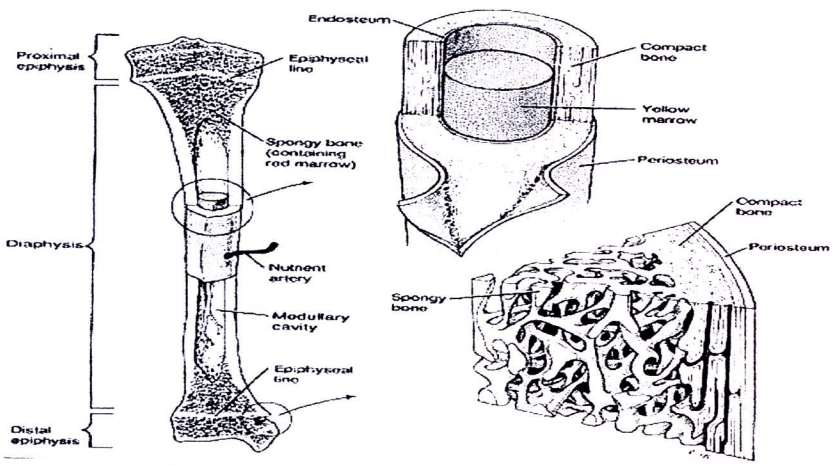
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กระดูก (Bone)

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

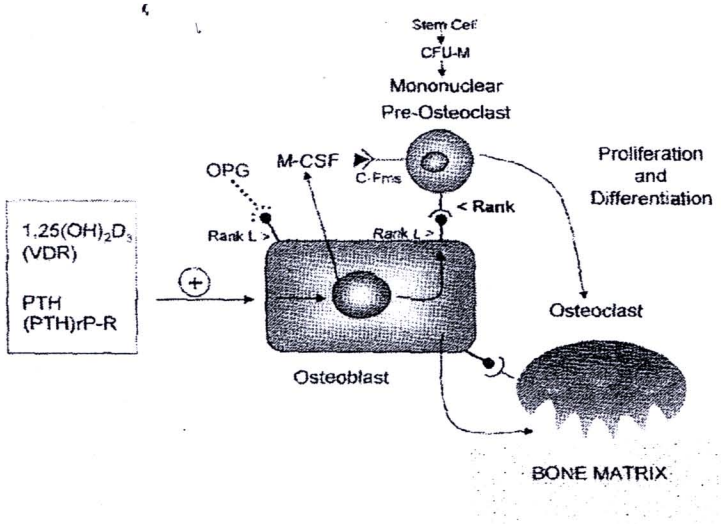


รูปที่ 1 โครงสร้างของกระดูกยาว (long bone) ประกอบด้วยกระดูกเนื้อแน่น และกระดูกเนื้อโปร่ง

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

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

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



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

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

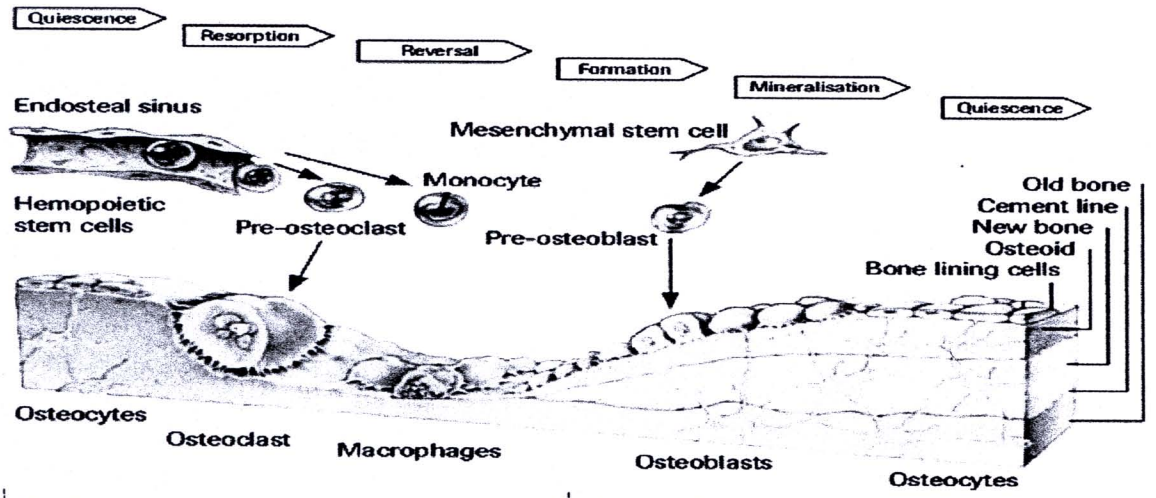
Bone remodeling cycle ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (รูปที่ 3)

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

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

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

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



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

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

ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

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

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

ภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียมวลกระดูกไม่ให้เกิดเพิ่มมากขึ้น และลดอัตราการเกิดกระดูกหักได้ ดังนั้นการ**ป้องกัน**จึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุด แต่คนส่วนใหญ่มักไม่เห็นความสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุน จนกระทั่งมีอาการจึงจะเข้ารับการรักษา ปัจจุบันการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนทำได้โดย การออกกำลังกาย รับประทานอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอ หลีกเลี่ยงการดื่มเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และงดสูบบุหรี่ ส่วนในผู้หญิงที่ผ่าตัดรังไข่ออก และผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement

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

ผลของไอโซฟลาโวน (Isoflavones) ต่อกระดูก

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

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

กวาวเครือขาว

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

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

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

วิธีการวิจัย

1. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมีย ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก

สัตว์ทดลอง

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

ขั้นตอนการทดลอง

นำหนูแรทเพศเมีย อายุ 6 เดือน จำนวน 70 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

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

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

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

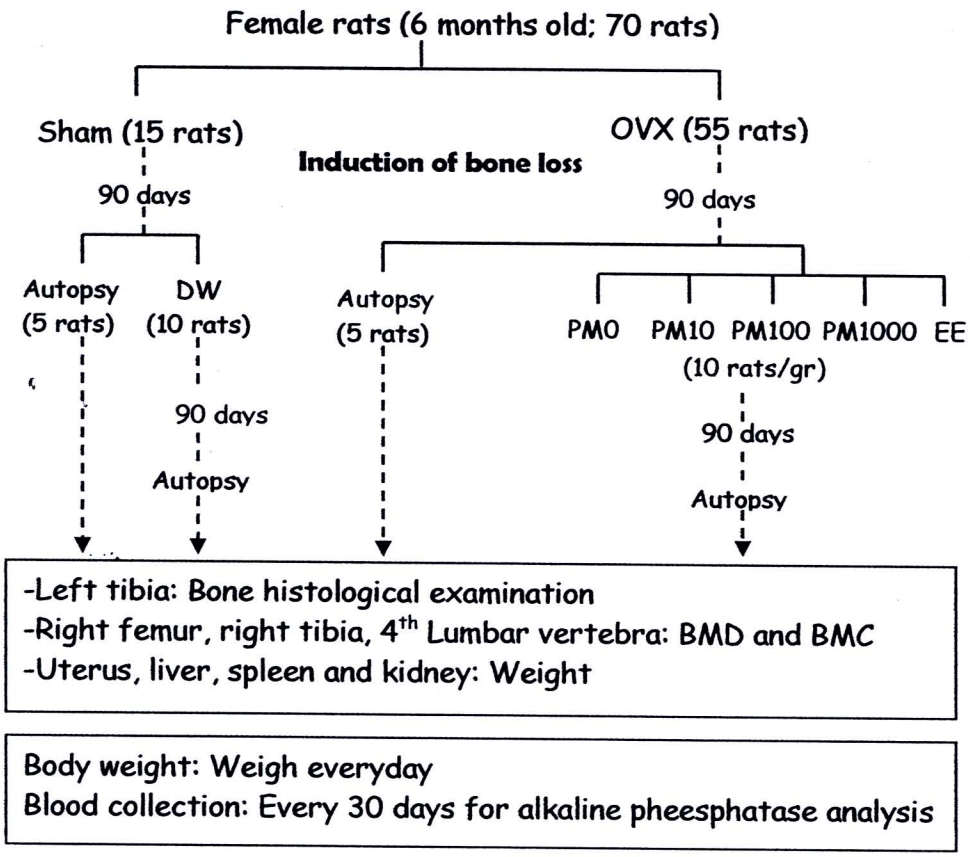
นำหนูที่เหลือ จำนวน 60 ตัว (กลุ่ม SH จำนวน 10 ตัว และ กลุ่ม OVX จำนวน 50 ตัว) มาแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ กลุ่มละ 10 ตัว และทำการทดลอง โดยให้สารต่างๆ ทางปาก นาน 90 วันดังนี้

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

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง



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

2. การศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดอัณฑะออก

สัตว์ทดลอง

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

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 8 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 245503
เลขเรียกหนังสือ

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

นำหนูแรทเพศผู้ อายุ 6 เดือน จำนวน 70 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

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

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

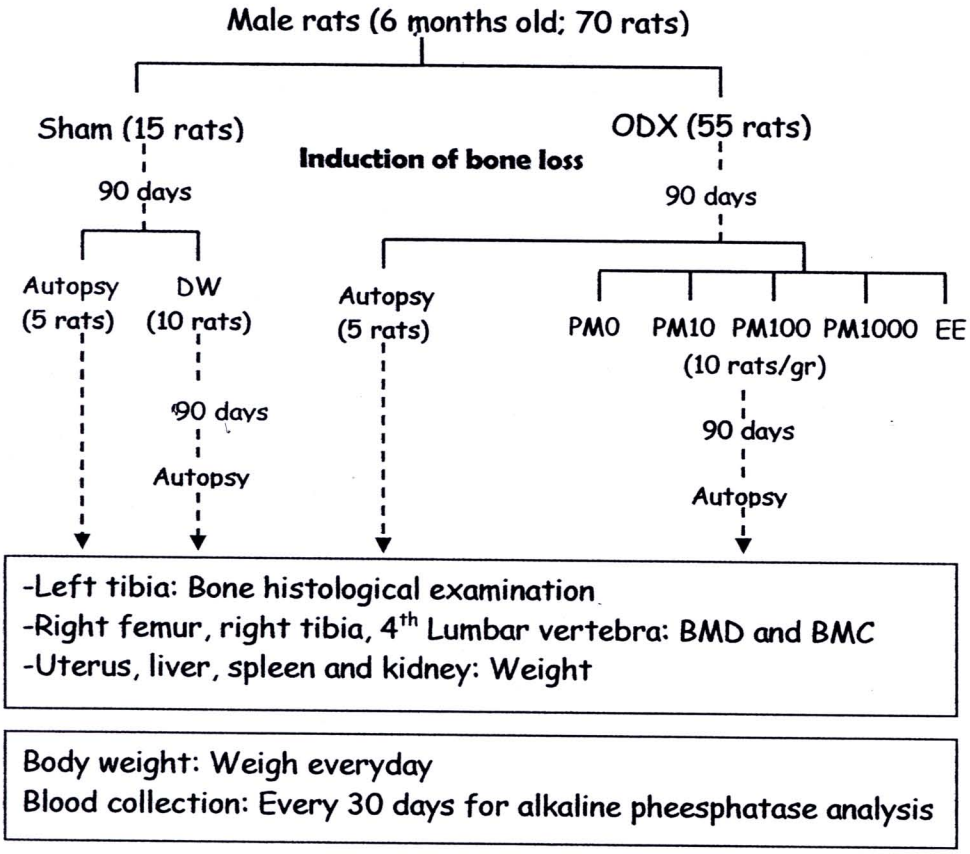
หลังจากผ่าตัดจะเลี้ยงหนูต่อไปอีกเป็นระยะเวลา 90 วัน เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูอยู่ในสภาวะพร่องฮอร์โมนเพศ และเกิดภาวะกระดูกพรุนตามการศึกษาของ Urasopon และคณะ (2007; 2008a) เก็บเลือดทุกๆ 30 วัน (day 30, day 60 และ day 90) ภายหลังจากผ่าตัดนาน 90 วัน สุ่มเลือกหนูกลุ่ม Sham และกลุ่ม ODX กลุ่มละ 5 ตัว มาทำการุณยฆาต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

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

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

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

แผนภาพแสดงขั้นตอนการทดลอง



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

การเตรียมสารละลายกวาวเครือขาว

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

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

การเตรียมสารสกัดกวาวเครือขาวและการวิเคราะห์ส่วนประกอบไฟโตเอสโตรเจนโดยวิธี HPLC

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

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

การวิเคราะห์สารประกอบไฟโตเอสโตรเจนประกอบด้วยขั้นตอน ดังนี้

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

โดยมีอัตราการไหลของสารที่ความเร็ว 1 มิลลิตร/นาที และตรวจวัดสารที่แยกได้ที่ค่าความยาวคลื่น 225 นาโนเมตร

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

การเตรียมสารละลาย 17 α – ethinylestradiol

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

เก็บตัวอย่างเลือด

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

การวัดความหนาแน่นกระดูก

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

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

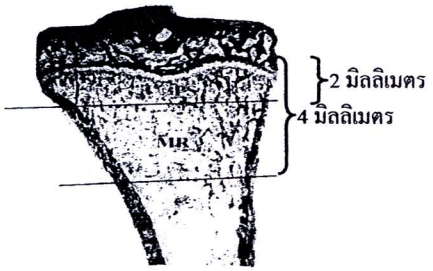
- กระดูก tibia ทำการวัดตำแหน่งของ proximal tibial metaphysis (TM) และ tibial diaphysis (TD)
- กระดูก femur ทำการวัดตำแหน่งของ distal femoral metaphysis (FM) และ femoral diaphysis (FD)
- กระดูกสันหลังท่อนที่ 4 (L4)

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

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของกระดูก

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

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



รูปที่ 4 แสดงตำแหน่งที่ทำการวัดพื้นที่กระดูก (Trabecular bone area)

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

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