รายงานผลการวิจัย

โครงการส่งเสริมการทำงานวิจัยเชิงลึกในสาขาวิชาที่มีศักยภาพสูง
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช ประจำปี 2553
(โครงการนำร่อง)

เรื่อง

สารออกฤทธิ์ชีวภาพในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุนและโรคหลอดเลือดแข็งตัวในผู้สูงอายุ

Bioactive Compounds for Prevention and Treatment of Osteoporosis and Arthrosclerosis in Aging Person

คณะผู้วิจัย

1. ศาสตราจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์
2. รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช
3. รองศาสตราจารย์ ดร. นพ. นรัตพล เจริญพันธ์
4. รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน
5. รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ
6. รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม
7. อาจารย์ ดร. สุกัญญา เจริญพร
8. อาจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มิถุนายน 2554
สัญญาเลขที่ CU-CLUSTER-Aging -8-35-53

ชื่อโครงการวิจัย สารออกฤทธิ์ชีวภาพในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุน

ชื่อผู้วิจัย ธนาภัทร ปาลกะ

เดือน และ ปี ที่ทำวิจัยเสร็จ มิถุนายน 2554

บทคัดย่อ

โรคกระดูกพรุนเป็นโรคที่มีสาเหตุจากการสูญเสียมวลกระดูกซึ่งกำลังเป็นปัญหาด้านสาธารณสุขที่สำคัญในประเทศที่เป็นสังคมผู้สูงวัย ออสตีโอคลาสต์ (osteoclast) เปลี่ยนสภาพจากเซลล์ในสายมอโนซัยท์และแมโครฟาจ โดยทำหน้าที่หลักในการสลายกระดูกในกระบวนการสลายกระดูก (bone resorption) การสลายกระดูกเกินโดยออสตีโอคลาสต์นำไปสู่การสูญเสียมวลกระดูกและส่งผลให้เกิดภาวะกระดูกพรุน ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยมีจุดประสงค์ในการคัดกรองหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติ (พืชและจุลินทรีย์) ที่มีฤทธิ์ต่อต้านการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ โดยใช้เซลล์ไลน์ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ในสายมอโนซัยท์และแมโครฟาจเป็นเซลล์แบบจำลองในงานวิจัยนี้ ก่อนอื่นคณะผู้วิจัยได้หาภาวะที่เหมาะสมในการเปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์โดยใช้ recombinant Receptor Activator Nuclear Factor Kappa B-Ligand (rRANK-L) ติดตามการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์โดยการตรวจวัดแอคติวิตีของ tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP) บ่มบัดเซลล์ไลน์ RAW264.7 ด้วย rRANK-L ที่ความเข้มข้น 50 และ100 ng/mL และบ่มเซลล์นาน 7 วัน ในระหว่างนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มี rRANK-L ผสมอยู่ทุกๆ 2 วัน ผลจากการย้อมหาแอคติวิตีของ TRAP พบว่าความเข้มข้นของ RANK-L ที่ 100 ng/mL เหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ได้แรงที่สุด ดังนั้น จึงใช้ระบบคัดกรองนี้ในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและสารเมแทบอไลต์จากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์ ผลจากการคัดกรองพบว่าสารประกอบลิโมนอยด์จากพืช *Xylocarpus moluccensis* (7-oxo-7-deacetoxygedunin; KP-1) มีแอคติวิตีที่แรงในการกดการเปลี่ยนสภาพที่ 9 μM เมื่อวัดค่าความเป็นพิษต่อเซลล์พบว่ามีความเป็นพิษต่ำโดยมีค่า IC50 ที่ 26.29 μM ยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์ คือ *NFAT-c1*, *irf8* และ *cathepsin K* การบำบัดด้วย KP-1 ทำให้ระดับการแสดงออกของ mRNA ของ *NFAT-c1* และ *cathepsin K* ลดต่ำลงแต่ไม่มีผลต่อระดับของ *irf8* ผลที่ได้นี้บ่งบอกว่า KP-1 ออกฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์โดยการขัดขวางการแสดงออกของยีนที่เป็นเครื่องหมายและควบคุมการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ ส่งผลให้การแสดงออกของยีนที่เป็นเครื่องหมายของออสตีโอคลาสต์ลดต่ำลง ดังนั้นสารในกลุ่มลิโมนอยด์จากพืช KP-1 น่าจะมีศักยภาพในการที่จะพัฒนาเป็นยาบำบัดอาการกระดูกพรุนได้

Project Title Bioactive Compounds for Prevention and Therapy of Osteoporosis

Name of the Investigators Tanapat Palaga

Year 2011

Abstracts

Osteoporosis is the disease of bone mass lost which increasingly become one of the public health problems in aging society. Osteoclasts differentiate from monocyte/macrophage lineage cells and function mainly in breaking down bones in the process called bone resorption. Excessive bone resorption by osteoclasts leads to loss in bone mass which result in osteoporosis. In this study, we aimed at identifying bioactive compounds from natural sources (plants and microbes) which have antagonistic activity against differentiation of osteoclasts. Monocyte/macrophage cell line, RAW264.7, was used as a model in this study. First, differentiation of osteoclasts were optimized using recombinant Receptor Activator Nuclear Factor Kappa B-Ligand (rRANK-L). Differentiation of osteoclasts were followed by monitoring the activity of tartrate-resistance acid phosphatase (TRAP). RAW264.7 cells were treated with rRANK-L at 50, 100 ng/mL and incubated for 7 days while fresh media containing rRANK-L were added every other days. TRAP staining revealed that RANK-L at concentration of 100 ng/mL induced more robust osteoclast differentiation. Using this screeing system, plants derived compounds and microbial metabolites were screened for anti-osteoclastogenic activity. One limonoid compound (7-oxo-7-deacetoxygedunin; KP-1) from *Xylocarpus moluccensis* showed strong anti-osteolastogenic activity at concentration of 9 μM. The cytotoxicity of KP-1 was low with an IC50 of 26.29 μM. Treatment with KP-1 decreased mRNA level of *NFAT-c1* and *cathepsin K* but did not affect that of *irf8*. These results suggest that KP-1 exhibits anti-osteoclastogenic activity by interfering with expression of osteoclast markers regulators, resulting in significant decrease in mRNA expression. Taken together, this plant limonoid KP-1 has a potential to be developed as novel therapeutic drug for treating the condition of osteoporosis.

บทนำ

โรคที่มนุษย์ต้องเผชิญอยู่ในปัจจุบัน มีมากมาย เช่น โรคมะเร็ง หรือโรคติดเชื้อประเภทต่างๆ ดังนั้นเพื่อที่จะทำให้เราสามารถมีดำรงชีวิตอยู่ได้หนึ่งในปัจจัยที่สำคัญคือยารักษาโรค ยาที่มีใช้อยู่ในปัจจุบันอาจไม่ได้ผลหรือได้ผลน้อย ทำให้ต้องมีการพัฒนายาที่ใช้รักษาให้มีความสามารถเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ดังนั้นการค้นพบสารออกฤทธิ์ชนิดใหม่ๆจึงมีความจำเป็นสูงมากเพื่อที่จะให้การรักษามีประสิทธิภาพต่อไป โดยเฉพาะโรคที่เกิดกับผู้สูงอายุ เนื่องจากในปัจจุบันวิวัฒนาการทางแพทย์สูงขึ้นส่งผลให้อายุเฉลี่ยของประชากรสูงขึ้นตามไปด้วย ทำให้โรคที่เกิดขึ้นกับผู้สูงอายุมีความสำคัญตามไปด้วย เช่น โรคหัวใจ โรคความดันโลหิตสูง โรคกระดูกพรุน โรคอัลไซเมอร์ โรคมะเร็ง เป็นต้น ยังมีพืชผักและสมุนไพรของไทยอีกเป็นจำนวนมากที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำมาทำการวิจัยเพื่อหาสารออกฤทธิ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารออกฤทธิ์ในการรักษาโรคผู้สูงอายุ อันเป็นปัญหาที่มีความสำคัญเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคกระดูกพรุนและออสตีโอคลาสต์

ออสตีโอคลาสต์เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell) ที่พัฒนาการมาจากเซลล์สายมอโนซัยท์/แมโครฟาจ เซลล์ประเภทนี้หลั่งกรดและเอนไซม์ย่อยสลายเพื่อสลายกระดูกTRAP เป็นเอนไซม์ที่นิยมใช้เป็นเครื่องหมายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของออสตีโอคลาสต์ ไซโตไคน์สองชนิด ได้แก่ RANK-L และ M-CSF มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ จากเซลล์ไขกระดูกในกลุ่มมัยอีลอยด์ ออสตีโอบลาสต์สามารถควบคุมการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ได้โดยหลั่งไซโตไคน์สองประเภทนี้ การไม่สมดุลระหว่างการสร้างและการสลายกระดูกมักส่งผลให้เกิดภาวะการสูญเสียมวลกระดูกทำให้เกิดโรคกระดูกพรุน

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่สามารถกดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์มีศักยภาพสูงในการพัฒนาเป็นยาต้านการสลายกระดูกเพื่อการบำบัดภาวะการสูญเสียมวลกระดูกได้ อีกทั้งยังอาจสามารถใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันการเกิดอาการได้ ที่ผ่านมาได้มีการรายงานเกี่ยวกับสารกระกอบจากธรรมชาติ ทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ได้

Woo และคณะ (2004) รายงานว่า quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในผลไม้และผัก โดยเฉพาะในสารสกัดจากหัวหอม สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแอคติวิตีของ TRAP ได้ ในเซลล์พรีออส ดีโอคลาสต์ ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L [1] อีกทั้ง ในปี 2006 กลุ่มวิจัยเดียวกันยังรายงานถึง reveromycin A ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่มีหมู่คาร์บอกซีลิก 3 หมู่ ในโครงสร้างซึ่งแยกได้จากสารสกัดจุลินทรีย์ *Streptomyces* ซึ่งสารนี้สามารถเหนี่ยวนำให้ออสตีโอคลาสต์ตายแบบ apoptosis ได้แบบจำเพาะ โดยสารนี้กดการทำงานของ isoleucyl-tRNA synthetase ในออสตีโอคลาสต์แบบจำเพาะ [2]

ในปี 2010 Tang และคณะรายงานถึงไอโซฟลาโวนที่แยกได้จากพืชซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเอสโตรเจนสามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกได้ โดยเฉพาะ genestein ที่เป็นไอโซฟลาโวนกลุ่มหลักในถั่วเหลืองสามารถกดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์จากเซลล์ไขกระดูกและ RAW264.7 ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L และ M-CSF ได้ [3] อีกทั้ง ยังมีสารต้านการสลายกระดูกที่แยกได้จากเมแทบอไลต์ทุติยภูมิของจุลินทรีย์ เช่น FK506 Concanamycin B ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces* sp. [4, 5] และ prodigiosins ซึ่งแยกได้จาก *Serratia marcescens* [6] เป็นต้น

อาการอักเสบเป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ innate ซึ่งหากอยู่ภายใต้การควบคุมที่เหมาะสม การอักเสบมีประสิทธิภาพในการกำจัดการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ แต่หากการอักเสบมีการดำเนินไปเป็นระยะเวลานาน จนกลายเป็นการอักเสบเรื้อรังก็จะกลายเป็นโทษต่อเจ้าบ้านได้ โดยอาจทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อของตนเองได้ โรคที่เป็นปัญหาทางสาธารณสุขสำหรับผู้สูงอายุในปัจจุบันหลายโรคมีสาเหตุมาจากการอักเสบเรื้อรัง เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมและกระตุ้นการอักเสบ คือ แมโครฟาจ เซลล์ชนิดนี้พบมีอยู่ทั่วไปในอวัยวะต่างๆ มีหน้าที่หลักในการจับกิน (phagocytosis) สิ่งแปลกปลอม อีกทั้ง เมื่อถูกกระตุ้นยังมีความสามารถในการหลั่งสารต่างๆ ที่มีฤทธิ์ในการทำลายเชื้อก่อโรค เช่น nitric oxide reactive oxygen species เป็นต้น ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้ยังมีความสามารถในการทำลายเนื้อเยื่อของเจ้าบ้านได้ ยาลดการอักเสบในปัจจุบันที่นิยมใช้ คือ สเตียรอยด์ เนื่องจากมีฤทธิ์ครอบคลุมในการกดการทำงานของภูมิคุ้มกันได้ดี แต่การใช้ยาสเตียรอยด์เป็นระยะเวลานานมักมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ตามมาด้วย

สำหรับโรคข้ออักเสบรูมาตอยด์นั้น การอักเสบเรื้อรังบริเวณข้อทำให้เกิดการหลั่งสารออกฤทธิ์ต่างๆ จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่บริเวณที่เกิดการอักเสบของข้อ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการแปรสภาพของออสตีโอคลาสต์เพื่อมากขึ้นในบริเวณนั้น ทำให้ที่รอยโรคมีภาวะการทำลายข้อและกระดูกได้ [7] ดังนั้น การอักเสบและการสลายมวลกระดูกจึงมีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดในการเหนี่ยวนำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคได้

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแหล่งธรรมชาติ (พืชและจุลินทรีย์) ที่มีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพของออสจีโอคลาสต์และฤทธิ์ต้านการอักเสบ และศึกษากลไกในระดับโมเลกุลของแอคติวิตีด้านการเปลี่ยนสภาพเบื้องต้น สารที่คัดกรองได้จากการวิจัยนี้มีศักยภาพในการเป็น lead compound เพื่อพัฒนาเป็นยาต้านการสลายกระดูกสำหรับป้องกันและบำบัดโรคกระดูกพรุนต่อไปได้

<u>วัตถุประสงค์</u>

เพื่อคัดกรองสารจากพืชและจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบและการเปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์และศึกษากลไกของแอคติวิตีนี้ในระดับโมเลกุล

แผนการวิจัยตลอดโครงการ

กิจกรรม	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. การพัฒนาระบบการคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กดการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ออสตีโอคลาสต์และระบบการตรวจการทำงานของเซลล์ออสตีโอคลาสต์	●	●										
2. การพัฒนาระบบคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กดการอักเสบ			●	●								
3. การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรและสารสกัดเมแทบอไลต์จากจุลินทรีย์					●							
4. การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพ						●						
5. การทำให้บริสุทธิ์และพิสูจน์เอกลักษณ์ทางเคมี							●	●	●			
6. การศึกษากลไกการออกฤทธิ์และการศึกษาฤทธิ์ในระดับ *in vitro*							●	●	●	●	●	●

* ● หมายถึงกิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้ว

วิธีการวิจัย (Procedure)

1. เซลล์ไลน์และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบ

เซลล์ไลน์ที่ใช้ในการวัดแอคติวิตีของสารออกฤทธิ์ชีวภาพต้านการอักเสบและการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ คือ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ monocyte/macrophage precursor โดยเลี้ยงเซลล์ในอาหาร DMEM ที่เติม fetal bovine serum (10% v/v) โซเดียมไพรูเวต (1 mM) HEPES (1 mM) และเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซิน โดยเลี้ยงที่ภาวะ 5% คาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เบื้องต้น จึงบ่มเซลล์ด้วยสารทดสอบที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 mg/mL) ในอาหารเลี้ยงเซลล์และบ่มเซลล์ต่ออีก 4 ชั่วโมง จากนั้นเติม isopropanol (0.04 N HCl) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm คำนวณค่าการอยู่รอดของเซลล์โดยใช้สมการต่อไปนี้

% cell viability = (OD test – OD blank) x 100/(OD control – OD blank)

2. การเหนี่ยวนำออสตีโอคลาสต์และการคัดกรองสาร

นำเซลล์ RAW264.7 มากระตุ้นด้วย recombinant RANK-L (rRANK-L; Peprotech) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ng/mL นาน 5 วัน พร้อมกับสารที่ทำการคัดกรองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่ทำให้การอยู่รอดของเซลล์ต่ำกว่า 80% จากการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ข้างต้น

เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มี rRANK-L ทุกๆ 2 วัน จากนั้นวัดการเปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์โดยการย้อม TRAP

3. การตรวจหาแอคติวิตีของ Tartrate-resistant alkaline phosphatase (TRAP)

หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์แล้ว ตรึงเซลล์ด้วย 10% formaldehyde และเติมสารละลาย p-nitrophenylphosphate ใน 50 mM citrate buffer (pH 4.6) ซึ่งเป็นซับสเตรทของ TRAP และเติม 0.1 N NaOH และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm โดยใช้ไมโครเพลทรีดเดอร์ สำหรับการย้อมหาแอคติวิตีของ TRAP ในออสตีโอคลาสต์นั้น นำเซลล์ที่เหนี่ยวนำเป็นออสตีโอคลาสต์มาตรึงด้วย 10% formaldehyde นาน 10 นาที และล้างใน 95% ethanol จากนั้นเติม 0.1 mg/mL naphthol AS-MX phosphate และ 0.6 mg/mL fast red violet LB salt ใน 50 mM sodium acetate buffer (pH 5.0) ที่มี 50 mM sodium tartrate หลังจากล้างด้วยน้ำแล้วทำให้แห้ง ส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ออสตีโอคลาสต์จะย้อมติดสีแดงเข้มและมีหลายนิวเคลียสในหนึ่งเซลล์ [8]

4. การกระตุ้นการอักเสบในแมคโครฟาจ

กระตุ้น RAW264.7 ด้วย rIFNγ (10 ng/mL) และไลโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide; LPS) (100 ng/mL) นาน 24 ชั่วโมง เก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อนำไปวัดปริมาณของไนตริกอออกไซด์ที่ผลิตได้

5. การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการการเปลี่ยนสภาพของออส ตีโอคลาสต์

วัดปริมาณไนตริกออกไซด์ในรูปของไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RAW264.7 ที่กระตุ้นโดย IFNγ/LPS โดยปฏิกิริยา Greiss reaction ตามวิธีที่ได้มีรายงานมาก่อนหน้านี้ [9] ยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ที่ศึกษา คือ *Nfat-c1*, *Cathepsin K* และ *irf8* และใช้ *beta-actin* เป็นยีนควบคุม โดยติดตามการแสดงออกของ mRNA ของยีนเหล่านี้ในเซลล์ออสตีโอคลาสต์ที่เหนี่ยวนำโดย rRANK-L ด้วยวิธี quantitative realtime RT-PCR สกัด total RNA จากเซลล์โดยใช้ TriaZol (Invitrogen) และเปลี่ยน RNA เป็น cDNA โดยใช้ reverse transcriptase และทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสด้วย 1 x Maxima™ SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Fermentas) ในเครื่อง MJ Mini personal Thermal cycler (BioRad) และคำนวณระดับการแสดงออกโดยใช้ $2^{-\Delta\Delta CT}$

6. สารสกัดทดสอบ

สารสกัดที่คัดกรองประกอบด้วยสารที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วจากพืช (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม ภาควิชาเคมี และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยม ภักดี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Professor Jun Wu, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences) สารสกัดอย่างหยาบจากเมแทบอไลต์จากจุลินทรีย์ที่แยกได้จากดินในจังหวัดน่าน

ผลของการวิจัย (Result)

1. การพัฒนาระบบการคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กดการแปรสภาพของเซลล์ออสตีโอคลาสต์และระบบการตรวจการทำงานของเซลล์ออสตีโอคลาสต์

นำเซลล์ไลน์ RAW264.7 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ที่มีสมบัติเป็น macrophage precursor มาใช้เป็นเซลล์ทดสอบ โดยเติม recombinant RANKL ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้มีการแปรสภาพเป็นออสติโอคลาสต์ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 ng/mL และเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานาน 5 วัน โดยเติมอาหารใหม่พร้อม rRANKL ทุกๆ 2 วัน จากกนั้นตรวจสอบการแปรสภาพเป็นเซลล์ออสติโอคลาสต์โดยใช้การย้อมเพื่อตรวจหา TRAP โดยการตรวจเชิงคุณภาพทำโดยวิธีการย้อม *in situ* ด้วย substrate และตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และการตรวจเชิงปริมาณวัดโดยการเก็บ cell lysate และใช้ chromogenic substrate ในการวัดแอคติวิตีของเอนไซม์ ทำให้สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 nm ได้

แสดงผลการย้อมเซลล์ในรูปที่ 1 ในรูปที่ 1A เซลล์ที่ไม่ได้รับ rRANKL ไม่มีเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงและไม่พบว่ามีเซลล์มีที่นิวเคลียสหลายนิวเคลียส (multi-nucleated cell) ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับ rRANKL ที่ 50 และ 100 ng/mL นั้น มีเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงจำนวนมาก อีกทั้ง ยังมีเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน (รูปที่ 1B-C) โดยจำนวนเซลล์ที่มีนิวเคลียสหลายนิวเคลียสนั้นพบมากกว่าในเซลล์ที่ได้รับ RANKL ที่ 100 ng/mL ผลที่ได้นี้ยังสอดคล้องกับการวัดเชิงปริมาณ โดยการตรวจการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงของ cell lysate หลังจากที่เติม chromogenic substrate แล้ว โดยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดที่ 410 nm พบว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ rRANKL และเซลล์ที่ได้รับ rRANKL 100 ng/mL ให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.20 และ 2.0 ตามลำดับ ดังนั้น จึงใช้ภาวะนี้เป็นภาวะที่เหมาะสมในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีฤทธิ์กดการแปรสภาพของออสตีโอคลาสต์

<u>รูปที่ 1</u> ผลการย้อมแอคติวิตี TRAP ในเซลล์ RAW264.7 ที่ได้รับ rRANKL (A) RAW264.7 ที่ไม่มีการเติม rRANKL (B-C) RAW264.7 ที่เติม rRANKL ที่ 50 และ 100 ng/mL ตามลำดับ ลูกศรแสดงตำแหน่งของเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell)

<u>2. การพัฒนาระบบคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่มีฤทธิ์กดการอักเสบ</u>

ใช้เซลล์ RAW264.7 ในการพัฒนาระบบคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยนำเซลล์มากระตุ้นด้วย recombinant interferon gamma (rIFNγ) และ lipopolysaccharide (LPS) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเซลล์ไปวัดปริมาณ nitric oxide ที่เซลล์ผลิตโดยปฏิกิริยา Griess พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นมีการผลิต nitric oxide ในปริมาณที่สูงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นอย่างมีนัยสำคัญ (ไม่แสดงผล) ดังนั้น จึงจะใช้การวัดปริมาณ nitric oxide เป็นการวัดเชิงปริมาณเพื่อคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ

<u>3. การเตรียมสารสกัดจากพืชสมุนไพรและสารสกัดเมแทบอไลต์จากจุลินทรีย์</u>

สารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ซึ่งจะนำมาใช้ในการทดสอบคัดกรองฤทธิ์ทางชีวภาพนั้นมีดังนี้

(1) สารสกัดจากพืชในกลุ่ม limonoid ที่ได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) และ Professor Jun Wu (South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, China) จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัวอย่าง

(2) สารสกัดจากกระชายดำและอนุพันธ์ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒทรา สวัสดี (ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัวอย่าง

(3) สารสกัดแมเทบอไลท์จากจุลินทรีย์ *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากโครงการความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในเขตพื้นที่จังหวัดน่าน (ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ปี 2549) จำนวนทั้งสิ้น 80 ตัวอย่าง

สารสกัดเหล่านี้มีทั้งที่เป็นสารสกัดอย่างหยาบและสารที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้ว โดยทำละลายในตัวทำละลาย Dimethyl sulfoxide (DMSO) หรือ 50% acetone (v/v)

2.4 การคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพ

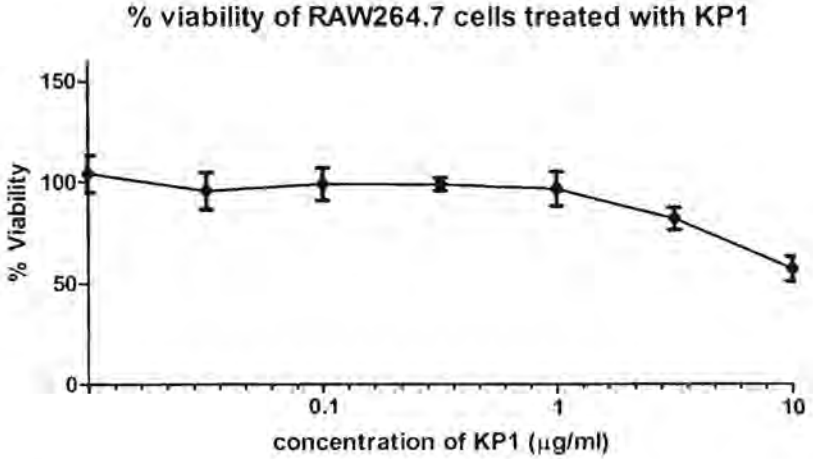
ก่อนคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ต้านการแปรสภาพของออสตีโอคลาสต์และต้านการอักเสบ ได้ทดสอบการเป็นพิษของสารที่จะคัดกรองต่อเซลล์ก่อน เพื่อกำหนดความเข้มข้นที่จะใช้ในการคัดกรองสารเป้าหมาย โดยนำเซลล์ RAW264.7 มาทดสอบกับสารที่จะทำการคัดกรองที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าความอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT

หลังจากนั้นเลือกคความเข้มข้นตสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และใช้ในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ชีวภาพที่ได้จากแหล่งต่างๆ ที่ระบุข้างต้น ผลการคัดกรองแสดงในตารางที่ 1

จากผลในการคัดกรองเบื้องต้นพบว่าสารในกลุ่มลิโมนอยด์ (limonoid) ที่สกัดได้จากพืช *Xylocarpus moluccensis* (7-oxo-7-deacetoxygedunin; KP-1) มีฤทธิ์ในการกดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์และการอักเสบที่แรง ในขณะที่มีสารสกัดอย่างหยาบจาก *Streptomyces* sp. ที่แยกได้จากดินในจังหวัดน่านที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบสูง ส่วนสารสกัดจากพืชอื่นๆ นั้นพบว่ามีฤทธิ์ต่ำหรือไม่มี ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเน้นศึกษากลไกการทำงานของ KP-1 ในเซลล์ออสตีโอคลาสต์ และกำลังดำเนินการทำให้สารสกัดจากจุลินทรีย์บริสุทธิ์โดยวิธีทางเคมีต่อไป

5. การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของ KP-1

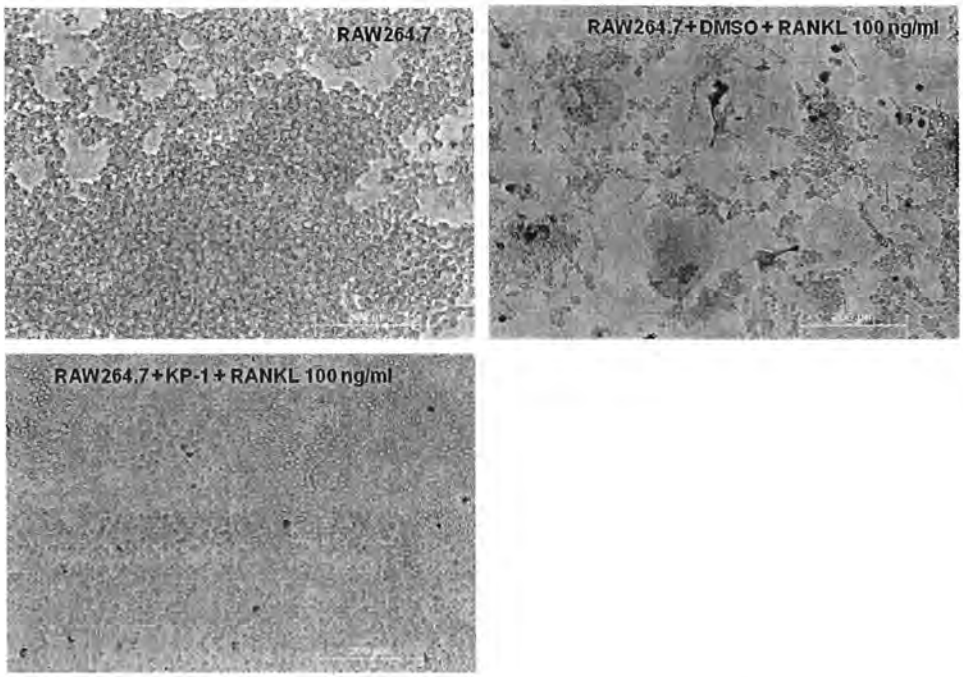
เพื่อทดสอบว่า KP-1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 หรือไม่ จึงนำเซลล์มาทดสอบกับ KP-1 ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมงและวัดค่าการอยู่รอดของเซลล์โดยวิธี MTT (รูปที่ 2) จากนั้นคำนวณค่า IC50 ของสาร พบว่ามีค่า IC50 ที่ 11.53 μg/mL (26.29 μM)



รูปที่ 2 ความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ของ KP-1 โดยวิธี MTT

จากนั้นย้อมเซลล์ RAW264.7 ที่เหนี่ยวนำให้เป็นออสตีโอคลาสต์โดย rRANK-L ภายใต้การให้ KP-1 ที่ความเข้มข้น 9 μM เพื่อติดตามแอคติวิตีของ TRAP พบว่าสาร KP-1 สามารถ

กดแอคติวิตีของ TRAP ได้อย่างชัดเจนในขณะที่เซลล์ที่ได้รับเฉพาะตัวทำละลายควบคุมมีแอคติวิตีของ TRAP อย่างชัดเจน (รูปที่ 3) เมื่อวัดฤทธิ์ในการกดนี้เชิงปริมาณพบว่า KP-1 ที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถกดการเปลี่ยนสภาพได้ 97.58%



<u>รูปที่ 3</u> ฤทธิ์กดการเปลี่ยสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์ของ KP-1เหนี่ยวนำให้ RAW264.7 เป็นออสตีโอคลาสต์โดย rRANK-L ภายใต้การมี KP-1 (9 mM) หรือตัวทำละลายควบคุม DMSO นาน 5 วันและย้อมแอคติวิตีของ TRAP

ตารางที่ 1 สรุปผลการคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการแปรสภาพของออสตีโอคลาสต์และสารต้านการอักเสบ

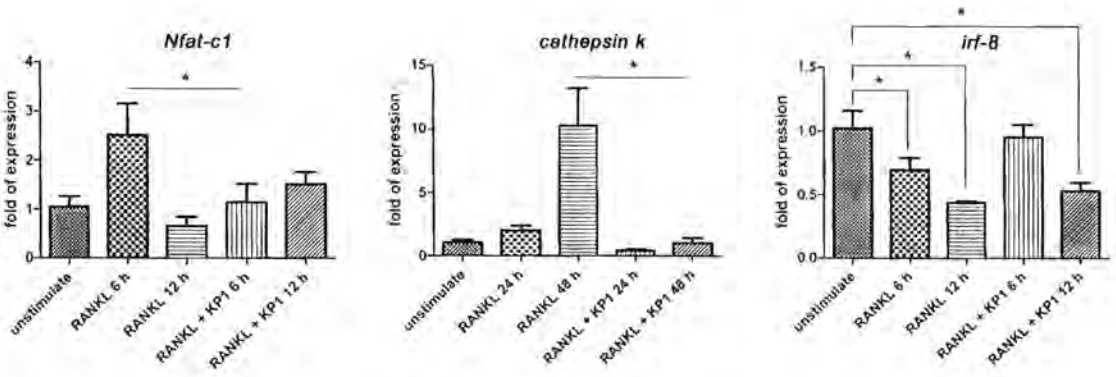
ตัวอย่างสารที่นำมาคัดกรอง	จำนวนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านการแปรสภาพของออสตีโอคลาสต์	จำนวนตัวอย่างที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ
สารในกลุ่ม limonoids ที่สกัดได้จากพืชและสารอนุพันธ์ (อนุเคราะห์โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม)	2	1
สารในกลุ่ม limonoids ที่สกัดได้จากพืช (อนุเคราะห์โดย Professor Jun Wu)	2	9
สารสกัดจากกระชายดำและสารอนุพันธ์ (อนุเคราะห์โดยผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัฒทรา สวัสดี)	-	-
สารสกัดแมเทบอไลท์จากจุลินทรีย์ *Streptomyces* sp.	-	2

6. ผลของสารที่มีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ต่อการแสดงออกของยีน

เพื่อศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ KP-1 จึงติดตามการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ ได้แก่ *Nfat-c1* และ *Cathepsin K* โดย NFAT-c1 เป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์และอยู่ภายใต้การควบคุมของการกระตุ้นโดย RANK-L สำหรับ Cathepsin K เป็นโปรตีเอสที่มีหน้าที่สำคัญในการสลายกระดูกโดยสามารถย่อย elastin gelatin และ collagen ได้ และยีน *irf8* ประมวลรหัส transcription factor ที่มีรายงานว่าการกระตุ้นโดย RANK-L กดการแสดงออกของยีนนี้และการกดการแสดงออกนี้มีความสำคัญต่อการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์

เมื่อบำบัด RAW264.7 ด้วย KP-1 ที่ความเข้มข้น 9 μM และติดตามการแสดงออก mRNA ของยีนเหล่านี้ พบว่า KP-1 มีฤทธิ์กดการแสดงออกของทั้ง *Nfat-c1* และ *Cathepsin K* แต่ไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *irf8* (รูปที่ 4)

ผลที่ได้จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารลิโมนอยด์ KP-1 ออกฤทธิ์กดการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์แบบจำเพาะ ซึ่งส่งผลให้การเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ภายใต้การเหนี่ยวนำโดย RANK-L ไม่เกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการที่ได้จากการวัดแอคติวิตี TRAP ในการทดลองข้างต้น



รูปที่ 4 ผลของสาร KP-1 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของออส ตีโอคลาสต์

เหนี่ยวนำ RAW264.7 ให้เปลี่ยนสภาพเป็นออสตีโอคลาสต์โดย rRANK-L ที่ระยะเวลาต่าง ๆ โดยมี KP-1 (9 mM) หรือตัวทำละลายควบคุม DMSO และติดตามการแสดงออกของ mRNA ของ Nfat-c1, cathepsin k และ irf-8 โดยวิธี quantitative RT-PCR ปรับระดับการแสดงออกของ mRNA โดยใช้การแสดงออกของ beta-actin

การอภิปรายผล (Discussion)

ในงานวิจัยนี้ คณะผู้วิจัยได้ทำการคัดกรองเพื่อหาสารจากแหล่งธรรมชาติที่มีฤทธิ์กดการเปลี่ยนสภาพและ/หรือการอักเสบและศึกษากลไกในระดับโมเลกุลเบื้องต้นของสารเหล่านั้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหา lead compound ที่มีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นยาป้องกันหรือบำบัดอาการกระดูกพรุนและพยาธิสภาพที่เกิดจากการอักเสบเรื้อรัง โดยพบว่ามีสารสกัดในกลุ่มลิโมนอยด์จากพืช *Xylocarpus moluccensis* มีแอคติวิตีสูงในการกดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L ซึ่งที่ผ่านมายังไม่เคยมีรายงานมาก่อน อีกทั้ง ยังพบว่าสารสกัดอย่างหยาบจาก Streptomyces sp. ที่แยกได้จากดินในจังหวัดน่านมีฤทธิ์กดการอักเสบ ซึ่งปัจจุบันกำลังดำเนินการทำให้บริสุทธิ์เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางเคมีต่อไป

สารในกลุ่มลิโมนอยด์เป็นสารที่สกัดได้จากพืชโดยพบมากในกลุ่ม citrus, *Rutaceae*, *Meliaceae* ซึ่งจัดเป็น tetranortriterpenes โดยมีโครงสร้างหลักเป็น furanolactone ปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารในกลุ่มนี้เพื่อนำไปเป็นยาต้านไวรัส ยาต้านรา ยาต้านมาลาเรีย เป็นต้น โดยมีการรายงานหลายฉบับที่ระบุถึงฤทธิ์ในการกดการอักเสบของสารในกลุ่มนี้ [10-12] ซึ่งในงานวิจัยนี้พบว่าสาร KP-1 ที่มีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ก็มีฤทธิ์กดการอักเสบในระบบคัดกรองของงานวิจัยนี้เช่นกัน ซึ่งกำลังอยู่ระหว่างการศึกษากลไกการทำงานในระดับโมเลกุลสำหรับฤทธิ์ดังกล่าว

สาร KP-1 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำและมีฤทธิ์ในการต้านการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ที่สูง โดยเมื่อเปรียบเทียบกับ FK506 (tacrolimus) ซึ่งเป็นสารที่แยกได้จากจุลินทรีย์ *Streptomyces sp.* ที่มีฤทธิ์ในการกดการทำงานของ NFAT และมีการใช้กันอย่างแพร่หลายเป็นยากดภูมิคุ้มกัน พบว่าสาร KP-1 มีฤทธิ์กดการเปลี่ยสภาพได้สมบูรณ์กว่า FK506

โดยเมื่อศึกษาผลของสาร KP-1 ต่อการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L แล้ว พบว่าสาร KP-1 สามารถกดการแสดงออกของ *Nfat-c1* และ *Cathepsin k* แบบจำเพาะโดยไม่มีผลต่อการแสดงออกของ *irf-8* mRNA ผลดังกล่าวแสดงว่าสาร KP-1 ออกฤทธิ์โดยการจัดขวางการส่งสัญญาณปลายน้ำของวิถีสัญญาณ RANK-L ที่นำไปสู่การแสดงออกของ *Nfat-c1* mRNA การแสดงออกของ Cathepsin K อยู่ภายใต้การควบคุมของ NFAT-c1 ดังนั้น ผลที่ได้จึงสอดคล้องกันโดยการลดลงของ *Nfat-c1* โดยสาร KP-1 ทำให้การแสดงออกของ Cathepsin K ลดต่ำลง ปัจจุบันคณะผู้วิจัยกำลังศึกษากลไกในการออกฤทธิ์เพื่อสืบหาวิถีสัญญาณที่น่าจะเป็นเป้าหมายในการทำงานของสาร KP-1

ข้อสรุป (Conclusion)

1. ได้พัฒนาระบบการคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการกดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์และการอักเสบในระดับ in vitro
2. คัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพโดยใช้ระบบข้างต้น จากสารที่ได้จากพืชและจุลินทรีย์และพบว่ามีสารบริสุทธิ์ในกลุ่มลิโมนอยด์จากพืชมีฤทธิ์กดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์และสารสกัดอย่างหยาบจากจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์กดการอักเสบ
3. สารลิโมนอยด์ KP-1 จาก *Xylocarpus moluccensis* ออกฤทธิ์กดการเปลี่ยนสภาพของออสตีโอคลาสต์โดยกดการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของออสตีธอคลาสต์ ได้แก่ *Nfat-c1* และ *Cathepsin k*

ข้อเสนอแนะ (Suggestion for further work)

เพื่อนำไปใช้พัฒนาเป็น lead compound เป็นยาบำบัดหรือรักษาอาการกระดูกพรุน คณะผู้วิจัยจะศึกษาวิถีสัญญาณที่เป็นเป้าหมายของสาร KP-1 ซึ่งเป็นวิถีสัญญาณปลายน้ำจาก RANK-L ได้แก่ NF-κB และ MAPK อีกทั้ง จะศึกษาผลของสารนี้ในระดับ *in vivo* ในสัตว์ทดลองแบบจำลองโรคกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือนโดยการตัดรังไข่ในหนูไมซ์เพื่อลดระดับฮอร์โมนเอสโตรเจน

เอกสารอ้างอิง

[1] J.T. Woo, H. Nakagawa, M. Notoya, T. Yonezawa, N. Udagawa, I.S. Lee, M. Ohnishi, H. Hagiwara, K. Nagai, Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts, Biol Pharm Bull 27 (2004) 504-509.

[2] J.T. Woo, M. Kawatani, M. Kato, T. Shinki, T. Yonezawa, N. Kanoh, H. Nakagawa, M. Takami, K.H. Lee, P.H. Stern, K. Nagai, H. Osada, Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts, Proc Natl Acad Sci U S A 103 (2006) 4729-4734.

[3] C.H. Tang, C.S. Chang, T.W. Tan, S.C. Liu, J.F. Liu, The novel isoflavone derivatives inhibit RANKL-induced osteoclast formation, Eur J Pharmacol 648 59-66.

[4] L.C. Hofbauer, C. Shui, B.L. Riggs, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, T. O'Brien, S. Khosla, Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells, Biochem Biophys Res Commun 280 (2001) 334-339.

[5] M. Miyazaki, Y. Fujikawa, C. Takita, H. Tsumura, Tacrolimus and cyclosporine A inhibit human osteoclast formation via targeting the calcineurin-dependent NFAT pathway and an activation pathway for c-Jun or MITF in rheumatoid arthritis, Clin Rheumatol 26 (2007) 231-239.

[6] J.T. Woo, Y. Ohba, K. Tagami, K. Sumitani, T. Kataoka, K. Nagai, Prodigiosin 25-C and metacycloprodigiosin suppress the bone resorption by osteoclasts, Biosci Biotechnol Biochem 61 (1997) 400-402.

[7] H. Takayanagi, K. Ogasawara, S. Hida, T. Chiba, S. Murata, K. Sato, A. Takaoka, T. Yokochi, H. Oda, K. Tanaka, K. Nakamura, T. Taniguchi, T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma, Nature 408 (2000) 600-605.

[8] B. Zhao, M. Takami, A. Yamada, X. Wang, T. Koga, X. Hu, T. Tamura, K. Ozato, Y. Choi, L.B. Ivashkiv, H. Takayanagi, R. Kamijo, Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis, Nat Med 15 (2009) 1066-1071.

[9] I. Guevara, J. Iwanejko, A. Dembinska-Kiec, J. Pankiewicz, A. Wanat, P. Anna, I. Golabek, S. Bartus, M. Malczewska-Malec, A. Szczudlik, Determination of nitrite/nitrate in human biological material by the simple Griess reaction, Clin Chim Acta 274 (1998) 177-188.

[10] J.M. van der Nat, W.G. van der Sluis, K.T. de Silva, R.P. Labadie, Ethnopharmacognostical survey of Azadirachta indica A. Juss (Meliaceae), J Ethnopharmacol 35 (1991) 1-24.

[11] J.H. Kim, Y.M. Park, J.S. Shin, S.J. Park, J.H. Choi, H.J. Jung, H.J. Park, K.T. Lee, Fraxinellone inhibits lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by negatively regulating nuclear

factor-kappa B in RAW 264.7 macrophages cells, Biol Pharm Bull 32 (2009) 1062-1068.

[12] M.H. Yang, J.S. Wang, J.G. Luo, X.B. Wang, L.Y. Kong, Chisopanins A-K, 11 new protolimonoids from Chisocheton paniculatus and their anti-inflammatory activities, Bioorg Med Chem 19 1409-1417.

ชื่อโครงการวิจัย การศึกษาผลและกลไกการรักษาภาวะกระดูกพรุนของพืชสมุนไพรไทย กวาวเครือขาวในหนูแรท

ชื่อผู้วิจัย สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์, สุกัญญา เจริญพร, นรัตพล เจริญพันธุ์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤษภาคม 2554

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของกวาวเครือขาวในการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียที่ชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก แบ่งหนู (อายุ 6 เดือน) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Sham control (SH) และกลุ่มที่ตัดรังไข่ออก (OVX) พักหนูไว้ 90 วัน สุ่มเลือกหนูกลุ่ม SH และกลุ่ม OVX กลุ่มละ 5 ตัว มาทำการุณยฆาต เก็บเลือดจากหัวใจ และเก็บกระดูกขาขวาท่อนบน หน้าแข้งขวา และสันหลังท่อนที่ 4 เพื่อนำไปวัดความหนาแน่นกระดูก และมวลกระดูก และเก็บกระดูกหน้าแข้งข้างซ้าย เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในระดับจุลภาค นำหนูที่เหลือ (กลุ่ม SH จำนวน 10 ตัว และ กลุ่ม OVX จำนวน 50 ตัว) มาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว และให้สารต่างๆ ทางปาก คือ น้ำกลั่น (กลุ่ม SH และ PM0), กวาวเครือขาวในขนาด 10, 100 และ 1000 มล/กก นน.ตัว/วัน (กลุ่มPM10, PM100 และ PM1000) และ 17 α-ethinylestradiol ขนาด 0.1 มล/กก นน.ตัว/วัน (กลุ่มEE) ตามลำดับ นาน 90 วัน ในระหว่างให้สารเก็บเลือดทุก ๆ 30 วัน ชั่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ และในวันสุดท้ายของการให้สารทำการุณยฆาตและเก็บอวัยวะต่าง ๆ ดังข้างต้น ผลการทดลองพบว่าการตัดรังไข่ออกทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพิ่มขึ้น เมื่อให้กวาวเครือขาวและ EE ทำให้น้ำหนักตัวลดลง พบการเพิ่มสูงขึ้นของน้ำหนักมดลูกในหนูเพศเมีย และไม่พบการเปลี่ยนแปลงของตับ, ไต และม้าม เนื้อกระดูก (%BA) ความหนาแน่นกระดูก และมวลกระดูกลดลงภายหลังจากตัดรังไข่ออก และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ โดยผลของ PM1000 มีค่าใกล้เคียงกับ EE โดยคาดว่าการตัดต่อมบ่งเพศออก, การให้กวาวเครือขาวและ EE มีผลไปกระตุ้นให้อัตราการสร้างและสลายกระดูกเพิ่มขึ้น เพราะระดับ alkaline phosphatase และ tartrate resistant acid phosphatase 5 b ในซีรั่ม มีค่าเพิ่มสูงขึ้น จากผลการทดลองครั้งนี้กล่าวได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะมีฤทธิ์ป้องกันการสลายกระดูก (antiresorptive effect) แล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic effect) ได้ด้วย จากผลการทดลองในปีที่ 1 นี้ ทำให้สรุปได้ว่ากวาวเครือขาวเป็นสมุนไพรทางเลือกที่ดีที่ควรจะพัฒนาต่อไปไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีสูงวัย โดยควรที่จะทำการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ต่อไปในปีที่ 2 เสียก่อน

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

Names of the Investigators Suchinda Malaivijitnond, Sukanya Jaroenporn, Narattapon Charoenphandhu

Year May 2010

Abstract

This study aims to investigate the effects of *Pueraria mirifica* herb on bone loss prevention in ovariectomy-induced osteoporotic rats. Six-month old female rats were divided into 2 groups; shame control (SH) and ovariectomy (OVX), and kept for 90 days. Five rats in each group were randomly selected, collected blood, euthanized, and collected right femur, right tibia and 4th lumbar vertebra for bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) analysis and left tibia for histological examination. Remaining rats in each group (10 rats in SH group and 50 rats in OVX group) were divided into 6 groups (10 rats/group) and fed with distilled water (SH and PM0 groups), 10, 100 and 1000 mg/kg BW/day of *P. mirifica* (PM10, PM100 and PM1000 groups) and 0.1 mg/kg BW/day of 17 α-ethinylestradiol (EE group), respectively, for 90 days. Blood samples were collected every 30 days, and body weights were measured once a week. Rats were euthanized at the end of treatment period and collected organs as describe previously. Ovariectomy increased body weight gains in rats; however, feeding of *P. mirifica* and EE reduced body weight gains. *P. mirifica* increased uterus weights and no changes of liver, kidney and spleen weights. %Trabecular bone area (%BA), BMD and BMC were reduced after ovariectomy and dose-dependently increased after *P. mirifica* feeding; the increase in PM1000 group was equally to those of the EE group. The ovariectomy, *P. mirifica* and EE might stimulate the bone turnover rate, because levels of serum alkaline phosphataseand tartrate resistant acid phosphatase 5 b were increased. From this study, it indicates that *P. mirifica* consumption could prevent bone loss (anti-resorptive effect) and restore the established osteoporosis (anabolic effect) in female rats. From the first year results, we can conclude that *P. mirifica* is one of the potential alterantive medicinal herbs that should be developed to be an anti-osteoporotic drug for aged women. Besides, the mechanisms of its effects should be consequently determined in the second year.

บทนำ

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

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

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

นิยมที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนทั้งสองกลุ่ม ยังมีราคาสูง และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu เป็นไม้เลื้อย และมีหัวอยู่ใต้ดินเพื่อสะสมอาหาร พบว่าส่วนหัวของกวาวเครือขาวเป็นบริเวณที่อุดมไปด้วยสารไฟโตเอสโตรเจน (phytoestrogens) อย่างน้อย 17 ชนิด โดยสารหลักเป็นพวก isoflavanoids ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin (Cherdshewasart and Sriwatcharakul, 2007; Cherdshewasart et al., 2007a) ซึ่งสารเหล่านี้มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงสามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptors) ได้และออกฤทธิ์เหมือนกับฮอร์โมนเอสโตรเจน จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาวสามารถลดระดับของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับแคลเซียมในซีรั่ม ในลิงแสมแก่เพศเมียได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Trisomboon et al., 2004) และต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีภายหลังจากการตัดต่อมบ่งเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมบ่งเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาว แสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก โดยกวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูกในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถป้องกันการเกิดโรคกระดูกพรุนได้ แต่อย่างไรก็ตามด้วยที่โรคกระดูกพรุนสามารถเกิดได้กับมนุษย์ทุกคน อย่างค่อยเป็นค่อยไปโดยไม่มีอาการแสดงให้เห็นจนกว่าจะเกิดสภาวะกระดูกหักแล้วผู้ป่วยถึงจะรู้ตัว และเข้ารับการรักษา ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยากที่จะแก้ไข ซึ่งขณะนี้นักวิจัยทั่วโลกกำลังมุ่งเน้นทำการวิจัย เพื่อให้ได้ยามาใช้ในการรักษาสภาวะกระดูกพรุน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสมุนไพรกวาวเครือขาว ในการรักษา (therapeutics) ภาวะกระดูกพรุนภายหลังจากที่อาการดังกล่าวได้เกิดขึ้นแล้ว รวมไปถึงการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อกระดูก เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการทดลองทั้ง

ในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยเริ่มต้นจากการศึกษาในหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่จะถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนก่อน โดยการตัดต่อมบ่งเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วัน จากนั้นจึงให้กวาวเครือขาวที่ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน และติดตามวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของกระดูก เละติดตามดูว่ากวาวเครือขาวสามารถรักษาภาวะกระดูกพรุนได้หรือไม่ จากนั้นจึงศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อเซลล์กระดูกของหนูแรทในหลอดทดลอง (*in vitro*)

โดยในการทดลองของปีที่ 1 จะศึกษาเฉพาะในสัตว์ทดลองและในรายงานความก้าวหน้าในรอบ 6 เดือนนี้จะเป็นการรายงานเกี่ยวกับหนูแรทเพศเมียที่จะถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน โดยการตัดรังไข่และพักหนูไว้นาน 90 วัน จากนั้นจึงให้กวาวเครือขาวที่ขนาด 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน และติดตามวัดการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของกระดูก (bone histology) ความหนาแน่นกระดูก (bone mineral density) และระดับ alkaline phosphaste (bone formation marker) ในซีรั่ม

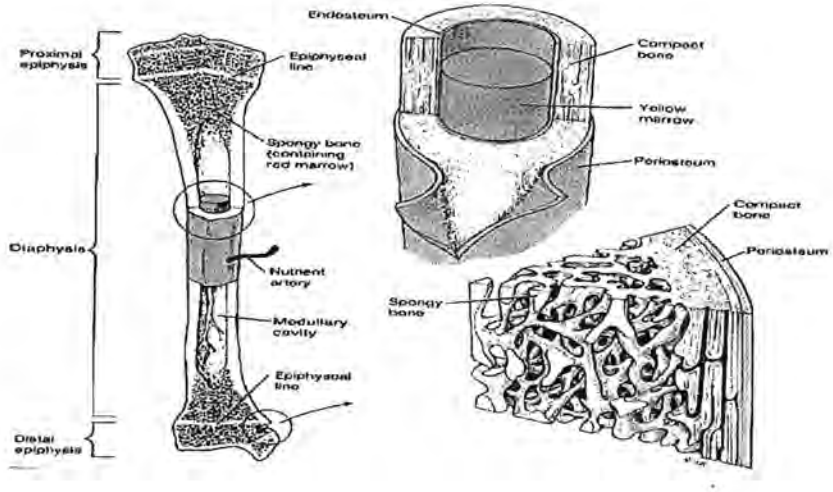
<u>วัตถุประสงค์ของโครงการ</u>

เพื่อศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมีย ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก

<u>การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง</u>

<u>กระดูก (Bone)</u>

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

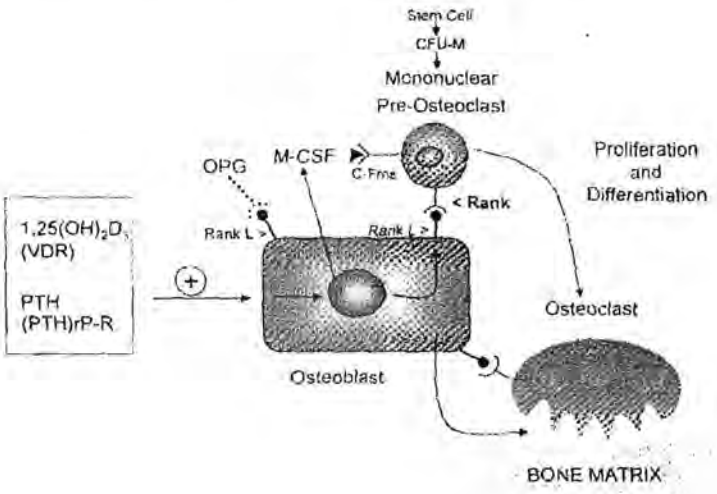


<u>รูปที่ 1</u> โครงสร้างของกระดูกยาว (long bone) ประกอบด้วยกระดูกชนิดเนื้อแน่น และกระดูกเนื้อโปร่ง

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

โดยพบว่า osteoblast และ osteoclast จะมีการทำงานที่ประสานกัน (รูปที่ 2) โดยมียีนหลายชนิดที่ควบคุมการเจริญ (development) ของ osteoblast เช่น Core binding factor A1 (Cbfa1) หรือ Runx2, Osf2 และ AML3 (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997) โดยยีนเหล่านี้จะไปมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และการเจริญ (maturation) โดยไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนหลายชนิด เช่น osterix, osteoponin, osteocalcin, bone sialopactin, type I collagen, receptor activator of nuclear factor KB (RANK-L) และ osteopogeterin (OPG) Osteocalcin และ osteoponin จะช่วยในการสะสมแคลเซียม (mineralization) ในขณะที่ RANK-L และ OPG จะควบคุมการทำงานของ osteoclast โดย RANK-L จะจับกับ RANK receptor ที่อยู่บน pre-osteoclast (osteoclast precursor) ซึ่งจะไปกระตุ้น pre-osteoclast ให้กลายไปเป็น mature osteoclast ที่สามารถทำหน้าที่สลายกระดูกได้ ในขณะที่ OPG สามารถจับกับ RANK-L ได้ ทำให้ RANK-L ไม่สามารถจับกับ RANK receptor ที่ pre-osteoclast ได้

ดังนั้น pre-osteoclast จึงไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น mature osteoclast ได้ การสลายกระดูกจะลดลง



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

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

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

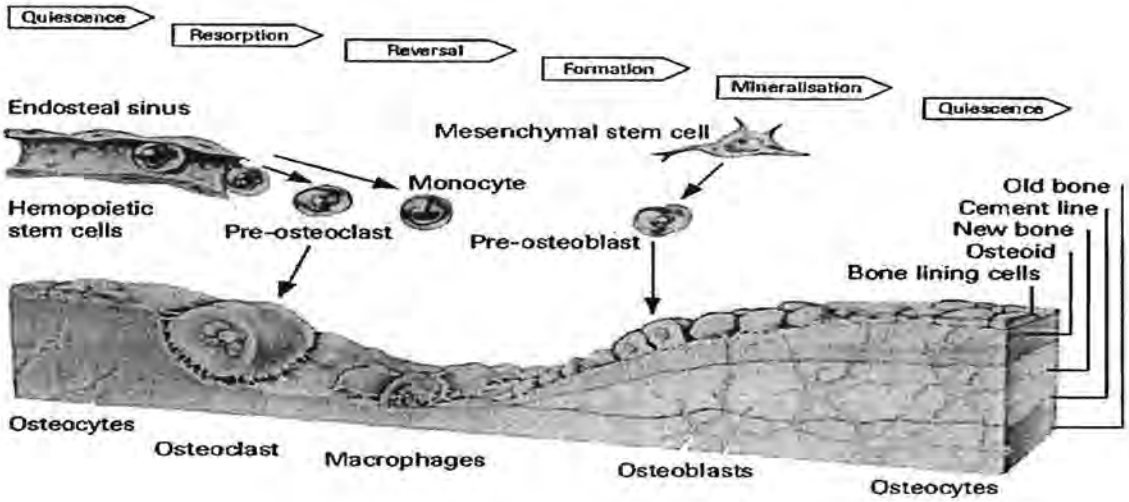
Resorption phase คือ กระบวนการสลายเนื้อกระดูก โดย osteoclast จะใช้ส่วนของ ruffle border วางตัวบริเวณผิวกระดูกส่วนที่จะมีการสลายเนื้อกระดูก จากนั้นจะหลั่งไฮโดรเจนอิออน (H^+) และหลั่ง hydrolytic enzyme เพื่อสลายกระดูก ทำให้เกิดการปลดปล่อยแคลเซียมฟอสเฟตออกมา ในขณะที่เกิดกระบวนการสลายกระดูก osteoclast จะหลั่งเอนไซม์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

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

Formation phase คือ กระบวนการสร้างกระดูก โดย osteoblast จะสังเคราะห์ และหลั่ง osteoid ล้อมรอบตัวเอง หลังจากนั้นจะหลั่ง pyrophosphate และแคลเซียม ออกมาจนกระทั่งความเข้มข้นของแคลเซียมภายนอกเซลล์สูงเกินกว่าที่จะละลายได้ osteoblast

จะหลั่ง เอนไซม์ alkaline phosphatase ออกมาเพื่อสลาย (hydrolyze) pyrophosphate ทำให้เกิดการสะสมตัวของแคลเซียม ที่ช่องว่างระหว่างโมเลกุลของคอลลาเจน ซึ่งเรียกกระบวนการนี้ว่า mineralization ทำให้ osteoblast ค่อยๆ ถูกดันให้ออกห่างจากผิวกระดูก แล้วเปลี่ยนไปเป็น osteocyte

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



รูปที่ 3 แสดงกระบวนการ bone remodeling cycle ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสลายกระดูกโดยการทำหน้าที่ของ osteoclast และกระบวนการสร้างกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoblast

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

ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

กระดูกพรุน คือ ภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกลดน้อยลง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับจุลภาคของเนื้อเยื่อกระดูก ส่งผลให้กระดูกเปราะบาง ไม่สามารถรับน้ำหนัก หรือแรงกดได้ตามปกติ ทำให้กระดูกหักได้ง่าย (Kanis et al., 1994) โดยตำแหน่งที่หักบ่อย ได้แก่ กระดูกสันหลัง (spinal vertebra) กระดูกสะโพก (hip) และกระดูกข้อมือ (wrist) กลไกในการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้นเกิดได้จากสองกลไกด้วยกันคือ 1)เกิดจาก bone turnover สูงขึ้น เนื่องจากกระดูกมี remodeling unit เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอัตราการ

สลายกระดูกมากขึ้นกว่าปกติ และ2)เกิดจากกระบวนการ bone remodeling cycle imbalance โดยพบว่าเกิดกระบวนการ bone resorption มากกว่า กระบวนการ bone formation ซึ่งการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้น อาจเกิดจากกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือเกิดจากทั้งสองกลไกร่วมกันก็ได้ (Compson, 2001)

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

ภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียมวลกระดูกไม่ให้เกิดเพิ่มมากขึ้น และลดอัตราการเกิดกระดูกหักได้ ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุด แต่คนส่วนใหญ่มักไม่เห็นความสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุนจนกระทั่งมีอาการจึงจะเข้ารับการรักษา ปัจจุบันการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนทำได้โดย การออกกำลังกาย รับประทานอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอ หลีกเลี่ยงการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และงดสูบบุหรี่ ส่วนในผู้หญิงที่ผ่าตัดรังไข่ออก และผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy) พบว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถลดอุบัติการณ์เกิดกระดูกหักได้ (Tongeson and Bell., 2001) แต่อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (Sulak 1997; Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) เป็นต้น ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มี

การศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น อันเนื่องมาจากการใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ 1) กลุ่มที่ยับยั้งกระบวนการสลายกระดูก (antiresorptive agents) ได้แก่ bisphosphonates ซึ่งเป็นยาที่สามารถยับยั้ง osteoclast activity และกระตุ้นกระบวนการ apoptosis ของ osteoclast ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกลดน้อยลง (Papapoulos, 2008) 2) กลุ่มที่กระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก (anabolic agent) โดยยากลุ่มนี้มีวัตถุประสงค์ในการใช้เพื่อเพิ่มมวลกระดูก ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (Parathyroid hormone) ซึ่งพบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์สามารถเพิ่มกระบวนการสร้างกระดูกโดยการกระตุ้น osteoblast activity สามารถเพิ่มจำนวนของ osteoblast และยับยั้งกระบวนการ apoptosis ของ osteoblast cells ได้ (Deal, 2009) แต่พบว่าฮอร์โมนพาราไทรอยด์มีผลข้างเคียง คือ ทำให้เกิดอาการวิงเวียนศีรษะ คลื่นไส้ และ อาเจียน และผลที่ได้ยังไม่แน่นอน จึงยังไม่เป็นที่นิยมที่จะนำมาใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุน นอกจากนี้ยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุนทั้งสองกลุ่ม ยังมีราคาสูง และต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ทำให้ผู้ที่มีภาวะกระดูกพรุนไม่สามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง โดยเฉพาะประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาสมุนไพรท้องถิ่นภายในประเทศ เพื่อพัฒนาเป็นยาในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุน เพื่อลดต้นทุนในการผลิต และการนำเข้ายาจากต่างประเทศ อีกทั้งสามารถนำไปใช้กับประชาชนได้อย่างเหมาะสม และไม่มีผลข้างเคียง

ผลของไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ต่อกระดูก

ไอโซฟลาโวนเป็นสารไฟโตเอสโตรเจน ที่พบมากในพืช เช่น ถั่วเหลือง มีโครงสร้างและคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ไอโซฟลาโวน ได้แก่ daidzin, genistin, daidzein, genistein และ puerarin สามารถจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Murkies et al., 1998; Chen and Anderson, 2002) ได้มีการศึกษาพบว่าไอโซฟลาโวนมีผลกระตุ้นการสร้างกระดูก จากการศึกษาโดยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกระดูกกับ genistein ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-6} -10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในเนื้อเยื่อ และเพิ่ม alkaline phosphatase activity ซึ่งเป็น bone formation marker ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Yamaguchi and Gao, 1998) และเมื่อทำการย้อม osteoclast ด้วย tartrate – resistant acid phosphatase ซึ่งเป็น bone resorption marker พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ genistein จะมีจำนวนของ osteoclast ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Gao and Yamaguchi., 1999) และจากการศึกษาในเซลล์กระดูกพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง osteoblast MC3T3-E1 ร่วมกับ genistein และ daidzein ที่ความเข้มข้น 10^{-6} -10^{-5} โมลาร์ สามารถเพิ่ม alkaline phosphatase activity และ เพิ่มปริมาณดีเอนเอในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Sugimoto and Yamaguchi, 2000) ในปี 2007 Zhang และคณะ พบว่าเมื่อเลี้ยง osteoblast ร่วมกับ puerarin ที่ความเข้มข้น 10 และ 25 ไมโครโมล/ลิตร มีผลเพิ่มจำนวนเซลล์ และเพิ่ม

alkaline phosphatase activity ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และจากการศึกษาของ Ishimi และคณะ ในปี ค.ศ. 2000 พบว่า การให้ genistein ขนาด 0.4 และ 0.7 mg ต่อวัน นาน 4 สัปดาห์ ในหนูขาวเพศเมียที่ถูกตัดรังไข่ พบว่า สามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกของกระดูกต้นขาได้

<u>กวาวเครือขาว</u>

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

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

2004) และต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีภายหลังจากการตัดต่อมบ่งเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมบ่งเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาวแสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูกของกระดูกส่วนรยางค์ (long bone) และกระดูกส่วนแกนกลาง (axial bone) ในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีความแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การเกิดโรคกระดูกพรุนได้ แต่อย่างไรก็ตามด้วยที่โรคกระดูกพรุนสามารถเกิดได้กับมนุษย์ทุกคน อย่างค่อยเป็นค่อยไป โดยไม่มีอาการแสดงให้เห็นจนกว่าจะเกิดสภาวะกระดูกหักแล้วผู้ป่วยถึงจะรู้ตัว และเข้ารับการรักษา ซึ่งการเกิดลักษณะดังกล่าวเป็นการเปลี่ยนแปลงที่ยากที่จะแก้ไข และนักวิจัยทั่วโลกกำลังมุ่งเน้นศึกษาวิจัยเพื่อให้ได้มาซึ่งยาที่ใช้ในการรักษาภาวะกระดูกพรุน และจากที่มีรายงานว่ากวาวเครือขาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดและการเจริญของมะเร็งเต้านมได้ด้วย (Cherdshewasart et al., 2004; 2007b) ซึ่งเป็นข้อดีที่เหนือกว่าการใช้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสมุนไพรกวาวเครือขาว ในการรักษา (therapeutics) ภาวะกระดูกพรุนภายหลังจากที่อาการดังกล่าวได้เกิดขึ้นแล้ว โดยการตัดต่อมบ่งเพศของหนูทั้งสองเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วัน เพื่อชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน แล้วจึงทดลองให้กวาวเครือขาว รวมไปถึงการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อกระดูก เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

วิธีการวิจัย

สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Sprague - Dawley อายุ 2 เดือน จำนวน 70 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล นำมาเลี้ยงไว้ที่เรือนเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิที่ 23 - 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 - 18.00 น.) และมืด 12 ชั่วโมง (18.00 - 06.00 น.) ได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูป (S. W. T. Co., Ltd, สมุทรปราการ ประเทศไทย) ตลอดเวลา จนกระทั่งหนูมีอายุครบห้าเดือนครึ่ง จึงเปลี่ยนมาให้อาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (soybean - free diet) CC.P. 082/SBF, Lot No. 080101, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) เพื่อกำจัดปัจจัยรบกวนจากสารไฟโตเอสโตรเจนที่พบมากในถั่วเหลือง (ตารางที่ 1 และ 2: Urasopon et al., 2008b) เมื่อหนูมีอายุครบ 6 เดือน เก็บเลือดจากหัวใจ กำหนดให้วันนี้เป็น D_0 ของการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณไอโซฟลาโวนในอาหารสำเร็จรูปมาตรฐานและอาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (Usasopon et al., 2008b).

Sample	Isoflavones (mg/ 100 g sample)				
	Daidzin	Daidzein	Genistin	Genistein	Total
Rodent diet (C.P. 082)					
Lot no. 2	20.7±0.6	10.2±3.4	38.6±2.6	1.4±0.7	70.9±3.0
Lot no. 10	12.2± 0.2	4.5±0.6	20.7±0.9	1.2±0.3	38.6±2.9
Lot no. 18	26.2±0.9	9.1±1.0	36.2±1.1	0.9±0.6	72.4±3.7
Lot no. 21	13.7±0.8	5.4±0.3	22.7±0.8	0.8±0.5	42.5±0.8
Lot no. 24	18.8±1.8	10.0±0.2	28.8±3.5	0.4±0.1	58.0±5.6
Soybean-free diet (C.P. 082/SBF) Lot no. 050119	0.9±0.1	3.0±0.1	2.2±0.1	nd	6.1±0.2

nd = not detected

ตารางที่ 2 แสดงส่วนประกอบต่าง ๆ ในอาหารสำเร็จรูปมาตรฐานและอาหารสำเร็จรูปที่ไม่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ (Usasopon et al., 2008b)

Ingredients	Percentage of diet	
	Standard rodent diet	Soybean-free diet
Moisture	6.69	4.64
Protein	27.6	28.9
Fat (Ether extraction)	2.45	2.94
Fat (Acid hydrolysis)	8.36	10.8
Fiber	3.69	2.98
Ash	5.98	4.52
Calcium	1.17	0.91
Phosphorus	0.93	0.792
Sodium Chloride	0.51	0.44
Vitamin D	4,000 i.u. / kg feed	4,000 i.u. / kg feed

เพื่อควบคุมการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวหนูที่จะเกิดจากการตัดรังไข่ (Mcelroy and Wade, 1987) อาหารสำเร็จรูปที่ให้ในหนูที่ตัดรังไข่จะปรับตามหนูกลุ่ม sham-control โดยก่ารทดลองในสัตว์ทดลองครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาและอนุมัติการใช้สัตว์ทดลองจากคณะกรรมการ

ควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Protocol Review No. 0823003)

ขั้นตอนการทดลอง

นำหนูแรทเพศเมีย อายุ 6 เดือน จำนวน 70 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

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

2. กลุ่ม Ovariectomy (OVX) คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเปิดหน้าท้อง และนำรังไข่ออกทั้งสองข้าง จำนวน 55 ตัว

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

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

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

ป้อนสารในช่วงเวลา 08.00 - 10.00 น. ชั่งน้ำหนักหนูตัวสัปดาห์ละครั้ง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และใช้ค่านำหนักตัวที่ได้ในแต่ละสัปดาห์มาปรับปริมาณการให้กวาวเครือขาว และปริมาณ17 α - ethinylestradiol เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (D_{120}, D_{150} และ D_{180}) เมื่อครบ 90 วัน ทำการุณยฆาตหนูด้วยสารระเหยอีเธอร์ และเก็บกระดูกส่วน right tibia, right femur และ 4^{th} lumbar vertebra เพื่อนำไปวัดมวลกระดูก และความหนาแน่นของกระดูก

และเก็บกระดูก left tibia ใน 10 % phosphate buffer formalin เพื่อนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histology)

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง

การเตรียมสารละลายกวาวเครือขาว

กาวเครือขาวที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นกวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai III โดยนำส่วนหัวของกวาวเครือขาวมาล้างให้สะอาด และหั่นเป็นชิ้นบางๆ และนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาบดเป็นผง และกรองให้ได้ขนาด 100 Mesh เก็บผงกวาวเครือขาวที่ได้ในที่แห้ง และไม่มีแสงแดด นำผงกวาวเครือขาวมาผสมน้ำกลั่น และป้อนหนูด้วย gavage feeding needle ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน ป้อนในปริมาตรครั้งละ 1 มิลลิลิตร สารแขวนลอยกวาวเครือขาวจะเตรียมใหม่ทุกๆ สัปดาห์ ปริมาณสารไฟโตเอสโตรเจนในกวาวเครือขาวสายพันธุ์ Wichai III จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC มีค่าอยู่ระหว่าง 123 - 157 มิลลิกรัม/100 กรัม กวาวเครือขาว (Urasopon et al., 2008b) และได้ทดสอบฤทธิ์เชิงเอสโตรจินิก (estrogenic activity) ด้วยวิธี vaginal cytology assay แล้ว (Malaivijitnond et al., 2006; Cherdshewasart et al., 2007a; Urasopon et al., 2008b).

การเตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวและการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจนโดยวิธี HPLC

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

1. นำผงกวาวเครือขาวปริมาณ 50 กรัม ผสมกับ 95% เอทธานอล ปริมาตร 150 มิลลิลตร นำไปบ่มใน incubator shaker ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. นำสารสกัดเอทธานอลที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (Whatman No.4) และเก็บสารละลายที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
3. นำตะกอนที่เหลือจากการสกัดครั้งแรกไปผสมกับ 95% เอทธานอล ปริมาตร 100 มิลลิลตร และทำซ้ำขั้นตอนที่ 1 และ2
4. นำสารสกัดที่ได้จากการสกัดครั้งแรกและครั้งที่สองมาผสมรวมกัน นำไปทำให้แห้งภายใต้แรงดันสูญญากาศ ด้วยเครื่อง rotary evaporator

5. นำสารสกัดที่ได้จากข้อ 4 ไปทำให้แห้งสนิท โดยนำไปบ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บสารสกัดที่ได้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อไปด้วยเครื่อง HPLC

การวิเคราะห์สารประกอบไฟโตเอสโตรเจนประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

1. นำสารสกัดจากขั้นตอนข้างต้นมา 3 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอทธานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 4.5 มิลลิตร และทำให้เจือจางโดยเติมสารละลาย A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) ปริมาตร 1.5 มิลลิตร
2. ฉีดสารละลายที่เตรียมได้ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ของ HPLC ขนาด 250 x 4.6 มิลลิเมตร (ODS, Japan) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยระบบของ HPLC ประกอบไปด้วย Water 1525 binary HPLC pump, Waters 717 plus auto-sampler, and Water 2487 UV absorbance Dual λ detector (Waters, Milford, USA)
3. ตัวพา (mobile phase) ที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของสารในคอลัมน์ ประกอบด้วย solution A (100: 0.1% v/v of deionized water : phosphoric acid) และ solution B (100:0.1 of acetonitrile : phosphoric acid) โดยมีอัตราการไหลของสารที่ความเร็ว 1 มิลลิตร/นาที และตรวจวัดสารที่แยกได้ที่ค่าความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร
4. ทำการวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวนแต่ละชนิดที่พบในกวาวเครือขาว โดยเปรียบเทียบกับ retention time และปริมาณพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสารไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิด คือ puerarin (>99 purity, LKT Laboratories, Inc., MN, USA), daidzin (>95 purity), genistin (>95 purity), daidzein (>98 purity, Sigma-Aldrich, MO, USA) และ genistein (>99% purity, LC Laboratories, MA, USA)

<u>การเตรียมสารละลาย 17 α – ethinylestradiol</u>

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

<u>เก็บตัวอย่างเลือด</u>

เก็บตัวอย่างเลือดหนูตั้งแต่ก่อนที่จะทำการผ่าตัดหนู (D_0) ภายหลังการผ่าตัดนาน 90 วัน และระหว่างให้สารต่างๆ นาน 90 วัน รวมทั้งสิ้น 180 วัน ด้วยความถี่ทุกๆ 30 วัน คือ D_{30}, D_{60} D_{90} D_{120}, D_{150} และ D_{180} ซึ่งระยะเวลาดังกล่าว เป็นระยะเวลาที่เหมาะสมในการบันทึกการเปลี่ยนแปลงของสารชีวโมเลกุล ของกระบวนการซ่อมสร้างและสลายกระดูก (biochemical markers of bone remodeling) (Delmas 2000; Alatalo et al., 2003) โดยใช้เข็มเบอร์ 26 G × 1/2" เจาะผ่านหัวใจห้องล่างขวา (cardiac puncture) หลังจากที่สลบสัตว์ทดลองด้วยอีเธอร์

จากนั้นจะนำเลือดไปปั่นที่ความเร็ว 2,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที เก็บซีรั่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำซีรั่มที่ได้ไปตรวจวัดระดับของ alkaline phosphatase และ tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) ด้วยวิธี Enzyme Immunoassay (EIA)

การตรวจวัดระดับของ alkaline phosphatase (ALP) ในซีรั่ม

ระดับของ ALP ในซีรั่ม เป็นดัชนีบ่งชี้การเกิดกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) โดยส่งตัวอย่างซีรั่มไปตรวจวัดระดับ ALP ที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ซึ่งตรวจวัดโดยวิธี enzyme-linked immunoassay (EIA) %coefficient variations (%CVs) ของค่า intra และ inter-assay ในการตรวจวัดเท่ากับ 2.8% และ 6.3% ตามลำดับ

การตรวจวัดระดับของ tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b) ในซีรั่ม

TRAP-5b ถูกสังเคราะห์โดย osteoclast และหลั่งออกมาสู่กระแสเลือด ดังนั้นระดับของ TRAP 5b ในซีรั่ม จึงใช้เป็นดัชนีบ่งชี้กระบวนการสลายกระดูก (bone resorption) ในการทดลองครั้งนี้ตรวจวัด rat TRAP 5b ด้วยวิธี EIA โดยใช้ RatTRAP ^{TM} Assay Kit (IDS Ltd. UK; Lot No. 6482, UK) ที่จำเพาะกับ 5b isoform ของ TRAP ในซีรั่ม โดย monoclonal antibody จะไม่จับกับ TRAP 5a ซึ่งไม่จำเพาะกับการสลายกระดูกของ osteobclast %coefficient variations (%CVs) ของค่า intra และ inter-assay ในการตรวจวัดเท่ากับ 3.64% และ 4.18% ตามลำดับ

การวัดความหนาแน่นกระดูก

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

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

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

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

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

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

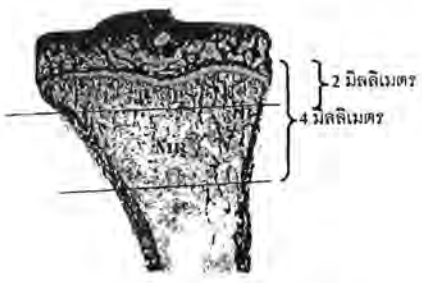
นำสไลด์กระดูกที่ได้มาถ่ายภาพ และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Digital Image Processing Software Image Pro (Plus Software Media Cybernatics, Inc., USA) โดยทำการศึกษา trabecular bone area ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ห่างจาก epiphyseal plate ลงมา 2 และ 4 มิลลิเมตร (Cui et al., 2004) ดังรูปที่ 4 โดยจะวัดทั้งสิ้น 4 windows ต่อสไลด์ และวัด 5 สไลด์ ต่อกระดูกหนึ่งชิ้น รวมค่าที่ได้ทั้งหมดเท่ากับ 20 ค่า/กระดูก 1 ชิ้น/หนู 1 ตัว หรือเท่ากับ 200 ค่า/กลุ่ม

ค่าที่แสดงคือ %trabecular bone area (%BA) คำนวณจากสูตร

$$\text{\% Trabecular bone area (\%BA) (ในแต่ละ section)} = \frac{\text{(Sum of trabecular bone area} \times 100)}{\text{Sum of the bone area}}$$

%BAเฉลี่ยจาก 5สไลด์ คำนวณจาก

$$\text{\%BA of each rat} = (\%BA_1+\%BA_2+\%BA_3+\%BA_4+\%BA_5)/5$$



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งที่ทำการวัดพื้นที่กระดูก (Trabecular bone area)

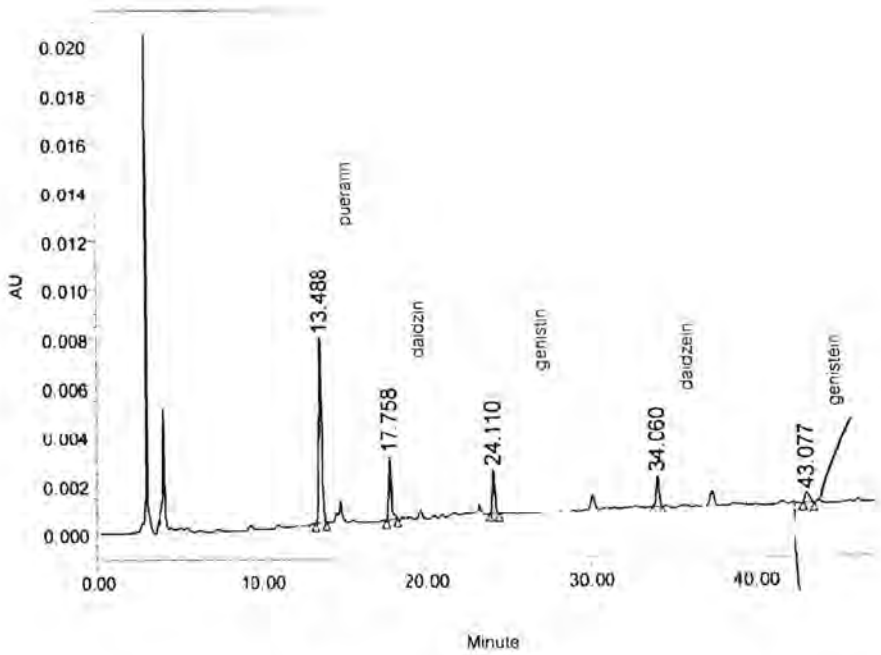
วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

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

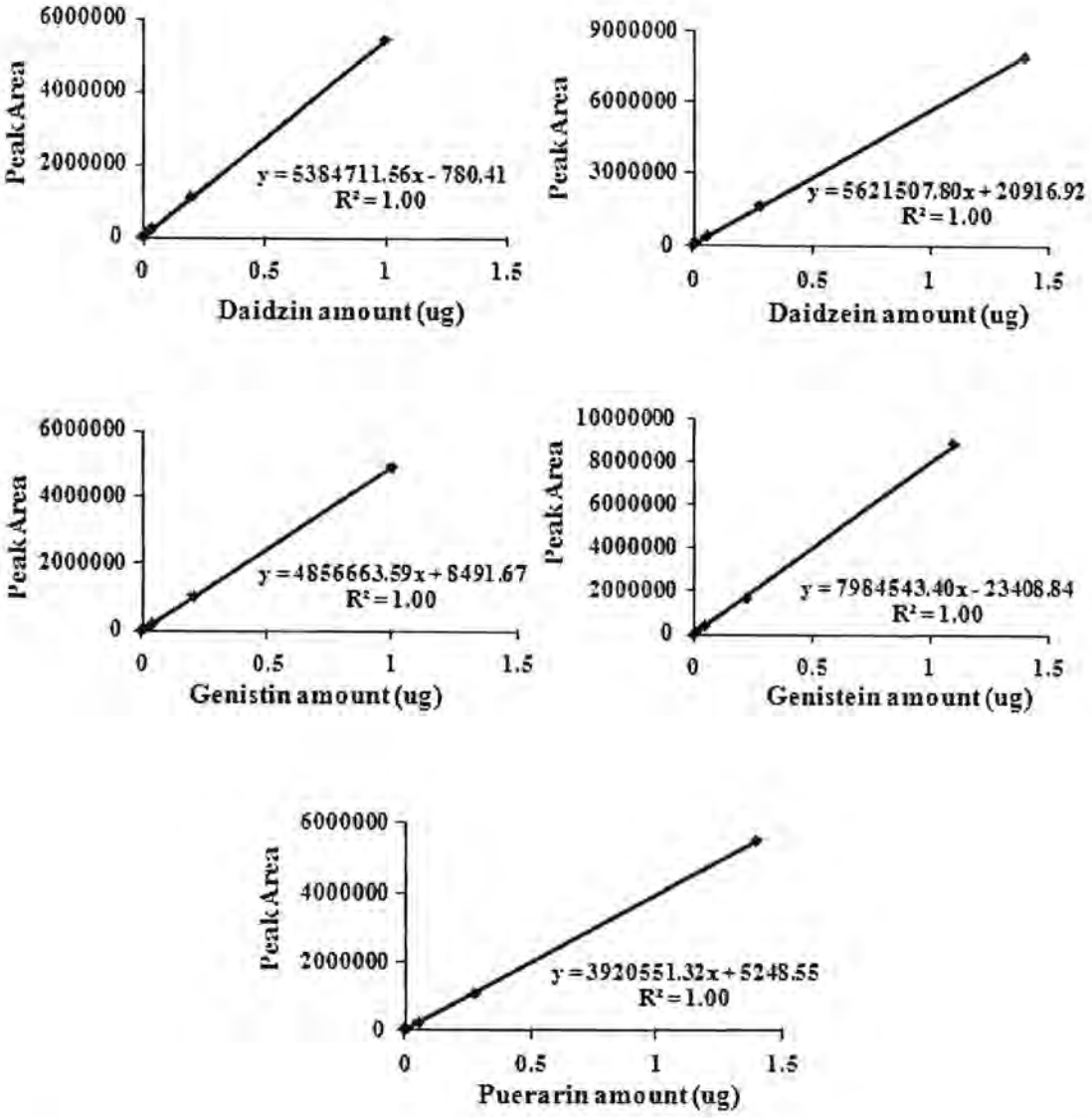
ผลการวิจัย

ผลการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวโดยวิธี HPLC

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



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



<u>รูปที่ 6</u> แสดงค่าไอโซฟลาโวนมาตรฐาน 5 ชนิดคือ puerarin, daidzin, genistin, daidzein และ genistein และค่าพื้นที่ใต้กราฟ (peak area)

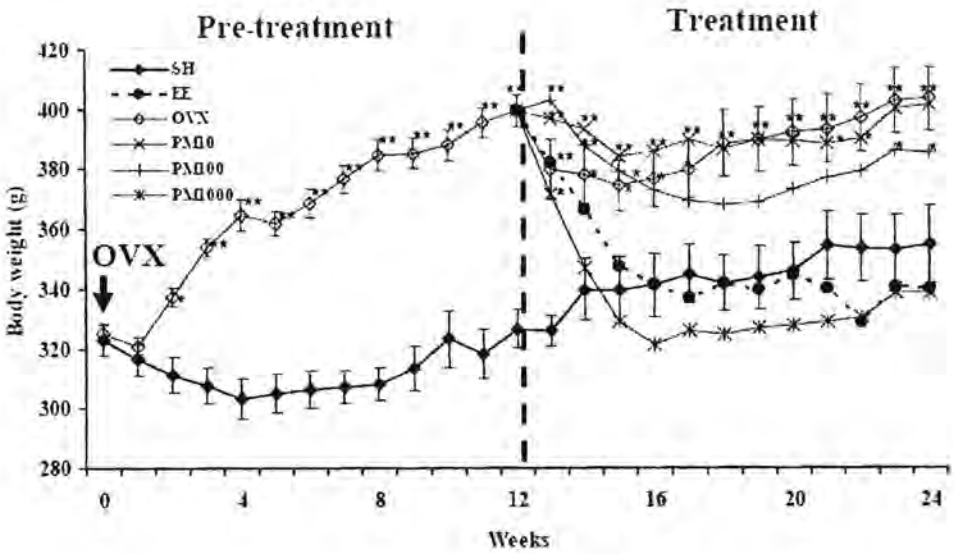
<u>ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อน้ำหนักตัวหนู</u>

จากการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวหนูทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อเริ่มการทดลองในวันที่ D_0 ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$; รูปที่ 7) แต่ภายหลังจากการตัดรังไข่ในหนูกลุ่ม OVX พบว่าน้ำหนักตัวหนูเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) เริ่มตั้งแต่วันที่ 14 (D_{14}) ของการทดลอง โดยค่าน้ำหนักตัวหนูในวันที่ 90 (D_{90}) มีค่าสูงกว่าวันที่ D_0 ประมาณ 1.25 เท่า (325.26 $\pm$ 3.19 กรัม และ 395.35 $\pm$ 5.27 กรัม ในวันที่ 0 และ 90 ตามลำดับ) แต่ในทางกลับกันพบว่าน้ำหนักตัวหนูในกลุ่ม SH มีค่าลดลงเล็กน้อยในช่วง 60

แรกของการทดลอง จากนั้นค่าจึงกลับคืนสู่สภาวะปกติในวันที่ 90 (D_{90}) ของการทดลอง ดังนั้น เมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม OVX และ กลุ่ม SH จึงมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ <0.01) ตั้งแต่ในวันที่ 14 ของการทดลอง

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

แม้ว่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม SH มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในช่วงสุดท้ายของการทดลอง แต่ก็ยังคงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับวันที่ 0 (D_0)

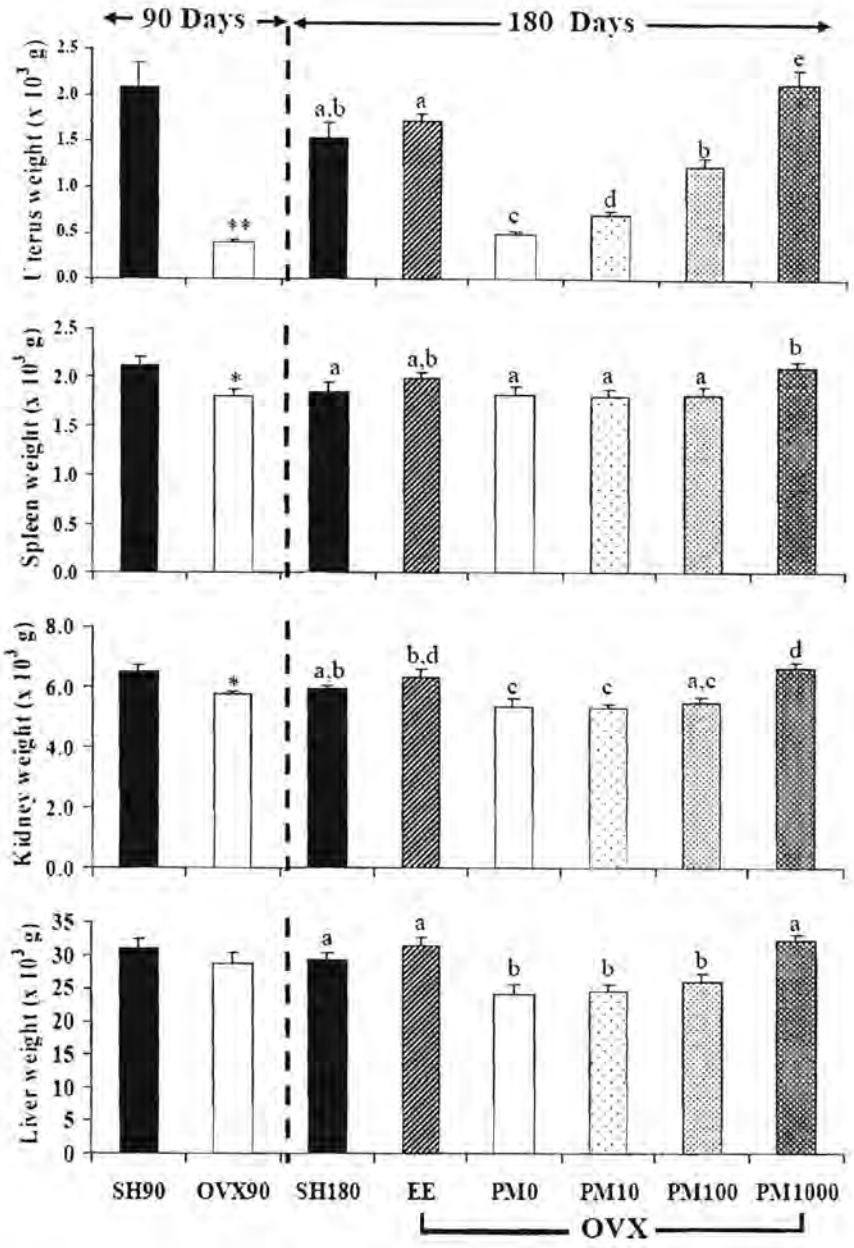


รูปที่ 7 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนัวตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนัวตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ OVX เท่านั้น * และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH

ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์

เนื่องจากน้ำหนักตัวของหนูแต่ละกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละช่วงเวลา ดังนั้นน้ำหนักอวัยวะจึงคำนวณเป็นน้ำหนักอวัยวะสัมพัทธ์ (น้ำหนักอวัยวะ/น้ำหนักตัว) เพื่อที่จะสามารถนำมาเปรียบกันได้ระหว่างกลุ่มต่าง ๆ

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



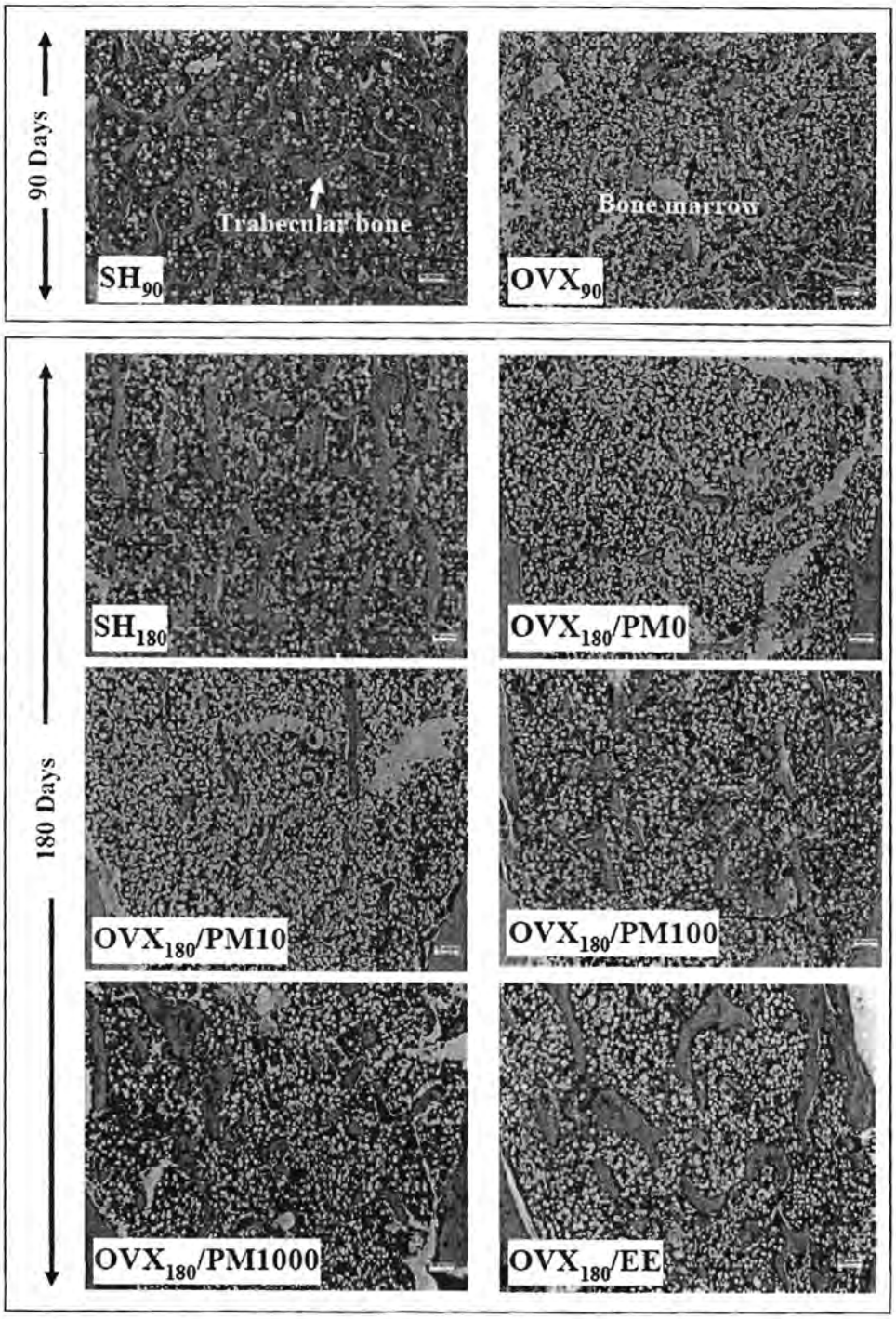
รูปที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยน้ำหนักสัมพัทธ์ของมดลูก, ม้าม. ไต และตับในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน หลังจากถูกตัดรังไข่ * และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

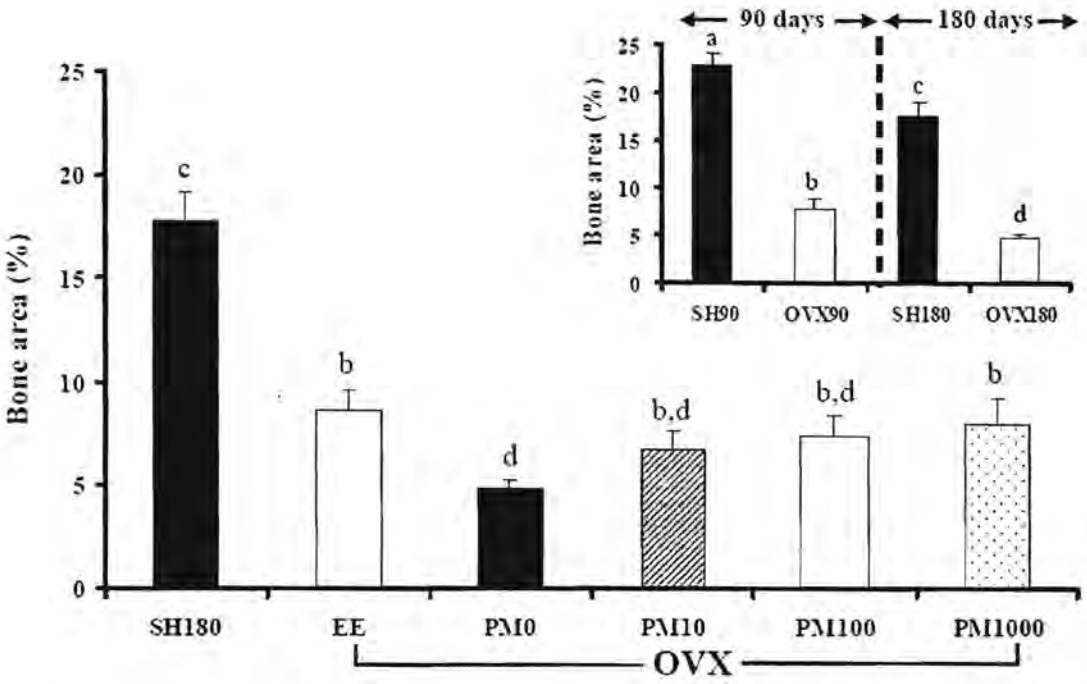
ภายหลังการตัดรังไข่นาน 90 วัน (OVX_{90}) trabecular bone area ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH_{90} ในขณะที่ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น (รูปที่ 9) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูแรทเพศเมียเกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง และเมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดรังไข่ไว้นานถึง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

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

เมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่า %BA ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น นั่นคือ %BA ในหนูกลุ่ม OVX_{90} เท่ากับ 7.88± 0.99 และในหนูกลุ่ม PM0, PM10, PM100 และ PM1000 มีค่าเท่ากับ 4.83 ± 0.42, 6.73 ± 0.92, 7.45 ± 0.93 และ 8.01 ± 1.27 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 10 และค่า %BA ของหนูกลุ่ม PM1000 มีค่าใกล้เคียงกับหนูกลุ่ม EE (%BA = 8.67 ± 0.96) นอกจากนี้พบว่าค่า %BA ของหนูกลุ่ม PM1000 และ EE มีค่าสูงกว่าหนูกลุ่ม PM0 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เท่ากับ 65.8% และ 79.5% ตามลำดับ และสูงกว่ากลุ่ม OVX_{90} เล็กน้อย ($P>0.05$) เท่ากับ 1.64% และ 10.9% ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่าการได้รับกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน และฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (17 α - ethinylestradiol) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน ในหนูแรทเพศเมียสามารถทำให้กระดูกหนาตัวกลับคืนมาได้ แต่อย่างไรก็ตามค่า %BA ในหนูกลุ่ม PM1000 และ EE ยังคงต่ำกว่าของหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-54.77% และ -51.04% ตามลำดับ, $p<0.01$)



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



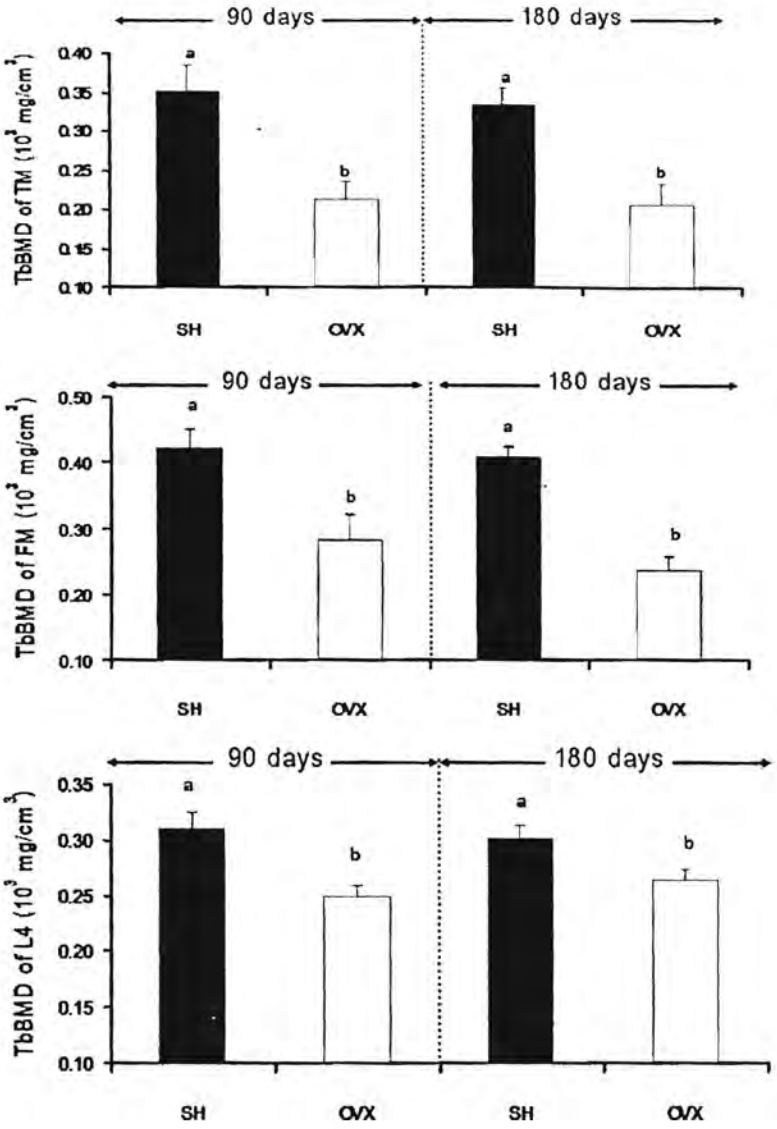
รูปที่ 10. แสดงค่าเฉลี่ย %trabecular bone area ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน (กราฟเล็กมุมบนขวา) และภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม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

ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อความหนาแน่นกระดูก (Bone mineral density; BMD

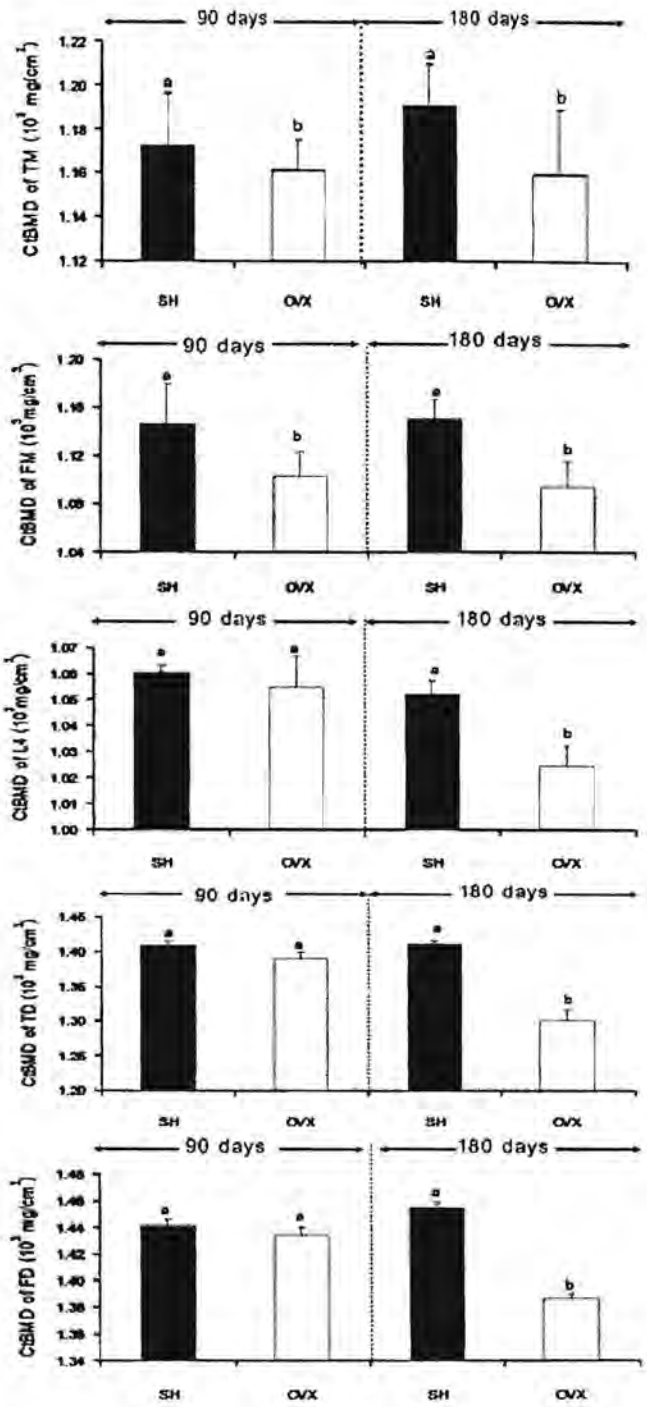
ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral density of trabecular and cortical bone) ภายหลังการตัดรังไข่

เปรียบเทียบผลของการตัดรังไข่ต่อค่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (TbBMD) ระหว่างหนูกลุ่ม SH และหนูที่ตัดรังไข่ นาน 90 และ 180 วัน พบว่าภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ tibial metaphysis (TM), femur metaphysis (FM) และ 4th lumbar vertebra (L4) มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) เท่ากับ 36.86%, 35.20% และ 19.55% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม SH_{90} (รูปที่ 11) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้หนูเกิดสภาวะกระดูกพรุนได้จริง แต่เมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดรังไข่ไว้นานถึง 180 วัน ($PM0/OVX_{180}$) พบว่าภาวะกระดูกพรุนลดลงไปจากหนูกลุ่ม OVX_{90} เพียงเล็กน้อยเท่านั้น เท่ากับ 38.24%, 42.24% และ 12.58% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{180} เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ TbBMD กับอายุ จากหนูอายุ 9 เดือน (SH_{90}) เป็น 12 เดือน (SH_{180}) พบว่าค่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ TM, FM และ L4 มีแนวโน้มลดลง เท่ากับ 4.78%, 3.45% และ 2.75% แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)

ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (CtBMD) ทั้ง 3 ส่วน คือ tibial diaphysis (TD), femur diaphysis (FD) และ 4th lumbar vertebra (L4) ของหนูกลุ่ม OVX_{90}ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (รูปที่ 12) เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{90} ยกเว้นกระดูกส่วน tibial metaphysis (TM) และ femur metaphysic (FM) ที่ลดลง 2.96% และ 3.82% ตามลำดับ ($p<0.05$) แต่เมื่อทิ้งหนูไว้ภายหลังจากตัดรังไข่นานถึง 180 วัน ($PM0/OVX_{180}$) พบว่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น 5 ส่วน คือ TM, FM, L4, TD และ FD ของหนูกลุ่ม $PM0/OVX_{180}$ ลดต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} เท่ากับ 5.67%, 4.96%, 2.60%, 2.64% และ 4.69% ตามลำดับ ($p<0.001$) ซึ่งแสดงว่าการชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนในกระดูกเนื้อแน่นจะใช้เวลานานกว่าในกระดูกเนื้อโปร่ง เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ CtBMD กับอายุ จากหนูอายุ 9 เดือน (SH_{90}) เป็น 12 เดือน (SH_{180}) พบว่าค่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่นส่วน TM เพิ่มขึ้น 5.07% และส่วน FD เพิ่มขึ้น 2.03% แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$)



<u>รูปที่ 11</u> แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

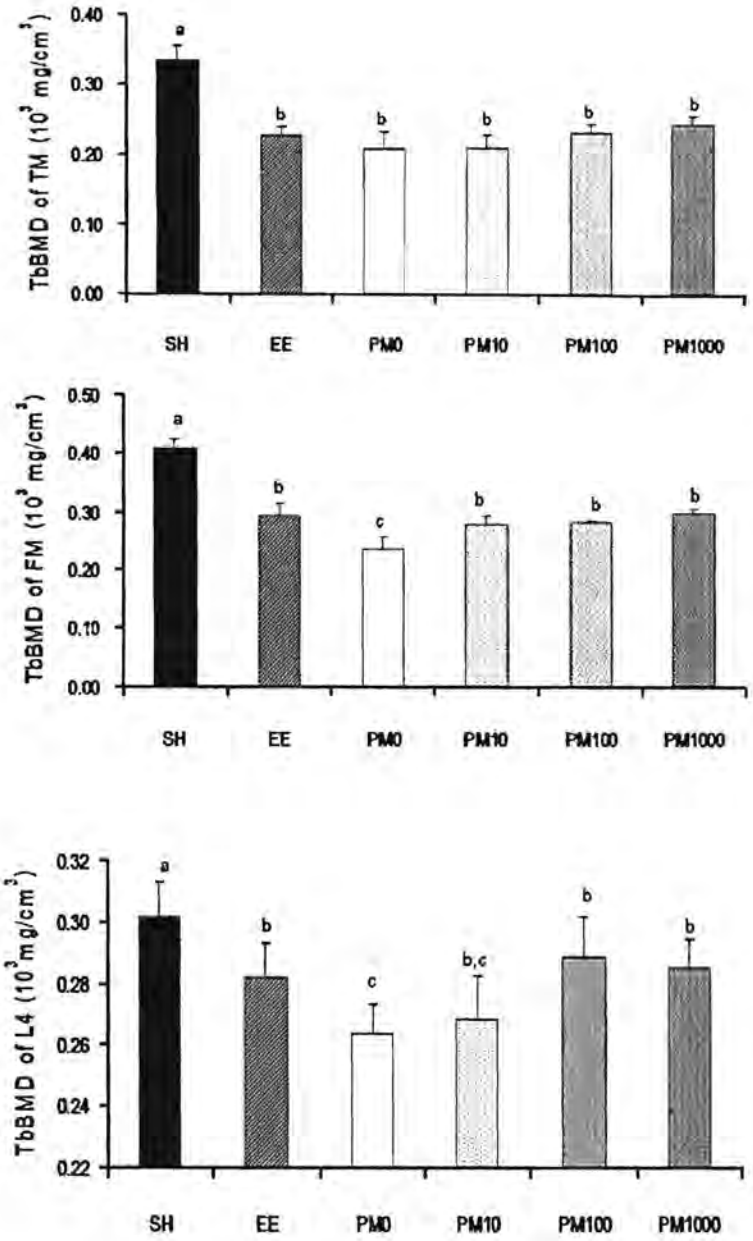


รูปที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

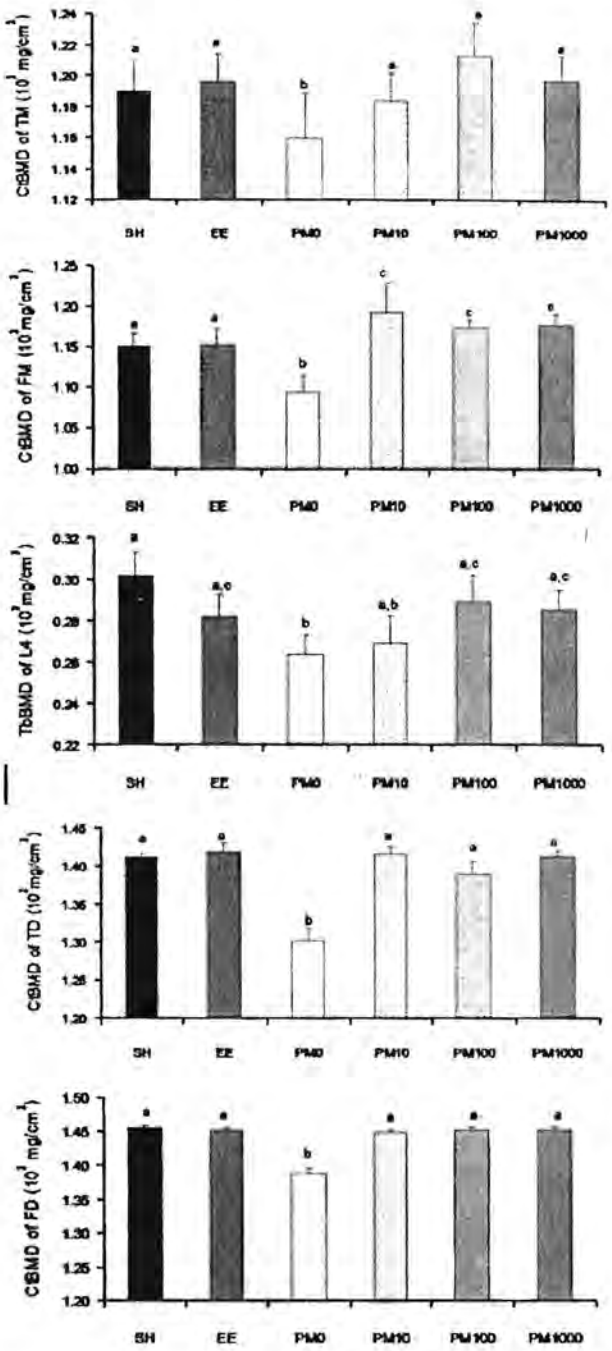
ความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral density of trabecular and cortical bone) ภายหลังได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาว

เมื่อพิจารณาความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (TbBMD) ภายหลังจากให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน (รูปที่ 13) พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดที่สูงขึ้น ที่ขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM1000) มีค่าสูงกว่าของหนูกลุ่ม OVX_{90} นั่นคือค่าความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ tibial metaphysis, femur metaphysis และ 4^{th} lumbar vertebra ในหนูกลุ่ม OVX_{90} เท่ากับ 0.212±0.023, 0.282±0.038 และ 0.249±0.010 x 10^3 mg/cm^3 และของหนูกลุ่ม PM1000 เท่ากับ 0.239±0.012, 0.299±0.007 และ 0.285±0.008 x 10^3 mg/cm^3 (หรือค่าความหนาแน่นกระดูกในกลุ่ม PM มีค่าสูงกว่ากลุ่ม OVX เท่ากับ 12.76, 6.02 และ 14.45% ตามลำดับ) ซึ่งค่าที่ได้ของกลุ่ม PM1000 ใกล้เคียงกับของหนูกลุ่ม EE มีค่าเท่ากับ 0.233±0.011, 0.296±0.015 และ 0.282±0.009 x 10^3 mg/cm^3 ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามค่าความหนาแน่นกระดูกของหนูกลุ่ม PM1000 และ EE ยังคงต่ำกว่าของหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่มีค่าความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโปร่งทั้ง 3 ส่วน คือ tibial metaphysis, femur metaphysis และ 4^{th} lumbar vertebra เท่ากับ 0.346±0.022, 0.412±0.014 และ 0.301±0.010 x 10^3 mg/cm^3 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (CtBMD) ภายหลังจากให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน (รูปที่ 14) พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นกระดูกได้ โดยสามารถป้องกันได้แม้แต่เมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดต่ำเพียง 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM10) เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าค่า CtBMD ที่เพิ่มขึ้นไม่สัมพันธ์กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ ยกเว้นที่กระดูก 4^{th} lumbar vertebra และค่า CtBMD ของกระดูก FM ในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวทุกกลุ่มมีค่าสูงกว่ากลุ่ม SH_{180} และ EE



<u>รูปที่ 13</u> แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



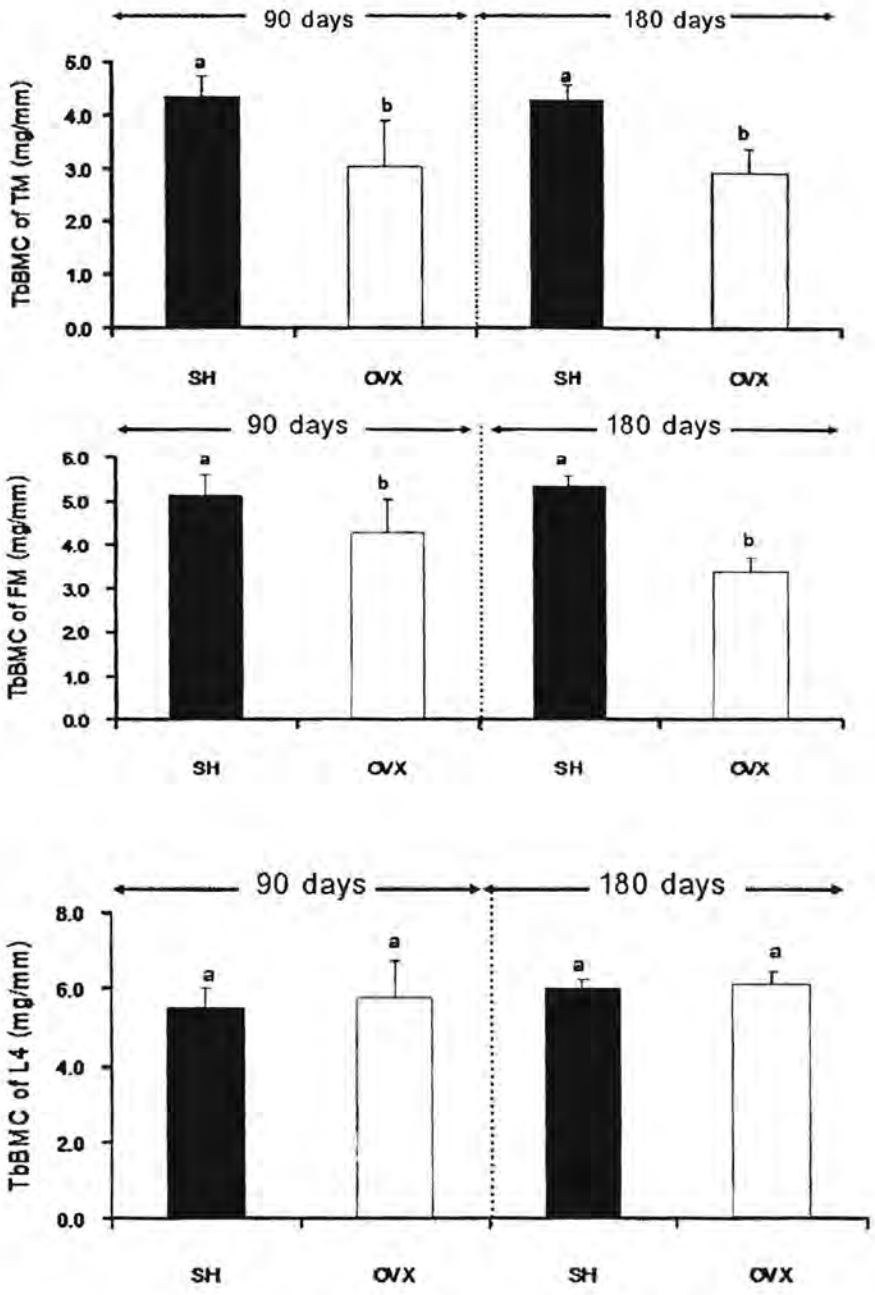
รูปที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อมวลกระดูก (Bone mineral content; BMC)

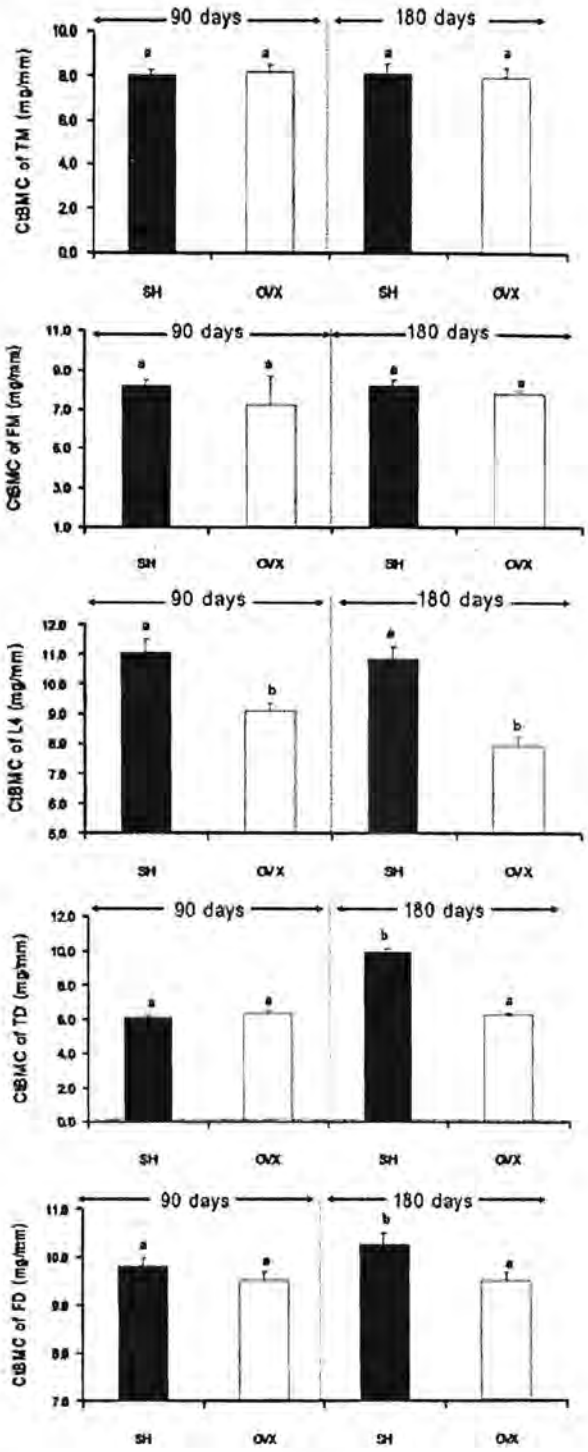
มวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral content of trabecular and cortical bone) ภายหลังการตัดรังไข่

เปรียบเทียบผลของการตัดรังไข่ต่อค่ามวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (TbBMC) ระหว่างหนูกลุ่ม SH และหนูที่ตัดรังไข่ นาน 90 และ 180 วัน พบว่าภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน ค่า TbBMC ของ tibial metaphysis (TM) และ femur metaphysis (FM) มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 29.56% และ 16.96% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH_{90} แต่ค่า TbBMC ของ 4th lumbar vertebra (L4) ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 15) จากลักษณะดังกล่าวเป็นการยืนยันได้ว่าการตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน แต่เมื่อทิ้งหนูภายหลังจากตัดรังไข่ไว้นานถึง 180 วัน ($PM0/OVX_{180}$) พบว่าค่า TbBMC ของกระดูก TM และ FM ลดลงถึง 31.69% และ 36.71% ตามลำดับ ($p<0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{180} เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ TbBMC กับอายุ จากหนูอายุ 9 เดือน (SH_{90}) เป็น 12 เดือน (SH_{180}) พบว่าค่า TbBMC ของกระดูกทั้ง 3 ส่วน คือ TM, FM และ L4 ไม่เปลี่ยนแปลง ($p>0.05$)

ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน พบว่าเฉพาะค่ามวลกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (CtBMC) ส่วน L4 เท่านั้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 17.88% เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม SH_{90} (รูปที่ 16) แต่เมื่อทิ้งหนูไว้ภายหลังจากตัดรังไข่นานถึง 180 วัน ($PM0/OVX_{180}$) พบว่า CtBMC ส่วน L4, TD และ FD ของหนูกลุ่ม $PM0/OVX_{180}$ ลดต่ำกว่าหนูกลุ่ม SH_{180} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เท่ากับ 27.07%, 36.86% และ 7.30% ตามลำดับ ($p<0.001$) และการตัดรังไข่นาน 90 และ 180 วัน ไม่มีผลต่อ CtBMC ของ TM และ FM ($p>0.05$) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของ CtBMC กับอายุ จากหนูอายุ 9 เดือน (SH_{90}) เป็น 12 เดือน (SH_{180}) พบว่าค่า CtBMC ส่วน TD และ FD เพิ่มขึ้น 38.66% และ 4.50% ตามลำดับ ($p<0.01$)



<u>รูปที่ 15</u> แสดงค่าเฉลี่ยมวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

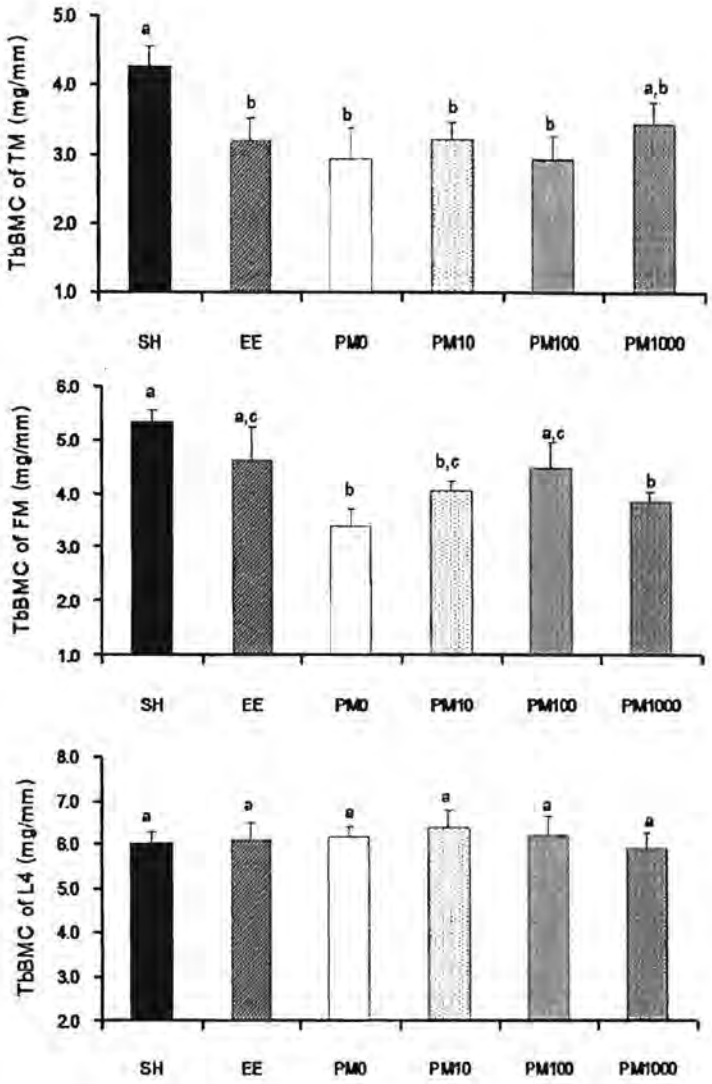


<u>รูปที่ 16</u> แสดงค่าเฉลี่ยมวลกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) นาน 90 และ 180 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

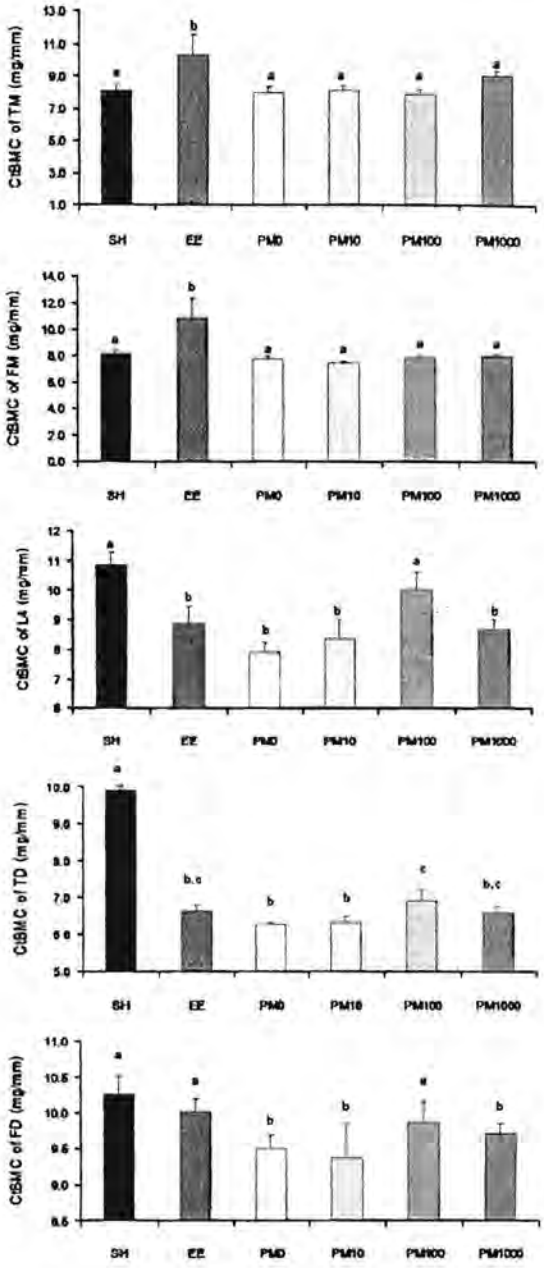
มวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น (Bone mineral content of trabecular and cortical bone) ภายหลังได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาว

เมื่อพิจารณามวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (TbBMC) ภายหลังจากให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน (รูปที่ 17) พบว่ากวาวเครือขาวในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM100) และ EE ป้องกันการลดลงของ TbBMC ที่กระดูก FM ได้เท่ากับ 32.84% และ 36.05% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม PM0 และไม่พบการเปลี่ยนแปลงที่กระดูกส่วนอื่น ๆ และเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาดอื่น ๆ

เมื่อพิจารณามวลกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (CtBMC) ภายหลังจากให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 90 วัน (รูปที่ 18) พบว่ากวาวเครือขาวในขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM100) สามารถป้องกันการลดลงของค่า CtBMC ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่กระดูก L4, TD และ FD เท่ากับ 26.44%, 10.62% และ 3.80% เมื่อเปรียบเทียบกับ PM0 ในขณะที่ EE สามารถป้องกันการลดลงของ CtBMC ของ TM, FM และ TD เท่ากับ 7.57%, 26.57% และ 3.27% ตามลำดับ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ CtBMC เมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 10 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM10 และ PM1000)



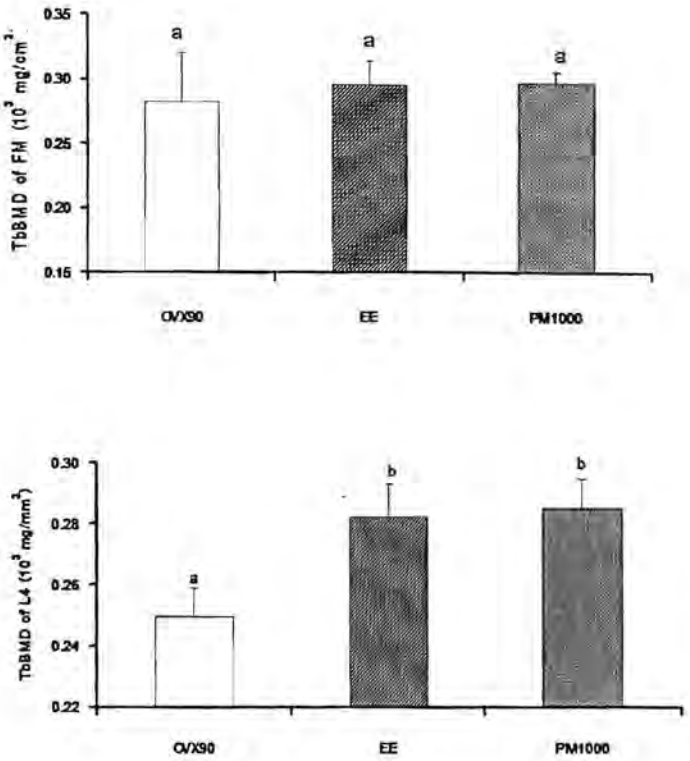
<u>รูปที่ 17</u> ค่าเฉลี่ยมวลกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่นาน 90 วัน และได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



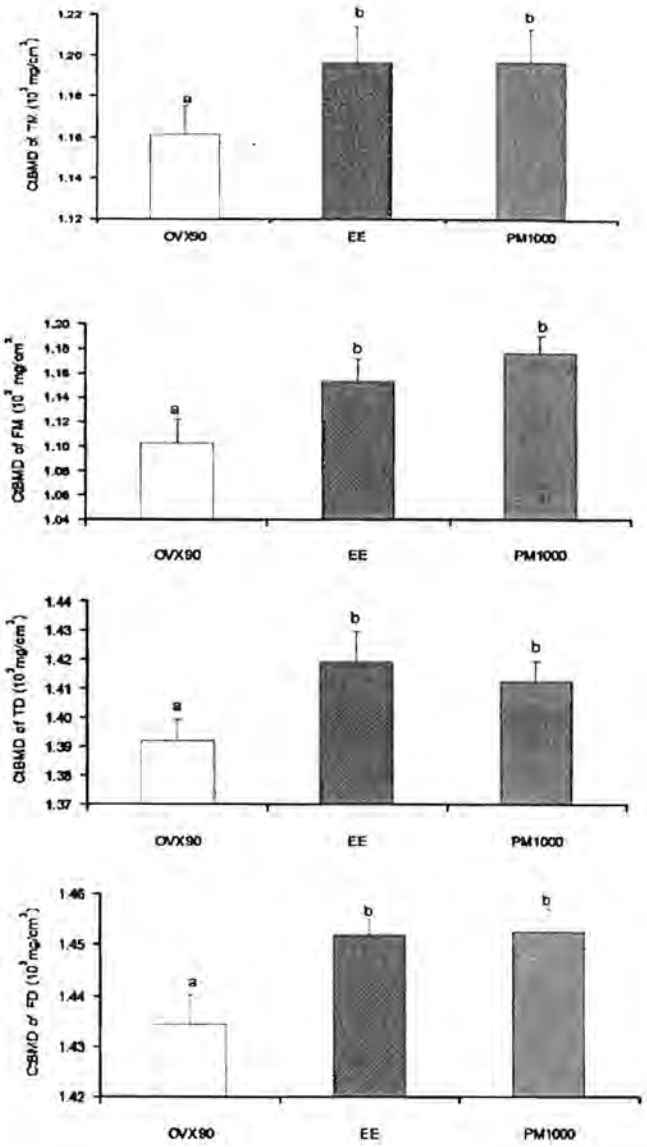
<u>รูปที่ 18</u> แสดงค่าเฉลี่ยมวลกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่นาน 90 วัน และได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลของเอสโตรเจนสังเคราะห์และกวาวเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุน

จากผลการทดลองในหัวข้อ 2.4 และ 2.5 พบการเกิดภาวะกระดูกพรุนในกระดูกเนื้อโปร่ง (Tb) ได้เร็วกว่าและมากกว่ากระดูกเนื้อแน่น (Ct) และการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นกระดูก (BMD) เห็นได้ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดู (BMC) ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของ TbBMD จึงน่าจะเป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการติดตามการรักษาภาวะกระดูกพรุนเมื่อให้เอสโตรเจนสังเคราะห์และกวาวเครือขาวในหนูแรทที่ตัดรังไข่ จากการเปรียบเทียบค่า TbBMD ระหว่างหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวกับกลุ่ม PM0 (OVX_{180}) พบการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดในกลุ่ม PM1000 ดังนั้นในการพิจารณาผลของกวาวเครือขาวต่อการรักษากระดูกพรุนจึงนำเฉพาะค่า TbBMDs ของกลุ่ม PM1000 และ EE เท่านั้น มาใช้เปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX_{90} (รูปที่ 19) พบว่าเฉพาะกระดูกส่วน FM และ L4 เท่านั้นที่เห็นการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นกระดูกเมื่อเทียบกับ OVX90 แต่การเพิ่มสูงขึ้นในกระดูกส่วน FM ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่ค่า TbBMD ของกระดูก L4 ในกลุ่ม PM1000 และ EE เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม OVX90 เท่ากับ 4.61% และ 5.043% ตามลำดับ



<u>รูปที่ 19</u> ผลของการให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM1000) และ esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุน โดยศึกษาความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง ส่วน distal femoral metaphysis (FM) และ 4th lumbar vertebra (L4) ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)



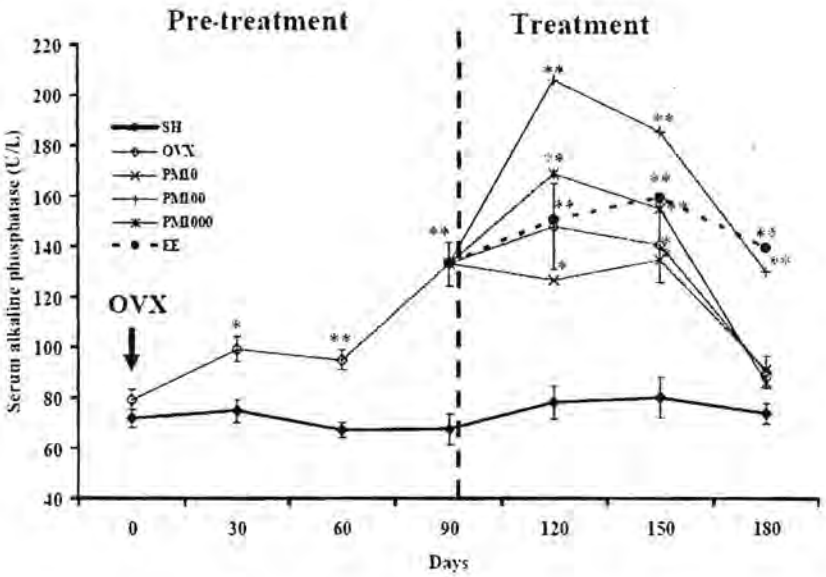
<u>รูปที่ 20</u> แสดงผลของการให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM1000) และ esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุน โดยศึกษาความหนาแน่นกระดูกของกระดูกเนื้อแน่น ส่วน TM, FM, TD และ FD ตัวอักษรบนแท่งกราฟแต่ละอันถ้าแตกต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

เมื่อศึกษาค่า CtBMD พบว่า PM1000 ทำให้ค่า CtBMD เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่กระดูกส่วน TM, FM, TD และ FD เท่ากับ 3.05%, 6.78%, 1.50% และ 13.46% ตามลำดับ (รูปที่ 20) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX_{90} และการให้ EE ทำให้ค่า CtBMD เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ที่กระดูกส่วน TM, FM, TD และ FD เท่ากับ 3.08%, 4.58%, 1.93% และ 11.11% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX_{90}

ผลของการตัดรังไข่และการให้กวาวเครือขาวต่อ bone marker ในซีรั่ม

ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม

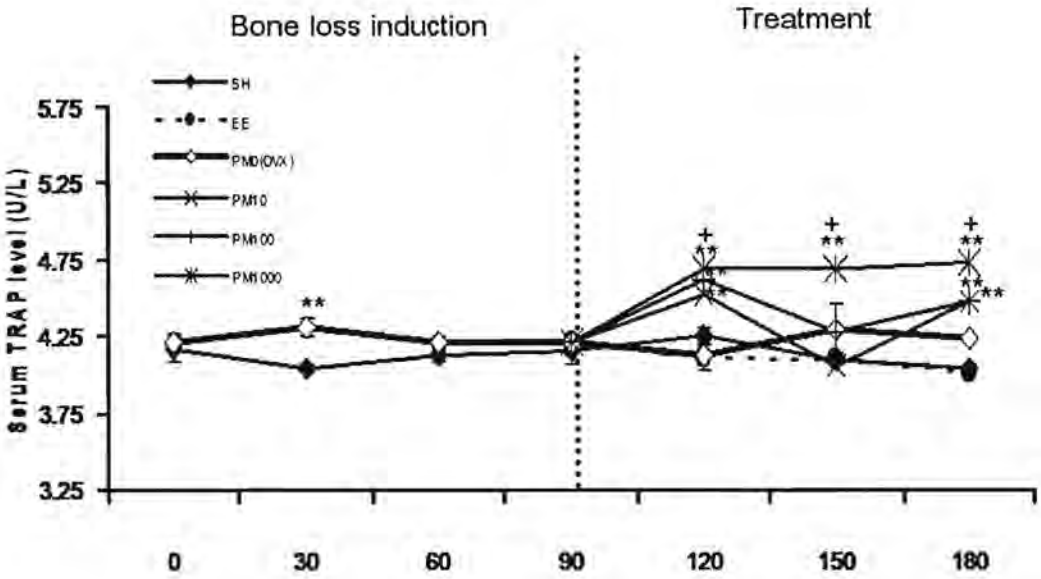
ภายหลังการตัดรังไข่นาน 90 และ 180 วัน (กลุ่ม OVX) พบว่าระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ 0.01) ในช่วง 90 วันแรก เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH (รูปที่ 21) และยังคงเพิ่มสูงขึ้นต่อไปอีกนาน 30 วัน ก่อนที่จะลดต่ำลงมาใกล้เคียงกับกลุ่ม SH ในช่วง 60 วันสุดท้ายของการทดลอง (D_{150} และ D_{180}) และเมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM0, PM10 และ PM1000) นาน 90 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม OVX พบว่าไม่มีผลต่อระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่ม โดยไม่ทำให้ค่าเพิ่มขึ้นหรือลดลงไปจากกลุ่ม OVX ยกวันกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/ วัน (PM100) ที่ระดับ alkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าสูงกว่ากลุ่ม OVX ตลอดระยะเวลาที่ได้รับสาร เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน EE ที่ระดับalkaline phosphatase ในซีรั่มมีค่าสูงอยู่ดลอดเวลา ไม่ต่างจากกลุ่ม OVX ในระหว่างวันที่ 120 และ 150 (D_{120} และ D_{150}) ซึ่งค่าที่สูงนี้ จะยังคงสูงอยู่จนกระทั่งวันที่ 180 (D_{180}) จึงทำให้ค่า alkaline phosphotose ของหนูกลุ่ม EE ใน D_{180} สูงกว่าของหนูกลุ่ม OVX และไม่กลับคืนสู่ระดับของหนูกลุ่ม SH ในขณะที่ระดับalkaline phosphatase ในซีรั่มของหนูกลุ่ม SH มีค่าคงที่ตลอดการทดลอง 180วัน



รูปที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ย alkaline phosphatase ในซีรั่ม ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน แสดงค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเฉพาะกลุ่ม SH และ OVX เท่านั้น * และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH

ระดับ tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP 5b)ในซีรั่ม

ในวันแรกของการทดลอง (D_0) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในระดับของ TRAP 5b ระหว่างหนูกลุ่ม SH และ OVX ($p>0.05$) แต่ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน (รูปที่ 22) ระดับ TRAP 5b ในหนูกลุ่ม OVX สูงกว่าหนูกลุ่ม SH ในวันที่ 30 (D_{30}) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อให้กวาวเครือขาวพบว่าในกลุ่ม PM1000 ระดับ TRAP 5b สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตลอดการทดลอง ในขณะที่กลุ่ม PM10 และ PM100 สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เฉพาะ D_{120} และ D_{180} เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SH ในขณะที่ระดับ TRAP 5b ในกลุ่ม PM0 คงที่ตลอดการทดลองและไม่แตกต่างจากกลุ่ม SH ($p>0.05$)



รูปที่ 22 แสดงค่าเฉลี่ย tartrate resistant acid phosphatase 5b ในซีรั่ม ในหนูกลุ่ม sham (SH) และหนูที่ได้รับการตัดรังไข่ (OVX) ภายหลังจากได้รับสาร esthinylestradiol (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน หรือได้รับสารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 0, 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM10, PM100 และ PM1000 ตามลำดับ) เป็นเวลานาน 90 วัน * และ ** = $p < 0.05$ และ 0.01 ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่ม SH

การอภิปรายผล

จากการทดลองที่มีมาในอดีตเกี่ยวกับฤทธิ์ในเชิงเอสโตรเจนิก (estrogenic activity) ของกวาวเครือขาวพบว่ามีการทดสอบฤทธิ์เอสโตรเจนิกแล้วทั้งในสัตว์ทดลอง (in vivo) และในหลอดทดลอง (in vitro) ในหลอดทดลองได้ศึกษาฤทธิ์เอสโตรเจนิกของกวาวเครือขาวโดยใช้ MFC-7 proliferation assay และ Hela cell proliferation assay (Cherdshewasart et al., 2004; 2008a) ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลอง คือการทดสอบการเจริญของเซลล์เยื่อบุช่องคลอด (vaginal cytology assay) และมดลูก (uterotripic assay) ในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ (Cherdshewasart et al., 2007; Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Urasopon et al., 2008b; Cherdshewasart et al., 2008b) การลดลงของระดับฮอร์โมน luteinizing hormone และ follicle stimulating hormone ในซีรั่มของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ (Malaivijitnon et al. 2004) และในลิงแสมเพศเมียโตเต็มวัยและลิงแสมวัยหมดประจำเดือน (Trisomboon et al., 2005; 2006) และเมื่อไม่นานมานี้ทางทีมวิจัยของเราก็ได้พบว่าฤทธิ์เชิงเอสโตรเจนิกของกวาวเครือขาวสามารถตรวจวัดได้จาการติดตามดูการลดลงของน้ำหนักตัวของหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ ทั้งนี้เนื่องจากการตัดรังไข่จะทำให้น้ำหนักตัวในหนูเพศเมียสูงขึ้น (Urasopon et al., 2008a; 2008b; Malaivijitnond et al., 2010) ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ก็สอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในอดีต นั่นคือ การตัดรังไข่ทำให้น้ำหนักตัวหนูเพิ่มขึ้น และการให้กวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลงตามขนาดที่ให้ ซึ่งผลที่ได้คล้ายกับในหนูที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (17□-ethinylestradiol ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน; EE) ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัวในหนูเพศเมีย เมื่อได้รับกวาวเครือขาวสัมพันธ์ (แปรผกผัน) กับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกภายหลังจากที่ได้รับกวาวเครือขาว (Malaivijitnond et al., 2004; 2006; Shirke et al., 2009) เมื่อติดตามดูผลของการตัดรังไข่ต่อน้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะที่เกี่ยวของกับกระบวนการเมตาบอลิสม คือ ตับ, ไต และม้าม พบว่ามีผลน้อยมาก และเมื่อให้กวาวเครือขาวหรือและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์ EE ก็ไม่มีผลกระทบกับอวัยวะเหล่านี้

สารไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวออกฤทธิ์ได้โดยเข้าจับกับ estrogen receptor (ERs) ทั้งสองชนิด คือ ERα และ ERβ แต่จะจับกับ ERβ และกระตุ้นการแสดงออกของยีน ได้ดีกว่าการจับกับ ERα (Kuiper et al., 1998; Onoe et al., 1997) สามารถพบ ERα ได้ในเนื้อเยื่อไม่กี่ชนิด ส่วนใหญ่จะพบที่ระบบสืบพันธุ์ ในขณะที่สามารถพบ ERβ ได้ในเนื้อเยื่อหลายชนิด รวมทั้งที่กระดูก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กระดูก lumbar vertebra และ trabecular bone (Onoe et al., 1997; Gustafsson, 1999) จากการค้นพบ estrogen receptor 2 ชนิด ในร่างกายคนเรา และแต่ละชนิดมีการแสดงออกในเนื้อเยื่อที่ต่างกัน ดังนั้นจึงมีงานวิจัยจำนวนมากที่ศึกษาถึงสารที่มีฤทธิ์เอสโตรเจนิกและออกฤทธิ์ได้ในเนื้อเยื่อที่จำเพาะ ที่เรียกว่า selective estrogen recetor, modulators (SERMs) โดยคาดหวังว่า SERMs จะออกฤทธิ์ต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายที่ต้องการและไม่มีผลข้างเคียงต่อเนื้อเยื่ออื่น ซึ่งจากรายงานในอดีตพบว่าสารไฟโตเอสโตรเจนจากกวาวเครือขาวก็มีฤทธิ์เป็น SERMs เช่นกัน โดยพบว่า

ไฟโตรเอสโตรเจนที่สามารถแสดงฤทธิ์ป้องกันสภาวะกระดูกพรุน ไม่มีผลกระตุ้นการเจริญของมดลูก เช่น เมื่อให้เจนิสเตอิน (genistein) ในขนาด 0.5 – 0.7 มิลลิกรัม/วัน แก่หนูไมซ์ที่ตัดรังไข่ สามารถป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูกเนื้อโปร่งได้โดยไม่มีผลต่อการเจริญของมดลูก (Fanti et al., 1998; Ishimi et al., 2000) หนูแรทที่ตัดรังไข่ที่กินอาหารถั่วเหลืองผสมกับสารไอโซฟลาโวน (isoflavone content) คือ เจนิสติน (genistin), เจนิสเตอิน (genistein), ดาอิดซิน (daidzin) และดาอิเซอิน (daidzein) ในขนาด 1,462.0, 25.1, 590.0 และ 11.3 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โปรตีนถั่วเหลือง พบว่าค่ามีผลไปเพิ่มความหนาแน่นกระดูกของ femoral bone แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักมดลูก (Arjmandi et al., 1998) และเมื่อให้ *Pueraria lobata* ซึ่งเป็นพืชตระกูลเดียวกับกวาวเครือขาวและมีสารไฟโตเอสโตรเจนเช่นเดียวกัน ให้แก่หนูไมซ์ที่ตัดรังไข่พบว่าสามารถไปบรรเทาภาวะกระดูกพรุนได้โดยไม่มีผลต่อการเจริญของมดลูก (Wang et al., 2003)

โรคกระดูกพรุนจัดว่าเป็นภัยเงียบ ที่ค่อย ๆ เกิด ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่จึงมักที่จะไม่รู้ตัวเมื่อโรคเริ่มเกิดและมักจะไม่หาวิธีการป้องกัน ผู้ป่วยจะตระหนักกับโรคนี้ก็ต่อเมื่อมีการแตกหักของกระดูก ซึ่งเมื่อถึงเวลานั้นโรคกระดูกพรุนก็ร้ายแรงเกินเยียวยาแล้ว และผู้ป่วยส่วนใหญ่จะขวนขวายหาทางรักษาโรค เมื่อไม่นามานี้ทีมวิจัยของเราได้ค้นพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออกได้ ดังนั้นจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุน (Urasopon et al., 2007; 2008a)

ปริมาณของกวาวเครือขาวที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 10, 100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน เป็นปริมาณที่มีรายงานว่าสามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูก ในหนูโตเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ที่ถูกตัดต่อมบ่งเพศออก (Urasopon et al., 2007; 2008a) ระยะเวลาในการให้สารนาน 90 วัน ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการวางแผนตามการทดลองของ Devareddy และคณะ (2006) โดยเป็นระยะเวลาที่สามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกภายหลังจากการให้สารไอโซฟลาโวน ในหนูแรทเพศเมีย ที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนจากการตัดรังไข่ได้

การใช้หนูแรทเพศเมียตัดรังไข่ เพื่อเป็นตัวแทนสัตว์ทดลองในการศึกษาโรคกระดูกพรุนในคนที่อยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเพศเป็นวิธีการที่นิยมกัน (Khalil et al., 2005; Soung et al., 2006; Ren et al., 2007) โดยกระดูกในหนูแรทจะเจริญเต็มที่ (peak bone mass) เมื่อหนูอายุได้ 6 – 9 เดือน และมวลกระดูกจะเริ่มลดลงเมื่อหนูอายุได้ 12 เดือน (Ke et al., 1996) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการทดลองโดยใช้หนูอายุ 6 เดือน เพื่อตัดปัจจัยรบกวนจากการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกจากอายุของหนู นั่นคือ การเจริญของกระดูกในหนูวัยเด็ก หรือการสูญเสียมวลกระดูกในหนูแก่ อย่างไรก็ตามการตอบสนองของกระดูกในหนูจะต่างกันในกระดูกแต่ละชนิด และในกระดูกแต่ละส่วน โดยกระดูกเนื้อโปร่งจะมีการเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่ากระดูกเนื้อแน่น (Thompson et al., 1995; Bloomfield et al., 2002) ดังจะเห็นได้จากในหนูเพศเมีย

การเปลี่ยนแปลง (ลดลง) ของกระดูกเนื้อโปร่งเมื่อตัดรังไข่นาน 90 วัน และการเปลี่ยนแปลง (เพิ่มขึ้น) เมื่อให้กวาวเครือขาว ในการทดลองครั้งนี้ ในขณะที่กระดูกเนื้อแน่นมีการเปลี่ยนแปลง (ลดลง) ที่น้อยมากและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 90 วัน โดยจะสามารถเห็นการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่นได้ก็ต่อเมื่อตัดรังไข่และพักหนูไว้นานถึง 180 วัน นอกจากนี้ยังเห็นผลการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่นน้อยมากภายหลังจากที่ให้กวาวเครือขาว ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก ในส่วนกระดูกเนื้อโปร่งบริเวณ proximal tibial metaphysis (Zang et al., 2007; Filipovic et al., 2009)

เมื่อตัดรังไข่หนูพบว่า %trabecular bone area (%BA) ของกระดูก proximal tibial metaphysis ลดลง ในขณะที่ bone marrow cavity เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ว่าการตัดรังไข่ในหนูแรทเพศเมียสามารถชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ (Fanti et al., 1998; Arjmandi et al., 1998; Zang et al., 2007; Filipovic et al, 2009; Picherit et al., 2001) และจากการทดลองครั้งนี้พบว่ากวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์สามารถบรรเทาภาวะกระดูกพรุนได้ กวาวเครือขาวและฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์นอกจากจะมีฤทธิ์ในการป้องกันการสูญเสียเนื้อกระดูก (anti-osteoporosis effect) แล้ว ยังสามารถออกฤทธิ์กระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อกระดูก (anabolic effect) ได้ด้วย โดยเฉพาะอย่างเมื่อให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Picherit et al. (2001) ที่ทำการทดลองในหนูแรทเพศเมียอายุ 7 เดือน และชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่และทิ้งหนูไว้นาน 80 วัน (OVX_{80}) โดยพบว่าภายหลังจากที่ให้สารไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลือง (soybean isoflavone) ในขนาด 20 – 80 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 84 วัน พบว่าค่าความหนาแน่นกระดูกและ %BA ของหนูในวันสุดท้ายของการให้สารที่ D_{164} มีแนวโน้มสูงกว่าของหนู OVX80

สำหรับการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นกระดูกในหนูเพศเมีย ภายหลังการตัดรังไข่ออกและภายหลังจากที่ได้รับกวาวเครือขาวในขนาดต่าง ๆ และฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ คล้ายคลึงกับการเปลี่ยนแปลงของค่า %BA นั่นคือภายหลังการตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และพักหนูไว้นาน 90 วัน ทำให้ค่าความหนาแน่นกระดูเนื้อโปร่งและความหนาแน่นกระดูกเนื้อแน่นลดลงอย่างสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Urasopon et al., 2007; 2008a) และเมื่อได้รับกวาวเครือขาวค่าความหนาแน่นกระดูกเพิ่มขึ้นอย่างสัมพันธ์กับขนาดที่ให้ โดยการเปลี่ยนแปลงจะขึ้นอยู่กับชนิดและตำแหน่งของกระดูก ในกระดูกเนื้อโปร่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่าในกระดูกเนื้อแน่น กระดูกส่วนแกนกลาง (axial bone) 4^{th} lumbar vertebra มีการเพิ่มขึ้นของเนื้อกระดูกมากว่ากระดูกส่วนรยางค์ (long bone) tibia และ femur (Khalil et al., 2005; Soung et al., 2006; Urasopon et al., 2007; 2008a) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นกระดูกภายหลังจากที่หนูเพศเมียได้รับกวาวเครือขาว โดยรวมจะเห็นได้ว่ากวาวเครือขาวในขนาดสูงสุด (1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน นาน 90 วัน) ให้ผลใกล้เคียงกับเมื่อ

ให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ (EE) ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน อีกทั้งยังมีค่าสูงกว่าความหนาแน่นกระดูกของกลุ่มที่ตัดรังไข่นาน 90 วัน (OVX_{90}) และมีค่าใกล้เคียง ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ออกที่เวลานาน 180 วัน (SH_{180}) จากผลดังกล่าวสามารถกล่าวได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะสามารถป้องกันการสลาย (resorption) ของกระดูกแล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้าง (formation) ของกระดูกได้อีกด้วย ซึ่งกลไกการทำงานของกวาวเครือขาวเพื่อให้ได้ผลดังกล่าวยังไม่มีรายงาน ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษากลไกดังกล่าวต่อไปในปีที่ 2 ก่อนที่จะพัฒนากวาวเครือขาวไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุน

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

ในหนูเพศเมีย จะเห็นได้ว่าการตัดรังไข่มีผลทำให้ระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ (Shirke et al., 2009; Li and Yu, 2003; Lee et al., 2004) ระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้เกี่ยวกับการสร้างกระดูก (bone formation), osteoclast cell proliferation, differentiation and synthesis of collagen ได้ (Choi et al., 2001) ในขณะที่ดัชนีบ่งชี้เกี่ยวกับการสลายกระดูก (bone resorption) นิยมใช้การตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ hydroxyproline ในปัสสาวะ และ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) ในซีรั่ม ซึ่งในสภาวะที่หนูแรทถูกตัดรังไข่ค่า bone formation และ bone resortipn marker จะมีค่าสูงขึ้น (Arjmandi et al., 1998; Arjmandi, 2001) จากรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับผลของฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์และสารไอโซฟลาโวนต่อระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่ม พบว่าผลไม่สอดคล้องกัน นั่นคือ มีผลทั้งไปลดและไปเพิ่มระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่ม (Shirke et al., 2009; Li and Yu, 2003; Lee et al., 2004) แม้ว่าในการทดลองครั้งนี้ผลของกวาวเครือขาวต่อระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มจะไม่เด่นชัด แต่อย่างน้อยก็สามารถเห็นได้ว่ากวาวครือขาวในขนาด 100 และ 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน (PM100 และ PM1000) ในวันที่ 120 และ 150 (D_{120} และ D_{150}) มีค่าสูงกว่ากลุ่ม PM0 และ SH ซึ่งผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับการทดลองของ Arjmandi et al. (1998) ที่ว่าเมื่อให้อาหารที่มีส่วนผสมของถั่วเหลืองแก่หนูแรททำให้ระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้น เจนิสเตอิน, คิวเมสตรอล (coumestrol) และดาอิดเซอิน สามารถกระตุ้นการหลั่ง alkaline hosphatase จากเซลล์ MC3T3-E1 (osteoblast-like cell line) (Kanno et al., 2004) มีรายงานว่าสารไอโซฟลาโวนสามรถยับยั้งการสลายกระดูกของเซลล์ osteoclast

(osteoclast resorption) และกระตุ้นการสร้างกระดูกของเซลล์ osteoblast (osteoblastic bone formation) (Li and Yu, 2003; Sugimoto and Yamaguchi, 2000; Brynin, 2002) และเมื่อป้อนไอโซฟลาโวนจากถั่วเหลืองให้แก่หนูแรทที่ตัดรังไข่ทุกวัน นาน 3 เดือน สามารถลดระดับ deoxypyrodinoline ในปัสสาวะ (bone resorption marker) (Arjmandi, 2001) และในสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนจากการตัดรังไข่สามารถชักนำการสลายกระดูกโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กระดูกเนื้อโปร่งได้ พบว่าการแสดงออกของ ERβ mRNA ในกระดูกเนื้อโปร่งส่วน distal femoral metaphysis และ lumbar vertebra มีมากกว่าในกระดูกเนื้อแน่น ส่วน femoral metaphysis (Onoe et al., 1997) ซึ่งจะสอดคล้องกับการทดลองนี้ที่พบการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อโปร่งภายหลังจากที่ให้กวาวเครือขาวเห็นได้ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่น จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าระดับ alkaline hosphatase ในซีรั่มในวันสุดท้ายของการทดลอง (D_{180}) ในหนูทุกกลุ่ม (ยกเว้นกลุ่ม EE และ PM100) กลับคืนสู่ระดับของ D_0 ซึ่งแสดงว่า bone turnover กลับคืนสู่สภาวะปกติ

Tartrate resistant acid phosphatase 5 b (TRAP 5b) สร้างและหลั่งมาจาก osteoclast ดังนั้นจึงสามารถใช้การเปลี่ยนแปลงของระดับ TRAP 5b ในซีรั่ม เป็นดัชนีบ่งชี้การสลายกระดูกได้ ดังจะเห็นได้จากระดับ TRAP 5b ในซีรั่มที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคกระดูก (Halleen et al., 2000; Chu et al., 2003; Mose et al 2003) และลดลงในผู้ป่วยที่ได้รับสารต่อต้านการสลายกระดูก (antiresorptive drugs) (Koizumi et al., 2003; Voskaridou et al., 2003) ในหนูแรทภายหลังการตัดรังไข่นาน 3 เดือนระดับ TRAP 5b ในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Songlin et al., 2009) ในการทดลองครั้งนี้ระดับ TRAP 5b ในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้นทันทีภายหลังจากตัดรังไข่นาน 30 วัน ทั้งนี้เนื่องจากการตัดรังไข่ทำให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลง ชักนำให้เกิดการสูญเสียเนื้อกระดูกและเกิดภาวะกระดูกพรุน (Urasopon et al., 2008b) โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลง (การเพิ่มขึ้น) ของระดับ TRAP 5b ในหนูที่ตัดรังไข่จะตรวจจับได้ภายในช่วงอาทิตย์แรกเท่านั้น เพราะหลังจากนั้นจะเกิดการปรับตัวเข้าสู่สภาวะปกติ (Surve et al., 2001) หลังให้กวาวเครือขาวระดับ TRAP 5b ในซีรั่ม เพิ่มสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อให้ EE ระดับ TRAP 5b ในซีรั่ม ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง ลักษณะดังกล่าวบ่งชี้ว่ากวาวเครือขาวและ EE มีกลไกการออกฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ยังไม่เพียงพอที่จะอธิบายกลไกดังกล่าวในระดับเซลล์ได้ จึงควรที่ตรวจวัดระดับของ bone resorption ตัวอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น sialoprotein หรือ pyridinoline cross-linking telopeptides

จากการทดลองในครั้งนี้เราเพียงแต่วัดการปลี่ยนแปลงของ %BA, ความหนาแน่นกระดูก, มวลกระดูกและ ระดับ alkaline hosphatase และ TRAP 5b ในซีรั่ม เท่านั้น ซึ่งข้อมูลที่ได้ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปได้ว่ากวาวเครือขาวมีกลไกการออกฤทธิ์เป็นเช่นไรต่อเซลล์กระดูก ดังนั้นจึงควรที่จะต้องทำการทดลองเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูกของเซลล์

กระดูกของหนูแรท ในหลอดทดลอง แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองในครั้งนี้เราสามารถสรุปได้ว่าการกินกวาวเครือขาวสามารถป้องกันการสลายกระดูก (anti-osteoporosis effect) และรักษาภาวะกระดูกพรุน (anabolic effect) ในหนูแรทเพศเมียได้ ซึ่งในปัจจุบันนี้พบว่าสารที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการสร้างเนื้อกระดูกที่มีขายในท้องตลาดมีอยู่เพียงตัวเดียว คือ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ก็มีผลข้างเคียง คือ ทำให้คลื่นไส้, อาเจียน, ปวดหัว, ตะคริวที่ขา และเวียนศรีษะ และมีราคาแพงมาก ดังนั้นผู้ป่วยส่วนใหญ่ที่ใช้ฮอร์โมนพาราไทรอยด์มักเป็นผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะกระดูกพรุนขั้นรุนแรงที่ให้ยาอื่นไม่ได้แล้ว หรือเมื่อยาอื่นใช้ไม่ได้ผลแล้ว (Ng, 2009) จากผลการทดลองในครั้งนี้จึงถือได้ว่ากวาวเครือขาวสามารถที่จะใช้เป็นตัวเลือกหนึ่งในการรักษาภาวะกระดูกพรุนได้ นอกจากนี้กวาวเครือขาวยังมีข้อดีเหนือการใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ตรงที่กวาวเครือขาวยังสามารถไปลดการเกิดและการเจริญของมะเร็งเต้านมอีกด้วย (Cherdshewasart et al., 2007b)

ข้อสรุป

1. การตัดรังไข่ในหนูเพศเมียทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มสูงขึ้น และการให้กวาวเครือขาวทำให้น้ำหนักตัวของหนูเพศเมียที่ตัดรังไข่ลดลง อย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือขาวที่ให้ และผลที่ได้คล้ายกับผลของการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ (17α - ethinylestradiol, EE)
2. การตัดรังไข่ทำให้น้ำหนักมดลูกลดลงในหนูเพศเมีย และทำให้น้ำหนักมดลูกเพิ่มสูงขึ้นเมื่อให้กวาวเครือขาว โดยขึ้นกับขนาดที่ให้ และผลที่ได้คล้ายกับผลของการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์
3. ในหนูอายุ 6 เดือน การตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และพักไว้นาน 90 วัน สามารถชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ ทั้งในกระดูกเนื้อโปร่งและกระดูกเนื้อแน่น ทั้งในส่วน diaphysis และ metaphysis และทั้งในกระดูกแกนกลาง (4^{th} lumbar vertebra) และกระดูกรยางค์ (tibia and femur)
4. การให้กวาวเครือขาวนาน 90 วัน ในหนูที่ถูกชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมรังไข่ ทำให้เนื้อกระดูก (%trabecular bone area) ความหนาแน่นกระดูก และมวลกระดูกเพิ่มขึ้น อย่างสัมพันธ์กับขนาดกวาวเครือขาวที่ให้ โดยกวาวเครือขาวในขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน มีผลใกล้เคียงกับการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ในขนาด 0.1 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน อีกทั้งยังมีค่าสูงกว่าของกลุ่มที่ตัดต่อมรังไข่ออกนาน 90 วัน (OVX_{90}) และมีค่าใกล้เคียง ($p>0.05$)
5. การตัดรังไข่ออก, การให้กวาวเครือขาว และการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ alkaline phosphatase ในซีรั่มให้สูงขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าปัจจัยดังกล่าวไปมีผลทำให้ bone turnover rate เพิ่มสูงขึ้น
6. การตัดรังไข่, การให้กวาวเครือขาว และการให้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ tartrate resistant acid phosphatase 5 b (TRAP 5b) ในซีรั่มให้สูงขึ้น ซึ่งบ่งชี้ว่าปัจจัยดังกล่าวไปมีผลทำให้ bone turnover rate เพิ่มสูงขึ้น
7. จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่ากวาวเครือขาวนอกจากจะมีฤทธิ์ป้องกันการสลายกระดูก (antiresorptive effect) แล้ว ยังสามารถกระตุ้นการสร้างกระดูก (anabolic effect) ได้ จึงควรที่จะพัฒนากวาวเครือขาวต่อไปเพื่อใช้เป็นยาในการรักษาโรคกระดูกพรุนในสตรีสูงวัย

ข้อเสนอแนะ

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

1. ศึกษาผลของกวาวเครือขาวในการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูเพศผู้ที่ตัดอัณฑะออก
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาวต่อกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ของเซลล์กระดูกของหนูแรท ในหลอดทดลอง
3. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารไฟโตเอสโตรเจนที่สกัดได้จากกวาวเครือขาว ผ่านตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจนของ osteoblast

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FilipoviĆ B, SosiĆ-JurjeviĆ B, AjdzanoviĆ V, BrkiĆ D, ManojloviĆ-Stojanoski M, MiloseviĆ V, et al. 2009.Daidzein administration positively affects thyroid C cells and bone structure in orchidectomized middle-aged rats. *Osteoporos Int.* Doi 10.1007/s00198-009-1092-x.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ส่วนผนวก

ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์

1. บทความในวารสารวิชาการ

1.1 ระดับนานาชาติ

-**Malaivijitnond S**, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. 2010. Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. *Fitoterapia*. 81: 569-576. (IF2009= 1.363).

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

1.2 ระดับชาติ

- ทารีณี โลนุชิต, สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์. 2554. วิธีการตรวจสอบตัวอย่างกวาวเครือขาวในห้องปฏิบัติการ. วารสารวิทยาศาสตร์. Accepted.

2. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

2.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

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

-Tiyasatkulkovit W, Thongbunchoo J, Charoenphandhu N, **Malaivijitnond S.** 2010. Effects of phytoestrogens foun in Thai herb, *Pueraria mirifica*, on bone formation. 15th Biological Sciences Graduate Congress, 15-17 December 2010, University of Malaya, Malyasia. P.49.

-Gomuttapong S, Pewphong R, Choeisiri S, Jaroenporn S, **Malaivijitnond S.** 2010. Testing of estrogenic activity and toxicity of *Stephania venosa* in ovariectomized rats. 15th Biological Sciences Graduate Congress, 15-17 December 2010, University of Malaya, Malyasia. P.57.

3. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการในประเทศ

3.1. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

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