จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาผลและกลไกการรักษาภาวะกระดูกพรุนของพืชสมุนไพรไทยกวาวเครือขาวในหนูแรท

โดย

สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

กุมภาพันธ์ 2555

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ทุนวิจัย
กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานวิจัย

การศึกษาผลและกลไกการรักษาภาวะกระดูกพรุนของพืชสมุนไพรไทยกวาวเครือขาวในหนูแรท

โดย

สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

กุมภาพันธ์ 2555

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สัญญาเลขที่ R_011_2552 ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยวิจัยไพรเมท และ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัย และขอขอบคุณ Prof. Yuzuru Hamada ณ Primate Research Institute of Kyoto University, Japan ที่ให้ยืมเครื่อง peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) ในการตรวจวัดความหนาแน่นและมวลกระดูกในหนูแรท

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลและกลไกการรักษาภาวะกระดูกพรุนของพืชสมุนไพรไทยกวาวเครือขาวในหนูแรท

ชื่อผู้วิจัย สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์, สุกัญญา เจริญพร, วัชราภรณ์ ติยะสัตย์กุลโกวิท, สมฤดี หาญมานพ, อุบล ฉิมสกุล

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2553

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของกวาวเครือขาวในการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ ที่ชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก แบ่งหนู (อายุ 6 เดือน) แต่ละเพศออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Sham control (SH) และกลุ่มที่ตัดต่อมบ่งเพศออก (OVX/ODX) พักหนูไว้ 90 วัน สุ่มเลือกหนูกลุ่ม SH และกลุ่ม OVX/ODX กลุ่มละ 5 ตัว มาทำการุณยฆาต เก็บเลือดจากหัวใจ และเก็บกระดูกขาขวาท่อนบน หน้าแข้งขวา และสันหลังท่อนที่ 4 เพื่อนำไปวัดความหนาแน่นกระดูก และเก็บกระดูกหน้าแข้งข้างซ้าย เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในระดับจุลภาค นำหนูที่เหลือ (กลุ่ม SH จำนวน 10 ตัว และ กลุ่ม OVX/ODX จำนวน 50 ตัว) มาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว และให้สารต่างๆ ทางปาก คือ น้ำกลั่น (กลุ่ม SH และ PM0), กวาวเครือขาวในขนาด 10, 100 และ 1000 มล/กก นน.ตัว/วัน (กลุ่มPM10, PM100 และ PM1000) และ 17α - ethinylestradiol ขนาด 0.1 มล/กก นน.ตัว/วัน (กลุ่มEE) ตามลำดับ นาน 90 วัน ในระหว่างให้สารเก็บเลือดทุก ๆ 30 วัน ชั่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ และในวันสุดท้ายของการให้สารทำการุณยฆาต และเก็บอวัยวะต่าง ๆ ดังข้างต้น ผลการทดลองพบว่าการตัดต่อมบ่งเพศออกทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศเมียเพิ่มขึ้น แต่ทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศผู้ลดลง เมื่อให้กวาวเครือขาวและ EE ทำให้น้ำหนักตัวลดลงในหนูทั้งสองเพศ พบการเพิ่มสูงขึ้นของน้ำหนักมดลูกในหนูเพศเมีย แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักต่อมลูกหมากและเซมินัล เวซิเคิล ในหนูเพศผู้ และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของตับ, ไต และม้ามในหนูทั้งสองเพศ เนื้อกระดูก (%BA) และความหนาแน่นกระดูกลดลงภายหลังจากตัดต่อมบ่งเพศออก และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ โดยผลของ PM1000 มีค่าใกล้เคียงกับ EE โดยคาดว่าการตัดต่อมบ่งเพศออก, การให้กวาวเครือขาวและ EE มีผลไปกระตุ้นให้อัตราการสร้างและสลายกระดูกเพิ่มขึ้น เพราะระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม มีค่าเพิ่มสูงขึ้น จากผลการทดลองครั้งนี้กล่าวได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะมีฤทธิ์ป้องกันการสลายกระดูก (antiresorptive effect) แล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic effect) ได้ด้วย โดยผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลการทดลองในปีที่ 1 นี้ ทำให้สรุปได้ว่ากวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรทางเลือกที่ดีที่ควรจะพัฒนาต่อไปไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีและบุรุษสูงวัย โดยควรที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต่อไปในปีที่ 2 เสียก่อน

Project title Study of the therapeutic effects and mechanisms of *Pueraria mirifica* herb on bone loss in rats

Names of the Investigators Suchinda Malaivijitnond, Sukanya Jaroenporn, Wacharaporn Tiyasatkulkovit, Somrudee Harnmanop, Ubon Chimsakul

Year September 2010

Abstract

This study aims to investigate the effects of *Pueraria mirifica* herb on bone loss prevention in gonadectomy-induced osteoporotic rats. Six-month old male and female rats were divided into 2 groups; shame control (SH) and ovariectomy/orchidectomy (OVX/ODX), and kept for 90 days. Five rats in each group were randomly selected, collected blood, euthanized, and collected right femur, right tibia and 4th lumbar vertebra for bone mineral density (BMD) analysis and left tibia for histological examination. Remaining rats in each group (10 rats in SH group and 50 rats in OVX/ODX group) were divided into 6 groups (10 rats/group) and fed with distilled water (SH and PM0 groups), 10, 100 and 1000 mg/kg BW/day of *P. mirifica* (PM10, PM100 and PM1000 groups) and 0.1 mg/kg BW/day of 17α - ethinylestradiol (EE group), respectively, for 90 days. Blood samples were collected every 30 days, and body weights were measured once a week. Rats were euthanized at the end of treatment period and collected organs as describe previously. Gonadectomy increased body weight gains in females, but decreased in males. However, feeding of *P. mirifica* and EE reduced body weight gains in both sexes of rats. *P. mirifica* increased uterus weights in females, but has no effects on prostate gland and seminal vesicle weights in males. No changes of liver, kidney and spleen weights in both sexes. %Trabecular bone area (%BA) and BMD were reduced after gonadectomy and dose-dependently increased after *P. mirifica* feeding; the increase in PM1000 group was equally to those of the EE group. The gonadectomy, *P. mirifica* and EE might stimulate the bone turnover rate, because levels of serum alkaline phosphatase were increased. From this study, it indicates that *P. mirifica* consumption could prevent bone loss (anti-resorptive effect) and restore the established osteoporosis (anabolic effect) in female as well as male rats. From the first year results, we can conclude that *P. mirifica* is one of the potential alterantive medicinal herbs that should be developed to be an anti-osteoporotic drug for aged women and men. Besides, the mechanisms of its effects should be consequently determined in the second year.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	i
บทคัดย่อภาษาไทย	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	iii
สารบัญ	iv
รายการภาพประกอบ	v
รายการภาพประกอบ	v
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
วิธีการวิจัย	11
ผลการวิจัย	19
การอภิปรายผล	41
ข้อสรุป	47
ข้อเสนอแนะ	48
เอกสารอ้างอิง	49
ส่วนผนวก	56

รายการภาพประกอบ

รูปที่ 1 4
รูปที่ 2 5
รูปที่ 3 6
รูปที่ 4 18
รูปที่ 5 19
รูปที่ 6 20
รูปที่ 7 21
รูปที่ 8 23
รูปที่ 9 25
รูปที่ 10 26
รูปที่ 11 27
รูปที่ 12 29
รูปที่ 13 30
รูปที่ 14 32
รูปที่ 15 33
รูปที่ 16 34
รูปที่ 17 36
รูปที่ 18 37
รูปที่ 19 39
รูปที่ 20 40

รายการสัญลักษณ์

ALP	=	alkaline phosphatase
BA	=	bone area
BMC	=	bone mineral content
BMD	=	bone mineral density
Cbfa1	=	core binding factor A1
EE	=	17α-ethinylestradiol
ER	=	estrogen receptor
ERT	=	estrogen replacement therapy
HPLC	=	high performance liquid chromatography
IL-1	=	interleukin – 1
IL-6	=	interleukin - 6
ODX	=	orchidectomy
OPG	=	osteopogeterin
OVX	=	ovariectomy
PM	=	*Pueraria mirifica*
pQCT	=	peripheral Quantitative Computed Tomography
RANK-L	=	receptor activator of nuclear factor κB
SH	=	sham operation
TNF-α	=	tumor necrosis factor – alpha
TRAP	=	tartrate resistant acid phosphatase

บทนำ

กระดูกพรุน (osteoporosis) เป็นภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกน้อยกว่าปกติ ทำให้กระดูกบางและเปราะ เสี่ยงต่อกระดูกหักง่ายขึ้น (Kanis et al., 1994) ในปัจจุบันอุบัติการณ์ของโรคกระดูกพรุนมีแนวโน้มสูงขึ้น ทั้งนี้เป็นผลมาจากอายุเฉลี่ยของประชากรส่วนใหญ่สูงขึ้น และโรคนี้ยังเกิดได้ทั้งในเพศหญิงและชาย จึงเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของหลายๆ ประเทศ รวมทั้งประเทศไทย (Pongchaiyakul et al., 2006)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogens) มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการรักษาสมดุลของกระดูก (Compson, 1990) โดยเอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) พบว่าในผู้หญิงภายหลังจากหมดประจำเดือน ฮอร์โมนเอสโตรเจนจะลดลงอย่างรวดเร็ว การทำงานของ osteoclast จึงมากขึ้น ส่งผลให้มวลกระดูก (bone mineral content; BMC) และความหนาแน่นของกระดูก (bone mineral density; BMD) ลดลงอย่างรวดเร็ว (Riggs, 1982; Ohta et al., 2002) เป็นสาเหตุสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ส่วนในผู้ชายนั้นพบว่าการขาดฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgens) หรือมีความผิดปกติของยีนตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen-receptor gene) จะทำให้มีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคกระดูกพรุนได้เช่นกัน (Erben et al., 2000; Riggs et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลกระดูกในเพศชายเหมือนกับในเพศหญิง (Smith et al., 1994)

การใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy; ERT) เป็นวิธีการที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุนที่มีประสิทธิภาพ แต่พบว่าการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนอาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน เป็นต้น (Sulak 1997; Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มีการศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ 1) กลุ่มที่ยับยั้งกระบวนการสลายกระดูก (antiresorptive agents) ได้แก่ bisphosphonates ซึ่งเป็นยาที่สามารถยับยั้ง osteoclast activity และกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของ osteoclast ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกลดน้อยลง (Papapoulos, 2008) 2) กลุ่มที่กระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก (anabolic agent) ยากลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเพิ่มมวลกระดูก ได้แก่ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) ซึ่งพบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์สามารถเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูกโดยการกระตุ้น osteoblast activity สามารถเพิ่มจำนวน osteoblast และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast ได้ (Deal, 2009) แต่พบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์มีผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ และ อาเจียน และผลที่ได้ยังไม่แน่นอน จึงยังไม่เป็นที่นิยมที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนทั้งสองกลุ่ม ยังมีราคาแพง และต้อง

นำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu เป็นไม้เลื้อย และมีหัวอยู่ใต้ดินเพื่อสะสมอาหาร พบว่าส่วนหัวของกวาวเครือขาวเป็นบริเวณที่อุดมไปด้วยสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) อย่างน้อย 17 ชนิด โดยสารหลักเป็นพวก isoflavanoids ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007; Cherdshewasart et al., 2007a) ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptors) ได้และออกฤทธิ์เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาวสามารถลดระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับแคลเซียมในซีรั่ม ในลิงแสมแก่เพศเมียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Trisomboon et al., 2004) และต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีภายหลังตัดต่อมบ่งเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมบ่งเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาว แสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก โดยกวาวเครือขาวสามารถป้องกัน การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูกในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุนได้ แต่อย่างไรก็ตามโรคกระดูกพรุนสามารถเกิดได้กับมนุษย์ทุกคน อย่างค่อยเป็นค่อยไป โดยไม่มีอาการแสดงให้เห็นจนกว่าจะเกิดสภาวะกระดูกหักแล้วผู้ป่วยถึงจะรู้ตัว และเข้ารับการรักษา ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยากที่จะแก้ไข ขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกกำลังมุ่งเน้นทำการวิจัย เพื่อให้ได้ยามาใช้ในการรักษาสภาวะกระดูกพรุน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสมุนไพรกวาวเครือขาว ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนภายหลังจากที่อาการดังกล่าวได้เกิดขึ้นแล้ว รวมไปถึงการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อกระดูก เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดลองทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเริ่มต้นจากการศึกษาในหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่จะถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนก่อนด้วยการตัดต่อมบ่งเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วัน จากนั้นจึงให้กวาวเครือขาวที่ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน และติดตามวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของ

กระดูก และติดตามดูว่ากวาวเครือขาวสามารถรักษาภาวะกระดูกพรุนได้หรือไม่ จากนั้นจึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเซลล์กระดูกของหนูแรทในหลอดทดลอง (*in vitro*)

การทดลองของปีที่ 1 จะศึกษาเฉพาะในสัตว์ทดลองและในรายงานฉบับสมบูรณ์นี้จะเป็นการรายงานเกี่ยวกับหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน โดยการตัดรังไข่และตัดอัณฑะ ตามลำดับ และพักหนูไว้นาน 90 วัน จากนั้นจึงให้กวาวเครือขาวที่ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน และติดตามวัดการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของกระดูก (bone histology) %trabecular bone area (%BA) ความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density) มวลกระดูก (bone mineral content) และระดับ alkaline phosphaste (bone formation marker) ในซีรั่ม

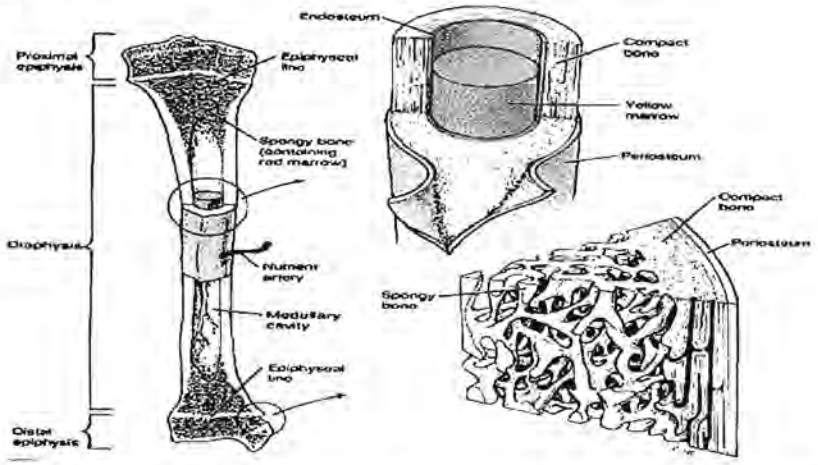
วัตถุประสงค์ของโครงการในปีที่ 1

1. เพื่อศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก

การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูก (Bone)

กระดูก เป็นอวัยวะสำคัญมีหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนไหวของร่างกาย ค้ำจุน และปกป้องอวัยวะภายใน รวมทั้งเป็นแหล่งสะสมแร่ธาตุที่สำคัญของร่างกาย โดยเฉพาะแคลเซียม และฟอสฟอรัส กระดูกแต่ละชิ้นประกอบด้วยเนื้อกระดูกที่มีโครงสร้างแตกต่างกันสองชนิดคือ กระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) และกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) (รูปที่ 1) โดยกระดูกเนื้อแน่น จะพบอยู่ด้านนอกของกระดูก มีช่องว่างระหว่างเนื้อกระดูกน้อย มีความหนาแน่นสูง พบเป็นโครงสร้างส่วนใหญ่ของกระดูกบริเวณ diaphysis กระดูกเนื้อโปร่งพบด้านในของกระดูก มีลักษณะโปร่งบาง สานกันเป็นโครงตาข่าย ทำหน้าที่ช่วยกระจายแรง ในการรับน้ำหนัก และเป็นที่อยู่ของหลอดเลือด และไขกระดูก พบมากบริเวณกระดูกส่วน metaphysis และ epiphysis บริเวณนอกสุดของกระดูกจะหุ้มด้วยเยื่อหุ้มกระดูก

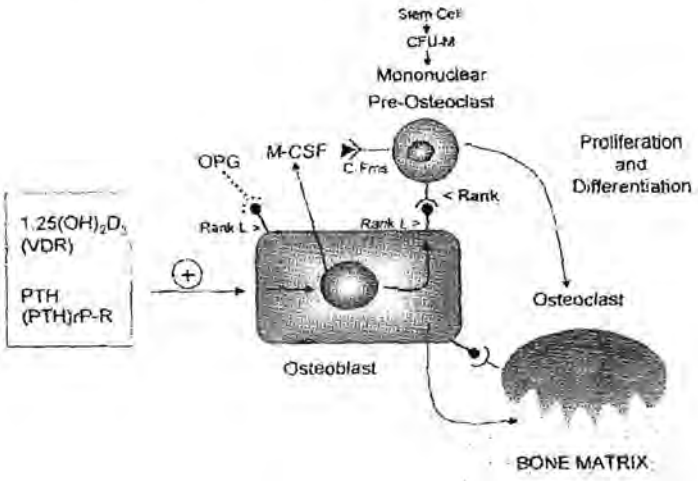


รูปที่ 1 โครงสร้างของกระดูกยาว (long bone) ประกอบด้วยกระดูกเนื้อแน่น และกระดูกเนื้อโปร่ง

ส่วนประกอบหลักของกระดูก ได้แก่ 1) osteoid ซึ่งประกอบด้วยคอลลาเจนเป็นส่วนใหญ่ ทำให้กระดูกมีความยืดหยุ่น 2) calcium phosphate ซึ่งอยู่ในรูปของ hydroxyapatite ($3Ca_3(PO_4)_2Ca(OH)_2$) โดยสะสมตัวอยู่ในช่องว่างระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน ทำให้กระดูกเกิดการแข็งตัว และ 3) เซลล์กระดูก ซึ่งมีอยู่สามชนิดด้วยกัน คือ osteoblast เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูก osteoclast เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีหลายนิวเคลียส ทำหน้าที่ในการสลายกระดูก และ osteocyte ซึ่งเป็น osteoblast ที่เจริญเต็มที่แล้ว โดยปกติแล้วเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ทำงานร่วมกัน เพื่อทำให้เกิดกระบวนการซ่อม สร้าง และสลายกระดูก (bone remodeling cycle) ซึ่งเป็นวงจรที่เกิดขึ้นตลอดเวลา เพื่อคงสมดุล และความแข็งแรงของกระดูก (Nakamura, 2007)

โดยพบว่า osteoblast และ osteoclast จะมีการทำงานที่ประสานกัน (รูปที่ 2) โดยมียีนหลายชนิดที่ควบคุมการเจริญ (development) ของ osteoblast เช่น Core binding factor A1 (Cbfa1) หรือ Runx2, Osf2 และ

AML3 (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997) โดยยีนเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และการเจริญ (maturation) โดยไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนหลายชนิด เช่น osterix, osteoponin, osteocalcin, bone sialopactin, type I collagen, receptor activator of nuclear factor KB (RANK-L) และ osteopogeterin (OPG) Osteocalcin และ osteoponin จะช่วยในการสะสมแคลเซียม (mineralization) ในขณะที่ RANK-L และ OPG จะควบคุมการทำงานของ osteoclast โดย RANK-L จะจับกับ RANK receptor ที่อยู่บน pre-osteoclast (osteoclast precursor) ซึ่งจะไปกระตุ้น pre-osteoclast ให้กลายไปเป็น mature osteoclast ที่สามารถทำหน้าที่สลายกระดูกได้ ในขณะที่ OPG สามารถจับกับ RANK-L ได้ ทำให้ RANK-L ไม่สามารถจับกับ RANK receptor ที่ pre-osteoclast ได้ ดังนั้น pre-osteoclast จึงไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น mature osteoclast ได้ การสลายกระดูกจะลดลง



รูปที่ 2 แสดงการทำงานประสานกันระหว่าง osteoblast และ osteoclast ในการควบคุมสมดุลของกระดูก M-CSF และ OPGL/RANKL เป็น osteoblast factor ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของ osteoclast

ฮอร์โมนสำคัญที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลของกระดูก คือ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) และฮอร์โมนแคลซิโตนิน (calcitonin) ฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะทำหน้าที่ตรงข้ามกัน โดยฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะทำหน้าที่สลายกระดูกและฮอร์โมนแคลซิโตนินจะช่วยในการสร้างกระดูก (Jane and Gary, 2001)

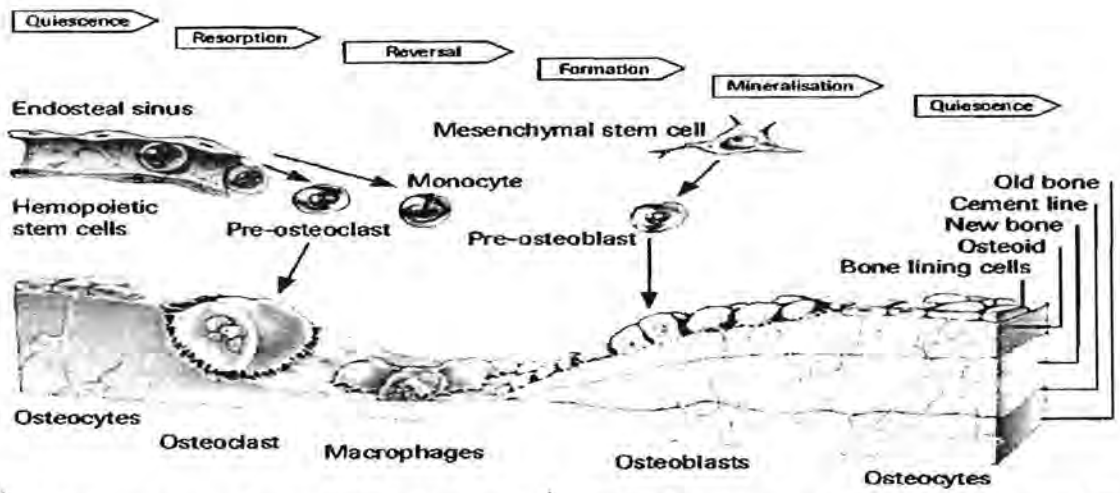
Bone remodeling cycle ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (รูปที่ 3)

Resorption phase คือ กระบวนการสลายเนื้อกระดูก โดย osteoclast จะใช้ส่วนของ ruffle border วางตัวบริเวณผิวกระดูกส่วนที่จะมีการสลายเนื้อกระดูก จากนั้นจะหลั่งไฮโดรเจนอิออน (H^+) และหลั่ง hydrolytic enzyme เพื่อสลายกระดูก ทำให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมฟอสเฟตออกมา ในขณะที่เกิดกระบวนการสลายกระดูก osteoclast จะหลั่งเอนไซม์ Tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) ออกมา ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการ dephosphorylation เกิดการสลายเนื้อกระดูก ทำให้กระดูกเกิดเป็นหลุมเล็ก ๆ ขึ้น

Reversal phase ภายหลังจากที่มีการสลายกระดูกแล้ว จะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวพวก macrophages มาเก็บกินซากกระดูก มีกลุ่ม mononuclear cells (pro-osteoblasts) มายังตำแหน่งที่มีการสลายกระดูก และเริ่มเข้าสู่กระบวนการสร้างกระดูกต่อไป

Formation phase คือ กระบวนการสร้างกระดูก โดย osteoblast จะสังเคราะห์ และหลั่ง osteoid ล้อมรอบตัวเอง หลังจากนั้นจะหลั่ง pyrophosphate และแคลเซียม ออกมาจนกระทั่งความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์สูงเกินกว่าที่จะละลายได้ osteoblast จะหลั่ง **เอนไซม์** alkaline phosphatase ออกมาเพื่อสลาย (hydrolyze) pyrophosphate ทำให้เกิดการสะสมตัวของแคลเซียม ที่ช่องว่างระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า mineralization ทำให้ osteoblast ค่อยๆ ถูกดันให้ออกห่างจากผิวกระดูก แล้วเปลี่ยนไปเป็น osteocyte

Quiescence phase เป็นระยะภายหลังจากที่เกิดกระบวนการสร้างกระดูกเสร็จสิ้นแล้ว (Hill and Orth, 1998; Nakamura, 2007)



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการ bone remodeling cycle ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสลายกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoclast และกระบวนการสร้างกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoblast

Bone remodeling cycle เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ตั้งแต่เกิดจนตาย เป็นกระบวนการสำคัญที่ทำให้กระดูกมีการเจริญพัฒนา และซ่อมแซมกระดูกให้มีความแข็งแรงอยู่เสมอ ถ้ามีความผิดปกติเกิดขึ้นกับกระบวนการดังกล่าว เช่น เกิดกระบวนการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างกระดูก จะทำให้มีการสูญเสียเนื้อกระดูก มวลกระดูกลดลง และอาจทำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ในที่สุด

ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

กระดูกพรุน คือ ภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกลดน้อยลง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับจุลภาคของเนื้อเยื่อกระดูก ส่งผลให้กระดูกเปราะบาง ไม่สามารถรับน้ำหนัก หรือแรงกดได้ตามปกติ ทำให้กระดูกหักได้ง่าย (Kanis et al., 1994) โดยตำแหน่งที่หักบ่อย ได้แก่ กระดูกสันหลัง (spinal vertebra) กระดูกสะโพก (hip) และกระดูกข้อมือ (wrist) กลไกในการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้นเกิดได้จากสองกลไกด้วยกันคือ 1)เกิดจาก bone turnover สูงขึ้น เนื่องจากกระดูกมี remodeling unit เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอัตราการสลายกระดูกมากขึ้นกว่าปกติ และ2)เกิดจากกระบวนการ bone remodeling cycle imbalance โดยพบว่าเกิดกระบวนการ bone resorption มากกว่า กระบวนการ bone formation ซึ่งการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้น อาจเกิดจากกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือเกิดจากทั้งสองกลไกร่วมกันก็ได้ (Compson, 2001)

ฮอร์โมนเอสโตรเจน มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการรักษาสมดุลของกระดูก (Compson et al., 1990) โดยเอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ osteoclast ทำให้เกิดกระบวนการ bone resorption ลดลง จากที่กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า กระบวนการ bone remodeling cycle เกิดจากการทำงานของ osteoblast และ osteoclast พบว่าเซลล์ทั้งสองชนิด มีตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptors) ทั้งชนิดแอลฟา (estrogen receptor alpha; ERα) และเบต้า (ERβ) (Bland, 2000) ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนจะสามารถแสดงฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ โดยการจับกับตัวรับของเอสโตรเจน เมื่อมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะมีการสร้าง cytokines จาก osteoblast และ osteoblast progenitor cells มากขึ้น cytokines เหล่านี้ได้แก่ interleukin - 1 (IL-1), interleukin - 6 (IL-6) และ tumor necrosis factor – alpha (TNF-α) ซึ่งพบว่า cytokines เหล่านี้จะมีผลทำให้ osteoclast มีอายุยาวนานขึ้น และทำให้ progenitor cell เจริญไปเป็น mature osteoclast ได้มากขึ้น (Huges and Boyce, 1997; Jimi et al., 1996) ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ฮอร์โมนเอสโตรเจนยังมีผลต่อการทำงานของ osteoblast พบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนกระตุ้นให้ osteoblast สร้าง type I collagen มากขึ้น (Nakamura, 2007) และยับยั้งการเกิดกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast เมื่อมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนขึ้นจึงมีผลทำให้กระบวนการ bone formation เกิดขึ้นน้อยลง ด้วยเหตุผลดังกล่าว เมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจึงทำให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการ bone remodeling cycle ขึ้น ทำให้มีการสูญเสียมวลกระดูกมากกว่าปกติ และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกระดูกพรุนตามมา

ภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียมวลกระดูกไม่ให้เกิดเพิ่มมากขึ้น และลดอัตราการเกิดกระดูกหักได้ ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุด แต่คนส่วนใหญ่มักไม่เห็นความสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุน จนกระทั่งมีอาการจึงจะเข้ารับการรักษา ปัจจุบันการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนทำได้โดย การออกกำลังกาย รับประทานอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอ หลีกเลี่ยงการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และงดสูบบุหรี่ ส่วนในผู้หญิงที่ผ่าตัดรังไข่ออก และผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement

therapy) พบว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถลดอุบัติการณ์เกิดกระดูกหักได้ (Tongeson and Bell., 2001) แต่อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (Sulak 1997; Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) เป็นต้น ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มีการศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ 1) กลุ่มที่ยับยั้งกระบวนการสลายกระดูก (antiresorptive agents) ได้แก่ bisphosphonates ซึ่งเป็นยาที่สามารถยับยั้ง osteoclast activity และกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของ osteoclast ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกลดน้อยลง (Papapoulos, 2008) 2) กลุ่มที่กระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก (anabolic agent) โดยยากลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเพิ่มมวลกระดูก ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (Parathyroid hormone) ซึ่งพบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์สามารถเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูกโดยการกระตุ้น osteoblast activity สามารถเพิ่มจำนวนของ osteoblast และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast cells ได้ (Deal, 2009) แต่พบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์มีผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ และอาเจียน และผลที่ได้ยังไม่แน่นอน จึงยังไม่เป็นที่นิยมที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนทั้งสองกลุ่ม ยังมีราคาสูง และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

ผลของไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ต่อกระดูก

ไอโซฟลาโวนเป็นสารไฟโตเอสโตรเจน ที่พบมากในพืช เช่น ถั่วเหลือง มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ไอโซฟลาโวน ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin สามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Murkies et al., 1998; Chen and Anderson, 2002) ได้มีการศึกษาพบว่าไอโซฟลาโวนมีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก จากการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกกับ genistein ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6}-10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อ และเพิ่ม alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็น bone formation marker ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yamaguchi and Gao, 1998) และเมื่อทำการย้อม osteoclast ด้วย tartrate – resistant acid phosphatase ซึ่งเป็น bone resorption marker พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ genistein จะมีจำนวนของ osteoclast ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gao and Yamaguchi., 1999) และจากการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง osteoblast MC3T3-E1 ร่วมกับ genistein และ daidzein ที่ความเข้มข้น 10^{-6} -10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่ม alkaline phosphatase activity

และ เพิ่มปริมาณดีเอนเอในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sugimoto and Yamaguchi, 2000) ในปี 2007 Zhang และคณะ พบว่าเมื่อเลี้ยง osteoblast ร่วมกับ puerarin ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ไมโครโมล/ลิตร มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ และเพิ่ม alkaline phosphatase activity ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Ishimi และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบว่า การให้ genistein ขนาด 0.4 และ 0.7 mg ต่อวัน นาน 4 สัปดาห์ ในหนูขาวเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ พบว่า สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกของกระดูกต้นขาได้

กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu เป็นไม้เลื้อย และมีหัวอยู่ใต้ดินเพื่อสะสมอาหาร ส่วนหัวของกวาวเครือขาว ถูกนำมาใช้เป็นยาแผนโบราณ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ ทดแทนฮอร์โมนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน ป้องกันผมร่วง และใช้เป็นส่วนผสมในครีมขยายทรวงอก เป็นต้น กวาวเครือขาวสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ ได้เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการทดลองให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวแก่สัตว์ทดลอง พบว่ากวาวเครือขาวสามารถไปกระตุ้นการเจริญของเซลล์เยื่อบุมดลูกและเซลล์เยื่อบุผนังช่องคลอดในหนูแรทเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ (Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Cherdshewasart et al., 2007a) สามารถลดระดับของลูติไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone; LH) และฟอลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (follicle stimulating hormone; FSH) ในหนูแรทเพศผู้และเพศเมีย (Malaivijitnond et al., 2004) และในลิงหางยาวเพศเมีย (Trisomboon et al., 2004; 2006) และพบว่าสามารถบรรเทาอาการภายหลังหมดประจำเดือนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้ เช่น อาการร้อนวูบวาบ หรือนอนไม่หลับได้ เป็นต้น (Muangman and Cherdshewasart, 2001) นอกจากนี้ยังพบว่ากวาวเครือขาวสามารถยับยั้งการเจริญของมะเร็งเต้านมในหนูแรทเพศเมียที่ถูกชักนำด้วยสารก่อมะเร็ง 7,12-DMBA ได้อย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ (Cherdshewasart et al., 2007b) และเมื่อให้สารสกัดกวาวเครือขาวที่สกัดด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ ที่ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร พบว่าสามารถไปยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 ในหลอดทดลองได้ (Cherdshewasart et al., 2004) และเมื่อศึกษาพิษเรื้อรังจากการให้กวาวเครือขาวในขนาด 5 และ 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน แก่หนูแรท นาน 6 เดือน พบว่ากวาวเครือขาวไม่แสดงความเป็นพิษ นั่นคือไม่มีผลต่อการทำงานของตับ ไต และน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ และอวัยวะภายใน (Manosroi et al., 2004) และไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนังในกระต่ายและหนูตะเภา (Cherdshewasart et al., 2003)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า หัวของกวาวเครือขาวประกอบไปด้วย สารไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิด ที่พบมากได้แก่ กลุ่มของไอโซฟลาโวน ซึ่งประกอบด้วย daidzin, daidzein, genistin, genistein, puerarin และ mirificin เป็นต้น (Chanakaow et al., 2000; Ingham et al., 2002; Cherdshewasart et al., 2007a; 2008; Urasopon et al., 2008b) ซึ่งสารไอโซฟลาโวนเหล่านี้ มีรายงานว่ามีผลกระตุ้นการเจริญของกระดูก ดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาวสามารถลดระดับของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับแคลเซียมในซีรั่ม ในลิงหางยาวแก่เพศเมียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Trisomboon et al., 2004) และ

ต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีภายหลังจากการตัดต่อมบ่งเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ **และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน**) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมบ่งเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาวแสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถ**ป้องกัน** (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ของกระดูกส่วนรยางค์ (long bone) และกระดูกส่วนแกนกลาง (axial bone) ในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถ**ป้องกัน** (prevention) การเกิดโรคกระดูกพรุนได้ แต่อย่างไรก็ตามด้วยที่โรคกระดูกพรุนสามารถเกิดได้กับมนุษย์ทุกคน อย่างค่อยเป็นค่อยไป โดยไม่มีอาการแสดงให้เห็นจนกว่าจะเกิดสภาวะกระดูกหักแล้วผู้ป่วยถึงจะรู้ตัว และเข้ารับการรักษา ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยากที่จะแก้ไข และนักวิจัยทั่วโลกกำลังมุ่งเน้นศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้มาซึ่งยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุน และจากที่มีรายงานว่ากวาวเครือขาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดและการเจริญของมะเร็งเต้านมได้ด้วย (Cherdshewasart et al., 2004; 2007b) ซึ่งเป็นข้อดีที่เหนือกว่าการใช้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสมุนไพรกวาวเครือขาว ในการ**รักษา** (therapeutics) ภาวะกระดูกพรุนภายหลังจากที่อาการดังกล่าวได้เกิดขึ้นแล้ว โดยการตัดต่อมบ่งเพศของหนูทั้งสองเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วัน เพื่อชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน แล้วจึงทดลองให้กวาวเครือขาว รวมไปถึงการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อกระดูก เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมีย ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก

สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Sprague - Dawley อายุ 2 เดือน จำนวน 70 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิที่ 23 - 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 - 18.00 น.) และมืด 12 ชั่วโมง (18.00 - 06.00 น.) ได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูป (S. W. T. Co., Ltd, สมุทรปราการ ประเทศไทย) ตลอดเวลา จนกระทั่งหนูมีอายุครบห้าเดือนครึ่ง จึงเปลี่ยนมาให้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (soybean - free diet) CC.P. 082/SBF, Lot No. 080101, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) เพื่อกำจัดปัจจัยรบกวนจากสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบมากในถั่วเหลือง (Urasopon et al., 2008b) เมื่อหนูมีอายุครบ 6 เดือน เก็บเลือดจากหัวใจ กำหนดให้วันนี้เป็น D_0 ของการทดลอง

ขั้นตอนการทดลอง

นำหนูแรทเพศเมีย อายุ 6 เดือน จำนวน 70 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม Sham control (SH) คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง แต่ไม่ได้นำรังไข่ ออก จำนวน 15 ตัว
2. กลุ่ม Ovariectomy (OVX) คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง และนำรังไข่ออกทั้งสองข้าง จำนวน 55 ตัว

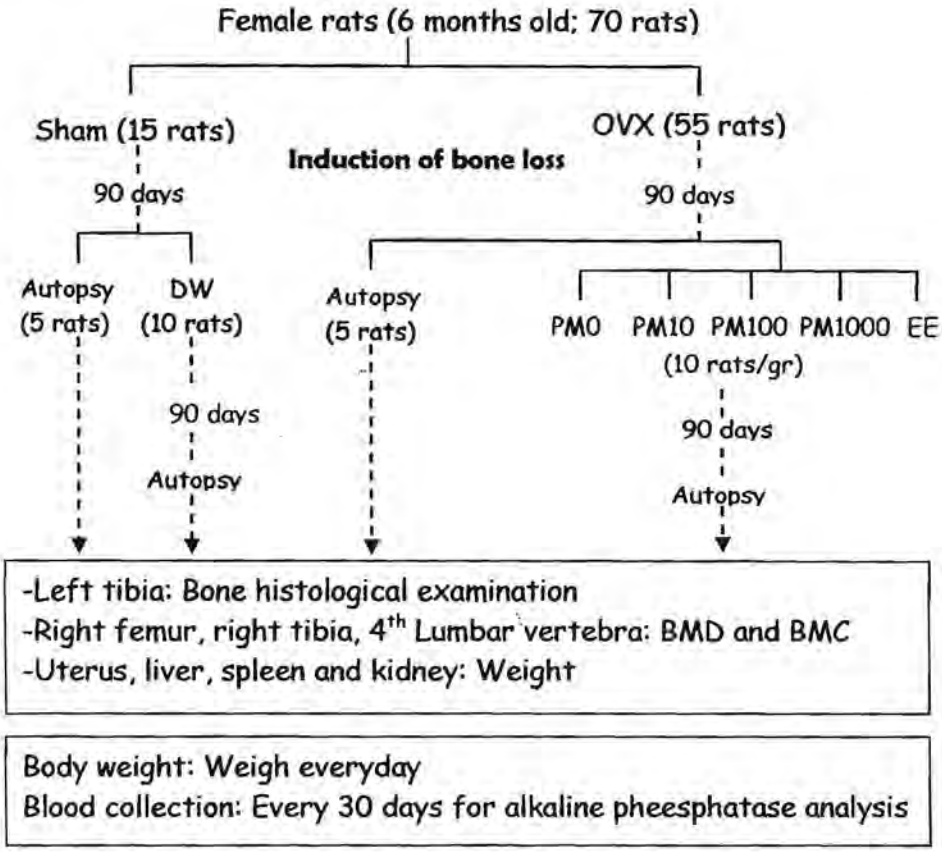
หลังจากผ่าตัดจะเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูอยู่ในสภาวะพร่องฮอร์โมนเพศ และเกิดภาวะกระดูกพรุนตามการศึกษาของ Urasopon และคณะ (2007; 2008a) เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (D_{30}, D_{60} และ D_{90}) ภายหลังจากผ่าตัดนาน 90 วัน สุ่มเลือกหนูกลุ่ม SH และกลุ่ม OVX กลุ่มละ 5 ตัว มาทำการุณยฆาตด้วยสารระเหยอีเธอร์ เก็บเลือดจากหัวใจ และเก็บกระดูกขาขวาท่อนบน (right femur) กระดูกหน้าแข้งข้างขวา (right tibia) กระดูกสันหลังท่อนที่ 4 (4^{th} lumbar vertebra) เพื่อนำไปวัดมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูก และเก็บกระดูกหน้าแข้งข้างซ้าย (left tibia) ใน 10 % phosphate buffer formalin เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histology)

นำหนูที่เหลือ จำนวน 60 ตัว (กลุ่ม SH จำนวน 10 ตัว และ กลุ่ม OVX จำนวน 50 ตัว) มาแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ กลุ่มละ 10 ตัว และทำการทดลอง โดยให้สารต่างๆ ทางปาก นาน 90 วันดังนี้

1. กลุ่ม Sham ที่ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/วัน (กลุ่ม SH)
2. กลุ่ม OVX ที่ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/วัน (กลุ่ม PM0)
3. กลุ่ม OVX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM10)
4. กลุ่ม OVX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM100)
5. กลุ่ม OVX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM1000)
6. กลุ่ม OVX ที่ได้รับ 17α - ethinylestradiol ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่มEE)

ป้อนสารในช่วงเวลา 08.00 – 10.00 น. ชั่งน้ำหนักหนูตัวสัปดาห์ละครั้ง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และใช้ค่านำหนักตัวที่ได้ในแต่ละสัปดาห์มาปรับปริมาณการให้กวาวเครือขาว และปริมาณ17α – ethinylestradiol เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (D_{120}, D_{150} และ D_{180}) เมื่อครบ 90 วัน ทำการุณยฆาตหนูด้วยสารระเหยอีเธอร์ และเก็บกระดูกส่วน right tibia, right femur และ 4^{th} lumbar vertebra เพื่อนำไปวัดมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูก และเก็บกระดูก left tibia ใน 10 % phosphate buffer formalin เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histology)

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง



Remark
OVX = Ovariectomy
DW and PM0 = Daily feeding with 1 ml of distilled water for 90 days
PM10 = Daily feeding with 10 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days
PM100 = Daily feeding with 100 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days
PM1000 = Daily feeding with 1,000 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days

2. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดอัณฑะออก

สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague - Dawley อายุ 2 เดือน จำนวน 70 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิที่ 23 - 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 - 18.00 น.) และมืด 12 ชั่วโมง (18.00 - 06.00 น.) ได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูป (S. W. T. Co., Ltd, สมุทรปราการ ประเทศไทย) ตลอดเวลา จนกระทั่งหนู

มีอายุครบห้าเดือนครึ่ง จึงเปลี่ยนมาให้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (soybean - free diet) เพื่อกำจัดปัจจัยรบกวนจากสารไฟโตรเอสโตรเจนที่พบมากในถั่วเหลือง (Urasopon et al., 2008b) เมื่อหนูมีอายุครบ 6 เดือน เก็บเลือดจากหัวใจ กำหนดให้วันนี้เป็น day 0 ของการทดลอง

นำหนูแรทเพศผู้ อายุ 6 เดือน จำนวน 70 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม Sham control (SH) คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง แต่ไม่ได้นำอัณฑะ ออก จำนวน 15 ตัว

2. กลุ่ม Orchidectomy (ODX) คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง และนำอัณฑะ ออกทั้งสองข้าง จำนวน 55 ตัว

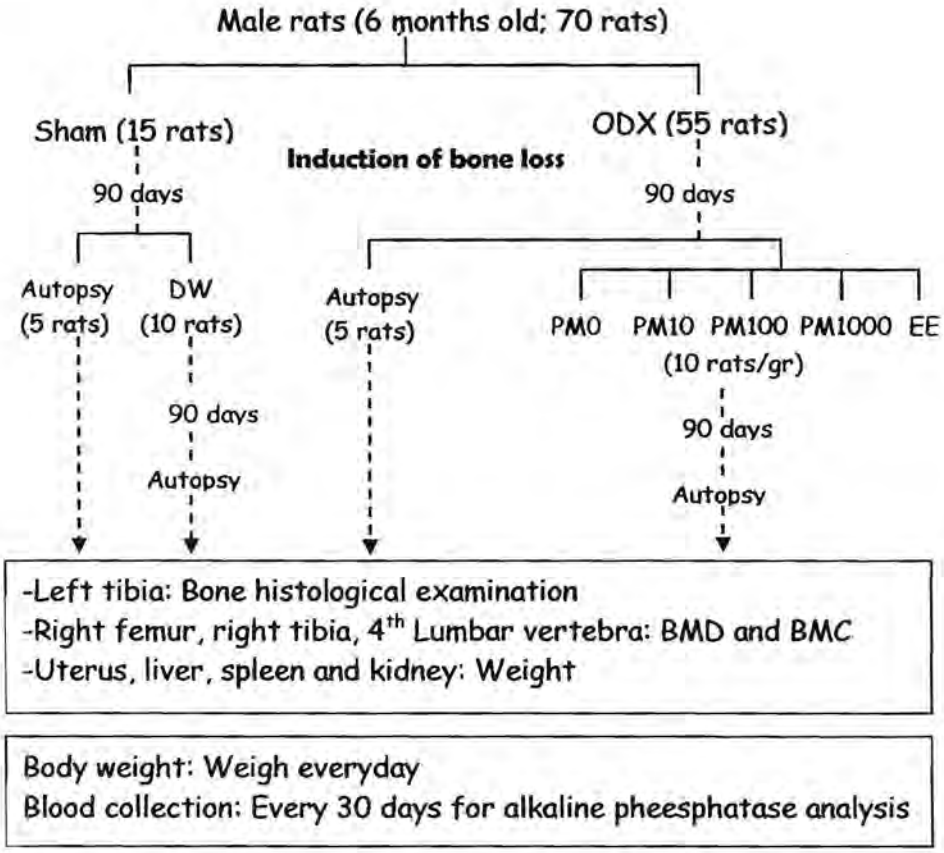
หลังจากผ่าตัดจะเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูอยู่ในสภาวะพร่องฮอร์โมนเพศ และเกิดภาวะกระดูกพรุนตามการศึกษาของ Urasopon และคณะ (2007; 2008a) เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (day 30, day 60 และ day 90) ภายหลังจากผ่าตัดนาน 90 วัน สุ่มเลือกหนูกลุ่ม Sham และกลุ่ม ODX กลุ่มละ 5 ตัว มาทำการุณยฆาต ด้วยสารระเหยอีเธอร์ เก็บเลือดจากหัวใจ และเก็บกระดูกขาขวาท่อนบน (right femur) กระดูกหน้าแข้งข้างขวา (right tibia) กระดูกสันหลังท่อนที่ 4 (4^{th} lumbar vertebra) เพื่อนำไปวัดมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูก และเก็บกระดูกหน้าแข้งข้างซ้าย (left tibia) ใน 10 % phosphate buffer formalin เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histology)

นำหนูที่เหลือ จำนวน 60 ตัว (กลุ่ม SH จำนวน 10 ตัว และ กลุ่ม ODX จำนวน 50 ตัว) มาแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ กลุ่มละ 10 ตัว และทำการทดลอง โดยให้สารต่างๆ ทางปาก นาน 90 วันดังนี้

1. กลุ่ม Sham ที่ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/วัน (กลุ่ม SH)
2. กลุ่ม ODX ที่ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร/วัน (กลุ่ม PM0)
3. กลุ่ม ODX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM10)
4. กลุ่ม ODX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM100)
5. กลุ่ม ODX ที่ได้รับกวาวเครือขาว ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่ม PM1000)
6. กลุ่ม ODX ที่ได้รับ 17α - ethinylestradiol ขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (กลุ่มEE)

ป้อนสารในช่วงเวลา 08.00 – 10.00 น. ชั่งน้ำหนักหนูตัวสัปดาห์ละครั้ง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และใช้ค่าน้ำหนักตัวที่ได้ในแต่ละสัปดาห์มาปรับปริมาณการให้กวาวเครือขาว และปริมาณ17α – ethinylestradiol เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (D_{120}, D_{150} และ D_{180}) เมื่อครบ 90 วัน ทำการุณยฆาตหนูด้วยสารระเหยอีเธอร์ และเก็บกระดูกส่วน right tibia, right femur และ 4^{th} lumbar vertebra เพื่อนำไปวัดมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูก และเก็บกระดูก left tibia ใน 10 % phosphate buffer formalin เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histology)

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง



Remark
ODX = Orchidectomy
DW and PM0 = Daily feeding with 1 ml of distilled water for 90 days
PM10 = Daily feeding with 10 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days
PM100 = Daily feeding with 100 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days
PM1000 = Daily feeding with 1,000 mg/kg of *P. mirifica* for 90 days

การเตรียมสารละลายกวาวเครือขาว

กวาวเครือขาวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นกวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai III โดยนำส่วนหัวของกวาวเครือขาวมาล้างให้สะอาด และหั่นเป็นชิ้นบางๆ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดเป็นผง และกรองให้ได้ขนาด 100 Mesh เก็บผงกวาวเครือขาวที่ได้ในที่แห้ง และไม่มีแสงแดด นำผงกวาวเครือขาวมาผสมน้ำกลั่น และป้อนหนูด้วย gavage feeding needle ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ป้อนในปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร สารแขวนลอยกวาวเครือขาวจะเตรียมใหม่ทุกๆ สัปดาห์ ปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai III จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีค่าอยู่ระหว่าง 123 - 157 มิลลิกรัม/100 กรัม กวาวเครือขาว (Urasopon et al., 2008b) และได้ทดสอบฤทธิ์เชิง

เอสโตรจินิก (estrogenic activity) ด้วยวิธี vaginal cytology assay แล้ว (Malaivijitnond et al., 2006; Cherdshewasart et al., 2007a; Urasopon et al., 2008b).

การเตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวและการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจนโดยวิธี HPLC

วิเคราะห์สารประกอบไฟโตเอสโตรเจน กลุ่มไอโซฟลาโวน จากกวาวเครือขาว โดยเทคนิค high performance liquid chromatography (HPLC) โดยก่อนทำการวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวนจากส่วนหัวของกวาวเครือขาว จะต้องทำการสกัดผงกวาวเครือขาวที่ได้จากขั้นตอนที่แล้วด้วย 95% เอทธานอล ตามวิธีการของ Urasopon et al (2008b) ดังนี้

1. นำผงกวาวเครือขาวปริมาณ 50 กรัม ผสมกับ 95% เอทธานอล ปริมาตร 150 มิลลิลตร นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. นำสารสกัดเอทธานอลที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman No.4) และเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. นำตะกอนที่เหลือจากการสกัดครั้งแรกไปผสมกับ 95% เอทธานอล ปริมาตร 100 มิลลิลตร และทำซ้ำขั้นตอนที่ 1 และ2
4. นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดครั้งแรกและครั้งที่สองมาผสมรวมกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้แรงดันสุญญากาศ ด้วยเครื่อง rotary evaporator
5. นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4 ไปทำให้แห้งสนิท โดยนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์สารประกอบไฟโตเอสโตรเจนประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

1. นำสารสกัดจากขั้นตอนข้างต้นมา 3 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอทธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 4.5 มิลลิตร และทำให้เจือจางโดยเติมสารละลาย A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) ปริมาตร 1.5 มิลลิตร
2. ฉีดสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ของ HPLC ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (ODS, Japan) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยระบบของ HPLC ประกอบไปด้วย Water 1525 binary HPLC pump, Waters 717 plus auto-sampler, and Water 2487 UV absorbance Dual λ detector (Waters, Milford, USA)
3. ตัวพา (mobile phase) ที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์ ประกอบด้วย solution A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) และ solution B (100:0.1 of acetonitrile : phosphoric acid)

โดยมีอัตราการไหลของสารที่ความเร็ว 1 มิลลิตร/นาที และตรวจวัดสารที่แยกได้ที่ค่าความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร

4. ทำการวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดที่พบในกวาวเครือขาว โดยเปรียบเทียบกับ retention time และปริมาณพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสารไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิด คือ puerarin (>99 purity, LKT Laboratories, Inc., MN, USA), daidzin (>95 purity), genistin (>95 purity), daidzein (>98 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA) และ genistein (>99% purity, LC Laboratories, MA, USA)

การเตรียมสารละลาย 17 α – ethinylestradiol

นำผง 17 α – ethinylestradiol ที่มีความบริสุทธิ์เท่ากับ 98% HPLC จากบริษัท Sigma, St. Louis มาละลายด้วย absolute ethanol ปริมาณน้อยที่สุด จากนั้นเติมน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไประเหย ethanol ออกโดยเปิดฝาขวดทิ้งไว้ข้ามคืน จากนั้นเก็บสารละลายที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเป็น stock solution นำสารละลาย 17 α – ethinylestradiol ไปเจือจางกับน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ก่อนจะนำไปป้อนหนู จนสารละลายหมด (Urasopon et al., 2008a)

เก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดหนูตั้งแต่ก่อนที่จะทำการผ่าตัดหนู (D_0) ภายหลังการผ่าตัดนาน 90 วัน และระหว่างให้สารต่างๆ นาน 90 วัน รวมทั้งสิ้น 180 วัน ด้วยความถี่ทุกๆ 30 วัน คือ D_{30}, D_{60} D_{90} D_{120}, D_{150} และ D_{180} ซึ่งระยะเวลาดังกล่าว เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล ของกระบวนการซ่อมสร้างและสลายกระดูก (biochemical markers of bone remodeling) (Delmas 2000; Alatalo et al., 2003) โดยใช้เข็มเบอร์ 26 G × 1/2" เจาะผ่านหัวใจห้องล่างขวา (cardiac puncture) หลังจากที่สลบสัตว์ทดลองด้วยอีเธอร์ จากนั้นจะนำเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำซีรั่มที่ได้ไปตรวจวัดระดับของ alkaline phosphatase ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay (EIA)

การวัดความหนาแน่นกระดูก

ภายหลังจากทำการุณยฆาตหนูด้วยสารระเหยอีเธอร์ จะทำการเก็บกระดูกขาขวาท่อนบน (right femur) กระดูกหน้าแข้งข้างขวา (right tibia) กระดูกสันหลังท่อนที่ 4 (4th lumbar vertebra) โดยเลาะกล้ามเนื้อออกจากกระดูก และนำผ้าก๊อซชุบน้ำเกลือ (0.9 % normal saline) มาห่อกระดูกให้มิดชิด และห่อทับด้วยกระดาษฟอยด์ นำไปใส่ถุงพลาสติก (zip lock) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ความหนาแน่นของกระดูก (BMD) จะวัดโดยใช้เครื่อง peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT, XTC Research SA^{+}, Stratec Medizintechnik GmbH., Germany) โดยวัดกระดูกส่วนกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) และกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ซึ่งมีรายละเอียดในการวัด ดังนี้

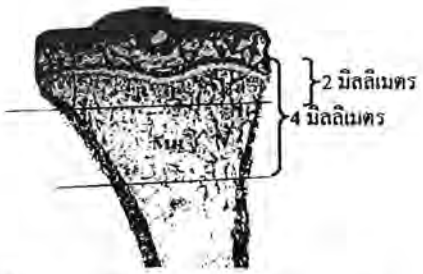
- กระดูก tibia ทำการวัดตำแหน่งของ proximal tibial metaphysis (TM) และ tibial diaphysis (TD)
- กระดูก femur ทำการวัดตำแหน่งของ distal femoral metaphysis (FM) และ femoral diaphysis (FD)
- กระดูกสันหลังท่อนที่ 4 (L4)

หลังจากนั้นจะนำมาวิเคราะห์ผลด้วย XCT – 5.50E software (Stratec Medizintechnik GmbH., Germany)

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

ภายหลังจากทำการุณยฆาตหนูด้วยสารระเหยอีเธอร์ ทำการเก็บกระดูกหน้าแข้งข้างซ้าย (Left tibia) ที่เลาะกล้ามเนื้อออกแล้วใน 10 % phosphate buffer formalin นาน 72 ชั่วโมง และนำกระดูกมา decalcification โดยการแช่ใน EDTA - G solution (EDTA disodium salt 14.5 กรัม, NaOH 1.25 กรัม, glycerol 15 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ โดยเปลี่ยน EDTA - G solution ทุกๆ สัปดาห์ หลังจากนั้นนำมา dehydrate ใน ethanol ที่ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ 90 เปอร์เซ็นต์ และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นำกระดูกที่ได้ไป embedd ใน paraffin และนำไปตัด section หนา 5 μm ในแนว frontal plane และนำไปย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) (Urasopon et al., 2008a)

นำสไลด์กระดูกที่ได้มาถ่ายภาพ และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Digital Image Processing Software Image Pro (Plus Software Media Cybernatics, Inc., USA) โดยทำการศึกษา trabecular bone area ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ห่างจาก epiphyseal plate ลงมา 2 และ 4 มิลลิเมตร (Cui et al., 2004) ดังรูปที่ 4 โดยจะวัดทั้งสิ้น 4 windows ต่อสไลด์ และวัด 3 สไลด์ ต่อกระดูกหนึ่งชิ้น รวมค่าที่ได้ทั้งหมดเท่ากับ 12 ค่า/กระดูก 1 ชิ้น/หนู 1 ตัว หรือเท่ากับ 120 ค่า/กลุ่ม



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งที่ทำการวัดพื้นที่กระดูก (Trabecular bone area)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

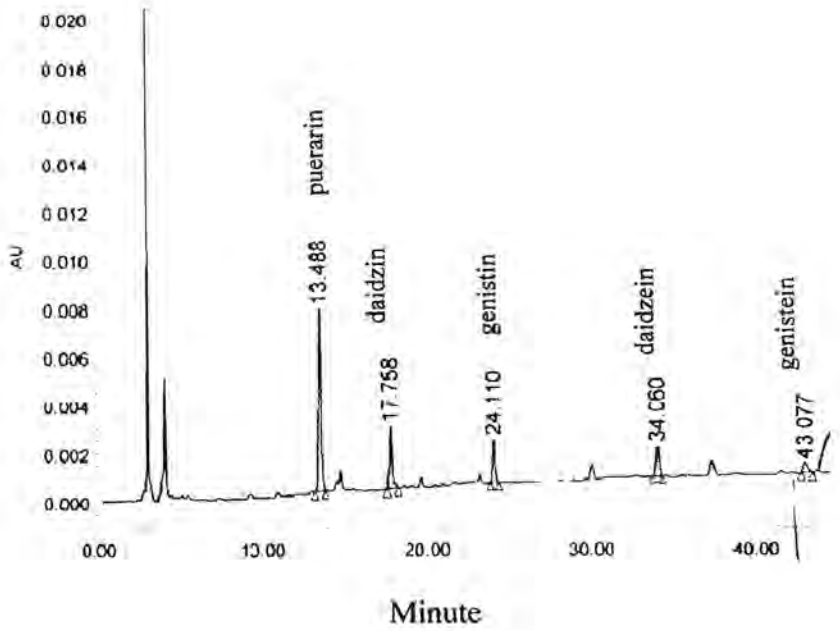
แสดงผลข้อมูลในรูปของ mean ± SEM วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของข้อมูลระหว่างกลุ่มต่าง ๆ ในจุดเวลาเดียวกัน หรือในกลุ่มเดียวกันแต่คนละจุดเวลา โดยใช้ One-way Analysis of Variance (ANOVA) และทดสอบ post-hoc test ด้วย LSD test ยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$

ผลการวิจัย

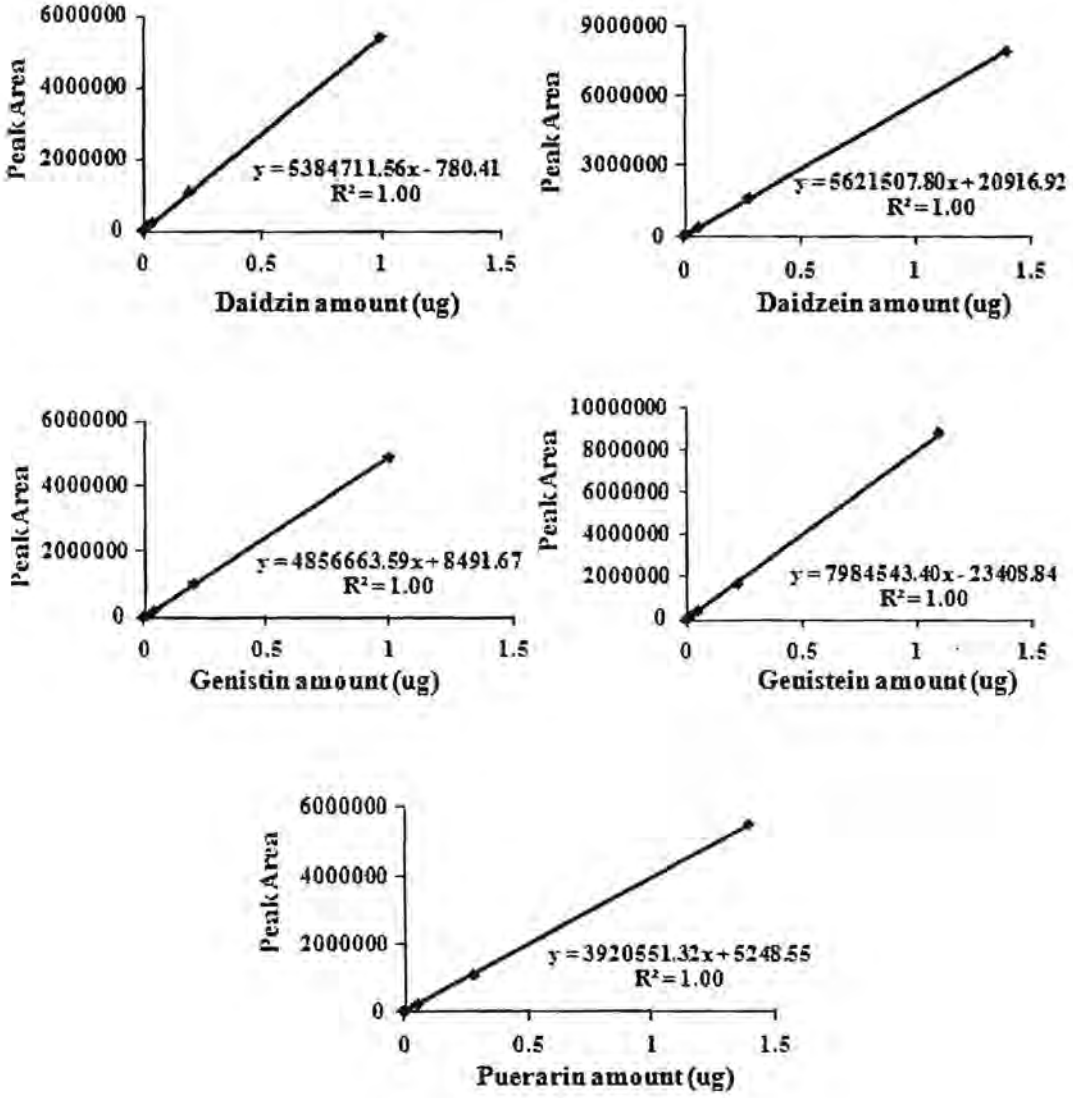
1. ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวโดยวิธี HPLC

สารไฟโตรเอสโตรเจน ไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิด คือ Puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein เมื่อวิเคราะห์ด้วย HPLC จะเคลื่อนออกมาจากคอลัมน์ที่เวลา 12.95, 17.75, 24.68, 33.35 และ 42.18 นาที ตามลำดับ (ดังรูปที่ 5) เมื่อนำค่าสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) มาวาดลงบนกราฟ และคำนวณหาค่าความสัมพันธ์พบมีค่า R^2 = 1.0 (ดังรูปที่ 6) จากการวิเคราะห์ผงกวาวเครือขาวปริมาณ 100 กรัม พบว่ามีสารไอโซฟลาโวน 5 ชนิด รวม 77.21 มิลลิกรัม เมื่อแยกเป็นแต่ละชนิดพบมีปริมาณของ puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein เท่ากับ 46.15, 11.94, 9.45, 1.42 และ 8.25 มิลลิกรัม ตามลำดับ

รูปที่ 5. แสดง HPLC fingerprints ของสารไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิดคือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein



รูปที่ 6. แสดงค่าไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิดคือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein และค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area)



2. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมีย ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก

2.1. น้ำหนักตัวหนู

จากการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเริ่มการทดลองในวันที่ D_0 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$; รูปที่ 7) แต่ภายหลังจากการตัดรังไข่ในหนูกลุ่ม OVX พบว่าน้ำหนักตัวหนูเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เริ่มตั้งแต่วันที่ 14 (D_{14}) ของการทดลอง โดยค่าน้ำหนักตัวหนูใน

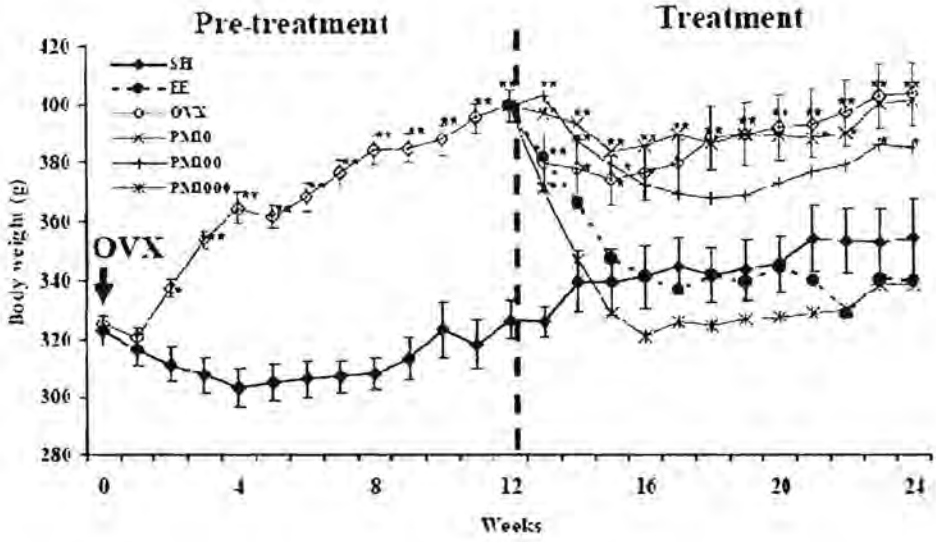
วันที่ 90 (D_{90}) มีค่าสูงกว่าวันที่ D_0 ประมาณ 1.25 เท่า (325.26 $\pm$ 3.19 กรัม และ 395.35 $\pm$ 5.27 กรัม ในวันที่ 0 และ 90 ตามลำดับ) แต่ในทางกลับกันพบว่าน้ำหนักตัวหนูในกลุ่ม SH มีค่าลดลงเล็กน้อยในช่วง 60 วันแรกของการทดลอง จากนั้นค่าจึงกลับคืนสู่สภาวะปกติในวันที่ 90 (D_{90}) ของการทดลอง ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม OVX และ กลุ่ม SH จึงมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ <0.01) ตั้งแต่วันที่ 14 ของการทดลอง

เมื่อป้อนสารแขวนลอยกวาวเครือขาวให้แก่หนูกลุ่ม OVX ทางปากทุกวันเป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าน้ำหนักตัวหนูลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ นั่นคือ น้ำหนักตัวหนูลดลงมากขึ้นเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น โดยน้ำหนักตัวหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM 1000) มีขนาดเท่ากับหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (17α-ethinylestradiol) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (EE) และไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับหนูในกลุ่ม SH ตลอดระยะเวลานาน 90 วัน ของการให้สาร

แม้ว่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม SH มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสุดท้ายของการทดลอง แต่ก็ยังคงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (D_0)

รูปที่ 7. แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ OVX เท่านั้น

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH



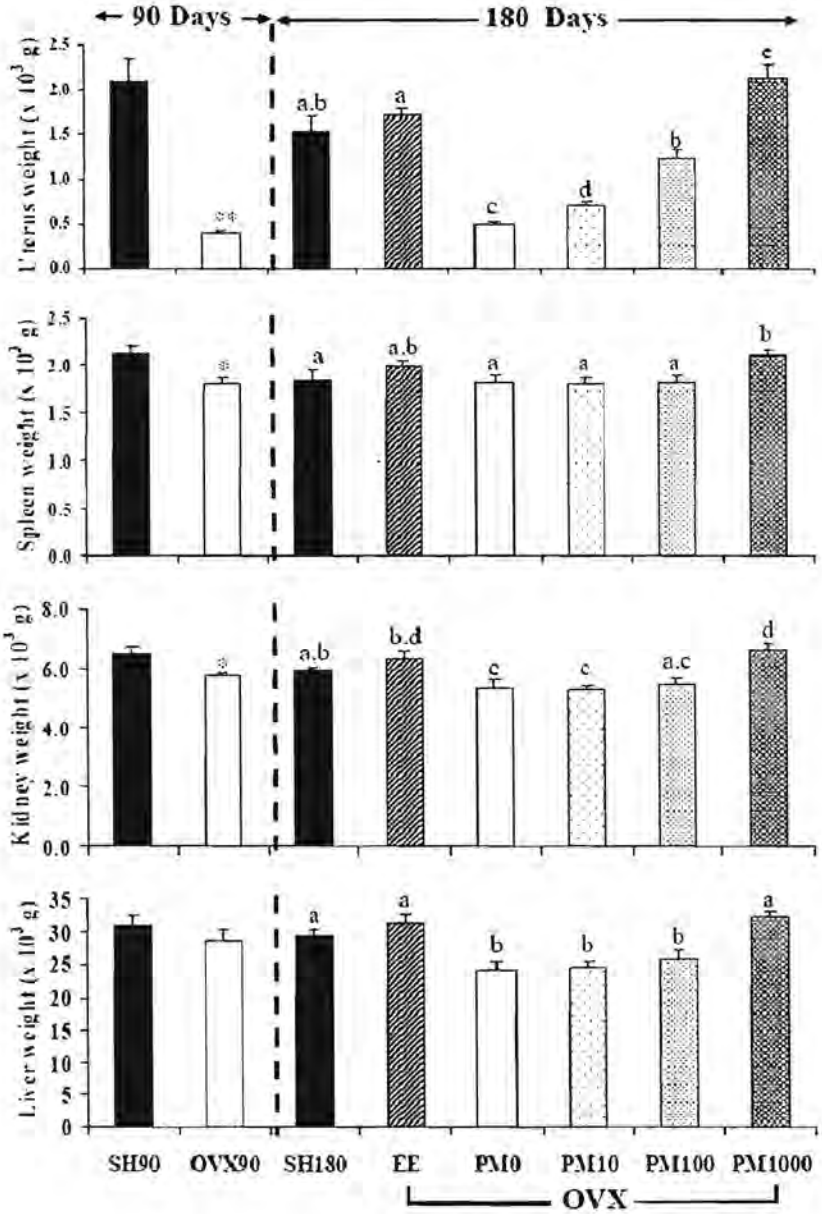
2.2. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์

เนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละช่วงเวลา ดังนั้น น้ำหนักอวัยวะจึงคำนวณเป็นน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (น้ำหนักอวัยวะ/น้ำหนักตัว) เพื่อที่จะสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ระหว่างกลุ่มต่าง ๆ

ภายหลังจากตัดรังไข่เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูก, ม้าม และไตในหนูกลุ่มที่ตัดรังไข่ (OVX) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ <0.01, รูปที่ 8) ยกเว้นน้ำหนักตับที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และเมื่อเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นเวลานาน 90 วัน (D_{180}) พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูก, ไต และตับ ในหนูกลุ่มที่ตัดรังไข่ (OVX/PM0) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ <0.01) และเมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวแก่หนูพบว่าน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์สามารถกลับคืนมามีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม SH อย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งน้ำหนักมดลูกสัมพัทธ์ ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE) น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ทั้งหมดกลับคืนมาใกล้เคียงกับกลุ่ม SH ($p>0.05$)

รูปที่ 8. แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูก, ม้าม. ไต และตับในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



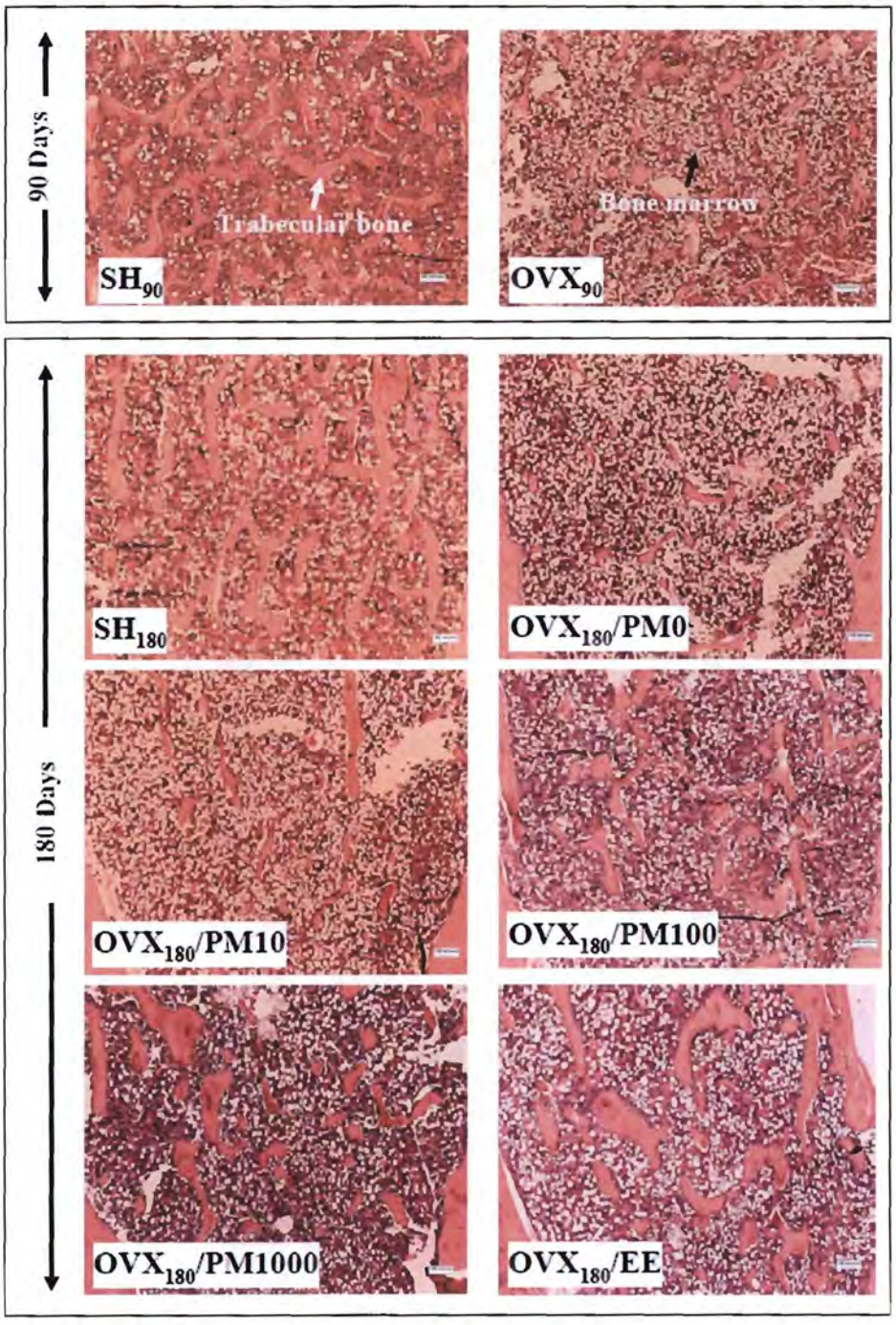
2.3. โครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

ภายหลังตัดรังไข่นาน 90 วัน (OVX_{90}) trabecular bone area ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH_{90} ในขณะที่ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น (รูปที่ 9) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูแรทเพศเมียเกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง และเมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดรังไข่ไว้นานถึง 180 วัน (OVX_{180}/PM0) ยิ่งทำให้สภาวะกระดูกพรุนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถฟื้นกลับคืนมาได้เมื่อหนูได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาว (PM) และฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE)

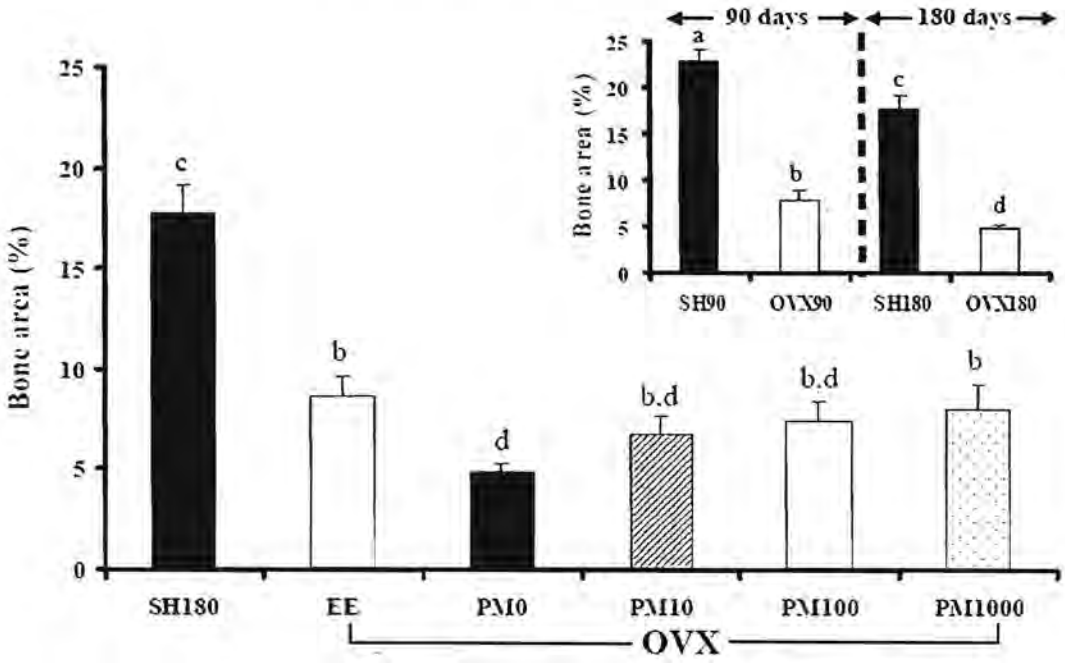
เมื่อเปรียบเทียบค่า %trabecular bone area (%BA) ระหว่างกลุ่ม SH และ OVX ภายหลังการตัดรังไข่นาน 90 และ 180 วัน พบว่าค่า %BA ของหนูกลุ่ม OVX_{90} มีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{90} อยู่ 65.4% (22.79 ± 1.34 และ 7.88 ± 0.99 สำหรับหนูกลุ่ม SH_{90} และ OVX_{90} ตามลำดับ ($p < 0.001$)) และ %BA ของหนูกลุ่ม OVX_{180}/PM0 มีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} เท่ากับ 72.72% (17.71 ± 1.42 และ 4.83 ± 0.42 สำหรับหนูกลุ่ม SH_{180} และ OVX_{180} ตามลำดับ ($p < 0.001$)) ดังแสดงในรูปที่ 10 เมื่อเปรียบเทียบค่า %BA ในหนูปกติที่ไม่ได้ตัดรังไข่ ในแง่ของอายุหนูที่เพิ่มขึ้น พบว่าค่า %BA ลดลง 22.29% ($p = 0.004$) เมื่อหนูอายุเพิ่มขึ้นจาก 9 เดือน (SH_{90}) เป็น 12 เดือน (SH_{180}) และเมื่อพิจารณาค่า %BA ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างสัมพันธ์กับอายุและการตัดรังไข่ ระหว่างหนูกลุ่ม OVX ที่มีอายุ 9 เดือน (OVX_{90}) กับหนูกลุ่ม OVX ที่มีอายุ 12 เดือน (OVX_{180}) พบว่าค่า %BA ลดลงสูงถึง 38.70% ($p < 0.01$)

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่า %BA ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น นั่นคือ %BA ในหนูกลุ่ม OVX_{90} เท่ากับ 7.88±0.99 และในหนูกลุ่ม PM0, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 4.83 ± 0.42, 6.73 ± 0.92, 7.45 ± 0.93 และ 8.01 ± 1.27 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 และค่า %BA ของหนูกลุ่ม PM1000 มีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม EE (%BA = 8.67 ± 0.96) นอกจากนี้พบว่าค่า %BA ของหนูกลุ่ม PM1000 และ EE มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่ม PM0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เท่ากับ 65.8% และ 79.5% ตามลำดับ และสูงกว่ากลุ่ม OVX_{90} เล็กน้อย ($P>0.05$) เท่ากับ 1.64% และ 10.9% ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าการได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน และฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน ในหนูแรทเพศเมีย สามารถทำให้กระดูกหนาตัวกลับคืนมาได้ แต่อย่างไรก็ตามค่า %BA ในหนูกลุ่ม PM1000 และ EE ยังคงต่ำกว่าของหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-54.77% และ -51.04% ตามลำดับ, $p<0.01$)

รูปที่ 9. แสดงโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูกในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่



รูปที่ 10. แสดงค่าเฉลี่ย %trabecular bone area ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน (กราฟเล็กมุมบนขวา) และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่ ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

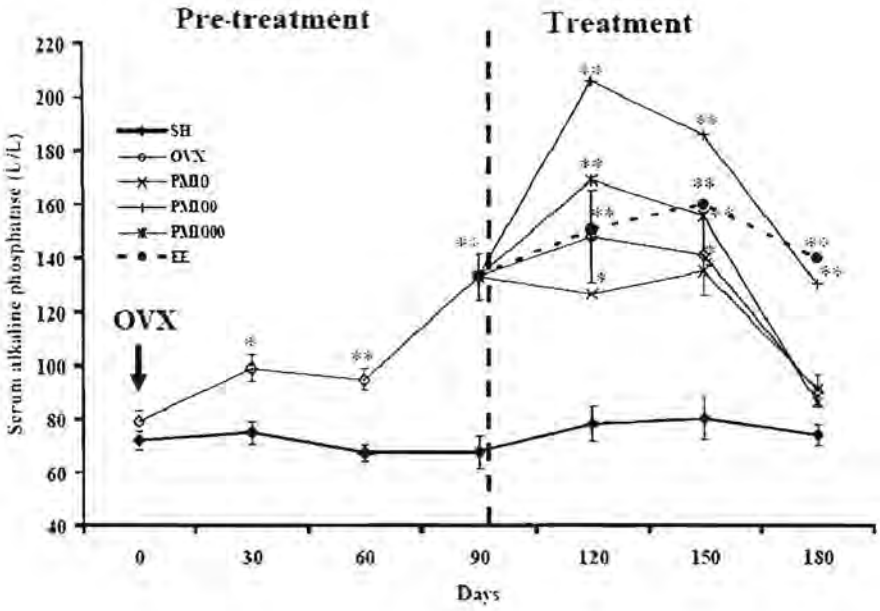


2.4. ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม

ภายหลังการตัดรังไข่นาน 90 และ 180 วัน (กลุ่ม OVX) พบว่าระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) ในช่วง 90 วันแรก เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH (รูปที่ 11) และยังคงเพิ่มสูงขึ้นต่อไปอีกนาน 30 วัน ก่อนที่จะลดต่ำลงมาใกล้เคียงกับกลุ่ม SH ในช่วง 60 วันสุดท้ายของการทดลอง (D_{150} และ D_{180}) และเมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM0, PM10 และ PM1000) นาน 90 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX พบว่าไม่มีผลต่อระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม โดยไม่ทำให้ค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงไปจากกลุ่ม OVX ยกวันกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM100) ที่ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าสูงกว่ากลุ่ม OVX ตลอดระยะเวลาที่ได้รับสาร เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน EE ที่ระดับalkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าสูงอยู่ตลอดเวลา ไม่ต่างจากกลุ่ม OVX ในระหว่างวันที่ 120 และ 150 (D_{120} และ D_{150}) ซึ่งค่าที่สูงนี้ ยังคงสูงอยู่จนกระทั่งวันที่ 180 (D_{180}) จึงทำให้ค่า alkaline phosphotose ของหนูกลุ่ม EE ใน D_{180} สูงกว่าของหนูกลุ่ม OVX และไม่กลับคืนสู่ระดับของหนูกลุ่ม SH ในขณะที่ระดับalkaline phosphatase ในซีรั่มของหนูกลุ่ม SH มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง 180วัน

รูปที่ 11. แสดงค่าเฉลี่ย alkaline phosphatase ในซีรั่ม ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ OVX เท่านั้น

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH



2.5. ค่าความหนาแน่นกระดูก (Bone mineral density; BMD)

ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (Bone mineral density of trabecular bone)

ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ tibial metaphysis, femur metaphysis และ 4th lumbar vertebra มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH (รูปที่ 12) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูเกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง แต่เมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดรังไข่ไว้นานถึง 180 วัน (PM0) พบว่าภาวะกระดูกพรุนไม่ลดลงไปจากเดิม นั่นคือไม่แตกต่างจากกลุ่ม OVX_{90}

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM1000) ความหนาแน่นกระดูกมีค่าสูงกว่าของหนูกลุ่ม OVX_{90} นั่นคือ ค่าความหนาแน่นกระดูกส่วน tibial metaphysis, femur metaphysis และ 4th lumbar vertebra ในหนูกลุ่ม OVX_{90} เท่ากับ 0.212±0.023, 0.282±0.038 และ 0.249±0.010 x 10^3 mg/cm^3 และของหนูกลุ่ม PM1000 เท่ากับ 0.239±0.012, 0.299±0.007 และ 0.285±0.008 x 10^3 mg/cm^3 (หรือค่าความหนาแน่นกระดูกในกลุ่ม PM มีค่าสูงกว่ากลุ่ม OVX เท่ากับ 12.76, 6.02 และ 14.45% ตามลำดับ) ซึ่งค่าที่ได้ของกลุ่ม PM1000 ใกล้เคียงกับของหนูกลุ่ม EE ที่มีค่าเท่ากับ 0.233±0.011, 0.296±0.015 และ 0.282±0.009 x 10^3 mg/cm^3 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามค่าความหนาแน่นกระดูกของหนูกลุ่ม PM1000 และ EE ยังคงต่ำกว่าของหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่มีค่าเท่ากับ 0.346±0.022, 0.412±0.014 และ 0.301±0.010 x 10^3 mg/cm^3 ตามลำดับ

ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral density of cortical bone)

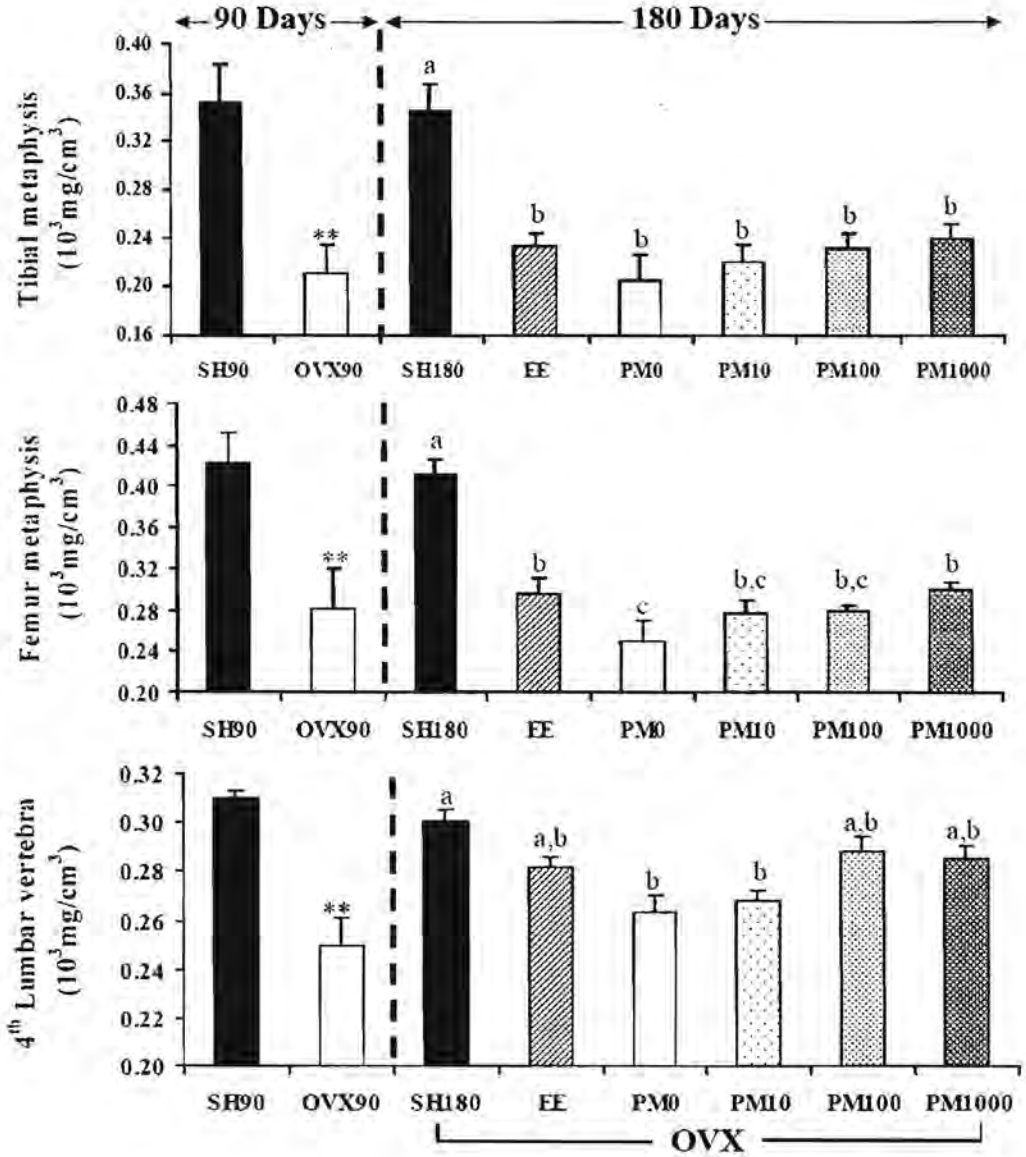
ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่นทั้ง 5 ส่วน คือ tibial metaphysis, tibial diaphysis, femur metaphysis, femur diaphysis และ 4th lumbar vertebra ของหนูกลุ่ม OVX_{90} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (รูปที่ 13) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{90} แต่เมื่อทิ้งหนูไว้ภายหลังจากตัดรังไข่นานถึง 180 วัน (PM0) พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น 4 ส่วน คือ tibial diaphysis, femur metaphysis, femur diaphysis และ 4th lumbar vertebra ของหนูกลุ่ม OVX/PMO ลดต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} ซึ่งแสดงว่าการชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในกระดูกเนื้อแน่นจะใช้เวลานานกว่าในกระดูกเนื้อโปร่ง

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้ โดยสามารถป้องกันได้แม้แต่เมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดต่ำเพียง 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM10) เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าค่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่นที่เพิ่มขึ้นไม่สัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ ยกเว้นที่กระดูก 4th lumbar vertebra

รูปที่ 12. แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่

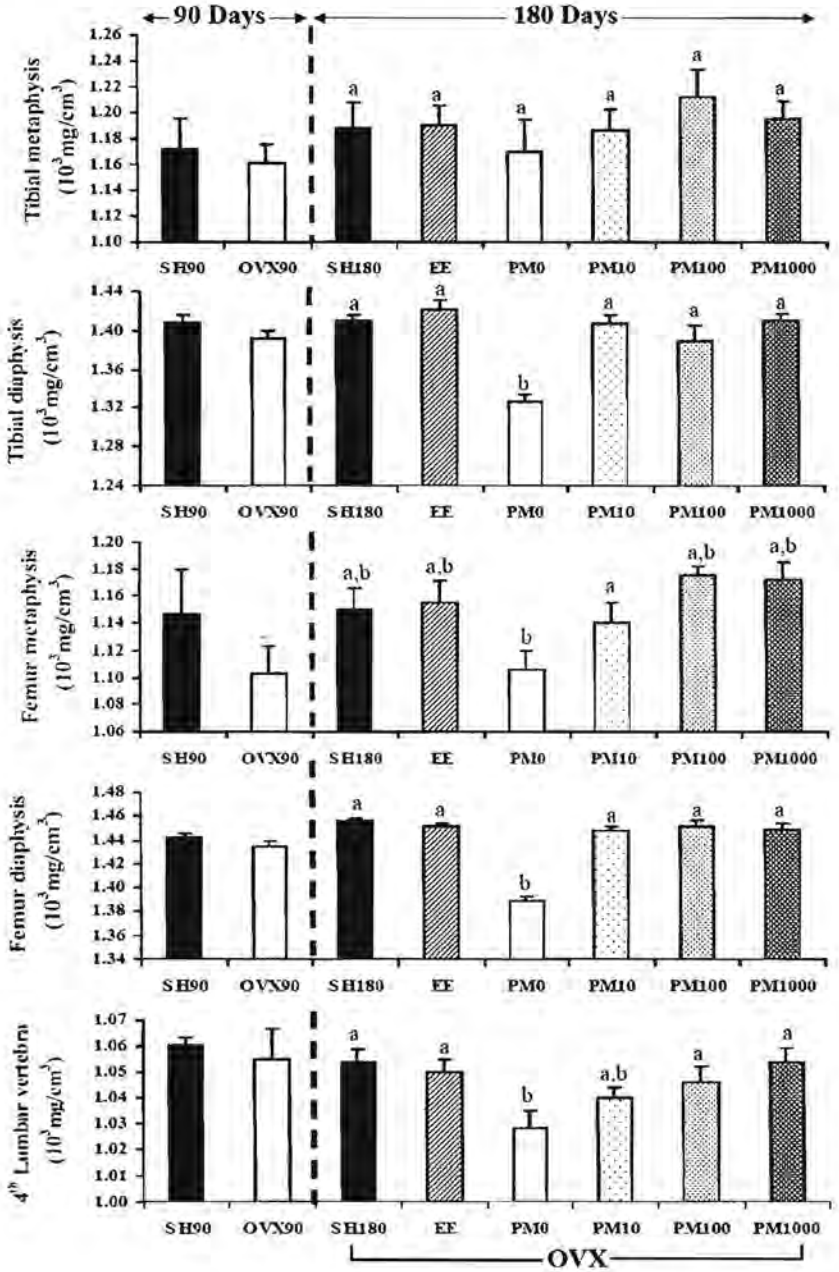
* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH

ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 13. แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่

ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



3. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดอัณฑะออก

3.1. น้ำหนักตัวหนู

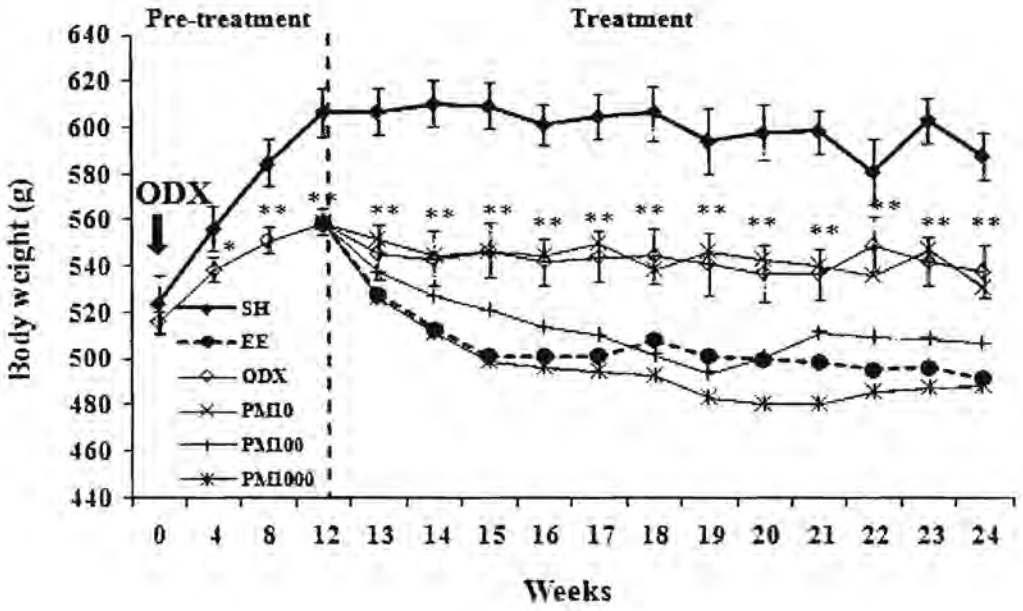
จากการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเริ่มการทดลองในวันที่ D_0 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$; รูปที่ 14) ในระหว่างการทดลอง หนูทั้งสองกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมียัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) ในสัปดาห์ที่ 4 หรือวันที่ 28 (D_{28}) ของการทดลอง แต่ในหนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะ (ODX) พบว่าน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นน้อยกว่าหนูกลุ่มที่ไม่ได้ตัดอัณฑะ (SH) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) เริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 หรือวันที่ 28 (D_{28}) ของการทดลอง โดยในวันที่ 90 (D_{90}) ค่าน้ำหนักตัวหนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะ มีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่มที่ไม่ได้ตัดอัณฑะประมาณ 1.09 เท่า (559.41 $\pm$ 6.05 กรัม และ 607.00 $\pm$ 10.55 กรัม ในหนูกลุ่ม ODX และ กลุ่ม SH ตามลำดับ)

เมื่อป้อนสารแขวนลอยกวาวเครือขาวให้แก่หนูกลุ่ม ODX ทางปากทุกวัน เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าน้ำหนักตัวหนูลดลงอย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ นั่นคือ น้ำหนักตัวหนูลดลงมากขึ้นเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น โดยน้ำหนักตัวของหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM 10) มีค่าไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะและได้รับน้ำกลั่นอย่างเดียว (ODX) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM 1000) มีน้ำหนักตัวลดลงต่ำสุด เทียบเท่ากับหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE) ตลอดระยะเวลานาน 90 วัน ของการให้สาร

แม้ว่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม SH มีค่าสูงขึ้นในช่วง 90 วันแรกของการทดลอง (จากหนูอายุ 6 เดือน จนกระทั่งมีอายุได้ 9 เดือน) แต่ภายหลังจากนั้นอีก 90 วัน น้ำหนักตัวหนูมีค่าคงที่ ($p>0.05$) จนกระทั่งวันที่ 180 ของการทดลอง หรือเมื่อหนูอายุได้ 12 เดือน

รูปที่ 14. แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ ODX เท่านั้น

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH



3.2. น้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์

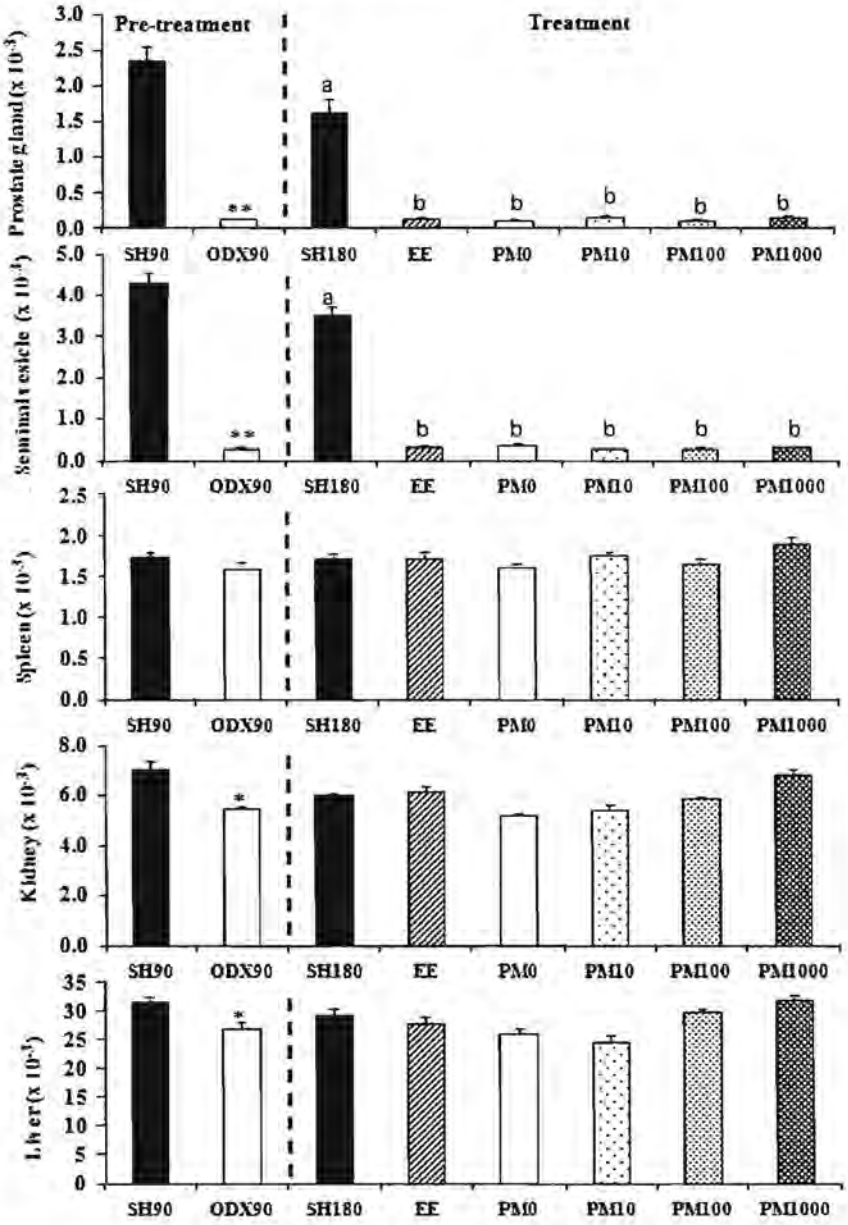
เนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละช่วงเวลา ดังนั้น น้ำหนักอวัยวะจึงคำนวณเป็นน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ เพื่อที่จะสามารถนำมาเปรียบกันได้ระหว่างกลุ่มต่าง ๆ พบว่า ภายหลังจากที่เลี้ยงหนูไว้เป็นเวลานาน 90 วัน (SH90) และ 180 วัน (SH180) หรือเมื่อหนูมีอายุได้ 9 และ 12 เดือน ตามลำดับ พบว่าน้ำหนักอัณฑะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อหนูมีอายุมากขึ้น แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$, รูปที่ 15)

รูปที่ 15. แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสัมพัทธ์ของอัณฑะในหนูกลุ่ม sham (SH) นาน 90 และ 180 วัน

ภายหลังจากตัดอัณฑะเป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ คือ ต่อมลูกหมาก และเซมินัล เวสซิเคิล ในหนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะ (ODX) มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$, รูปที่ 16) และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิสม คือ ม้าม, ตับ และไต ไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างหนูทั้งสองกลุ่ม ยกเว้นน้ำหนักไต ในหนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะมีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นเวลานาน 90 วัน (D_{180}) พบว่าน้ำหนักสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมาก และเซมินัล เวสซิเคิล ในหนูที่ตัดอัณฑะทุกกลุ่ม (EE, PM0, PM10, PM100 และ PM1000) มีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p <0.01$) ในขณะที่น้ำหนักสัมพัทธ์ของม้าม, ไต และตับ ไม่มีความแตกต่างกันในหนูทั้ง 6 กลุ่ม ($p>0.05$)

รูปที่ 16. แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมาก, seminal vesicle, ม้าม, ไต และตับในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดอัณฑะ

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

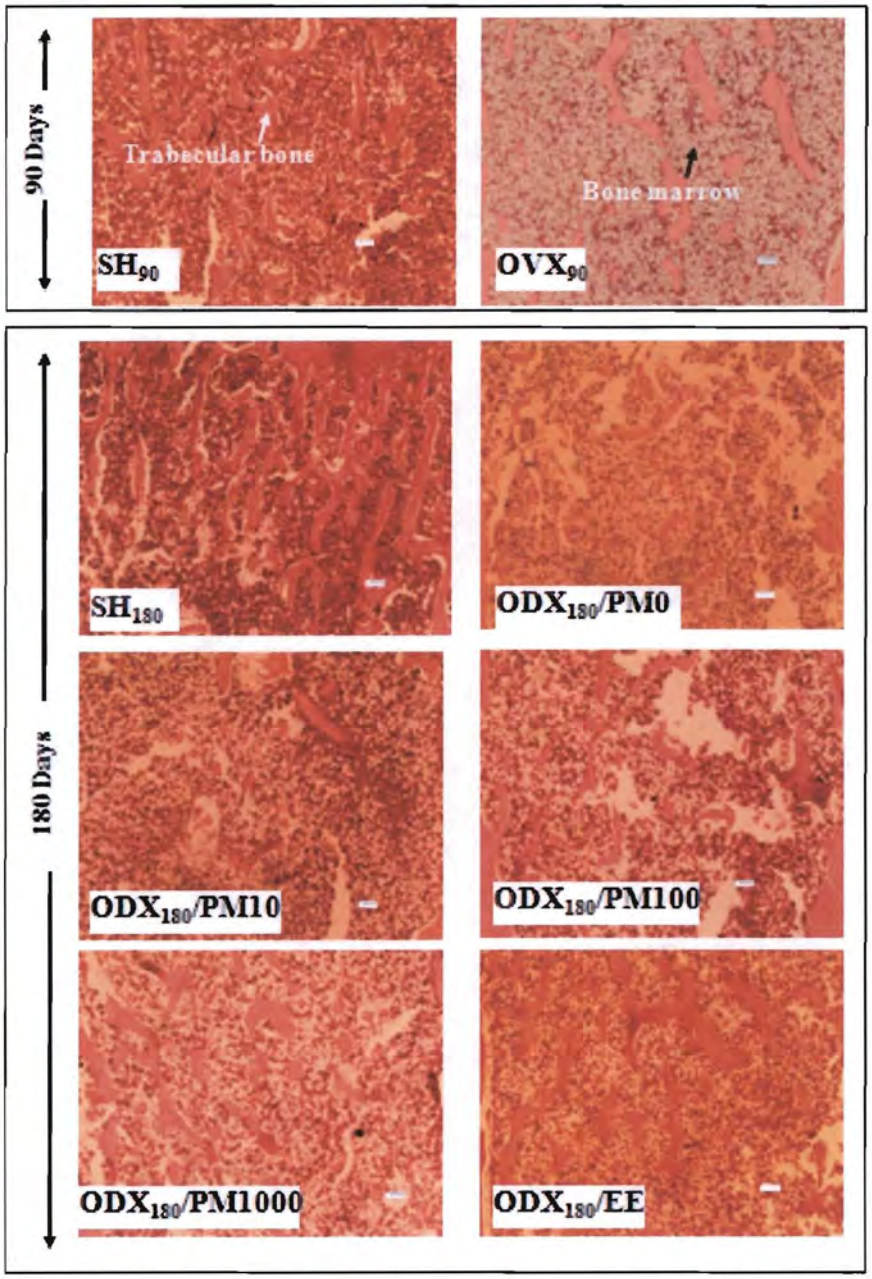


3.3. โครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

ภายหลังการตัดอัณฑะนาน 90 วัน (ODX_{90}) trabecular bone area ลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH_{90} ในขณะที่ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น (รูปที่ 17) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดอัณฑะและทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูแรทเพศผู้เกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง และเมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดอัณฑะไว้นานถึง 180 วัน (ODX_{180}/PM0) ยิ่งทำให้สภาวะกระดูกพรุนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสภาวะดังกล่าวสามารถฟื้นกลับคืนมาได้เมื่อหนูได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาว (PM) และฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE) โดยการฟื้นตัวของกระดูกจะขึ้นกับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ นั่นคือ trabecular bone area เพิ่มมากขึ้นเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น โดย trabecular bone area ในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM 1000) มีค่าใกล้เคียงกับหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE) แต่อย่างไรก็ตาม trabecular bone area ก็ยังต่ำกว่าในหนูกลุ่ม SH_{180}

ซึ่งในขณะนี้กำลังวิเคราะห์ค่า %trabecular bone area (%BA) และจะทำการเปรียบเทียบค่า %BA ระหว่างกลุ่ม SH และ ODX ภายหลังการตัดอัณฑะนาน 90 และ 180 วัน และเปรียบเทียบระหว่างการให้กวาวเครือขาวขนาดต่าง ๆ และเมื่อให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ ต่อไป

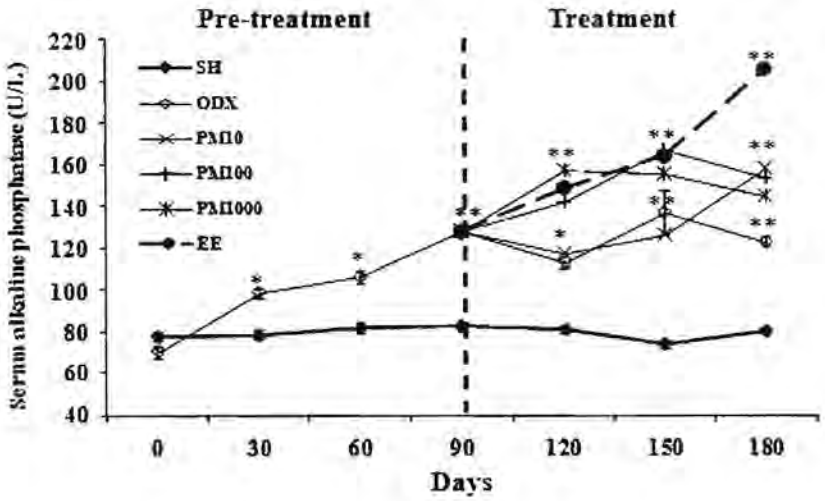
รูปที่ 17. แสดงโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูกในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดอัณฑะ



3.4. ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม

ภายหลังการตัดอัณฑะนาน 90 และ 180 วัน (กลุ่ม ODX) พบว่าระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มในหนูเพศผู้ มีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) ในช่วง 90 วันแรก เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH (รูปที่ 18) เช่นเดียวกับหนูเพศเมีย แต่ภายหลังจากนั้นจะมีค่าคงที่ โดยระดับ alkaline phosphatase ในระหว่างวันที่ 120 – 180 มีค่าแกว่งไกวใกล้เคียงกับของวันที่ 90 (D_{90}) (113.40 – 137.30 U/L สำหรับ D_{120} - D_{180} และ 128.52 ± 2.66 U/L สำหรับ D_{90}) และเมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวทำให้ระดับ alkaline phosphatase เพิ่มสูงขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ นั่นคือ ในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM10) นาน 90 วัน ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม ไม่แตกต่างจากกลุ่ม ODX ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM100 และ PM1000) มีค่าสูงกว่ากลุ่ม ODX อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และมีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (EE) แต่ในวันสุดท้ายของการทดลอง (D_{180}) ระดับ alkaline phosphatase ในหนูกลุ่ม EE มีค่าสูงกว่าหนูทุกกลุ่ม และระดับ alkaline phosphatase ในหนู ODX ทุกกลุ่ม ที่ได้รับกวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ ในระหว่างวันที่ 90 – 180 มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่ม SH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01)

รูปที่ 18. แสดงค่าเฉลี่ย alkaline phosphatase ในซีรั่ม ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ ODX เท่านั้น * และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH



3.5. ค่าความหนาแน่นกระดูก (Bone mineral density; BMD)

ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (Bone mineral density of trabecular bone)

ภายหลังจากตัดอัณฑะนาน 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ tibial metaphysis, femur metaphysis และ 4th lumbar vertebra มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH (รูปที่ 19) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดอัณฑะและทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูเพศผู้เกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง และเมื่อทิ้งหนูหลังจากตัดอัณฑะไว้นานถึง 180 วัน (PM0) พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน ลดต่ำลงกว่าเมื่อทิ้งไว้นาน 90 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ชนิดในหนูกลุ่ม SH_{180} มีค่าต่ำกว่ากลุ่ม SH_{90} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ และ 0.05) ซึ่งแสดงว่าเมื่อหนูมีอายุมากขึ้นจาก 9 เดือน เป็น 12 เดือน ทำให้ความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโปร่งลดลงด้วยเช่นกัน

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดอัณฑะและทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้อย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM1000) ความหนาแน่นกระดูกมีค่าสูงกว่าของหนูกลุ่ม ODX_{90} และใกล้เคียงกับกลุ่ม EE โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระดูกส่วน tibia metaphysis และ 4th lumbar vertebra ในหนูกลุ่ม PM1000 มีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากหนูกลุ่ม SH_{180}

ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral density of cortical bone)

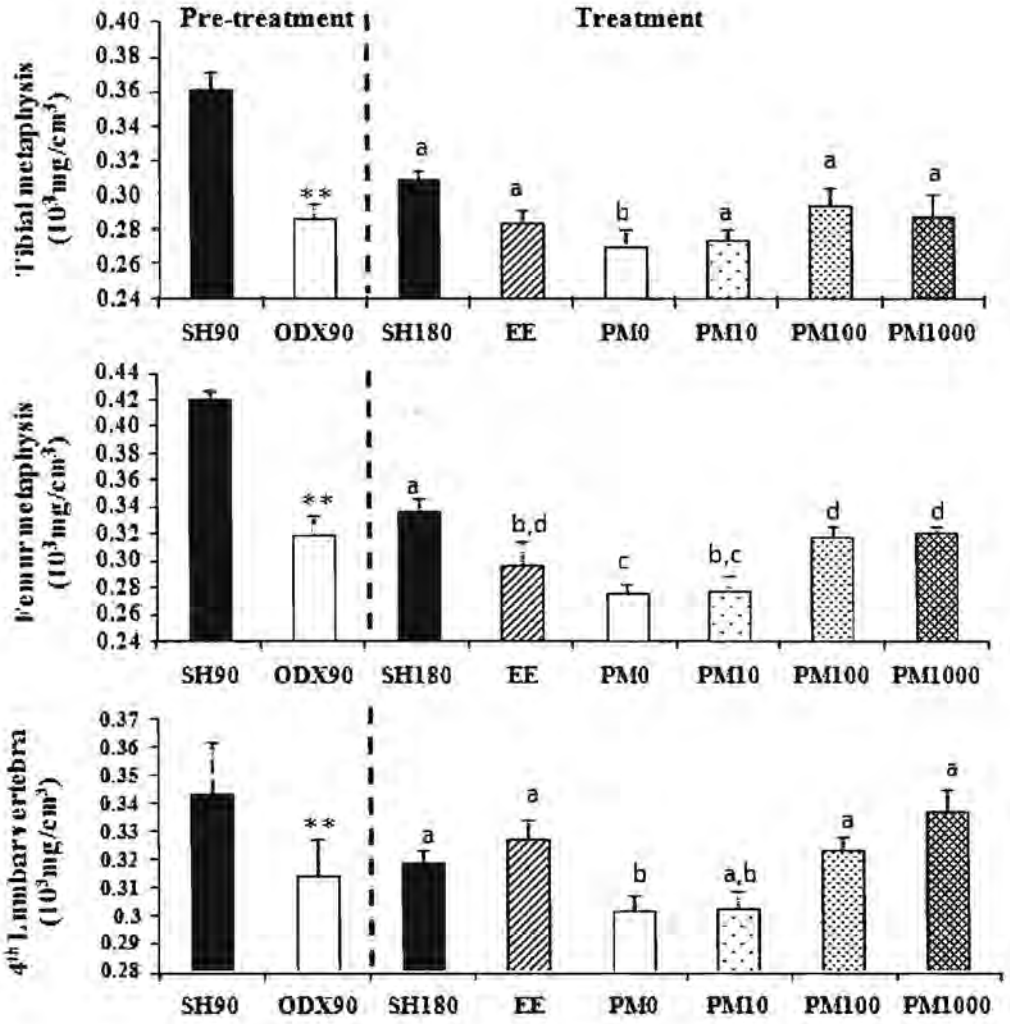
ภายหลังจากตัดอัณฑะนาน 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่นทั้ง 4 ส่วน คือ tibial metaphysis, tibial diaphysis, femur diaphysis และ 4th lumbar vertebra ของหนูกลุ่ม ODX_{90} มีค่าต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{90} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) ยกเว้นกระดูกส่วน femur metaphysis ที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{90} (รูปที่ 20) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าความหนาแน่นกระดูกส่วน femur metaphysis ของหนูแต่ละตัวในกลุ่ม ODX_{90} มีความแตกต่างกันมาก จึงทำให้ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสูง และเมื่อเลี้ยงหนูต่อไปอีก 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกส่วน tibial metaphysis และ femur diaphysis ของหนูกลุ่ม SH_{90} มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่หนูกลุ่มที่ตัดอัณฑะ 180 วัน (ODX/PM0) พบว่าความหนาแน่นกระดูกส่วน tibial metaphysic, femur metaphysis, femur diaphysis และ 4th lumbar vertebra ลดต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} ซึ่งแสดงว่าการชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในกระดูกเนื้อแน่นส่วน tibia diaphysis จะใช้เวลานานมากกว่า 180 วัน

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดอัณฑะและทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้ แต่ไม่สัมพันธ์กับขนาดที่ให้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระดูกส่วน femur metaphysis

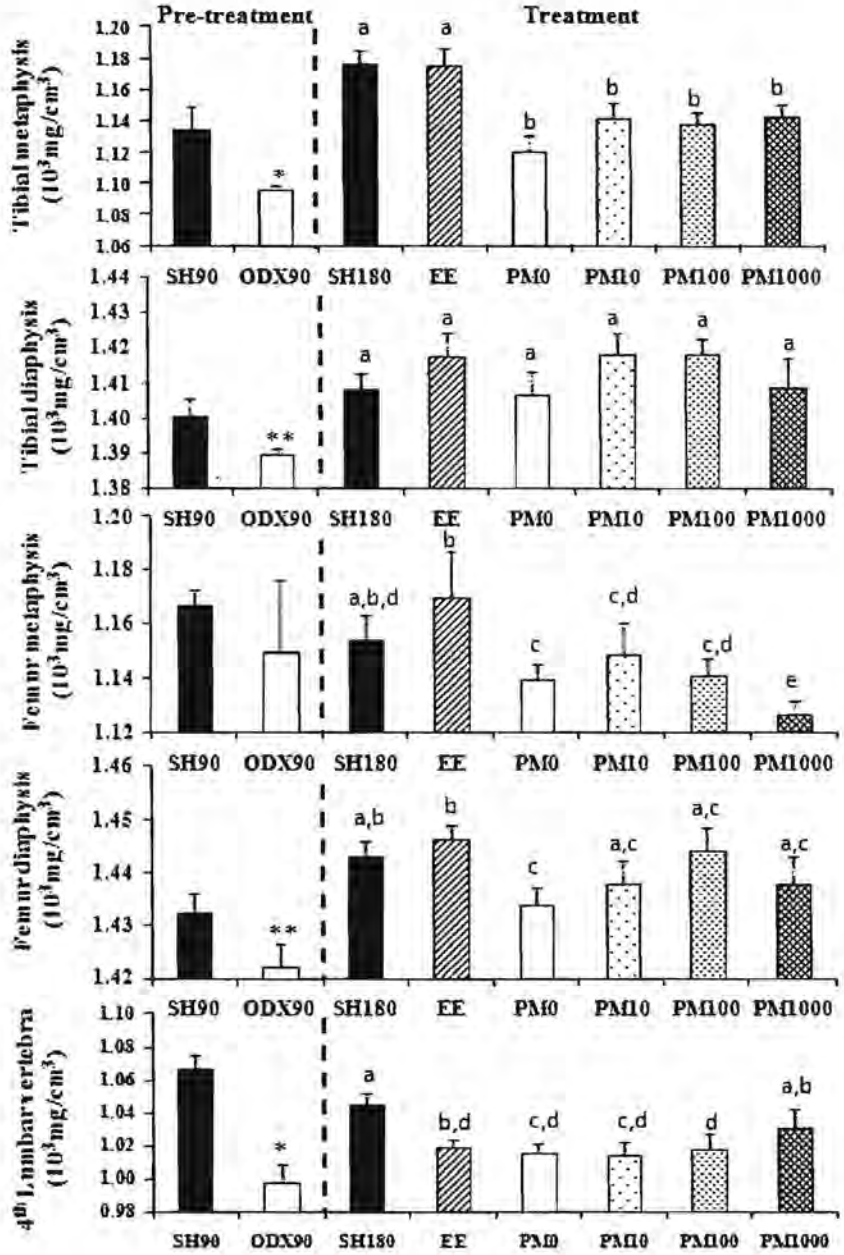
รูปที่ 19. แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดอัณฑะ

* และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH

ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 20. แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดอัณฑะ (ODX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดอัณฑะ ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



การอภิปรายผล

จากการทดลองที่มีมาในอดีตเกี่ยวกับฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนิก (estrogenic activity) ของกวาวเครือขาว พบว่ามีการทดสอบฤทธิ์เอสโตรเจนิกแล้วทั้งในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) การศึกษาในหลอดทดลองทำโดยใช้ MFC-7 proliferation assay และ Hela cell proliferation assay (Cherdshewasart et al., 2004; 2008a) ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลอง เป็นการตรวจวัดการเจริญของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (vaginal cytology assay) และมดลูก (uterotripic assay) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ (Cherdshewasart et al., 2007; Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Urasopon et al., 2008b; Cherdshewasart et al., 2008b) การลดลงของระดับ luteinizing hormone และ follicle stimulating hormone ในซีรั่มของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ (Malaivijitnon et al. 2004) และในลิงแสมเพศเมียโตเต็มวัยและลิงแสมวัยหมดประจำเดือน (Trisomboon et al., 2005; 2006) และเมื่อไม่นานมานี้ทางทีมวิจัยของเราก็ได้พบว่าฤทธิ์เอสโตรเจนิกของกวาวเครือขาวสามารถตรวจวัดได้จากการลดลงของน้ำหนักตัวของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ ทั้งนี้เนื่องจากการตัดรังไข่จะทำให้น้ำหนักตัวในหนูเพศเมียสูงขึ้น (Urasopon et al., 2008a; 2008b; Malaivijitnond et al., 2010) ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในอดีต นั่นคือ การตัดรังไข่ทำให้น้ำหนักตัวหนูเพิ่มขึ้น และการให้กวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลงตามขนาดที่ให้ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับในหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (17α-ethinylestradiol ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน; EE) ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัวในหนูเพศเมียเมื่อได้รับกวาวเครือขาว สัมพันธ์ (แบบแปรผกผัน) กับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูก (Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Shirke et al., 2009) ในหนูเพศผู้ การตัดอัณฑะให้ผลตรงกันข้ามกับการตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย นั่นคือ การตัดอัณฑะทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลง ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้ (Kang et al., 2005; Nishino et al., 2006; Owens et al., 2006; Malaivijitnond et al., 2010b) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อให้กวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ พบว่าไปลดน้ำหนักตัวในหนูเพศผู้ เช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในหนูเพศเมีย แต่กวาวเครือขาวที่ให้ไม่มีผลต่อน้ำหนักของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ คือ ต่อมลูกหมาก และเซมินัล เวสิเคิล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Urasopon et al. (2007) เมื่อติดตามดูผลของการตัดรังไข่และการตัดอัณฑะต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่เกี่ยวของกับกระบวนการเมตาบอลิสม คือ ตับ, ไต และม้าม พบว่ามีผลน้อยมาก และเมื่อให้กวาวเครือขาวหรือและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ ก็ไม่มีผลกระทบกับอวัยวะเหล่านี้

สารไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวออกฤทธิ์ได้โดยเข้าจับกับ estrogen receptors (ERs) ทั้งสองชนิด คือ ERα และ ERβ แต่จะจับกับ ERβ และกระตุ้นการแสดงออกของยีน ได้ดีกว่าการจับกับ ERα (Kuiper et al., 1998; Onoe et al., 1997) สามารถพบ ERα ได้ในเนื้อเยื่อไม่กี่ชนิด ส่วนใหญ่จะพบที่ระบบสืบพันธุ์ ในขณะที่ ERβ พบได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งที่กระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กระดูก lumbar vertebra และ trabecular bone (Onoe et al., 1997; Gustafsson, 1999) จากการค้นพบ ERs ทั้ง 2 ชนิด ในร่างกายคนเรา และแต่ละชนิดมี

การแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์เอสโตรเจนิกและออกฤทธิ์ได้ในเนื้อเยื่อที่จำเพาะ ที่เรียกว่า selective estrogen receptor modulators (SERMs) โดยคาดหวังว่า SERMs จะออกฤทธิ์ต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการและไม่มีผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่ออื่น ซึ่งจากรายงานในอดีตพบว่าสารไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวก็มีฤทธิ์เป็น SERMs เช่นกัน โดยพบว่าไฟโตเอสโตรเจนที่สามารถแสดงฤทธิ์ป้องกันภาวะกระดูกพรุน ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของมดลูก เช่น เมื่อให้ genistein ในขนาด 0.5 – 0.7 มิลลิกรัม/วัน แก่หนูไมซ์ที่ตัดรังไข่ สามารถป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูกเนื้อโปร่งได้โดยไม่มีผลต่อการเจริญของมดลูก (Fanti et al., 1998; Ishimi et al., 2000) หนูแรทที่ตัดรังไข่และกินอาหารถั่วเหลืองผสมกับสารไอโซฟลาโวน (isoflavone content) คือ genistin, genistein, daidzin และ daidzein ในขนาด 1,462.0, 25.1, 590.0 และ 11.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โปรตีนถั่วเหลือง พบว่ามีผลเพิ่มความหนาแน่นกระดูกของ femoral bone แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักมดลูก (Arjmandi et al., 1998) และเมื่อให้ *Pueraria lobata* ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกันกับกวาวเครือขาวและมีสารไฟโตเอสโตรเจนเช่นเดียวกัน ให้แก่หนูไมซ์ที่ตัดรังไข่พบว่าสามารถไปบรรเทาภาวะกระดูกพรุนได้โดยไม่มีผลต่อการเจริญของมดลูก (Wang et al., 2003)

โรคกระดูกพรุนจัดว่าเป็นภัยเงียบ ที่ค่อย ๆ เกิด ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงมักไม่รู้ตัวเมื่อโรคเริ่มเกิดและไม่หาวิธีการป้องกัน ผู้ป่วยจะตระหนักกับโรคนี้ก็ต่อเมื่อมีการแตกหักของกระดูก ซึ่งเมื่อถึงเวลานั้นโรคกระดูกพรุนก็ร้ายแรงเกินเยียวยาแล้ว และผู้ป่วยส่วนใหญ่จะขวนขวายหาทางรักษาโรค เมื่อไม่นานมานี้ทีมวิจัยของเราได้ค้นพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมปงเพศออกได้ ดังนั้นจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุน (Urasopon et al., 2007; 2008a)

ปริมาณของกวาวเครือขาวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน เป็นปริมาณที่มีรายงานว่าสามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก ในหนูโตเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ที่ถูกตัดต่อมบ่งเพศออก (Urasopon et al., 2007; 2008a) ส่วนระยะเวลาในการให้สารในการศึกษาครั้งนี้ นาน 90 วัน เป็นการวางแผนตามการทดลองของ Devareddy และคณะ (2006) ซึ่งเป็นระยะเวลาที่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูก ภายหลังจากการให้สารไอโซฟลาโวน ในหนูแรทเพศเมีย ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนจากการตัดรังไข่ได้

การใช้หนูแรทเพศเมียตัดรังไข่และหนูแรทเพศผู้ตัดอัณฑะ เพื่อเป็นตัวแทนสัตว์ทดลองในการศึกษาโรคกระดูกพรุนในคนที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเพศเป็นวิธีการที่นิยมกัน (Khalil et al., 2005; Soung et al., 2006; Ren et al., 2007) โดยกระดูกในหนูแรทจะเจริญเต็มที่ (peak bone mass) เมื่อหนูอายุได้ 6 – 9 เดือน และมวลกระดูกจะเริ่มลดลงเมื่อหนูอายุได้ 12 เดือน (Ke et al., 1996) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดลองโดยใช้หนูอายุ 6 เดือน เพื่อตัดปัจจัยรบกวนจากการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกจากอายุของหนู นั่นคือ การเจริญของกระดูกในหนูวัยเด็ก หรือการสูญเสียมวลกระดูกในหนูแก่ อย่างไรก็ตามการตอบสนองของกระดูกในหนูจะต่างกัน

ในกระดูกแต่ละชนิด และในกระดูกแต่ละส่วน โดยกระดูกเนื้อโปร่งจะมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่ากระดูกเนื้อแน่น (Thompson et al., 1995; Bloomfield et al., 2002) ดังจะเห็นได้จากหนูเพศเมีย ที่พบการเปลี่ยนแปลง (ลดลง) ของกระดูกเนื้อโปร่งเมื่อตัดรังไข่นาน 90 วัน และการเปลี่ยนแปลง (เพิ่มขึ้น) เมื่อให้กวาวเครือขาว ในขณะที่กระดูกเนื้อแน่นมีการเปลี่ยนแปลง (ลดลง) ที่น้อยมาก ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน โดยจะเห็นการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่นได้ก็ต่อเมื่อตัดรังไข่และพักหนูไว้นานถึง 180 วัน นอกจากนี้ยังเห็นผลการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่นน้อยมากภายหลังจากที่ให้กวาวเครือขาว ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก ในกระดูกเนื้อโปร่งบริเวณ proximal tibial metaphysis (Zang et al., 2007; Filipovic et al., 2009)

เมื่อตัดรังไข่หนู พบว่า %trabecular bone area (%BA) ของกระดูก proximal tibial metaphysis ลดลง ในขณะที่ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ว่าการตัดรังไข่ในหนูแรทเพศเมียสามารถชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ (Fanti et al., 1998; Arjmandi et al., 1998; Zang et al., 2007; Filipovic et al, 2009; Picherit et al., 2001) และจากการทดลองครั้งนี้พบว่ากวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์สามารถบรรเทาภาวะกระดูกพรุนได้ กวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์นอกจากจะมีฤทธิ์ในการป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูก (anti-osteoporosis effect) แล้ว ยังสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูก (anabolic effect) ได้ด้วย โดยเฉพาะอย่างเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Picherit et al. (2001) ที่ทำการทดลองในหนูแรทเพศเมียอายุ 7 เดือน และชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่และทิ้งหนูไว้นาน 80 วัน (OVX_{80}) โดยพบว่าภายหลังจากที่ให้สารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง (soybean isoflavone) ในขนาด 20 – 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน นาน 84 วัน พบว่าค่าความหนาแน่นกระดูกและ %BA ของหนูในวันสุดท้ายของการให้สารที่ D_{164} มีแนวโน้มสูงกว่าของหนู OVX_{80} สำหรับหนูเพศผู้ พบว่าการตัดอัณฑะสามารถชักนำให้ bone area ลดลง และ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับหนูเพศเมีย และสอดคล้องกับผลการทดลองของ Khalil et al. (2005) และ Soung et al. (2006) และเมื่อให้กวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ สามารถชักนำให้ bone area เพิ่มขึ้นได้เช่นเดียวกับหนูเพศเมีย (Urasopon et al., 2007; 2008 a) ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่า ERβ สามารถพบได้ในกระดูกทั้งของหนูเพศเมียและเพศผู้ และจากผลที่ได้อาจกล่าวได้ว่าระดับ ERβ ในเนื้อเยื่อกระดูกไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูเพศเมียและหนูเพศผู้

สำหรับการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นกระดูกในหนูเพศเมียและเพศผู้ ภายหลังการตัดต่อมบ่งเพศ (รังไข่ในหนูเพศเมียและอัณฑะในหนูเพศผู้) ออก และภายหลังจากที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาดต่าง ๆ และฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ คล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของค่า %BA นั่นคือภายหลังการตัดรังไข่ในหนูเพศเมียและการตัดอัณฑะในหนูเพศผู้ และพักหนูไว้นาน 90 วัน ทำให้ค่าความหนาแน่นกระดูเนื้อโปร่งและความหนาแน่นกระดูกเนื้อแน่นลดลงอย่างสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Urasopon et al., 2007; 2008a) และเมื่อได้รับกวาวเครือ

ขาวค่าความหนาแน่นกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ โดยการเปลี่ยนแปลงจะขึ้นอยู่กับชนิดและตำแหน่งของกระดูก ในกระดูกเนื้อโปร่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่าในกระดูกเนื้อแน่น กระดูกแกนกลาง (axial bone) 4th lumbar vertebra มีการเพิ่มขึ้นของเนื้อกระดูกมากกว่ากระดูกส่วนรยางค์ (long bone) tibia และ femur แต่การตอบสนองไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูทั้งสองเพศ (Khalil et al., 2005; Soung et al., 2006; Urasopon et al., 2007; 2008a) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นกระดูกภายหลังจากที่หนูเพศเมียและเพศผู้ได้รับกวาวเครือขาว โดยรวมจะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวในขนาดสูงสุด (1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน) ให้ผลใกล้เคียงกับเมื่อให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน อีกทั้งยังมีค่าสูงกว่าความหนาแน่นกระดูกของกลุ่มที่ตัดต่อมบ่งเพศนาน 90 วัน (OVX_{90} และ ODX_{90}) และมีค่าใกล้เคียง ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดต่อมบ่งเพศออกที่เวลานาน 180 วัน (SH_{180}) จากผลดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะสามารถป้องกันการสลาย (resorption) กระดูกแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้าง (formation) กระดูกได้อีกด้วย ซึ่งกลไกการทำงานของกวาวเครือขาวเพื่อให้ได้ผลดังกล่าวยังไม่มีรายงาน ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษากลไกดังกล่าวต่อไปในปีที่ 2 ก่อนที่จะพัฒนากวาวเครือขาวไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุน

มีการใช้ alkaline phosphatase เป็นตัวตรวจติดตาม (marker) การเปลี่ยนแปลงของกระดูกในทางคลินิกมาเป็นเวลานาน โดย alkaline phosphatase ที่อยู่ในกระแสเลือดมีหลายรูปแบบ (several dimeric isoform) และหลั่งออกมาจากอวัยวะหลายชนิดด้วยกัน เช่น ตับ, กระดูก, ลำไส้, ม้าม, ไต และรก พบว่าในผู้ใหญ่ที่ตับอยู่ในภาวะปกติ ประมาณ 50% ของ alkaline phosphatase หลั่งออกมาจากตับและอีก 50% หลั่งออกมาจากกระดูก ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มในการทดลองครั้งนี้เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของการหลั่ง alkaline phosphatase จากกระดูก เพราะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตับ ทั้งในหนูเพศเมียและหนูเพศผู้ ภายหลังจากให้กวาวเครือขาวนาน 90 วัน

ในหนูเพศเมีย จะเห็นได้ว่าการตัดรังไข่มีผลทำให้ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Shirke et al., 2009; Li and Yu, 2003; Lee et al., 2004) ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้เกี่ยวกับการสร้างกระดูก (bone formation), osteoclast cell proliferation, differentiation and synthesis of collagen ได้ (Choi et al., 2001) ในขณะที่ดัชนีบ่งชี้เกี่ยวกับการสลายกระดูก (bone resorption) นิยมใช้การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ hydroxyproline ในปัสสาวะ และ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) ในซีรั่ม ซึ่งในสภาวะที่หนูแรทถูกตัดรังไข่ค่า bone formation และ bone resortipn marker จะมีค่าสูงขึ้น (Arjmandi et al., 1998; Arjmandi, 2001) จากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์และสารไอโซฟลาโวนต่อระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่ม พบว่าผลไม่สอดคล้องกัน นั่นคือ มีผลทั้งลดและเพิ่มระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่ม (Shirke et al., 2009; Li and Yu, 2003; Lee et al., 2004) แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ผลของกวาวเครือขาวต่อระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มจะไม่เด่นชัด แต่อย่างน้อยก็สามารถเห็นได้ว่ากวาวครือขาวในขนาด 100 และ 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน

(PM100 และ PM1000) ในวันที่ 120 และ 150 (D_{120} และ D_{150}) มีค่าสูงกว่ากลุ่ม PM0 และ SH ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Arjmandi et al. (1998) ที่ว่าเมื่อให้อาหารที่มีส่วนผสมของถั่วเหลืองแก่หนูแรททำให้ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้น genistein, coumestrol และ daidzein สามารถกระตุ้นการหลั่ง alkaline phosphatase จากเซลล์ MC3T3-E1 (osteoblast-like cell line) (Kanno et al., 2004) มีรายงานว่าสารไอโซฟลาโวนสามารถยับยั้งการสลายกระดูกของเซลล์ osteoclast (osteoclast resorption) และกระตุ้นการสร้างกระดูกของเซลล์ osteoblast (osteoblastic bone formation) (Li and Yu, 2003; Sugimoto and Yamaguchi, 2000; Brynin, 2002) และเมื่อป้อนไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองให้แก่หนูแรทที่ตัดรังไข่ทุกวัน นาน 3 เดือน สามารถลดระดับ deoxypyridinoline ในปัสสาวะ (bone resorption marker) (Arjmandi, 2001) และในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนจากการตัดรังไข่สามารถชักนำการสลายกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กระดูกเนื้อโปร่งได้ พบว่าการแสดงออกของ ERβ mRNA ในกระดูกเนื้อโปร่งส่วน distal femoral metaphysis และ lumbar vertebra มีมากกว่าในกระดูกเนื้อแน่น ส่วน femoral metaphysis (Onoe et al., 1997) ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองนี้ ที่พบการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อโปร่งภายหลังจากที่ให้กวาวเครือขาวได้ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่น จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มในวันสุดท้ายของการทดลอง (D_{180}) ในหนูทุกกลุ่ม (ยกเว้นกลุ่ม EE และ PM100) กลับคืนสู่ระดับของ D_0 ซึ่งแสดงว่า bone turnover กลับคืนสู่สภาวะปกติ

ในหนูเพศผู้ การตัดอัณฑะมีผลทำให้ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้น เช่นเดียวกับการตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Soung et al., 2006) ที่ว่าการตัดอัณฑะทำให้การแสดงออกของยีน alkaline phosphatase เพิ่มสูงขึ้นในหนูแรทแก่เพศผู้ แต่ภายหลังจากที่ให้กวาวเครือขาวในหนูเพศผู้พบว่าผลที่ได้ต่างไปจากหนูเพศเมีย นั่นคือ ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้น้ำกลั่น อย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ โดยกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน และกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น ยกเว้นในวันสุดท้ายของการให้สาร (D_{180}) Soung et al. (2006) รายงานว่าการแสดงออกของยีน ALP (alkaline phosphatase) ที่เพิ่มขึ้นภายหลังให้สารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง ในหนูแรทแก่เพศผู้ เพราะสารไอโซฟลาโวนไป up-regulate การแสดงออกของยีน ALP ซึ่งจะไปกระตุ้นให้ bone turnover เพิ่มสูงขึ้น และทำให้มีการสร้างเนื้อกระดูกมากกว่าการสลายกระดูก และผลสุดท้ายจึงทำให้มวลกระดูกและความหนาแน่นกระดูกสูงขึ้น

จากการทดลองในครั้งนี้เราเพียงแต่วัดการปลี่ยนแปลงของ %BA, ความหนาแน่นกระดูก และ ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม เท่านั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่ากวาวเครือขาวมีกลไกการออกฤทธิ์เช่นไรต่อเซลล์กระดูก ดังนั้นจึงควรที่จะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตร

เจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ในเซลล์กระดูกของหนูแรท ในหลอดทดลอง แต่อย่างไรก็ตาม จากการทดลองในครั้งนี้ เราสามารถสรุปได้ว่าการกินกวาวเครือขาวสามารถป้องกันการสลายกระดูก (anti-osteoporosis effect) และรักษาภาวะกระดูกพรุน (anabolic effect) ในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ได้ และผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างหนูทั้งสองเพศ ซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีขายในท้องตลาดมีอยู่เพียงตัวเดียว คือ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ก็มีผลข้างเคียง คือ ทำให้คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดหัว, เป็นตะคริวที่ขา และเวียนศีรษะ และมีราคาแพงมาก ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ใช้ฮอร์โมนพาราไทรอยด์มักเป็นผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะกระดูกพรุนขั้นรุนแรงที่ให้ยาอื่นไม่ได้แล้ว หรือเมื่อยาอื่นแล้วใช้ไม่ได้ผล (Ng, 2009) จากผลการทดลองในครั้งนี้จึงถือได้ว่ากวาวเครือขาวสามารถที่จะใช้เป็นตัวเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะกระดูกพรุนได้ นอกจากนี้กวาวเครือขาวยังมีข้อดีเหนือการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ตรงที่กวาวเครือขาวยังสามารถไปลดการเกิดและการเจริญของมะเร็งเต้านมได้อีกด้วย (Cherdshewasart et al., 2007b)

ข้อสรุป

1. การตัดรังไข่ในหนูเพศเมียทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่การตัดอัณฑะในหนูเพศผู้ทำให้น้ำหนักตัวลดลง
2. การให้กวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ลดลง เช่นเดียวกับในหนูเพศผู้ที่ตัดอัณฑะ อย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือขาวที่ให้ และผลที่ได้คล้ายกับการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ (17α-ethinylestradiol, EE)
3. การตัดรังไข่ทำให้น้ำหนักมดลูกลดลงในหนูเพศเมีย แต่การให้กวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มสูงขึ้น โดยขึ้นกับขนาดที่ให้ และผลที่ได้คล้ายกับการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์
4. การตัดอัณฑะทำให้น้ำหนักต่อมลูกหมากและเซมินัล เวซิเคิลลดลง แต่การให้กวาวเครือขาวไม่มีผลต่อน้ำหนักต่อมลูกหมากและเซมินัล เวซิเคิล เช่นเดียวกับการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์
5. ในหนูอายุ 6 เดือน การตัดรังไข่ในหนูเพศเมียและการตัดอัณฑะในหนูเพศผู้ และพักไว้นาน 3 เดือน สามารถชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ ทั้งในกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น ทั้งในส่วน diaphysis และ metaphysis และทั้งในกระดูกแกนกลาง (4^{th} lumbar vertebra) และกระดูกรยางค์ (tibia and femur)
6. การให้กวาวเครือขาวนาน 90 วัน ในหนูที่ถูกชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก ทำให้เนื้อกระดูก (%trabecular bone area) ความหนาแน่นกระดูก และมวลกระดูกเพิ่มขึ้น อย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือขาวที่ให้ โดยกวาวเครือขาวในขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน มีผลใกล้เคียงกับการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน อีกทั้งยังมีค่าสูงกว่าของกลุ่มที่ตัดต่อมบ่งเพศนาน 90 วัน (OVX_{90} และ ODX_{90}) และมีค่าใกล้เคียง ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดต่อมบ่งเพศออกที่เวลานาน 180 วัน (SH_{180})
7. การตัดต่อมบ่งเพศออก การให้กวาวเครือขาว และการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ alkaline phosphatase ในซีรั่มให้สูงขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าปัจจัยดังกล่าวไปมีผลทำให้ bone turnover rate เพิ่มสูงขึ้น
8. จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะมีฤทธิ์ป้องกันการสลายกระดูก (antiresorptive effect) แล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic effect) ได้ โดยไม่มีความแตกต่างกันของผลที่ได้ระหว่างหนูทั้งสองเพศ จึงควรที่จะพัฒนากวาวเครือขาวต่อไปเพื่อใช้เป็นยาในการรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีและบุรุษสูงวัย

ข้อเสนอแนะ

จากผลที่ได้ในปีที่ 1 ที่ว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกันการสลายกระดูก (antiresorptive effect) และสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic effect) ได้ จึงควรที่พัฒนาต่อไปเป็นยาในการรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีและบุรุษสูงวัย แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ผลที่สมบูรณ์ จึงควรที่จะศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวที่ระดับเซลล์เสียก่อน ดังนั้นในปีที่ 2 (ตุลาคม 2554 – กันยายน 2555) จึงวางแผนที่จะทำงานวิจัยต่อจากปีที่ 1 ดังนี้

1. **ตรวจวัดค่า** bone remodeling marker **คือ ระดับของ** tartrate – resistant acid phosphatase **ระดับฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับฮอร์โมนแคลซิโตนิน และ** bone mineral content (BMC) **ในหนูแรทเพศเมีย และเพศผู้**
2. **หาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์** rat osteosacoma cell line (UMR 106) และ primary osteoblast จากกระดูกหน้าแข้ง (tibia) ของหนูแรทโตเต็มวัยเพศเมีย เพื่อการทดลองในปีที่ 2 ต่อไป
3. **ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ของเซลล์กระดูกหนูแรท ในหลอดทดลอง**
4. **ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาว ผ่านตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนของ** osteoblast

เอกสารอ้างอิง

Alatalo S, Penq Z, Janckila A, aija H, Vihko P, Halleen J. 2003. A novel immunoassay for the eterination of tartrate resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Mine Res.* 18: 134 – 139.

Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. 1998. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. *Am J Clin Nutr.* 68 (suppl):1364s-8s.

Arjmandi BH. 2001.The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *J Am Coll Nutr.* 20:398S-402S.

Bland R. 2000. Steroid hormone receptors expression and action in bone. *Biochem Soc Med Res Soc.* 98: 217 – 204.

Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD. 2007. Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone* 31:149-57.

Brynin R. 2002. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. *Altern Med Rev.* 7:317-27.

Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2005. Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol* 79: 636-646.

Canavan T P, Doshi NR. 1999. Endometrial cancer. *American Family Physician.* 59; 3069 – 3077.

Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higuchi Y, kudo M, Chaichantipyuth C. 2000. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Medica.* 66: 572 – 575.

Chen X, Anderson JB. 2002. Isoflavones and bone: Animal and human evidence of efficacy. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interaction*, 2: 352 – 359.

Cherdshewasart W. 2003. Toxicity tests of a phytoestrogen-rich herb; Pueraria mirifica. *J Sci Res Chula Univ.* 28: 1-12.

Cherdshewasart W, Cheewasopit W, Picha P. 2004. The differential anti-proliferation effect of white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*) and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of MCF-7 cells. *J Ethnopharmaco.* 93: 255 – 260.

Cherdshewasart W, Cheewasopit W, Picha P. 2004. Anti-protiferation effects of the white (*Pueraria mirifica*), red (*Butea superba*), and black (*Mucuna collettii*) Kwao Krua plants on the growth of HeLa cells. *J Sci Res Chul Univ.* 29:27-32.

Cherdchewasart W, Sriwatcharakul S. 2007. Major isoflavonoid content of the 1-year cultivated phytoestrogen –rich herb, *Pueraria mirifica*. *Biosci Biotecnol Biochem*. 7: 2527- 2533.

Cherdshewasart W, Kitisama Y, Malaivijitnond S. 2007a. Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. *J Reprod Dev*. 53: 385-393.

Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. 2007b. Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERalpha and ERbeta. *Maturitas*. 58:174-81.

Cherdshewasart W, Sutijit W. 2008. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen - rich Pueraria mirifica and Pueraria lobata tubers. *Phytomedicine*. 15: 38 – 43.

Cherdshewasart W, Traisup V, Picha P. 2008a Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. *J Reprod Dev* . 54:63-7.

Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S, Malaivijitnond S. 2008b. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas*. 61:350-7.

Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ. 2001. Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry*. 56:733-9.

Compson JE. 1990. Osteoporosis. *Clin Endocrinol*. 33: 653 – 682.

Compson JE. 2001. Sex steroid and bone. *Physiol Rev*. 81: 419 – 447.

Cui L, Wu T, Liu Y, Deng Y, Ai C and Chen H. 2004. Tanshinone prevents cancellous bone loss induced by ovariectomy in rats. *Acta Pharmacologica Sinica*. 25: 678 – 684.

Deal C. 2009. Potential new drug targets for osteoporosis. *Rheumatology*. 5: 21–27.

Delmas P. 2000. Markers of bone turnover for monitoring treatment of osteoporosis with antiresorptive drugs. *Osteoporosis International*. 6: 66 – 76.

Devareddy L, Khalil DA, Smith B J, Lucas EA, Soung DY, Marlow DD et al. 2006. Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone*. 38: 686 – 693.

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. 2000. Androgen deficiency indduce high turnover osteopenia in aged male rat: A sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res*. 15: 1085 – 98.

Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, et al. 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Inst*. 8:274-81.

Filipović B, Sosić-Jurjević B, Ajdzanović V, Brkić D, Manojlović-Stojanoski M, Milosević V, et al. 2009.Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporos Int.* Doi 10.1007/s00198-009-1092-x.

Fontanges E, Fontana A, Delma P. 2004. Osteoporosis and breast cancer. *Joint Bone Spine.* 71: 102–110.

Gao H Y, Yamaguchi M. 1999. Anabolic effect of daidzein on cortical bone tissue culture: Comparison with genistein effect. *Mol Cel Biochem.* 194: 93-98.

Gustafsson JA. 1999. Review: estrogen recptor-β a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol.* 163:379-83.

Hill PA and Orth M. 1998. Bone remodeling. *Journal of Orthodontics.* 25: 101 – 107.

Huges DE and Boyce BF. 1997. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Patho.* 50: 132 – 137.

Ingham JL, Tahara S and Pope GS. 2002. Chemical Components and Pharmacology of rejuvenating plant *Pueraria mirifica*. In: *Pueraria*: The genus *Pueraria*. Keung W. M. first edition. Newyork. Taylor and Francis. 290.

Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, et al. 2000. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:697-701.

Jimi E, Ikebe T, Takahashi N, Herata M, Suda T, Koga T. 1996. Inter leukin 1 alpha activates all NF - kappa B - like factor in osteoclast - like cells. *J Biol Chem.* 271: 4605 – 4608.

Kang HG, Jeong SH, Cho JH, Kim DG, Park JM, Cho MH. 2005. Evaluation of estrogenic and androgenic activity of butylated hydroxyanisole in immature female and castrated rats. *Toxicology.* 213: 147-156.

Kanis JA, Melton LJ, Christian JC, Khaltaeu N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Osteoporosis International.* 9: 1137 – 1147.

Kanno S, Hirano S, Kayama F. 2004. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology.* 196:137-45.

Ke HZ, Qi H, Crawfond DT, Pirie CM, Simmons HA, Thompson DD. 1996. Longitudinal and cross-sectional characterization of long-term skeletal effects of aging and orchidectomy in the male rat. *Bone.* 19 Suppl:129S-69S.

Khali DA, Lucas EA, Smith BJ, Soung DY, Devareddy L, Juma S, Akhter MP, Rexker R, Arjmandi BH. 2005. Soy insoflavones may protect against orchidectomy-induced bone loss in aged male rats. Calcif Tissue Int. 76: 56-62.

Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. *Endocrinology*. 139:4252-63.

Lee Y-B, Lee HJ, Kim KS, Lee J-Y, Nam S-Y, Cheon S-H, et al. 2004. Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem*. 68:1040-5.

Li B, Yu S. 2003. Genistein prevents bone resorption diseased by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull*. 26:780-6.

Lissin LW, Cooke JP. 2000. Phytoestrogen and cardiovascular health. *J Ame Col Cardio*. 35: 1403 – 1410.

Malaivijitnond S, Kiatthaipipat P, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. 2004. Different effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci*. 96:428-35.

Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. 2006. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. *J Ethnopharmacol*. 107:354-60.

Malaivijitnond S, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. 2010a. Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. *Fitoterapia*. 81:569-576.

Malaivijitnond S, Ketsuwan A, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. 2010b. Luteinizing hormone reduction by the male potency herb, *Butea superba* Roxb. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 43(9):843-852.

Manosroi A, Saowakon S, Manosroi J. 2004. Pre,iminary chronic toxicity study of herbal formulations containing red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) or white Khao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu) in Wistar rats. SWU J Pharm Sci. 9: 1-12. (in Thai)

Muangman V, Cherdshewasart W. 2001. Clinical trial of the phytoestrogen rich herb, *Pueraria mirifica* as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal woman. *Siriraj Hos Gaz*. 53: 300 – 309.

Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. 1998. Phytoestrogens. *J Clin Endocr Met* . 83: 297 – 303.

Nakamura H. 2007. Morphology, function and differentiation of bone cells. *J Hard Tiss Biol*. 16: 15 – 22.

Ng KW. 2009. Future developments in osteoporosis therapy. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 9:371-84.

Nishino T, Wedel T, Schmitt O, Schonfelder M, Hirtreiter C, Schulz T, et al. 2006. The xenoestrogen bisphenol A in the Hershberger assay: androgen receptor regulation and morphometrical reactions indicate no major effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* . 98: 155-163.

Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. 2002. Bone resorption versus estrogen loss following oophrectomy and menopause. *Maturitas*. 43: 27 – 33.

Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. 1997. Expression of estrogen receptor β in rat bone. *Endocrinology*.138:4509-12.

Owens W, Zeiger E, Walker M, Ashby J, Onyon L, Gray LE Jr. 2006. The OECD program to validate the rat Hershberger bioassay to screen compounds for *in vivo* androgen and antiandrogen responses. Phase 1: use of a potent agonist and a potent antagonist to test the standardized protocol.*Environ Health Perspect* 114: 1259-1265.

Papapoulos S. 2008. Bisphosphonates: how do they work. *Best Practice & Research*. 22: 831 – 847.

Picherit C, Bennetau-Pelissero C, Chanteranne B, Lebecque P, Davicco MJ, Barlet JP, et al. 2001. Soybean isoflavones dose-dependently reduce bone turnover but do not reverse established osteopenia in adult ovariectomized rats. *J Nutr*. 131:723-8.

Pongchaiyakul C, Apinyanurak C, Soontrapa S et al. 2006. Prevalence of osteoporosis in Thai men. *J Med Assoc Thai*. 89: 160-169.

Pongchaiyakul C, Apinyanurak C, Soontrapa S et al. 2006. Prevalence of osteoporosis in Thai men. *J Med Assoc Thai*. 89: 160-169.

Ren P, Ji H, Shao Q, Chen X, Han J, Sun Y. 2007. Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats. *Pharmacology* .79:129-36.

Riggs BL. 1982. Changes in bone mineral density of proximal femur and spine with aging: Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndrome. *J Clin Invest*. 70: 716 – 733.

Riggs BL, Khosla S, Melton J. 2002. Sex steroid and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocrine Rev*. 23: 279 – 302.

Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. 2009. Osteoprotective effect of *Phaseolus vulgaris* L in ovariectomy-induced osteopenia in rats. *Menopause*.16:589-96.

Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med*. 331: 1056-1061.

Smith MR. 2006. Treatment-related osteoporosis in men with prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 12: 6315s-6319s.

Soung Y, Devareddy L, Khalil DA, Hooshmand S, Patade A, Lucas EA, Arjmandi BH. 2006. Soy affects trabecular microarchitecture and favorably alters select bone-specific gene expressions in a male rat model of osteoporosis. Calcif Tissue Int. 78:385-391

Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000. Stimulating effect of daidzein in osteoblast MC3T3 – E1 cells. *Biochem Pharm*. 59: 471 – 475.

Sulak PJ. 1997. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropriate use of progestin to oppose endogenous and exogenous. *Endoc Met Clin North America*. 26: 399 – 412.

Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. 1995. FDA guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*.17 Suppl:125S-33S.

Tongerson D, Bell S. 2001. Hormone replacement therapy reduces the risk of nonvertebral fracture in postmenopausal woman. *JAMA*. 285: 2891 – 2891.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Suzuki J, Hamada Y, Watanabe G, Taya K. 2004. Long-term treatment effects of *Pueraria mirifica* phytoestrogens on parathyroid hormone and calcium levels in aged menopausal cynomolgus monkeys. *J Reprod Dev*. 50: 639-645.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W, Taya K. 2006. The Estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. *Endocrine*. 29:129-134.

Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. 2005. Ovulation block by *Pueraria mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. *Endocrine*. 26:33-9.

Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2007. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. *Maturitas*. 56:322-31.

Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008a. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen – rich herb, prevent bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas*. 59: 137-48.

Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Poungmali U, Malaivijitnond S. 2008b. Isoflavone contents in rodent diets and its estrogenic effect on vaginal cornification in *Pueraria mirifica*-treated rats. *Science Asia*. 34:371-6.

Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. 2003. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab*. 21:268-75.

Yamaguchi M, Gao YH. 1998. Inhibiting effect of genistein on bone resorption in tissue culture. *Biochemical Pharmacology*. 55: 71 – 76.

Zang Y, Li X-L, Lai W-P, Chen B, Chow H-K, Wu C-F, et al. 2007. Anti-osteoporotic effect of *Erythrina variegate* L. in ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*. 109:165-9.

Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. 2007. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/AKT pathway in rat calvaria osteoblast. *Planta medicine*. 73: 341 – 347.

ส่วนผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. บทความในวารสารวิชาการนานาชาติ

-Hammanop S, Urasopon N, Hamada Y, **Malaivijitnond S.** 2010. Therapeutic effects of a phytoestrogen-rich herb *Pueraria mirifica* on ovariectomy-induced osteoporotic rats. In preparation.

2. บทความในวารสารวิชาการระดับชาติ

-ทารีณี โลนุชิต, **สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์**. 2554. วิธีการตรวจสอบตัวอย่างกวางเครือขาวในห้องปฏิบัติการ. วารสารวิทยาศาสตร์.

3. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

3.1. วิทยากรรับเชิญ (Keynote speaker)

-**Malaivijitnond S.** 2009. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to women's health. Biological Science Graduate Congress. 10-12 December 2009. Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

3.2. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-**Malaivijitnond S**, Urasopon N, Hammanop S, Chimsakul U, Jaroenporn S, Chershewasart W, Watanabe G, Taya K.2009. Effect of Dietary Phytoestrogens on Rodent, Monkey and Human Physiology. The 3rd International Congress on the Future of Animal Research "Biomedical and Field Research with Non-human Primates", 19-22 November 2009, Rose Garden Riverside, Nakhon Pathom, Thailand

-**Malaivijitnond S.** 2010. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to women's health. Seminar of the Veterinary Physiology Laboratory, Tokyoto Unviersity of Agriculture and Technology, Japan. 22 September 2010.

3.3. นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า

- **Malaivijitnond S**, Urasopon N, Harnmanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn S. 2010. Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestrogens on bone loss. The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 64.

3.4. นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

-Hanmanop S, **Malaivijitnond S.** 2010. The therapeutic effects of white Kwao Krua *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabanhdu on ovariectomy-induced osteoporotic rats. The 6th Intercongress

Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 86.

4. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

4.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-**Malaivijitnond S.** 2010. Reproductive endocrine research: A case study of *Pueraria mirifica*. อบรมวิชาการสรีรวิทยา-พยาธิสรีรวิทยา ครั้งที่ 28 ประจำปี 2553. ณ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 230/1 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 17-21.

เอกสารแนบ (ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์)

Artwork Quality Results
"Therapeutic effects of the phytoestrogen-rich herb, Pueraria mirifica, on ovariectomy-induced osteoporotic rats"

If your uploaded Item has a Fail link, this indicates that the Item does not meet the journal's production standards. You can click the Fail link to obtain more information about how to correct the Item. In order to replace an Item, click 'Edit Submission' on the prior page.
If you choose not to act upon these recommendations you can continue the submission process. However after acceptance you may be asked to supply improved artwork files. This can possibly delay the production process.

Close

Submission Files

Item Type	Item Description	File Name	Size	Artwork Quality Results
PDF	PDF			View
Cover Letter	Cover Letter	CoverLetter_Harnmanop_27Sept10.doc	59.5 KB	N/A
Graphical Abstract	*Graphical Abstract	Graphical abstract_Harnmanop_27Sept10.doc	22.4 MB	N/A
Manuscript	*Manuscript	MS_Harnmanop_27Sept10.doc	132.5 KB	N/A
Figure	Figure	Figure_Harnmanop_27Sept10.pdf	365.2 KB	Pass [View]

Close

Therapeutic effects of the phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*, on ovariectomy-induced osteoporotic rats

Somrudee Harnmanop[a,b], Nontakorn Urasopon[c], Yuzuru Hamada[d], Suchinda Malaivijitnond[b,*]

[a]*Interdepartment of Physiology Program, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

[b]*Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand*

[c]*Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 34190, Thailand*

[d]*Evolutionary Morphology Section, Primate Research Institute, Kyoto University, Japan*

***Correspondence and reprint requests:**

Dr. Suchinda Malaivijitnond

Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand.

E-mail: Suchinda.m@chula.ac.th

Tel: 66-2-2185275

Fax: 66-2-2185256

1. Introduction

Pueraria mirifica Airy Shaw and Suvatabandhu is an indigenous Thai herb. Its tuberous roots contain at least 17 phytoestrogen compounds, mainly isoflavones [1,2]. The estrogenic activity of *P. mirifica* has been evaluated on various organ systems, including the reproductive organs [3-5] and breast cancer [6]. Based on its estrogenic activity, *P. mirifica* has become a major focal point for modern research on postmenopausal symptoms in women [7-10], including osteoporosis.

Osteoporosis is a skeletal disorder characterized by a low bone mineral density and microarchitectural deterioration of bone tissue, which predisposes the individual to an increased risk of fractures of the hip, spine and other skeletal sites [11]. Bone fractures may lead to disability, as well as a decreased quality of life, and increased morbidity and mortality [12]. It has been estimated that the annual number of worldwide cases of osteoporosis-related hip fractures will increase from 1.66 million to 6.25 million by the year 2050 [13]. Actually, 26% of all hip fractures in 1990 occurred in Asia, and this rate could rise to 37% and 45% by the year 2025 and 2050, respectively [14]. The higher prevalence of osteoporosis has occurred recently in the world, especially in countries where the human life-span has been prolonged. Thus, in women aged 40 – 44 years (a premenopausal age), the prevalence of osteoporosis is only 0.9%, but this increases to over 30% and 87% at 70 and over 79 years of age, respectively [15].

In women, estrogen deficiency has been recognized as a key factor for osteoporosis development. Estrogen plays an important role in maintaining bone mass in adult women by exerting a tonic suppression of bone remodeling and maintaining the balance between bone formation and bone resorption. Thus, entering the menopause, which is accompanied with a sudden loss of estrogen, could result in a decrease of bone mineral density and bone mineral content [16]. Therefore, estrogen replacement therapy is proposed to prevent bone loss in

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult female Sprague-Dawley rats, aged 60 days and weighing 200 - 250 g, were obtained from the National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakhon Pathom, Thailand. They were housed in stainless steel cages with sawdust bedding at five animals/cage in a room with controlled lighting (lights on 0600 – 2000 h) and temperature (25 ± 1 °C) at the Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University. The animals were fed with a standard rat chow diet (C. P. 082, Lot No. 17, S.W.T. Co., Ltd, Thailand) for 3.5 months (when they were 5.5 months old). Two weeks in advance and during the experimental period, rats were fed a soy-bean free rat diet (C.P. 082/SBF, Lot No. 080101, S. W. T. Co., Ltd, Thailand) to minimize the phytoestrogen content in the diet, as reported previously [25]. To minimize the increase in body weight caused by ovariectomy, the food consumption of ovariectomized rats was adjusted weekly to the level of sham-operated rat consumption. Water was supplied *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Faculty of Science, Chulalongkorn University (Protocol Review no. 0823003).

2.2. Experimental procedure

At 6 months of age, blood samples were collected from the rats by cardiac puncture and this day was designed as D_0. Seventy rats were divided into two main groups: sham control (15 rats) and ovariectomy (55 rats). In the ovariectomy group (OVX group), rats were bilaterally ovariectomized from a dorsal approach. In the sham control group, ovaries were exteriorized but replaced intact. The rats were then kept for 90 days after the surgery to induce bone loss [22,23], before being submitted to the study, and blood samples were consecutively collected every 30 days, which were designed as D_{30}, D_{60} and D_{90}, respectively.

2.4. The extraction of P. mirifica *and isoflavone analysis*

The isoflavone content of *P. mirifica* was analyzed by a high performance liquid chromatography (HPLC) technique. Before being submitted for the isoflavone content analysis, the *P. mirifica* powder was first extracted. In the extraction step, 50 g of the *P. mirifica* powder was mixed with 150 ml of 95% ethanol and incubated in an incubator shaker at 250 rpm, 50 °C for 24 hours. The ethanol extract was filtered by filter paper (Whatman No.4) and the solution was kept at -20 °C. The precipitation was again extracted with 100 ml of 95% ethanol in the same way as mentioned above. The solutions collected from the two extractions were pooled together and solvents were removed under a vacuum of a rotary evaporator. Then, the extraction was dried by incubated in the water bath at 60 °C. The dried extract was stored at -20 °C until HPLC analysis.

To identify isoflavone contents, 3 mg of a dried extract was re-dissolved with 4.5 ml of absolute ethanol and diluted with 1.5 ml of solution A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid). Then a 10-µl injection volume of extracted solution was analyzed for five isoflavones using a HPLC according to the previously described method [25] with a slight modification. The HPLC system (Water 1525 binary HPLC pump, Waters 717 plus auto-sampler, and Water 2487 UV absorbance Dual λ detector (Waters, Milford, USA)) was performed in a 250 mm x 4.6 mm column (ODS, Japan) at 25 °C. The mobile phase consisted of solution A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) and solution B (100:0.1 of acetonitrile : phosphoric acid) with gradient elution, flow rate at 1 ml/min and detection wavelength was set at 255 nm. The isoflavone content in the sample was analyzed by comparing the retention time and quantifying the amount using standard curves of peak area of the five isoflavone standards. Puerarin (>99 purity, LKT Laboratories, Inc., MN, USA), daidzin (>95 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA), genistin (>95 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA), daidzein (>98 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA) and genistein (>99% purity, LC

to a small size and then decalcified in EDTA-G solution (EDTA disodium salt 14.50 g, NaOH 1.25 g, glycerol 15 ml and distilled water 100 ml) for 4 weeks by changing the EDTA-G solution every week. After four weeks, the decalcified bones were dehydrated through a series of increasing ethanol concentrations to absolute ethanol and then cleared in xylene. After embedded in paraffin, they were cut into 5 μm thick sections, and stained with hematoxylin and eosin. The slides were analyzed under an Olympus light microscope and digitized with a camera (Sony, DSC-S85).

The Digital Image Processing Software Image Pro (Plus Software Media Cybernatics, Inc., USA) was used for quantitative bone histomorphometric measurements. The studied region of proximal tibia metaphysis was trabecular bone between 2 and 4 mm distal to the growth plate-epiphyseal junction. In each section, four non-overlapped windows of 1 x 1 mm were determined, and five sections in each rat were randomly selected for the study. The percent of trabecular bone area (%BA) was calculated by the trabecular bone area/total area x 100.

2.8. Statistical analysis

The data are expressed as the mean ± 1 SEM. Differences in body weights, relative organ weights, %BA and serum alkaline phosphatase levels between each time point in each group, and between each group in each time point, were analyzed by one way analysis of variance (ANOVA) with post-hoc test by LSD test. In all cases significance was set at $p < 0.05$. As the body weights in all groups of rats significantly changed throughout the study period, the relative organ weights (organ weight/body weight) were used.

3.3. Bone histology and bone area

After OVX for 90 days, the trabecular bone area was dramatically reduced, whilst the bone marrow cavity was concomitantly increased (Figure 3). This confirms the success of the induction of bone loss by OVX in this study. The trabecular bone area in OVX rats after 180 days was reduced further than that after 90 days, whilst in contrast treatment of the OVX rats with different doses of *P. mirifica* or with EE restored the trabecular bone area.

Comparison between the SH and OVX groups after OVX for 90 and 180 days revealed that the % trabecular bone area (%BA) in OVX groups were markedly and significantly lower (65.40% and 72.72%, respectively) than those of the SH groups at 22.79 ± 1.34 vs. 7.88 ± 0.99 for SH_{90} and OVX_{90} ($p < 0.001$), and 17.71 ± 1.42 vs. 4.83 ± 0.42 for SH_{180} and OVX_{180} ($p < 0.001$), respectively, as shown in Figure 4. As the age of the control SH rats increased from 9 months (SH_{90} group) to 12 months (SH_{180} group) old they also showed a decrease in the %BA by 22.29% ($p = 0.004$), whilst that for the OVX rats showed a significant 38.7% decrease in the %BA ($p = 0.01$).

Treatment of the OVX rats with *P. mirifica* could prevent the progressive reduction of %BA from that of the OVX_{90} group (%BA = 7.88 ± 0.99 for the OVX_{90} group), especially at the higher doses (%BA = 4.83 ± 0.42, 6.73 ± 0.92, 7.45 ± 0.93 and 8.01 ± 1.27 for PM0, PM10, PM100 and PM1000, respectively), as shown in Figure 3, whilst the %BA in the PM1000 group was nearly the same as that of the EE group (%BA = 8.67 ± 0.96). Moreover, the %BA in the PM1000 and EE groups were significantly higher than the PM0 group ($p<0.05$), by 65.80% and 79.50%, respectively, and slightly higher than that of the OVX_{90} group, by 1.64% and 10.90%, respectively. Thus, feeding of PM1000 and EE to the rats seems to rescue the %BA. However, restoration of the %BA was not complete and, for

rats, where ovariectomy increased the body weight [23,25,31]. This was also the case in the present study, where the body weights of rats were increased after OVX and dose-dependently decreased after *P. mirifica* treatment, confirming that the rats were in an endogenous estrogen deficiency stage after the OVX, and that *P. mirifica* could reverse the estrogenic activity, as also observed in the EE group.

Since the body weights of rats were altered after *P. mirifica* and EE treatment, the weights of the organs are presented as the relative organ weights (organ weight/body weight). The OVX showed a very mild effect on the relative weights of the metabolic organs. However, the relative uterus weights were highly decreased after OVX treatment but recovered after the administration of *P. mirifica* or EE, as has been reported previously [4,5,32].

Phytoestrogens exhibit estrogenic activity by binding at both estrogen receptors (ERs), ERα and ERβ, with a higher binding affinity [33] and expression of mRNA at ERβ [34]. ERα dominates in a few specific tissues, and is mainly involved in the reproductive system, whereas ERβ is expressed in many tissues including the bone, especially the lumbar vertebra and trabecular bone [34,35]. Intensive investigation is currently underway to identify selective estrogen receptor modulators (SERMs), which display the desirable estrogenic effects but lack or have a greatly reduced level of undesirable side effects. Thus, phytoestrogens are considered to be SERMs activity. There is a marked difference between phytoestrogen dosages that protect against bone loss and those that induce uterine hypertrophy. Thus treatment of the OVX mice with genistein at 0.5 - 0.7 mg/day could prevent trabecular bone loss without inducing the hypertrophic effects on the uterus [36,37]. The OVX rats fed with soy protein containing the isoflavone content (which include genistin, genistein, daidzin and daidzein), at 1,462.0, 25.1, 590.0 and 11.3 mg/kg soy protein isolate, increased the bone femoral density, but induced no significant effect on the uterine weight [38]. The OVX mice fed with *P. lobata*, another phytoestrogen containing herb, showed an amelioration of bone

prevent the bone loss (anti-osteoporosis effect), but they also restored the established osteoporosis (anabolic effect) in female rats, as seen by the fact that the %BAs in PM1000 and EE groups were higher than the OVX_{90} group by 1.64% and 10.9%, respectively, although it was not significant. This was also reported in seven-month old rats which were induced to osteoporosis by ovariectomy and kept for 80 days (OVX_{80}) with or without subsequent treatment with 20 – 80 mg/kg BW of soybean isoflavone for 84 days [46]. Although the BMD and bone area at D_{164} were not significantly different from those of the OVX_{80} rats, the numerical values tended to be higher, especially for the trabecular bone areas [46].

Alkaline phosphatase has been clinically available for several years as a marker for bone metabolism. Serum alkaline phosphatase consists of several dimeric isoforms that originate from various tissues, such as the liver, bone, intestine, spleen, kidney and placenta. In adults with a normal liver function, approximately 50% of the total alkaline phosphatase activity arises from the liver and 50% arises from the bone. Thus, we assume that the changes in the serum alkaline phosphatase levels in the present study are due to the changes in the bone isoform, because *P. mirifica* had no effect on the liver weights, although of course this awaits formal confirmation. In agreement with the previous published reports indicating that ovariectomy increased serum alkaline phosphatase levels [32,47,48], our OVX rats showed an increase in serum alkaline phosphatase levels starting from D_{30}, whereas the levels were stable in the SH rats throughout the study period. Serum alkaline phosphatase is an indirect marker of bone formation, osteoblast cell proliferation, differentiation and synthesis of collagen [49]. It suggests then that the OVX rats have increased bone formation. Concomitantly, urinary hydroxyproline and serum tartrate-resistant acid phosphatase activity, which are viewed as bone resorption markers, were also elevated in OVX rats [38,50]. Thus, bone formation and bone resorption were greater in the OVX rats. Controversial results of the effect of estrogen

hormone [54]. However, parathyroid hormone has undesirable side effects, including nausea, vomiting, headache, leg cramps and dizziness, and, most importantly, it is very expensive. Thus, parathyroid hormone treatment is reserved for patients with severe osteoporosis who are unable to take other medications or for whom other medications are not effective [54]. Regarding the results presented here, *P. mirifica* might be a candidate of choice, because *P. mirifica* also confers beneficial effects in terms of the reduction of tumorigenesis and tumor growth [6]. Thus, the use of *P. mirifica* could promise major advances to bone health in postmenopausal women.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Robert Butcher, Faculty of Science, Chulalongkorn University for proofreading of the manuscript. This study was supported in part by the Inter-Department of Physiology, the Graduate School; the Thai Government Stimulus Package 2 (TKK2555), under the Project for Establishment of Comprehensive Center for Innovative Food, Health Products and Agriculture; Ratchadaphisek Somphot Endowment Fund (Grant no. AG001B).

References

[1] Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine (nee Yoshikawa) K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod 2000;63:173-5.

[2] Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*. Biosci Biotechnol Biochem 2007;71:2527-33.

[12] Ray NF, Chan GM, Thamer M, Melton LJ 3rd. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fratures in the United States in 1995: Report from the National Osteoporosis Foundation. J Bone Miner Res 1997;12:24-35.

[13] Cooper C, Campion G, Melton LJ 3rd. Hip fractures in the elderly: A world-wide projection. Osteoporos Int 1992;2:285-9.

[14] Gullberg B, Johnell O, Kanis JA. World-wide projections for hip fracture. Osteoporos Int 1997;7:407-13.

[15] Henry MJ, Pasco JA, Nicholson GC, Seeman E, Kotowicz MA. Prevalence of osteoporosis in Australian women: Geelong osteoporosis study. J Clin Densitom 2000;3:261-8.

[16] Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. Bone resorption versus estrogen loss follwing oophorectomy and menopause. Maturitas 2002;43:27-33.

[17] Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC. Skeletal effects of estrogen. Endocr Rev 1994;15:275-300.

[18] Kenemans P, Bosman A. Breast cancer and post-menopausal hormone therapy. Best Pract Res Cl En 2003;17:123-37.

[19] Fontanges E, Fontana A, Delmas P. Osteoporosis and breast cancer. Joint Bone Spine 2004;71:102-10.

[20] Sulak PJ. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropiate use of progestins to oppose endogenous and exogenous. Endocrinol Metab Clin North Am 1997;26:399-412.

[21] Canavan TP, Doshi NR. Endometrial cancer. Am Fam Physician 1999;59: 3069-77.

[22] Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas 2007;56:322-31.

[31] Malaivijitnond S, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. Fitoterapia 2010;Doi: 10.1016/j.fitote.2010.01.019.

[32] Shirke SS, Jadhav SR, Jagtap AG. Osteoprotective effect of *Phaseolus vulgaris* L in ovariectomy-induced osteopenia in rats. Menopause 2009;16:589-96.

[33] Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β. Endocrinology 1998;139:4252-63.

[34] Onoe Y, Miyaura C, Ohta H, Nozawa S, Suda T. Expression of estrogen receptor β in rat bone. Endocrinology 1997;138:4509-12.

[35] Gustafsson JA. Review: estrogen recptor-β a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol 1999;163:379-83.

[36] Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, et al. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. Osteoporos Inst 1998;8:274-81.

[37] Ishimi Y, Arai N, Wang X, Wu J, Umegaki K, Miyaura C, et al. Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. Biochem Biophys Res Commun 2000;274:697-701.

[38] Arjmandi BH, Birnbaum R, Goyal NV, Getlinger MJ, Juma S, Alekel L, et al. Bone-sparing effect of soy protein in ovarian hormone-deficient rats is related to its isoflavone content. Am J Clin Nutr 1998;68 (suppl):1364s-8s.

[39] Wang X, Wu J, Chiba H, Umegaki K, Yamada K, Ishimi Y. *Puerariae radix* prevents bone loss in ovariectomized mice. J Bone Miner Metab 2003;21:268-75.

[40] Ren P, Ji H, Shao Q, Chen X, Han J, Sun Y. Protective effects of sodium daidzein sulfonate on trabecular bone in ovariectomized rats. Pharmacology 2007;79:129-36.

[51] Kanno S, Hirano S, Kayama F. Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. Toxicology 2004;196:137-45.

[52] Sugimoto E, Yamaguchi M. Stimulatory effect of daidzein in osteoblastic MC3T3-E1 cells. Biochem Pharmacol 2000;59:471-5.

[53] Brynin R. Soy and its isoflavones: a review of their effects on bone density. Altern Med Rev 2002;7:317-27.

[54] Ng KW. Future developments in osteoporosis therapy. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2009;9:371-84.

100 and 1000 mg/kg BW/day (OVX, PM10, PM100 and PM1000, respectively) for 90 days (B). Except for the SH and OVX groups, the data are expressed as only the mean (derived from 10 replicates) because the SE values overlapped making the plot unclear. * and ** = $p < 0.05$ and 0.01, respectively, compared to the SH group.

วารสารวิทยาศาสตร์
สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย
ในพระบรมราชูปถัมภ์
scithaimag@gmail.com

๒๔ มีนาคม ๒๕๕๔

เรื่อง การรับบทความวิจัยวิทยาศาสตร์เพื่อการตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์

เรียน คุณทาริณี โลนุชิต และ รองศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์
หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สิ่งที่ได้รับ

๑. บทความวิจัยเรื่อง วิธีการตรวจสอบกวาวเครือขาวในห้องปฏิบัติการ จำนวน ๑๖ หน้า ๒ ชุด
๒. แผ่น ซีดี ๑ แผ่น

กองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์ สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย ในพระบรมราชูปถัมภ์ ได้รับบทความที่ท่านส่งมาเพื่อการตีพิมพ์ลงในวารสารวิทยาศาสตร์เป็นที่เรียบร้อยแล้ว และขณะนี้บทความของท่านได้รับการจัดลำดับรอการตีพิมพ์ลงในวารสารวิทยาศาสตร์ ฉบับเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน พ.ศ. ๒๕๕๔ เป็นที่เรียบร้อยแล้ว

ทางกองบรรณาธิการขอขอบคุณท่านที่ให้ความสนใจและส่งบทความมาเพื่อลงตีพิมพ์ในวารสารวิทยาศาสตร์ ซึ่งเรายินดีที่จะเป็นสื่อกลางเพื่อเผยแพร่ผลงานของท่านสู่สาธารณชนต่อไป

จึงเรียนมาเพื่อทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(นายฉัตรชัย เครือเสนา)
รองบรรณาธิการวารสารวิทยาศาสตร์

สำนักงานจัดทำวารสารวิทยาศาสตร์
๕๒/๑๑-๑๒ อาคาร ลอท ทเวนตี้ไนน์ ซอยอินทามระ ๒๙ ถนนสุทธิสารวินิจฉัย เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร ๑๐๔๐๐ โทรศัพท์ ๐๒ ๒๗๙๘๘๗๑-๒ โทรสาร ๐๒ ๒๗๙๘๘๗๒
52/11-12 Lot Twenty-nine Building, Soi Inthamara 29, Suttisarn Road, Phayathai, Bangkok 10400 Tel. 02 2798871-2 Fax. 02 2798872

วิธีการตรวจสอบตัวอย่างกวาวเครือขาวในห้องปฏิบัติการ

ทาริณี โลนุชิต และ รศ. ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์*

หน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร

โทรศัพท์/โทรสาร 02-218-5275

อีเมล suchinda.m@chula.ac.th

Corresponding author: รศ. ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

บทคัดย่อ

กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิดและมีอยู่ในปริมาณสูงจึงก่อให้เกิดกระแสความนิยมทั้งในการนำไปใช้ในคนเพื่อสรรพคุณทางยาและเครื่องสำอาง หรือนำไปศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองหลายชนิด อย่างไรก็ตามตัวอย่างกวาวเครือขาวที่ได้มาอาจจะไม่สามารถจำแนกชนิดได้โดยง่ายหรืออย่างมั่นใจ ทั้งนี้มีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิดที่มีลักษณะคล้ายกวาวเครือขาว ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งหวังที่จะหาคุณสมบัติบางประการที่สามารถใช้ในการจำแนกกวาวเครือขาวได้ ในการจำแนกแบ่งเป็น 3 ระดับคือ 1. จำแนกจากใบ กิ่ง และ หัว ของตัวอย่างพืช 2. จำแนกจากลักษณะของผงบดละเอียดและ 3. จำแนกจากฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวด้วยวิธี Vaginal cytology assay ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง ผลการศึกษาพบว่ากวาวเครือขาวมีหัวใต้ดินที่ค่อนข้างกลม ใบมี 3 ใบย่อย รูปไข่ ด้านบนใบเกลี้ยง ด้านล่างมีขนสั้น ๆ ประปราย และก้านใบมีขนสั้น ๆ เนื้อด้านในหัวมีสีขาว เส้นใยมาก ไม่มีเส้นรอบวง เมื่อนำเนื้อส่วนหัวไปหั่น ตากแห้ง และบดเป็นผง และส่องดูใต้กล้อง จะพบส่วนประกอบหลักสองอย่างคือ เม็ดแป้งขนาดเล็ก ประมาณ 3.63 – 4.27 ไมครอน ที่มีสีเหลืองอ่อน และเส้นใยจำนวนมาก และเมื่อนำไปทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจน พบว่ากวาวเครือขาวสามารถกระตุ้นให้มี Cornified cell เพิ่มสูงขึ้น โดยขึ้นกับสายพันธุ์ของกวาวเครือที่นำมาทดสอบ

บทนำ

ด้วยปัจจุบันกระแสในการดูแลสุขภาพด้วยสมุนไพรแทนการใช้อาหารเสริมหรือยาซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์เป็นที่นิยมกันอย่างมากและกว้างขวาง และสมุนไพรที่ได้รับความนิยมมากชนิดหนึ่งก็คือกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* กวาวเครือขาวเป็นไม้เถาว์ ที่มีรากเป็นหัว ซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นยาสมุนไพรโดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการรักษาสุขภาพและความงามของผู้หญิง เนื่องจากมีสารที่มีลักษณะโครงสร้างและฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเพศเอสโตรเจนที่เรียกว่าสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) ในปริมาณสูงและมีสารไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิด (Chansakaow et al., 2000; Cherdshewasart et al., 2007a; 2007b; Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007; Jaroenporn et al., 2006; Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Trisomboon et al., 2004; 2005; 2006) จึงนิยมนำมารับประทานเป็นยาบำรุงโดยเฉพาะในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนกวาวเครือขาวถูกใช้เป็นยาสมุนไพรเพื่อทดแทนการพร่องของฮอร์โมนเพศเอสโตรเจน (Muangmand and Cherdshewasart, 2001) ทั้งยังเป็นสมุนไพรที่ได้รับการนิยมในการนำมาวิจัยในสัตว์ฟันแทะ โดยมุ่งหวังประโยชน์การนำไปประยุกต์ใช้ทางยา ในการรักษาโรคในผู้ป่วยสูงวัย เช่น โรคกระดูกพรุน (Urasopon et al., 2007; 2008a) โรคมะเร็ง (Cherdshewasart et al., 2009) และโรคความจำเสื่อม (Chindewa et al., 2008) เป็นต้น รวมทั้งการนำไปศึกษาวิจัยในสัตว์เศรษฐกิจหลากหลายชนิดเช่น ปลาดุก (ปุญมณี กาญจนวรกุลและคณะ, 2549) ไก่ (สมโภชน์ ทับเจริญและคณะ, 2550) และสุกร (สมโภชน์ ทับเจริญ, 2551) ทั้งเพื่อประโยชน์ในการเร่งอัตราการเติบโตและเพิ่มอัตราการแลกเนื้อของสัตว์ (รุ่งกานต์ กล้าหาญ และคณะ, 2546 และ สมโภชน์ ทับเจริญ และคณะ, 2546)

ด้วยเหตุนี้กวาวเครือขาวจึงได้รับความสนใจในการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อหาขนาดและวิธีใช้ ที่เหมาะสมในทางห้องปฏิบัติการหรือนำไปใช้บริโภคในคนหนุ่มสาว หรือผู้สูงวัย แต่อย่างไรก็ตามกวาวเครือขาวที่ขายอยู่ทั่วไปตามท้องตลาดนั้นมักไม่อยู่ในรูปของหัวสดที่มีใบและดอกที่สามารถนำมาใช้ประกอบการจำแนกชนิดได้ด้วยลักษณะทางอนุกรมวิธาน โดยส่วนมากกวาวเครือขาวที่ได้มามักอยู่ในรูปของหัวกวาวเครือขาวสด ที่ไม่มีใบและดอกประกอบ หรือแผ่นกวาวเครือขาวตากแห้ง หรือ ผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว ที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกหรือแคปซูล อีกทั้งยังมีพืชสมุนไพรหลายชนิดที่พบในประเทศไทยที่มีรากเป็นหัวและมีลักษณะคล้ายกับกวาวเครือขาว ซึ่งถ้าหากไม่ใช่ผู้เชี่ยวชาญทางด้านพฤกษศาสตร์อาจจะทำให้เกิดความสับสนในการจัดจำแนก และทำให้นำไปใช้ผิดประเภทได้

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ จึงดำเนินการเพื่อหาวิธีการในการจำแนกชนิดของกวาวเครือขาวในรูปแบบต่างๆที่ได้รับมาและมีขายทั่วไปตามท้องตลาด โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเปรียบเทียบลักษณะของตัวอย่างกวาวเครือขาวในรูปแบบหัวกวาวเครือขาวสด แผ่นกวาวเครือขาวอบแห้ง และผงกวาวเครือขาวบดละเอียด การทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของสารไฟโตเอสโตรเจนซึ่งเป็นสารสำคัญในกวาวเครือขาวด้วยวิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2006; Cherdshewasart et al., 2007b) ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนในสารประกอบต่าง ๆ โดยมุ่งหวังว่างานวิจัยชิ้นนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ช่วยให้ผู้ใช้โดยทั่วไป หรือนักวิจัยต่าง ๆ ที่ไม่จำเป็นต้องมีพื้นฐานด้านความรู้ทาง

พฤกษศาสตร์ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกกวาวเครือขาวมาใช้ได้อย่างถูกต้องและได้ประโยชน์สูงสุดตามที่มุ่งหวัง

วัสดุและวิธีการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้จะใช้ตัวอย่างพืชซึ่งได้รับคำยืนยันจากคนในแต่ละพื้นที่ว่าเป็นกวาวเครือขาวประกอบด้วย ส่วนหัว ใบ และกิ่ง ที่ได้รับมาจากศูนย์ศึกษาและพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ อำเภอดอยสะเก็ด จังหวัดเชียงใหม่ (SMP-1) และจากอำเภอสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี (SMP-2) ผงกวาวเครือขาวบดละเอียด (SMP-3) ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์ สมโภชน์ ทับเจริญ ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติสถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์วิชัย-3 (Wichai-3) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ในห้องปฏิบัติการของหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการเปรียบเทียบลักษณะโดยแบ่งออกเป็น 3 ระดับ ดังนี้ การจำแนกชนิดของพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน การจำแนกลักษณะผงของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการศึกษาฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ระดับที่ 1 การจำแนกชนิดของตัวอย่างพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน

โดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางสันฐานของตัวอย่างได้แก่ ใบ กิ่งและหัว ของตัวอย่างพืชที่ได้รับมากับลักษณะของตัวอย่างกวาวเครือ *P. mirifica* หมายเลข BCU007952 และ BCU010250 จากพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยในการศึกษาในระดับนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างใบ กิ่ง หัว และลักษณะเนื้อด้านในของตัวอย่างพืชที่ได้รับการยืนยันว่าเป็นกวาวเครือขาวที่ได้รับมาจาก จังหวัดเชียงใหม่ (SMP-1) และอุบลราชธานี (SMP-2) ตามลำดับ

ระดับที่ 2 การจำแนกลักษณะผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

หลังจากทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานแล้ว ส่วนหัวของ SMP-1 และ SMP-2 จะถูกนำมาแปรรูปเป็นผงบดละเอียด โดยการนำส่วนหัวมาปลอกเปลือกออก หั่นเป็นแผ่นบาง แล้วนำไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 36 ชั่วโมง นำแผ่นที่อบแห้งแล้วมาบดด้วยเครื่องบด และกรองผงบดละเอียดที่ได้ให้มีขนาด 149 ไมครอน (100 mesh) จากนั้นนำตัวอย่างผงบดละเอียดแต่ละชนิดไปผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วนผงบดละเอียด 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำสารแขวนลอยที่ได้ไปศึกษาลักษณะและส่วนประกอบเปรียบเทียบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเชิงประกอบ (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) ด้วยกำลังขยาย 200 และ 400 เท่า และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ด

แป้งถ้าหากเม็ดแป้งมีรูปร่างกลม หรือวัดส่วนที่กว้างที่สุดถ้าหากเม็ดแป้งมีรูปร่างชนิดอื่นด้วย Ocular micrometer จำนวน 30 เม็ดแป้งต่อหนึ่งตัวอย่าง และนับจำนวนของเม็ดแป้งในกรอบขนาด 0.16 ตารางมิลลิเมตรต่อสไลด์หนึ่งแผ่น โดยทำการสุ่มนับทั้งหมด 10 กรอบต่อหนึ่งตัวอย่าง โดยแต่ละตัวอย่างที่ศึกษาจะทำซ้ำจำนวน 3 ครั้งต่อตัวอย่าง โดยการศึกษาในระดับนี้จะทำการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง SMP-1 และ SMP-2 กับตัวอย่างกวาวเครือขาว SMP-3 และWichai-3

ระดับ 3 การทดสอบฤทธิ์ของทางเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ศึกษาฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของไฟโตเอสโตรเจนในตัวอย่างพืชโดยใช้วิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2006; 2010; Cherdshewasart et al., 2007b) ซึ่งเป็นวิธีที่อาศัยหลักการที่ว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญและการแบ่งเซลล์ (proliferation) ของเซลล์เยื่อบุผนังช่องคลอดได้ และเซลล์ที่ได้เมื่อนำมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะมีลักษณะแบนบาง ไม่มีนิวเคลียสที่เรียกว่า Cornified cell ซึ่งสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น สารไฟโตเอสโตรเจนได้

ทำการทดลองในหนูแรท เพศเมีย สายพันธุ์วิสตาร์ (Wistar) อายุ 8 สัปดาห์ที่มีวงสืบพันธุ์ปกติ 4 ถึง 5 วันต่อรอบวงสืบพันธุ์ จำนวน 25 ตัว โดยสั่งซื้อหนูมาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และนำมาเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่มีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้อุณหภูมิเท่ากับ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00-18.00) และมืด 12 ชั่วโมง (18.00-06.00) โดยเลี้ยงหนูไว้ในกรงสเตนเลสที่ปูด้วยขี้เลื่อยอบฆ่าเชื้อที่อุณภูมิ 80 องศาเซลเซียสอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จำนวน 5 ตัวต่อกรง ในระหว่างการทดลองหนูจะได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (soybean-free diet; CP.082/SBF, S.W.T., Co., Ltd, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) (Urasopon et al., 2008b) และน้ำตลอดเวลา เลี้ยงหนูไว้ในเรือนเลี้ยงนาน 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง เพื่อให้ปรับตัว

นำหนูแรทมาตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง และแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว คือ กลุ่มควบคุม (DW) และกลุ่มที่ ให้สารกวาวเครือขาว ที่แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ กลุ่ม SMP-1, SMP-2, SMP-3 และ Wichai-3 ตามลำดับ

ในการทดลองแบ่งออกเป็น 3 ระยะๆ ละ 14 วันได้แก่ ระยะก่อนให้สาร ระยะให้สาร และระยะหลังให้สาร ในระยะก่อนให้สารและระยะหลังให้สาร หนูไม่ได้รับสารใด ๆ ในขณะที่ระยะให้สารหนูได้รับผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวที่ผสมน้ำกลั่นในขนาด 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ในน้ำกลั่น 0.7 มล./วัน (กลุ่ม SMP-1, SMP-2, SMP-3 และWichai-3) หรือน้ำกลั่นปริมาตร 0.7 มล./วัน (กลุ่ม DW) โดยให้สารทางปากในเวลา 08.00-09.00 ทุกวัน ติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดด้วยการทำ Vaginal smear ในเวลา 08.00-09.00 น.ทุกวัน จนสิ้นสุดการทดลอง ในการตรวจเซลล์เยื่อบุช่องคลอดจะทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเชิงประกอบ (Olympus Optical Co., Ltd., Japan) โดยจะจำแนกเซลล์เป็น 3 ชนิด คือ

Leukocyte (L), Nucleated cell (O) และ Cornified cell (Co) นับจำนวนเซลล์ที่พบ จากนั้นทำการคำนวณร้อยละของเซลล์ Co ที่พบจากสูตร $\%Co = \frac{Co}{(L+O+Co)} \times 100$

ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติโครงการจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Protocol Review Number 0823013)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยที่ได้รับระหว่างกลุ่มการทดลองต่างๆ โดยใช้ One-way ANOVA และทำ post-hoc test ด้วย LSD test โดยกำหนดให้มีการยอมรับค่าความแตกต่างทางสถิติที่ $p<0.05$ เป็นต้นไป โดยใช้โปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17.0

ผลการทดลอง

ระดับที่ 1 การจำแนกชนิดของตัวอย่างพืชด้วยหลักอนุกรมวิธาน

จากการเปรียบเทียบลักษณะใบ กิ่ง และ หัวของ SMP-1 และ SMP-2 กับตัวอย่างกวาวเครือขาว *P. mirifica* หมายเลข BCU007952 และ BCU010250 (ภาพที่ 1) พบว่า SMP-1 มีลักษณะของใบและกิ่งตรงกับลักษณะของ BCU007952 และ BCU010250 ที่เป็นพืชเถาว์ไม้เลื้อยผลัดใบ ใบเป็นใบประกอบ มี 3 ใบย่อย ก้านใบมีขนสั้น ๆ ใบย่อยใบกลางรูปไข่ กว้างประมาณ 9-15 ซม. ยาวประมาณ 15-30 ซม. ใบย่อยคู่ข้างขนาดใกล้เคียงกับใบกลาง ปลายใบมนหรือเรียวแหลม โคนใบสอบหรือมน ด้านบนใบเกลี้ยง ด้านล่างมีขนสั้นๆ ประปราย (ภาพที่ 1 ก และ ข) หัวใต้ดินมีลักษณะค่อนข้างกลม เนื้อด้านในสีขาว (ภาพที่ 1 ค และ จ) ส่วน SMP-2 ไม่ตรงกับตัวอย่างใด ดังนั้นจึงได้ทำการเปรียบเทียบกับตัวอย่างพืชอื่นๆที่เก็บอยู่ในพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์ กสิน สุวะตะพันธุ์ พบว่าเป็นสมุนไพรที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์คือ *Stephania venosa* ชื่อภาษาไทยว่าสบู่เลือด หรือว่านสบู่เลือด โดยลักษณะที่ใช้ประกอบการจำแนกชนิดจากใบและหัว คือ ใบเดี่ยวออกแบบสลับ ใบรูปไข่ ขอบใบเว้าคล้ายรูปสามเหลี่ยม ใบกว้างประมาณ 7-12 ซม. ยาว 6-11 ซม. ฐานใบรูปตัดหรือเว้า ปลายใบตัดหรือมีติ่ง หน้าใบมีขนและมัน เส้นใบชัด ก้านใบยาวประมาณ 5-15 ซม. หัวใต้ดินขนาดใหญ่ กลม เปลือกหัวสีน้ำตาล เปลือกขรุขระหรือเรียบ เนื้อในสีขาวดังแสดงในภาพที่ 1 (ง และ ฉ)

เนื่องจากหัวกวาวเครือขาว (SMP-1) และสบู่เลือด (SMP-2) มีสีขาวคล้ายกันจึงวิเคราะห์ลักษณะเนื้อด้านในหัวโดยละเอียดยิ่งขึ้น พบว่า SMP-2 มีเนื้อสีขาวที่มีเส้นใยและมีรอยเส้นรอบวงสีน้ำตาลอ่อนชัดเจน ส่วน SMP-1 นั้นมีเนื้อสีขาวและเส้นใยมากแต่ไม่ปรากฏเส้นรอบวงดังแสดงในภาพที่ 1 (จ และ ฉ)

ระดับที่ 2 การจำแนกลักษณะผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากการจำแนกลักษณะทางสัณฐานทำให้ทราบว่าตัวอย่าง SMP-2 คือสบู่เลือดไม่ใช่กวาวเครือขาว แต่ดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นว่า ในบางครั้งตัวอย่างพืชสมุนไพรที่ได้รับมา อาจจะไม่ได้มีลักษณะเป็นหัว หรือเป็นหัว แต่ไม่มีใบเป็นส่วนประกอบ ทำให้การวิเคราะห์ในระดับที่ 1 ไม่สามารถทำได้และโดยส่วนใหญ่กวาวเครือขาวที่มีขายกันอยู่ทั่วไปในท้องตลาดหรือในร้านขายยาแพทย์แผนโบราณมักจะอยู่ในรูปของผงบดละเอียด ดังนั้นการศึกษาในระดับนี้จึงเป็นการเปรียบเทียบลักษณะของผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว 3 สายพันธุ์คือ SMP-1 SMP-3 และ Wichai-3 กับสบู่เลือด (SMP-2) จากการศึกษาผงบดละเอียดขนาด 149 ไมครอน (100 mesh) ของตัวอย่างทั้ง 4 ชนิด ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 400 เท่า พบว่า SMP-1 SMP-3 และ Wichai-3 มีลักษณะคล้ายคลึงกันคือในผงบดละเอียดนั้นประกอบด้วยส่วนที่เป็นเส้นใยที่ถูกตัดออกเป็นท่อนสั้นๆ จากกระบวนการบด และส่วนที่เป็นเม็ดแป้งรูปร่างค่อนข้างกลมสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 2 ก ข และ ค) ขนาดเล็ก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยตั้งแต่ 3.63 ± 0.28 ไมครอน ถึง 4.27 ± 0.30 ไมครอน (ดังตารางที่ 1) ซึ่งเล็กกว่าผงบดละเอียดของ SMP-2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.13 ± 0.60 ไมครอน (ตารางที่ 1) ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมเช่นเดียวกับของกวาวเครือขาว แต่มีสีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 2 ง) ได้ทำการทดลองยืนยันส่วนของเม็ดแป้งโดยการนำไปย้อมด้วยสารละลายไอโอดีนอิ่มตัวได้เม็ดแป้งติดสีน้ำเงินเข้ม นอกจากนั้นตัวอย่างผงบดละเอียดของสบู่เลือด SMP-2 ยังพบส่วนของเส้นใยน้อยมากเมื่อเทียบกับตัวอย่างผงบดละเอียดของกวาวเครือทั้ง 3 กลุ่ม จากการสุ่มนับจำนวนเม็ดแป้ง พบว่าจำนวนเม็ดแป้งที่พบในหนึ่งกรอบการนับตัวอย่างจะแปรผกผันกับขนาดของเม็ดแป้ง นั่นคือเม็ดแป้งที่มีขนาดใหญ่ (เช่น SMP-2) จะมีจำนวนน้อยในหนึ่งกรอบที่นับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบวความแตกต่าง ($p<0.05$) ระหว่าง SMP-2 กับ SMP-1 และ SMP-3 เท่านั้นในขณะที่สายพันธุ์ Wichai-3 มีจำนวนเม็ดแป้งน้อยกว่า SMP-2 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.301$) ดังแสดงผลในตารางที่ 2 และภาพที่ 2

ระดับ 3 การทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนในตัวอย่างพืช

ภายหลังจากตัดรังไข่หนูแรทเพศเมียออกทั้ง 2 ข้าง และตรวจดูเซลล์เยื่อบุช่องคลอดโดยวิธี Vaginal cytology assay (Malaivijitnond et al., 2010) พบว่าเซลล์เยื่อบุช่องคลอดชนิด Cornified cell (Co) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วในช่วง 14 วันแรกของระยะก่อนให้สาร (ภาพที่ 3) โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co อยู่ระหว่างร้อยละ 4.27-30 เซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่พบส่วนใหญ่ในระยะนี้เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาว (Leukocyte; L) และหลังจากการให้สารแขวนลอยของผงบดละเอียดของกวาวเครือขาวและสบู่เลือดในน้ำกลั่นทางปากไปเพียงสามวัน พบว่าเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว (Wichai-3 SMP-1 และ SMP-3) มีจำนวนเซลล์ชนิด Co เพิ่มขึ้นและค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co มีค่าเพิ่มสูงขึ้น เป็น 50.00±22.80, 53.60±7.40 และ 50.60±40.47 ตามลำดับ ต่างจากกลุ่ม SMP-2 ที่ได้รับสารแขวนลอยของผงบดละเอียดของสบู่เลือด และกลุ่มที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และนอกจากนี้ยังพบว่าค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co ของ

หนูกลุ่มที่ได้รับสบู่เลือด (SMP-2) และน้ำกลั่น (DW) ไม่มีการปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ตลอดการทดลองทั้ง 3 ระยะ ค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co มีค่าแกว่งไกวอยู่ในช่วงร้อยละ 4-31.21 ในหนูทั้งสองกลุ่ม ในขณะที่ค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co ของกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว SMP-3, Wichai-3 และ SMP-1 มีค่าสูงสุดในวันที่ 4, 8 และ 13 ของการให้สารตามลำดับ และเมื่อหยุดให้สารพบว่าค่าร้อยละของเซลล์ชนิด Co ลดลงและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากระยะก่อนให้สารในวันที่ 4, 3 และ 2 ของการหยุดให้สารตามลำดับ

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกกวาวเครือขาวออกจากพืชสมุนไพรอื่นๆ ที่ไม่ต้องการเครื่องมือใดๆ ประกอบการจำแนกเลย คือ การสังเกตุลักษณะของหัว ใบ และกิ่ง ด้วยตาเปล่า โดยต้องดูลักษณะทั้ง 3 อย่างประกอบกัน แต่ในบางครั้งที่ได้รับพืชสมุนไพรมาอาจจะมีเฉพาะส่วนหัวเท่านั้น ก็สามารถผ่าส่วนหัวและสังเกตลักษณะเนื้อด้านในหัว เช่น สี ลักษณะเส้นใยและเส้นรอบวง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความมั่นใจยิ่งขึ้นในการนำไปใช้เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดตามวัตถุประสงค์ที่มุ่งหวัง และถ้ามีเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ คือ กล้องจุลทรรศน์ประกอบการศึกษา ควรที่จะทำการทดสอบในระดับผงบดละเอียดต่อไป โดยนำผงบดละเอียดมากรองให้ได้เฉพาะขนาด 149 ไมครอน หรือ 100 mesh จะทำให้สามารถใช้สีและขนาดของเม็ดแป้งช่วยในการจำแนกชนิดได้ โดยเม็ดแป้งของกวาวเครือขาวจะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อดูใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดแป้งมีค่า 3.63 ถึง 4.27 ไมครอน แต่มีบางครั้งที่ได้รับกวาวเครือขาวมาในรูปยาบรรจุในแคปซูล ซึ่งไม่สามารถจำแนกได้จากลักษณะผงเพียงอย่างเดียว และผงบรรจุในแคปซูลนั้นมีกวาวเครือขาวบรรจุปนอยู่กับพืชสมุนไพรอื่นๆ หรือแม้แต่ในบางครั้งยาที่มีบรรจุในแคปซูลนั้นเป็นกวาวเครือขาวจริง แต่เนื่องจากกวาวเครือขาวที่เก็บจากคนละแหล่ง (Cherdshewasart et al., 2007a; 2007b) หรือคนละฤดูกาล (Cherdshewasart and Sriwatcharaku, 2007) หรือแม้แต่ต้นเดียวกันแต่คนละหัว (Urasopon et al., 2008b) ก็มีฤทธิ์ทางเอสโตรเจนต่างกัน ดังนั้นการนำกวาวเครือขาวไปใช้ต่อไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองและคน ที่มุ่งหวังที่จะนำผลการทดลองที่ได้ไปตีพิมพ์ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติหรือนำไปใช้ทางยา จึงควรจะมีการทดสอบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนเสียก่อน

ดังเช่นในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธี Vaginal cytology assay ซึ่งเป็นวิธีที่ง่าย ราคาถูก มีความไวสูง ไม่ต้องฆ่าสัตว์ทดลอง และเป็นที่นิยมกันมากในปัจจุบัน (Malaivijitnond et al., 2006; 2010; Cherdshewasart et al., 2007b; 2008; Urasopon et al., 2008b) จากผลการทดลองจะเห็นได้อย่างชัดเจนว่าสบู่เลือดไม่ทำให้ค่าร้อยละของเซลล์ Co เพิ่มสูงขึ้นหรือไม่มีผลทางฮอร์โมนเอสโตรเจนนั่นเอง โดยให้ผลเช่นเดียวกันกับการให้น้ำกลั่น (DW) แก่หนูทดลอง ทั้งนี้จากรายงานการทดลองที่มีมาก่อนหน้านี้พบว่าสบู่เลือดมีสารที่ออกฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อมาเลเรีย (Likhitwitayawuid et al., 1999) และรักษาโรคอัลไซเมอร์

(Ingkaninan et al., 2003) ซึ่งไม่เกี่ยวกับฤทธิ์ทางเอสโตรเจน และการทดลองครั้งนี้เป็นครั้งแรกที่รายงาน ผลทางฮอร์โมนเอสโตรเจนของสบู่เลือด

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ทางเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวที่ทำการทดลองในครั้งนี้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ Wichai-3และSMP-3 ที่มีการศึกษาวิจัยกันมาแล้วอย่างกว้างขวางและ สายพันธุ์ SMP-1 ที่มีการค้นพบใหม่และยังไม่มีการรายงานมาก่อน พบว่ากวาวเครือขาวสายพันธุ์ SMP-3 ออกฤทธิ์ได้เร็วที่สุด และแรงที่สุด ในขณะที่กวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai-3 และ SMP-1 ออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกัน เพียงแต่กวาวเครือขาวสายพันธุ์ SMP-1 จะคงฤทธิ์ไว้ได้นานที่สุดถึง 3 วัน หลังจากการหยุดให้สาร หรือนาน 3 ใน 4 เท่าของความยาวรอบประจำเดือนของหนูแรทเพศเมีย ซึ่งถ้าหากเปรียบเทียบกับผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์จะกินระยะเวลานาน 21 วัน (เมื่อกำหนดให้รอบประจำเดือนปกติในผู้หญิงวัยเจริญพันธุ์กินระยะเวลานาน 28 วัน; Johnson, 2010)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวที่เก็บมาจากคนละแหล่งกันหรือคนละสายพันธุ์กัน มีฤทธิ์ทางเอสโตรเจนต่างกัน ดังนั้นก่อนที่จะนำกวาวเครือขาวไปใช้ในการศึกษาวิจัยใดๆ หรือนำไปใช้ทางยา จึงควรที่จะมีการตรวจสอบคุณภาพ (Quality control) ก่อนนำไปใช้ทุกครั้ง ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่าในการจำแนกกวาวเครือเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนและแม่นยำ จะมีการตรวจสอบเป็นลำดับขั้น ตั้งแต่อย่างง่ายจนถึงระดับที่ต้องใช้เครื่องทางวิทยาศาสตร์และใช้ผู้ที่มีความรู้ความชำนาญทางสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ประกอบด้วย แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยคาดหวังว่าผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยชิ้นนี้จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในทางปฏิบัติได้อย่างกว้างขวางและเป็นประโยชน์ต่อผู้สนใจโดยทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหน่วยวิจัยไพรเมท ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศูนย์ศึกษาการพัฒนาห้วยฮ่องไคร้อันเนื่องมาจากพระราชดำริ จังหวัดเชียงใหม่ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดแป้งในตัวอย่างผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ต่างๆ (Wichai-3, SMP-1 และ SMP-3) และสมุนไพร (SMP-2)

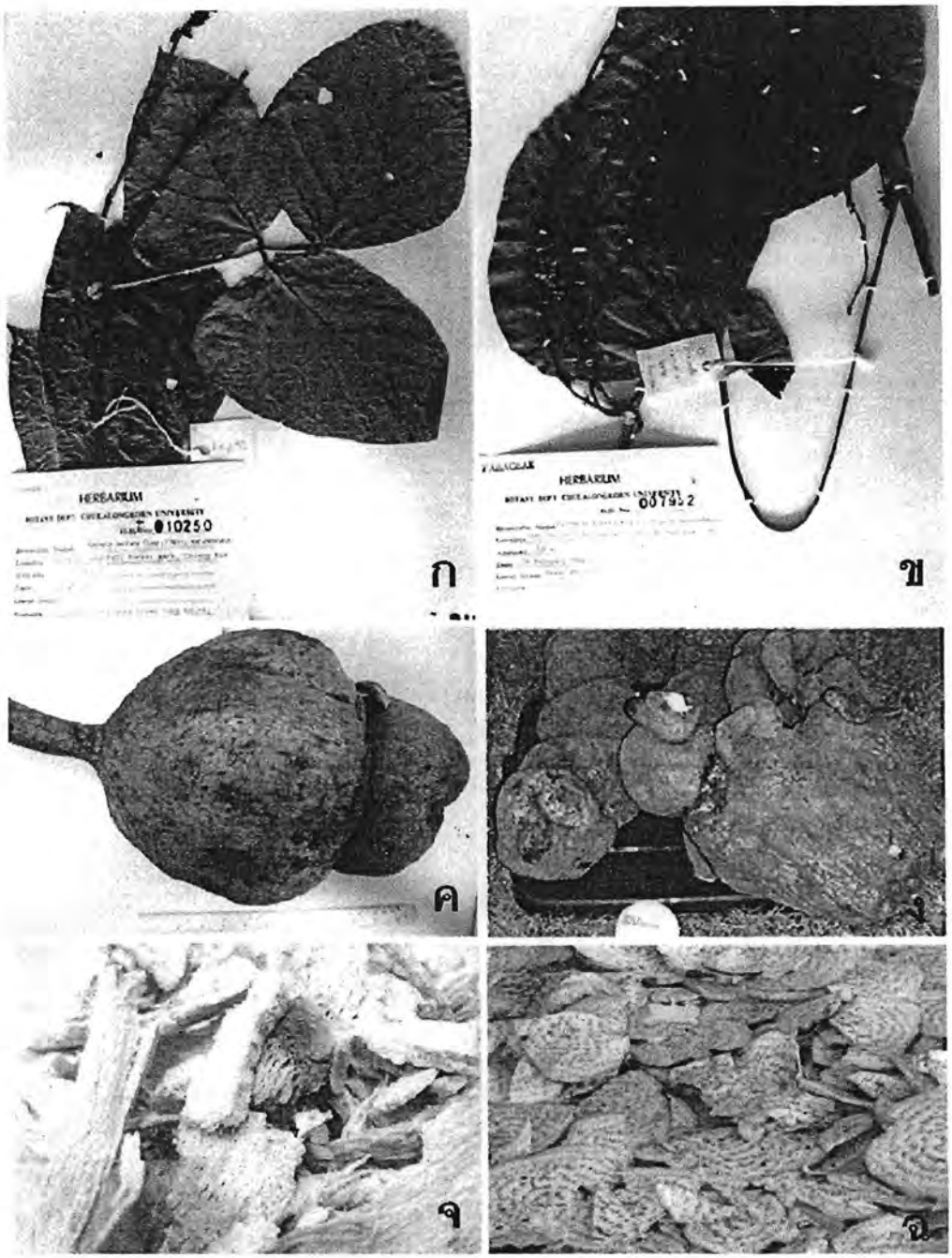
ตัวอย่างพืช	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดแป้ง (ไมครอน)
Wichai-3	3.63 ± 0.28**
SMP-1	4.27 ± 0.30**
SMP-3	3.73 ± 0.31**
SMP-2	6.13 ± 0.60

** แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SMP-2

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนของเม็ดแป้งในตัวอย่างผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ต่างๆ (Wichai-3, SMP-1 และ SMP-3) และสบู่เลือด (SMP-2)

ตัวอย่างพืช	จำนวนเม็ดแป้งในครอบพื้นที่ขนาด 0.16 มม.^{2}
Wichai-3	36.60 ± 0.88
SMP-1	38.70 ± 1.01*
SMP-3	40.70 ± 0.63*
SMP-2	35.20 ± 1.16

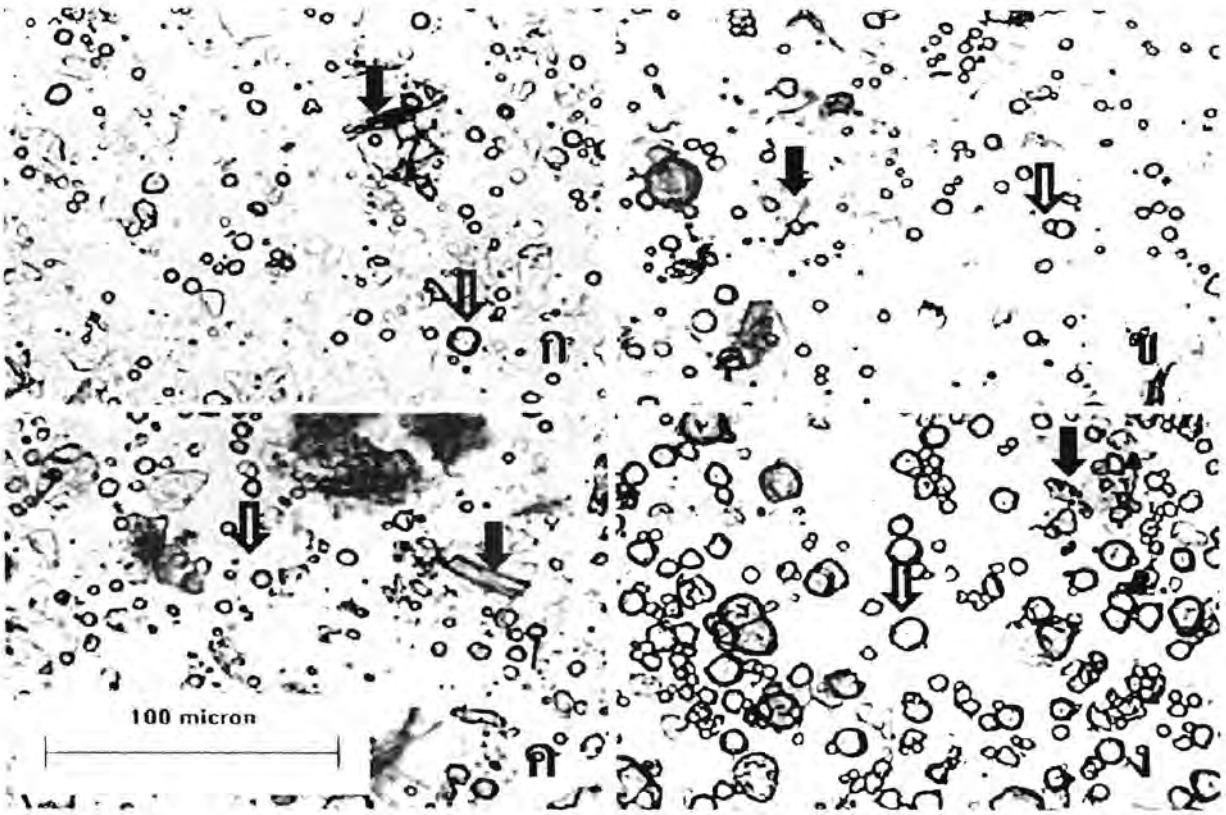
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SMP-2



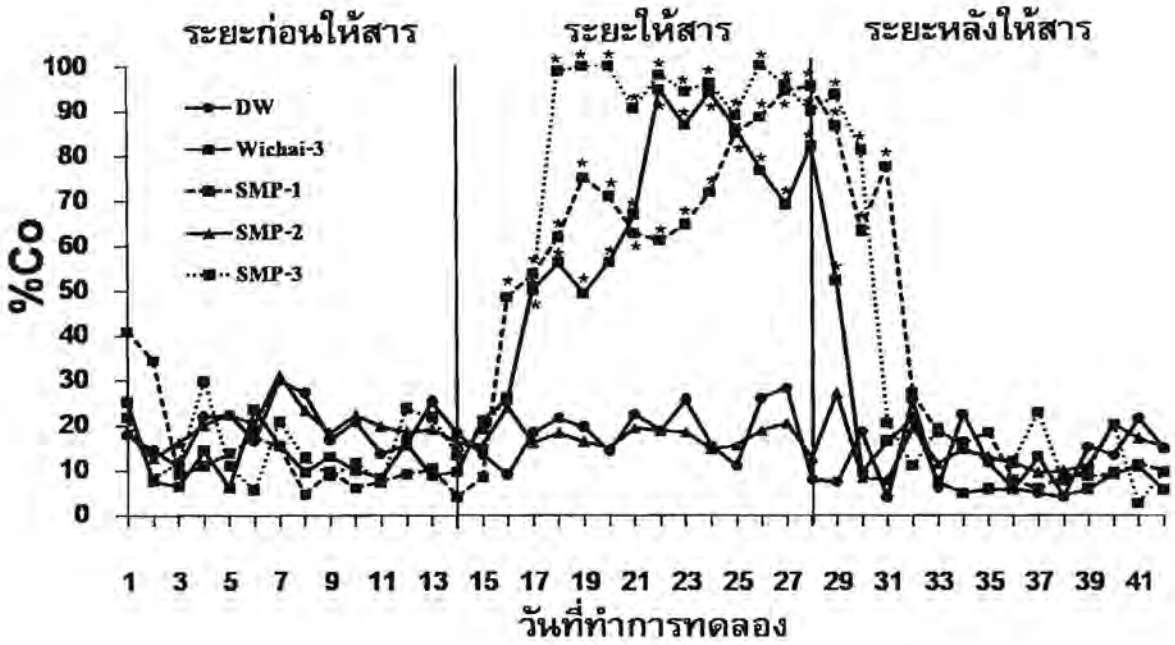
ภาพที่ 1 ก และ ข แสดงภาพตัวอย่างของใบและกิ่งของกวาวเครือขาว หมายเลข BCU007952 และ BCU010250 จากพิพิธภัณฑ์พืช ศาสตราจารย์กสิน สุวะตะพันธุ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค และ จ แสดงภาพหัวและเนื้อในหัวของตัวอย่างพืชที่ได้จากจังหวัดเชียงใหม่ (SMP-1) และจากการตรวจสอบใบ กิ่ง หัว และเนื้อในหัว พบว่าเป็นกวาวเครือขาว

ง และ ฉ แสดงภาพหัวและเนื้อในหัวของตัวอย่างพืชที่ได้จากจังหวัดอุบลราชธานี (SMP-2) และจากการตรวจสอบใบ กิ่ง หัว และเนื้อในหัว พบว่าเป็นสบู่เลือด



ภาพที่ 2 แสดงภาพผงบดละเอียดของกวาวเครือขาว Wichai-3 (ก) SMP-1 (ข) SMP-3 (ค) และผงบดละเอียดของสบู่เลือด SMP-2 (ง) โดยปลายลูกศรชี้เม็ดแป้ง (⇓) และเส้นใย (↓) ที่ถูกบดเป็นท่อนสั้นๆ



ภาพที่ 3 แสดงร้อยละของ Cornified cell (%Co) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ และให้สารแขวนลอยของกวาวเครือขาว (Wichai-3, SMP-1 และ SMP-3) สบู่เลือด (SMP-2) และน้ำกลั่น (DW) ทางปาก ทุกวัน นาน 14 วัน

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระยะก่อนให้สาร

เอกสารอ้างอิง

ปุญมณี กาญจนวรกุล, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, อรพินท์ จินตสถาพร, ส่งศรี มหาสวัสดิ์ (2549) ผลของกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตและการใช้ประโยชน์อาหารในปลาคุกลูกผสม การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 535-544

รุ่งกานต์ กล้าหาญ, อรพินท์ จินตสถาพร, ประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ, ส่งศรี มหาสวัสดิ์, ศรีน้อย ชุ่มคำ (2546) ประสิทธิภาพของกวาวเครือขาวต่อการเจริญเติบโตและระบบสืบพันธุ์ในปลานิล การประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 111-118

สมโภชน์ ทับเจริญ, วาณี ชันวัฒนสิน, เกรียงศักดิ์ สอาครักษ์, หนูจันทร์ มาตา (2546) ระดับที่เหมาะสมของการใช้กวาวเครือขาวในสูตรอาหารกระต่ายระยะรุ่น-ขุน, การประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร, 284-290

สมโภชน์ ทับเจริญ (2551) การใช้กวาวเครือขาวช่วยในการคัดเลือกสุกรสาวทดแทน วารสารปศุสัตว์เกษตรศาสตร์, 35 (138) 18-24

สมโภชน์ ทับเจริญ, เกรียงศักดิ์ สอาครักษ์, อรทัย ไตรวุฒานนท์, สุชาติ สงวนพันธุ์, อรประพันธ์ ส่งเสริม, อรรถวุฒิ พลายบุญ, มณฑาทิพย์ ยุ่นฉลาด, ประนอม เดชวิสิฐสกุล, ธีรวุท ปิ่นทอง, วุฒิชัย นุตกุล, คาราวรรณ ปิ่นทอง **(2550)** ผลการใช้กวาวเครือขาวในไก่ลูกผสมพื้นเมืองและไก่กระทง วารสารสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วิทยาศาสตร์), 39 (1) 39-64

Chansakaow, S., Ishikawa, T., Seki, H., Sekine, K., Okada, M., Chaichantipyuth, C. (2000). Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact. J Nat Prod, 63 (2) 173-175

Cherdshewasart, W., Kitsamai, Y., Malaivijitnond, S. (2007a). Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. J Reprod Dev, 53 (2) 385-393

Cherdshewasart, W., Sriwatcharakul, S., Malaivijitnond, S. (2008). Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. Maturitas, 61 (4) 350-357

Cherdshewasart, W., Subtang, S., Dahlan, W. (2007b). Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich- herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. J Pharm Biomed Anal, 43 (2) 428-434

Cherdshewasart, W., Sutjit, W., Pulcharoen, K., Chulasiri, M. (2009). The mutagenic and antimutageniceffects of the trad itional phytoestrogen-rich herbs, *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata*. Braz J Med Bioi Res, 42 (9) 816-823

Chindewa, R., Lapanantasin, S., Sanvarinda, Y., Chongthammakun, S. (2008). *Pueraria mirifica*, phytoestrogen-induced change in synaptophys in expression via estrogen receptor in rat hippocampal neuron. J Med Assoc Thai, 91 (2) 208-14

Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W. (2003). Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. J Ethnopharmacol, 89 (2-3) 261-264

Jaroenporn, S., Malaivijitnond, S., Wattanasirmkit, K., Trisomboon, H., Watanabe, G., Taya, K., Cherdshewasart, W. (2006). Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. Endocrine, 30 (1) 93-101

Jonhson, MH. (2010) Essential reproduction. 6th edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK, 95

Likhitwitayawuid, K., Dej –adisai, S., Jongbunprasert, V., Krungkrai, J. (1999). Antimalarials from *Stephania venosa*, *Prismatomeris sessiliflora*, *Diospyros montana* and *Murraya siamensis*. Planta Med, 65 (8) 754-756

Malaivijitnond, S., Chansri, K., Kijkuokul, P., Urasopon, N., Cherdshewasart, W. (2006). Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herbs. J Ethnopharmacol, 107 (3) 354-360

Malaivijitnond, S., Kiatthaipipat, P., Cherdshewasart, W., Watanabe, G., Taya K. (2004). Different effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and ma le rats. J Pharmacol Sci, 96 (4) 428- 435

Malaivijitnond, S., Tungmunnithum, D., Gittarasanee, S., Kawin K., Limjunyawong, N. (2010). Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. Filoterapia, 81 569-576

Muangman, V., Cherdshewasart, W. (2001). Clinicaltrial of the phytoestrogenrich herb, *Pueraria mirifica* as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal women. Siriraj Hosp Gaz, 53 300-309

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Taya, K. (2004). Estrogenic effects of *Pueraria mirifica* on the menstrual cycle and hormones- related ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys. J Pharmacol Sci, 94 (1) 51-59

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Taya, K. (2005). Ovulation block by *Pueraria mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. Endocrine, 26 (1) 33-39

Trisomboon, H., Malaivijitnond, S., Watanabe, G., Cherdshewasart, W., Taya, K. (2006). The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine, 29 129-134

Urasopon, N., Hamada, Y., Asaoka, K., Cherdshewasart, W., Malaivijitnond S. (2007). *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas, 56 (3) 322- 331

Urasopon, N., Hamada, Y., Asaoka, K., Poungmali, U., Malaivijitnond, S. (2008a). Isoflavone contents in rodent diets and its estrogenic effect on vaginal cornification in *Pueraria mirifica*-treated rats. Science Asia, 34 (4) 371-376

Urasopon, N., Hamada, Y., Cherdshewasart, W., Malaivijitnond, S. (2008b). Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas, 59 (2) 137-148

PL-05

Phytoestrogen from a Thai herb promise major advances to women health

Suchinda Malaivijitnond

Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand **E-mail: Suchinda.M@chula.ac.th**

Osteoporosis, breast cancer and reproductive function abnormalities are the major health problems and the big concerns for women in the world. The main factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex steroid hormone, estrogens. Therefore, many synthetic estrogens (analogue, agonist or antagonist of estrogens) are being sought to cure the symptoms. By using those synthetic estrogens, however, it is not only because it has a high cost but because it also has undesirable side effects, it therefore does not appropriate to use by Thai women. *Pueraria mirifica* (PM) is an endemic Thai herb which commonly found throughout Thailand, especially in the North. It contained at least 17 phytoestrogens, mainly isoflavones. The first identified phytoestrogen was miroestrol in the year 1960. Phytoestrogens found in PM are structurally and functionally similar to 17β-estradiol, but it binds mainly to the estrogen receptor beta (ERβ). PM's roots have been used in Thai traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal symptoms for more than 60 years; ordinary dose of PM consumed in native Thai people is 200 mg/day (or 4 mg/kg). Thus, the PM should be considered for an alternative choice of estrogen replacement therapy in women. We here assessed estrogenic activities of PM on stimulating reproductive organs, preventing and curing osteoporosis and suppressing breast cancers in mice, rats, monkeys and humans. PM induced increase of uterus weights and vaginal cornification, suppressed serum LH and FSH levels and decreased body weight gain in ovariectomized mice and rats. In adult female monkeys, PM increased the length of menstrual cycles or induced cessation of menstruation via suppression of folliculogenesis and ovulation. Changes of LH, FSH, E_2 and P_4 levels were congruent with changes in menstrual cycle lengths. In aged female monkeys, serum FSH, LH and E_2 levels were dose-dependently decreased after PM treatment and showed a rebounded increase after the cessation. In perimenopausal women, the PM intake could alleviate the climacteric symptoms, such as hot flushes, frustration, sleep disorder, skin dryness, high blood cholesterol, oligomenorrhea and amenorrhea. PM dose-dependently reduced the tumoriogensis and tumor growth in NMU-induced rats. Feedings of PM in female rats significantly prevented bone loss induced by ovariectomy and could slow the progress of the occurred osteoporosis. Based on these results, the use of PM should promise major advances to women's health. It can be used as a contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replacement therapy for osteoporosis and alleviation of climacteric symptoms in postmenopausal women, with a great benefit on no undesirable side effect on breast cancer stimulation.

Abstract of the 14th Biological Sciences Graduate Congress

10th -12th December, 2009, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

3.1. วิทยากรรับเชิญ (Keynote speaker)

-Malaivijitnond S. 2009. Phytoestrogens from a Thai herb promise major advances to women's health. Biological Science Graduate Congress. 10-12 December 2009. Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

EFFECT OF DIETARY PHYTOESTROGENS ON RODENT, MONKEY AND HUMAN PHYSIOLOGY

Suchinda Malaivijitnond[1*], *Nontakorn Urasopon*[2], *Somrudee Hanmanop*[1], *Ubon Chimsakul*[1], *Sukanya Jaroenporn*[1], *Wichai Cherdshewasart*[1], *Gen Watanabe*[3], *Kazuyoshi Taya*[3]

[1]Primate Research Unit, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand
[2]Faculty of Agriculture, Ubon Rajathanee University, Thailand
[3]Tokyo University of Agriculture and Technology, Tokyo, Japan
E-mail: suchinda.m@chula.ac.th

Osteoporosis, breast cancer and reproductive function abnormalities are the major health problems and the big concerns for women in the world. The main factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex steroid hormone, estrogens. By using the synthetic estrogens, however, it is not only because it has a high cost but because it also has undesirable side effects. *Pueraria mirifica* (PM) is an endemic Thai herb which commonly found throughout Thailand. It contained at least 17 phytoestrogens. Phytoestrogens found in PM are structurally and functionally similar to 17β-estradiol, but it binds mainly to the estrogen receptor-β. PM's roots have been used in Thai traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal symptoms for more than 60 year. Thus, we here assessed estrogenic activities of PM stimulating reproductive organs, preventing and curing osteoporosis and suppressing breast cancers in mice, rats, monkeys and humans. PM increase of uterus weights and vaginal cornification, increased the length reproductive cycles via suppression of folliculogenesis and ovulation in rats and monkeys. In perimenopausal women, the PM intake could alleviate the climacteric symptoms, such as hot flushes, frustration, sleep disorder, skin dryness, high blood cholesterol, oligomenorrhea and amenorrhea. PM dose-dependently reduced the tumoriogensis and tumor growth in NMU-induced rats. Feedings of PM in female rats significantly prevented bone loss induced by gonadectomy. Additionally, high dose of PM treatment also exhibited the therapeutic effect on bone loss in female rats. Based on these results, the use of PM should promise major advances to women's health. It can be used as a contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replacement therapy for osteoporosis and alleviation of climacteric symptoms in menopausal women, with a great benefit on no undesirable side effect on breast cancer stimulation.

Key Words: *Pueraria mirifica*, phytoestrogens, osteoporosis, breast cancer, monkeys

3.2. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-Malaivijitnond S, Urasopon N, Hammanop S, Chimsakul U, Jaroenporn S, Chershewasart W, Watanabe G, Taya K.2009. Effect of Dietary Phytoestrogens on Rodent, Monkey and Human Physiology. The 3rd International Congress on the Future of Animal Research "Biomedical and Field Research with Non-human Primates", 19-22 November 2009, Rose Garden Riverside, Nakhon Pathom, Thailand

O32

Preventive and therapeutic effects of Pueraria mirifica herb-containing phytoestrogens on bone loss

S. Malaivijitnond[1], N. Urasopon[2], S. Hammanop[1], U. Chimsakul[1], W. Tiyasatkulkovit[1] and S. Jaroenporn[1]

[1]Primate Research Unit, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, [2]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ubon Rajathanee University, Thailand.
suchinda.m@chula.ac.th

Osteoporosis is a major public health problem in aging population. Though estrogen is effective in reducing bone loss, it associates with a high risk of breast and endometrium cancers. The alternative drugs for bone loss therapy with less undesirable side effects need to be sought. The present study determined preventive and therapeutic effects of Pueraria mirifica Thai herb, which contains a high amount of phytoestrogens, on bone loss in fully mature female and male rats. For the preventive effect study, 6 months old female and male rats were gonadectomized and subsequently fed with suspensions of P. mirifica at the concentration of 0, 10, 100 or 1000 mg/kg BW/day (PM-0, PM-10, PM-100 and PM-1000, respectively) or 0.1 mg/kg BW/day of 17α-ethinylestradiol (EE) for 3 months. For the therapeutic effect study, rats were gonadectomized and kept for 3 months, for bone loss induction, and then were fed with the suspensions as described above for 3 months. Changes of bone mineral density, bone mineral content, bone histomorphometry, serum bone markers, and sex organ weights were determined. Bone loss was significantly induced by gonadectomy and it was dose-dependently prevented by P. mirifica treatment for 3 months in female as well as in male rats. At PM-100 and PM-1000, bone loss was completely prevented, as expected, comparable to those in the EE group. Surprisingly, PM-1000 also exhibited the therapeutic effect on bone loss in both sexes of rats as in the EE group: Though weights of seminal vesicle and ventral prostrate gland in orchidectomized rats were not altered by P. mirifica, the uterus weights were dose-dependently increased in ovariectomized rats. The results suggest that P. mirifica may be applicable for prevention and therapeutics on osteoporosis in andropausal men and menopausal women; however, an undesirable side effect on stimulating female reproductive organs should be concerned.

3.3. นำเสนอผลงานแบบปากเปล่า

- Malaivijitnond S, Urasopon N, Hammanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn S. 2010. Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestrogens on bone loss. The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 64.

P19

The therapeutic effects of White Kwao Krua Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabandhu on ovariectomy – induced osteoporotic rats

S. Hanmanop[1] and S. Malaivijitnond[2]

[1]Physiology M.Sc. Program, Graduated School, [2]Primate Research Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
Hanmanop@hotmail.com

Pueraria mirifica Airy Shaw & Suvatabundhu (PM) is a Thai indigenous herb. Its tuberous roots contain several isoflavonoid compounds which could prevent bone loss in gonadectomized rats. In the present study, the therapeutic effects of PM on bone loss in osteoporotic rats have been investigated. Six months old female rats were ovariectomized (OVX) or sham operated (SH) on day 0 and were kept for 90 days to induce bone loss. On day 90, five rats in each group (OVX_{90} and SH_{90} groups) were randomly selected, euthanized and left tibia were collected for histomorphometry study and kept as a base-line value. The remaining SH rats (SH_{180}) were gavaged daily with distilled water for 90 days. The OVX were randomly divided into five groups, PM0, PM10, PM100, PM1000 and EE groups which were gavaged daily with 0, 10, 100 and 1,000 mg/ kg BW/ day of PM and 0.1 mg/ kg BW/ day of 17-α ethinylestradiol, respectively, for 90 days, and were sacrificed on day 180. The left tibia was removed for bone histomorphometry study. Ninety days after ovariectomy the trabecular bone area in OVX_{90} group was lower than the SH_{90} group by 65.42%, indicating that bone loss was successfully induced by ovariectomy. After 90 days of PM or EE treatment, the trabecular bone area in PM1000 and EE groups was significantly higher than the PM0 group by 65.80% and 79.46% ($p<0.05$) , and rather higher than that of OVX_{90} group by 1.64% and 10.91%. However, the increase in trabecular bone area in PM1000 and EE groups was still lower that of the SH_{180} group by -54.77% and -51.04%. These results indicate that PM consumption could significantly prevent bone loss and tend to reverse the established bone loss in osteoporotic rats.

☑ 4. นำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

-Hanmanop S, Malaivijitnond S. 2010. The therapeutic effects of white Kwao Krua *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabanhdu on ovariectomy-induced osteoporotic rats. The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE), Palmerston North, New Zealand, January 19-22, 2010. pp. 86.

Reproductive Endocrine Research on *Pueraria Mirifica* Herb and Its Estrogenic Efficacy

รศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์

Reproductive function abnormalities are the major health problems and the big concerns for women in the world. The main factors causing those symptoms are the disorder or the deficiency of sex steroid hormone, estrogens. Therefore, many synthetic estrogens (analogue, agonist or antagonist of estrogens) are being sought to cure the symptoms. By using those synthetic estrogens, however, it is not only because it has a high cost but because it also has undesirable side effects, it therefore does not appropriate to use by Thai women. Thus *Pueraria mirifica* herb, known in Thai as white Kwao Krua, containing at least 17 phytoestrogens (Cherdshewasart et al., 2007a; Urasopon et al., 2008a) should be considered as an alternative choice of estrogen replacement therapy in women. Phytoestrogens found in *P. mirifica* are structurally and functionally similar to 17β-estradiol, but it binds mainly to the estrogen receptor beta (ERβ) (Kuiper et al., 1997; 1998). *P. mirifica's* roots have been used in Thai traditional medicine to rejuvenate and remedy the postmenopausal symptoms for more than 60 years; ordinary dose of *P. mirifica* consumed in native Thai people is 200 mg/day (or 4 mg/kg) (Muangman and Cherdshewasart, 2001). We here assessed estrogenic activities of *P. mirifica* on reproductive organs and fertility in both sexes of mice and rats and in female monkeys.

4. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

4.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

-Malaivijitnond S. 2010. Reproductive endocrine research: A case study of *Pueraria mirifica*. อบรมวิชาการสรีรวิทยาชพยาธิสรีรวิทยา ครั้งที่ 28 ประจำปี 2553. ณ อาคารแพทยพัฒน์ ห้อง 230/1 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 17-21.

The isoflavone contents in *P. mirifica* tuberous roots vary widely between locations (Cherdshewasart et al., 2007b), between seasons (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007), and even between roots of the same plant (Urasopon et al., 2008a). The estrogenic activity of wild *P. mirifica's* tuberous roots collected from 28 out of 76 provinces of Thailand was tested by MCF-7 proliferation assay (Cherdshewasart et al., 2008), vaginal cornification assay (Cherdshewasart et al., 2007b) and uterotropic assay (Malaivijitnond et al., 2006). The tuberous root of *P. mirifica* collected from Chiang Mai province which had an optimal tuber size and growth rate and showing a high estrogenic activity was chosen for the study, and hereafter named *P. mirifica* cultivar Wichai-III. A voucher specimen of *P. mirifica* (No. BCU 11405) is deposited at the herbarium of the Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University (Cherdshewasart et al., 2007b).

An oral administration of 1,000 mg/kg BW/day of *P. mirifica* suspension decreased the serum luteinizing hormone (LH) levels in both orchidectomized and ovariectomized rats and decreased the serum follicle stimulating hormone (FSH) levels only in ovariectomized rats (Malaivijitnond et al., 2004). The reductions of serum LH and FSH levels in female rats were greater than those of male rats. *P. mirifica* induced increase in uterus weights and vaginal proliferation, and decreased body weight gain in ovariectomized rats. In adult female monkeys, *P. mirifica* increased the length of menstrual cycles or induced cessation of menstruation via suppression of folliculogenesis and ovulation (Trisomboon et al., 2004; 2005; 2007a). Changes of LH, FSH, estradiol (E2) and progesterone (P4) levels were congruent with changes in menstrual cycle lengths (Trisomboon et al., 2004; 2005; 2007a). In aged female monkeys, serum FSH, LH and E2 levels were dose-dependently decreased after *P. mirifica* treatment and showed a rebounded increase after the cessation (Trisomboon et al., 2006a; 2007b). Moreover, *P. mirifica* could exhibit the estrogenic effect on sex skin of aged female monkeys (Trisomboon

et al., 2006b). An oral administration of 100 mg/kg BW/day of *P. mirifica* for 8 weeks decreased the mating efficiency in female mice (Jaroenporn et al, 2007), though it did not affect fertility in male mice (Jaroenporn et al., 2006). Based on these results, the use of *P. mirifica* should promise major advances to incur a reproductive function in women. It might be used as a contraceptive drug in premenopausal women and as an estrogen replacement therapy, viz. for alleviation of climacteric symptoms, in postmenopausal women. Regarding to the recent results showing that *P. mirifica* dose-dependently reduced the tumoriogenesis and tumor growth in NMU or DMBA-induced rats (Chedshewasart et al., 2007c; Wannaprasert et al., 2007), use of *P. mirifica* to incur a reproductive function in women should have a great benefit on no undesirable side effect on breast cancer stimulation. As we also discovered that *P. mirifica* could prevent bone loss induced by gonadectomy in female and male rats (Urasopon et al., 2007; 2008b) and could slow the progress of the occurred osteoporosis (Malaivijitnond et al., 2010), *P. mirifica* should also be one of the alternative choices for osteoporosis treatment in humans.

Key words: ***Pueraria mirifica*, phytoestrogens, reproduction, mice, rats, monkeys**

References

1. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S. Major isoflavonoid contents of the 1-year-cultivated phytoestrogen-rich herb, *Pueraria mirifica*. Bioscience, biotechnology, and biochemistry 2007; 71: 2527-33.
2. Cherdshewasart W, Subtang S, Dahlan W. Major isoflavonoid content of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2007; 43: 428-34.
3. Cherdshewasart W, Kitsamai Y, Malaivijitnond S. Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay. Journal of Reproduction and Development 2007; 53: 385-93.
4. Cherdshewasart W, Panriansaen R, Picha P. Pretreatment with phytoestrogen-rich

plant decreases breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERα and ERβ. Maturitas 2007; 58:174-81.

5. Cherdshewasart W, Trisup V, Picha P. Determination of the estrogenic activity of wild phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 proliferation assay. Journal of Reproduction and Development 2008; 54 :63-7.
6. Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmkit K, Trisomboon H, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Effects of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. Endocrine 2006; 30: 93-101.
7. Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmkit K, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Assessment of fertility and reproductive toxicity in adult female mice after long-term exposure to *Pueraria mirifica*. Journal of Reproduction and Development 2007; 53 :995-1005.
8. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Endocrinology 1997; 138: 863-70.
9. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Endocrinology 1998; 139: 4252-63.
10. Malaivijitnond S, Kiatthaipipat P, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya [illegible] effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and [illegible] tion in gonadectomized female and male rats. Journal of Pharmacological [illegible] 2004; 96: 428-35.
11. Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. Journal of Ethnopharmacology 2006; 107 :354-60.
12. Malaivijitnond S, Urasopon N, Hammanop S, Chimsakul U, Tiyasatkulkovit W, Jaroenporn S. Preventive and therapeutic effects of *Pueraria mirifica* herb-containing phytoestrogens on bone loss. *The 6th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE)*, Palmerston North, New Zealand 2010; 19-22.
13. Muangman V, Cherdshewasart W. Clinical trial of the phytoestrogen-rich herb, Pueraria mirifica as a crude drug in the treatment of symptoms in menopausal women. Siriraj Hosp Graz 2001; 3: 300-8.
14. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. Estrogenic effects of *Pueraria*

mirifica on the menstrual cycle and hormones-related ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys. Journal of Pharmacological Sciences 2004;94: 51-9.

15. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Taya K. Ovulation block by *Pueraria mirifica*: a study of its endocrinological effect in female monkeys. Endocrine 2005; 26: 33-9.
16. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Watanabe G, Cherdshewasart W, Taya K. The Estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. Endocrine 2006; 29:129-34.
17. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. Effect of *Pueraria mirifica* on the sexual skin coloration of aged menopausal cynomolgus monkeys. Journal of Reproduction and Development 2006; 52:537-42
18. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. Assessment of urinary gonadotropin and steroid hormone profiles of female cynomolgus monkeys after treatment with *Pueraria mirifica*. Journal of Reproduction and Development 2007; 53: 395-403.
19. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Cherdshewasart W, Watanabe G, Taya K. The Prominence of *Pueraria mirifica* herb containing phytoestrogens on the urinary gonadotropin and estradiol levels in aged menopausal monkeys. Animal Science Journal 2007; 78: 378-86.
20. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevents bone loss in orchidectomized rats. Maturitas 2007; 56: 322-31.
21. Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K, Ubon Poungmali, Malaivijitnond S. Isoflavone contents in rodent diets and its estrogenic effect on vaginal cornification in *Pueraria mirifica*-treated rats. Science Asia 2008; 34: 371-6.
22. Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. Maturitas 2008; 59:137-48.
23. Wannaprasert T, Malaivijitnond S, Poungmali U, Cherdshewasart W. Effects of *Pueraria mirifica* on mammary tumorigenesis in N-nitroso-N-methyl-induced rats. *The 9th National Cancer Conference in Celebrations on the Auspicious Occasion of His Majecty the King's 80th Birthday Anniversary, 5th* 2007; 180: 12-4.