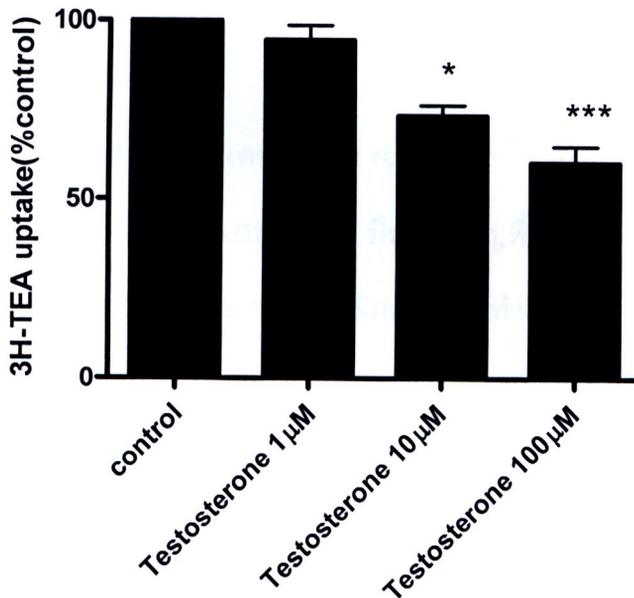




บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและวิจารณ์ผล

1. ศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของเทสโทสเตอโรนต่อประสิทธิภาพการทำงาน (transport activity) ของ OCT2

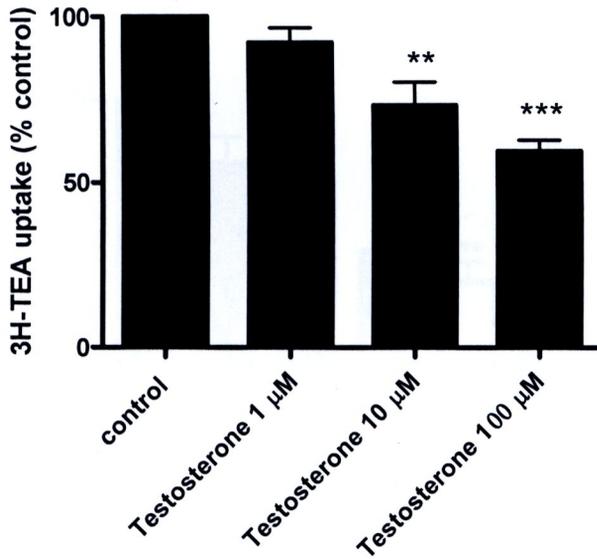
ในการศึกษาโดยใช้ CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร พบว่าเมื่อใช้ Waymouth buffer ที่มี testosterone 1,10,100 μM incubate เซลล์ก่อนการ uptake สารประจวบ (3H-TEA) เป็นเวลา 10 และ 20 นาที เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่าเทสโทสเตอโรน ในขนาด 1, 10 และ 100 μM มีผลลดการทำงานของ OCT2 ในการขนส่ง TEA อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่า p value < 0.05 และ 0.001 ตามลำดับ



รูปที่ 3 ผลของเทสโทสเตอโรนต่อ rbOCT2 ที่มีต่อการขนส่งสาร TEA (10 นาที, n=3)

* มีนัยสำคัญที่ p value < 0.05 *** มีนัยสำคัญที่ p value < 0.001

เทสโทสเตอโรนในขนาด 10 และ 100 μM มีผลลดการทำงานของ OCT2 ในการขนส่ง TEA อย่างมีนัยสำคัญ ในเวลา 10 นาที



รูปที่ 4. ผลของเทสโทสเตอโรนต่อ rbOCT2 ที่มีต่อการขนส่งสาร TEA (20 นาที,

n=4) ** มีนัยสำคัญที่ p value <0.01 *** มีนัยสำคัญที่ p value < 0.001

เทสโทสเตอโรน ในขนาด 10 และ 100 μM มีผลลดการทำงานของ OCT2 ในการขนส่ง TEA อย่างมีนัยสำคัญ ในเวลา 20 นาที

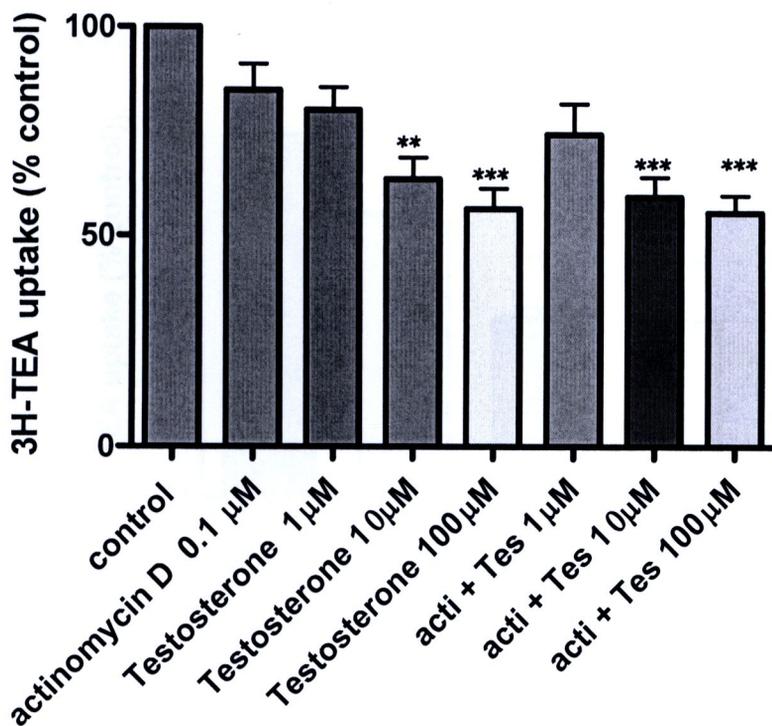
2. ทดสอบยืนยันฤทธิ์เฉียบพลันของเทสโทสเตอโรนต่อ OCT2 (non-genomic action/acute effect)

2.1 ผลของ Actinomycin D

ศึกษาฤทธิ์เฉียบพลันของเทสโทสเตอโรนต่อประสิทธิภาพการทำงาน (transport activity) ของ OCT2 โดยมีสารยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนร่วมด้วย

เมื่อนำมาทดลองโดย incubate CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร ด้วย testosterone 1,10,100 μM ร่วมกับ actinomycin D (สารที่มีคุณสมบัติยับยั้ง protein

synthesis) 0.1 μM ก่อนการ uptake TEA 10 นาที พบว่าเทสโทสเตอโรนยังมีการยับยั้งการขนส่ง TEA อยู่ อันเป็นการพิสูจน์ขั้นต้นว่าฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจาก non-genomic action โดยไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (genomic action)



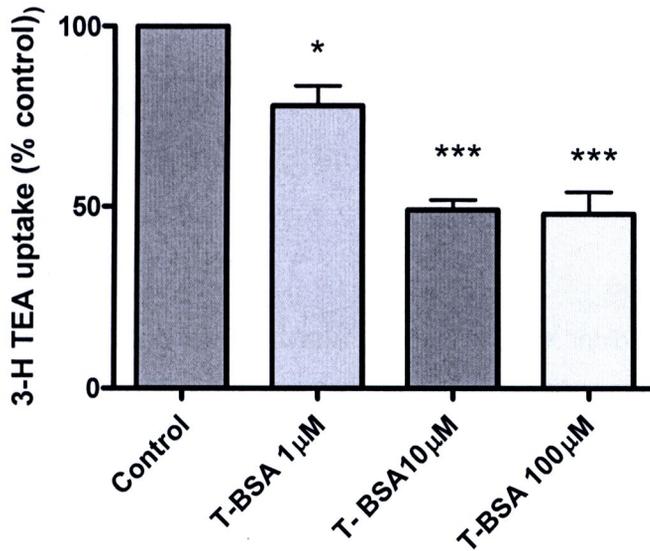
รูปที่ 5. ผลของเทสโทสเตอโรนร่วมกับ actinomycin D ต่อการขนส่ง TEA (10 นาที, n=3) ** มีนัยสำคัญที่ p value < 0.01 *** มีนัยสำคัญที่ p value < 0.001

ผลของการใช้เทสโทสเตอโรน 1,10,100 μM และ actinomycin D 0.1 μM ก่อนการทดสอบการขนส่ง TEA 10 นาที พบว่าเทสโทสเตอโรนยังแสดงผลการยับยั้งการขนส่ง TEA



2.2 ผลของ Testosterone BSA

ในทำการทดลองโดยใช้ Testosterone BSA ซึ่งเป็นเทสโทสเตอโรนที่ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ในขนาด 1,10,100 μM พบว่า Testosterone BSA มีผลยับยั้งการขนส่ง TEA เข้าสู่ CHO-K1 เซลล์ที่มี rbOCT2 อยู่เหมือนกับการใช้เทสโทสเตอโรนปกติ แสดงให้เห็นว่าผลของเทสโทสเตอโรนเกิดได้โดยไม่มีการผ่านเข้าไปในเซลล์



รูปที่ 6. ผลของ testosterone-BSA ต่อ rbOCT2 ที่มีต่อการขนส่งสาร TEA (n=3)

* มีนัยสำคัญที่ p value < 0.05

*** มีนัยสำคัญที่ p value < 0.001

Testosterone BSA มีผลยับยั้งการขนส่ง TEA เข้าสู่ CHO-K1 เซลล์โดย rbOCT2 เหมือนกับการใช้เทสโทสเตอโรนปกติ

3. ศึกษาคุณสมบัติทางจลนพลศาสตร์ของ OCT2 ภายใต้การควบคุมของเทสโทสเตอโรน

ในการศึกษาหากลไกของ non-genomic ว่ามีผลต่อ affinity และ จำนวน ของ rbOCT2 หรือไม่ จึงได้ทำการทดลองทางจลนพลศาสตร์หาค่า K_t and J_{max} ของ rbOCT2 โดยใช้ TEA ในความเข้มข้นต่างๆ เมื่อนำผลการทดลองมาคำนวณค่าทาง kinetic พบว่าเมื่อ incubate ด้วย testosterone 10 μM เป็นเวลา 10 นาที พบว่าค่า K_t จะเปลี่ยนแปลงโดยเพิ่มจาก 35.13 ± 1.24 ใน

กลุ่มควบคุม เป็น $46.9 \pm 1.1 \mu\text{M}$ โดยไม่มีผลต่อ J_{max} แสดงว่า เทสโทสเตอโรนมีผลยับยั้งการขนส่งสารอินทรีย์ประจวบกับการเปลี่ยนแปลง affinity ของ OCT2

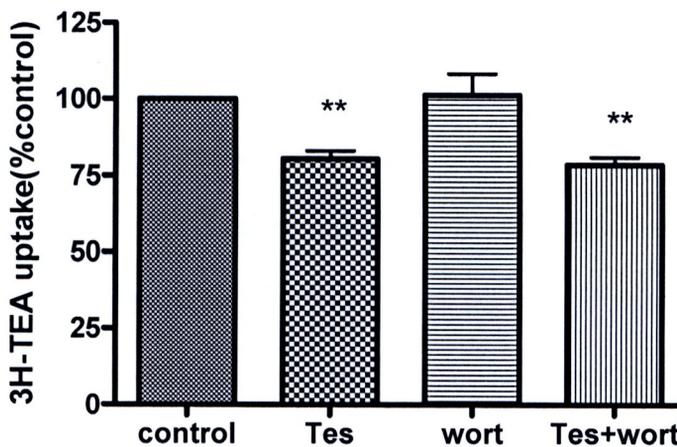
ตารางที่ 2 แสดงผล non-genomic ของเทสโทสเตอโรนที่มีต่อค่าทางจลนพลศาสตร์

กลุ่ม	Km (μM)	J_{max} (pmol/min/cm ²)
กลุ่มควบคุม	35.13 ± 1.24	373.17 ± 63.0
Testosterone 10 μM 10 นาที	$46.9 \pm 1.1^{**}$	276.8 ± 38.3

** มีนัยสำคัญที่ p value <0.01

4. ศึกษา signaling pathway เบื้องต้น

ทำการศึกษา signaling เบื้องต้นโดยใช้ wortmannin (PI3K inhibitor) 10nM incubate ร่วมกับเทสโทสเตอโรนในขนาด 10 μM พบว่ามีการยับยั้งการขนส่ง TEA เข้าสู่ CHO-K1 cells ที่มีการแสดงออกของ rbOCT2 อย่างถาวร เหมือนกับการใช้ testosterone ปกติ แสดงให้เห็นว่าไม่มีความเกี่ยวข้องกับ PI3K pathway



รูปที่ 6. ผลของการใช้ wortmannin (PI3K inhibitor) ร่วมกับเทสโทสเตอโรน

(n=3) ** มีนัยสำคัญที่ p value <0.01

ผลของเทสโทสเตอโรนในภาวะที่มีการยับยั้ง signaling pathway ของ PI3K พบว่าเทสโทสเตอโรนลดการขนส่งของ TEA เข้าสู่เซลล์