ผลของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* ต่อเนื้อเยื่อกระดูก
ของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ระยะโตเต็มวัย

นางสาวชัญญาพัชญ์ แสนเทศธัญวัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* EXTRACT ON BONE TISSUE OF ADULT RICE FIELD FROG *Hoplobatrachus rugulosus*

Miss Chanyapatch Saenthetthanyawat

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Zoology
Department of Biology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* ต่อเนื้อเยื่อกระดูกของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ระยะโตเต็มวัย
โดย	นางสาวชัญญาพัชญ์ แสนเทศธัญวัฒน์
สาขาวิชา	สัตววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงแข สิทธิเจริญชัย)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ ดร.นพดล กิตนะ)

.....กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ดวงใจ บุญกุศล)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ชัญญาพัชญ์ แสนเทศธัญวัฒน์ : ผลของสารสกัดกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* ต่อเนื้อเยื่อกระดูกของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ระยะโตเต็มวัย (EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* EXTRACT ON BONE TISSUE OF ADULT RICE FIELD FROG *Hoplobatrachus rugulosus*) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.วิเชฏฐ์ คนซื่อ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ, หน้า.

ในปัจจุบันมีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* (PM) ต่อเนื้อเยื่อกระดูกของสัตว์เลือดอุ่นได้แก่ หนูและลิงเป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่พบการศึกษาในสัตว์เลือดเย็น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศ การเติบโต ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนและความหนาแน่นและเนื้อเยื่อกระดูกของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* โดยสกัดผงกวาวเครือขาวด้วย 95% เอทานอลด้วยวิธีซอกซ์เลต ซึ่งได้เปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับร้อยละ 4.79 เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงและตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนด้วยวิธี vaginal cytology assay และ uterotrophic assay พบว่ามีสาร puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ปริมาณ 7.49, 0.71, 0.56, 0.78 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อสารสกัดหยาบ 100 กรัมตามลำดับ และมีฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนต่อหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ หลังจากนั้นนำสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวเคลือบลงบนอาหารที่ใช้เลี้ยงกบนา 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม control, กลุ่ม positive control (E2), PM10 (10 ppm), PM100 (100 ppm) และ PM1000 (1000 ppm) ตั้งแต่ระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis) จนอายุ 3 เดือนใน 2 ช่วงฤดูกาลคือในฤดูสืบพันธุ์ (เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม) และนอกฤดูสืบพันธุ์ (เดือนกันยายนถึงเดือนธันวาคม) ผลการศึกษาพบว่า 1) สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวทำให้เกิดภาวะเพศกำกวม (intersex) ในกบนาทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ และทำให้น้ำหนักและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM100 ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM1000 มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในฤดูสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM100 นอกฤดูสืบพันธุ์มีค่าน้อยอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวสามารถกระตุ้นหรือยับยั้งให้มีการผลิตเอสโตรเจนภายในร่างกายจากแหล่งต่าง ๆ ให้มากขึ้นหรือน้อยลงได้ 2) สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวมีผลอ่อนต่อความหนาแน่นกระดูก โดยพบว่า ความหนาแน่นของกระดูกต้นขาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ ในขณะที่ความหนาแน่นของกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM10, PM100 และ PM1000 ที่ตำแหน่ง metaphysis มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในฤดูสืบพันธุ์ โดยพบว่าสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวมีผลทำให้ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียมีค่าน้อยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจากการทดลองทั้งหมดจะเห็นได้ว่า ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวนั้นจะมีผลต่อกบนาเพศเมียมากกว่ากบนาเพศผู้ทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5471940323 : MAJOR ZOOLOGY
KEYWORDS: AMPHIBIAN / WHITE KWAO KRUA / BONE / PLASMA ESTROGEN LEVELS / RICE FIELD FROG

CHANYAPATCH SAENTHETTHANYAWAT: EFFECTS OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* EXTRACT ON BONE TISSUE OF ADULT RICE FIELD FROG *Hoplobatrachus rugulosus*. ADVISOR: ASST. PROF. WICHASE KHONSUE, Ph.D., CO-ADVISOR: NOPPADON KITANA, Ph.D., pp.

At present, effects of *Pueraria mirifica* (PM) crude extract on bone tissue has been well studied in endotherms such as rat and monkey, while little or no information is available for ectotherms. The current research thus aims to examine effects of the PM crude extract on sex ratio, growth, plasma estradiol level, bone mineral density (BMD) and bone tissue of the rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus*. PM powder was extracted with 95% ethanol by a Soxhlet extractor. The extraction yield of PM was 4.79%. The crude extract was analyzed for phytoestrogens using high performance liquid chromatography and analyzed for estrogenic activity using vaginal cytology and uterotrophic assays. Chemical analyses showed that the crude extract composed of puerarin, daidzin, genistin, daidzein and genistein at the amounts of 7.49, 0.71, 0.56, 0.78 and 0.00 mg in 100 g of PM, respectively. The PM also showed positive estrogenic activity in ovariectomized rats. The extract was then coated onto commercial food pellets and fed to 5 experiment groups as follows: control (no crude extract), positive control (E2), PM10 (10 ppm crude extract), PM100 (100 ppm crude extract) and PM1000 (1,000 ppm crude extract) groups. Treatment started from a completed metamorphosis stage until the fully-grown stage for a period of 3 months in both breeding season (May to August) and Non-breeding season (September to December). The result showed that, firstly, the PM crude extract could induce the intersex in frogs in both seasons, significantly decrease the body weight and snout-to-vent length of female frogs in breeding season, significantly increase plasma estradiol level of female PM1000 frogs in breeding season, and significantly reduced plasma estradiol level of female PM100 frogs in non-breeding season. This suggested that effect of the PM crude extract on estradiol secretion in frog body could be both stimulation and suppression. Secondly, the result showed that the PM crude extract showed mild effect on bone mineral density with no significant effects on femoral bone in both seasons. Significant effects of the PM extract was found only in metaphysis of tibiofibular bone in female frogs in breeding season when treatment with PM10, PM100 and PM1000 significantly reduce BMD of the frogs. Overall, the PM crude extract showed greater effect in female frogs compared to male frogs.

Department:	Biology	Student's Signature	.....
Field of Study:	Zoology	Advisor's Signature	.....
Academic Year:	2014	Co-Advisor's Signature	.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นิพนธ์เล่มนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีได้เลยหากขาดความกรุณา เมตตาอย่างยิ่งยวด ของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วิเชฏฐ์ คนซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำ ตรวจแก้ และปรับปรุง ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นมาก รวมทั้งเอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์ และห้องปฏิบัติการในการวิจัยครั้งนี้ พร้อมทั้งความกรุณาในการอบรมสั่งสอนลูกศิษย์คนนี้ในด้านต่างๆ ทั้งที่เกี่ยวข้องงานวิจัยและในด้านอื่น ๆ ด้วยความเข้าใจและเมตตาเป็นอย่างมาก ซึ่งสิ่งต่าง ๆ ท่านอาจารย์ได้สั่งสอนนั้นลูกศิษย์คนนี้จะใช้ให้เกิดประโยชน์กับคนรอบข้างมากที่สุด และขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่ให้ทั้งความรู้ คำแนะนำ และสนับสนุนอย่างดียิ่งตลอดมา ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทั้งสองอย่างสูงในโอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงแข สิทธิเจริญชัย ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ดวงใจ บุญกุศล ที่ให้การสนับสนุนและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. จิรารัช กิตนะ อย่างยิ่งที่ให้คำแนะนำ ความช่วยเหลือ สนับสนุน เอื้อเฟื้อสถานที่ให้การทำงานวิจัย และอบรมสั่งสอนลูกศิษย์คนนี้ อาจารย์ ดร. ชัชวาล ใจซื่อกุล, อาจารย์ ดร. สุกัญญา เจริญพร, อาจารย์ ดร. วัชราภรณ์ ติยะสัตย์กุลโกวิท, อาจารย์ ดร. นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต, อาจารย์ ดร.นนทิวิชญ ตัณฑวณิช ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำ พร้อมทั้งสนับสนุน เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ และความรู้ความเข้าใจในการวิจัยนี้, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒทรา สวัสดี หน่วยวิจัยผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและแนะนำเทคนิคในการสกัดสาร, อาจารย์สมโภชน์ ทับเจริญ แห่งสถาบันวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม เอื้อเฟื้อผงกวาวเครือขาวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถานีวิจัยคัดเลือกและบำรุงพันธุ์สัตว์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน และเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวกอย่างดีตลอดการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณ คุณเอกชัย ปัญญาอินทร์ และ คุณปริญญา มารัตน์ สำหรับความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ คุณภานุพงศ์ ธรรมโชติ, คุณธงชัย ฐิติภูรี, คุณรชตะ มณีอินทร์, คุณภูมิ เตชชาติวนิช, คุณธฤษวรรณ ไตรจิตต์, คุณกิตติภูมิ จันทร์ศรี, คุณปัทมาศ ยะแสง, คุณขัตพันธุ์ จันทะวงษ์ศรี, คุณกุลพัฒน์ เจริญพรวัฒนา สำหรับการช่วยเหลือมิตรภาพ และกำลังใจที่สำคัญอย่างยิ่งให้สามารถแก้ไขปัญหาและก้าวผ่านอุปสรรคที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยและด้านอื่น ๆ มาได้ คุณดลพร กิตติวนิชย์กุล, คุณสโรชา สุทนต์ และ ดร. ปรวีร์ พรหมโชติ สำหรับคำแนะนำเรื่องการหาความหนาแน่นกระดูกในการวิจัยครั้งนี้

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการสนับสนุนให้นิสิตผลิตผลงานวิจัยภายใต้ระบบเครือข่ายวิชาการภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU-ANR-56-05), ทุน90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2556 และโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารีสนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง 1
สารบัญภาพ 1
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 หลักการและเหตุผล 1
1.2 วัตถุประสงค์ในการศึกษา 2
1.3 แผนการศึกษา 2
บทที่ 2 สืบสวนเอกสาร 3
2.1 กวาวเครือขาว 3
2.2 กบนา 10
2.3 กระดูก 13
2.4 ภาวะกระดูกบาง (osteopenia) 16
บทที่ 3 สารสกัดกวาวเครือขาวและการตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัด 18
3.1 บทนำ 18
3.2 วิธีการศึกษา 19
3.3 ผลการทดลอง 23
3.4 อภิปรายผลการทดลอง 27
บทที่ 4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเพศ น้ำหนัก ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย 29
4.1 บทนำ 29

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

4.2 วิธีการศึกษา 30
4.3 ผลการทดลอง 37
4.4 อภิปรายผลการศึกษา 43
บทที่ 5 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อมวลกระดูกและจุลกายวิภาคกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย 48
5.1 บทนำ 48
5.2 วิธีศึกษา 49
5.3 ผลการทดลอง 53
5.4 อภิปรายผลการศึกษา 71
บทที่ 6 สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ 74
6.1 สรุปผลการศึกษา 74
6.2 ข้อเสนอแนะ 78
รายการอ้างอิง 80
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 95

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตาราง 2-1 สารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาว (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552)..... 4

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม 6

ตาราง 4-1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาแต่ละเพศใน ฤดูสืบพันธุ์..... 40

ตาราง 4-2 น้ำหนักตัวและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาแต่ละเพศนอกฤดูผสม พันธุ์ 40

ตาราง 4-3 ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์..... 42

ตาราง 5-1 ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์ 54

ตาราง 5-2 ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์ 55

ตาราง 5-3 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาในกลุ่ม control ในและนอกฤดูสืบพันธุ์ 57

ตาราง 5-4 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาในกลุ่ม control ในและนอกฤดูสืบพันธุ์ 59

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

ภาพ 1-1 ขอบเขตในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศ การเติบโต ความหนาแน่น และเนื้อเยื่อกระดูกกบนาในระยะโตเต็มวัย 2

ภาพ 2-1 กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* สายพันธุ์ SARDI 190 4

ภาพ 2-2 กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834) 11

ภาพ 2-3 วงจรชีวิตของกบ (Garcia, 2015) 12

ภาพ 2-4 การเจริญของกระดูกแบบ endochondral ossification (Ortega *et al.*, 2004) 15

ภาพ 2-5 วงจรการปรับแต่งกระดูกในคน (Riggs and Parfitt, 2005) 16

ภาพ 2-6 ภาพที่ถ่ายด้วยรังสีเอ็กซ์เรย์ที่แสดงถึงภาวะกระดูกบางและความปกติของกระดูก long bone ในกบ new guinea tree frog โดย Stetter (1995) 17

ภาพ 3-1 ผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ SARDI 190 19

ภาพ 3-2 เครื่องซอกซ์เลต 20

ภาพ 3-3 เครื่องระเหยตัวทำละลาย 21

ภาพ 3-4 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ระเหยตัวทำละลายแล้ว 24

ภาพ 3-5 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ชนิด cornified (%Co) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้วที่ถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นตลอดการทดลอง (control) และกลุ่มที่ป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ในระยะเวลา 14 วัน ช่วงระยะก่อนทดลองและระยะทดลอง 25

ภาพ 3-6 น้ำหนักมดลูกของหนูแรทที่ตัดรังไข่นาน 7 วัน แล้วให้น้ำกลั่น (control) และสารสกัดกวาวเครือขาวในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันเป็นเวลานาน 7 วัน 26

ภาพ 3-7 โครมาโทแกรมแสดงสารไฟโตเอสโตรเจนกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบใน 27

ภาพ 4-1 การจำแนกลักษณะสัณฐานภายนอกของกบนาเพศผู้ (A) เพศเมีย (B) และเพศกำกวม (intersex; C) 33

ภาพ 4-2 การจำแนกลักษณะสัณฐานของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของกบนาเพศผู้ (A) เพศเมีย (B) และเพศกำกวม (intersex; C) 34

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาพ 4-3 จุลกายวิภาคของอัณฑะกบนาเพศผู้ ลักษณะเป็นท่อ seminiferous tubule 35

ภาพ 4-4 จุลกายวิภาคของรังไข่กบนาเพศเมีย มีลักษณะเป็นเซลล์ oocyte อยู่ภายใน 35

ภาพ 4-5 จุลกายวิภาคของอัณฑะกบนาเพศกำกวม (intersex) มีลักษณะเป็นท่อ seminiferous tubule อยู่บริเวณขอบของอัณฑะ บริเวณตรงกลางมีลักษณะเป็นเซลล์ oocyte อยู่ภายใน 36

ภาพ 4-6 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์ (พฤษภาคม 2556–สิงหาคม 2556) 38

ภาพ 4-7 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์ (กันยายน 2556–ธันวาคม 2556) 38

ภาพ 5-1 ตำแหน่ง epiphysis metaphysis และ diaphysis ของกระดูกต้นขา 51

ภาพ 5-2 ผลการวิเคราะห์หาค่ากระดูกส่วน cortical รวมกับ sub-cortical และส่วน trabecular 52

ภาพ 5-3 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) ในฤดูสืบพันธุ์ 63

ภาพ 5-4 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) นอกฤดูสืบพันธุ์ 64

ภาพ 5-5 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) ในฤดูสืบพันธุ์ 68

ภาพ 5-6 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) นอกฤดูสืบพันธุ์ 69

ภาพ 5-7 ภาพด้านซ้าย (กำลังขยาย 2.5 เท่า) และขวา (กำลังขยาย 10 เท่า) แสดงเนื้อเยื่อกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control ที่ตำแหน่ง metaphysis แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน cortical bone ลักษณะปกติ โดยตัวอักษร BMC แสดง Bone marrow cavity, สัญลักษณ์ลูกศร (⬆) แสดง Periosteum, ดอกจัน (*) แสดง cortical bone, สามเหลี่ยม (▼) แสดง Bone marrow cells 70

ภาพ 5-8 ภาพด้านซ้าย (กำลังขยาย 2.5 เท่า) และขวา (กำลังขยาย 10 เท่า) แสดงเนื้อเยื่อกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 ที่ตำแหน่ง metaphysis แสดงเนื้อเยื่อกระดูก cortical bone ที่มีลักษณะพรุน คล้าย spongy bone โดยตัวอักษร BMC แสดง Bone

marrow cavity, สัญลักษณ์ ลูกศร (⬆) แสดง Periosteum, ดอกจัน (*) แสดง cortical bone, สามเหลี่ยม (▼) แสดง Bone marrow cells..... 71

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 หลักการและเหตุผล

กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* เป็นพืชสมุนไพรไทยชนิดหนึ่งในวงศ์ Leguminosae ที่ประกอบไปด้วยสารไฟโตเอสโตรเจน 22 ชนิด (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) ซึ่งสารไฟโตเอสโตรเจนนี้ออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยสามารถที่จะจับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) มาแล้วทำให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพ จากการศึกษาการออกฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวที่ผ่านมาพบว่า การออกฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสายพันธุ์ ฤดูกาล และพื้นที่ปลูก (Cherdshewasart *et al.*, 2008; รัตนา ปานเรียนแสน, 2543)

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารประกอบเอสโตรเจน มีผลต่อการเจริญและการเติบโตของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Britson and Threlkeld, 1998; Diana *et al.*, 2000; Boone and James, 2003; Carr *et al.*, 2003; Jason *et al.*, 2004; Rohr and Palmer, 2005) และยังมีการรายงานว่าสารประกอบเอสโตรเจนและสารไฟโตเอสโตรเจนสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้โดยการรบกวนฮอร์โมนเพศในกระบวนการสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ (Saidapur *et al.*, 2001; Pettersson *et al.*, 2006; Jul-a-dung *et al.*, 2009; Uppanunchai *et al.*, 2011; Piprek *et al.*, 2012) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในกบนาพบว่าสมุนไพรกวาวเครือขาวสามารถที่จะป้องกันโรคและกระตุ้นการเจริญของกบนาได้ (ปรีชา สุวรรณ์, 2547)

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่เป็นสัตว์เศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื้อของกบนาอุดมไปด้วยโปรตีนที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น กบนาได้รับความนิยมไปอย่างแพร่หลายทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ (Niekisch, 1986; Tokur *et al.*, 2008; Warkentin *et al.*, 2009) และมีแนวโน้มว่ามูลค่าผลผลิตกบนาจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ดังนั้นจึงทำให้กบนาได้รับความสนใจและเป็นที่นิยมเลี้ยงอย่างมาก ซึ่งจากการศึกษาของ Yang *et al.* (2011) พบว่ากบ *Rana dybowski* ที่เลี้ยงในฟาร์มเลี้ยงนั้นมีความหนาแน่นกระดูกน้อยกว่ากบที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ

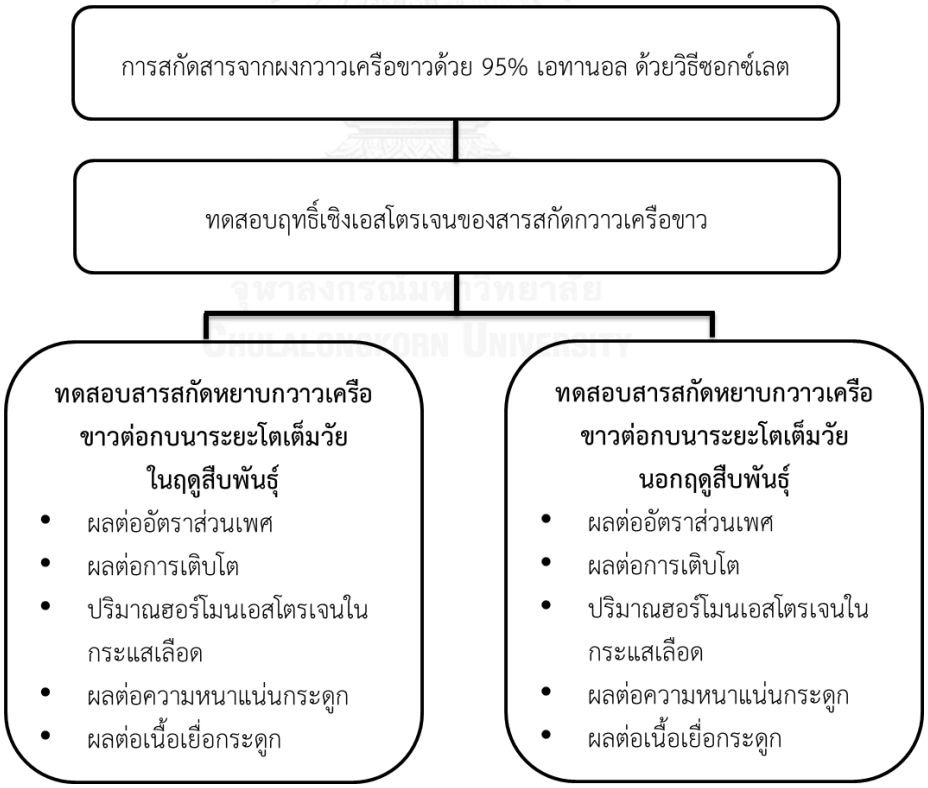
กระดูกแข็งเป็นอวัยวะหนึ่งที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างมากในการเคลื่อนที่ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกซึ่งโดยปกติสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura จะเคลื่อนที่โดยอาศัยการกระโดดเป็นหลักดังนั้นกระดูกจึงมีหน้าที่สำคัญในการค้ำจุนร่างกายและเป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อในการเคลื่อนที่ ดังนั้นหากเกิดภาวะหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับกระดูกย่อมส่งผลอย่างมากต่อการดำรงชีวิต ประกอบกับการศึกษาก่อนหน้านี้เป็นที่รู้กันดีว่าสารสกัดกวาวเครือขาวนั้นสามารถที่จะ

รักษาและป้องกันภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทที่ตัดรังไข่ได้ (Urasopon *et al.*, 2008) แต่การศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังมีน้อยมากและยังไม่ปรากฏหลักฐานที่ชัดเจนว่ามีผลอย่างไรต่อกระดูกของสัตว์กลุ่มนี้ ดังนั้นจึงเป็นของคำถามในการวิจัยครั้งนี้ว่าสารสกัดกวาวเครือขาวมีผลอย่างไรต่ออัตราส่วนเพศ การเติบโต ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือด และมีผลอย่างไรต่อความหนาแน่นและเนื้อเยื่อกระดูกของกบนา

1.2 วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. ศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศ, การเติบโต และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์
2. ศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นและเนื้อเยื่อกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์

1.3 แผนการศึกษา



ภาพ 1-1 ขอบเขตในการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศ การเติบโต ความหนาแน่น และเนื้อเยื่อกระดูกกบนาในระยะโตเต็มวัย

บทที่ 2
สืบสวนเอกสาร

2.1 กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* (Kashemsanta *et al.*, 1952) เป็นพืชสมุนไพรไทยอยู่ในวงศ์ Leguminosae มีลักษณะเป็นไม้เลื้อย ลำต้นมีลักษณะค่อนข้างกลมผิวเกลี้ยง ไม่มีขน ลำต้นไม่ตั้งตรงและแตกกิ่งก้านไปเรื่อยๆ ใบมีลักษณะเป็นขนนก มีใบย่อย 3 ใบ เรียงสลับ ใบย่อยมีลักษณะแคบเรียว ใบกลางมีลักษณะเป็นรูปไข่กว้าง ใบย่อยคู่ข้างเบี้ยว กว้าง 7-13 เซนติเมตร ยาว 13-19 เซนติเมตร ปลายใบของกวาวเครือขาวเรียวแหลม แต่โคนใบเป็นรูปลิ่ม ดอกมีทั้งช่อเดี่ยวและช่อแขนง มีสีม่วงแดง ฝักอ่อนมีสีเขียว ฝักแก่มีสีน้ำตาล ลักษณะแบนหัวท้ายแหลม รากเป็นส่วนที่สะสมอาหาร มีลักษณะเป็นกระจุกอยู่บริเวณใต้โคนโดยรากหนึ่งรากอาจจะเกิดการแบ่งเป็นตอนๆ ก็ได้ ซึ่งลักษณะนี้ขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของสภาพดิน รากค่อนข้างกลมถึงรีเป็นส่วนใหญ่ มีสีขาวผิวค่อนข้างเรียบ เนื้อในมีสีขาว ไม่มียาง สามารถพบการกระจายได้ทั่วไปตามบริเวณป่าเบญจพรรณและป่าเต็งรังของประเทศไทย ซึ่งการเจริญเติบโตในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันทำให้กวาวเครือขาวมีลักษณะทางพฤกษศาสตร์บางประการที่แตกต่างกันไปด้วย เช่น ลักษณะความแข็งแรงและขนาดเถา ลักษณะของใบ ลักษณะของสีดอกที่แตกต่างกัน เป็นต้น ซึ่งเป็นความหลากหลายของกวาวเครือขาวที่สามารถที่จะบอกแหล่งที่มาของกวาวเครือขาวได้ (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552)

อนุกรมวิธานของกวาวเครือขาวมีดังต่อไปนี้

อาณาจักร: Plantae

ดิวิสชั่น: Magnoliophyta

ชั้น: Magnoliopsida

อันดับ: Fabales

วงศ์: Leguminosae

สกุล: *Pueraria*

สปีชีส์: *Pueraria mirifica*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพ 2-1 กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* สายพันธุ์ SARDI 190

กวาวเครือขาวเป็นพืชที่มีองค์ประกอบของสารไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิดและจะพบสารไฟโตเอสโตรเจนได้มากสุดที่บริเวณราก (Malaivijitnond, 2012) จากการศึกษาองค์ประกอบของกวาวเครือขาวพบว่ามีสารไฟโตเอสโตรเจนทั้งหมด 7 กลุ่ม 22 ชนิด ดังตาราง 2-1 และ 2-2 (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552)

ตาราง 2-1 สารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาว (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552)

กลุ่มของสาร	**ชนิดของสารไฟโตเอสโตรเจน**	**เอกสารอ้างอิง**
Isoflavonoid	Daidzein	Ingham *et al.* (1986a)
	Genistein	Ingham *et al.* (1986a)
	Kwakhurin	Ingham *et al.* (1986a)
	Kwakhurin hydrate	Ingham *et al.* (1989)
Isoflavone glycoside	Daidzin (daidzein-7-o-glucoside)	Ingham *et al.* (1986a)
	Genistin (genistein-7-o-glucoside)	Ingham *et al.* (1986a)
	Mirificin (puerarin6'-o-beta-apiofuranoside)	Ingham *et al.* (1986b)
Isoflavone glycoside	Puerarin (daidzein-8-glucoside)	Ingham *et al.* (1986a); Ingham *et al.* (1989)
	Puerarin 6"-monoacetate	Ingham *et al.* (1989)

ตาราง 2-1 สารไฟโตเอสโตรเจนที่พบในกวาวเครือขาว (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) (ต่อ)

กลุ่มของสาร	ชนิดของ สารไฟโตเอสโตรเจน	เอกสารอ้างอิง
Chromenes	Miroestrol	Scholler *et al.* (1940); Bounds and Pope (1960); Jones and Pope (1961)
	Deoxymiroestrol	Chansakaow *et al.* (2000a)
	Isomiroestrol	Chansakaow *et al.* (2000b)
	Mirificoumestan glycol	Ingham *et al.* (1988)
	Mirificoumestan hydrate	Ingham *et al.* (1988)
Sterols	Beta-sitosterol	Hayodom (1971)
	Stigmasterol	Hayodom (1971)
	Spinasterol	Jeon *et al.* (2005)
Pterocapans	Puericapene	Chansakaow *et al.* (2000b)
	Tuberosin	Chansakaow *et al.* (2000b)
Acid	Tetracosanoic acid	Chansakaow *et al.* (2000b)

สารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวมีการออกฤทธิ์ที่คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยสามารถที่จะจับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) แล้วทำให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพ ในการศึกษาสารไฟโตเอสโตรเจนที่เป็นองค์ประกอบของกวาวเครือขาวนั้นพบว่า สารชนิดแรกที่พบในกวาวเครือขาวนั้นคือสาร miroestrol สารชนิดนี้เป็นสารที่มีฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนที่แรงที่สุดของกวาวเครือขาวและฤทธิ์ของสารชนิดนี้นั้นมีความใกล้เคียงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายของสิ่งมีชีวิตมาก (Jones and Pope, 1960; Jones and Pope, 1961) และฤทธิ์ของสารชนิดนี้มีผลต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ จากการศึกษาที่ผ่านมาในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้ว พบว่าสาร miroestrol สามารถทำให้ขนาดของต่อมน้ำนมและขนาดของมดลูกเพิ่มขึ้นได้ซึ่งคล้ายกับหนูแรทกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Benson *et al.*, 1961; Malaivijitnond *et al.*, 2004; Malaivijitnond *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2008) ดังนั้นสามารถที่จะกล่าวได้ว่าในกวาวเครือขาว สารที่ออกฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนที่แรงที่สุดนั้นก็คือ สาร miroestrol แต่สารชนิดนี้มีในปริมาณที่น้อยมาก (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) สารชนิดที่ออกฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนที่มีความแรงรองลงมาคือ สาร deoxymiroestrol แต่สารชนิดนี้สามารถถูกออกซิไดซ์โดยอากาศและเปลี่ยนเป็นสาร miroestrol ได้

โดยง่าย (Chansakaow *et al.*, 2000a) ซึ่งในการเตรียมผงกวาวเครือขาวนั้นต้องผ่านการปอกเปลือกหั่นเป็นชิ้นบางๆ แล้วนำไปตากหรือผึ่งแดดหรืออบให้แห้ง ก่อนที่จะถูกนำมาบดเป็นผง ซึ่งอากาศอาจจะออกซิไดซ์สาร deoxymiroestrol ให้เป็น miroestrol (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) และสารที่มีฤทธิ์รองลงมาอีกกลุ่มคือกลุ่ม isoflavonoid (Cherdshewasart *et al.*, 2007) และ isoflavone glycoside (Ingham *et al.*, 1986a; Ingham *et al.*, 1986b; Ingham *et al.*, 1989; Cherdshewasart *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นสารกลุ่มที่มีฤทธิ์เอสโตรเจนต่ำแต่มีปริมาณมากและหลากหลายชนิดในกวาวเครือขาว เช่น daidzein, genistein, daidzin, genistin, และ puerarin (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2008; Urasopon *et al.*, 2008a) เป็นต้น ด้วยความที่กวาวเครือขาวเป็นพืชที่ประกอบไปด้วยสารไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิดดังนั้นจึงมีการศึกษาฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ในร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น ลิง หนู แรท และหนูไมซ์ เป็นต้น ดังตาราง 2-3 ถึง 2-7

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

ระบบ	ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
ระบบสืบพันธุ์ของลิง	- สารแขวนลอย ปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน ทำให้รอบประจำเดือนของลิงแสมมีระยะเวลานานขึ้น	Trisomboon *et al.* (2004a)
	- สารแขวนลอย ปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถยับยั้งการตกไข่ของลิงแสม	Trisomboon *et al.* (2005)

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (ต่อ)

ระบบ	ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
ระบบฮอร์โมนของลิง	- สารแขวนลอย ปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถยับยั้งการหลั่ง follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH)	Trisomboon *et al.* (2005)
	- สารแขวนลอย ปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน ทำให้ปริมาณฮอร์โมนเอสตราไดออลและโพรเจสเทอโรนลดลง	Trisomboon *et al.* (2005)
	- สารแขวนลอย ปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน ทำให้ปริมาณ inhibin hormone ลดลง	Trisomboon *et al.* (2005)
	- สารแขวนลอย ปริมาณ 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวันมีผลต่อการขับ follicle stimulating hormone (FSH) ออกทางปัสสาวะ	Trisomboon *et al.* (2007a)

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (ต่อ)

ระบบ	ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
ระบบฮอร์โมนของลิง (ต่อ)	- สารแขวนลอย ปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถรบกวน follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ในลิงแสมวัยหมดประจำเดือนได้	Trisomboon *et al.* (2007b)
	- สารแขวนลอย ปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถลดระดับ parathyroid hormone (PTH) ได้	Trisomboon *et al.* (2004b)
ระบบสืบพันธุ์ของหนู	- สารแขวนลอยปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน ทำให้น้ำหนักของ epididymis การเคลื่อนที่ และการอยู่รอดของสเปิร์มของหนูไมซ์เพศผู้ลดลง	Jaroenporn *et al.* (2006)
	- สารแขวนลอยปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถทำให้รอบวงสืบพันธุ์ของหนูไมซ์เพศเมียมีระยะเวลานานขึ้น	Jaroenporn *et al.* (2007)

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (ต่อ)

ระบบ	ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
ระบบสืบพันธุ์ของหนู (ต่อ)	- สารแขวนลอยปริมาณ 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน ทำให้มีการเจริญของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้ว - สารแขวนลอยปริมาณ 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวันสามารถทำให้น้ำหนักของมดลูกของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่เพิ่มขึ้น	Malaivijitnond *et al.* (2006); Cherdshewasart *et al.* (2007); Cherdshewasart *et al.* (2008) Malaivijitnond *et al.* (2006); Cherdshewasart *et al.* (2008)
ระบบฮอร์โมนของหนู	- สารแขวนลอยปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.2 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถลดระดับ follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ของหนูไมซ์เพศเมียได้ - สารแขวนลอยปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน สามารถเพิ่ม follicle stimulating hormone (FSH) ของหนูแรทที่ตัดรังไข่ได้	Jaroenporn *et al.* (2007) Malaivijitnond *et al.* (2004)

ตาราง 2-2 ผลของกวาวเครือขาวต่อระบบต่างๆ ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (ต่อ)

ระบบ	ผลการทดลอง	เอกสารอ้างอิง
ระบบฮอร์โมนของหนู (ต่อ)	- สารแขวนลอยปริมาณ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อน้ำกลั่น 0.7 มิลลิลิตรสามารถเพิ่มระดับ luteinizing hormone (LH) ของหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่ตัดต่อมบ่งเพศออกได้	Malaivijitnond *et al.* (2004)
ระบบกระดูกของหนู	- สารแขวนลอยปริมาณ 10, 100, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกของหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่ตัดต่อมบ่งเพศออกได้	Urasopon *et al.* (2007); Urasopon *et al.* (2008)

ส่วนการศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีเพียงการศึกษาถึงผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อระบบสืบพันธุ์และการเติบโตของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* โดย Lonuchit (2010) เท่านั้น โดยพบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวสามารถที่จะกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวและความยาวลำตัวของกบนาแต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศเมื่อให้สารสกัดในระยะเป็นตัวสำเร็จ แต่อย่างไรก็ตามการออกฤทธิ์เอสโตรเจนของกวาวเครือขาวนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสายพันธุ์ ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และพื้นที่ปลูก (รัตนา ปานเรียนแสน, 2543)

2.2 กบนา

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดหนึ่งที่มีลักษณะลำตัวขนาดใหญ่ สั้นทู่ สีเขียวมะกอกอมน้ำตาล ด้านหลังและด้านสีข้างมีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วไป ใต้ท้องมีสีเทา ใต้คางมีลายขีดยาวสีดำ สามารถพบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำจืด เช่น แม่น้ำ หนอง คลอง บึง และนาข้าว (IUCN, 2004; ธัญญา จั่นอาจ, 2546) การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ของกบนามีดังต่อไปนี้

อาณาจักร: Animalia

ไฟลัม: Chordata.

ชั้น: Amphibia

อันดับ: Anura

วงศ์: Dicroglosidae

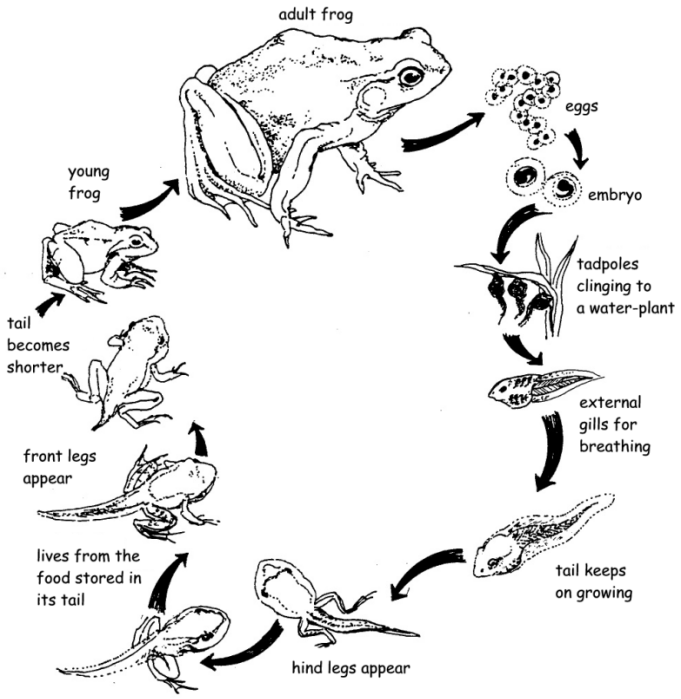
สกุล: *Hoplobatrachus*

สปีชีส์: *Hoplobatrachus rugulosus*

ภาพ 2-2 กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834)

ปัจจุบันกบนาเป็นสัตว์เศรษฐกิจและแหล่งโปรตีนทางเลือกอีกชนิดหนึ่งของประชากรชาวไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กบนาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวงจรชีวิตที่สั้น และให้ผลผลิตในระยะเวลาที่รวดเร็ว เนื้อกบนามีรสชาติอร่อย ดังนั้นกบนาจึงได้รับความนิยมในการบริโภคอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น สาธารณรัฐประชาชนจีน ฮ่องกง ไต้หวัน และสหรัฐอเมริกา (Niekisch, 1986; Tokur *et al.*, 2008; Warkentin *et al.*, 2009)

นอกจากนี้ยังมีการรายงานเพิ่มเติมด้วยว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกผลผลิตของกบนาคิดเป็นร้อยละ 2 จากการนำเข้าของเนื้อกบในทวีปยุโรป (Gratwicke *et al.*, 2009; Aabedi *et al.*, 2014) และจากข้อมูลมูลค่าผลผลิตของสัตว์ในประเทศไทยโดยกรมประมง (กรมประมง, 2552) พบว่ามูลค่าผลผลิตของกบนานั้นเพิ่มขึ้นจาก 66.4 ล้านบาทต่อปี เป็น 107 ล้านบาทต่อปีภายในระยะเวลา 4 ปี (ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2549 ถึง พ.ศ. 2552) และมีแนวโน้มว่ามูลค่าผลผลิตกบนาจะสูงขึ้นเรื่อยๆ โดยการเลี้ยงกบนาของเกษตรกรนั้นจะเลี้ยงกบนาในช่วงตั้งแต่เดือนพฤษภาคม – กันยายนซึ่งเป็นฤดูสืบพันธุ์ของกบนา เนื่องจากจะให้ผลผลิตน้ำหนักที่ดีกว่าเลี้ยงในช่วงระยะเวลาอื่นๆ (ผุสตี ปริยานนท์, 2548) กบนาจะใช้เวลาประมาณ 30 – 45 วันในการเจริญจากไข่กลายเป็นเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis) โดยมีวงชีวิตดังภาพ 2-3



ภาพ 2-3 วงจรชีวิตของกบ (Garcia, 2015)

ซึ่งในระหว่างการเจริญเติบโตของกบนาในระยะต่างๆ จะมีการเจริญและพัฒนาของอวัยวะต่างๆ ในร่างกายของกบนาด้วย ซึ่งรวมถึงการเจริญของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ด้วย ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีกระบวนในการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ 1) กระบวนการกำหนดเพศ (sex determination) ซึ่งเป็นการกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิตด้วยพันธุกรรมตั้งแต่มีการปฏิสนธิ (Nakamura, 2009) และ 2) การแยกเพศ (sex differentiation) ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงลักษณะที่แสดงออกของเพศไปตามที่พันธุกรรมได้กำหนดไว้ (Nakamura, 2010) โดยขั้นตอนการแยกเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกสามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 รูปแบบ คือ 1) Differentiated type ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นรังไข่โดยขึ้นอยู่กับการกำหนดจากโครโมโซมเพียงอย่างเดียว 2) Undifferentiated type ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรังไข่ทั้งหมดและหลังจากนั้นครึ่งหนึ่งของประชากรจะมีภาวะสองเพศ (hermaphodism) แล้วท้ายที่สุดจึงเปลี่ยนมาเป็นอัณฑะ และ 3) Semi-differentiated type ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นรังไข่และอัณฑะที่มีเซลล์ของรังไข่ปรากฏอยู่ (ovotestis) โดยมีสัดส่วนไม่คงที่ และจากนั้นทั้งรังไข่และอัณฑะที่มีเซลล์ของรังไข่ปรากฏอยู่จะเจริญไปเป็นอัณฑะ (Nakamura 2010) ซึ่งในกระบวนการนี้สารแปลกปลอมจากสิ่งแวดล้อมสามารถไปรบกวนการทำงานของทั้ง 2 ขั้นตอนนี้ได้ ทำให้ภาวะเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกมีการเปลี่ยนแปลงไปจากภาวะปกติได้ แต่อย่างไรก็ตามกลไกการแยกเพศในกบนายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

โดยทั่วไปสามารถระบุเพศของกบนาโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายนอกและภายในโดยเพศผู้จะปรากฏมีถุงเสียงให้เห็นภายนอกในฤดูสืบพันธุ์และมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เป็นอัณฑะที่มีลักษณะรูปร่างกลมหรือรีอยู่ภายใน (บังอร ฉางทรัพย์, 2550) ส่วนเพศเมียจะไม่มีถุงเสียงและมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เป็นรังไข่มีลักษณะเป็นริ้วบางๆ และมีท่อนำไข่ (สมศักดิ์ วนิชาชีวะ, 2544) ซึ่งความแตกต่างระหว่างเพศก็ทำให้ความแตกต่างหลายด้านด้วย

2.3 กระดูก

ระบบโครงกระดูก เป็นระบบทางชีววิทยาระบบหนึ่งที่ทำหน้าที่เป็นโครงของร่างกาย เพื่อช่วยค้ำจุนร่างกายในการเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหวและป้องกันอวัยวะที่อ่อนนุ่ม (ชูชาติ ยังบรรเทา, 2546) สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ 1) โครงสร้างแข็งภายนอกร่างกาย (exoskeleton) เป็นโครงสร้างแข็งที่อยู่ภายนอกร่างกาย (กนกธร ปิยธำรงรัตน์, 2551) สามารถพบได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แมลง กุ้ง หอยและปู เป็นต้น และ 2) โครงสร้างแข็งภายใน (endoskeleton) เป็นโครงสร้างแข็งที่อยู่ภายในร่างกาย (สมศักดิ์ วนิชาชีวะ, 2544) สามารถพบได้ทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ระบบโครงกระดูกภายในมีองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นกระดูกแข็งและกระดูกอ่อน

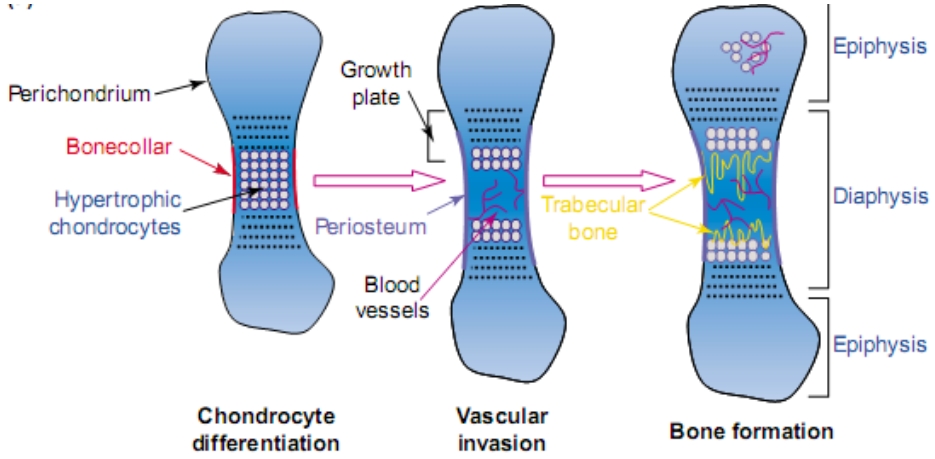
กระดูกแข็งเป็นอวัยวะหนึ่งที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างภายในของสัตว์มีกระดูกสันหลัง มีองค์ประกอบหลักเป็นสารกลุ่ม hydroxyapatite ภายนอกมีลักษณะแน่น แข็งมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน (cortical bone) ภายในมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (trabecular bone) ตรงกลางเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดไขกระดูก (marrow) ภายนอกสุดจะมีเยื่อหุ้มกระดูกชั้นนอก (periosteum) ห่อหุ้มอยู่บริเวณส่วนที่เป็นข้อต่อ กระดูกแข็งประกอบไปด้วยเซลล์พื้นฐาน 4 ชนิด คือ 1) เซลล์ osteoprogenitor เป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์กระดูกที่เจริญมาจาก embryonic mesenchymal cell สามารถที่จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเจริญไปเป็นเซลล์กระดูกได้ เซลล์ osteoprogenitor มักแทรกตัวอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มชั้นใน (endosteum) และเยื่อหุ้มกระดูกชั้นนอก (periosteum) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างและซ่อมแซมเนื้อกระดูก เมื่อถูกกระตุ้นจะเจริญไปเป็นเซลล์ osteoblast 2) osteoblast เป็นเซลล์เนื้อเยื่อกระดูกที่ยังไม่เจริญเต็มที่ มักพบในบริเวณผิวกระดูกที่กำลังสร้างเนื้อกระดูกใหม่ มีบทบาทสำคัญในการสร้างสารต่างๆ ในเซลล์กระดูก (bone matrix) เมื่อถูกกระตุ้นเซลล์ osteoblast จะเกิดการสะสมแคลเซียมและเจริญไปเป็นเซลล์ osteocyte 3) เซลล์ osteocyte เป็นเซลล์กระดูกที่เจริญเติบโตเต็มที่และมีการสะสมแคลเซียม สามารถพบได้มากที่สุดในกระดูกแข็ง เซลล์มักวางตัวอยู่ในแอ่งที่เรียกว่า lacuna มีบทบาทสำคัญในการรักษาสภาพของเนื้อกระดูกแข็ง 4) เซลล์ osteoclast เป็นเซลล์สลายกระดูกที่เจริญมาจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด

monocyte มักพบในบริเวณที่ผิวกระดูกมีการกัดกร่อน (bone resorption) มีบทบาทสำคัญในการสร้างเอนไซม์ Tartrate-resistant acid phosphate (TRAP) และเอนไซม์โปรทีโอไลติกออกมาเพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อกระดูกและเกี่ยวข้องกับการควบคุมปริมาณแคลเซียมในกระแสเลือด (วินิดา บัณฑิต *et al.*, 2535; บังอร ฉางทรัพย์, 2550; สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 2553) ซึ่งการเจริญของกระดูกนั้นเริ่มต้นมาตั้งแต่ในระยะเอ็มบริโอต่อเนื่องมาเรื่อยๆ จนกระทั่งเจริญเต็มที่ โดยการเจริญของกระดูกประกอบไปด้วย 2 วิธีด้วยกัน คือ 1) การเจริญแบบ intramembranous ossification และ 2) การเจริญแบบ endochondral ossification (IOF, 2015) โดยการเจริญแบบ intramembranous ossification จะเริ่มต้นจาก mesenchymal cell จะมารวมตัวกันในบริเวณที่จะเกิดเป็นกระดูก แต่ละเซลล์จะมีส่วนที่ยื่นมาเชื่อมติดกันทำให้เกิดเป็นแผ่น ซึ่งช่องว่างระหว่างเซลล์จะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มี collagen บรรจุอยู่ mesenchymal cell นี้เองจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นเซลล์กระดูกอ่อน (osteoblast) และสร้างสารที่เรียกว่า osteoid ออกมารอบเซลล์ เซลล์กระดูกจะปล่อยเอนไซม์ alkaline phosphatase ทำให้มี calcium มาสะสมที่ osteoid ขณะเดียวกันเซลล์กระดูกอ่อนก็จะเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกที่มีแขนงยื่นออกมารอบ เซลล์ซึ่งจะเรียงตัวติดกันและฝังตัวอยู่ในแอ่ง lacuna ทำให้ calcium มาสะสมอยู่รอบๆ เซลล์ห่อหุ้มรอบแขนงเกิดเป็นท่อทางเดิน (canaliculi) แต่ละชั้นกระดูกที่เกิดจากการตกตะกอนของ calcium ion นี้จะกลายเป็นกระดูกท่อนเล็กๆ กระจายตัวเป็นหย่อมๆ และในเวลาต่อมาจะเริ่มกลายเป็นแผ่นกระดูก (trabecular bone) ที่มีเส้นใย collagen เรียงตัวกันกระจัดกระจายไม่เป็นระเบียบ เมื่อมีการสลายและสร้างใหม่ของกระดูกจะมีการสร้าง matrix ออกมาด้วย ส่วนการสร้างกระดูกบริเวณที่เป็นกระดูกแข็งพบว่าเส้นใย collagen จะเรียงตัวเป็นวงรอบเส้นเลือด (Zimmermann, 1992; Shapiro, 2008; สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 2553)

ส่วนการเจริญแบบ endochondral ossification นั้นจะเจริญมาจากเซลล์กระดูกอ่อน ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนนี้เองจะถูกแทนที่ด้วยเซลล์กระดูกแข็ง (osteocyte) ซึ่งเซลล์กระดูกอ่อนนี้ถือว่าเป็นแม่แบบสำหรับการสร้างกระดูกโดยวิธีนี้เริ่มต้นจากการยื่นบางส่วนของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteum) เข้ามาในเซลล์ชั้นในของ condrogenous layer และมีการสร้างเซลล์กระดูกตรงบริเวณผิวรอบนอกที่เรียกว่า periosteal ring ในขณะเดียวกันเซลล์กระดูกอ่อนก็จะปล่อยสาร alkaline phosphatase ออกมาทำให้มี calcium ion มาสะสมใน matrix หลังจากนั้นผนังของเยื่อหุ้มเซลล์ก็จะมีหลอดเลือดมาเลี้ยงและแทรกตัวเข้าไปพร้อมที่จะนำ mesenchymal cell เข้าไป ทั้งหลอดเลือดและ mesenchymal cell นี้จะเปลี่ยนไปเป็นเซลล์กระดูกอ่อน เซลล์กระดูกแข็งและเซลล์สลายกระดูกต่อไป โดยเซลล์สลายกระดูกที่ทำหน้าที่สร้าง osteoid และทำให้เกิดการ ossification โดยวิธีนี้จะค่อยๆ ขยายออกไปทางด้านปลายของกระดูกทั้งสองข้างที่ยังเป็นกระดูกอ่อน ดังภาพ 2-4 ซึ่งภาวะที่

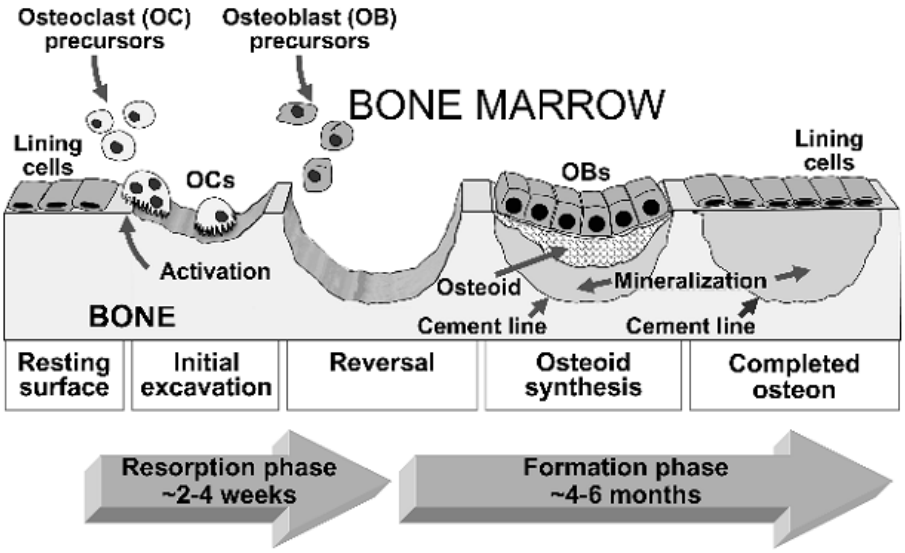
Chulalongkorn University

กระดูกจะคงความแข็งแรงไว้ได้นั้นขึ้นอยู่กับอัตราการสร้างและสลายกระดูกหรือการปรับแต่งกระดูก (bone remodeling) (Ortega *et al.*, 2004; สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 2553)



ภาพ 2-4 การเจริญของกระดูกแบบ endochondral ossification (Ortega *et al.*, 2004)

การปรับแต่งกระดูกนั้นประกอบด้วยการสลายกระดูกเก่าและสร้างกระดูกใหม่ขึ้นมาทดแทน ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นตลอดเวลา ซึ่งจะมีวงจรการปรับแต่งกระดูกดังภาพ 2-5 และเกิดทั้งกระดูกส่วน cortical และ trabecular โดยกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นบริเวณผิวนอกสุดของเยื่อหุ้มกระดูก (periosteal surface) เยื่อหุ้มกระดูกชั้นใน (endosteal surface) ซึ่งขั้นตอนแรกเริ่มจาก osteoclast จะกำจัดเอาเนื้อกระดูกบางส่วน เรียกกระบวนการนี้ว่า การสลายกระดูก (bone resorption) จากนั้น osteoblasts จะเข้ามายังบริเวณที่มีการสลาย และดึง calcium เข้ามาสะสมในเซลล์เกิดการแทนที่ของกระดูกใหม่โดย osteocyte เรียกว่าการสร้างกระดูก (bone formation) โดยการปรับแต่งกระดูกส่วน trabecular (สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก, 2553) จะมีอัตราที่มากกว่าในกระดูกส่วน cortical ซึ่งหากสมดุลการสลายและการสร้างเสียสมดุลไปจะทำให้เกิดการสูญเสียกระดูกทั้งภาวะกระดูกพรุนและกระดูกบาง (Robling *et al.*, 2006; สโรชา สุทนต์, 2555)



ภาพ 2-5 วงจรการปรับแต่งกระดูกในคน (Riggs and Parfitt, 2005)

2.4 ภาวะกระดูกบาง (osteopenia)

เป็นภาวะหนึ่งที่ความหนาแน่นของกระดูกนั้นมีค่าต่ำลงกว่าปกติ ซึ่งในทางการแพทย์ถือว่าเป็นอาการเริ่มแรกของโรคกระดูกพรุน (World Health Organization, 2003) ซึ่งภาวะนี้อาจเป็นสาเหตุของการบาดเจ็บหรือการแตกหักของกระดูกได้ง่ายซึ่งอาจเกิดจากกิจกรรมต่างๆ ในชีวิตประจำวัน ภาวะนี้สามารถเกิดได้เมื่ออัตราการสร้างและสลายกระดูกมีความไม่สมดุลกัน ซึ่งมีสาเหตุมาจากหลากหลายปัจจัย (Mikio, 2011) ดังนี้

1) อายุ อายุที่มากขึ้นทำให้เซลล์สร้างกระดูกเสื่อมโทรมลง ในขณะที่เซลล์สลายกระดูกยังสามารถทำงานอย่างได้อย่างปกติ ดังนั้นจึงทำให้เกิดความไม่สมดุลกันของอัตราการสร้างและสลายกระดูก (Mikio, 2011)
2) ภาวะขาดฮอร์โมนเพศ เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเมื่อขาดไปก็จะทำให้การทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเสียสมดุลไป (Silverberg *et al.*, 1996)
3) ภาวะขาดอาหาร การขาดอาหารจะลดการสร้างกระดูก และยังช่วยกระตุ้นการสลายกระดูกให้เพิ่มมากยิ่งขึ้นด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งการขาดอาหารจำพวก โปรตีน แคลเซียม และวิตามินดี (Yang *et al.*, 2011)
4) การไม่เคลื่อนไหวหรือการไม่ออกกำลังกาย การเคลื่อนไหวหรือการเคลื่อนที่นี้จะช่วยกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและลดการทำงานของเซลล์สลายกระดูก ในทางกลับกันหากร่างกายไม่มีการเคลื่อนไหวก็จะกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูกให้ทำงานมากขึ้น (Hudson *et al.*, 2004)

ซึ่งภาวะนี้เป็นภาวะที่มีการรายงานถึงในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลากหลายชนิด เช่น มนุษย์ (Grinspoon *et al.*, 2000) แกะ (Newman *et al.*, 1995) สุนัข (Kunkle *et al.*, 1982) แมว (Tomsa *et al.*, 1999) หมู (Rodgers *et al.*, 1993) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงภาวะกระดูกบางในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกบางชนิดอีกด้วย (Stetter, 1995) โดยศึกษาด้วยการใช้รังสีเอ็กซ์เรย์ในการถ่ายภาพกระดูกเพื่อบอกลักษณะของกระดูกที่มีความผิดปกติ ดังภาพ 2-6 นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงภาวะกระดูกบางในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ได้รับแสง UV ในปริมาณน้อยด้วย (Wolff, 2014)

ภาพ 2-6 ภาพที่ถ่ายด้วยรังสีเอ็กซ์เรย์ที่แสดงถึงภาวะกระดูกบางและความปกติของกระดูก long bone ในกบ new guinea tree frog โดย Stetter (1995)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
สารสกัดกวาวเครือขาวและการตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัด

3.1 บทนำ

กวาวเครือขาวเป็นพืชที่ประกอบไปด้วยสารไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิดและพบสารไฟโตเอสโตรเจนได้มากสุดที่บริเวณราก (Malaivijitnond, 2012) ซึ่งสารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวนี้สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) แล้วทำให้เกิดการตอบสนองทางชีวภาพ แต่อย่างไรก็ตาม การออกฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของกวาวเครือขาวนั้นมีการเปลี่ยนแปลงไปตามสายพันธุ์ ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และพื้นที่ปลูก (รัตนา ปานเรียนแสน, 2543) ดังนั้นก่อนการนำผงหรือสารสกัดกวาวเครือขาวมาใช้ทดลองหรือทดสอบในสัตว์ทดลองจึงต้องมีการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนก่อน

ปัจจุบันการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์ต่างๆ ทางธรรมชาติมีด้วยหลายวิธี แต่วิธีที่ได้รับความนิยมนั้นมีอย่างน้อย 3 วิธี คือ 1) การตรวจวัดในหลอดทดลอง (*in vitro* assay) และ 2) การทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์จึงต้องทำในสัตว์ทดลอง (in vivo assay)

การตรวจวัดในหลอดทดลอง (in vitro assay) ได้รับความนิยม เพราะมีความสะดวก รวดเร็ว และสามารถตรวจสอบสารได้ครั้งละเป็นจำนวนมาก ได้แก่ MCF-7 proliferation assay (Cherdshewasart *et al.*, 2008) HeLa cell proliferation assay (Amato *et al.*, 2002) และ yeast cells assay (Schultis and Metzger, 2004) แต่วิธีการที่กล่าวทั้งหมดนั้นไม่เป็นไปตามความเป็นจริงกับสิ่งที่เกิดขึ้นในร่างกายของสัตว์ทดลอง (Cherdshewasart *et al.*, 2007) และการแสดงออกของตัวรับที่แตกต่างกันในเซลล์แต่ละประเภทของเซลล์ที่นำมาใช้ดังนั้นจึงทำให้ผลการทดสอบมีความผันแปรมาก (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) และไม่ใช่การทดสอบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552) ดังนั้นเพื่อเป็นการหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว การทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของพืชสมุนไพรหรือสารสังเคราะห์จึงต้องทำในสัตว์ทดลอง (*in vivo* assay) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมอย่างมากมี 2 วิธี คือ 1) วิธีการติดตามด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของมดลูก (uterotrophic assay) (Jefferson *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2004) และ 2) วิธีการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายในเยื่อบุช่องคลอด (vaginal cytology assay) เนื่องจากเป็นวิธีที่มีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงและเป็นกลไกที่เกิดขึ้นภายในตัวสัตว์ทดลองจริง (Malaivijitnond *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007; Cherdshewasart *et al.*, 2008)

ดังนั้นในการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดกวาวเครือขาวในการทดลองครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการทดสอบด้วยการติดตามการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของมดลูกและการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายในเยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์ (wistar) เพศเมียที่ตัดรังไข่แล้ว

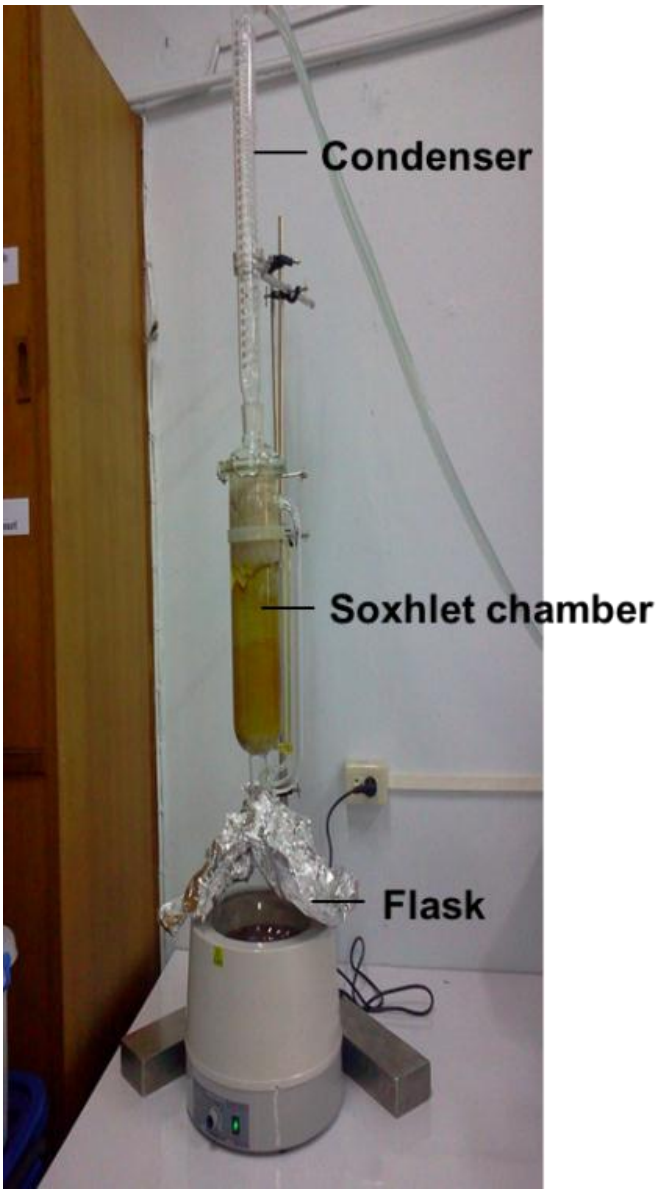
3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 การสกัดผงกวาวเครือขาว

ผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ SARDI 190 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จากอาจารย์สมโภชน์ ทับเจริญ แห่งสถาบันวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ ศูนย์วิจัยและฝึกอบรมการเลี้ยงสุกรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม โดยแช่ผงกวาวเครือขาวลงใน 95% เอทานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อัตราส่วนของเอทานอลต่อผงกวาวเครือขาวเท่ากับ 3,000 มิลลิลิตรต่อ 1 กิโลกรัม โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ผงกวาวเครือขาวทั้งหมด 10 กิโลกรัม สารละลายที่แช่ผงกวาวเครือขาวและผงกวาวเครือขาวที่ถูกแช่หมัก จะถูกนำมาสกัดแบบต่อเนื่องในเครื่องสกัดซอกซ์เลต (soxhlet extractor) เป็นเวลา 8 ชั่วโมงต่อผงกวาวเครือขาวจำนวน 1 กิโลกรัม ที่ห้องปฏิบัติเนื้อเยื่อและไมโครเทคนิค ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพ 3-1 ผงกวาวเครือขาวสายพันธุ์ SARDI 190

การสกัดด้วยวิธีซอกซ์เลต เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยอาศัยหลักการการระเหยของตัวทำละลายที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากขวดรูปชมพู่ (flask) ของเครื่องซอกซ์เลตไปยังบริเวณ condenser ที่จะมีการหล่อเย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส จากนั้นตัวทำละลายซึ่งได้แก่ 95% เอ-ทานอลควบแน่นและกลายเป็นของเหลวตกลงมายังบริเวณ chamber ของเครื่องซอกซ์เลตที่มีผงกวาวเครือขาวอยู่ใน chamber เมื่อปริมาณของ 95% เอทานอลมีปริมาณที่มากพอ สารละลายทั้งหมดก็ถูกปล่อยลงมายังบริเวณขวดรูปชมพู่ของเครื่องซอกซ์เลตอีกครั้งหนึ่งและเกิดการสกัดแบบต่อเนื่อง



ภาพ 3-2 เครื่องซอกซ์เลต

นำสารละลายที่ได้จากการสกัดด้วยวิธีซอกซ์เลตมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 (Whatman®, England) โดยดูดด้วยเครื่องปั๊มลมสุญญากาศ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องระเหยตัวทำละลาย (rotary evaporator) (Heidolph, Germany) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 70-150 รอบต่อนาที โดยควบแน่นเอทานอลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ด้วยความดัน 100-300 มิลลิบาร์ และระเหยเอทานอลออกด้วยอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 55 ±5 องศาเซลเซียส จนกว่าน้ำหนักของสารสกัดจะไม่เปลี่ยนแปลง นำสารสกัดหยาบของกวาวเครือขาวที่ได้มาหาเปอร์เซ็นต์การสกัด และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสและไม่ให้โดนแสงจนกว่าทำการทดลอง

ภาพ 3-3 เครื่องระเหยตัวทำละลาย

3.2.2 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว

3.2.2.1 การตัดรังไข่ของหนูแรทเพศเมีย

หนูแรท (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์วิสตาร์ (wistar) อายุ 60 วัน จำนวน 8 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม จะถูกเลี้ยงพักไว้เป็นเวลา 3 วัน ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลองชั่วคราว ห้อง 401/3 ตึกมหามกุฎ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ซึ่งได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูปตลอดเวลา หลังจากนั้นหนูแรทจะถูกสลบด้วยสารโซเดียมเพนโตบาร์บิทอล

(sodium pentobarbital) ปริมาณ 40-50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว โดยการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) เมื่อหนูแรทสลบแล้ว โกนขนบริเวณสีข้างของหนูแรทออก ทำความสะอาดด้วย 70% เอทานอล และเปิดผ่าผิวหนังให้มีความกว้างประมาณ 1 เซนติเมตร จากนั้นจึงผ่าชั้นกล้ามเนื้อจนถึงช่องท้องและตัดรังไข่ออก นำส่วนที่เหลือทั้งหมดคืนเข้าไปในช่องท้องตามเดิมแล้วเย็บชั้นกล้ามเนื้อและผิวหนังตามลำดับ โดยอุปกรณ์ผ่าตัดทั้งหมดจะถูกแช่อยู่ในสารละลายเดทตอล (Dettol) (RT. Reckitt Benckiser Ltd., Indonesia) จากนั้นจะทำความสะอาดแผลด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ Betadine (IDS manufacturing LTD, Thailand) และผ่ารังไข่ที่เหลืออีกข้างด้วยวิธีเดียวกัน นำหนูแรทที่ตัดรังไข่แล้วใส่กรงที่ปูรองนอนด้วยกระดาษสะอาดจนกระทั่งหนูแรทฟื้นจึงย้ายไปใส่กรงที่ปูรองด้วยขี้เลื่อย จากนั้นพักหนูแรทเป็นเวลา 7 วัน โดยมีการเฝ้าสังเกตหนูที่ถูกตัดรังไข่ทุกวัน

3.2.2.2 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด

แบ่งหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้วออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มล่ะ 4 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1: หนูแรทถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตร ตลอดการทดลอง (control)

กลุ่มที่ 2: หนูแรทถูกป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวปริมาณ 4.78 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักต่อวัน (PM) (Cherdshewasart *et al.*, 2007)

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ 1) ระยะก่อนการทดลองนาน 7 วัน และ 2) ระยะทดลองนาน 7 วัน โดยทำ vaginal smear เซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทเพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เป็นเวลาทั้งหมด 14 วัน ที่เวลา 13.00 – 14.00 น. ของทุกวัน โดยให้สารแก่หนูในแต่ละระยะการทดลองดังต่อไปนี้

ระยะก่อนการทดลอง: หนูทุกกลุ่มถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวันเป็นระยะเวลา 7 วัน

ระยะการทดลอง : หนูแรทกลุ่มที่ 1 ถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 1 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน และหนูแรทกลุ่มที่ 2 ถูกป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 7 วัน

การทำ vaginal smear ทำโดยใช้ไมโครปิเปทดูดสารละลาย normal saline (0.9% NaCl) (A.N.B. Laboratories Co., Ltd.) ปริมาณ 10 ไมโครลิตร สอดเข้าไปในช่องคลอดของหนูแรทแล้วดูดขึ้นลงเบาๆ จากนั้นนำไปหยดลงบนสไลด์และนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจำแนกชนิดของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด โดยจำแนกเซลล์ที่พบออกเป็น 3 ชนิด คือชนิด cornifield (Co) ชนิด nucleated

(O) และ ชนิด leukocyte (L) ตรวจนับเซลล์จำนวน 100 เซลล์และนำไปคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ของ cornifield cell จากจำนวนเซลล์ทั้งหมดที่พบ (Malaivijitnond *et al.*, 2006)

3.2.2.3 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วยการเจริญของมดลูกของหนูแรท

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง การุณยฆาตหนูแรทด้วยการฉีดสารโซเดียมเพนโตบาร์บิทอลปริมาณ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เข้าบริเวณช่องท้อง ผ่าตัดนำมดลูกมาชั่งน้ำหนัก โดยขั้นตอนการทดลองในการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรททั้งหมดได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตามข้อตกลงการวิจัยหมายเลข 1323002 แห่งคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาว

การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารกัดด้วยเครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) โดยสารสกัดกวาวเครือขาวปริมาณ 3 มิลลิกรัมจะถูกละลายลงใน 100% เอทานอล ปริมาณ 4.5 มิลลิลิตร และ 0.1% phosphoric acid ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นดูดสารละลายปริมาณ 20 ไมโครลิตร และฉีดเข้าเครื่องวิเคราะห์ ผ่านคอลัมม์ชนิด C18 เป็นเฟสนิ่ง และเฟสเคลื่อนที่เป็น 0.1% phosphoric acid และ acetronitrile จากนั้นติดตามสารไฟโตเอสโตรเจนทั้ง 5 ชนิด ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตความยาวคลื่น 255 นาโนเมตร (Anukulthanakorn, 2013) โดยการทดลองทำที่ห้องปฏิบัติการวิจัยและทดสอบทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเปอร์เซ็นของเซลล์ชนิด cornified และน้ำหนักมดลูกของหนูแรทนำไปตรวจสอบหาการกระจายของข้อมูลด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov หากการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบปกติข้อมูลจะถูกเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย *t*-test ทดสอบค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มและยอมรับความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.3 ผลการทดลอง

3.3.1 การสกัดผงกวาวเครือขาว

หลังจากการสกัดด้วย 95% เอทานอลพบว่า สารสกัดมีลักษณะเป็นสารเหลวสีน้ำตาลเข้ม และหลังจากระเหยตัวทำละลายออกพบว่า สารสกัดกวาวเครือขาวมีลักษณะเป็นยางเหนียว สีน้ำตาล

เข้ม น้ำหนักสุดท้ายของสารสกัดกวาวเครือขาวเท่ากับ 478.67 กรัม จากการสกัดผงกวาวเครือขาว 10 กิโลกรัม ซึ่งสามารถคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดครั้งนี้ได้เท่ากับ 4.79 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสารสกัดนี้จะถูกทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ต่อไป

ภาพ 3-4 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ระเหยตัวทำละลายแล้ว

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

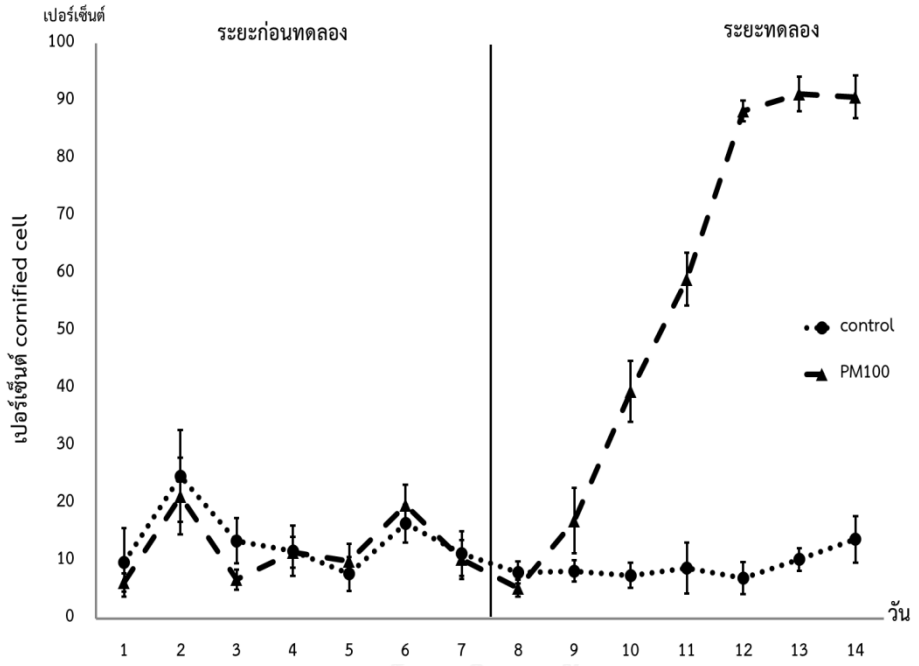
3.3.2 การตัดรังไข่ของหนูแรทเพศเมีย

หลังจากการตัดรังไข่และป้อนด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 7 วัน ของหนูแรททั้งสองกลุ่มในระยะก่อนการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์เซลล์ cornified มีค่าน้อยและรักษาระดับอยู่ที่ 6 -15% ซึ่งเป็นเครื่องมือที่สามารถยืนยันได้ว่ารังไข่ของหนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์ทั้ง 8 ตัวนั้นถูกตัดออกจนหมดและไม่มีผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนจากรังไข่ของหนูแรทในการทดลอง ซึ่งสามารถสังเกตได้จากเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทเกือบจะทั้งหมดเป็นเซลล์ชนิด leukocyte ดังภาพ 3-5

3.3.2.1 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดกวาวเครือขาวด้วยการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด

ในระยะทดลองพบว่า เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทในกลุ่ม control ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากระยะก่อนทดลองและเซลล์ส่วนใหญ่เกือบทั้งหมดเป็นเซลล์ชนิด leucocyte อย่างไรก็ตาม เซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทที่ตัดรังไข่ในกลุ่มที่ให้สารสกัดกวาวเครือ

ขาวหรือกลุ่ม PM มีการเปลี่ยนแปลงหลังจากให้สารสกัดกวาวเครือขาว 2 วัน โดยเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทนั้นจะมีเซลล์ชนิด cornified เพิ่มขึ้นมากกว่าช่วงระยะก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ชนิด cornified ในระยะทดลองมีค่ามากกว่าระยะก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.019) และมีมากสุดเท่ากับ 91.25±3.01 ในวันที่ 13 หรือวันที่ 6 หลังจากป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือขาว ดังภาพ 3-5

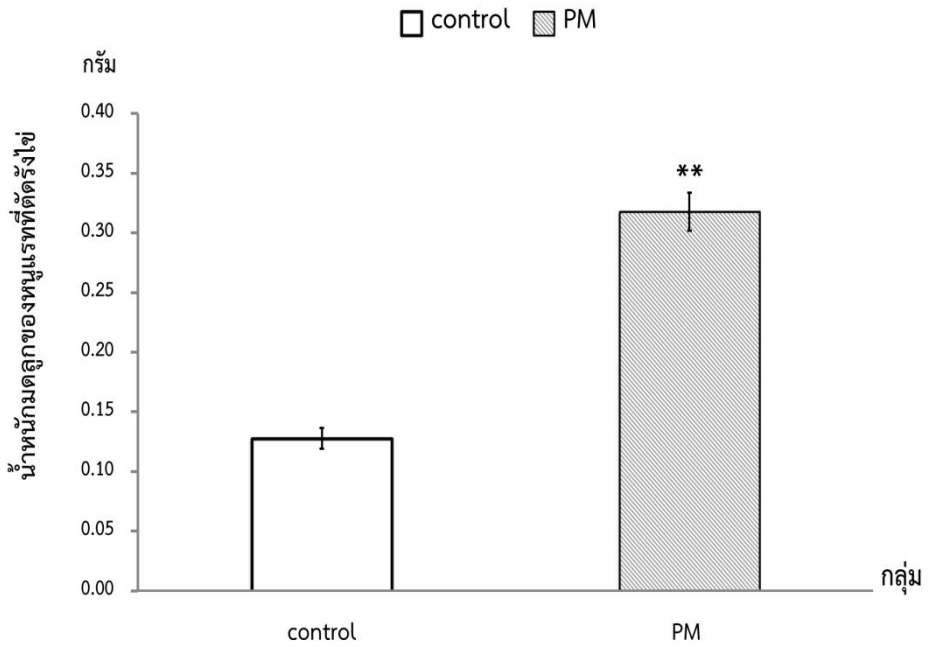


ภาพ 3-5 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ชนิด cornified (%Co) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้วที่ถูกป้อนด้วยน้ำกลั่นตลอดการทดลอง (control) และกลุ่มที่ป้อนด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ในระยะเวลา 14 วัน ช่วงระยะก่อนทดลองและระยะทดลอง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3.2.2 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวด้วยการเจริญของมดลูกของหนูแรท

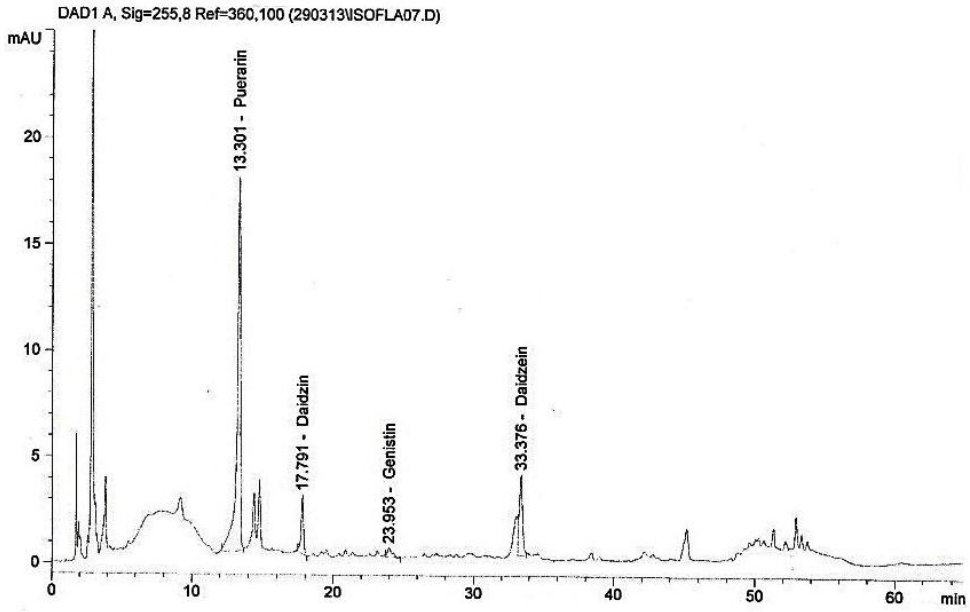
หลังจากตัดมดลูกของหนูแรทที่ถูกการุณยฆาตในวันสุดท้ายของการทดลองมาชั่งน้ำหนัก พบว่าน้ำหนักมดลูกของหนูแรทในกลุ่ม PM มีค่ามากกว่าน้ำหนักมดลูกของหนูแรทในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) ดังภาพ 3-6



ภาพ 3-6 น้ำหนักมดลูกของหนูแรทที่ตัดรังไข่นาน 7 วัน แล้วให้น้ำกลั่น (control) และสารสกัดกวาวเครือขาวในปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวันเป็นเวลานาน 7 วัน

3.3.3 การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาว

สารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาวที่ศึกษาในครั้งนี้ถูกตรวจสอบโดยการเปรียบเทียบกับระยะเวลาของสารที่อยู่ในคอลัมน์ (retention times) และปริมาณของสารที่แสดงออกมาโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารกลุ่มกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์โดยพบสารกลุ่มไอโซ-ฟลาโวนอยด์ 4 ชนิดในสารสกัดกวาวเครือขาวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein, และgenistein และถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่เวลา 13.30, 17.79, 23.95, 33.37, และ 42.21 นาทีตามลำดับ โดยสารไฟโตเอสโตรเจนชนิด puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein มีปริมาณเท่ากับ 7.49, 0.71, 0.56, 0.78, และ 0.00 มิลลิกรัมต่อสารสกัด 100 กรัมตามลำดับ



ภาพ 3-7 โครมาโทแกรมแสดงสารไฟโตเอสโตรเจนกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว

3.4 อภิปรายผลการทดลอง

3.4.1 การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวจากการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด

จากผลการทดลองสารสกัดกวาวเครือขาวที่ทำให้เกิดเซลล์ชนิด cornified ที่ช่องคลอดของหนูแรทนั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Malaivijitnond *et al.* (2006) ที่พบว่าเมื่อให้สารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้ว ก็จะพบเซลล์ชนิด cornified โดยเกิดจากการที่สารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวไปจับกับตัวรับชนิด ER-เบต้า และ ER-แอลฟา ของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทที่ตัดรังไข่ กระตุ้นให้เซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทเจริญและเปลี่ยนเป็นเซลล์ชนิด cornified (Malaivijitnond *et al.*, 2006; Cherdshewasart *et al.*, 2007; Cherdshewasart *et al.*, 2008)

3.4.2.การตรวจสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อการเจริญของมดลูก

จากผลการศึกษาน้ำหนักของมดลูกที่เปลี่ยนแปลงไปสอดคล้องกับผลของการติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดที่มีการตอบสนองไปในทางเดียวกัน และสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Malaivijitnond *et al.* (2004); Malaivijitnond *et al.* (2006) และ Cherdshewasart *et al.* (2008) ซึ่งผลของกวาวเครือขาวจากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สาร

สกัดกวาวเครือขาวสามารถที่จะกระตุ้นให้มดลูกของหนูที่ตัดรังไข่มีการเจริญเติบโตเพิ่มขนาด ซึ่งเป็นผลให้น้ำหนักของมดลูกเพิ่มขึ้นด้วย (วิชัย เชิดชีวศาสตร์, 2552)

3.4.3 การวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาว

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของAnukulthanakorn (2013) ที่ทำการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาวด้วยวิธีเดียวกันแต่พบสาร genistein ในสารสกัดกวาวเครือขาว เนื่องจากสารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ฤดูกาลที่เก็บเกี่ยว (Cherdshewasart *et al.*, 2008) และพื้นที่ปลูก (รัตนา ปานเรียนแสน, 2543) ซึ่งตัวอย่างกวาวเครือขาวที่นำมาใช้ศึกษาในงานวิจัยก่อนหน้านี้ของAnukulthanakorn (2013) และตัวอย่างกวาวเครือขาวที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นตัวอย่างคนละสายพันธุ์ มีฤดูกาลที่เก็บเกี่ยวและพื้นที่ปลูกที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงทำให้พบสารไฟโตเอสโตรเจนในปริมาณที่แตกต่างกันออกไป

จากการสกัดผงกวาวเครือขาวปริมาณ 10 กิโลกรัม ด้วย 95 % เอทานอล ด้วยวิธีซอกซ์เลตได้เปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับ 4.79 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเมื่อนำสารสกัดหยาบปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ป้อนหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่แล้วทำให้เกิดการเจริญของเซลล์เยื่อบุช่องคลอดและมดลูกของหนูแรท และจากการพบสารไฟโตเอสโตรเจนจำนวน 4 ชนิด คือ puerarin, daidzin, genistin, และ daidzein ในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่สกัดนั้น สามารถที่จะบอกได้ว่าสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่สกัดได้นั้นมีสารไฟโตเอสโตรเจนเป็นองค์ประกอบและมีฤทธิ์เชิงเอสโตรเจน ดังนั้นจึงสามารถนำสารสกัดหยาบจากการศึกษาในบทนี้ไปใช้ทำการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อกบนาในบทต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเพศ น้ำหนัก ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร และ ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย

4.1 บทนำ

กบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ปัจจุบันเป็นสัตว์เศรษฐกิจและแหล่งโปรตีนทางเลือกอีกชนิดหนึ่งของประชากรในประเทศไทยและในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ กบนาเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวงจรชีวิตที่สั้น และให้ผลผลิตในระยะเวลาที่รวดเร็ว นอกจากนี้เนื้อของกบนาอุดมไปด้วยโปรตีนที่สามารถหาได้ง่ายในท้องถิ่น กบนาได้รับความนิยมไปอย่างแพร่หลายทั้งตลาดในประเทศและต่างประเทศ (Niekisch, 1986; Tokur *et al.*, 2008; Warkentin *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังมีการรายงานเพิ่มเติมด้วยว่าประเทศไทยเป็นประเทศที่มีการส่งออกผลผลิตของกบนาคิดเป็นร้อยละ 2 จากการนำเข้าเนื้อกบในทวีปยุโรป (Gratwicke *et al.*, 2009; Aabedi *et al.*, 2014) และมีแนวโน้มว่ามูลค่าผลผลิตกบนาจะสูงขึ้นเรื่อยๆ ด้วยเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ผู้เลี้ยงกบนาหาวิธีเพื่อเพิ่มผลผลิตกบนา ซึ่งวิธีหนึ่งก็คือการใช้สมุนไพรไทย เช่น กวาวเครือขาวเสริมอาหารในการเลี้ยงกบนา (ผุสตี ปริยานนท์, 2548)

กวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* มีสารไฟโตเอสโตรเจนซึ่งออกฤทธิ์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายของสิ่งมีชีวิต มีองค์ประกอบของสารหลายกลุ่ม เช่น กลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoid) กลุ่มไอโซฟลาโวนไกลโคไซด์ (isoflavone glycoside) กลุ่มโครมีนส์ (chromenes) และกลุ่มคูมิสแตน (coumestans) (Bounds and Pope, 1960; Ingham *et al.*, 1989; Chansakaow *et al.*, 2000a) เป็นต้น ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกันโรคของกบนา กระตุ้นการเติบโต (ปรีชา สุวรรณ์, 2547) และยังมีงานวิจัยโดย Saidapur *et al.* (2001); Pettersson *et al.* (2006); Jul-a-dung *et al.* (2009); Uppanunchai *et al.* (2011) และ Piprek *et al.* (2012) ที่พบว่าสารประกอบเอสโตรเจนและสารไฟโตเอสโตรเจน (Cong *et al.*, 2006) นั้นสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้โดยเข้าไปรบกวนกระบวนการต่างๆ ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจะมีกระบวนในการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนด้วยกัน คือ กระบวนการระบุเพศ (sex determination) และการแยกเพศ (sex differentiation)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาที่มีก่อนหน้านี้เป็นจำนวนมากรายงานว่า สารประกอบเอสโตรเจนมีผลต่อการเจริญ (Carr *et al.*, 2003; Jason *et al.*, 2004; Rohr and Palmer, 2005) และการ

เติบโต (Britson and Threlkeld, 1998; Diana *et al.*, 2000; Boone and James, 2003; Carr *et al.*, 2003) ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอีกด้วย

นอกจากนั้นแล้วสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเป็นสัตว์ที่มีความเหมาะสมอย่างยิ่งที่จะใช้เป็นสัตว์ทดลองในการทดสอบสารประกอบเอสโตรเจนและสารเคมีต่างๆ ที่ปนเปื้อนหรืออยู่ในสิ่งแวดล้อม หรือใช้เป็นสิ่งมีชีวิตเฝ้าระวังเพราะสารต่างๆ สามารถที่จะซึมผ่านผิวหนังได้ดี (Cong *et al.*, 2006)

จากข้อมูลทั้งหมดที่กล่าวมาจึงนำไปสู่วัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้คือ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเพศ น้ำหนัก ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย

4.2 วิธีการศึกษา

4.2.1 วิธีการทดลอง

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อกบนาระยะโตเต็มวัย โดยเลี้ยงกบนาจนเป็นถึงระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis, Gosner stage 46) อายุประมาณ 30-45 วัน จำนวน 600 ตัว นำไปเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ที่มีขนาดกว้าง 300 เซนติเมตร ยาว 300 เซนติเมตร สูง 150 เซนติเมตร ภายในบ่อใส่น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติปริมาตร 7,500 มิลลิลิตร โดยใส่กบนาจำนวนบ่อละ 60 ตัว พร้อมวางกระเบื้องลอนคู่เพื่อใช้เป็นที่หลบซ่อนตัวของกบนาจำนวน 1 แผ่น บ่อเลี้ยงได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่สถานีวิจัยคัดเลือกและบำรุงพันธุ์สัตว์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ในการเริ่มต้นการทดลองแบ่งกบนาที่เลี้ยงออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 120 ตัว โดยทำการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ในฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556) และนอกฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556) ซึ่งแบ่งกลุ่มในแต่ระยะดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม กบนาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงกบนามาตรฐาน (control)

กลุ่มที่ 2: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ที่ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (positive control)

กลุ่มที่ 3: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 0.479 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM10)

กลุ่มที่ 4: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM100)

กลุ่มที่ 5: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 47.9 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM1000)

สาร 17บีต้า-เอสตราไดออล (E_2) ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม และ สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ทดสอบฤทธิ์แล้ว (ผลการทดลองในบทที่ 3) ปริมาณ 0.479, 4.79, และ 4.79 มิลลิกรัมตามลำดับ นำมาละลายใน 95% เอทานอล ปริมาณ 30 มิลลิลิตร เมื่อสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลและสารสกัดสกัดกวาวเครือขาวละลายในตัวทำละลายหมดแล้ว นำมาเคลือบลงบนอาหารเลี้ยงกบนามาตรฐานตามกลุ่มการทดลองที่กำหนดไว้ด้านบน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อระเหยตัวทำละลายออก ชั่งน้ำหนักตัวของกบนาเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักทุก 4 วัน หลังจากระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แล้ว โดยให้อาหารกบนาในปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน ในช่วงเช้าและเย็นของทุกวันเป็นระยะ 3 เดือน หลังจากนั้นการุณยฆาตกบนาทั้งหมดด้วยสาร MS-222 ที่มีความเข้มข้นสูง ชั่งน้ำหนักตัวและวัดความยาวจากปลายปากถึงรูเปิดทวาร (snout-to-vent length: SVL)

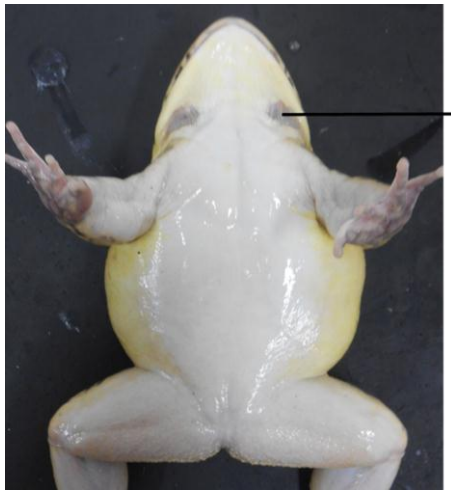
การเก็บตัวอย่างเลือดของกบนาโดยการดูดเลือดจากหัวใจด้วยเข็มฉีดยา ขนาดเข็ม 25 G ยาว ½ นิ้ว เคลือบด้วยสาร heparin ประมาณ 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างเลือดจะถูกปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และเก็บพลาสมาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำตัวอย่างพลาสมาไปวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดด้วยเทคนิค radioimmunoassay ที่บริษัท กรุงเทพ อาร์ไอเอ, วังทองหลาง, กรุงเทพฯ

เก็บตัวอย่างอวัยวะต่างๆ ดังนี้ รังไข่ ท่อนำไข่ และอัณฑะ เมื่อผ่าออกมาแล้วอวัยวะต่างๆ เหล่านั้นจะถูกชั่งน้ำหนักและแช่ลงใน Davidson's fixative เป็นเวลา 2 วัน และเปลี่ยนเป็น 70% เอทานอล เพื่อนำไปศึกษาเพศของกบนาต่อไป การทดลองในบทนี้ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตามข้อตกลงการวิจัยหมายเลข 1423005 แห่งคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

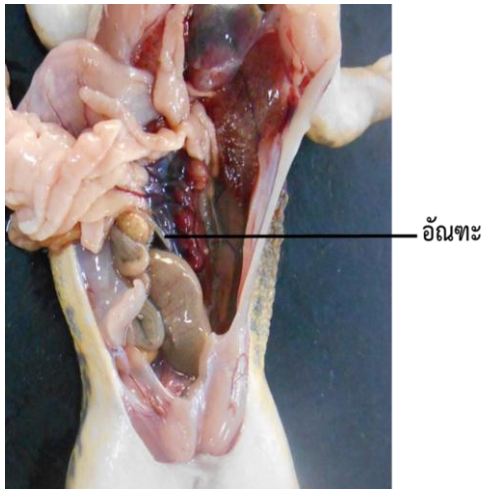
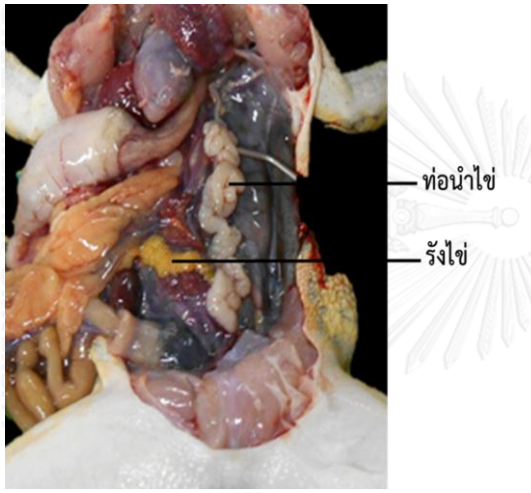
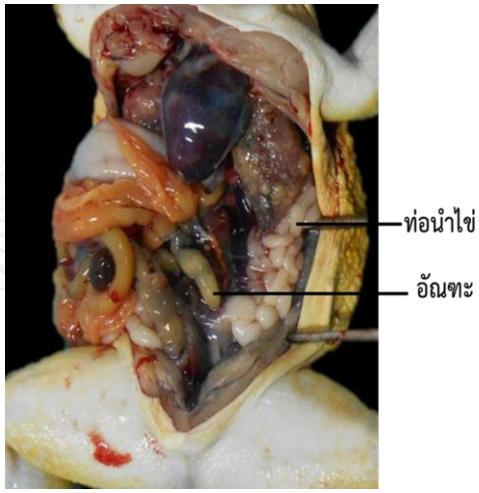
การจำแนกเพศของกบนา ซึ่งจำแนกด้วย 3 ลักษณะ คือ 1) ลักษณะสัณฐานภายนอก ซึ่งกบนาเพศผู้จะเห็นถุงเสียง (vocal sac) มีลักษณะเป็นถุงสีดำอยู่ใต้คางของกบนาเพศผู้ ดังภาพ 4-1 2) ลักษณะสัณฐานภายในของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งกบนาเพศผู้มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์คืออัณฑะ (testis) มีลักษณะเป็นก้อนรี ยาว เนื้อแน่น กบนาเพศเมียมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์คือรังไข่ (ovary) มีลักษณะเป็นริ้วๆ สีออกเหลือง และพบการเจริญของท่อนำไข่ (oviduct) และกบนาที่แยกเพศไม่ได้ชัดเจนหรือเพศกำกวม (intersex) มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ลักษณะเป็นก้อนรี ยาว เนื้อแน่น คล้ายอัณฑะ และพบการเจริญของท่อนำไข่ ดังภาพ 4-2 3) ลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะ

สร้างเซลล์สืบพันธุ์ กบนาเพศผู้ ภายในอัณฑะจะพบท่อ seminiferous tubule อยู่ภายในและอาจจะเห็นเซลล์ของสเปิร์มในระยะที่แตกต่างกัน กบนาเพศเมีย ภายในรังไข่จะพบเซลล์ oocyte เป็นจำนวนมาก และกบนาเพศกำกวม (intersex) ภายในอัณฑะจะพบลักษณะรอบขอบอัณฑะจะเป็นท่อ seminiferous tubule แต่ในบริเวณตรงกลางของอัณฑะจะพบเซลล์ oocyte เจริญอยู่เป็นจำนวนมาก ดังภาพ 4-3 ถึง 4-5

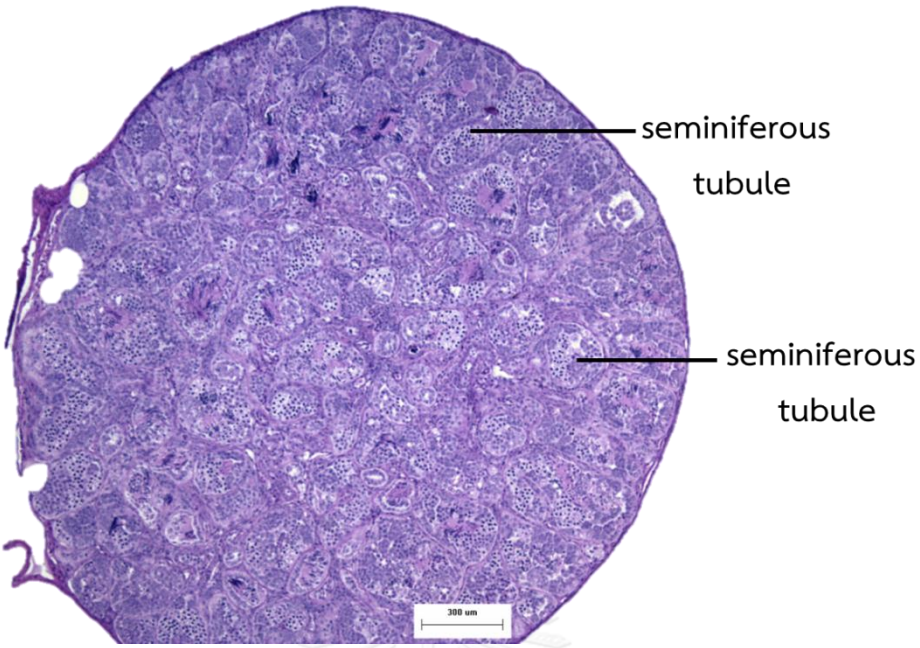
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ลักษณะสัณฐานของเพศผู้	ลักษณะสัณฐานของเพศเมีย	ลักษณะสัณฐานของเพศกำกวม (intersex)
A	B	C
		
เพศผู้ พบถุงเสียง (vocal sac) มีลักษณะเป็นถึงสีดำอยู่ใต้คาง	เพศเมีย ไม่พบถุงเสียงที่ใต้คางของกบนา	เพศกำกวม ไม่พบถุงเสียงที่ใต้คางของกบนา

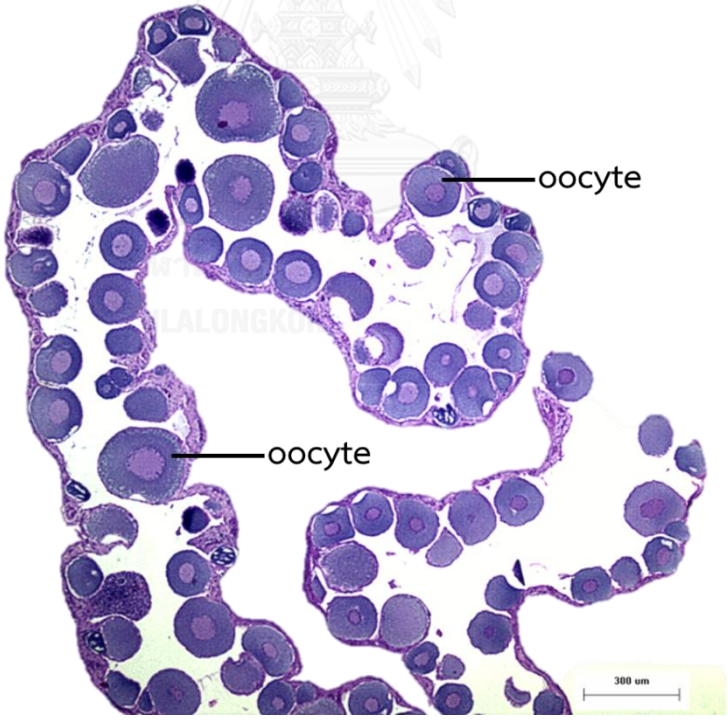
ภาพ 4-1 การจำแนกลักษณะสัณฐานภายนอกของกบนาเพศผู้ (A) เพศเมีย (B) และเพศกำกวม (intersex; C)

ลักษณะสัณฐานของเพศผู้	ลักษณะสัณฐานของเพศเมีย	ลักษณะสัณฐานของเพศกำกวม
A	B	C
		
เพศผู้ มีอัณฑะ ลักษณะเป็นก้อนรี ยาว มีเนื้อแน่น	เพศเมีย มีรังไข่ ลักษณะเป็นริ้วๆ สีออกเหลือง และพบการเจริญของท่อนำไข่	เพศกำกวม พบอัณฑะ ลักษณะเป็นก้อนรี ยาว มีเนื้อแน่น และพบการเจริญของท่อนำไข่

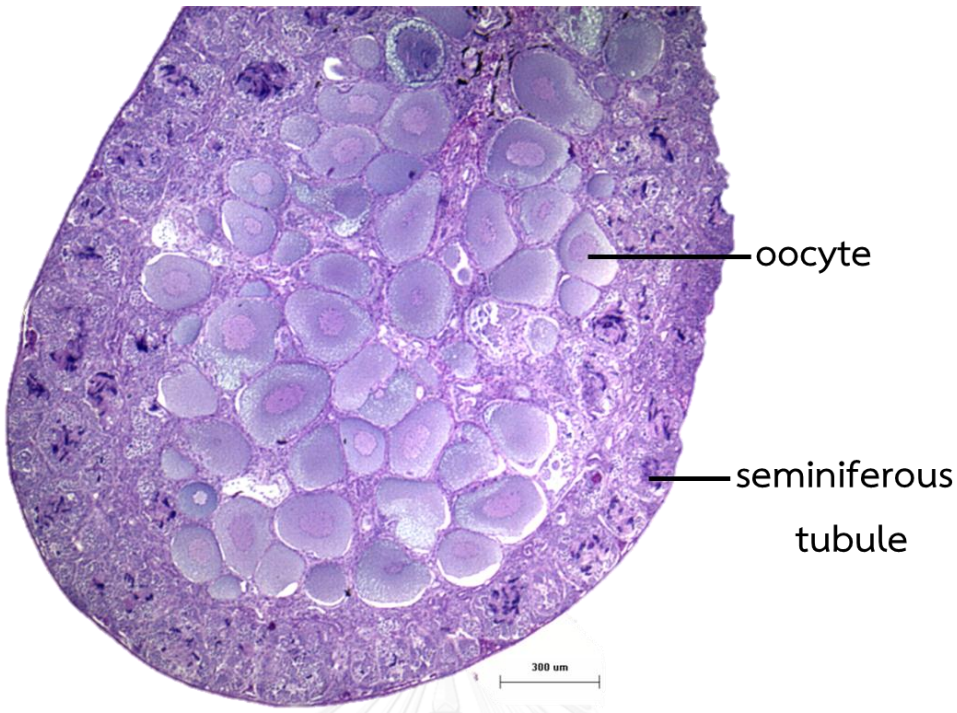
ภาพ 4-2 การจำแนกลักษณะสัณฐานของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของกบนาเพศผู้ (A) เพศเมีย (B) และเพศกำกวม (intersex; C)



ภาพ 4-3 จุลกายวิภาคของอัณฑะกบนาเพศผู้ ลักษณะเป็นท่อ seminiferous tubule



ภาพ 4-4 จุลกายวิภาคของรังไข่กบนาเพศเมีย มีลักษณะเป็นเซลล์ oocyte อยู่ภายใน



ภาพ 4-5 จุลกายวิภาคของอัณฑะกบนาเพศกำกวม (intersex) มีลักษณะเป็นท่อ seminiferous tubule อยู่บริเวณขอบของอัณฑะ บริเวณตรงกลางมีลักษณะเป็นเซลล์ oocyte อยู่ภายใน

4.2.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

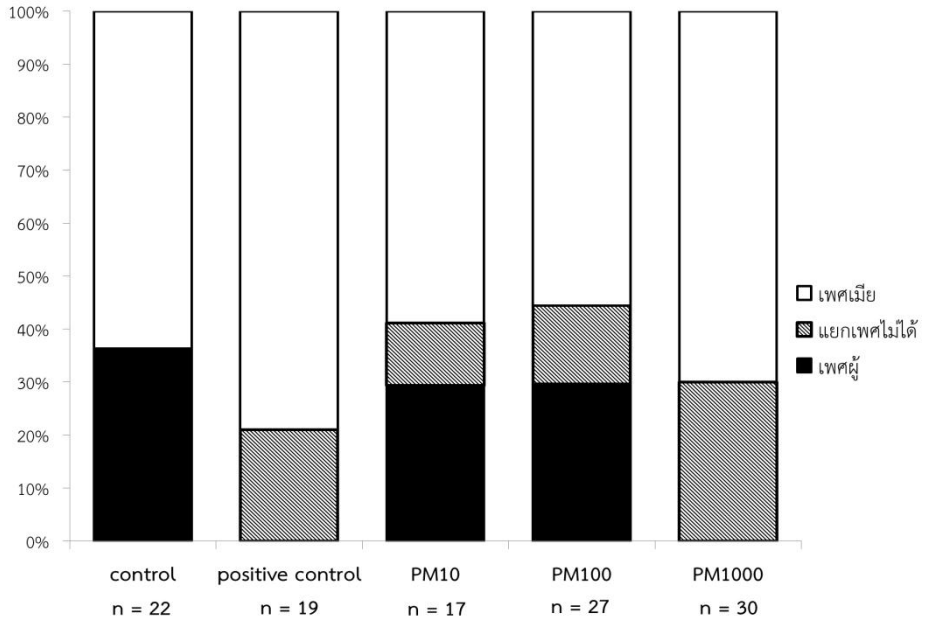
เปรียบเทียบน้ำหนักตัว (กรัม) ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร (มิลลิเมตร) และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือด (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร) ของกบนาระยะโตเต็มวัยในเพศเดียวกัน โดยนำน้ำหนักตัว ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดไปตรวจสอบหาการกระจายของข้อมูลด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov หากการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบปกติเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA โดยใช้การทดสอบอย่างมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่สุดแบบ LSD แต่หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบปกติเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลองด้วย Kruskal-Wallis โดยใช้การทดสอบความมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่สุดแบบ Dunn ในโปรแกรม SigmaPlot 11.0

4.3 ผลการทดลอง

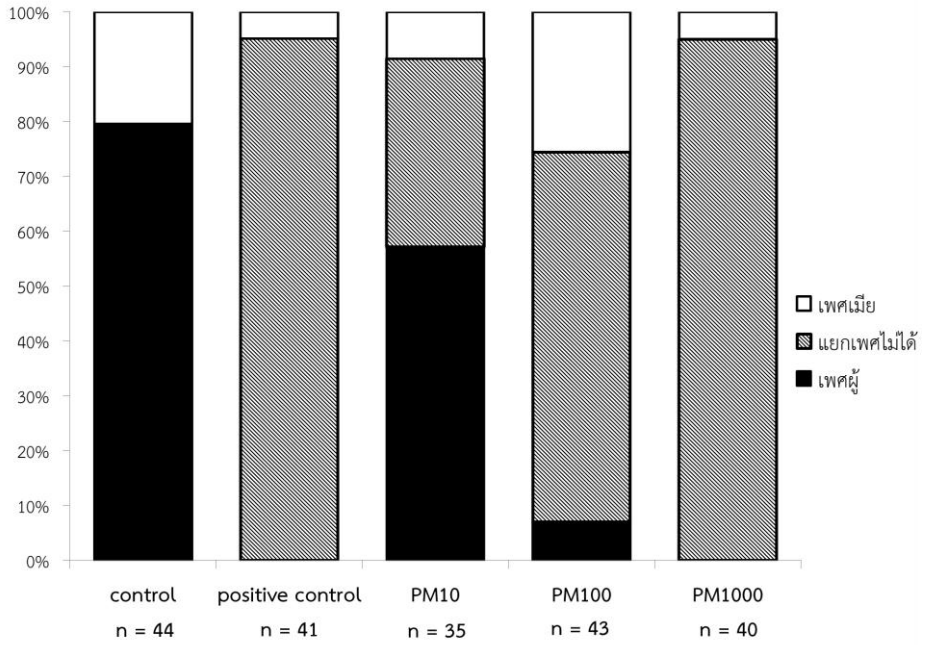
4.3.1 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการกำหนดเพศของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนเพศของกบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์มีอัตราส่วนของกบนาเพศผู้ต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=8/22), positive control (n=0/19), PM10 (n=5/17), PM100 (n=8/27), และ PM1000 (n=0/30) เท่ากับร้อยละ 36.36, 0.00, 29.41, 29.63 และ 0.00 ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองจะไม่พบกบนาเพศผู้ในกลุ่ม positive control และ PM1000 และอัตราส่วนของกบนาเพศเมียต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=14/22), positive control (n=15/19), PM10 (n=10/17), PM100 (n=15/27), และ PM1000 (n=21/30) เท่ากับร้อยละ 63.63, 78.95, 58.82, 55.56, และ 70.00 ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังพบกบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้อย่างชัดเจน โดยกบนาจะกลุ่มนี้จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกคล้ายคลึงเพศเมีย คือ ไม่พบถุงเสียง แต่พบอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายอัณฑะ นอกจากนี้ยังพบว่ามีท่อนำไข่ที่มีการเจริญในกบนากลุ่มนี้ ซึ่งอัตราส่วนเพศของกบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือกบนามีเพศกำกวม (intersex) ต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=0/22), positive control (n=4/19), PM10 (n=2/17), PM100 (n=4/27), และ PM1000 (n=9/30) เท่ากับร้อยละ 0.00, 21.05, 11.77, 14.82, และ 30.00 ตามลำดับ ดังภาพ 4-4 โดยจากการทดลองนี้จะไม่พบกบนาที่ที่มีเพศกำกวมในกลุ่ม control และจากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะของกบนาที่มีเพศกำกวมพบว่า ลักษณะภายในของอัณฑะนั้นมีลักษณะเป็นท่อ seminiferous tubule อยู่ในบริเวณรอบๆ ของอัณฑะ แต่บริเวณตรงกลางของอัณฑะพบเซลล์ oocyte ประมาณ 50 เซลล์เจริญอยู่ภายใน ดังภาพ 4-6

ผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนเพศของกบนาที่เลี้ยงนอกฤดูสืบพันธุ์มีอัตราส่วนของกบนาเพศผู้ต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=35/44), positive control (n=0/41), PM10 (n=20/35), PM100 (n=3/43), และ PM1000 (n=0/40) เท่ากับร้อยละ 79.55, 0.00, 57.14, 6.98 และ 0.00 ตามลำดับ และอัตราส่วนเพศของกบนาเพศเมียต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=9/44), positive control (n=2/41), PM10 (n=3/35) PM100 (n=11/43), และ PM1000 (n=2/40) เท่ากับร้อยละ 20.46, 5.71, 8.57, 25.58, และ 5.00 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนเพศของกบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือที่มีเพศกำกวมต่อจำนวนกบนาทั้งหมดในกลุ่ม control (n=0/44), positive control (n=39/41), PM10 (n=12/35), PM100 (n=29/43), และ PM1000 (n=38/40) เท่ากับ 0.00, 95.12, 34.29, 67.44 และ 95.00 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบกบนาเพศกำกวมในกลุ่ม control เช่นเดียวกับการทดลองในฤดูสืบพันธุ์ ดังภาพ 4-7



ภาพ 4-6 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์ (พฤษภาคม 2556–สิงหาคม 2556)



ภาพ 4-7 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์ (กันยายน 2556–ธันวาคม 2556)

4.3.2 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์นั้น พบว่า น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM100 และน้ำหนักตัวของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-3 จากการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่าน้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.001) จากการเปรียบเทียบน้ำหนักกบนาเพศผู้ที่ให้สารสกัดกวาวเครือขาวในแต่ละความเข้มข้นพบว่า น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 มีค่ามากกว่าน้ำหนักของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.005) และน้ำหนักตัวของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control และ PM100 มีค่าที่น้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.003 และ p=0.034 ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหนักของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM10 ยังมีค่ามากกว่ากบนาเพศเมียกลุ่ม PM100 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p=0.019) ดังตาราง 4-1

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่าน้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้เพศในกลุ่ม control PM10 และ PM100 และน้ำหนักตัวของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control positive control PM10 PM100 และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-4 จากการวิเคราะห์ทางสถิติยังพบว่าน้ำหนักตัวของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มทั้งในเพศผู้ (p=0.468) และเพศเมีย (p=0.368) ตามลำดับ ดังตาราง 4-2

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตาราง 4-1 ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาแต่ละเพศในฤดูสืบพันธุ์

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)			ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร (มิลลิเมตร)		
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศกำกวม	เพศผู้	เพศเมีย	เพศกำกวม
control	98.20±6.20a	197.17±16.02A	-	96.25±1.57a	116.44±2.42A	-
positive	-	119.42±9.52B	112.30±7.00	-	96.74±1.81B	94.91±2.96
PM10	138.71±9.47b	209.37±32.38A	128.24±33.00	96.34±1.79a	108.98±5.16AC	94.81±5.24
PM100	106.40±5.64a	143.07±32.38BC	125.86±10.77	93.20±2.23a	99.40±3.98BC	93.58±1.98
PM1000	-	177.92±15.03AC	119.18±9.79	-	106.24±2.39ABC	101.17±5.54

ตาราง 4-2 น้ำหนักตัวและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาแต่ละเพศนอกฤดูผสมพันธุ์

กลุ่ม	น้ำหนักตัว (กรัม)			ความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร (มิลลิเมตร)		
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศกำกวม	เพศผู้	เพศเมีย	เพศกำกวม
control	80.40±3.85a	103.20±9.51A	-	93.24±1.35a	98.70±2.62A	-
positive	-	90.80±15.55A	65.72±3.83	-	96.88±4.25A	86.58±1.34
PM10	72.28±6.94a	104.34±24.14A	87.24±5.69	87.94±2.41a	102.56±5.69A	94.32±1.48
PM100	69.18±12.83a	79.45±9.31A	75.84±5.30	88.75±5.11a	93.13±3.09A	92.27±1.58
PM1000	-	118.49±15.03A	80.25±4.77	-	101.53±7.51A	91.79±1.54

ตัวหนังสือภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองของเพศผู้ในฤดูกาลเลี้ยงเดียวกัน

ตัวหนังสือภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองของเพศเมียในฤดูกาลเลี้ยงเดียวกัน

4.3.3 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM100 และความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-1 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.431) แต่ในกบนาเพศเมียพบว่าความยาวจากปลายปากถึงรูทวารในกลุ่ม positive control และ PM100 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.050 และ p<0.050 ตามลำดับ) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของความยาวปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียในความเข้มข้นที่ต่างกันของสารสกัดกวาวเครือขาว (p>0.05)

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM100 และกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาทั้งเพศผู้และเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.112 และ p=0.452 ตามลำดับ)

4.3.4 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM1000 และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-5 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณของฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางระหว่างกลุ่ม (p=0.252) และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM1000 มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.036) และมีค่ามากกว่ากลุ่ม PM10 และ PM100 อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05 และ p<0.05 ตามลำดับ) ดังตาราง 4-3

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศผู้ใน

กลุ่ม control, PM10, และ PM1000 และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าดังตาราง 4-5 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม (p=0.051) และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.001) และในกลุ่ม PM100 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.014) แต่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียที่ให้ด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวในแต่ละความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังตาราง 4-3

ตาราง 4-3 ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์

กลุ่ม	**ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาในฤดูสืบพันธุ์ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)**		**ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือกของกบนานอกฤดูสืบพันธุ์ (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)**	
	เพศผู้	**เพศเมีย**	**เพศผู้**	**เพศเมีย**
control	97.00±14.63a	66.00±4.72A	207.00±45.31a	147.75±26.26A
positive	-	68.50±16.50A	-	286.50±10.50B
PM10	87.75±10.28a	65.25±5.80A	104.80±9.93a	85.00±8.00AC
PM100	134.00±17.00a	66.00±4.02A	70.00±17.78a	81.40±9.18C
PM1000	-	101.25±13.53B	-	97.50±19.50AC

ตัวหนังสือภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็ก แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองของเพศผู้ในฤดูกาลเลี้ยงเดียวกัน

ตัวหนังสือภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ แสดงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองของเพศเมียในฤดูกาลเลี้ยงเดียวกัน

4.4 อภิปรายผลการศึกษา

4.4.1 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเพศของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ารูปแบบการกำหนดเพศของกบนาเป็นแบบ undifferentiated type (ธฤษวรรณ ไตรจิตต์, 2549) คือกบนาทั้งหมดจะมีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นเพศเมียทั้งหมด จากนั้นครึ่งหนึ่งของประชากรจะเปลี่ยนมาเป็นเพศผู้ โดยการเปลี่ยนแปลงนี้จะเกิดขึ้นตามโครโมโซมที่กำหนดเพศของกบนาตั้งแต่ต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ไม่พบกบนาเพศผู้ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม positive control และ PM1000 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่กล่าวไว้ว่า ฮอร์โมนเพศ (sex steroid hormone) จะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเมื่อได้รับในช่วงวิกฤต (critical period) ที่มีการเปลี่ยนแปลงเพศ ซึ่งช่วงวิกฤตนี้ก็จะแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสิ่งมีชีวิต (Nakamura, 2009; Hayes *et al.*, 2010; Tompsett *et al.*, 2012; Phuge and Gramapurohit, 2014) โดยที่ถ้าเป็นสารกลุ่มเอสโตรเจน เช่น เอสโตรเจนที่สร้างจากภายในร่างกาย (endogenous hormone) และเอสโตรเจนที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อม (exogenous hormone) จะไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงเพศของกบนา (sex-reversal) ได้ทั้งในกระบวนการการระบุเพศ (sex determination) (Nakamura, 2009; Nakamura, 2010; Tompsett *et al.*, 2012) และ การแยกเพศ (sexual differentiation) (Duarte-Guterman *et al.*, 2009; Hayes *et al.*, 2010; Phuge and Gramapurohit, 2014) แต่ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดลองในกบนาระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์หรือระยะ Gosner stage 46 จนถึงระยะที่เป็นตัวเต็มวัยเต็มที่ (ใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงประมาณ 3 เดือน) ดังนั้นการได้รับสารเอสโตรเจนจากสิ่งแวดล้อมน่าจะไปมีผลกับกระบวนการแยกเพศของกบนาเพียงอย่างเดียว โดยเข้าไปทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนเพศในร่างกายโดยตรงแล้วไปมีผลกับอวัยวะเป้าหมาย เช่น อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์นั้นๆ เจริญไปเป็นรังไข่ในที่สุด และจากการศึกษาที่ผ่านมาโดย Cong *et al.* (2006) พบอีกว่าสารไฟโตเอสโตรเจนกลุ่ม quercetin ที่ความเข้มข้นสูงทำให้ phenotype หรือลักษณะที่ปรากฏภายนอกของกบ *Xenopus laevis* เป็นเพศเมียมากยิ่งขึ้นโดยจะทำให้เซลล์สเปิร์มมาโตโกเนีย (spermatogonia) เกิดการ apoptosis และ necrosis อีกด้วย นอกจากนี้สารไฟโตเอสโตรเจนยังสามารถไปลดการหลั่ง luteinizing hormone ซึ่งเป็นผลให้ไปลดปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่อยู่ในกระแสเลือดอีกด้วย

เมื่อได้รับสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล และสารสกัดกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้นสูงจะทำให้ไปกระตุ้นเซลล์ oocyte ที่ยังไม่ได้สลายไปให้มีการเจริญขึ้นอีกครั้งหนึ่ง ดังนั้นจึงทำให้กบนาในกลุ่ม

positive control และ PM1000 เป็นกบนาที่ไม่สามารถที่จะแยกเพศได้หรือเกิดภาวะที่มีเพศกำกวม (intersex) ได้

นอกจากนี้ยังมีผลการทดลองที่พบท่อนำไข่ในกบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือมีเพศที่กำกวมอาจเกิดจากสารเอสโตรเจนที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมนั้นไปมีผลทำให้เกิดการทำงานร่วมกันระหว่างเอสโตรเจนและ Anti-Müllerian hormone (Hutson *et al.*, 1982) ซึ่งเป็นฮอร์โมนตัวหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งการเจริญของท่อนำไข่(Lasala *et al.*, 2004) ในช่วงที่ก่อนหรือระหว่างกระบวนการการแยกเพศ (Piprek *et al.*, 2013) เป็นผลให้ Müllerian duct ซึ่งจะเจริญไปเป็นท่อนำไข่นั้นถูกเก็บรักษาไว้และไม่สลายไปตามอิทธิพลของ Anti-Müllerian hormone ซึ่งการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hutson *et al.* (1982) ที่พบ Müllerian duct ในตัวอ่อนของไก่เพศผู้ที่ฉีดสาร diethylstilbestrol ซึ่งเป็นสารประกอบเอสโตรเจนชนิดหนึ่ง ดังนั้นจึงอาจทำให้กบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือมีเพศกำกวมนั้นแสดงลักษณะที่มีท่อนำไข่และถูกจัดให้เป็นกลุ่มที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือมีเพศกำกวมตามการจำแนกของ McCoy *et al.* (2008) ซึ่งอัตราส่วนของกบนาที่ไม่สามารถแยกเพศได้หรือมีเพศกำกวมนั้นมีอัตราส่วนที่มากขึ้นตามปริมาณของสารสกัดกวาวเครือขาวที่ให้ในการศึกษาครั้งนี้

4.4.2 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากผลการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวของกบนาเพศเมียมากกว่ากบนาเพศผู้ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปตามลักษณะสัณฐานที่แตกต่างกันระหว่างเพศในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kupfer (2009) ที่ศึกษาน้ำหนักตัวและขนาดตัวของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเพศเมียพบว่าจะมีค่ามากกว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเพศผู้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Gramapurohit *et al.* (2004) พบว่ากบนาอินเดีย *Hoplobatrachus tigerinus* (Daud) เพศเมียมีน้ำหนักตัวมากกว่าเพศผู้เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าในการทดลองครั้งนี้กบนาที่เลี้ยงนอกฤดูสืบพันธุ์ (กันยายน – ธันวาคม) จะมีขนาดและน้ำหนักตัวที่น้อยกว่ากบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ (พฤษภาคม-สิงหาคม) (Boone *et al.*, 2007; Lonuchit, 2010; วราภรณ์ ชัยบรรจงเวช, 2538) และจากผลการทดลองครั้งนี้ พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักตัวของกบนาในเพศเมียในกลุ่ม positive control และ PM100 มีน้ำหนักที่น้อยกว่ากลุ่ม control ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Cong *et al.* (2006) ซึ่งการมีน้ำหนักตัวที่น้อยนี้เป็นผลมาจากสารประกอบเอสโตรเจนไปหน่วงการเติบโตของกบนา

มีการศึกษาในหนูแรทเพศเมีย (Anukulthanakorn, 2013) ที่มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้นเมื่อตัดรังไข่ออก สามารถอธิบายได้ว่า การลดลงของสารกลุ่มเอสโตรเจนมีผลต่อไฮโพทาลามัสและเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งไฮโพทาลามัสเป็นศูนย์ควบคุมที่ทำให้มีความอยากอาหาร ดังนั้นการตัดรังไข่ในหนูแรทจึงเหนี่ยวนำให้หนูแรทนั้นมีความอยากอาหารเพิ่มมากขึ้นจึงเป็นผลให้น้ำหนักตัวของหนูแรทเพิ่มมากขึ้นด้วย ในทางกลับกัน ถ้าสารกลุ่มเอสโตรเจนเพิ่มมากขึ้นก็จะทำให้ความอยากอาหารของหนูแรทลดน้อยลง เป็นผลให้การกินอาหารของหนูแรทลดลง ส่งผลให้น้ำหนักตัวของหนูแรทลดลงด้วย (Anwar *et al.*, 2001; Minokoshi *et al.*, 2008) ดังนั้นจากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า กบนาเพศเมียที่ได้รับสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล และสารสกัดกวาวเครือขาวปริมาณ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวนั้นมีน้ำหนักตัวที่ต่ำกว่ากลุ่ม control อาจจะเป็นผลมาจากความอยากอาหารของกบนาในกลุ่ม positive control และ PM100 ลดน้อยลงเนื่องมาจากอิทธิผลของสารประกอบเอสโตรเจนและไฟโตเอสโตรเจนที่ให้ในการทดลอง จึงส่งผลให้น้ำหนักของกบนาทั้ง 2 กลุ่มนี้ (กลุ่ม positive control และ กลุ่ม PM100) ในฤดูสืบพันธุ์มีน้ำหนักน้อยลงไปดังเช่นการศึกษาในหนูแรท ซึ่งจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษากลไกนี้เพิ่มเติมต่อไป

นอกจากนี้อาจจะเป็นผลมาจากเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งเนื้อเยื่อไขมันเป็นศูนย์กลางที่ ligand จะเข้าไปจับ ER-beta เมื่อได้รับสารกลุ่มเอสโตรเจน (Pedersen *et al.*, 1996; Anwar *et al.*, 2001; Breton *et al.*, 2011) ดังนั้นเมื่อกบนาได้รับสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล และสารสกัดกวาวเครือขาวเข้าไปอาจทำให้เซลล์เนื้อเยื่อไขมันมีกิจกรรมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจากกิจกรรมที่เพิ่มมากขึ้นนี้เองก็จะทำให้มีสารกลุ่ม peroxide ที่เป็นพิษต่อเซลล์มากขึ้น ดังนั้นจึงทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงานเพิ่มมากขึ้นเพื่อสร้าง peroxisome มากำจัดสารพิษนี้ ซึ่งเมื่อนำทั้งสององค์ประกอบที่กล่าวมาข้างต้นมารวมกัน ซึ่งสันนิษฐานได้ว่าอาจจะเป็นสาเหตุของน้ำหนักที่ลดลงของกบนาที่ได้รับสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล และ สารสกัดกวาวเครือขาว (กลุ่ม PM1000) จึงจำเป็นที่จะต้องศึกษากลไกนี้ต่อไปเช่นกัน

จากการทดลองครั้งนี้ยังพบอีกว่า สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ทำให้น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในฤดูสืบพันธุ์มีน้ำหนักมากกว่ากลุ่ม control ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นนี้อาจจะมีสาเหตุมาจากหลายๆ ปัจจัย เช่น ไขมันที่สะสมในร่างกาย กล้ามเนื้อ และกระดูก (Herrel *et al.*, 2014) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในเรื่องความยาวของกระดูกต้นขาในบทที่ 5 พบว่าความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 .ในฤดูสืบพันธุ์มีความยาวมากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.008) และความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 .ในฤดูสืบพันธุ์มีแนวโน้มที่มีความยาวมากกว่ากลุ่ม control (p=0.076) ซึ่งความยาวของกระดูกต้นขาและปลายขาอาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 ในฤดูสืบพันธุ์มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ

4.4.3 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่า ความยาวจากปลายถึงรูทวารของกบนาเพศเมียที่ให้ด้วยสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลและสารสกัดกวาวเครือขาวในกลุ่ม PM100 ในฤดูสืบพันธุ์นั้นมีความยาวน้อยกว่ากลุ่ม control ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Bauer-Dantoin *et al.* (2010) ได้แสดงให้เห็นว่าสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลที่ให้ลูกอ๊อดของกบ *Xenopus laevis* ทั้งความเข้มข้นสูงและต่ำต่างก็มีผลต่อกระดูกสันหลังทั้งสิ้น โดยสาร17บีต้า-เอสตราไดออลนี้จะไปมีผลกับกระดูกที่เกิดจากกระบวนการ endochondral และ intramembranous ossification แต่ผลการทดลองนี้ให้ผลที่ตรงข้ามกับงานวิจัยก่อนหน้านี้โดย Bauer-Dantoin *et al.* (2010) ที่พบว่า การให้สาร 17บีต้า-เอสตราไดออลนั้นทำให้ความยาวลำตัวของลูกอ๊อดของกบ *Xenopus laevis* มีค่ามากขึ้น ซึ่งสามารถที่จะอธิบายได้ว่าสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ที่ลูกอ๊อดได้รับเข้าไปนั้นไปมีผลทำให้กระตุ้นการทำงานของฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์ (Huang and Brown, 2000) ซึ่งมีมากในกบที่อยู่ในระยะลูกอ๊อดและยังเป็นฮอร์โมนตัวสำคัญที่ทำให้เกิดการเมตามอโฟซิส (metamorphosis) อีกด้วย เมื่อถูกกระตุ้นก็จะทำให้มีการเจริญของกระดูกเพิ่มมากขึ้น แต่ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองในกบนาระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis) หรือในระยะ Gosner stage 46 ซึ่งเป็นระยะที่ฮอร์โมนจากต่อมไทรอยด์นั้น ลดบทบาทการทำงานหรือแทบจะไม่มีบทบาทในกบที่เป็นระยะโตเต็มวัย (Feder and Burggren, 1992) ดังนั้นผลการศึกษาผลของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาระยะโตเต็มวัยให้ผลที่ตรงข้ามกับลูกอ๊อดของ *Xenopus laevis* และอาจจะเป็นผลมาจากการที่กบนากินอาหารลดลงทำให้อัตราการเจริญของกระดูกต่ำกว่ากลุ่ม control อีกด้วย นอกจากนี้แล้วผลของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียนั้นยังสอดคล้องกับผลต่อน้ำหนักตัว และความยาวของกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ (บทที่ 5) ที่มีผลไปในทิศทางเดียวกันคือมีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ

4.4.4 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากผลต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศผู้ระยะโตเต็มวัยทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลองนั้นสอดคล้องกับการทดลองของ Qin *et al.* (2007) ที่พบว่าปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบ *Xenopus laevis*

เพศผู้ที่ให้ด้วยสาร polychlorinated biphenyls (PCBs) และ Aroclor1254 ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control และการศึกษาของ Lonuchit (2010) ที่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนา *Hoplobatrachus rugulosus* ที่ให้ด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม control เช่นกัน

ในทางกลับกัน ผลสารสกัดกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียระยะโตเต็มวัยที่เลี้ยงทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์นั้นยังไม่ชัดเจน และปริมาณของฮอร์โมนไม่ขึ้นกับปริมาณสารสกัดกวาวเครือขาวที่ให้เพิ่มขึ้น โดยที่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดที่วัดด้วยเทคนิค radioimmunoassay นั้นเป็นการวัดฮอร์โมนชนิดเอสตราไดออลเพียงเท่านั้น ไม่สามารถวัดปริมาณสารไฟโตรเอสโตรเจนที่กบนาได้รับจากสารสกัดกวาวเครือขาวได้ และผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM1000 มีค่ามากกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการศึกษาดัชนีการเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadosomatic index; GSI) ของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 ในฤดูสืบพันธุ์เพิ่มเติมพบว่ามีค่าเท่ากับ 0.1207±0.079, 0.1804±0.0396, 0.1781±0.0957, 0.1305±0.0170, และ 0.0845±0.0107 และจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ไม่มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดลอง (p=0.084) :ซึ่งจะเห็นว่าไม่สัมพันธ์กับปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนที่มีปริมาณเพิ่มขึ้น ดังนั้นอาจจะกล่าวได้ว่าปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM1000 ในฤดูสืบพันธุ์ไม่ได้เป็นผลมาจากการผลิตเอสโตรเจนของรังไข่ แต่อาจจะเป็นการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจนในร่างกายที่สามารถสร้างมาจากแหล่งอื่นนอกเหนือรังไข่ เช่น adrenal cortex (Rosol *et al.*, 2001) และ เนื้อเยื่อไขมัน (Simpson, 2003) เป็นต้น

นอกจากนี้ในการวัดปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์ที่มีปริมาณแตกต่างกันก็เป็นผลมากจากฤดูกาล (Moore *et al.*, 2005)

บทที่ 5
ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อมวลกระดูกและจุลกายวิภาคกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

5.1 บทนำ

กระดูกแข็งเป็นอวัยวะหนึ่งที่ประกอบขึ้นเป็นโครงร่างภายในของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ลักษณะของกระดูกมีลักษณะแข็ง แน่น แข็งมีสีขาวหรือสีเหลืองอ่อน (cortical bone) ภายในมีลักษณะเป็นรูพรุนคล้ายฟองน้ำ (trabecular bone) ตรงกลางเป็นที่อยู่ของหลอดเลือดไขกระดูก (marrow) ภายนอกสุดจะมีเยื่อหุ้มกระดูกชั้นนอก (periosteum) ห่อหุ้มอยู่บริเวณส่วนที่เป็นข้อต่อกระดูกนั้นมีหน้าที่สำคัญในการค้ำจุนร่างกายและเป็นที่ยึดเกาะของกล้ามเนื้อในการเคลื่อนที่หรือเคลื่อนไหว ดังนั้นหากกระดูกแข็งเกิดความอ่อนแอหรือมีความแข็งหรือความหนาแน่นที่เปลี่ยนแปลงไปนั้นอาจจะส่งผลกระทบอย่างมากต่อการดำรงชีวิตของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในอันดับ Anura เป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดหนึ่งที่เคลื่อนที่โดยอาศัยการกระโดดเป็นหลัก ดังนั้นกระดูกแข็งจึงเป็นอวัยวะหนึ่งที่มีความสำคัญและจำเป็นอย่างมากในการเคลื่อนที่ของสัตว์ชนิดนี้ ถึงแม้ว่าผิวหนังของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินจะสามารถดูดซึมแคลเซียมไอออนผ่านเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรงและมี endolymphatic sacs ซึ่งเป็นอวัยวะอยู่ในหูชั้นใน ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บสะสมแคลเซียมเพื่อการสร้างกระดูกแล้ว (Dempster, 1930; Pilkington and Simkiss, 1966; Srivastav *et al.*, 2000) แต่ยังมีการรายงานถึงภาวะกระดูกบางในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก (Stetter, 1995) บางชนิด ซึ่งสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีภาวะกระดูกบางนี้ทำให้กระดูกแตกหักได้ง่ายเมื่อมีปัจจัยภายนอกมากระทบ (Mikio, 2011) และอาจส่งผลต่อการดำรงชีวิตได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาโดย Yang *et al.* (2011) พบว่ากบ *Rana dybowski* ที่อยู่ในฟาร์มเลี้ยงมีความหนาแน่นกระดูกน้อยกว่ากบที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติ แต่ยังไม่พบรายงานภาวะกระดูกบางในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกประเทศไทยมาก่อน

กวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Leguminosae ที่มีสารกลุ่มไฟโตเอสโตรเจนหลากหลายชนิด ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ (Urasopon *et al.*, 2008) พบว่าสารสกัดกวาวเครือขาวนั้นสามารถที่จะรักษาและป้องกันภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทที่ตัดรังไข่ได้ ดังนั้นจึงมีการนำกวาวเครือขาวไปใช้ทดลองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่เผชิญกับปัญหาภาวะกระดูกบางหรือภาวะกระดูกพรุน

แม้ว่าจะยังไม่มีรายงานการเกิดภาวะกระดูกบางหรือกระดุกพรุนในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในประเทศไทย แต่หากต้องเผชิญกับภาวะดังกล่าว กวาวเครือขาวจะสามารถรักษาหรือป้องกันภาวะ

กระดูกบางหรือกระดูกพรุนในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกได้หรือไม่ และนอกจากนั้นยังไม่เคยมีการศึกษาความหนาแน่นของกระดูกในกบนามาก่อน จึงเป็นที่มาของวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นและเนื้อเยื่อกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย ซึ่งจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านความหนาแน่นของกระดูกกบนาในฟาร์มเลี้ยงและผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นของกระดูกกบนาในฟาร์มเลี้ยง

5.2 วิธีศึกษา

5.2.1 การเก็บตัวอย่างกระดูกต้นขา (femur) และ กระดูกปลายขา (tibiofibular) ของกบนาระยะโตเต็มวัย

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อกบนาระยะโตเต็มวัย โดยเลี้ยงกบนาจนเป็นถึงระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis, Gosner stage 46) อายุประมาณ 30-45 วัน จำนวน 600 ตัว นำไปเลี้ยงในบ่อปูนซีเมนต์ที่มีขนาดกว้าง 300 เซนติเมตร ยาว 300 เซนติเมตร สูง 150 เซนติเมตร ภายในบ่อใส่น้ำจากแหล่งน้ำธรรมชาติปริมาตร 7,500 มิลลิลิตร โดยใส่กบนาจำนวนบ่อละ 60 ตัว พร้อมวางกระเบื้องลอนคู่เพื่อใช้เป็นที่หลบซ่อนตัวของกบนาจำนวน 1 แผ่น บ่อเลี้ยงได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน ที่สถานีวิจัยคัดเลือกและบำรุงพันธุ์สัตว์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตำบลไหล่น่าน อำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน ในการเริ่มต้นการทดลองแบ่งกบนาที่เลี้ยงออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 120 ตัว โดยทำการทดลองจะแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ในฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556) และนอกฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556) ซึ่งแบ่งกลุ่มในแต่ระยะดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม กบนาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงกบนามาตรฐาน (control)

กลุ่มที่ 2: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ที่ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (positive control)

กลุ่มที่ 3: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 0.479 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM10)

กลุ่มที่ 4: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 4.79 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM100)

กลุ่มที่ 5: กบนาเลี้ยงด้วยอาหารที่เคลือบด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ปริมาณ 47.9 มิลลิกรัมกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (PM1000)

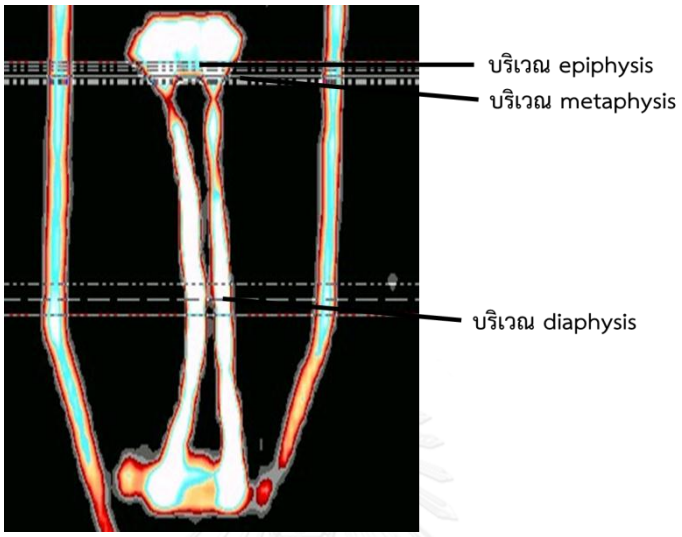
สาร 17บีต้า-เอสตราไดออล (E_2) ปริมาณ 0.1 มิลลิกรัม และ สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวที่ทดสอบฤทธิ์แล้ว (ผลการทดลองในบทที่ 3) ปริมาณ 0.479, 4.79, และ 4.79 มิลลิกรัมตามลำดับ นำมาละลายใน 95% เอทานอล ปริมาณ 30 มิลลิลิตร เมื่อสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลและสารสกัดสกัดกวาวเครือขาวละลายในตัวทำละลายหมดแล้ว นำมาเคลือบลงบนอาหารเลี้ยงกบนามาตรฐานตามกลุ่มการทดลองที่กำหนดไว้ด้านบน จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเพื่อระเหยตัวทำละลายออก ชั่งน้ำหนักตัวของกบนาเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักทุก 4 วัน หลังจากระยะเมตามอโฟซิสสมบูรณ์ (complete metamorphosis) แล้ว โดยให้อาหารกบนาในปริมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน ในช่วงเช้าและเย็นของทุกวันเป็นระยะ 3 เดือน หลังจากนั้นการุณยฆาตกบนาทั้งหมดด้วยสาร MS-222 ที่มีความเข้มข้นสูง จากนั้นกระดูกต้นขา (femur) (ชูชาติ ยังบรรเทา, 2546) และกระดูกปลายขา (tibiofibular) (ชูชาติ ยังบรรเทา, 2546) ทั้งสองข้างของกบนาจะถูกเก็บโดยข้างขวาจะถูกเก็บในสารละลาย normal saline (0.9% NaCl) (A.N.B. Laboratories Co., Ltd.) ปริมาณ 15 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์หามวลกระดูก และข้างซ้ายจะถูกเก็บในสารสะละลาย Davidson's fixative เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนใส่ 70% เอทานอล และนำไปศึกษาเนื้อเยื่อของกระดูกต่อไป

ก่อนนำกระดูกต้นขาและกระดูกปลายขาของกบนาข้างขวาไปวิเคราะห์หาความหนาแน่นกระดูก กระดูกทั้งสองชิ้นจะถูกนำมาวัดความยาวด้วยสายวัด โดยวัดจากบริเวณสุดของกระดูกด้านหนึ่งไปยังอีกด้านหนึ่งตามแนวของกระดูกแล้วบันทึกผล

5.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

การศึกษาความหนาแน่นกระดูกของกบนาในระยะโตเต็มวัยจะศึกษาด้วยเครื่อง peripheral quantitative computed tomography (pQCT) (XCT Research SA$^+$ with software version 6.20, Stratec Medizintechnik GmbH, Germany) โดยอาศัยหลักการที่วัตถุจะมีการดูดกลืนความเข้มของรังสีเอ็กซเลย์และติดตามผลด้วยการวัดความเข้มของรังสีเอ็กซเลย์หลังจากผ่านวัตถุแล้ว ตัวเครื่องประกอบด้วยเครื่องกำเนิดรังสีเอ็กซเลย์ ขนาด 46 กิโลโวล์ ด้วยเครื่องกำเนิดไฟฟ้าขนาด 0.03 มิลลิแอมแปร์ โดยค่าความแม่นยำและความเสถียรของเครื่องจะถูกทดสอบทุกๆ วันด้วยวัตถุมาตรฐาน (standard phantom) เมื่อเครื่องผ่านการทดสอบความแม่นยำและความเสถียรแล้วก็จะถูกนำมาใช้ทดสอบกระดูกโดยที่กระดูกต้นขาและกระดูกปลายขาจะถูกนำมาละลายน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนเริ่มการทดลอง จากนั้นนำกระดูกต้นขา (distal) มาวัดความยาวและนำมาวิเคราะห์หามวลกระดูกใน 3 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่ง epiphysis metaphysis และ diaphysis ของกระดูกโดยใช้

บริเวณ metaphyseal plate เป็นแหล่งอ้างอิงของทั้ง 3 บริเวณ ดังภาพ 5-1 และในแต่ละตำแหน่งจะถูกวิเคราะห์หาความหนาแน่นกระดูกจำนวน 3 ครั้ง

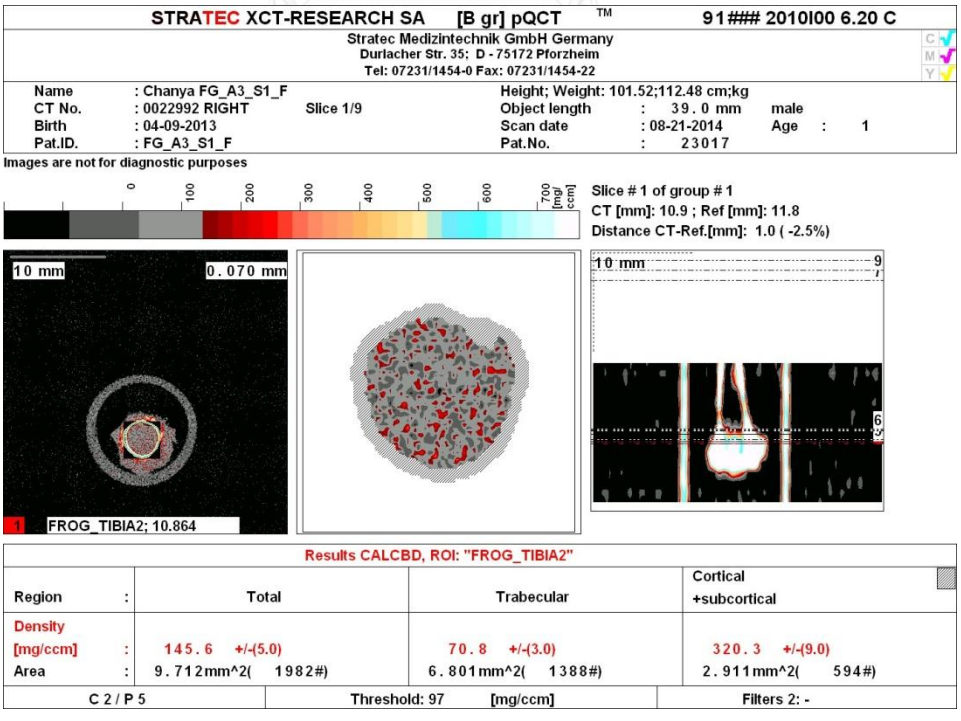


ภาพ 5-1 ตำแหน่ง epiphysis metaphysis และ diaphysis ของกระดูกต้นขา

กระดูกต้นขาตำแหน่ง epiphysis จะอยู่เหนือจากบริเวณอ้างอิง 0.2 0.4 และ 0.6 มิลลิเมตร ตำแหน่ง metaphysis จะอยู่ถัดลงมาจากบริเวณอ้างอิง 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิเมตร และตำแหน่ง diaphysis จะอยู่บริเวณกึ่งกลางของความยาวกระดูก (50% ของความยาวกระดูก) บริเวณเหนือขึ้นไปและถัดลงมาจากบริเวณกึ่งกลางกระดูกด้านละ 1 มิลลิเมตร และกระดูกปลายขาตำแหน่ง epiphysis จะอยู่เหนือจากบริเวณอ้างอิง 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิเมตร ตำแหน่ง metaphysis จะอยู่ถัดมาจากบริเวณอ้างอิง 0.1 0.2 และ 0.3 มิลลิเมตรเช่นเดียวกันและตำแหน่ง diaphysis จะอยู่บริเวณกึ่งกลางของความยาวกระดูกทั้งบริเวณที่เหนือขึ้นไปและถัดลงมาจากบริเวณกึ่งกลางกระดูกด้านละ 1 มิลลิเมตร โดยความละเอียดของภาพทั้งหมดเท่ากับ 0.07 วอกเซล (voxel) (Lundberg *et al.*, 2007) เส้นศูนย์กลางของกระดูกเท่ากับ 40 มิลลิเมตร ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Urasopon *et al.* (2007) พบว่าฤทธิ์ของกวาวเครือขาวในการป้องกันภาวะกระดูกพรุนเห็นได้ชัดเจนที่สุดในกระดูกส่วน trabecular แต่ในขณะที่ผลต่อกระดูก cortical นั้นเห็นผลที่ไม่ชัดเจนในหนูแรทที่ตัดรังไข่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงศึกษาผลต่อกระดูกส่วน cortical กับ trabecular กบนาในระยะโตเต็มวัย

กระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม control นำมาหาค่าที่ใช้แยกกระดูกส่วน cortical และ trabecular ออกจากกันโดยใช้การวิเคราะห์

ในโหมด CALCBD ซึ่งเป็นโหมดที่ใช้วิเคราะห์หาความหนาแน่นของกระดูกส่วน sub-cortical รวมกับ cortical และส่วน trabecular จากการเปรียบเทียบสีที่ใช้แสดงความหนาแน่นของกระดูกทั้งหมด โดยเริ่มต้นจากการกำหนดบริเวณที่จะศึกษา (region of interest) (ROI) จากนั้นตั้งค่าหาบริเวณที่ความหนาแน่นมีค่าแตกต่างกันและบริเวณที่เป็นกระดูกส่วน trabecular อัตโนมัติ จากนั้นโปรแกรมจะแสดงผลการวิเคราะห์ดังภาพ 5-2 ผลลัพธ์ที่ได้จากการวิเคราะห์ คือ ความหนาแน่นกระดูกส่วน sub-cortical รวมกับ cortical (ค่ามาตรฐาน 1) และค่าความหนาแน่นของกระดูกส่วน trabecular (ค่ามาตรฐาน 2) ของทุกตัวในกลุ่ม control ในตำแหน่งต่างๆ นำมาหาค่าเฉลี่ยเพื่อนำไปเป็นค่าความหนาแน่นมาตรฐานในการแยกกระดูกส่วน cortical และ trabecular ของกบนาออกจากกันในกลุ่มอื่นๆ ต่อไป โดยที่ค่าที่มากกว่าค่ามาตรฐาน 1 จะถูกจำแนกให้เป็นกระดูกส่วน cortical ค่าที่น้อยกว่าค่ามาตรฐาน 2 จะถูกจำแนกให้เป็นเนื้อเยื่ออ่อน (soft tissue) และค่าที่อยู่ระหว่างค่ามาตรฐาน 1 และค่ามาตรฐาน 2 จะถูกจำแนกให้เป็นกระดูกส่วน trabecular โดยผลการทดลองนี้จะรายงานผลในรูปแบบความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density) (BMD) ของกบนาโดยคำนวณจากน้ำหนักของแคลเซียมในกระดูกที่วัดได้ในหน่วยมิลลิกรัมต่อพื้นที่ 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (mg/cm^3) ซึ่งการทดลองในบทนี้ขั้นได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง ตามข้อตกลงการวิจัยหมายเลข 1423005 แห่งคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพ 5-2 ผลการวิเคราะห์หาค่ากระดูกส่วน cortical รวมกับ sub-cortical และส่วน trabecular

5.2.3 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ค่าความหนาแน่นกระดูกของกบนา (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร) นำไปตรวจสอบหาการกระจายตัวของข้อมูลด้วยวิธี Kolmogorov-Smirnov หากการกระจายตัวของข้อมูลเป็นแบบปกติเปรียบเทียบการทดลองระหว่างกลุ่มด้วย ANOVA โดยใช้การการทดสอบความมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่สุดแบบ LSD แต่หากการกระจายตัวของข้อมูลไม่เป็นแบบปกติเปรียบเทียบการทดลองระหว่างกลุ่มด้วย Kruskal-Wallis โดยใช้การทดสอบความมีนัยสำคัญอย่างน้อยที่สุดแบบ Dunn ในโปรแกรม SigmaPlot 11.0

5.2.4 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อลักษณะจุลกายวิภาคของกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

การศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อจุลกายวิภาคกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัยจะเลือกศึกษากระดูกของกบนาที่ความหนาแน่นกระดูกมีความแตกต่างจากกบนาในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยนำตัวอย่างกระดูกที่รักษาสภาพใน 70% เอทานอล แล้วทำให้อ่อนนุ่มลงด้วยสารละลาย 10% formic acid ต่อ 4% formaldehyde ในอัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนสารละลายทุกๆ 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย 70% เอทานอล 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นเก็บกระดูกต้นขาและปลายขาในสารละลาย 10% glycerin ใน 70% เอทานอล นาน 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อโดยวิธี Paraffin แล้วตัดตามแนวยาวด้วยเครื่อง rotary microtome (Leica RM2165, Germany) ที่ความหนา 7 ไมโครเมตร ย้อมสี Haematoxylin และ Eosin ตามวิธีมาตรฐาน และนำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Primostar, Zeiss, Germany)

5.3 ผลการทดลอง

5.3.1 ผลการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

5.3.1.1 กระดูกต้นขา (femur)

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 และความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าดังตาราง 5-1 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้

ในกลุ่ม PM10 มีค่ามากกว่าความยาวในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.008) แต่ไม่พบความแตกต่างความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ระหว่างกลุ่ม PM10 และ PM100 (p=0.203) นอกจากนี้ยังพบว่า ความยาวของกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม PM10, PM100 และ PM1000 (p>0.05) ดังตาราง 5-1

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาระยะโตเต็มวัย<u>นอกฤดูสืบพันธุ์</u>พบว่า ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 และความยาวของกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าดังตาราง 5-1 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.145) และความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM10 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.001) นอกจากนี้ยังพบว่าความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM10 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม PM100 และ PM1000 อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.007 และ p=0.002) ดังตาราง 5-1

ตาราง 5-1 ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์

กลุ่ม	**ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาในฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิเมตร)**		**ความยาวกระดูกต้นขาของกบนานอกฤดูผสมพันธุ์ (มิลลิเมตร)**	
	เพศผู้	**เพศเมีย**	**เพศผู้**	**เพศเมีย**
control	35.38±0.62	43.18±0.95	32.85±0.54	35.89±0.73
positive	-	36.92±0.76	-	34.00±1.00
PM10	38.60±0.87	41.33±1.43	32.25±0.99	29.66±0.88
PM100	37.14±0.73	40.73±1.59	28.33±3.17	34.66±0.94
PM1000	-	41.52±0.86	-	37.50±2.50

5.3.1.2 กระดูกปลายขา (tibiofibular)

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 และความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าดังตาราง 5-2 ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.076) และความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) นอกจากนี้ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control ยังมีค่าน้อยกว่ากบนาในกลุ่ม PM10, PM100, และ PM1000 อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05, p<0.05 และ p<0.05 ตามลำกับ)

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 และความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าดังตาราง 5-2 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.072 และ p=0.110 ตามลำดับ) ดังตาราง 5-2

ตาราง 5-2 ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาในและนอกฤดูสืบพันธุ์

กลุ่ม	ความยาวกระดูกปลายขาของกบนาในฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิเมตร)		ความยาวกระดูกปลายขาของกบนานอกฤดูผสมพันธุ์ (มิลลิเมตร)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
control	36.93±1.00	45.07±0.85	35.26±0.50	37.63±0.98
positive	-	37.33±0.59	-	35.00±2.00
PM10	40.00±1.00	43.77±2.03	33.25±1.16	32.33±2.40
PM100	39.37±0.77	42.78±1.49	31.00±2.51	36.44±0.62
PM1000	-	42.47±1.09	-	37.50±2.50

5.3.2 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกกบนาระยะโตเต็มวัย

5.3.2.1 ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัยในกลุ่ม control

กระดูกต้นขา (femur)

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม control โดยแบ่งความหนาแน่นกระดูกเป็น 3 ประเภท คือ ความหนาแน่นทั้งหมด (ความหนาแน่นที่เกิดจากความหนาแน่นของกระดูกส่วน cortical รวมกับ กระดูกส่วน trabecular; total bone mineral density; total BMD), ความหนาแน่นกระดูกส่วน cortical (CRT BMD) และความหนาแน่นส่วน trabecular (TRB BMD) ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis โดยความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ มีค่าดังตาราง 5-3

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาที่เลี้ยงนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม control โดยแบ่งความหนาแน่นกระดูกเป็น 3 ประเภทเช่นเดียวกับกบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ โดยความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ มีค่าดังตาราง 5-3

จากผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกต้นขาจะเห็นได้ว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน trabecular ทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis มีค่าใกล้เคียงกันมากดังนั้นค่าความหนาแน่นที่มีอิทธิผลให้ความหนาแน่นที่ตำแหน่งต่างๆ มีความแตกต่างกันในกระดูกต้นขาของกบนาจึงเป็นความหนาแน่นกระดูกส่วน cortical ซึ่งผลการทดลองต่อจากการทดลองนี้ไปจะรายงานเฉพาะความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical เท่านั้น

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาเพศผู้และเพศเมียทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis มีอย่างน้อยหนึ่งตำแหน่งที่ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาเพศผู้และเพศเมียในกลุ่ม control มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (diaphysis, $p<0.001$) ดังนั้นในการรายงานผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัย จะรายงานผลแยกเพศเป็นผลต่อเพศผู้และเพศเมียเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลอง

ตาราง 5-3 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาในกลุ่ม control ในและนอกฤดูสืบพันธุ์

ตำแหน่ง	ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนา ในฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)		ความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนา นอกฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
Epiphysis				
•Total	178.30±11.02	174.64±16.00	163.04±3.85	168.85±5.88
•CRT	658.57±16.96	618.17±18.08	709.23±6.65	739.42±16.35
•TRB	112.71±21.8	103.47±12.38	74.79±0.85	76.12±1.35
Metaphysis				
•Total	172.71±5.07	144.85±7.60	183.59±2.65	201.37±5.93
•CRT	776.30±15.49	723.47±17.68	801.06±5.21	828.86±9.17
•TRB	65.55±6.47	69.10±6.17	68.33±1.98	71.41±1.93
Diaphysis				
•Total	861.29±37.37	949.11±16.50	874.77±19.66	907.72±23.38
•CRT	1375.40±6.57	1347.72±3.82	1347.23±2.17	1346.09±2.48
•TRB	125.82±15.34	134.28±10.50	119.24±4.41	126.87±6.42

กระดูกปลายขา (tibiofibular)

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม control โดยแบ่งความหนาแน่นกระดูกเป็น 3 ประเภท คือ ความหนาแน่นทั้งหมด (ความหนาแน่นที่เกิดจากความหนาแน่นของกระดูกส่วน cortical รวมกับ กระดูกส่วน trabecular; total bone mineral density; total BMD), ความหนาแน่นกระดูกส่วน cortical (CRT BMD) และความหนาแน่นส่วน trabecular (TRB BMD) ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis โดยความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ มีค่าดังตาราง 5-4

ผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาที่เลี้ยงนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม control โดยแบ่งความหนาแน่นกระดูกเป็น 3 ประเภทเช่นเดียวกับกบนาที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ โดยความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ มีค่าดังตาราง 5-4

จากผลการวิเคราะห์ความหนาแน่นกระดูกปลายขาจะเห็นได้ว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน trabecular ทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis มีค่าใกล้เคียงกันมากดังนั้นค่าความหนาแน่นที่มีอิทธิผลให้ความหนาแน่นที่ตำแหน่งต่างๆ มีความแตกต่างกันในกระดูกต้นขาของกบนาจึงเป็นความหนาแน่นกระดูกส่วน cortical ซึ่งผลการทดลองต่อจากการทดลองนี้ไปจะรายงานเฉพาะความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical เท่านั้น

นอกจากนี้จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาเพศผู้และเพศเมียทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis มีอย่างน้อยหนึ่งตำแหน่งที่ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาเพศผู้และเพศเมียในกลุ่ม control มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (diaphysis, $p<0.001$) ดังนั้นในการรายงานผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัย จะรายงานผลแยกเพศเป็นผลต่อเพศผู้และเพศเมียเปรียบเทียบกันระหว่างกลุ่มการทดลอง

ตาราง 5-4 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาในกลุ่ม control ในและนอกฤดูสืบพันธุ์

ตำแหน่ง	ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนา ในฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)		ความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนา นอกฤดูสืบพันธุ์ (มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
Epiphysis				
•Total	273.82±13.58	204.77±13.26	233.96±4.97	218.11±10.55
•CRT	610.77±15.10	543.03±25.33	530.24±10.07	519.15±17.50
•TRB	98.70±7.16	87.95±3.92	87.86±3.49	81.09±1.86
Metaphysis				
•Total	298.84±10.53	266.18±9.73	285.08±3.59	279.56±8.58
•CRT	719.23±18.94	696.69±11.64	666.73±6.35	676.57±14.47
•TRB	87.96±10.66	89.76±8.28	98.94±2.52	101.21±4.22
Diaphysis				
•Total	845.61±43.69	903.96±20.82	858.37±13.80	909.55±21.97
•CRT	1352.00±7.35	1317.00±4.09	1306.96±2.06	1312.78±2.02
•TRB	189.60±58.91	240.05±46.42	200.54±17.66	240.00±40.66

5.3.2.1 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกกบนาระยะโตเต็มวัย

กระดูกต้นขา (femur)

ตำแหน่ง epiphysis

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM100 มีค่าเท่ากับ 658.57±16.91, 688.17±35.59 และ 684.47±21.66 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 618.17±18.08, 635.14±24.43, 652.48±32.43, 648.96±16.54 และ 624.11±14.11 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.590 และ p=0.702 ตามลำดับ) ดังภาพ 5-3

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 มีค่าเท่ากับ 709.23±6.65, 714.70±15.44 และ 684.20±12.39 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 739.42±16.35, 701.33±20.86, 779.93±14.36, 705.24±19.72, และ 665.23±42.73 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.146 และ p=0.179 ตามลำดับ) ดังภาพ 5-4

ตำแหน่ง metaphysis

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 776.30±15.49, 775.63±40.11, และ 787.52±12.19 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 723.47±17.68, 742.72±22.29, 758.41±34.97, 754.25±17.16 และ 703.73±17.05 มิลลิกรัมต่อ

ลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.900 และ p=0.257 ตามลำดับ) ดังภาพ 5-3

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10, และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 776.30±15.49, 775.63±40.11 และ 787.52±12.19 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100, และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 723.47±17.68, 742.72±22.29, 758.41±34.97, 754.25±17.16 และ 703.73±17.05 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.103 และ p=0.230) ดังภาพ 5-4

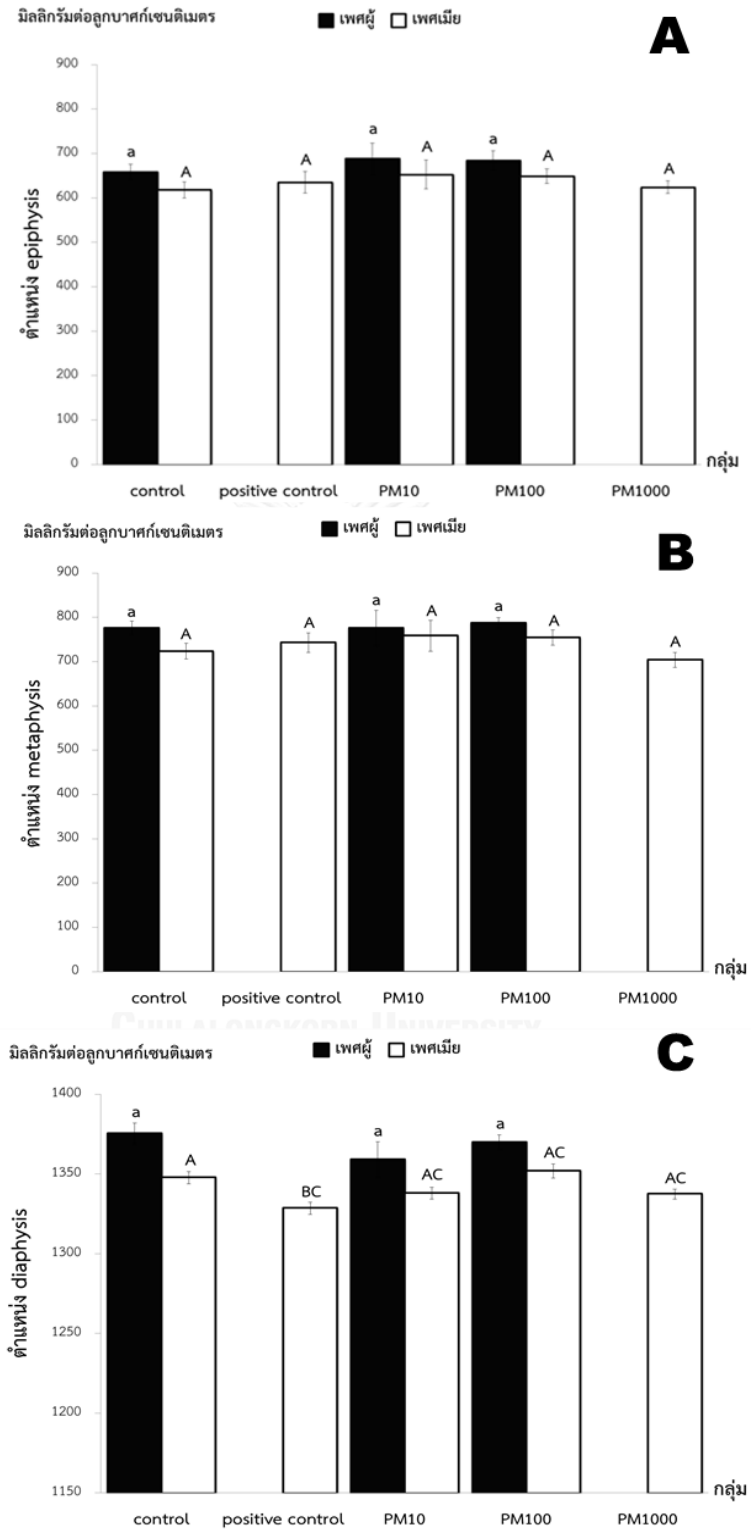
ตำแหน่ง diaphysis

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 มีค่าเท่ากับ 1375.40±6.57, 1359.99±11.23 และ 1369.97±4.61 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้เมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1347.72±3.82, 1328.60±3.83, 1337.98±3.75, 1351.95±4.40 และ 1337.49±3.08 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.329) และความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ดังภาพ 5-3

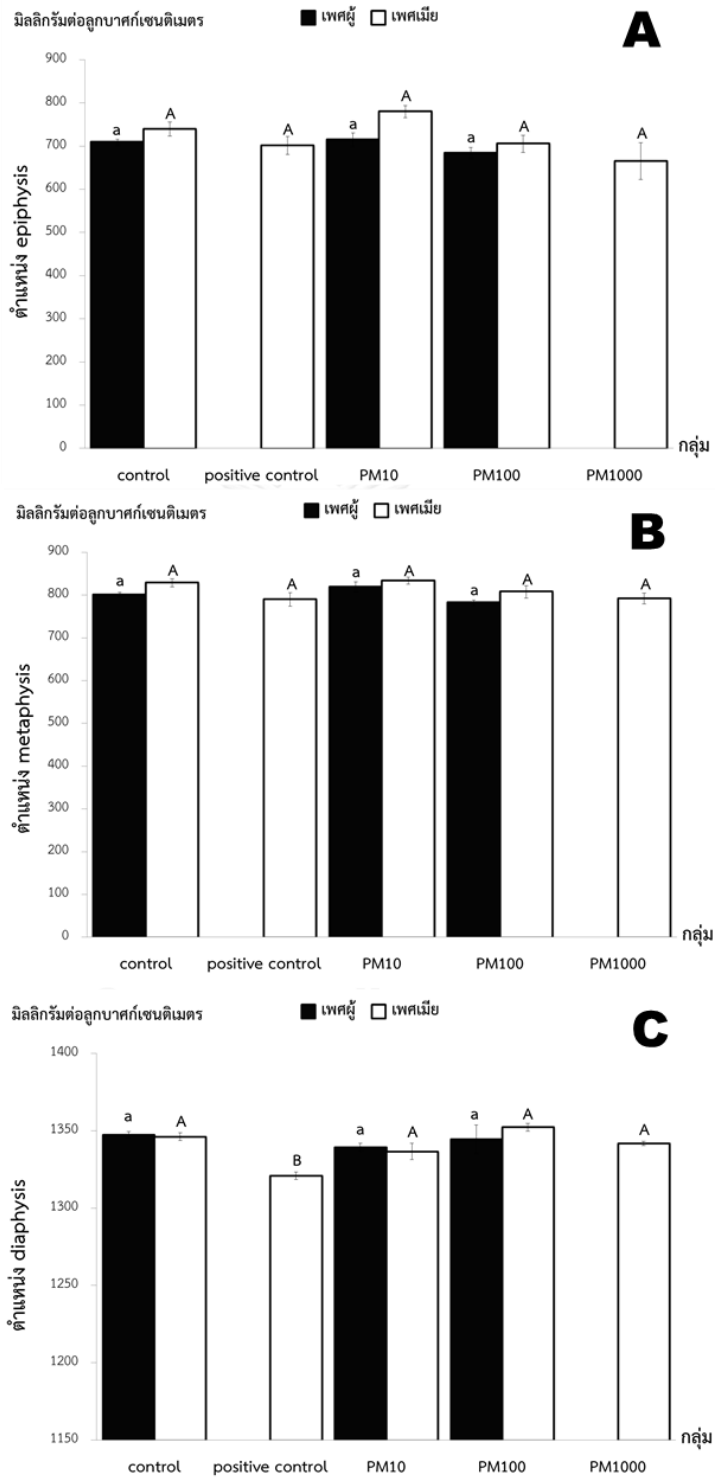
สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 มีค่าเท่ากับ 1347.23±2.17, 1339.28±2.61 และ 1344.62±9.19 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1346.09±2.48,

1320.90±2.30, 1336.56±5.20, 1352.24±2.47 และ 1341.80±1.46 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.115) และความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.001) ดังภาพ 5-4

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพ 5-3 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) ในฤดูสืบพันธุ์



ภาพ 5-4 ความหนาแน่นกระดูกต้นขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) นอกฤดูสืบพันธุ์

กระดูกปลายขา (tibiofibular)

ตำแหน่ง epiphysis

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 มีค่าเท่ากับ 610.77±15.10, 579.00±16.88 และ 543.20±22.11 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 534.03±25.33, 535.30±18.59, 483.90±13.52, 475.71±14.47 และ 477.42±12.76 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.113 และ p=0.052) ดังภาพ 5-5

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM100 มีค่าเท่ากับ 530.24±10.07, 547.52±22.64 และ 486.90±38.98 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 519.15±17.50, 532.03±19.00, 491.21±48.71, 487.88±12.84 และ 490.63±33.4 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง epiphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.379 และ p=0.530 ตามลำดับ) ดังภาพ 5-6

ตำแหน่ง metaphysis

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 719.23±18.94, 682.28±29.41, และ 681.25±15.95 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร ตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 696.69±11.64, 674.81±11.61, 658.98±14.58, 628.86±8.10 และ 633.28±11.67 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical

ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ (p=0.211) และความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาเพศเมียในกลุ่ม PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.044, p<0.001 และ p<0.001 ตามลำดับ) ดังภาพ 5-5

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 666.73±6.35, 669.91±16.19 และ 617.11±20.94 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 676.57±14.47, 671.90±6.00, 656.42±4.92, 650.08±19.69 และ 624.08±39.05 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง metaphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม (p=0.113 และ p=0.248) ดังภาพ 5-6

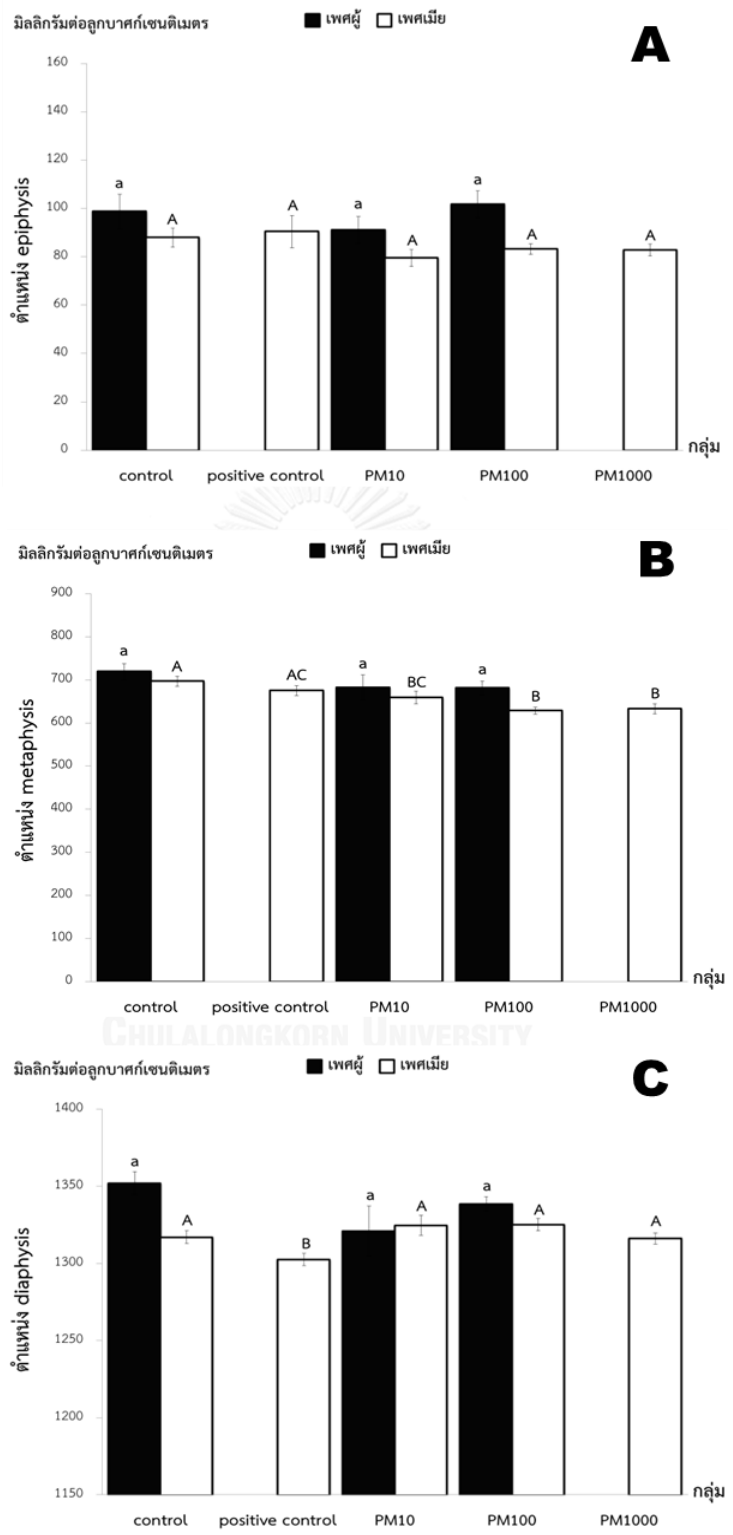
ตำแหน่ง diaphysis

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1352.00±7.35, 1321.02±16.11 และ 1338.56±4.71 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศเมียในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1317.00±4.09, 1302.50±3.89, 1324.66±6.43, 1325.16±4.07 และ 1316.08±3.58 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.075) และความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ (p=0.022) ดังภาพ 5-5

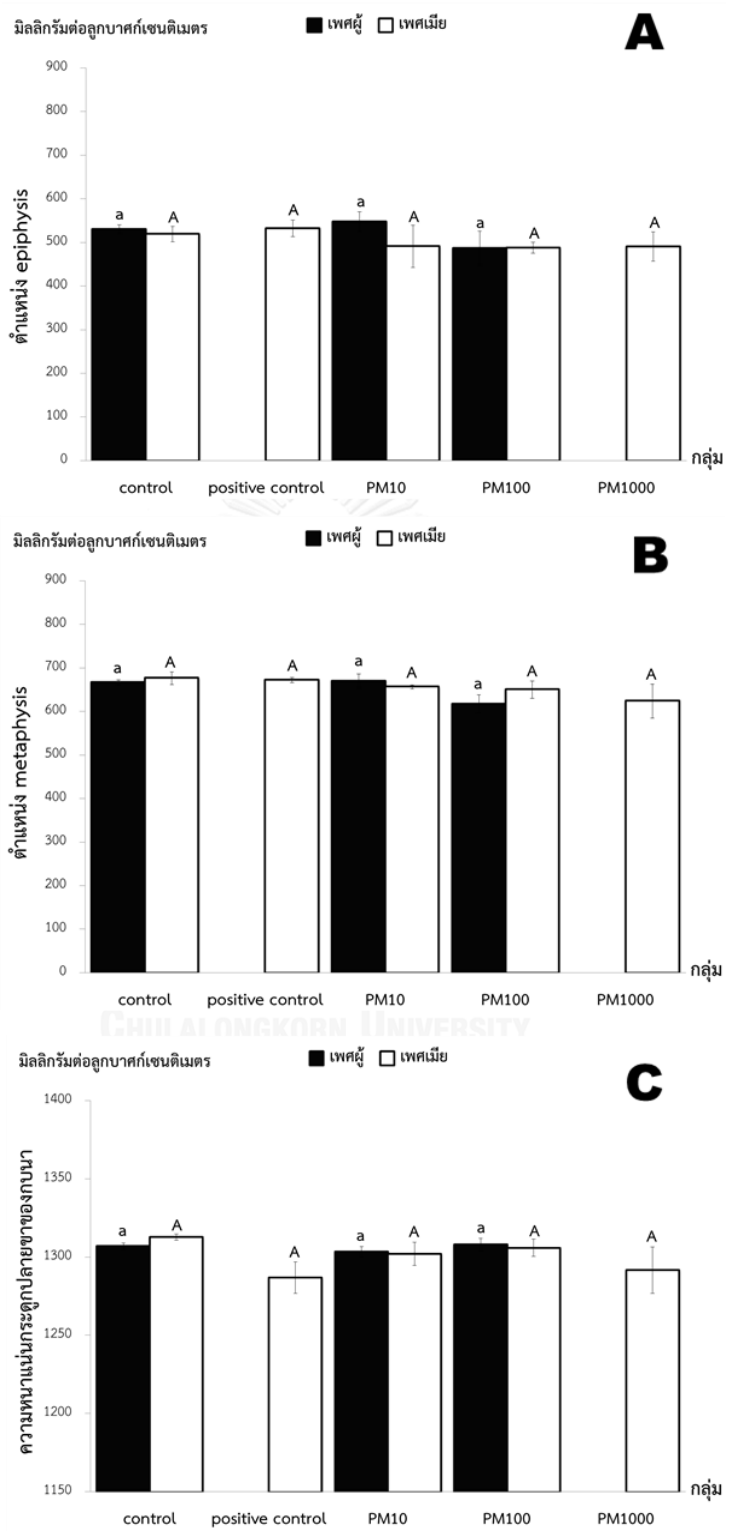
ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาระยะโตเต็มวัยนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า ความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control, PM10 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1306.96±2.06, 1303.48±3.23 และ 1307.95±3.95 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ และความหนาแน่นกระดูกกบนาเพศเมีย

ในกลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 1312.78±2.02, 1286.83±10.00, 1302.06±7.44, 1305.92±5.57 และ 1291.60±14.93 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตรตามลำดับ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ตำแหน่ง diaphysis ของกบนาทั้งเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p=0.587 และ p=0.230) ดังภาพ 5-6

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



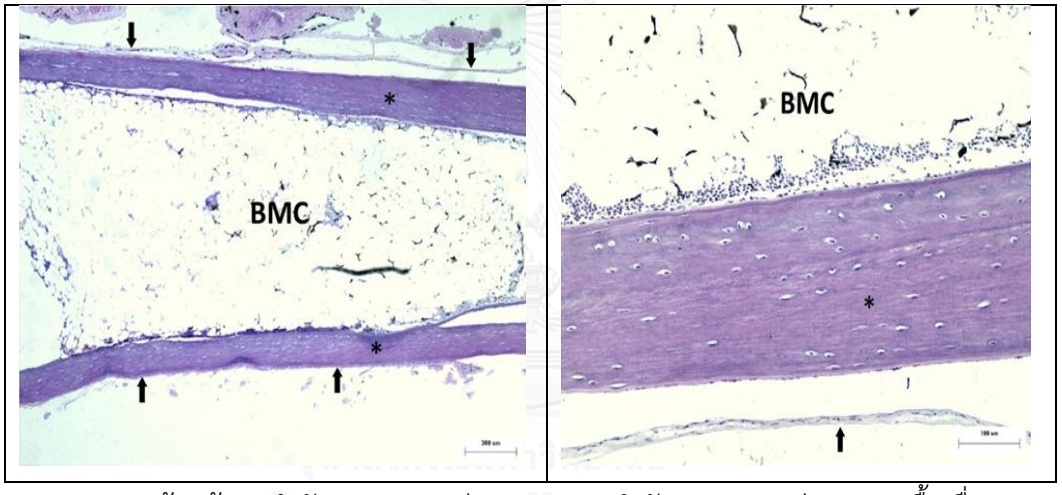
ภาพ 5-5 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) ในฤดูสืบพันธุ์



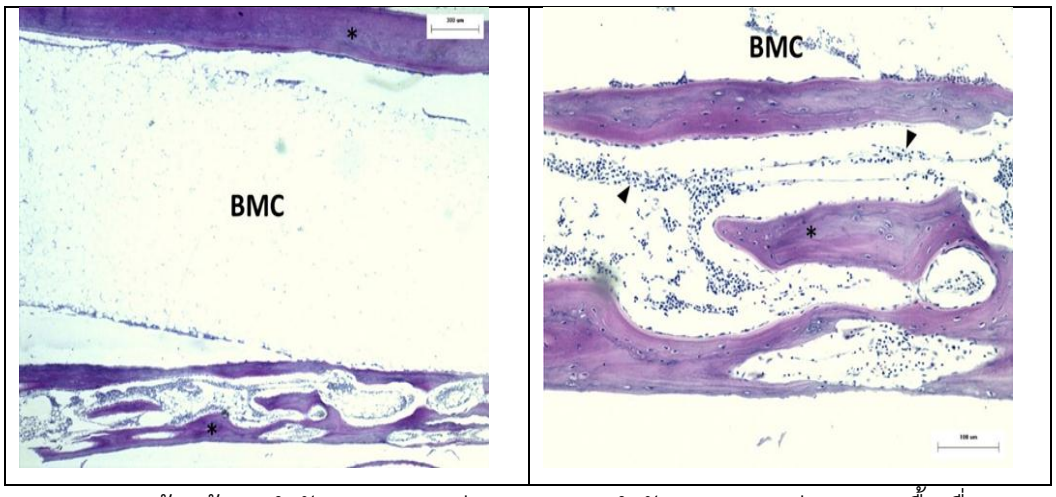
ภาพ 5-6 ความหนาแน่นกระดูกปลายขาส่วน cortical ของกบนาระยะโตเต็มวัยที่ตำแหน่ง epiphysis (A), metaphysis (B) และ diaphysis (C) นอกฤดูสืบพันธุ์

5.3.3 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อจุลกายวิภาคของกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากการศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อจุลกายวิภาคของกระดูกกบนาระยะโตเต็มวัย พบว่าทั้งกระดูกต้นขาและกระดูกปลายขาของกบนาในทุกกลุ่มการทดลองมีลักษณะที่ปกติคือ กระดูกส่วน cortical เชื่อมต่อเป็นเนื้อเดียวกันมี osteocyte กระจายอยู่ทั่วบริเวณเนื้อกระดูกขอบด้านนอกจะห่อหุ้มด้วยเยื่อ periosteum ยกเว้นจุลกายวิภาคกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 ในฤดูสืบพันธุ์มีลักษณะที่แตกต่างออกไป โดยพบว่ากระดูกส่วน cortical มีลักษณะไม่เชื่อมต่อกันและมีลักษณะพรุน คล้าย spongy bone ดังภาพ 4-31 แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน tibiofibular ของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน cortical ลักษณะปกติ และ 4-32 แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน tibiofibular ของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน cortical ที่มีลักษณะพรุนคล้าย spongy bone



ภาพ 5-7 ภาพด้านซ้าย (กำลังขยาย 2.5 เท่า) และขวา (กำลังขยาย 10 เท่า) แสดงเนื้อเยื่อกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม control ที่ตำแหน่ง metaphysis แสดงเนื้อเยื่อกระดูกส่วน cortical bone ลักษณะปกติ โดยตัวอักษร BMC แสดง Bone marrow cavity, สัญลักษณ์ ลูกศร (⬆) แสดง Periosteum, ดอกจัน (*) แสดง cortical bone, สามเหลี่ยม (▼) แสดง Bone marrow cells



ภาพ 5-8 ภาพด้านซ้าย (กำลังขยาย 2.5 เท่า) และขวา (กำลังขยาย 10 เท่า) แสดงเนื้อเยื่อกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 ที่ตำแหน่ง metaphysis แสดงเนื้อเยื่อกระดูก cortical bone ที่มีลักษณะพรุน คล้าย spongy bone โดยตัวอักษร BMC แสดง Bone marrow cavity, สัญลักษณ์ ลูกศร (⬆) แสดง Periosteum, ดอกจัน (*) แสดง cortical bone, สามเหลี่ยม (▼) แสดง Bone marrow cells

5.4 อภิปรายผลการศึกษา

5.4.1 ผลการศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากผลการศึกษาพบว่าความยาวกระดูกต้นและปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control ซึ่งจากการทดลองก่อนหน้านี้ของ Bauer-Dantoin *et al.* (2010) พบว่าสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลในความเข้มข้นสูง (2.724x10-7 mg/mL) จะเข้มข้นสูงจะยับยั้งกระบวนการ endochondral และ intramembranous ossification โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว หรือเท่ากับ $3.33x10^{-3}$ mg/mL ซึ่งมีค่ามากกว่าที่ Bauer-Dantoin *et al.* (2010) ได้รายงานไว้ ดังนั้นจากการยับยั้งกระบวนการ endochondral ossification จึงทำให้ความยาวของกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control

5.4.2 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากการศึกษาความหนาแน่นกระดูกต้นขาที่ตำแหน่ง epiphysis และ metaphysis พบว่ามีค่าความหนาแน่นที่น้อยกว่าตำแหน่ง diaphysis หรือกึ่งกลางของกระดูกต้นขาซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Liu *et al.* (2015) ที่ศึกษาความหนาแน่น bone-derived biology apatite (Bap) ซึ่งเป็นการศึกษาถึงน้ำหนักของสารประกอบกลุ่ม calcium hydroxyapatite และ

manganese (III) nitride ของ *Rana temporaria* พบว่าความหนาแน่นที่ตรงกลางกระดูกต้นขาจะมีค่าความหนาแน่นมากกว่าที่บริเวณปลายของกระดูก แต่มีความหนาแน่นที่แตกต่างกันเนื่องจากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเฉพาะสารประกอบกลุ่ม calcium hydroxyapatite เพียงเท่านั้น

นอกจากนี้ยังพบอีกว่าความหนาแน่นของกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาเพศเมียในกลุ่ม positive control นั้นมีค่าน้อยกว่ากลุ่ม control ซึ่งผลการทดลองในส่วนนี้สามารถอธิบายได้ว่า สาร 17บีต้า-เอสตราไดออล สามารถเป็นได้ทั้งตัวกระตุ้นและยังยั้ง endochondral ossification ขึ้นอยู่กับชนิดของสิ่งมีชีวิต ความเข้มข้น และระยะการเจริญ โดยจากการศึกษาของ Bauer-Dantoin *et al.* (2010) พบว่าความเข้มข้นของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ในปริมาณต่ำ ($2.724x10^{-9}$ mg/mL) ทำให้เร่งอัตราการ chondogenesis บางระยะใน ossification และความเข้มข้นของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ในปริมาณสูง ($2.724x10^{-7}$ mg/mL) ทำให้ยับยั้ง endochondral ossification โดยในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นเท่ากับ $3.33x10^{-3}$ mg/mL ซึ่งมีความเข้มข้นที่สูงกว่าใน Bauer-Dantoin *et al.* (2010) แต่ผลการทดลองที่ไม่สอดคล้องกันเนื่องจากผลในทางอ้อมของ 17บีต้า-เอสตราไดออล มีฤทธิ์ไปกระตุ้น thyroid hormone ซึ่งทำให้เกิด chondogenesis และ osteogenesis (Huang and Brown, 2000) และเป็นฮอร์โมนตัวสำคัญที่มีบทบาทมากในช่วงที่เป็นลูกอ๊อด แต่ thyroid hormone ไม่ค่อยมีการทำงานและบทบาทที่สำคัญในระยะโตเต็มวัย (Feder and Burggren, 1992) ซึ่งสมดุลของการสร้างกระดูกนั้นจะขึ้นอยู่กับอัตราการสร้างและสลายกระดูกในระยะลูกอ๊อดที่มีอัตราการสร้างที่มากกว่าซึ่งเป็นผลมาจาก thyroid hormone ดังนั้นจึงทำให้เพิ่มอัตราการสะสมแคลเซียมและการเจริญของกระดูก แต่เมื่ออยู่ในระยะโตเต็มวัยอัตราการสร้างที่เป็นผลมาจาก thyroid hormone น้อยลงดังนั้นจึงทำให้อัตราการสลายมีมากกว่า จึงเป็นผลให้มีค่าความหนาแน่นของกระดูกมีค่าน้อยลงด้วย ทั้งนี้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า ผลสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล สามารถเห็นผลได้ชัดเจนทั้งกระดูกต้นขาและปลายขาในกระดูกส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis

ส่วนผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกทั้งต้นขาและปลายขาของเพศเมียในกลุ่ม PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าน้อยกว่ากบนาในกลุ่ม control นั้นโดยไปมีผลคล้ายการทำงานของสาร 17บีต้า-เอสตาไดออล โดยเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันของสารเอสโตรเจนที่อยู่ภายในร่างกายของกบนาเองและสารไฟโตเอสโตรเจนจากสารสกัดกวาวเครือขาวที่ให้ในการทดลองและอาจจะกระตุ้นให้อัตราการสร้างและสลายกระดูกเร็วขึ้น (bone turnover rate) (Wronski *et al.*, 1988)

อัตราการสร้างและสลายกระดูกที่เร็วกว่าปกตินี้มีซึ่งแนวโน้มนี้จะพบเฉพาะในกลุ่มตัวเมียเท่านั้น ซึ่งการทดลองนี้ให้ผลที่แตกต่างกับการทดลองในหนูแรทที่สารสกัดจากกวาวเครือขาวไปมีผลทำให้อัตราสร้างและสลายของกระดูกช้าลง ดังนั้นจึงทำให้หนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่เมื่อให้สารสกัด

กวาวเครือขาวความหนาแน่นกระดูกที่เพิ่มมากขึ้น (Urasopon *et al.*, 2007; Urasopon *et al.*, 2008) ซึ่งจากการทดลองนี้จะปรากฏผลในเฉพาะกบนาเพศเมียเท่านั้น แต่จากการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ทราบถึงกลไกดังกล่าว

นอกจากนี้ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกกบนานี้ยังเห็นผลที่ชัดเจนเฉพาะกบนาเพศเมียที่เลี้ยงไว้ในฤดูสืบพันธุ์เท่านั้นซึ่งก็สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Stiffler (1993) ที่รายงานว่าฤดูกาลมีผลต่อ calcium ion เนื่องจากในฤดูหนาวนั้น parathyroid gland ซึ่งเป็นศูนย์ที่ควบคุม calcium ion หดตัวในฤดูหนาวและขยายตัวมากขึ้นในฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน ดังนั้นจึงทำให้ในฤดูหนาวนั้นมีปริมาณ calcium ion ที่อยู่ในกระแสเลือดน้อยกว่าฤดูอื่นๆ ซึ่งนั้นอาจจะเป็นเหตุผลที่ทำให้มีการเก็บสะสม calcium ion ในกระดูกที่น้อยกว่าในฤดูอื่นๆ (Srivastav *et al.*, 2000)

5.4.3 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อจุลกายวิภาคของกระดูกของกบนาระยะโตเต็มวัย

จากผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อลักษณะจุลกายวิภาคของกระดูกปลายขาซึ่งพบลักษณะกระดูกพรุนคล้าย spongy bone ของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 ในฤดูสืบพันธุ์ นั้นยังไม่สามารถที่จะสรุปได้ว่าเป็นภาวะกระดูกพรุนหรือกระดูกบางหรือไม่ และอาจจะเป็นความผิดปกติที่เกิดจากความผิดปกติในตัวของกบนา

การศึกษาภาวะกระดูกพรุนหรือกระดูกบางในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกยังไม่เคยมีการรายงานมาก่อนถึงลักษณะทางจุลกายวิภาค ดังนั้นการศึกษาในส่วนนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่ออธิบายผลที่เกิดขึ้นในกลุ่มสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกต่อไป

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 6
สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการศึกษา

6.1.1 ผลการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว

การสกัดสารไฟโตเอสโตรเจนจากผงกวาวเครือขาว 10 กิโลกรัม ด้วยวิธีซอกห์เลตได้สารสกัดกวาวเครือขาว 478.67 กรัม คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสกัดเท่ากับร้อยละ 4.79 ผลการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่พบว่า สารสกัดกวาวเครือขาวมีฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนต่อเซลล์เยื่อบุช่องคลอดและน้ำหนักของหนูแรท โดยเซลล์เยื่อบุช่องคลอดของหนูแรทเพศเมียที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวพบเซลล์ชนิด cornified เพิ่มมากขึ้นมากกว่าช่วงก่อนการทดลองอย่างมีนัยสำคัญ และน้ำหนักมดลูกของหนูแรทในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวมีน้ำหนักมากกว่าหนูแรทในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญด้วย ดังนั้นจากผลการทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนของสารสกัดกวาวเครือขาวในหนูแรทแสดงให้เห็นว่า สารสกัดกวาวเครือขาวนี้มีฤทธิ์เชิงเอสโตรเจน ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์ทางเคมีเพื่อหาปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในสารสกัดกวาวเครือขาวด้วยเครื่องโครมาโท-กราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ซึ่งพบสาร puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavonoid มีปริมาณเท่ากับ 7.49, 0.71, 0.56, 0.78 และ 0.00 มิลลิกรัมต่อสารสกัดกวาวเครือขาว 100 กรัมตามลำดับ

6.1.2 ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่ออัตราส่วนเพศของกบนาระยะโตเต็มวัย

การทดสอบผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อกบนาระยะโตเต็มวัยในฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2556 ถึงเดือนสิงหาคม พ.ศ. 2556) และนอกฤดูสืบพันธุ์ (ช่วงเดือนกันยายน พ.ศ. 2556 ถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2556) ใน 5 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่ม control, positive control, PM10, PM100 และ PM1000 ซึ่งทดสอบโดยการเคลือบสารสกัดกวาวเครือขาวลงบนอาหารเลี้ยงชนิดเม็ดและใช้เลี้ยงกบในปริมาณประมาณร้อยละ 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน พบว่า ในทั้ง 5 กลุ่มการทดลองอัตราส่วนเพศของกบนา (sex ratio) ทั้งในและนอกฤดูสืบพันธุ์ มีอัตราส่วนเพศที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง โดยพบว่าในฤดูสืบพันธุ์ กลุ่ม control สามารถแยกเพศได้ชัดเจนเป็นกบนาเพศผู้และเพศเมีย ในขณะที่ในกลุ่ม positive control, PM10, PM100, และ PM1000 พบกบนาที่มีเพศกำกวม (intersex) คิดเป็นร้อยละ 21.05, 11.77, 14.82 และ 30.00 ตามลำดับ และนอกฤดูสืบพันธุ์พบว่าในกลุ่ม control สามารถแยกเพศได้ชัดเจนเป็นกบนาเพศผู้และเพศเมีย เช่นเดียวกับกบนาในฤดูผสมพันธุ์ ในขณะที่กลุ่ม positive control, PM10, PM100 และ

PM1000 พบกบนาที่มีเพศกำกวม (intersex) คิดเป็นร้อยละ 95.12, 34.29, 67.44 และ 95.00 ตามลำดับ โดยพบกบนาที่มีเพศกำกวมเฉพาะกลุ่มที่ได้รับสารประกอบเอสโตรและไฟโตเอสโตรเจนเท่านั้น สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบเอสโตรเจนและสารไฟโตเอสโตรเจนจากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวส่งผลต่อกระบวนการการแยกเพศ (sex differentiation) ในกบนาและก่อให้เกิดเพศกำกวมได้

6.1.2 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการเติบโตของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาในฤดูสืบพันธุ์พบว่า น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้มีค่าสูงสุดในกลุ่ม PM10 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของกบนาเพศผู้ในฤดูสืบพันธุ์ส่วนหนึ่งอาจจะมาจากการที่มีความยาวกระดูกต้นขาที่มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์เพศเมียในฤดูสืบพันธุ์นั้นพบว่า มีค่าน้อยสุดในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารสกัดกวาวเครือขาวคือ กลุ่ม PM100 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งน้ำหนักที่ลดลงอาจจะเป็นเพราะสารไฟโตเอสโตร-เจนจากสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวไปมีผลต่อต่อมไฮโพทาลามัสที่เป็นศูนย์ควบคุมความอยากอาหาร แล้วทำให้ความอยากอาหารน้อยลงจึงส่งผลให้มีน้ำหนักตัวที่น้อยลง นอกจากนี้ยังมีอีกหนึ่งปัจจัยที่สอดคล้องกันคือ การที่ความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม PM100 มีความยาวน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญซึ่งอาจจะเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้น้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวของกบนานอกฤดูสืบพันธุ์พบว่า น้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้และเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งน้ำหนักของกบนาเพศผู้จะมีค่าสูงสุดในกลุ่ม control ในขณะที่เพศเมียมีค่าสูงสุดในกลุ่ม PM1000

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร (snout to vent length; SVL) ของกบนาในฤดูสืบพันธุ์ของกบนาเพศผู้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่ในกบนาเพศเมียค่าความยาวปลายปากถึงรูทวารมีค่าต่ำสุดที่ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวคือ กลุ่ม PM100 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยอาจจะเป็นผลมาจากผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวมีผลต่อการยับยั้งกระบวนการเจริญของกระดูกแบบ intramembranous ossification ซึ่งมีผลต่อการเจริญของกระดูกสันหลังแล้วจึงส่งผลต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์

ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนานอกฤดูสืบพันธุ์ในเพศผู้และเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งความยาวจากปลายปากถึงรูทวาร

สูงสุดของกบนาเพศผู้คือ กลุ่ม control และความยาวจากปลายปากถึงรูทวารสูงสุดของกบนาเพศเมียคือ กลุ่ม PM10

นอกจากนี้ยังพบว่า ผลของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล นั้นทำให้ทั้งน้ำหนักและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเพศเมียมีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะกบนาเพศเมียที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ซึ่งเกิดจาก สาร 17บีต้า-เอสตราไดออลนั้นไปมีผลต่อความอยากอาหาร การยับยั้งกระบวนการเจริญของกระดูกแบบ intramembranous ossification ซึ่งทำให้ไปมีผลต่อน้ำหนักตัวและการเจริญของกระดูกสันหลังแล้วส่งผลต่อความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาเช่นเดียวกัน

ซึ่งผลของน้ำหนักและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนามีความสอดคล้องเมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่างในฤดูผสมพันธุ์และนอกฤดูผสมพันธุ์นั้นพบว่า น้ำหนักตัวและความยาวจากปลายปากถึงรูทวารของกบนาในฤดูสืบพันธุ์มีค่ามากกว่านอกฤดูสืบพันธุ์ ซึ่งความแตกต่างนี้เป็นผลจากความแตกต่างของฤดูกาลในการเลี้ยงกบนา

6.1.3 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาระยะโตเต็มวัย

การวัดผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดด้วยวิธี radioimmunoassay เพื่อติดตามปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนภายในร่างกายของกบนา สรุปได้ว่าปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนของกบนาเพศผู้ในและนอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม แต่ในขณะที่ปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม PM1000 มีค่าสูงสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม PM100 มีค่าน้อยสุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญนั้นสามารถเห็นผลในเฉพาะเพศเมีย ซึ่งอาจจะเป็นเพราะผลทางอ้อมของสารสกัดกวาวเครือขาวที่กระตุ้นหรือยับยั้งให้มีการผลิตเอสโตรเจนภายในร่างกายจากแหล่งต่างๆ ที่ไม่ได้เกิดจากการผลิตของรังไข่ให้มากขึ้นหรือน้อยลงได้

6.1.4 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้ในฤดูผสมพันธุ์ในกลุ่ม PM10 มีค่ามากกว่าอย่างมีนัยสำคัญซึ่งผลในส่วนนี้สอดคล้องกับน้ำหนักตัวของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM10 ที่มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อ

ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศผู้นอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ในกลุ่ม PM10 มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้และเมียในฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดลอง และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้และเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดลองเช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ผลของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและแตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นๆ ในขณะที่ไม่มีผลต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ และผลของสาร17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ

6.1.5 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนาทั้งเพศผู้และเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มการทดลองทั้งในตำแหน่ง epiphysis, metaphysis, และ diaphysis และผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขากบนาเพศผู้และเพศเมียนอกฤดูสืบพันธุ์ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ตำแหน่ง epiphysis, metaphysis และ diaphysis เช่นเดียวกัน

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาของกบนาเพศผู้ในฤดูสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองทั้งในตำแหน่ง epiphysis, metaphysis, และ diaphysis ในขณะที่ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูกปลายขาของเพศเมียในกลุ่ม PM10, PM100, และ PM1000 ที่ตำแหน่ง metaphysis มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่ม control ซึ่งจากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดกวาวเครือขาวมีผลต่อความหนาแน่นกระดูกส่วน cortical ของกบนาในตำแหน่ง metaphysis เฉพาะเพศเมียเท่านั้น

นอกจากนี้ผลของสาร17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความหนาแน่นกระดูกเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ที่ตำแหน่ง diaphysis มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและแตกต่างจากกลุ่มการทดลองอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลต่อความยาวกระดูกต้นขาของกบนาเพศเมียในช่วงฤดูผสมพันธุ์ที่มีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าผลของสาร 17บีต้า-เอสตราไดออลต่อความหนาแน่นกระดูกต้นขาของกบนานั้นเห็นผลได้ชัดเจนในเฉพาะเพศเมียในกระดูกส่วน cortical ที่ตำแหน่ง diaphysis ในฤดูสืบพันธุ์ และความหนาแน่นของกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในช่วงฤดูผสมพันธุ์ที่ตำแหน่ง diaphysis มีค่าต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับความยาวกระดูกปลายขาของกบนาเพศเมียในช่วงฤดูผสมพันธุ์ที่มีความยาวต่ำสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจากข้อมูลทั้งหมดสามารถที่จะกล่าวได้ว่า สาร 17บีต้า-เอสตราไดออลมีผลต่อกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนา ที่ตำแหน่ง diaphysis เฉพาะกบนาเพศเมียเท่านั้น

ซึ่งผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวนั้นจะเห็นว่า ไม่เห็นผลที่แตกต่างกันในเพศผู้ทั้งที่เลี้ยงในฤดูสืบพันธุ์และนอกฤดูสืบพันธุ์ แต่จะเห็นผลได้ในเฉพาะกบนาเพศเมียในฤดูสืบพันธุ์ ซึ่งผลที่ความหนาแน่นกระดูกที่ลดลงนี้อาจเกิดจากการได้รับสารประกอบเอสโตรเจนหรือสารไฟโตเอสโตรเจนที่มีความเข้มข้นที่มากทำให้ไปยับยั้งกระบวนการการสร้างกระดูกทั้ง intramembranous ossification และ endochondral ossification และเป็นผลทำให้มีผลต่อความยาวกระดูกและความหนาแน่นกระดูกมีน้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ

6.1.6 ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อลักษณะจุลกายวิภาคกระดูกต้นขาและปลายขาของกบนาระยะโตเต็มวัย

ผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อลักษณะจุลกายวิภาคของกระดูกต้นขาไม่พบลักษณะกระดูกของกบนาที่มีความผิดปกติและแตกต่างไปจากกลุ่ม control ส่วนผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อลักษณะจุลกายวิภาคของกระดูกปลายขาพบลักษณะกระดูกพรุนคล้าย spongy bone ของกบนาเพศผู้ในกลุ่ม PM100 ในฤดูสืบพันธุ์ น่าจะมีสาเหตุมาจากความผิดปกติในตัวกบนาเอง

6.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาในครั้งนี้ทำให้เห็นว่าหากมีการนำสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวไปใช้ในการเลี้ยงกบนาในภาคเกษตรกรรมและมองเพียงผลผลิตที่เป็นน้ำหนักรวมในฤดูสืบพันธุ์นั้นอาจจะให้น้ำหนักตัวของกบนาในการขายเพิ่มขึ้นจริง เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของอัตราส่วนเพศและน้ำหนักตัวของกบนา แต่ทั้งนี้จากศึกษาครั้งเป็นการศึกษาพื้นฐานเท่านั้นหากจะมีการนำไปใช้ในภาคเกษตรกรรมอาจจะยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการตกค้างของสารไฟโตเอสโตรเจนมากน้อย

เพียงใดและมีอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่บริโภคกบนาที่ได้รับสารสกัดกวาวเครือขาวเข้าไปหรือไม่ ซึ่งควรจะมีการศึกษานี้เกิดขึ้นต่อไปในอนาคต

แต่หากมองการใช้สารสกัดหยาบกวาวเครือขาวในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกบางในกบนานั้น จากการทดลองจะพบว่าสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการป้องกันและรักษาภาวะนี้เนื่องจากให้ผลที่ทำให้ความหนาแน่นกระดูกของกบนาเพศเมียมีค่าน้อยลง

นอกจากนี้หากมีการศึกษาผลของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในกระแสเลือดของกบนาเพิ่มเติม ควรจะหาวิธีการที่เหมาะสมกับการวัดปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนที่กบนาได้รับเข้าไปจากสารสกัดกวาวเครือขาวและการใช้ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวและสาร 17บีต้า-เอสตราไดออล ที่มีปริมาณความเข้มข้นที่น้อยกว่าในการศึกษาครั้งนี้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

กนกธร ปิยธำรงรัตน์. 2551. กายวิภาคศาสตร์เปรียบเทียบของสัตว์มีกระดูกสันหลัง. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,305.

กรมประมง. 2552. "สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พุทธศักราช 2552 " Retrieved 17 มีนาคม, 2557, from http://www.fisheries.go.th/it-stat/yearbook/data_2552 /Freshwater/T1.pdf.

ชูชาติ ยังบรรเทา. 2546. พจนานุกรมศัพท์ชีววิทยา. กรุงเทพมหานคร: โอ. เอส. พรินติ้งเฮ้าส์ ,528.

ธฤษวรรณ ไตรจิตต์. 2549. ระยะการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของลูกอ๊อดกบนา *Hoplobatrachus rugulosus*. กรุงเทพมหานคร: โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,44.

ธัญญา จั่นอาจ. 2546. คู่มือสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกในเมืองไทย. กรุงเทพมหานคร: บริษัท ด่านสุทธาการพิมพ์ จำกัด,175.

บังอร ฉางทรัพย์. 2550. กายวิภาคศาสตร์ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,693.

ปรีชา สุวรรณ์. 2547. โครงการการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการเลี้ยงกบ โดยการมีส่วนร่วมของกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงกบจังหวัดเชียงราย : รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. เชียงราย: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย,132.

ผุสตี ปริยานนท์. 2548. "การเพาะเลี้ยงกบโดยวิธีธรรมชาติ." Retrieved 31 สิงหาคม, 2557, from http://www.hongkhrai.com/pdf/frog.pdf.

รัตนา ปานเรียนแสน. 2543. ลักษณะของประชากรกวาวเครือขาวจากแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วราภรณ์ ชัยบรรจงเวช. 2538. การศึกษาระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในรังไข่กบนา (*Rana tigerina*) และกบบูลฟร็อก (*Rana catesbeiana*) ที่โตเต็มวัยในช่วงเดือนกรกฎาคมถึง

ธันวาคม. กรุงเทพมหานคร: โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 20.

วิชัย เชิดชีวศาสตร์. 2552. นวัตกรรมสมุนไพรกวาวเครือขาว. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,509.

วินิดา บัณฑิต, อรศรี รมยะนันทน์ and สุจินต์ อึ้งถาวร. 2535. วิทยาฮิสโต 1: เซลล์และเนื้อเยื่อพื้นฐาน. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,272.

สมศักดิ์ วนิชาชีวะ. 2544. กายวิภาคศาสตร์เปรียบเทียบของสัตว์มีกระดูกสันหลัง. เชียงใหม่: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่,613.

สโรชา สุทนต์. 2555. ผลของ *Pueraria candollei* var. *mirifica* และพูรารินต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการตัดรังไข่ในหนูแรท. กรุงเทพมหานคร: โครงการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,29.

สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก. 2553. ชีววิทยาของกระดูก ชีวเคมีระดับเซลล์และโรคที่พบบ่อย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์จามจุรีโปรดักท์,267.

Aabedi, Z., S. H. G. Mirsaeed and Z. F. Khoshbakht. 2014. "Evaluating profitability of frog farming and its role in Iran's exports (case study of Bandar Anzali)." Reef Resource Assessment and Management Technical Paper 40: 454-462.

Amato, P., S. Christophe and P. L. Mellon. 2002. "Estrogenic activity of herbs commonly used as remedies for menopausal symptoms." Menopause 9: 145-150.

Anukulthanakorn, K. 2013. Effects of white kwao krua Pueraria mirifica on neuroprotective and neurotherapeutic actions in hippocampus of ovariestomized rats. The Degree of Doctor of Philosophy, Chulalongkorn University.

Anwar, A., P. G. McTernan, L. Anderson, J. Askaa, C. Moody, A. Barnett, M. Eggo and S. Kumar. 2001. "Site-specific regulation of oestrogen receptor-alpha

and-beta by oestradiol in human adipose tissue." Diabetes, Obesity and Metabolism 3: 338-349.

Bauer-Dantoin, A. C.Meinhardt and D. J. 2010. "17beta-Estradiol Exposure Accelerates Skeletal Development in *Xenopus laevis* Tadpoles." The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology 293: 1880-1886.

Benson, G. K., A. T. Cowie and Z. D. Hosking. 1961. "Mammogenic activity of miroestrol." Journal of Endocrinology 21: 401-409.

Boone, M. D. and S. M. James. 2003. "Interactions of insecticide, herbicide, and natural stressors in amphibian community mesocosms." Ecological Applications 13: 829-841.

Boone, M. D., R. D. Semlitsch, E. E. Little and M. C. Doyle. 2007. "Multiple stressors in amphibian communities: effects of chemical contamination, bullfrogs, and fish." Ecological Applications 17: 291-301.

Bounds, D. G. and G. S. Pope. 1960. "Light-absorption and chemical properties of miroestrol, the oestrogenic substance of *Pueraria mirifica*." Journal of the Chemical Society (Resumed): 3696-3705.

Breton, A., R. Cockrum, K. Austin, K. Cammack, S. Ford, B. Hess, G. Moss, P. Nathanielsz and B. Alexander. 2011. "Hypothalamic expression of genes for appetite regulators and estrogen alpha, estrogen beta and leptin receptors in obese dams and their fetuses." Animal 5: 1944-1948.

Britson, C. A. and S. T. Threlkeld. 1998. "Abundance, metamorphosis, developmental, and behavioral abnormalities in *Hyla chrysoscelis* tadpoles following exposure to three agrichemicals and methyl mercury in outdoor mesocosms." Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology 61: 154-161.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Carr, J. A., A. Gentles, E. E. Smith, W. L. Goleman, L. J. Urquidi, K. Thuett, R. J. Kendall, J. P. Giesy, T. S. Gross, K. R. Solomon and G. Van Der Kraak. 2003. "Response of larval *Xenopus laevis* to atrazine: assessment of growth, metamorphosis, and gonadal and laryngeal morphology." Environmental Toxicology and Chemistry 22: 396-405.

Chansakaow, S., T. Ishikawa, H. Seki, K. Sekine, M. Okada and C. Chaichantipyuth. 2000a. "Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of "Kwao Keur", *Pueraria mirifica*. The known miroestrol may be an artifact." Journal of Natural Products 63: 173-175.

Chansakaow, S., T. Ishikawa, K. Sekine, M. Okada, Y. Higuchi, M. Kudo and C. Chaichantipyuth. 2000b. "Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity." Planta medica 66: 572-575.

Cherdshewasart, W., Y. Kitsamai and S. Malaivijitnond. 2007. "Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Pueraria mirifica* by vaginal cornification assay." Journal of Reproduction and Development 53: 385-393.

Cherdshewasart, W. and S. Sriwatcharakul. 2008. "Metabolic activation promotes estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant." Maturitas 59: 128-136.

Cherdshewasart, W., S. Sriwatcharakul and S. Malaivijitnond. 2008. "Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant." Maturitas 61: 350-357.

Cherdshewasart, W., S. Subtang and W. Dahlan. 2007. "Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb Pueraria mirifica in comparison with Pueraria lobata." Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43: 428-434.

Cherdshewasart, W., V. Traisup and P. Picha. 2008. "Determination of the Estrogenic Activity of Wild Phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* by MCF-7 Proliferation Assay." Journal of Reproduction and Development 54: 63-67.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Cong, L., Z.-F. Qin, X.-N. Jing, L. Yang, J.-M. Zhou and X.-B. Xu. 2006. "*Xenopus laevis* is a potential alternative model animal species to study reproductive toxicity of phytoestrogens." Aquatic Toxicology 77: 250-256.

Dempster, W. T. 1930. "The morphology of the amphibian endolymphatic organ." Journal of Morphology 50: 71-126.

Diana, S. G., W. J. Resetarits, D. J. Schaeffer, K. B. Beckmen and V. R. Beasley. 2000. "Effects of atrazine on amphibian growth and survival in artificial aquatic communities." Environmental Toxicology and Chemistry 19: 2961-2967.

Duarte-Guterman, P., V. S. Langlois, K. Hodgkinson, B. D. Pauli, G. M. Cooke, M. G. Wade and V. L. Trudeau. 2009. "The aromatase inhibitor fadrozole and the 5-reductase inhibitor finasteride affect gonadal differentiation and gene expression in the frog *Silurana tropicalis*." Sexual Development 3: 333-341.

Feder, M. E. and W. W. Burggren. 1992. Environmental physiology of the amphibians The University of Chicago, Chicago, US, 60637, The University of Chicago Press. Ltd.,472.

Garcia, B. 2015. "Life cycle." from https://www.pinterest.com.

Gramapurohit, N. P., B. A. Shanbhag and S. K. Saidapur. 2004. "Growth, sexual maturation and body size dimorphism in the indian bullfrog *Hoplobatrachus tigerinus* (Daud)." Herpetologica 60: 414-419.

Gratwicke, B., M. J. Evans, P. T. Jenkins, M. D. Kusrini, R. D. Moore, J. Sevin and D. E. Wildt. 2009. "Is the international frog legs trade a potential vector for deadly amphibian pathogens?" Frontiers in Ecology and the Environment 8: 438-442.

Grinspoon, S., E. Thomas, S. Pitts, E. Gross, D. Mickley, K. Miller, D. Herzog and A. Klibanski. 2000. "Prevalence and Predictive Factors for Regional Osteopenia

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

in Women with Anorexia Nervosa." Annals of Internal Medicine 133: 790-794.

Hayes, T. B., V. Khoury, A. Narayan, M. Nazir, A. Park, T. Brown, L. Adame, E. Chan, D. Buchholz, T. Stueve and S. Gallipeau. 2010. "Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*)." Proceedings of the National Academy of Sciences 107: 4612-4617.

Hayodom, M. 1971. Constituents of the tuberous roots of *Pueraria mirifica*, Chulalongkorn University.

Herrel, A., M. Vasilopoulou-Kampitsi and C. Bonneaud. 2014. "Jumping performance in the highly aquatic frog, *Xenopus tropicalis*: sex-specific relationships between morphology and performance." Peer Computer and Science 2: e661.

Huang, H. and D. D. Brown. 2000. "Overexpression of *Xenopus laevis* growth hormone stimulates growth of tadpoles and frogs." Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 190-194.

Hudson, N. J., M. B. Bennett and C. E. Franklin. 2004. "Effect of aestivation on long bone mechanical properties in the green-striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*." Journal of Experimental Biology 207: 475-482.

Hutson, J. M., H. Ikawa and P. K. Donahoe. 1982. "Estrogen inhibition of mullerian inhibiting substance in the chick embryo." Journal of Pediatric Surgery 17: 953-959.

Ingham, J. L., K. R. Markham, S. Z. Dziedzic and G. S. Pope. 1986b. "Puerarin 6″-O-beta-apiofuranoside, a C-glycosylisoflavone O-glycoside from *Pueraria mirifica*." Phytochemistry 25: 1772-1775.

Ingham, J. L., S. Tahara and Z. Dziedzic Stanley. 1989. Minor isoflavones from the roots of *Pueraria mirifica*. Zeitschrift für Naturforschung C. 44**:** 724.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Ingham, J. L., S. Tahara and S. Z. Dziedzic. 1986a. "A chemical investigation of *Pueraria mirifica* roots." Zeitschrift für Naturforschung C 41: 403-408.

Ingham, J. L., S. Tahara and S. Z. Dziedzic. 1988. "Coumestans from the roots of *Pueraria mirifica*." Zeitschrift für Naturforschung C 43: 5-10.

Ingham, J. L., S. Tahara and S. Z. Dziedzic. 1989. "Minor isoflavones from the roots of Pueraria mirifica." Zeitschrift für Naturforschung C 44: 724-726.

IOF. 2015. "Introduction to the bone biology: All about ours bone." from http://www.iofbonehealth.org/introduction-bone-biology-all-about-our-bones.

IUCN. 2004. "*Hoplobatrachus rugulosus*." Retrieved 1 Jan, 2015, from http://www.iucnredlist.org/details/full/58300/0.

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

Jaroenporn, S., S. Malaivijitnond, K. Wattanasirmkit, G. Watanabe, K. Taya and W. Cherdshewasart. 2007. "Assessment of fertility and reproductive toxicity in adult female mice after long-term exposure to *Pueraria mirifica* Herb." Journal of Reproduction and Development 53: 995-1005.

Jason, R. R., A. A. Elskus, B. S. Shepherd, P. H. Crowley, T. M. McCarthy, J. H. Niedzwiecki, T. Sager, A. Sih and B. D. Palmer. 2004. "Multiple stressors and salamanders: effects of an herbicide, food limitation, and hydroperiod." Ecological Applications 14: 1028-1040.

Jefferson, W. N., E. Padilla-Banks, G. Clark and R. R. Newbold. 2002. "Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses." Journal of Chromatography B 777: 179-189.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Jeon, G.-C., M.-S. Park, D.-Y. Yoon, C.-H. Shin, H.-S. Sin and S.-J. Um. 2005. "Antitumor activity of spinasterol isolated from *Pueraria* roots." Experimental and molecular medicine 37: 111-120.

Jones, H. and G. Pope. 1960. "A study of the action of miroestrol and other oestrogens on the reproductive tract of the immature female mouse." Journal of Endocrinology 20: 229-235.

Jones, H. and G. Pope. 1961. "A method for the isolation of miroestrol from *Pueraria mirifica*." Journal of Endocrinology 22: 303-312.

Jul-a-dung, S., S. Leesanga and M. Tipbunpot. 2009. Effect of 17beta-estradiol hormone to the feminization of frog (*Rana rugulosa* Wiegmann). Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Department of Fisheries, Bangkok, Department of Fisheries

Kashemsanta, M. C. L., K. Suvatabandhu and H. K. A. Shaw. 1952. "A new species of *Pueraria* (Leguminosae) from Thailand, yielding an oestrogenic principle." Kew Bulletin 7: 549-552.

Kunkle, B. N., R. W. Norrdin, R. K. Brooks and R. W. Thomassen. 1982. "Osteopenia with decreased bone formation in beagles with malabsorption syndrome." Calcified Tissue International 34: 396-402.

Kupfer, A. 2009. "Sexual size dimorphism in caecilian amphibians: analysis, review and directions for future research." Zoology: 362-369.

Lasala, C., D. Carré-Eusèbe, J.-Y. Picard and R. Rey. 2004. "Subcellular and molecular mechanisms regulating anti-Müllerian hormone gene expression in mammalian and nonmammalian species." DNA and cell biology 23: 572-585.

Liu, Q., H. Pan, Z. Chen and J. P. Matinlinna. 2015. "Insight into Bone-Derived Biological Apatite: Ultrastructure and Effect of Thermal Treatment." BioMed Research International 2015: 11.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Lonuchit, T. 2010. Effect of white Kwao Krua *Pueraria mirifica* extrac t on reproductive organ development and growth of rice field frog *Hoplobatrachus rugulosus*. Master of Science Program in Zoology, Chalalongkorn University.

Lundberg, R., B. M. Jenssen, n. Leiva-Presa, M. Rönn, C. Hernhag, C. Wejheden, S. Larsson, J. Örberg and P. M. Lind. 2007. "Effects of short-term exposure to the DDT metabolite p, p′-DDE on bone tissue in male common frog (Rana temporaria)." Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 70: 614-619.

Malaivijitnond, S. 2012. "Medical applications of phytoestrogens from the Thai herb *Pueraria mirifica*." Frontiers of Medicine 6: 8-21.

Malaivijitnond, S., K. Chansri, P. Kijkuokul, N. Urasopon and W. Cherdshewasart. 2006. "Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb." Journal of ethnopharmacology 107: 354-360.

Malaivijitnond, S., P. Kiatthaipipat, W. Cherdshewasart, G. Watanabe and K. Taya. 2004. "Different effects of Pueraria mirifica, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats." J Pharmacol Sci 96: 428-435.

Malaivijitnond, S., P. Kiatthaipipat, W. Cherdshewasart, G. Watanabe and K. Taya. 2004. "Different effects of *Pueraria mirifica,* a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats." Journal of Pharmacological Sciences 96: 428-435.

McCoy, K. A., L. J. Bortnick, C. M. Campbell, H. J. Hamlin, L. J. Guillette and C. M. St Mary. 2008. "Agriculture alters gonadal form and function in the toad Bufo marinus." Environmental Health Perspectives 116: 1526-1532.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Mikio, A. N. 2011. "Osteopenia: Early signs of bone loss." Retrieved 9 Sep, 2012, from http://www.webmd.com/osteoporosis/guide/osteopenia-early-signs-of-bone-loss.

Minokoshi, Y., T. Shiuchi, S. Lee, A. Suzuki and S. Okamoto. 2008. "Role of hypothalamic AMP-kinase in food intake regulation." Nutrition 24: 786-790.

Moore, F. L., S. K. Boyd and D. B. Kelley. 2005. "Historical perspective: Hormonal regulation of behaviors in amphibians." Hormones and Behavior 48: 373-383.

Nakamura, M. 2009. "Sex determination in amphibians." Seminars in Cell & Developmental Biology 20: 271-282.

Nakamura, M. 2010. "The mechanism of sex determination in vertebrates—are sex steroids the key-factor?" Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology 313A: 381-398.

Newman, E., A. S. Turner and J. D. Wark. 1995. "The potential of sheep for the study of osteopenia: Current status and comparison with other animal models." Bone 16: S277-S284.

Niekisch, M. 1986. "The international trade in frog's legs." Traffic Bulletin 11: 1-22.

Ortega, N., D. J. Behonick and Z. Werb. 2004. "Matrix remodeling during endochondral ossification." Trends in Cell Biology 14: 86-93.

Pedersen, S. B., S. Fuglsig, P. Sjogren and B. Richelsen. 1996. "Identification of steroid receptors in human adipose tissue." European Journal of Clinical Investigation 26: 1051-1056.

Pettersson, I., A. Arukwe, K. Lundstedt-Enkel, A. S. Mortensen and C. Berg. 2006. "Persistent sex-reversal and oviducal agenesis in adult *Xenopus (Silurana) tropicalis* frogs following larval exposure to the environmental pollutant ethynylestradiol." Aquatic Toxicology 79: 356-365.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Phuge, S. K. and N. P. Gramapurohit. 2014. "Sex hormones alter sex ratios in the Indian skipper frog, *Euphlyctis cyanophlyctis*: determining sensitive stages for gonadal sex reversal." General and Comparative Endocrinology 203: 124-129.

Pilkington, J. B. and K. Simkiss. 1966. "The mobilization of the calcium carbonate deposits in the endolymphatic sacs of metamorphosing frogs." Journal of Experimental Biology 45: 329-341.

Piprek, R. P., A. Pecio, J. Z. Kubiak and J. M. Szymura. 2012. "Differential effects of testosterone and 17beta-estradiol on gonadal development in five anuran species." Reproduction 144: 257-267.

Piprek, R. P., A. Pecio, K. Laskowska-Kaszub, J. Z. Kubiak and J. M. Szymura. 2013. "Sexual dimorphism of AMH, DMRT1 and RSPO1 localization in the developing gonads of six anuran species." The International Journal of Developmental Biology 57: 891-895.

Qin, Z.-F., X.-F. Qin, L. Yang, H.-T. Li, X.-R. Zhao and X.-B. Xu. 2007. "Feminizing/demasculinizing effects of polychlorinated biphenyls on the secondary sexual development of Xenopus laevis." Aquatic Toxicology 84: 321-327.

Riggs, B. L. and A. M. Parfitt. 2005. "Drugs used to treat osteoporosis: the critical need for a uniform nomenclature based on their action on bone remodeling." Journal of Bone and Mineral Research 20: 177-184.

Robling, A. G., A. B. Castillo and C. H. Turner. 2006. "Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling." Annual Review of Biomedical Engineering 8: 455-498.

Rodgers, J. B., M. C. Monier-Faugere and H. Malluche. 1993. "Animal models for the study of bone loss after cessation of ovarian function." Bone 14: 369-377.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Rohr, J. R. and B. D. Palmer. 2005. "Aquatic herbicide exposure increases salamander desiccation risk eight months later in a terrestrial environment." Environmental Toxicology and Chemistry 24: 1253-1258.

Rosol, T. J., J. T. Yarrington, J. Latendresse and C. C. Capen. 2001. "Adrenal Gland: Structure, Function, and Mechanisms of Toxicity." Toxicologic Pathology 29: 41-48.

Saidapur, S. K., N. P. Gramapurohit and B. A. Shanbhag. 2001. "Effect of sex steroids on gonadal differentiation and sex reversal in the frog, *Rana curtipes*." General and Comparative Endocrinology 124: 115-123.

Scholler, W., M. Dohrn and W. Hohlweg. 1940. "An estrogenic substance from the tubes of Siamese vine, *Butea superba*." Naturwissenschaffen 28: 532.

Schultis, T. and J. W. Metzger. 2004. "Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase)." Chemosphere 57: 1649-1655.

Shapiro, F. 2008. "Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts." European Cells and Materials 15: 53-76.

Silverberg, S. J., F. G. Locker and J. P. Bilezikian. 1996. "Vertebral osteopenia: a new indication for surgery in primary hyperparathyroidism." The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 81: 4007-4012.

Simpson, E. R. 2003. "Sources of estrogen and their importance." The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology 86: 225-230.

Srivastav, A. K., V. Das, S. Srivastav and N. Suzuki. 2000. "Amphibian calcium regulation: physiological aspects." Zoologica Poloniae 1.

Stetter, M. D. 1995. Noninfectious medical disorders of amphibians. Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine, Elsevier.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Stiffler, D. F. 1993. "Amphibian calcium metabolism." The Journal of Experimental Biology 184: 47-61.

Tokur, B., R. D. Gürbüz and G. Özyurt. 2008. "Nutritional composition of frog (*Rana esculanta*) waste meal." Bioresource Technology 99: 1332-1338.

Tompsett, A. R., S. Wiseman, E. Higley, S. Pryce, H. Chang, J. P. Giesy and M. Hecker. 2012. "Effects of 17alpha-ethynylestradiol on sexual differentiation and development of the African clawed frog (*Xenopus laevis*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology 156: 202-210.

Tomsa, K., T. Glaus, B. Hauser, M. Fluckiger, P. Arnold, G. Wess and C. Reusch. 1999. "Nutritional secondary hyperparathyroidism in six cats." The Journal of Small Animal Practice 40: 533-539.

Trisomboon, H., S. Malaivijitnond, W. Cherdshewasart, G. Watanabe and K. Taya. 2007a. "Assessment of urinary gonadotropin and steroid hormone profiles of female cynomolgus monkeys after treatment with *Pueraria mirifica*." Journal of Reproduction and Development 53: 395-403.

Trisomboon, H., S. Malaivijitnond, W. Cherdshewasart, G. Watanabe and K. Taya. 2007b. "The influence of *Pueraria mirifica* herb containing phytoestrogens on the urinary gonadotropin and estradiol levels in aged menopausal monkeys." Animal Science Journal 78: 378-386.

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

Trisomboon, H., S. Malaivijitnond, G. Watanabe and K. Taya. 2004a. "Estrogenic effects of *Pueraria mirifica* on the menstrual cycle and hormone-related

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ovarian functions in cyclic female cynomolgus monkeys." Journal of Pharmacological Sciences 94: 51-59.

Trisomboon, H., S. Malaivijitnond, G. Watanabe and K. Taya. 2005. "Ovulation block by Pueraria mirifica." Endocrine 26: 33-39.

Uppanunchai, A., Y. Taksin, S. Wannapat, J. Phosri and S. Sripat. 2011. Effect of 17beta-estradiol on sexual differentiation of common lowland frog, *Rana rugulosa* (Wiegmann, 1935). Inland Fisheries Research and Development Bureau, Department of Fisheries, Bangkok Department of Fisheries

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

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

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

Wang, J.-F., Y.-X. Guo, J.-Z. Niu, J. Liu, L.-Q. Wang and P.-H. Li. 2004. "Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats." World Journal of Gastroenterology 10: 1967-1970.

Wang, X., J. Wu, H. Chiba, K. Umegaki, K. Yamada and Y. Ishimi. 2003. "Puerariae radix prevents bone loss in ovariectomized mice." Journal of Bone and Mineral Metabolism 21: 268-275.

Warkentin, I. G., D. Bickford, N. S. Sodhi and C. J. A. Bradshaw. 2009. "Eating Frogs to Extinction." Conservation Biology 23: 1056-1059.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Wolff, R. B. 2014. "Glucosamine and chondroitin sulfate association increases tibial epiphyseal growth plate proliferation and bone formation in ovariectomized rats." Clinics 69: 847-853.

World Health Organization. 2003. "Prevention and management osteoporasis." WHO Technical Report Series 921: 1-164.

Wronski, T. J., M. Cintrón and L. M. Dann. 1988. "Temporal relationship between bone loss and increased bone turnover in ovariectomized rats." Calcified Tissue International 43: 179-183.

Yang, S. H., X. M. Huang, R. Xia, Y. C. Xu and T. D. Dahmer. 2011. "Use of femur bone density to segregate wild from farmed Dybowski's frog (*Rana dybowskii*)." Forensic Science International 207: 61-65.

Zimmermann, B. 1992. "Degeneration of osteoblasts involved in intramembranous ossification of fetal rat calvaria." Cell and Tissue Research 267: 75-84.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวชัญญาพัชญ์ แสนเทศธัญวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 19 สิงหาคม พ.ศ. 2531 สำเร็จการศึกษาจากโรงเรียนราชวินิตบางแก้ว อำเภอบางพลี จังหวัดสมุทราปราการ ในปีการศึกษา 2549 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และจบการศึกษาในปีการศึกษา 2553 จากนั้นได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในระหว่างการศึกษาได้รับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช และทุนวิจัยจากโครงการสนับสนุนให้นิสิตผลิตผลงานวิจัยภายใต้ระบบเครือข่ายวิชาการภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (CU-ANR-56-05)

ผลงานทางวิชาการ

1. ชัญญาพัชญ์ แสนเทศธัญวัฒน์, นพดล กิตนะ, และ วิเชฏฐ์ คนซื่อ. ผลของอาหารเสริมสารสกัดกวาวเครือขาวต่อการเติบโตของกบนาระยะโตเต็มวัยในบ่อเลี้ยงจังหวัดน่าน. งานประชุมวิชาการสุขภาพสัตว์ภาคเหนือ ประจำปี 2557 11-12 ธันวาคม 2557 ณ โรงแรมเซ็นทารา ดวงตะวัน จังหวัดเชียงใหม่.

2. Saenthetthanyawat, C., Kitana, N., and Khonsue, K. Difference in bone mineral density between wild and farmed adult rice field frog. 5th International Wildlife Management Congress, 26th -30th July 2015, Sapporo, Japan.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University