) เป็นส่วนใหญ่ในกระเพาะพักอาหาร (rumen) อย่างไรก็ตามปริมาณของ PUFAs ในร่างกายสามารถเพิ่มให้มากขึ้นได้ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของ PUFAs ในอาหารที่ให้ หรือให้ PUFAs ในรูปที่ไม่ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยกระบวนการไบโอไฮโดรจิเนชัน (biohydrogenation) โดยจุลินทรีย์ในกระเพาะพักอาหาร

PUFAs พบได้ในอาหารหลายชนิด ในถั่วเหลือง เมล็ดฝ้าย และเมล็ดทานตะวัน จะมีปริมาณ linoleic acid อยู่ในปริมาณสูง ในขณะที่ linolenic acid พบได้ในหญ้าใบเขียว (green leaf forages) และ น้ำมันเมล็ดป่าน (linseed oil) ในปลาป่น (fish meal) พบว่า มีปริมาณของ EPA และ DHA อยู่ในปริมาณที่สูงเช่นกัน

องค์ความรู้ในปัจจุบันชี้ชัดว่า PUFAs มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในโคนม มีรายงานว่า การเสริม PUFAs ในอาหารสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ได้ เป็นต้นว่าการเสริมอาหารโคนมด้วยเมล็ดฝ้าย หรือเสริมอาหารด้วยไขสัตว์ที่ประกอบด้วย linoleic acid 10% และ 4.3% ตามลำดับจะช่วยทำให้อัตราการผสมติดดีขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Garcia-Bojalil et al., 1998; Son et al., 1996) นอกจากนี้การเสริมปลาป่นในอาหารก็ให้ผลเช่นกัน (Burke et al., 1997) เบื้องต้นมีการสันนิษฐานว่าการเพิ่มอัตราการผสมติดของ PUFAs เป็นผลมาจากการที่ PUFAs ไปขัดขวางการสังเคราะห์ prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) (Staples et al., 1998) โดยทั่วไปแล้ว $PGF_{2\alpha}$ จะถูกหลั่งออกมาจากมดลูกในช่วงวันที่ 17 ถึง 19 ของรอบการเป็นสัด (estrous cycle) การหลั่ง $PGF_{2\alpha}$ จะเป็นผลให้เกิดการสลายของ corpus luteum และทำให้เกิดการเข้าสู่รอบการเป็นสัดใหม่ ในกรณีที่โคตั้งท้อง ตัวอ่อนจะยับยั้งการหลั่ง $PGF_{2\alpha}$ เป็นผลให้มดลูกลดการหดตัว (uterine quiescence) ทำให้เกิดการฝังตัวของตัวอ่อน ซึ่งกระบวนการนี้เรียกว่า maternal recognition of pregnancy เนื่องจาก $PGF_{2\alpha}$ มีหน้าที่ในการสลาย corpus luteum ดังนั้นกระบวนการใดก็ตามที่ยับยั้งการสลาย corpus luteum ย่อมจะทำให้เกิด maternal recognition of pregnancy ได้ดียิ่งขึ้น (Garcia-Bojalil et al., 1998; Son et al., 1996; Staples et al., 1998; Petit et al., 2002)

ในคนและสัตว์อื่นๆก็เช่นกันพบว่า PUFAs มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ โดยในคนมีรายงานว่าการรับประทาน PUFAs ในรูปของน้ำมันปลาซึ่งประกอบด้วย EPA และ DHA สามารถบรรเทาอาการ ปวดเกร็งผิดปกติของมดลูก (premenstrual syndrome) และ การปวดประจำเดือนผิดปกติ (dysmenorrheal) ได้ (Harel et al., 1996) นอกจากนี้พบว่า PUFAs อาจจะมีผลต่อระยะเวลาของการตั้งครรภ์ (gestational length) และต่อกระบวนการคลอด (parturition) มีรายงานว่า การรับประทานน้ำมันปลาระหว่างตั้งครรภ์ในสตรีชาวเดนมาร์ก สามารถจะยืดระยะเวลาของการตั้งครรภ์ และลดการสังเคราะห์ $PGF_{2\alpha}$ ได้อย่างมีนัยสำคัญ (Olsen et al., 1986; 1991) การทดลองในหนู Wistar และในแกะก็ให้ผลเช่นเดียวกัน (Leaver et al., 1986; Olsen et al., 1986; 1992; Mathias et al., 1987; Baguma-Nibasheka et al., 1999) เนื่องจากในปัจจุบันยังไม่สามารถอธิบายขบวนการที่กระตุ้นให้เริ่มกระบวนการคลอดได้ (Lopez Bernal et al., 1995) การค้นพบดังกล่าวข้างต้นเป็นที่น่าสนใจว่า การเปลี่ยนแปลงของระดับ $PGF_{2\alpha}$ อาจจะเป็นตัวที่ทำให้เกิดการกระตุ้นขบวนการคลอด และยังผลให้เกิดการหดตัวของมดลูก (uterine contraction) ตามมา การทราบกลไกดังกล่าวนี้จะสามารถนำ PUFAs ไปใช้ประโยชน์ในการป้องกันการเกิดการคลอดก่อนกำหนด (preterm labor) ในมนุษย์ หรือนำไปใช้ในการป้องกันการแท้ง (abortion) ในสัตว์อย่างเช่นโคนมได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกทางสรรีวิทยา (physiological mechanisms of action) ดังกล่าวนี้ของ PUFAs

ในปัจจุบันแม้จะมีรายงานว่า PUFAs มีความสำคัญต่อระบบสืบพันธุ์ในโคนม แต่งานวิจัยที่ผ่านมาส่วนใหญ่ จะเป็นการศึกษาทางด้านโภชนาการ ในลักษณะของการศึกษาการเสริมอาหาร ซึ่งทำโดยเสริม PUFAs ในอาหารและวัดผลโดยศึกษาอัตราการผสมติด หรือวัดระดับของ $PGF_{2\alpha}$ ในกระแสเลือด ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการทำงาน (physiological studies) เบื้องต้นหรือการออกฤทธิ์ของ PUFAs ต่อมดลูกโดยตรงนั้นยังไม่มี โครงการวิจัยนี้จึงศึกษาผลของ PUFAs ต่อมดลูกในโคนม โดยได้ศึกษาผลของ PUFAs ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูก ทั้งนี้เพื่อให้ได้ทราบถึงกลไกการทำงานของ PUFAs ต่อระบบดังกล่าว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ PUFAs แต่ละชนิดซึ่งได้แก่ linoleic acid, linolenic acid, EPA และ DHA ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกโคนม โดยจะศึกษา

1) ผลของ PUFAs แต่ละชนิดต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous contraction) และที่ถูกกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ และฮอร์โมนชนิดอื่นๆ เช่น ออกซีโตซิน (oxytocin) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเอสโตรเจน (estrogen)
2) ผลของ PUFAs แต่ละชนิดต่อ ion channels และ intracellular Ca^{2+} store ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก
3) เปรียบเทียบผลของ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid ต่อการหดตัวของมดลูกว่าให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร
4) เปรียบเทียบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกในโคท้อง (pregnant cow)โคหลังคลอด (postpartum cow) และโคสาว (heifer)

ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาผลของ PUFAs ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกแบบ *in vitro*

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1) ได้ทราบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูก ผลที่ได้นี้จะทำให้ได้ทราบว่า PUFAs มีผลไปเพิ่มหรือลดการหดตัวของมดลูก สนับสนุนหรือไม่สนับสนุนอย่างไรต่อสมมุติฐานของการทดลองที่ได้มีมาก่อนแล้วว่าการเสริม PUFAs ลงในอาหารโคนมทำให้เกิดการยับยั้ง $PGF_{2\alpha}$ ยังผลให้เกิด uterine quiescence และ maternal recognition of pregnancy ได้ดียิ่งขึ้น
2) ได้ทราบผลของ PUFAs ต่อฮอร์โมน เนื่องจากการทำงานระบบสืบพันธุ์ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน การทราบผลดังกล่าวสามารถที่จะนำ PUFAs ไปใช้ร่วมกับฮอร์โมนได้อย่างถูกต้อง
3) ได้ทราบกลไกทางสรีรวิทยาของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูก ผลที่ได้นี้จะทำให้ทราบว่า PUFAs มีกลไกการทำงานอย่างไร เป็นต้นว่า PUFAs กระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของ ion channels และ/หรือ intracellular Ca^{2+} store การทราบผลดังกล่าวสามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการที่จะควบคุมการทำงานของมดลูกได้อย่างถูกต้อง
4) ได้ทราบว่า PUFAs แต่ละชนิดมีผลต่อการหดตัวของมดลูกที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร ในโคท้อง และโคที่ไม่ท้อง ผลที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ในการนำไปประกอบการพิจารณาเลือกใช้ชนิดของ PUFAs เพื่อเสริมลงในอาหารโคนมได้อย่างถูกต้อง
5) ได้ทราบผลของ PUFAs ต่อมดลูกในภาวะต่างๆของโคนม เช่น โคท้อง และโคที่ไม่ท้อง ว่ามีความคล้ายคลึง แตกต่าง หรือมีข้อจำกัดที่จะนำ PUFAs ไปใช้อย่างไร ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการนำ PUFAs ไปประกอบสูตรอาหารโคนมในระยะต่างๆ
6) ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จะทำการวิจัยต่อไปในอนาคต
7) ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประกอบการนำ PUFAs ไปใช้ในสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นๆ และมนุษย์

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล

ตัวอย่างมดลูก

เก็บตัวอย่างมดลูกโคนมที่ไม่ตั้งท้อง จากโรงฆ่าสัตว์ ในเขตจังหวัดนครราชสีมา และจังหวัดสระบุรี ตัวอย่างมดลูกโคนมท้องเก็บจากแผนกโคนม ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา แม่โคถูกส่งโรงฆ่าสัตว์เนื่องจากอุบัติเหตุ (จำนวนของมดลูกที่นำมาทดสอบได้จากโคที่ไม่ตั้งท้องจำนวนมากกว่า 20 ตัว อย่างไรก็ตามในตัวอย่างมดลูก 1 ตัวอย่าง (จากโค 1 ตัว) นั้นไม่จำเป็นว่าทุกชิ้นของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก (strip) ที่แยกออกมาจะเกิดการหดตัวเพื่อให้สามารถทำการทดลองได้ครบทุกการทดลองได้ ดังนั้นโค 1 ตัว อาจทำได้เพียง 1 การทดลอง การทดลองที่แสดงผลให้เห็นในงานวิจัยนี้จำนวน n ที่แสดง จึงหมายถึงจำนวนโคที่ใช้ในการศึกษา สำหรับโคที่ตั้งท้องนั้นได้ตัวอย่างมดลูกจากโคท้องระยะแรกทั้งสิ้น 2 ตัว และท้องระยะท้ายทั้งสิ้นจำนวน 3 ตัว แต่ที่สามารถหดตัวและทำการทดลองได้ มีจำนวนเพียง 3 ตัว

เนื่องจากผู้วิจัยมิได้ดำเนินการวิจัยในตัวสัตว์และมิได้ทำให้สัตว์ตายเพื่อการทดลอง เป็นเพียงการขอซื้อมดลูกจากโรงฆ่าสัตว์ท้องถิ่น แล้วนำมาทดลองต่อในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น การทดลองนี้จึงไม่ได้ขอรับการอนุญาตใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการดูแลและกำกับการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การเก็บตัวอย่างมดลูก และการแยกกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

ทันทีหลังจากที่โคถูกฆ่า ตัดมดลูกที่ไม่มีพยาธิสภาพ ขนาด 1 นิ้ว × 1 นิ้ว จากปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่ง โดยให้ตำแหน่งที่ตัดห่างจากบริเวณรอยต่อที่ปีกมดลูกทั้งสองข้าง มาเชื่อมกันประมาณ 2 นิ้ว จากนั้นแช่ตัวอย่างมดลูกในขวดเก็บตัวอย่าง ที่บรรจุสารละลาย Krebs' solution (pH = 7.4; ภาคผนวก ข) นำขวดดังกล่าวใส่ในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง เพื่อรักษาอุณหภูมิสารละลายให้อยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่เก็บได้กลับห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการทดลองภายใน 12 ชั่วโมง

เมื่อถึงห้องปฏิบัติการทำการแยก longitudinal strip (แถบกล้ามเนื้อเรียบที่ประกอบด้วยหลายๆ เซลล์ที่เรียงตัวกันคล้าย bundle ของกล้ามเนื้อลายตามแนวยาวของปีกมดลูก) ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกภายใต้กล้อง stereo microscope โดยตัด strip ให้มีขนาด 1 มม. × 5 มม. × 1 มม. ตัวอย่างมดลูก 1 ตัวอย่าง (1 นิ้ว × 1 นิ้ว) สามารถแยกได้หลาย strips ทำการผูก strip ด้วยไหมเย็บแผลเบอร์ 4 โดยทำห่วงที่ปลายด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านหนึ่งผูกเงื่อนตายทิ้งปลายไหมให้ยาว อุปกรณ์ในการเก็บตัวอย่างมดลูก และการแยก longitudinal strips ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกได้ แสดงไว้ในภาคผนวก ก

สารเคมี

ซื้อจากบริษัท Sigma® การเตรียมกรดไขมัน (stock solution) เตรียมโดยใช้เอทธานอลเป็นตัวทำละลาย ให้มีความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ กรดไขมันที่เตรียมแล้ว (stock solution) สามารถเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในภายหลังได้ ก่อนทำการทดลองได้ตรวจสอบเบื้องต้นแล้วว่า ความเข้มข้นของเอทธานอลที่ใช้กับเนื้อเยื่อ (working concentration) ไม่มีผลต่อการหดตัวของมดลูก

ความเข้มข้นของ PUFAs ที่ใช้ในการทดลองคือ 10 ไมโครโมลาร์ ซึ่งได้มีการรายงานไว้ว่าที่ระดับความเข้มข้นนี้เป็นระดับสูงที่สุด ที่เหมาะสมในการศึกษาทางสรีรวิทยาของเซลล์ โดยไม่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ไม่ทำลายผนังเซลล์และไม่มีผลต่อไมโตคอนเดรีย (Kang และ Leaf, 1994) ส่วนระดับความเข้มข้นของ $PGF_{2\alpha}$ ที่ใช้คือ 1 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากรายงาน Lukas และ Wray, 1999 ไว้ว่าเป็นระดับที่เหมาะสมในการศึกษาสรรีรวิทยาการหดตัวของมดลูก เพราะสามารถมีผลกระตุ้นการหดตัว โดยการทำให้มีการเปิดของประตูแคลเซียมที่ผนังเซลล์ และที่ซาโคพลาสมิค เรติคูลัมภายในเซลล์

วิธีการทดสอบผลของ PUFAs

การวัดแรงในการหดตัวและการทดสอบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกโคนม

นำ strip ที่เตรียมไว้เกี่ยวบ่วงเข้ากับตะขอที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ (fixed hook) ส่วนปลายไหมอีกด้านหนึ่งผูกติดกับ transducer ในขั้นตอนนี้ strip จะแขวนอยู่ภายใน organ bath chamber ที่บรรจุด้วยสารละลาย Krebs' solution ที่ถูกอุ่นให้มีอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส โดยให้มีออกซิเจน(95%) ร่วมกับคาร์บอนไดออกไซด์ ผ่านเข้าไปในสารละลายตลอดเวลา (สารละลายนี้จะมีองค์ประกอบคล้ายกับ extracellular fluid ที่ล้อมรอบเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของมดลูก) หลังจากปล่อยให้ strip แช่อยู่ในสารละลาย Krebs' solution จนกระทั่งเริ่มหดตัวได้เองโดยธรรมชาติแล้ว จึงทำการทดสอบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูก โดยการ superfused สารละลาย Kreb's ผ่านเนื้อเยื่อมดลูกที่กำลังหดตัวอยู่อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาประมาณ 30 นาที สำหรับการทดสอบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนนั้น หลังจากมดลูกหดตัวโดยธรรมชาติ ก็จะถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโดยการ superfused สารละลาย Kreb's ที่มีฮอร์โมน ผ่านเนื้อเยื่อมดลูกที่กำลังหดตัวอยู่ เมื่อจะศึกษาผลของ PUFAs ในภาวะที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและ $PGF_{2\alpha}$ ก็ทำได้โดย superfused สารละลาย Kreb's ที่มีส่วนประกอบทั้งฮอร์โมนและ PUFAs ให้แก่มดลูกแบบต่อเนื่องกันไป

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ในการบันทึกข้อมูลนั้น แรงตึงที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการหดหรือคลายตัวของกล้ามเนื้อจะส่งผ่าน transducer ซึ่ง transducer จะส่งสัญญาณผ่านต่อไปยัง bridge amplifier และมีการแปลงสัญญาณต่อโดยเครื่อง PowerLab ให้เป็นความสัมพันธ์ระหว่างแรงตึงและเวลาซึ่งจะถูกอ่านและบันทึกโดยโปรแกรม Chart Recorder และแสดงให้เห็นบนจอคอมพิวเตอร์ สำหรับอุปกรณ์ในการทดลองแสดงไว้ในภาคผนวก ก

วิธีวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ทางสถิติ

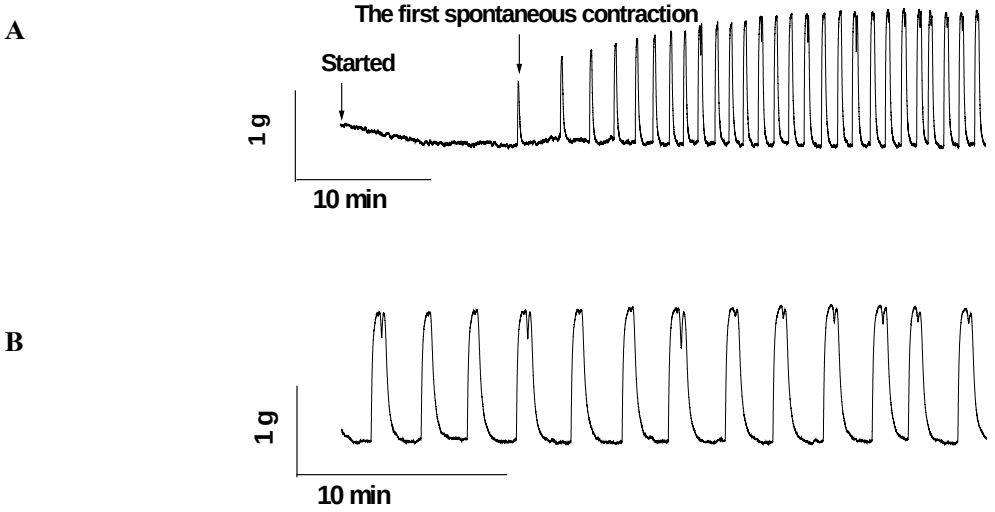
เปรียบเทียบผลก่อนและหลังการทดสอบ PUFAs โดยวิธี paired student's t-Test แสดงข้อมูลของความแรง (amplitude) และความถี่ (frequency) ในการหดตัว และพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) กรณีของการหดตัวที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน ก่อนและหลังการทดสอบ PUFAs แสดงในรูป mean ± S.E.M

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

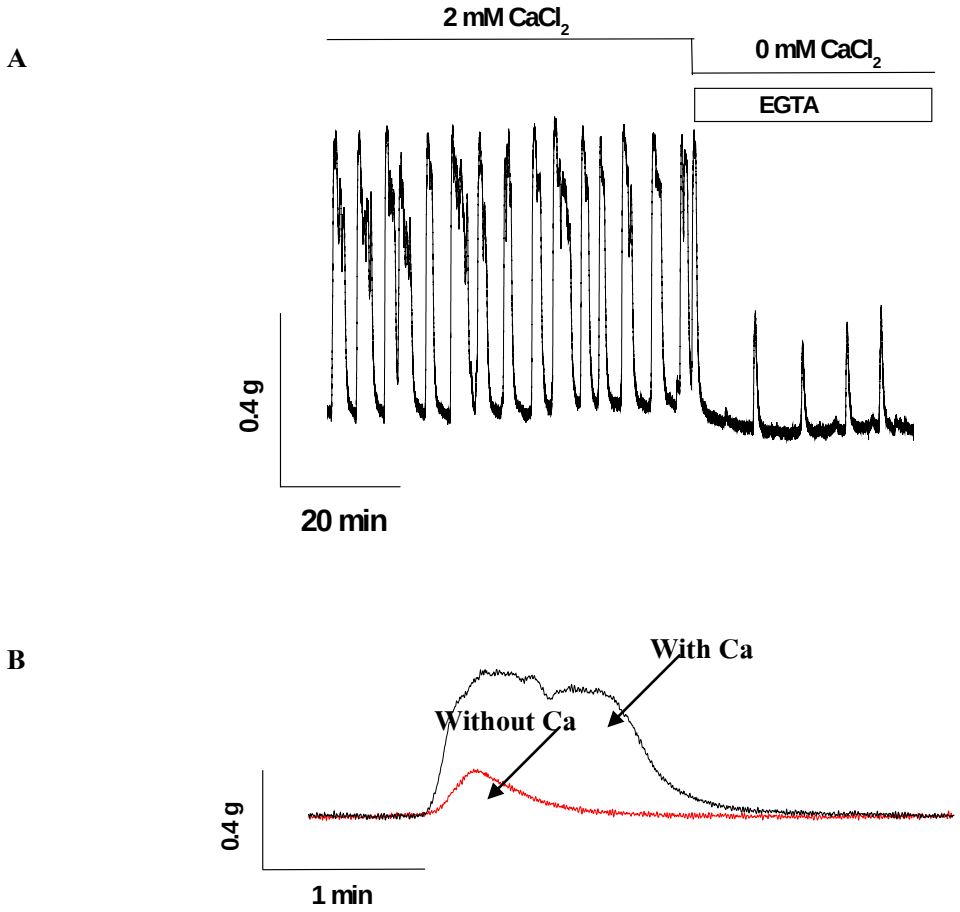
การหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง

เซลล์กล้ามเนื้อเรียบที่แยกได้จากมดลูกโคนมไม่ท้อง จะมีการหดตัวโดยธรรมชาติ ดังแสดงในรูปที่ 3.1 โดยจะเริ่มหดตัวประมาณ 20±1.91 นาที (จากจำนวน 80 strips) หลังจากเริ่มทำการทดลอง ความแรงในการหดตัวจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนถึงระดับหนึ่งหลังจากนั้นความแรงจะคงที่ และจะหดตัวด้วยความถี่ประมาณ 0.44±0.31 ครั้ง/นาที (จากจำนวน 56 strips) ซึ่งความถี่ในการหดตัวธรรมชาตินี้ มีค่าใกล้เคียงกับความถี่ของการหดตัวในมดลูกมนุษย์ (Kupittayanant et al., 2002)



รูปที่ 3.1 การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้อง *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงเวลา (นาที)* ***A*** *แสดงเวลาตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง (นาทีที่ 0, started) จนกระทั่งกล้ามเนื้อมดลูกเกิดการหดตัวครั้งแรก (ตำแหน่งที่ลูกศรชี้) และความแรงในการหดตัวค่อยๆ เพิ่มขึ้นในแต่ละครั้งจนกระทั่งแรงที่สุดแล้วจึงหดตัวต่อไปเรื่อยๆ ด้วยความถี่ที่คงที่* ***B*** *เป็นภาพขยายจาก A แสดงการหดตัวที่คงที่*

เพื่อทดสอบว่า การหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนม ขึ้นกับการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียม จากภายนอกเซลล์ผ่านประตูแคลเซียม (L-type Ca channels) ทำโดยให้ EGTA (ethylene glycol-bis (b-aminoethyl ether)-N,N,N´,N´-tetraacetic acid, 5 mM) แก่มดลูกที่กำลังหดตัว ดังแสดงในรูปที่ 3.2 EGTA ที่ให้นี้จะไปจับกับแคลเซียมภายนอกเซลล์ ทำให้แคลเซียมไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ จากรูปจะเห็นได้ว่าขณะที่มี EGTA แรงตึงของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกขณะพัก (resting tension) จะลดลงในเบื้องต้น จากนั้นความแรงในการหดตัวของมดลูกจะลดลงเหลือประมาณ 10% ของการหดตัวเมื่อเทียบกับในสภาพที่มีแคลเซียม (คิดเป็น 100% เต็ม)



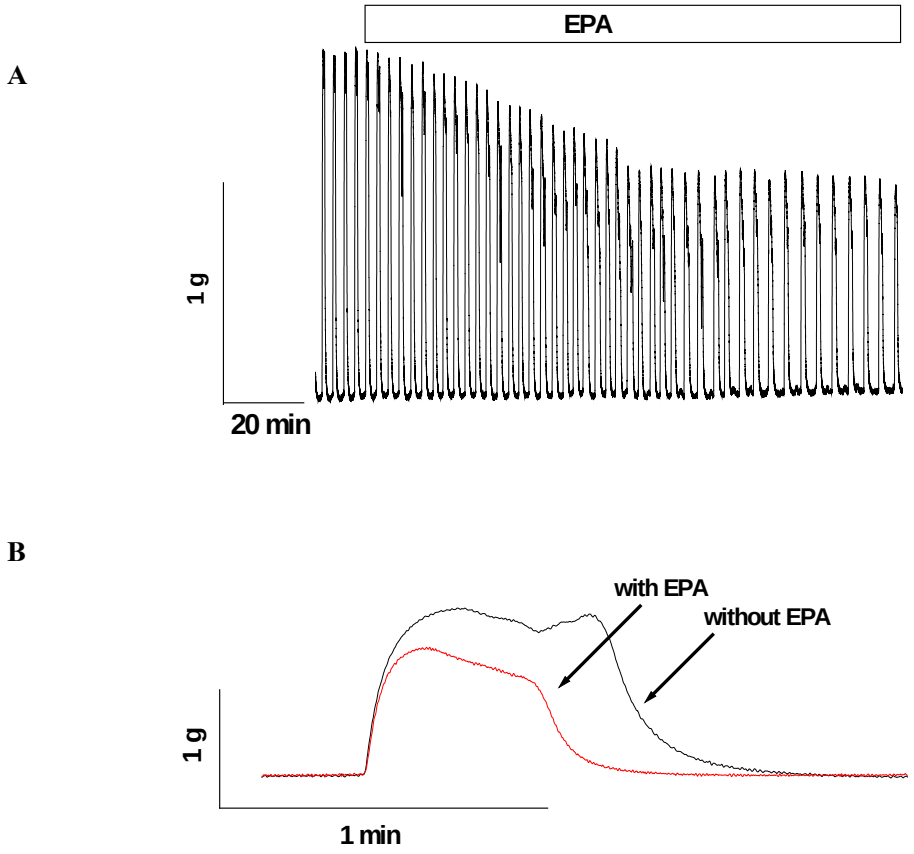
รูปที่ 3.2 การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้องในสภาพที่มีและไม่มีแคลเซียมนอกเซลล์ *แกนตั้งแสดงถึงความแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที) **A** แสดงให้เห็นถึงการหดตัวในสภาวะที่มีแคลเซียม และไม่มีแคลเซียม **B** เป็นภาพซ้อนทับแสดงการหดตัว 1 ครั้งในสภาพที่มี (with Ca^{2+}) และไม่มีแคลเซียม (without Ca^{2+})*

ผลของ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) **ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในโคนมที่ไม่ท้อง**

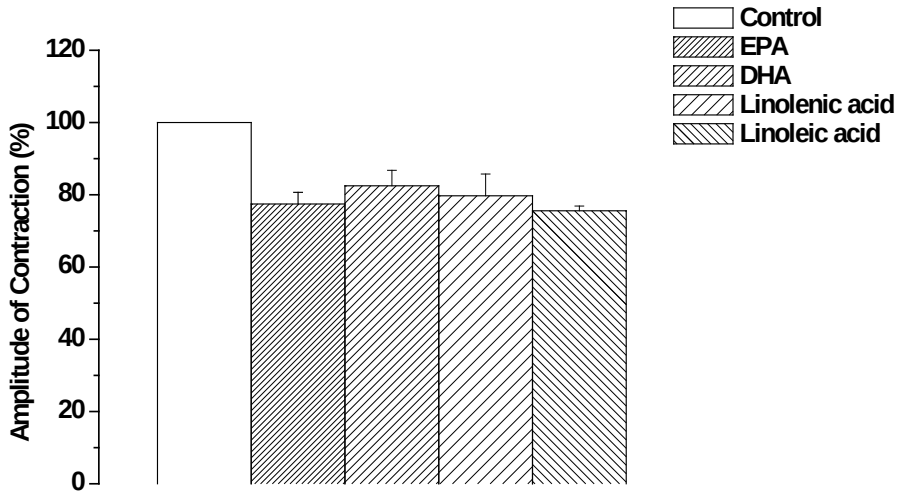
ผลของ PUFAs ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินของมดลูก

PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), linoleic acid และ linolenic acid สามารถยับยั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติในโคนมที่ไม่ท้องได้ เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับ PUFAs แต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ PUFAs แต่ละชนิดจะออกฤทธิ์ในทันที โดยทำให้ความแรงในการหดตัวค่อยๆ ลดลงทีละน้อย จนถึงระดับหนึ่ง ความแรงของการหดตัวที่ลดลงนี้จะคงที่ (stable) ดังแสดงในรูปที่ 3.3 (ยกตัวอย่าง ผลของ EPA) ภายในระยะเวลา 30 นาที PUFAs สามารถยับยั้งแรงในการหดตัวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เหลือเท่ากับ 77.46±3.23% (EPA; n = 11), 82.47±4.30% (DHA; n = 10), 79.73±6.01% (linoleic acid; n = 12) และ 75.58±3.83% (linolenic

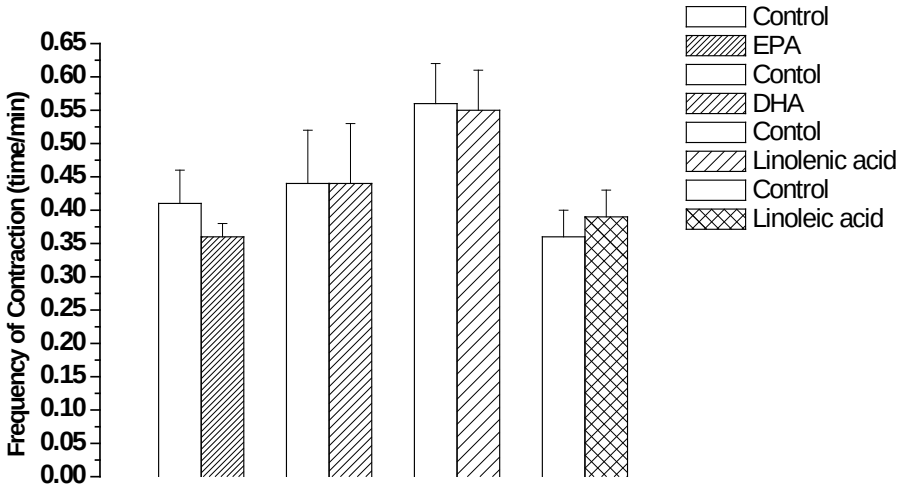
acid; n = 12) เมื่อเทียบกับการหดตัวในช่วงที่ไม่มี PUFAs ซึ่งคิดเป็น 100% ดังแสดงในรูปที่ 3.3 อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า PUFAs ทุกชนิดไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ ($p > 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3.5 ความถี่ในการหดตัวในขณะที่มี PUFAs มีค่าเท่ากับ 0.36±0.02 (EPA; n = 13), 0.44±0.09 (DHA; n = 13), 0.55±0.06 (linolenic acid; n = 15) และ 0.39±0.04 (linoleic acid; n = 15) ครั้งต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับขณะที่ไม่มี PUFAs ซึ่งมีค่าความถี่ในการหดตัวเท่ากับ 0.41±0.05 (EPA; n = 13), 0.44±0.08 (DHA; n = 13), 0.56±0.06 (linolenic acid; n = 15) และ 0.36±0.04 (linoleic acid; n = 15) ครั้งต่อนาทีตามลำดับ



รูปที่ 3.3 ผลของ EPA ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมที่ไม่ตั้งท้อง *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที) **A** แสดงให้เห็นถึงการหดตัวโดยธรรมชาติในสภาพที่ไม่มี และที่มี EPA **B** เป็นภาพซ้อนทับแสดงการหดตัว 1 ครั้งในสภาวะที่มีและไม่มี EPA*



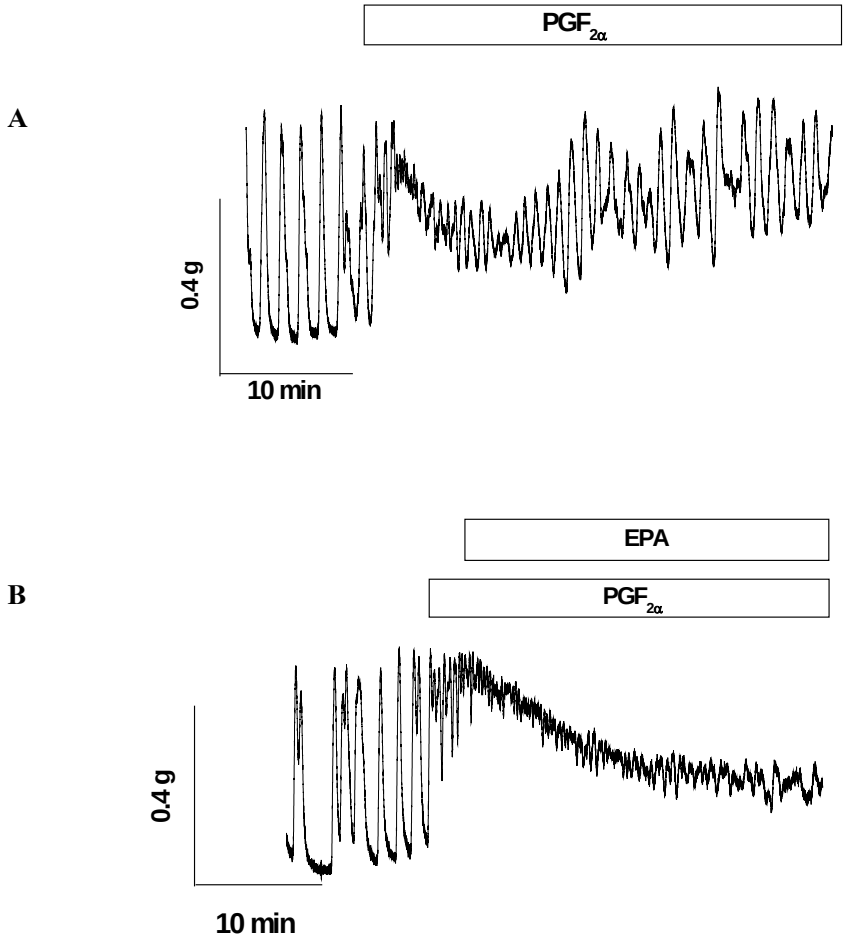
รูปที่ 3.4 ผลของ PUFAs ต่อความแรงในการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง



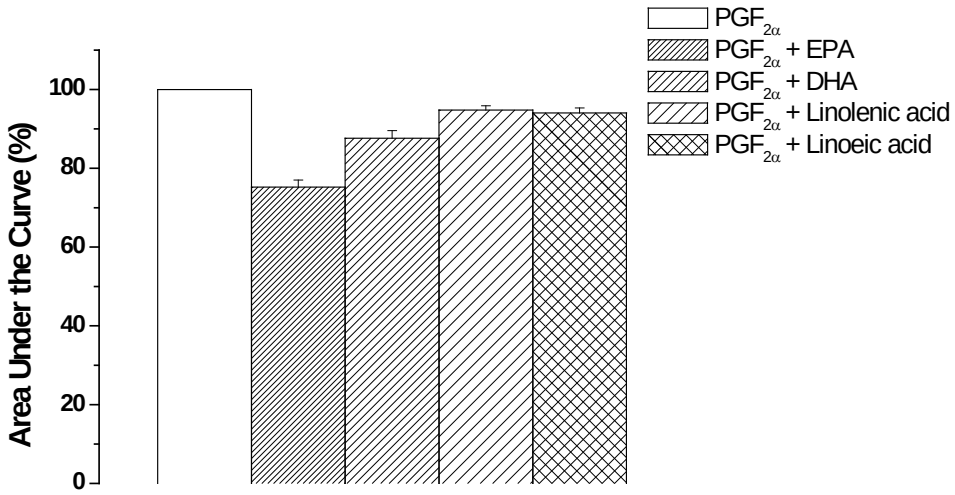
รูปที่ 3.5 ผลของ PUFAs ต่อความถี่ในการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง

PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid สามารยับยั้งการหดตัวของมดลูกกระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน ($PGF_{2\alpha}$) ในโคนมที่ไม่ท้อง ทั้งนี้คำนวณในรูปของ area under the contraction หรือ area under the curve เมื่อกำหนดให้การหดตัวขณะที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินเพียงอย่างเดียวเป็น 100% เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับการกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ จะเห็นได้ว่า $PGF_{2\alpha}$ ทำให้พื้นที่ใต้กราฟการหดตัวหรือ area under the contraction หรือ area under the curve เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมดลูกจะหดตัวเพิ่มขึ้นคิดเป็น 163.03±14.99% ($n = 11$) เมื่อเทียบกับขณะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินซึ่งคิดเป็น 100% ใน

สภาวะที่มี PUFAs (10 ไมโครโมลาร์) ร่วมด้วยพบว่า PUFAs มีผลยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในรูปที่ 3.6 (ยกตัวอย่าง ผลของ EPA) โดยพบว่า PUFAs สามารถที่จะลดการหดตัวของ (คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟการหดตัว) ที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ เหลือเท่ากับ 77.07±2.3 % (EPA, n =5), 81.30±6.46% (DHA, n = 4), 94.03±1.29% (linolenic acid; n = 4) และ 89.94±4.19 % (linoleic acid; n = 3) ภายในระยะเวลา 10 นาที เมื่อเทียบกับการหดตัวในช่วงที่ไม่มี PUFAs ซึ่งคิดเป็น 100% ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.6 ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ที่บันทึกได้จากโคนมไม่ท้อง *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)* A แสดงถึงการตอบสนองของมดลูกต่อพรอสต้าแกลนดิน B แสดงผลของ EPA ต่อการหดตัวที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน

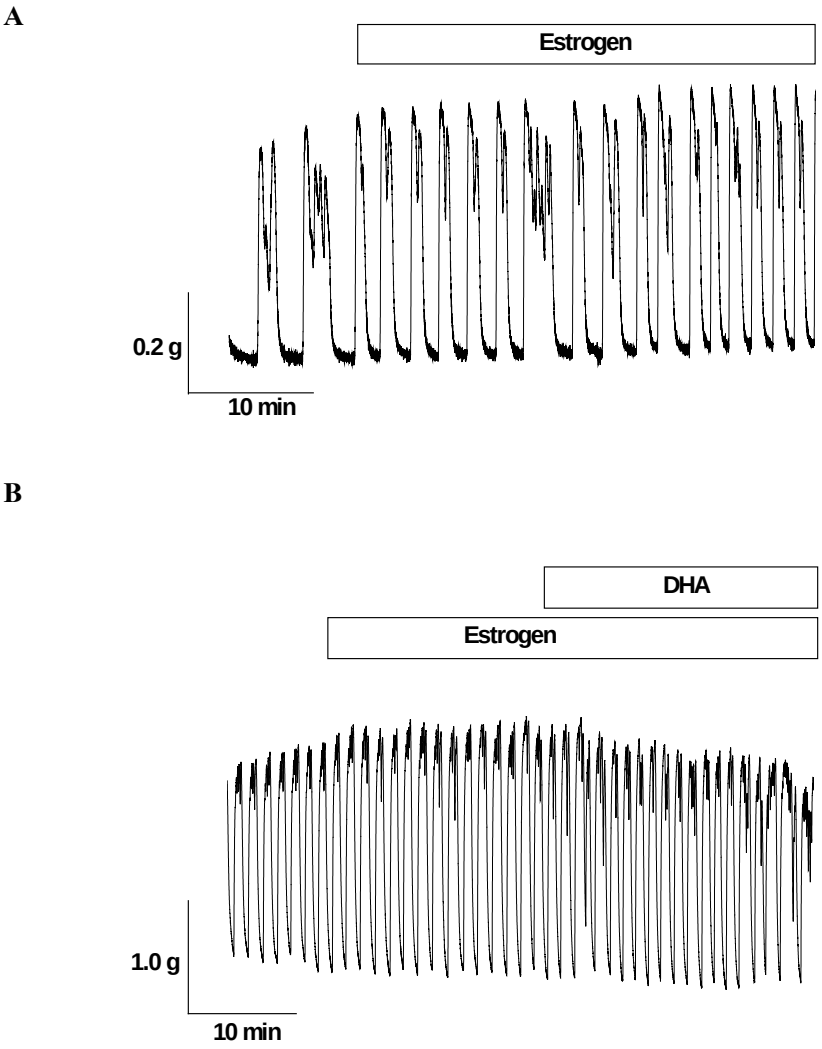


รูปที่ 3.7 ผลของ PUFAs ต่อแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกที่ถูกกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ในโคนมไม่ท้อง

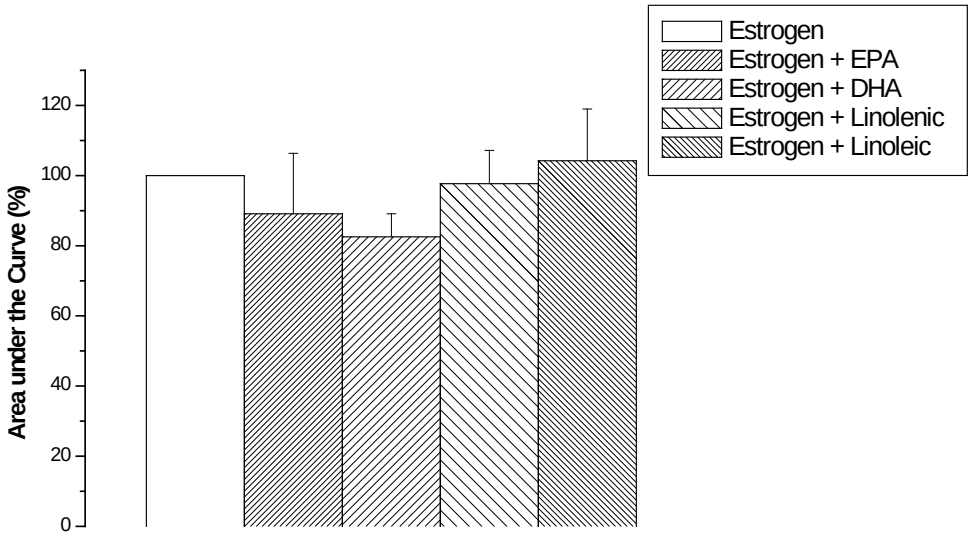
ผลของ PUFAs ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติและที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจนของมดลูก

PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid สามารยับยั้งการหดตัวของมดลูกในโคนมที่ไม่ท้องกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน ทั้งนี้คำนวณในรูปของ area under the contraction หรือ area under the curve เมื่อกำหนดให้การหดตัวขณะที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจนเพียงอย่างเดียวเป็น 100% อย่างไรก็ตาม เฉพาะ DHA เท่านั้นที่มีผลไปยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับการกระตุ้นด้วยเอสโตรเจนที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เห็นได้ว่าเอสโตรเจนจะทำให้มดลูกหดตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมดลูกจะหดตัวเพิ่มขึ้น 121.42±5.73% ($n = 11$) เมื่อเทียบกับขณะที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยเอสโตรเจนซึ่งคิดเป็น 100% ในสภาวะที่มี PUFAs (10 ไมโครโมลาร์) ร่วมด้วยพบว่า PUFAs จะไปมีผลยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจน ดังแสดงในรูปที่ 3.8 (ยกตัวอย่าง ผลของ DHA) โดยพบว่า PUFAs สามารถที่จะลดการหดตัว (คำนวณจากพื้นที่ใต้กราฟการหดตัว) ที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจนเหลือเท่ากับ 89.13±17.20% (EPA, $n = 3$), 82.55±6.58% (DHA, $n = 4$), 97.68±9.49% (linolenic acid; $n = 3$) และ 97.68±9.49% (linoleic acid; $n = 5$) ภายในระยะเวลา 10 นาที เมื่อเทียบกับการหดตัวในช่วงที่ไม่มี PUFAs ซึ่งคิดเป็น 100% ดังแสดงในรูปที่ 3.9



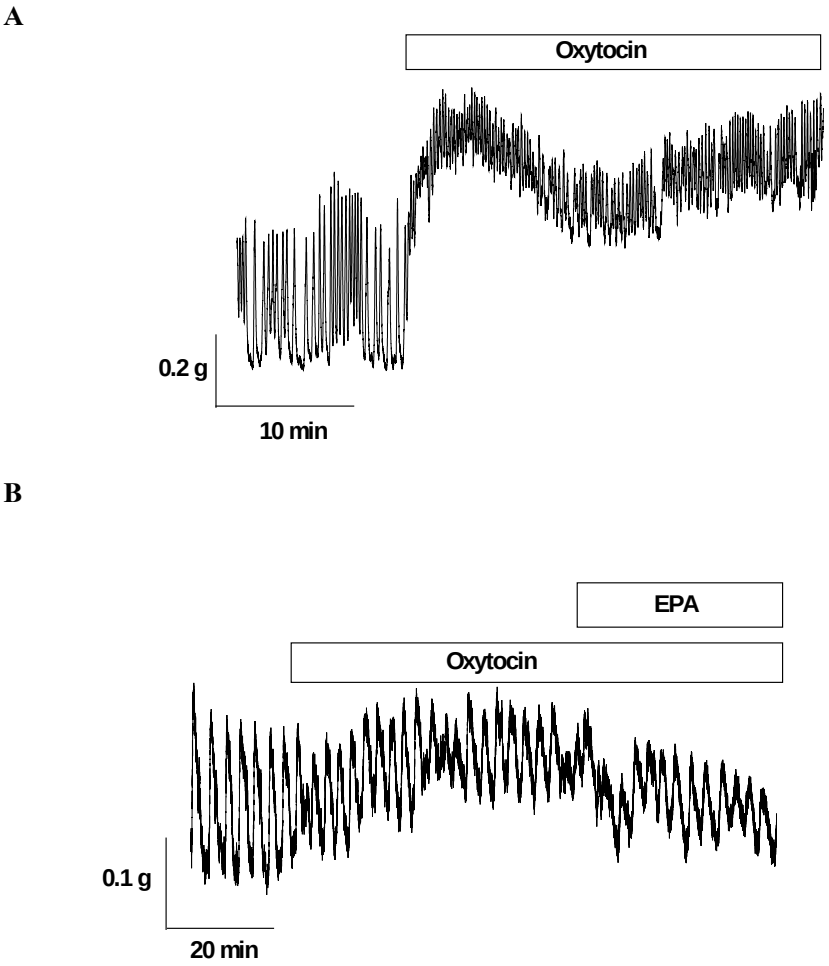
รูปที่ 3.8 ผลของ DHA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้อง ที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจน *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)* A แสดงถึงการตอบสนองของมดลูกต่อเอสโตรเจน B แสดงผลของ DHA ต่อการหดตัวที่กระตุ้นด้วยเอสโตรเจน



รูปที่ 3.9 ผลของ PUFAs ต่อความแรงในการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่ถูกกระตุ้นด้วยเอสโตรเจน

ผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นด้วยออกซิโตซิน

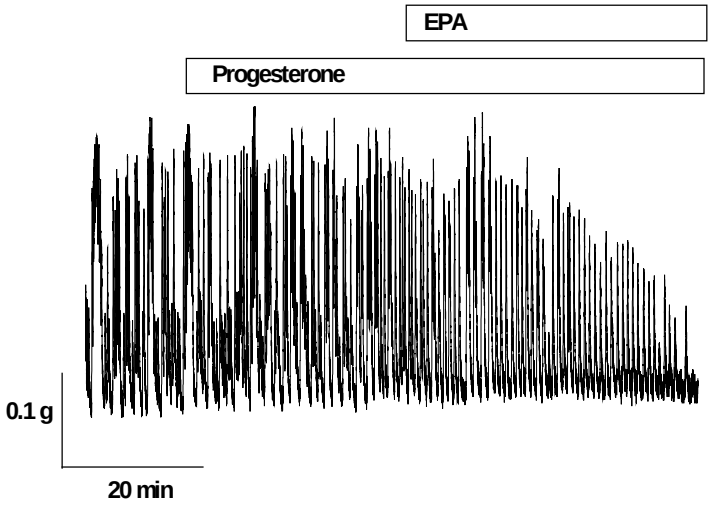
เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับการกระตุ้นด้วยออกซิโตซินที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เห็นได้ว่าออกซิโตซินจะทำให้มดลูกหดเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) โดยมดลูกจะหดตัวเพิ่มขึ้น 174.22±%24.29 ($n = 4$) เมื่อเทียบกับที่ไม่กระตุ้นด้วยออกซิโตซินซึ่งคิดเป็น 100% ในสภาวะที่มี EPA (10 ไมโครโมลาร์) ร่วมด้วยพบว่า EPA มีแนวโน้มจะไปมีผลยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วยออกซิโตซิน ดังแสดงในรูปที่ 3.10 ($n = 2$)



รูปที่ 3.10 ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่กระตุ้นด้วยออกซิโตซิน *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)* A แสดงถึงการตอบสนองของมดลูกต่อออกซิโตซิน B แสดงผลของ EPA ต่อการหดตัวที่กระตุ้นด้วยออกซิโตซิน

ผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นด้วยโปรเจสเตอโรน

เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับการกระตุ้นด้วยโปรเจสเตอโรนที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เห็นได้ว่าโปรเจสเตอโรนมีแนวโน้มทำให้มดลูกหดตัวลดลง โดยจะไปลดความถี่และความแรงในการหดตัว (n = 2) เมื่อเทียบกับขณะที่ยังไม่ได้ให้โปรเจสเตอโรน ในสภาวะที่มี EPA (10 ไมโครโมลาร์) ร่วมด้วยพบว่า EPA มีแนวโน้มไปเสริมผลในการยับยั้งการหดตัวที่เกิดจากโปรเจสเตอโรนให้มากขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 3.11 (n = 1)

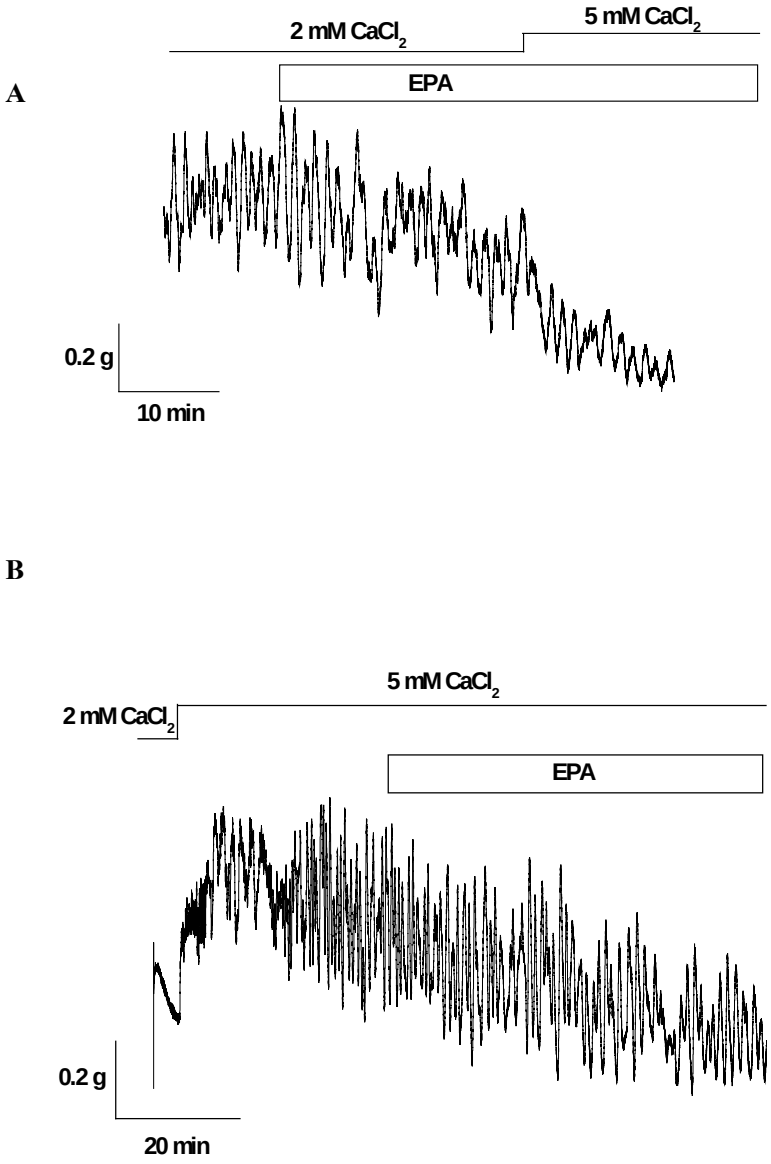


รูปที่ 3.11 ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมไม่ท้องที่ได้รับโปรเจสเตอโรน *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

กลไกที่ PUFAs ไปยับยั้งการหดตัวของมดลูก

ผลของการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวของ PUFAs

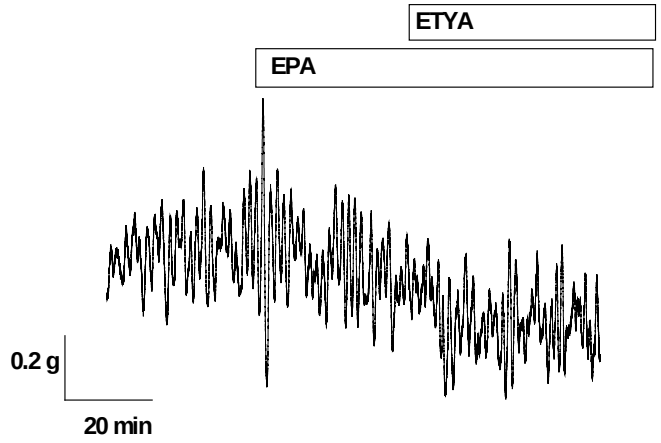
เพื่อเป็นการทดสอบว่า PUFAs ยับยั้งการหดตัวของมดลูกโดยการปิดประตูแคลเซียมหรือ L-type Ca channels ที่เยื่อหุ้มเซลล์หรือไม่ จึงได้เพิ่มปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ให้มากขึ้นจาก 2 มิลลิโมลาร์เป็น 5 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามพบว่า การเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการลดการหดตัวของ PUFAs (EPA) ได้ ดังแสดงในรูป 3.12A (n = 2) ในทางกลับกัน หากให้ EPA ภายหลังที่เพิ่มปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ให้มากขึ้นจาก 2 มิลลิโมลาร์เป็น 5 มิลลิโมลาร์ พบว่า PUFAs (EPA) ยังคงสามารถลดการหดตัวที่เพิ่มขึ้นจากการให้แคลเซียมในระดับสูงได้ ดังแสดงในรูป 3.12B (n = 2)



กราฟที่ 3.12 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมไม่ท้องด้วย EPA *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

ผลของ eicosatetraynoic acid ต่อการยับยั้งการหดตัวของ PUFAs

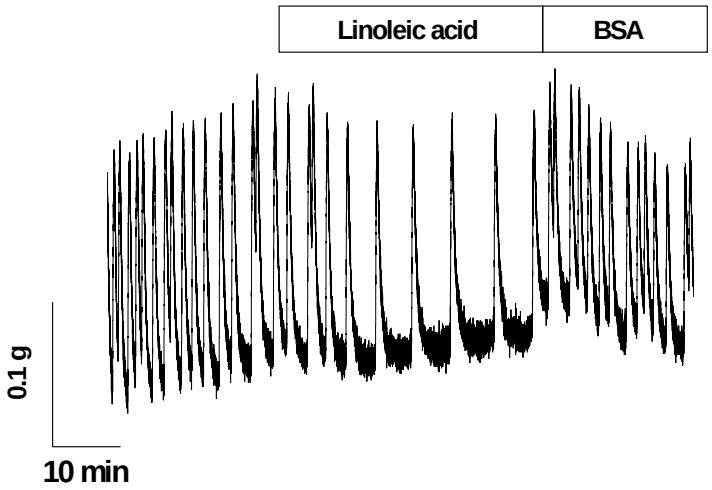
เพื่อเป็นการทดสอบว่า PUFAs ยับยั้งการหดตัวของมดลูกโดยผ่านเมทาบอไลต์ เช่น cyclooxygenase, lipoxygenase หรือ expoxygenase หรือไม่ จึงได้ให้สารยับยั้งเมตาบอไลต์ดังกล่าวคือ eicosatetraynoic acid หรือ EYTA (5 ไมโครโมลาร์) (Kang และ Leaf, 1994) ร่วมกับการให้ PUFAs อย่างไรก็ตาม พบว่า การให้ EYTA ไม่สามารถยับยั้งฤทธิ์ในการลดการหดตัวของ PUFAs (EPA) ได้ ดังแสดงในรูป 3.13 (n = 2)



รูปที่ 3.13 ผลของ EYTA ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมไม่ท้องด้วย EPA *แกนตั้งแสดงถึงความแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

ผลของ Bovine serum albumin ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูก PUFAs

เนื่องจาก PUFAs เป็นไขมันชนิดหนึ่งซึ่งอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลง fluidity ของผนังเซลล์ก่อให้เกิดผลต่อการหดตัวตามมา จึงทดสอบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกว่าสามารถล้างออกได้หรือไม่ (reversible effect) โดยให้ *bovine serum albumin* หรือ BSA (30 ไมโครโมลาร์) (Kang และ Leaf, 1994) ภายหลังจากการให้ PUFAs พบว่า BSA สามารถล้าง PUFAs ทุกชนิดออกได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.14 (ตัวอย่างที่แสดง คือ linoleic acid)



รูปที่ 3.14 ผลของ bovine serum albumin ต่อการยับยั้งการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดย PUFAs *แกนตั้งแสดงถึงความแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

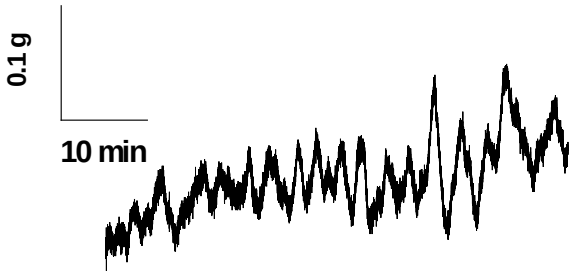
ธรรมชาติในการหดตัวของมดลูกโคนมท้อง

โคนมท้องระยะแรก

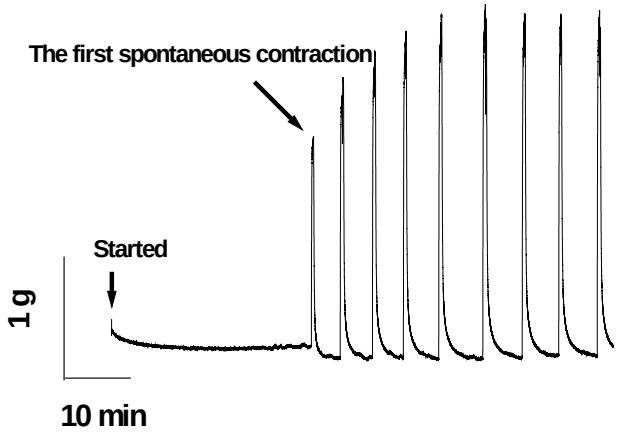
จากการเก็บตัวอย่างมดลูกโคนมที่ตั้งท้องระยะแรก (1-3 เดือน สังเกตจากขนาดของตัวอ่อน) จำนวน 2 ตัวอย่าง พบว่า มดลูกจะมีการหดตัวโดยธรรมชาติเช่นเดียวกับในโคนมไม่ตั้งท้อง ดังแสดงในรูปที่ 3.15 แต่แรงในการหดตัวจะน้อยกว่ามาก

โคนมท้องระยะท้าย

ในโคที่ท้องระยะท้าย การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกจะคล้ายคลึงกับมดลูกที่แยกได้จากโคนมไม่ท้อง ดังแสดงในรูปที่ที่ 3.16



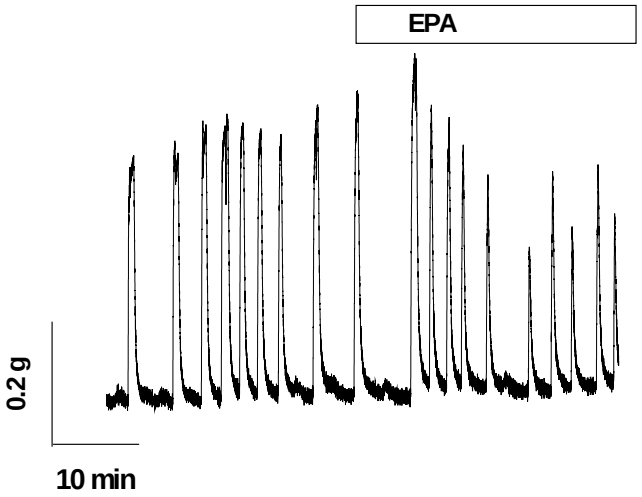
รูปที่ 3.15 การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโดยธรรมชาติที่บันทึกได้จากโคนมท้องระยะแรก *แกนตั้งแสดงถึงความแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*



รูปที่ 3.16 การหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมท้องระยะท้าย *บาร์แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

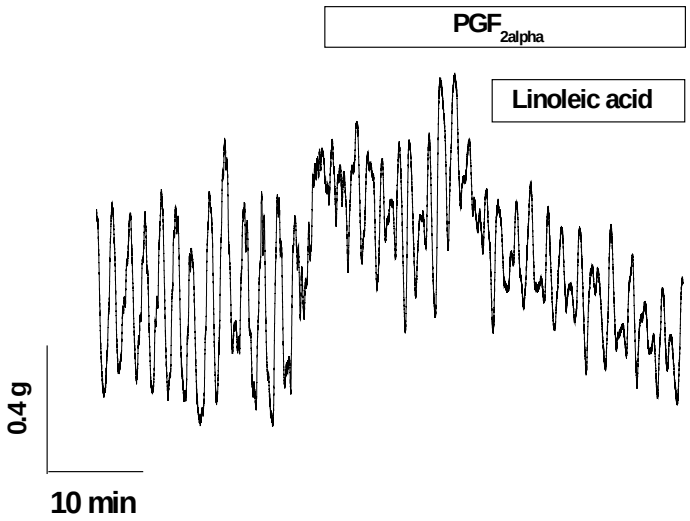
ผลของ PUFAs ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินของมดลูกในโคนมท้อง

PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid สามารถยับยั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติในโคนมท้องได้ (ไม่ได้หาค่าทางสถิติเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย) PUFAs สามารถยับยั้งแรงในการหดตัว เหลือเท่ากับ 28.20±2.78% (EPA; n = 3), 0% (DHA; n = 2), 77.97% (linoleic acid; n = 1) และ 68.75% (linolenic acid; n = 1) ภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเทียบกับการหดตัวในช่วงที่ไม่มี PUFAs ซึ่งคิดเป็น 100% ดังแสดงในรูปที่ 3.17 (ยกตัวอย่างผลของ EPA) อย่างไรก็ตาม PUFAs ทุกชนิด (ยกเว้น DHA) ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ (ไม่ได้หาค่าทางสถิติเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย) ความถี่ในการหดตัวในขณะที่มี PUFAs มีค่าเท่ากับ 0.3±0.15 (EPA; n = 3), 0.28±0.03 (DHA; n = 2), 0.07 (linolenic acid; n = 1) และ 0.20 (linoleic acid; n = 1) ครั้งต่อนาที เมื่อเปรียบเทียบกับขณะที่ไม่มี PUFAs ซึ่งมีค่าความถี่ในการหดตัวเท่ากับ 0.23±0.12 (EPA; n = 3), 0 (DHA; n = 1), 0.075 (linolenic acid; n = 1) และ 0.20 (linoleic acid; n = 1) ครั้งต่อนาที ตามลำดับ



รูปที่ 3.17 ผลของ EPA ต่อการหดตัวโดยธรรมชาติของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมท้อง *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

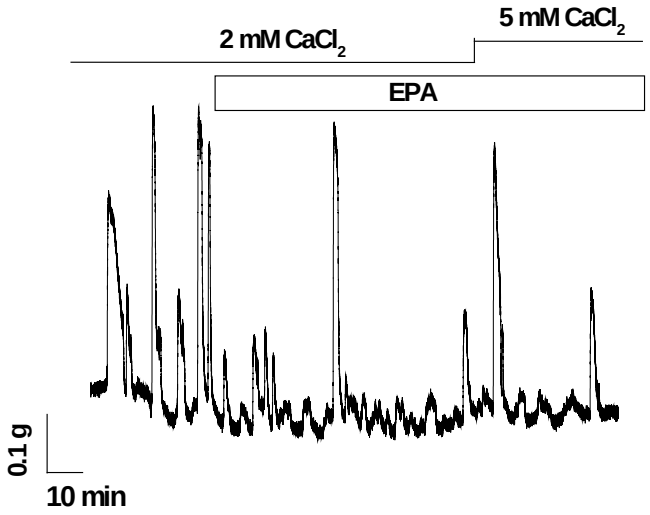
PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid สามารยับยั้งการหดตัวของมดลูกกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ในโคนมท้อง (ไม่ได้หาค่าทางสถิติเนื่องจากจำนวนตัวอย่างน้อย) เมื่อเซลล์กล้ามเนื้อมดลูกได้รับการกระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครโมลาร์ เห็นได้ว่า $PGF_{2\alpha}$ ทำให้มดลูกหดตัวถี่ขึ้นและระยะเวลาในการหดตัวยาวนานขึ้น ในสภาวะที่มี PUFAs (10 ไมโครโมลาร์) ร่วมด้วยพบว่า PUFAs ยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ แสดงในรูปที่ 3.18 (ยกตัวอย่าง ผลของ EPA) โดยพบว่า PUFAs สามารถที่จะลดความแรงในการหดตัวที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ เหลือเท่ากับ 0% (EPA; n = 1), DHA (ไม่ได้ทดสอบ), 82% (linoleic acid; n = 1) และ 80.61% (linolenic acid; n = 1) ภายในระยะเวลา 30 นาที เมื่อเทียบกับการหดตัวในช่วงที่ไม่มี PUFAs ซึ่งคิดเป็น 100%



รูปที่ 3.18 ผลของ EPA ต่อการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนมท้อง ที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

ผลของการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวในมดลูกโคนมโดย PUFAs

เพื่อพิสูจน์ว่า การยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมโดย PUFAs เกิดจากการที่ PUFAs ไปยับยั้งการเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบมดลูกของแคลเซียมทางประตู L-type สมมติฐานได้เพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์จากระดับปกติ (2 มิลลิโมลาร์) ไปเป็น 5 มิลลิโมลาร์ ในขณะที่ให้ PUFAs พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์ ไม่สามารถยับยั้งผลที่เกิดจาก PUFAs ได้ดังแสดงในรูปที่ 3.19



รูปที่ 3.19 ผลของการเพิ่มความเข้มข้นแคลเซียมนอกเซลล์ต่อการยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคนมท้องด้วย EPA *แกนตั้งแสดงถึงแรงในการหดตัว (กรัม) แกนนอนแสดงถึงเวลา (นาที)*

บทที่ 4

สรุปผลการวิจัย และการอภิปรายผล

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาผลของ PUFAs จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), linoleic acid และ linolenic acid ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกโคนม โดยทำการศึกษา 1) ผลของ PUFAs แต่ละชนิดต่อการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ (spontaneous contraction) และต่อการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วย $PGF_{2\alpha}$ และฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ได้แก่ ออกซีโตซิน (oxytocin) โปรเจสเตอโรน (progesterone) และเอสโตรเจน (estrogen) 2) ผลของ PUFAs แต่ละชนิดต่อ ion channels และ intracellular Ca^{2+} store ของมดลูก 3) เปรียบเทียบผลของ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid ผลต่อการหดตัวของมดลูกว่าให้ผลที่เหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร และ 4) เปรียบเทียบผลของ PUFAs ต่อการหดตัวของมดลูกในโคท้อง (pregnant cow) โคหลังคลอด (postpartum cow) และโคสาว (heifer) สรุปผลเป็นดังนี้

ธรรมชาติในการหดตัวของมดลูกโคนม

จากผลการวิจัยจะเห็นได้ว่า กล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนม จะมีความตึงตัวอยู่ตลอดเวลา สามารถหดตัวได้เองเป็นจังหวะ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม (เช่น ใน physiological saline solution หรือ Krebs' solution) แม้ว่าจะถูกแยกออกจากร่างกายโคแล้วก็ตาม การหดตัวที่เกิดขึ้นเองโดยธรรมชาตินี้ เนื่องมาจากการที่เซลล์บางเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบ (ใน strip) มี resting membrane potential ไม่คงที่ แต่จะมี depolarization สลับกับ repolarization เป็นจังหวะเรียกว่า slow wave potential ซึ่ง slow wave potential นี้เกิดขึ้นเองโดยไม่อาศัยสิ่งกระตุ้นจากภายนอก การเกิด slow wave ไม่สามารถถ่ายทอดผ่าน gap junction ให้เซลล์ข้างเคียงได้ และไม่สามารถทำให้กล้ามเนื้อหดตัวได้ แต่ถ้า depolarization ถึงค่า threshold potential (ประมาณ -35 มิลลิโวลต์) จะเกิด action potential บนยอดคลื่นของ slow wave potential ทำให้แคลเซียมเข้าสู่เซลล์และจะมีการหดตัวตามมา action potential ที่เกิดขึ้นนี้จะถ่ายทอดให้กับเซลล์ข้างเคียง (ใน strip) ผ่านทาง gap junction เซลล์ที่สร้าง slow wave potential นี้เรียกว่า pacemaker cell ด้วยเหตุนี้แม้จะขาดเส้นประสาทไปเลี้ยง อย่างเช่น การแยก strip ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกออกมานอกร่างกายก็ยังคงหดตัวเป็นจังหวะได้ในสภาวะที่เหมาะสม (Wray, 1993)

เช่นเดียวกับกล้ามเนื้อเรียบมดลูกของมนุษย์และสัตว์ทดลอง การหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนม ขึ้นอยู่กับการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมทางประตูแคลเซียม (L-type Ca^{2+} channels) แคลเซียมที่เข้าสู่เซลล์นี้ จะรวมตัวกับโปรตีน calmodulin ภายในเซลล์ เป็นผลให้ myosin light chain kinase enzyme เคลื่อนย้ายฟอสเฟตจาก ATP ไปให้ light myosin ทำให้ไมโอซินอยู่ในสภาวะที่สามารถจับกับแอคตินได้ และกล้ามเนื้อเกิดการหดตัวตามมา ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าระดับของแคลเซียมจะเป็นตัวกำหนดความแรงในการหด

ตัว หากไม่มีแคลเซียมภายนอกเซลล์แล้ว (เช่น การป้องกันไม่ให้แคลเซียมเข้าเซลล์โดยการใช้สาร EGTA) การหดตัวแทบจะไม่เกิดขึ้น

ฮอร์โมน เช่น พรอสต้าแกลนดิน สามารถกระตุ้นให้มดลูกโคนมหดตัวแรงขึ้นได้ อาจเป็นไปได้ด้วยการเปิดประตูแคลเซียม ทำให้แคลเซียมเข้าสู่เซลล์มากขึ้น นอกจากนี้ ฮอร์โมนอาจไปกระตุ้น sarcoplasmic reticulum ให้หลั่งแคลเซียมออกมา เป็นผลทำให้แคลเซียมภายในเซลล์มากขึ้น ทำให้มดลูกหดตัวได้แรงขึ้นและถี่ขึ้น

ผลการวิจัยที่ได้แสดงให้เห็นถึง ความสำคัญของแคลเซียมต่อการหดตัวของมดลูกโคนม ใน *in vitro* นี้สอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Houe et al. (2001) ที่พบว่าภาวะขาดแคลเซียมในกระแสเลือดจะนำมาซึ่งปัญหาของการคลอดยาก รกค้าง มดลูกอักเสบ ปัญหามดลูกเข้าอู่ช้า หรือระยะเวลาของการกลับสัดหลังคลอดยาวนาน ทั้งนี้เนื่องจากให้การบีบตัวของมดลูกน้อยลง

สำหรับโคนมที่ตั้งท้อง จากการสังเกตตัวอย่างมดลูกที่แยกได้จากโคซึ่งท้องระยะแรก (n = 2) พบว่ามีการหดตัวเป็นจังหวะ แต่ความแรงและความถี่ในการหดตัวน้อยกว่า เมื่อเทียบกับโคที่ท้องระยะท้ายหรือที่ไม่ตั้งท้อง สำหรับโคที่ท้องระยะท้าย พบว่า การหดตัวคล้ายคลึงกับมดลูกที่แยกได้จากโคไม่ตั้งท้อง ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า ในระยะแรกของการตั้งท้อง resting membrane potential มีค่าต่ำลง และเกิดภาวะเฉื่อยของ gap junction และตัวรับสัญญาณของมดลูก ดังที่มีรายงานในมดลูกของหนูทดลองและมนุษย์ (Wray, 1993) ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ จะตรงกันข้ามในมดลูกที่ได้จากโคตั้งท้องระยะท้าย จึงทำให้ ความแรงและความถี่ในการหดตัวใกล้เคียงกับโคไม่ท้อง อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดในเรื่องของตัวอย่างมดลูก จึงไม่สามารถหาข้อสรุปในขณะนี้ได้

ผลของ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) **ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในโคนมไม่ท้อง**

ผลต่อการหดตัวโดยธรรมชาติ

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid ที่ความเข้มข้น 10 μM สามารถยับยั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติของมดลูกได้ โดยที่ความถี่ในการหดตัวไม่เปลี่ยนแปลง การยับยั้งดังกล่าวนี้ ไม่สามารถกลับคืนในสภาวะที่แคลเซียมภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ทำให้สรุปได้ว่า กลไกการยับยั้งการหดตัวของ PUFAs ทั้ง 4 ชนิด ไม่ได้เกิดโดยการยับยั้ง การเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมเช่นเดียวกับที่มีรายงานในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจโดย Negretti et al. (2000) และ O'Neill et al. (2002)

ได้มีรายงานว่า PUFAs มีผลต่อเซลล์ได้สามวิธี *วิธีแรก* โดยการออกฤทธิ์ผ่านสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ที่เกิดจากเมทาบอไลท์ของ PUFAs เช่น cyclooxygenase, lypooxygenase และ epioxygenase *วิธีที่สอง* การที่ PUFAs เป็นกรดไขมันจึงแทรกตัวเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ เป็นผลทำให้เซลล์เปลี่ยนหน้าที่ไป *วิธีที่สาม* ออกฤทธิ์โดยการไปจับกับโปรตีนบนผนังเซลล์ เช่น โปรตีนที่ทำหน้าควบคุมการทำงานของ ion channels ต่างๆ (Kang และ Leaf, 1994) อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า การยับยั้งการหดตัวของมดลูกโคโดย PUFAs ไม่ได้เกิดจากวิธีแรก (เนื่องจาก EYTA ไม่มีผลต่อการยับยั้งของ PUFAs) และวิธีที่

สาม เกิดจากการยับยั้งประตูแคลเซียม (เนื่องจากการเพิ่มปริมาณแคลเซียมภายนอกเซลล์ไม่มีผลต่อการยับยั้งของ PUFAs) แต่น่าจะเกิดโดยวิธีที่สอง เนื่องจากพบว่า bovine serum albumin สามารถทำให้การหดตัวกลับสู่สภาพปกติได้ ด้วยการไปล้าง PUFAs ออกจากการไปแทรกตัวเป็นส่วนหนึ่งของผนังเซลล์ ดังนั้น ในแง่ของการปฏิบัติ การเสริมกรดไขมันกลุ่มดังกล่าวในอาหารโคนม อาจมีผลทำให้ผนังเซลล์ของมดลูกมีปริมาณกรดไขมันมากเกินไป เป็นผลให้เกิดการยับยั้ง slow wave potential ทำให้มดลูกไม่หดตัวได้

ผลต่อการหดตัวที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน

เช่นเดียวกันกับการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ PUFAs สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินได้ งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ได้มีการแสดงให้เห็นใน *in vitro* ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานวิจัยใน *in vitro* ว่า PUFAs สามารถยับยั้งการหลั่ง $PGF_{2\alpha}$ ในเซลล์เพาะเลี้ยงของสัตว์หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เยื่อบุผิวมดลูกของโค และยังรายงานใน *in vitro* อีกว่าการเสริม PUFAs ในอาหารโคนมทำให้เกิดการยับยั้ง $PGF_{2\alpha}$ ยังผลให้เกิดความสงบของมดลูก (uterine quiescence) และการรับรู้ของโคที่ท้อง (maternal recognition of pregnancy) ได้ดียิ่งขึ้น (Staples et al., 1998) กลไกที่ PUFAs ไปยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดินนั้น เป็นแบบไม่ย้อนกลับ เช่นเดียวกับการยับยั้งการหดตัวโดยธรรมชาติ กลไกการยับยั้งดังกล่าวนี้ ไม่ได้เกิดเนื่องจาก PUFAs มีผลไปลดการเข้าเซลล์ของแคลเซียม ทั้งนี้เพราะการเพิ่มความเข้มข้นของแคลเซียมนอกเซลล์ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง อย่างไรก็ตาม อาจเป็นไปได้ว่า PUFAs มีผลไปรบกวนตัวรับสัญญาณ (receptor) ของพรอสต้าแกลนดินบนผนังเซลล์ของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก โดยการจับกับโปรตีนแล้วเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวรับสัญญาณ (วิธีที่สาม) ดังเช่นได้มีรายงานในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบลำไส้โดย Pattern et al. (2005)

ผลต่อการหดตัวที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ

เช่นเดียวกันกับการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำด้วยพรอสต้าแกลนดิน PUFAs สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่กระตุ้นด้วยฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ได้แก่ เอสโตรเจนและออกซิโตซิน งานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่ได้มีการแสดงให้เห็นใน *in vitro* ก่อนหน้านี้ได้มีรายงานวิจัยใน *in vitro* ว่า EPA และ DHA มีผลต่อการให้เอสโตรเจนและออกซิโตซินเข้าหลอดเลือดของโค โดยทั้ง EPA และ DHA มีผลต่อการสังเคราะห์การหลั่ง $PGF_{2\alpha}$ ซึ่งกระตุ้นโดยเอสโตรเจนและออกซิโตซิน

การให้โปรเจสเตอโรนแก่มดลูกโคจะทำให้มดลูกคลายตัว เช่นที่มีรายงานในมดลูกของมนุษย์ (Welsh, 2007; Ruddock et al., 2008; Mesiano และ Anderson et al., 2009) โดยโปรเจสเตอโรนทำให้เกิดการคลายตัวของมดลูกทั้งในกลไกระดับการแสดงออกของยีน (genomic) และ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน (non-genomic mechanisms) (Mesiano และ Welsh, 2007) ในทางปฏิบัติจะใช้โปรเจสเตอโรนเพื่อป้องกันการแท้งระยะแรกและการคลอดก่อนกำหนด (Mesiano และ Welsh, 2007) จึง

เป็นที่น่าสนใจว่า การที่ PUFAs เสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการหดตัวของมดลูกน่าจะมีประโยชน์ในทางคลินิกในอนาคตหากมีการศึกษาเพิ่มเติม

ผลของ polyunsaturated fatty acids (PUFAs) **ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในโคนมท้อง**

เป็นที่น่าสนใจว่าผลของ PUFAs ต่อสรีรวิทยาการหดตัวของมดลูกในโคนมท้อง (ระยะท้าย) คล้ายคลึงกับผลที่ได้จากการทดลองในโคนมไม่ท้อง ทั้งในแง่ของผลต่อการหดตัวโดยธรรมชาติ และที่กระตุ้นโดยพรอสต้าแกลนดิน โดยพบว่า PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ EPA, DHA, linoleic acid และ linolenic acid ที่ความเข้มข้น 1-10 ไมโครโมลาร์ สามารถยับยั้งการหดตัวโดยธรรมชาติของมดลูกโคนมท้องได้ เช่นเดียวกับในมดลูกโคนมไม่ท้อง การยับยั้งการหดตัวไม่ได้เกิดจากการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียม เนื่องจากการเพิ่มปริมาณแคลเซียมนอกเซลล์ไม่สามารถลดการคลายตัวที่เกิดจาก PUFAs ทั้ง 4 ชนิดได้ เช่นเดียวกับการหดตัวโดยธรรมชาติ ในขณะที่มดลูกถูกกระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน PUFAs ทั้ง 4 ชนิด สามารถทำให้มดลูกคลายตัวได้เช่นเดียวกับที่พบในมดลูกโคไม่ท้อง กลไกการยับยั้งไม่ได้ผ่านทางการยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียม อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่า ผลของ PUFAs ในมดลูกโคนมท้องโดยเฉพาะในโคนมท้องใกล้คลอดจะรุนแรงกว่าในโคนมไม่ท้อง อาจเนื่องจาก ในขณะใกล้คลอดกลไกทางสรีรวิทยาของการหดตัวต่างๆ ที่จำเป็นในการคลอดมีความไวมากขึ้น ทำให้ PUFAs มีฤทธิ์ที่รุนแรงขึ้น

สรุป

กล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนม จะมีความตึงตัวอยู่ตลอดเวลา สามารถทำงานหรือหดตัวได้เองเป็นจังหวะติดต่อกันตลอดเวลา เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม แม้ว่าจะถูกตัดออกจากร่างกายแล้วก็ตามการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูกโคนม ขึ้นอยู่กับการเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียม ทางประตูแคลเซียม (L-type Ca^{2+} channels) ฮอร์โมนชนิดต่างๆ เช่น พรอสต้าแกลนดิน เอสโตรเจน และออกซิโตซินสามารถกระตุ้นให้มดลูกโคนมหดตัวแรงขึ้นได้ ด้วยการเปิดประตูแคลเซียม ทำให้แคลเซียมเข้าสู่เซลล์มากขึ้น นอกจากนี้ฮอร์โมนยังไปกระตุ้น sarcoplasmic reticulum ให้ปล่อยแคลเซียมออกมา เป็นผลให้มดลูกหดตัวได้แรงและถี่ขึ้น อย่างไรก็ตามโปรเจสเตอโรนมีฤทธิ์คลายตัวมดลูกโคนม

PUFAs ทั้ง 4 ชนิด คือ eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA), linoleic acid และ linolenic acid สามารถยับยั้งการหดตัวของมดลูกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติและที่กระตุ้นด้วยพรอสต้าแกลนดิน เอสโตรเจน และออกซิโตซินได้ และไปเสริมฤทธิ์ของโปรเจสเตอโรนในการคลายตัวมดลูก ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างระหว่างผลของ PUFAs แต่ละชนิด ส่วนกลไกการยับยั้งการหดตัวของ PUFAs มีความแตกต่างกันระหว่างการยับยั้งการหดตัวที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติ และการยับยั้งการหดตัวที่กระตุ้นโดยพรอสต้าแกลนดิน เอสโตรเจน และออกซิโตซิน เมื่อเปรียบเทียบผลของ PUFAs ทั้ง 4 ชนิด ระหว่างโคนมไม่ท้องและโคนมท้อง พบว่า ในโคท้อง PUFAs ออกฤทธิ์ที่รุนแรงกว่า

ข้อเสนอแนะ

การทดลองใน *in vitro* ในงานวิจัยนี้ สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า การเสริม PUFAs ลงในอาหารโคนมทำให้เกิดการยับยั้ง $PGF_{2\alpha}$ ยังผลให้เกิด uterine quiescence (ด้วยการลดการหดตัวของมดลูก) และเกิด maternal recognition of pregnancy ได้ดียิ่งขึ้น ซึ่งเห็นได้ชัดในการทดลองที่ใช้ตัวอย่างมดลูกจากโคท้องระยะแรก อย่างไรก็ตาม การเสริม PUFAs ลงในอาหารโคนมที่อยู่ในระยะใกล้คลอดอาจไม่เป็นผลดี เนื่องจากจะทำให้มดลูกไม่หดตัว อาจมีปัญหาคลอดยาก หรือรกค้าง สำหรับการเสริม PUFAs ลงในอาหารโคนมไม่ท้อง ผู้วิจัยมีความเห็นว่า ควรเสริมในช่วงหลังการผสมเทียมหรือหลังการเป็นสัด (metestrus) เพื่อช่วยให้การผสมติดดี เนื่องจากจะไปลดการหดตัวของมดลูก และเป็นการเสริมฤทธิ์โปรเจสเตอโรน แต่อาจมีข้อเสียคือไปยืดระยะลูเทียลให้ยาวนานขึ้นในกรณีที่โคผสมไม่ติด ดังรายงานโดย Kupittayanant et al. (2005)

บรรณานุกรม

Anderson, L., Martin, W., Higgins, C., Nelson, S.M. & Norman, J.E. (2009). The effect of progesterone on myometrial contractility, potassium channels, and tocolytic efficacy. *Reprod Sci.* **16(11):** 1052-61.

Baguma-Nibasheka, M., Brenna, J.T. & Nathanielsz, P.W. (1999). Delay of preterm delivery in sheep by omega-3 long-chain polyunsaturates. *Biol Reprod* **60:** 698–701.

Burke, J.M., Staples, C.R., Risco, C.A., de LaSota, R.L. & Thatcher, W.W. (1997). Effect of ruminant grade Menhaden fish meal on reproductive and reproductive performance of lactating diary cows. *J Dairy Sci* **80**: 3386-3398.

Garcia-Bojalil, C.M., Staples, R.R., Risco, C.A., Savio, J.D. & Thatcher, W.W. (1998). Protein degradability and calcium salts of long-chain fatty acids in diets of lactating dairy cows: reproductive response. *J Dairy Sci* **81**: 1385.

Harel, Z., Biro, F.M., Kottenhahn, R.K. & Rosenthal, S.L. (1996). Supplementation with o-mega-3 polyunsaturated fatty acids in the management of dysmenorrhea in adolescents. *Am J Obstet Gynecol* **174**: 1335-1338.

Hirsbrunner, G., Knutti, B., Liu, I., Kupfer, U., Scholtysik, G. & Steiner, A. (2002). An in vitro study on spontaneous myometrial contractility in the cow during estrous and diestrous. *Anim Reprod Sci* **70**: 171-180.

Kang, J.G. & Leaf, A. (1994). Effects of long chain polyunsaturated fatty acids on the contraction of neonatal rat cardiac myocytes. *Proc Nat Acad Sci USA* **91**: 9886–9890.

Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S. & Appel, L.J. (2002). Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation* **106**: 2747-2757.

Kupittayanant, P., Chasombat, J., Suksombat, W. & Kupittayanant, S. (2005). Effects of bypass fat supplementation on the oestrous cycle duration of early lactating cows. AHAT-BSAS International Conference. p 75

Kupittayanant, S., Lukas, M.J.M. & Wray, S. (2002). Effect of inhibiting the sarcoplasmic reticulum on spontaneous and oxytocin-induced contractions of human myometrium. *BJOG* **109**: 289-296.

Leaver, H.A., Lytton, F.D., Dyson, H., Watson, M.L. & Mellor, D.J. (1986). The effect of dietary ω3 and ω6 polyunsaturated fatty acids on gestation, parturition and prostaglandin E2 in the intrauterine tissues and the kidney. *Prog Lipid Res* **25:** 143.

Lopez Bernal, A., Europe-Finner, G.N., Phaneuf, S. & Watson, S.P. (1995). Preterm labour: a pharmacological challenge. *Trends Pharmacol Sci* **16**: 129-133.

Luckas MJ, Taggart MJ, Wray S. (1999). Intracellular calcium stores and agonist-induced contractions in isolated human myometrium. Am J Obstet Gynecol **181(2)**: 468-76.

Mathias, M.M., Tsai, A., Harris, M.A. & McGregor, J.A. (1987). Oral administration of menhaden oil alters gestation in rats. In: Lands WEM, Ed. Polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids. Champaign IL: American Oil Chemists' Society Press, pp 508–512.

Mesiano, S. & Welsh, T.N. (2007). Steroid hormone control of myometrial contractility and parturition. *Semin Cell Dev Biol.* **18(3):** 321-31.

Nair, S.S.D., Leitch, J.W., Falconer, J. & Garg, M.L. (1997). Prevention of cardiac arrhymia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *J Nutr* **127:** 383–393.

Negretti, N., Perez, M.R., Walker, D. & O'Neill, S.C. (2000). Inhibition of sarcoplasmic reticulum function by polyunsaturated fatty acids in intact, isolated myocytes from rat ventricular muscle. *J Physiol* **523.2**: 367-375.

O'Neill, S.C., Perez, M.R., Hammond, K.E., Sheader, E.A. & Negretti, N. (2002). Direct and indirect modulation of rat cardiac sarcoplasmic reticulum function by *n*–3 polyunsaturated fatty acids. *J Physiol* **538.1**: 179-184.

Olsen, S.F., Hansen, H.S., Sorensen, T.I.A., Jensen, B., Secher, N.J., Sommer, S. & Knudsen, L.B. (1986). Intake of marine fat, rich in (n-3) polyunsaturated fatty acids, may increase birth weight by prolonging gestation. *Lancet* **2:** 367–369.

Olsen, S.F., Hansen, H.S., Jensen, B. & Sorensen, T.I.A. (1986). Longer gestation in rats fed diet supplemented with (n-3) fatty acids that in rats fed diet supplemented with (n-6) fatty acids. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res* **15:** 89–93.

Olsen, S.F., Hansen, H.S., Sommer, S., Jensen, B., Sorensen, T.I.A., Secher, N.J. & Zachariassen, P. (1991). Gestational age in relation to marine n-3 fatty acids in maternal erythrocytes: A study in the Faroe Islands and Denmark. *Am J Obstet Gynecol* **164:** 1203–1209.

Olsen, S.F., Sorensen, J.D., Secher, N.J., Hedegaard, M., Henriksen, T.B., Hansen, H.S. & Grant, A. (1992). Randomized controlled trial of effect of fish-oil supplementation on pregnancy duration. *Lancet* **339:** 1003–1007.

Petit, H.V., Dewhurst, R.J., Scollan, N.D., Proulx, J.G., Khalid, M., Haresign, W., Twagiramungu, H. & Mann, G.E. (2002). Milk production and composition, ovarian function, and prostaglandin secretion of dairy cows fed omega-3 fats. *J Dairy Sci* **85**: 889-899.

Ruddock, N.K., Shi, S.Q., Jain, S., Moore, G., Hankins, G.D., Romero, R. & Garfield, R.E. (2008). Progesterone, but not 17-alpha-hydroxyprogesterone caproate, inhibits human myometrial contractions. *Am J Obstet Gynecol.* **199(4):** 391.e1-7.

Son, J., Grant, R.J. & Larson, L.L. (1996). Effects of tallow and escape protein on lactational and reproductive performance of dairy cows. J Diary Sci **79**: 822-830.

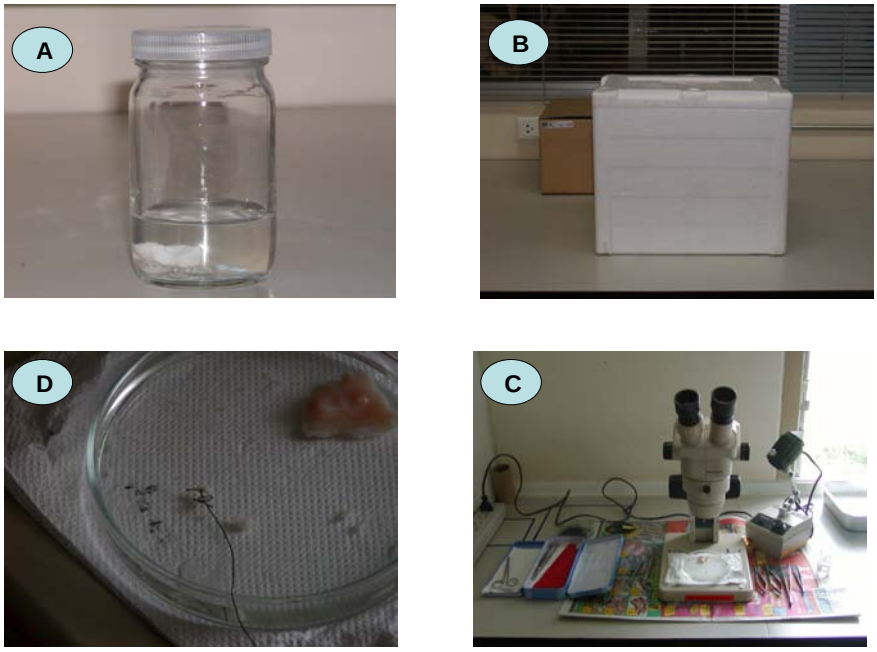
Staples, C.R., Burke, J.M. & Thatcher, W.W. (1998). Influences of supplemental fats on reproductive tissues and performance of lactating cows. *J Dairy Sci* **81**: 856-871.

Wray, S. (1993). Uterine contraction and physiological mechanisms of modulation. *Am J Physiol* **264**: 1-18.

Wray, S., Jones, K., Kupittayanant, S., LI, Y., Matthew, A., Monir-Bishty, E., Pierce, S.J., Noble, K., Shmygol, A. & Quenby, S (2003). Calcium signalling and uterine contractility. *J Soc Gyncol Investig* **10**: 252-264.

ภาคผนวก ก

อุปกรณ์การเตรียมตัวอย่างมดลูก

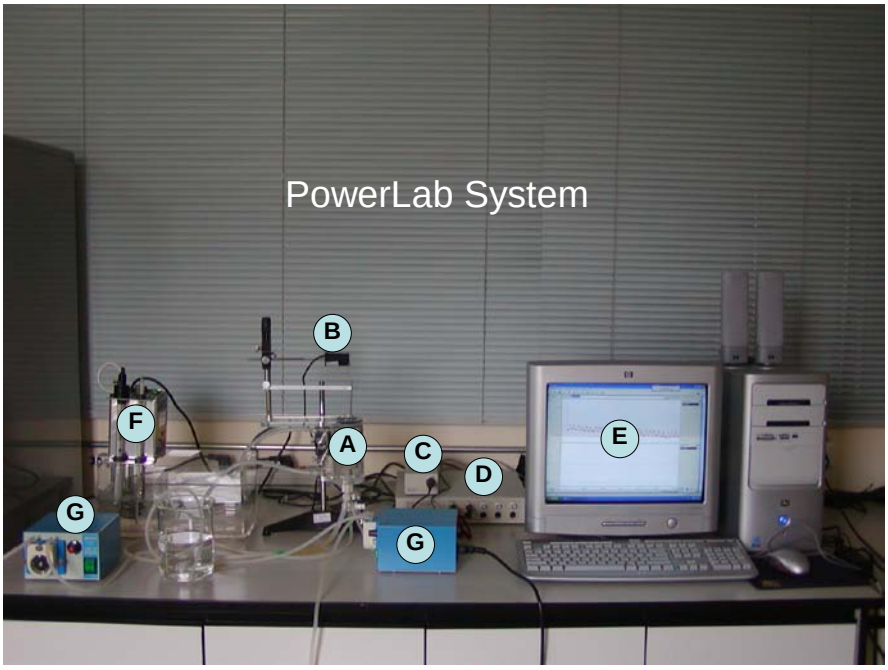


A, ตัวอย่างมดลูกโคที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ในขวดเก็บตัวอย่างที่บรรจุ Krebs's solution

B, กล่องโฟมสำหรับบรรจุขวดตัวอย่างภายในมีน้ำแข็งเพื่อให้อุณหภูมิอยู่ที่ 4 องศาเซลเซียส

C, การแยก strip ภายใต้กล้อง stereo microscope

D, strip ที่แยกได้หลังจากผูกด้วยไหมเย็บแผลเบอร์ 4



แสดงเครื่องมือที่ใช้วัดการหดตัวของกล้ามเนื้อเรียบมดลูก

A, Organ bath chamber

B, Transducer

C, Bridge Amp

D, PowerLab

E, Computer Set

F, Water bath chamber with temperature controller

G, Peristaltic pumps

ภาคผนวก ข

วิธีเตรียมสารสะลาย Physiological Saline Solution (สารละลาย Krebs')

	mM		**1 L**
NaCl	154	9	g/L
KCl	5.6	0.42	g/L
$Mg.SO_4.7H_2O$	0.12	0.29	g/L
HEPES	10.9	2.6	g/L
Glucose	11.7	2.1	g/L
$CaCl_2$	2	2	g/L

ประวัติผู้วิจัย

นางศจีรา คุปพิทยานันท์ ตำแหน่งอาจารย์ เกิดวันเสาร์ที่ 7 มีนาคม พุทธศักราช 2513 ที่อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยมจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีพุทธศักราช 2537 จากนั้นได้รับทุนจากบริติสเคาน์ซิลและรัฐบาลไทยให้ไปศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิตในสาขาสรีรวิทยา ที่มหาวิทยาลัยลิเวอร์พูล ประเทศอังกฤษ สำเร็จการศึกษาในปีพุทธศักราช 2546 ขณะกำลังศึกษา ณ สถานศึกษาดังกล่าวได้รับทุนนักสรีรวิทยารุ่นเยาว์ (Young Physiologist) จากมหาวิทยาลัยฯ เพื่อนำเสนอผลงานวิจัย ปีละ 1,000 ปอนด์ตลอดระยะเวลาการศึกษา ปัจจุบันปฏิบัติงานที่ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000 มีประสบการณ์ในการวิจัยและผลงานทางวิชาการทางด้านสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในช่วงปี 2543-2552 ผลงานฉบับเต็มในวารสารนานาชาติจำนวน 12 เรื่อง วารสารไทยจำนวน 3 เรื่อง และบทคัดย่อในวารสารระดับชาติ 5 เรื่องและวารสารระดับนานาชาติจำนวน 14 เรื่อง