



รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง)
ทุนอุดหนุนวิจัย มก.ปีงบประมาณ 2552

รหัสโครงการวิจัย ก-ข(ด) 37.52
ฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกดต่อเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการแสดงออกของ
โปรตีนในอัณฑะหนูวิสตาร์เพศผู้
*Antifertile Effect of *Momordica charantia* Seed Extract on Antioxidant Enzymes and Protein
Expression in Testicular Male Wistar Rats*

หัวหน้าโครงการ ศศ.พนัส อรรถกิตติวงศ์
หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน

แหล่งทุน : ทุนอุดหนุนวิจัย มก.

สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ระยะเวลาวิจัย 1 ปี (ปีงบประมาณ 2553)

แบบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง)

โครงการวิจัย (Project)

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2553

ส่วนที่ 1 ข้อมูลโครงการวิจัย

- 1.1 รหัส ก-ข(ค)37.52 ชื่อโครงการวิจัย ฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นต่อเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการแสดงออกของโปรตีนในอวัยวะหนูistarเพศผู้
- 1.2 ลักษณะโครงการ เป็นโครงการวิจัยเดี่ยว
- 1.3 ชื่อหัวหน้าโครงการ รศ. ดร. พันธุ์ ธรรมกิริตวิวงศ์
- 1.4 หน่วยงานต้นสังกัด ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน
หน่วยงานหลัก ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ บางเขน
- 1.5 ประเภทโครงการ โครงการวิจัย 3 สาขา โครงการวิจัยสาขาเกษตรศาสตร์
- 1.6 ระยะเวลาดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ 1 ปีงบประมาณ 2552
- 1.7 สถานที่ดำเนินงานวิจัยเก็บข้อมูล
- ห้องปฏิบัติการสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
- 1.8 งบประมาณรวมตลอดโครงการ 311,000.00 บาท ประกอบด้วย
ปีงบประมาณ 2552 ได้รับ 280,000 บาท
- 1.9 วัตถุประสงค์โครงการวิจัย
 1. ศึกษาฤทธิ์สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในของเหลวอวัยวะ
 2. ศึกษาฤทธิ์สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวอวัยวะ
 3. ศึกษาฤทธิ์สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นต่อการควบคุมระดับเทสโทสเตอโรนในเลือด
 4. ศึกษาฤทธิ์สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกในการลดความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูistarเพศผู้
 5. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสมบูรณ์พันธุ์ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โปรตีนและเทสโทสเตอโรน
- 1.10 เป้าหมายผลงานวิจัยตลอดโครงการ
ปีงบประมาณ เดือนที่ ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะได้
2552 1-6

7-12 คาดว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นจะมีผลต่อการลดความสมบูรณ์พันธุ์ การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การลดลงของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน และส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน

1.11 สรุปผลการดำเนินงานวิจัยตลอดโครงการ

- วัตถุประสงค์ (ตามแผน)

1. สกัดเมล็ดมะระระขึ้นกด้วยเอทานอล

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่สกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นกต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวอันทะ

ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่สกัดได้จากเมล็ดมะระระขึ้นกต่อเทสโทสเตอโรนในพลาสมา

กิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในของเหลวอันทะ

ประมวล สรุปผล จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์

- เป้าหมาย/ผลที่คาดหวัง (ตามแผน)

1. พัฒนาคู่มือกำเนิดเพศชาย มีประโยชน์ต่อวงการแพทย์และสาธารณสุข

เผยแพร่สู่ชุมชนในการนำผลิตผลทางการเกษตรใช้ให้เกิดประโยชน์

เสริมสร้างภูมิปัญญาท้องถิ่นสู่ระดับสากล

- ผลการดำเนินงาน (ปฏิบัติได้จริง)

1. สารสกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นก 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วันส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์หนูวิสตาร์ 57 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2. สารสกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักอันทะและน้ำหนักต่อพักเชื้ออสุจิของหนูวิสตาร์

3. สารสกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วันส่งผลลดระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในของเหลวอันทะและในพลาสมาเลือด

4. สารสกัดจากเมล็ดมะระระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และคาตาเลสในของเหลวอันทะหนูวิสตาร์เพศผู้

5. การป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกปริมาตร 400 และ 800 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงรูปแบบ โปรตีนในของเหลวอันทะหนุวิสตาร์

1.12 ผลการดำเนินงานวิจัยเป็นไปตามแผนหรือไม่ อย่างไร

- เป็นไปตามแผน

1.13 ปัญหา อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข

- ไม่มีปัญหาและอุปสรรค

1.14 สรุปผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

- บรรลุ

1.15 ผลผลิต/สิ่งที่ได้จากการวิจัย (Outputs)

- หัวเรื่องวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกต่อเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการแสดงออกของโปรตีนในอันทะหนุวิสตาร์เพศผู้

Antifertile Effect of Momordica charantia Seed Extract on Antioxidant Enzymes and Protein Expression in Testicular Male Wistar Rats

1.16 จุดเด่นของผลงานวิจัย / ผลผลิต / สิ่งที่ได้จากการวิจัย (outputs)

- พัฒนาภูมิปัญญาท้องถิ่น

ใช้สมุนไพรพื้นบ้านในการพัฒนางานวิจัยด้านความสมบูรณ์พันธุ์

- ก่อให้เกิดมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจ และคุณค่าเพิ่มทางสังคมและวัฒนธรรม
เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของเมล็ดมะระจีนกที่เป็นทรัพยากรเหลือใช้

1.17 การนำเสนอการวิจัยไปใช้ประโยชน์ (Outcomes)

1. การนำผลการวิจัยไปเผยแพร่/ถ่ายทอด

1.1 วารสารวิชาการระดับชาติ/วารสารวิชาการระดับนานาชาติ

-

1.2 นำเสนอในการประชุม/สัมมนาระดับชาติ และนานาชาติ

-

1.3 เผยแพร่ผลงานในรูปแบบการจัดนิทรรศการ

-

1.4 บทความ

-

1.5 จัดอบรมถ่ายทอด

-

1.6 นำเสนอทางสื่อผสม

-

1.7 ภาครัฐนำไปใช้กำหนดแผน/นโยบาย

-

1.8 มีผู้นำผลงานวิจัยไปอ้างอิง

-

1.9 อื่นๆ

-

2. เป้าหมายการนำผลลัพธ์ / ผลสำเร็จที่ได้ / หรือคาดว่าจะได้จากการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ด้านการศึกษา/เสริมการเรียนการสอน

- สาขาเกษตรศาสตร์และสัตววิทยาการสืบพันธุ์

2. ด้านการเกษตร

- ส่งเสริมมูลค่าสิ่งเหลือใช้ทางการเกษตร

3. ด้านเศรษฐกิจ

- วิจัยพื้นฐานนำไปสู่การพัฒนาการผลิตยาคุมกำเนิดเพศชาย

1.18 ผลกระทบ (Impact) ที่เกิดจากการนำผลการวิจัยไปใช้ สอดคล้องกับยุทธศาสตร์ด้านใด

- ยุทธศาสตร์การบริหารราชการแผ่นดิน (พ.ศ.2548-2551)

1. ยุทธศาสตร์การพัฒนามนุษย์บนฐานความหลากหลายทางชีวภาพและการสร้างความมั่นคงของฐานทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม

เป้าประสงค์ การพัฒนาคุณค่าความหลากหลายทางชีวภาพ และภูมิปัญญาท้องถิ่น

2. ยุทธศาสตร์การปรับโครงสร้างเศรษฐกิจให้สมดุลและยั่งยืน

เป้าประสงค์ การปรับโครงสร้างการผลิตเพื่อเพิ่มผลิตภาพ และคุณค่าของสินค้าและบริการบนฐานความรู้ และความเป็นไทย

3. ยุทธศาสตร์การสร้างความเข้มแข็งของชุมชนและสังคมให้เป็นรากฐานที่มั่นคงของประเทศ

เป้าประสงค์ การสร้างความมั่นคงของเศรษฐกิจชุมชน

4. ยุทธศาสตร์การพัฒนาคูณภาพคนและสังคมไทยสู่สังคมแห่งภูมิปัญญาและการเรียนรู้

เป้าประสงค์ การเสริมสร้างสุขภาวะคนไทยให้มีสุขภาพแข็งแรงทั้งกายและใจ มีความสัมพันธ์ทางสังคม และอยู่ในสภาพแวดล้อมที่น่าอยู่

5. ยุทธศาสตร์การเสริมสร้างธรรมาภิบาลในการบริหารจัดการประเทศ มุ่งเสริมสร้างความเป็นธรรมในสังคมอย่างยั่งยืน

เป้าประสงค์ การศึกษาและเสริมสร้างความมั่นคง เพื่อสนับสนุนการบริหารจัดการประเทศสู่คุณภาพ และความยั่งยืน

- นโยบายและยุทธศาสตร์การวิจัยของชาติ (พ.ศ.2551-2553)

ยุทธศาสตร์การวิจัยที่ 5 การบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัย ทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศสู่การใช้ประโยชน์ด้วยยุทธวิธีที่เหมาะสม

กลยุทธ์การวิจัยที่ 1 การพัฒนาระบบบริหารงานวิจัยของประเทศตลอดจนการบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัยทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศ และจากต่างประเทศสู่การใช้ประโยชน์

แผนงานวิจัยที่ 1 การวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนาระบบบริหารงานวิจัยของประเทศ ตลอดจนการบริหารจัดการความรู้ ผลงานวิจัย ทรัพยากร และภูมิปัญญาของประเทศ สู่การใช้ประโยชน์

1.19 การรับความคุ้มครองทรัพย์สินทางปัญญา

-

1.20 การได้รับรางวัล

-

1.21 งานที่จะทำต่อไป

- ทำการวิจัยแยกสารออกฤทธิ์จากเมล็ดมะระจีนกเพื่อทดสอบกลไกลดความสมบูรณ์พันธุ์

1.22 คำชี้แจงเพิ่มเติม

-

1.23 ได้แนบรายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการ (Project) ตามหัวข้อในส่วนที่ 2 มาด้วยแล้ว

ลงชื่อ.....หัวหน้าโครงการ

(รศ.พนัส ธรรมกীরติวงศ์)

24 ธ.ค. 2557

ส่วนที่ 2

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ (ฉบับจริง)

โครงการวิจัยทุนอุดหนุนวิจัย มก. ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยรหัส ก-ข(ค)37.52

ฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกต่อเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระและการแสดงออกของโปรตีนในอวัยวะหนูวิสตาร์เพศผู้

(1) พันัส ทรรณกัรติวงศ์

(1) Panus Tumkiratiwong

บทคัดย่อ

ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกต่อการลดความสมบูรณ์พันธุ์ การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระและรูปแบบโปรตีนในของเหลวอวัยวะ และระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและพลาสมาเลือดของหนูวิสตาร์เพศผู้ โดยกลุ่มควบคุมป้อนโดเมธิลซัลฟอกไซค์ 1.5 มิลลิลิตรต่อวัน กลุ่มทดลองป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก 400 และ 800 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้งต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ซึ่งละลายในโดเมธิลซัลฟอกไซค์ 1.5 มิลลิลิตร ป้อนต่อเนื่องกัน 42 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะ ท่อพักเชื้ออสุจิและระดับกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส คาตาเลส และรูปแบบโปรตีนในของเหลวอวัยวะ และระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและพลาสมาเลือด พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะ ท่อพักเชื้ออสุจิและระดับ และไม่ส่งผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส คาตาเลสและรูปแบบโปรตีนในของเหลวอวัยวะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามพบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกลดความสมบูรณ์พันธุ์และระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและพลาสมาเลือดของหนูวิสตาร์เพศผู้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นการลดระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและพลาสมาเลือดมากกว่าการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระและรูปแบบโปรตีนในของเหลวอวัยวะสะท้อนการลดความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูวิสตาร์เพศผู้

คำสำคัญ : กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส , ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ , คาตาเลส , ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส , เทสโทสเตอโรน , มะระจีนก , รูปแบบโปรตีน , หนูวิสตาร์

ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the effect of *Momordica charantia* seed extract on fertility, three testicular antioxidant enzymes, protein patterns, and testicular and plasma total testosterone in male Wistar rats. The controlled group was provided 1.5 ml DMSO/d and the experimental group II and III were given 400 and 800 mg/kgbw/d of *M. charantia* seed extract dissolved in 1.5 ml DMSO. They were orally administered for 42 consecutive days. Testicular, epididymal and liver weight changes, testicular superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase activities, protein patterns, and testicular and plasma testosterone were monitored. *M. charantia* seed extract did not significantly change in body weight, testicular, epididymal and liver weight, testicular catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and protein pattern. However, *M. charantia* seed extract demonstrated a significant reduction in fertility as well as in testicular and plasma testosterone. It suggests that the reduced fertility was attributed to the reduced testicular and plasma testosterone rather than three testicular antioxidant enzymes or protein pattern in male Wistar rat.

Key words: catalase, glutathione peroxidase, male infertility, *Momordica charantia*, protein patterns, superoxide dismutase, testosterone, Wistar rat

(1) ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กทม. 10900.

(1) Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkhen Campus, Bangkok, 10900.

ฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกต่อเอนไซม์ต้าน
อนุมูลอิสระและการแสดงออกของโปรตีนในอัณฑะหนูวิสตาร์เพศผู้

Antifertile Effect of *Momordica charantia* Seed Extract on Antioxidant
Enzymes and Protein Expression in Testicular Male Wistar Rats

คำนำ

งานวิจัยปัจจุบันมีการค้นคว้าและวิจัยยาเมล็ดคุมกำเนิดในเพศชายหลากหลายวิธีมากขึ้นกว่าในอดีตโดยให้ความสำคัญกับยาเมล็ดคุมกำเนิดที่ปราศจากฮอร์โมนสังเคราะห์ จากการศึกษาพบว่า สารสกัดจากพืชบางชนิดในตลาดยาได้รับการทดสอบแล้วว่า มีประสิทธิภาพสูง เช่น กอซซิปอล (gossypol) และว่านเจ้าพ่อฟ้าผ่า (*Tripterygium wilfordii*) เป็นต้น นอกจากนี้พบว่าเมล็ดมะละกอ และน้ำมันสะเดามีคุณสมบัติลดความสมบูรณ์พันธุ์เช่นเดียวกัน จากการทดลองของ Naseem *et al.* (1998) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกด้วยปิโตรเลียมอีเธอร์ เบนซีน และแอลกอฮอล์ รบกวนกระบวนการสร้างอสุจิโดยออกฤทธิ์เพิ่มระดับคลอเลสเตอรอลและสะสมไขมันชนิดซูดานอฟิลิก (sudanophilic lipid) บ่งชี้ว่าสารที่ได้ออกฤทธิ์ยับยั้งการสร้างสเตอรอยด์ (steroidogenesis) แต่กลไกการออกฤทธิ์ยังไม่ประจักษ์ พืชสมุนไพรบางชนิดออกฤทธิ์ทางอ้อมผ่านการยับยั้งแกนไฮโปทาลามัส-ต่อมใต้สมองส่วนหน้า-อัณฑะ (hypothalamic-pituitary-gonadal axis) บางชนิดอาจออกฤทธิ์โดยตรงที่ต่อมเพศ (gonad) โดยลดคุณภาพของเชื้ออสุจิ (sperm) และปริมาณน้ำเชื้อ (Colborn *et al.*, 1993; Chitra *et al.*, 2002) คาดว่าอาจชักนำให้ร่างกายมีการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น (reactive oxygen species; ROS) (Chitra *et al.*, 2002) เกิดความเสียหายต่อเยื่อเซลล์โดยกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) หากเกิดขึ้นในเซลล์อสุจิอาจทำให้เซลล์อสุจิสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่และไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอด (Garrido *et al.*, 2004) ดังนั้นมีพืชหลายชนิดมีฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ การค้นหาพืชในอุดมคติเพื่อพัฒนาเป็นยาลดความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศชายจึงเป็นอีกทางออกหนึ่งในการพัฒนายาที่ไม่มีองค์ประกอบของสเตอรอยด์ซึ่งปลอดภัยต่อผลข้างเคียงกับมนุษย์ มะระจีนก (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae) เป็นผักพื้นบ้านของ

ประเทศไทยนิยมนำผลมารับประทานส่วนเมล็ดซึ่งไม่มีการนำไปใช้ประโยชน์ ผู้วิจัยจึงสกัดหยาบเมล็ดมะระจีนก มาตรวจสอบการลดความสมบูรณ์พันธุ์พันธุ์ในหนูvistาร์เพศผู้ โดยเน้นศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกต่อการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ คาตาเลส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และรูปแบบโปรตีนในของเหลวในอวัยวะ และทดสอบเทอโรนินของเหลวในอวัยวะและพลาสมาเลือด ผู้วิจัยคาดหวังว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกอาจมีแนวโน้มประยุกต์ใช้เป็นยาคุมกำเนิดเพศชายชั่วคราวต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (KURDI) ที่จัดสรรทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปีงบประมาณ 2552 และภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้ออำนวยห้องปฏิบัติการสัตววิทยาสำหรับงานวิจัยครั้งนี้

รศ. ดร. พันธุ์ ธรรมกิริตวงศ์

สารบัญ

	หน้า
คำนำ.....	1
กิตติกรรมประกาศ.....	3
สารบัญ.....	4
สารบัญภาพ.....	5
บทที่ 1 บทนำ.....	6
บทที่ 2 วิธีวิจัย.....	11
บทที่ 3 ผลการวิจัย.....	26
บทที่ 4 สรุป วิเคราะห์ ข้อเสนอแนะ.....	36
บทที่ 5 เอกสารอ้างอิง.....	42

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง ตลอดการทดลอง 42 วัน.....	26
ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของอัมตะ (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) หนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	27
ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) ของท่อพักเชื้ออสุจิหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	28
ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบก่อนเริ่มการทดลอง (pretreatment phase) และเมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง (treatment phase).....	29
ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงระดับเทสโทสเตอโรนเฉลี่ย (นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) ในของเหลวอัมตะหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	30
ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงระดับเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยในพลาสมาเลือดของหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง ตลอดการทดลอง 42 วัน.....	31
ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (ยูนิตต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน) ในของเหลวอัมตะหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	32
ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน) ในของเหลวอัมตะหนูvistาร์แต่ละกลุ่ม เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	33
ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (นาโนโมลต่อ 1 นาทีต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน) ในของเหลวอัมตะหนูvistาร์แต่ละกลุ่ม เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	34
ภาพที่ 9 รูปแบบโปรตีนในของเหลวอัมตะหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง.....	35

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

สืบเนื่องจากปัญหาประชากรด้นโลกในปัจจุบันทำให้หลายประเทศต้องประกาศสงครามกับ ‘ความจน ความอดอยากและภาวะ โลกร้อน’ การคุมกำเนิดจึงกลายเป็นหนึ่งในนโยบายเร่งด่วนทั่วโลกเพื่อพัฒนาประเทศและเศรษฐกิจ ช่วยลดปัญหาประชากรด้วยการศึกษา ความไม่เท่าเทียมกันในสังคม ลดอัตราการตายหลังคลอด ควบคุมโรคเอดส์และลดปัญหาสิ่งแวดล้อม สำหรับประเทศไทย รัฐบาลได้สนับสนุนนโยบายคุมกำเนิดอย่างต่อเนื่องและพยายามรณรงค์ให้ประชาชนเห็นความสำคัญของการวางแผนครอบครัวก่อนแต่งงานซึ่งมีหลากหลายวิธีแตกต่างกันไปทั้งในเพศหญิงและเพศชาย ในประเทศยากจนมีเพียง 2 วิธีคือทำหมันชั่วคราวและใส่ห่วงอนามัยทองแดงซึ่งก่อให้เกิดความเจ็บปวดและมีผลข้างเคียงสูง ส่วนในประเทศพัฒนาแล้วการคุมกำเนิดแบบชั่วคราวในเพศหญิงที่มีการใช้กันคือ ใช้ห่วงอนามัย การนับวันปลอดภัย ยาเม็ดคุมกำเนิด การฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ร่างกาย ยาคุมแบบแปะ กุญชางอนามัยสตรีและฟองน้ำคุมกำเนิด ส่วนในเพศชายมีทางเลือกน้อยกว่าโดยวิธีที่ใช้คือ ทำหมันชั่วคราว ใช้ฮอร์โมน ใช้ยาเม็ดบางชนิด เช่น ไนเฟดิพีน (nifedipine) และการใช้กุญชางอนามัยซึ่งถึงแม้จะป้องกันโรคได้แต่ยังมีข้อผิดพลาดและไม่นิยมใช้ในคู่สามีภรรยา

แต่เดิมนั้นแนวความคิดเรื่องคุมกำเนิดได้ตกเป็นภาระของเพศหญิงเพียงฝ่ายเดียว จากการสำรวจของ Rosenfeld *et al.* (1993) พบว่าผู้หญิงพึงพอใจกับแต่ละวิธีที่เลือกใช้น้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ยกเว้นวิธีตัดและผูกท่อนำไข่ (tubal ligation) ประกอบกับในแต่ละเดือนรัฐบาลหลายประเทศต้องสูญเสียเงินมูลค่า 20-50 ดอลลาร์เพื่อคุมกำเนิดโดยใช้ห่วงอนามัยและยาเม็ดในเพศหญิง ทำให้ประเทศที่กำลังพัฒนาเสียเปรียบอย่างมาก ด้วยสาเหตุเหล่านี้ประกอบกับความเท่าเทียมกันระหว่างหญิงและชายในสังคมยุคใหม่ได้จุดประกายแนวคิดการคุมกำเนิดในเพศชาย ควบคู่กับแนวความคิดเดิมที่ว่า การคุมกำเนิดในเพศชายซับซ้อนกว่าเพศหญิงด้วยสาเหตุที่ “ผู้หญิงผลิตไข่เพียงเดือนละฟองแต่ผู้ชายผลิตอสุจิวันละหลายล้านตัว” โดยลี้มไปว่าอุปสรรคที่แท้จริงในการคิดค้นวิธีคุมกำเนิดในเพศชายคือค่านิยมในสังคมนั้นเอง (NICHD., 2000)

งานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งค้นคว้าและวิจัยยาเม็ดคุมกำเนิดในเพศชายเพื่อทดแทนข้อผิดพลาดจากวิธีคุมกำเนิดที่มีอยู่ โดยให้ความสำคัญกับยาเม็ดคุมกำเนิดที่ไร้ฮอร์โมน มีประสิทธิภาพ

ปลอดภัย สะดวกและประหยัดกว่า จากการศึกษาพบว่ายาหรือสารต่างๆมีผลกับตัวอสุจิต่างกันไป สารสกัดจากพืชบางชนิดในตลาดยาได้รับการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูง เช่น กอซซิปอล (gossypol) และว่านเจ้าพ่อฟ้าผ่า (*Tripterygium wilfordii*) เป็นต้น นอกจากนั้นยังพบว่า เมล็ดมะละกอและน้ำสะเดา มีคุณสมบัติลดความสมบูรณ์พันธุ์เช่นเดียวกัน การวิจัยยาโดยใช้สารสกัดจากพืชจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับประเทศไทย ซึ่งแม้จะไม่มีงบประมาณและเทคโนโลยีมูลค่ามหาศาลแต่มีทรัพยากรธรรมชาติที่หลากหลายเนื่องจากอยู่ในเขตศูนย์สูตร โดยเฉพาะทรัพยากรทางเกษตรจำนวนมากที่เหลือใช้ เมื่อประยุกต์เข้ากับเทคโนโลยีชีวภาพอาจกลายเป็นทรัพยากรมูลค่ามหาศาลและยั่งยืน คืบสมดุผลให้ทั้งธรรมชาติและสังคม งานวิจัยนี้จึงให้ความสำคัญกับการใช้ประโยชน์จากความหลากหลายทางชีวภาพควบคู่กับการประยุกต์ใช้ภูมิปัญญาชาวบ้านที่ถนัดกรองบอกเล่าสืบต่อกันมาสู่การพัฒนาทางวิชาการตามแนวเศรษฐกิจพอเพียง โดยพืชในอุดมคติชนิดนี้คือ ‘มะระจีนก’ ซึ่งเป็นผักพื้นบ้านของคนไทย ใช้รับประทานเป็นยามาช้านาน นอกจากนั้นประเทศจีนและอินเดียยังใช้เป็นอายุวัฒน์อีกด้วย ผสมผสานกับผลการทดลองสมัยใหม่เห็นผลชัดเจนว่ามะระจีนกมีสรรพคุณรักษาโรคมามากมาย เช่น ด้านมะเร็ง เบาหวาน และลดการติดเชื้อ เป็นต้น และที่สำคัญคือมีรายงานว่าในอดีตหลายประเทศทำแท้ง จากการทดลองของ Naseem *et al.* (1998) พบว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกบดจนกระบวนสร้างอสุจิในสัตว์ทดลอง แต่ด้วยเหตุผลใดนั้นยังไม่ทราบ งานวิจัยชิ้นนี้จึงมุ่งหวังที่จะใช้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกเป็นยาคุมกำเนิดเพศชายชั่วคราวเลียนแบบกระบวนการเป็นหมันตามธรรมชาติ ซึ่งยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากกระบวนการใด เพียงแต่มีรายงานว่าพบระดับอนุมูลอิสระในตัวอย่งน้ำอสุจิของชายที่เป็นหมัน จึงคาดว่าอนุมูลอิสระอาจเป็นสาเหตุทำให้อสุจิผิดปกติจนเป็นหมันได้ คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์คุมกำเนิดในสารสกัดเมล็ดมะระจีนกกับอนุมูลอิสระ โดยศึกษาผ่านทางกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิดที่สำคัญ คือ คาตาเลส กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส และซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส นอกจากนั้นยังศึกษาผลต่อระดับลูทีไนซิงฮอว์โมน เทสโทสเทอโรน และเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนเพื่อเป็นงานวิจัยต่อยอดในอนาคต โดยใช้ความรู้เบื้องต้นทางวิทยาศาสตร์ หากในอนาคตทราบว่าโปรตีนที่แสดงออกมากขึ้นหรือขาดหายไปหลังใช้สารสกัดเมล็ดมะระจีนกเป็นโปรตีนชนิดใด โปรตีนชนิดนั้นอาจเป็นกุญแจสำคัญในการผลิตทั้งยาช่วยพัฒนาและลดความสมบูรณ์เพศในเพศชายสืบต่อไป

กว่า 2 ทศวรรษแล้วที่นักวิจัยพยายามคิดค้นวิธีคุมกำเนิดชั่วคราวแบบใหม่ของเพศชายแทนที่จะมีเพียง 2 วิธีคือ การใช้ถุงยางอนามัยและทำหมันชั่วคราว ขณะนี้หลายประเทศได้ลงทุนค้นคว้าวิจัยเพื่อคิดค้นยาเม็ดคุมกำเนิดในเพศชาย โดยตั้งความหวังไว้ว่าอีก 2-3 ปีข้างหน้าจะประสบผลสำเร็จ การศึกษาฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดเมล็ดมะระจีนกต่อเอนไซม์ต้าน

อนุมูลอิสระและโปรตีนในอัญหะหนุวิสตาร์เพศผู้ เพื่อพัฒนาควบคุมกำเนิดเพศชายชั่วคราวจึงมีความสำคัญและสอดคล้องกับความต้องการทางสังคมและสถานภาพทางเศรษฐกิจของประเทศไทยอย่างยิ่ง ช่วยพลิกฟื้นภูมิปัญญาชาวบ้านเป็นภูมิปัญญาระดับชาติและระดับสากล นอกจากนี้จะนำทรัพยากรเหลือใช้มาสร้างประโยชน์ได้แล้ว ยังเป็นการยับยั้งปัญหาประชากรล้นโลก ยกระดับคุณภาพชีวิต ลดการตั้งท้องโดยไม่พึงประสงค์ ลดอัตราการตายของแม่ และสนับสนุนให้เพศชายมีส่วนร่วมในการคุมกำเนิดมากยิ่งขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาฤทธิ์สารสกัดเมล็ดมะระขี้นกต่อกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในของเหลวอัมตะ
2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขี้นกต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวอัมตะ
3. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขี้นกต่อการควบคุมระดับเทสโทสเตอโรนในเลือด
4. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดมะระขี้นกในการลดความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูวิสตาร์เพศผู้
5. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความสมบูรณ์พันธุ์ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โปรตีนและเทสโทสเตอโรน

ขอบเขตงานวิจัย

สกัดเมล็ดมะระขี้นกด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ได้สารสกัดสำหรับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการลดความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูวิสตาร์เพศผู้ ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในของเหลวอัมตะ ด้วยวิธี SDS-PAGE gel electrophoresis ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่สกัดจากเมล็ดมะระขี้นกต่อระดับเทสโทสเตอโรนในพลาสมา และกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในของเหลวอัมตะประมวล สรุปผล จัดทำรายงานฉบับสมบูรณ์ คัดเลือกชนิดโปรตีนที่แสดงออกอย่างแตกต่างในกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระขี้นกเพื่อเป็นข้อมูลวิจัยต่อยอด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับผลของสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกต่อการสร้างอนุมูลอิสระในอัมตะ
2. ใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่ช่วยบ่งชี้ว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกมีฤทธิ์ลดความสมบูรณ์พันธุ์
3. ได้ข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับใช้ในการพัฒนาด้วยยาสำคัญทางแพทย์ โดยเทคนิคการวิเคราะห์ระดับสูงที่อาจมีขึ้นต่อไปในอนาคต เช่น การแยกสารให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิค Column chromatography และวิเคราะห์หาชนิดโปรตีนด้วยวิธี 2D gel electrophoresis หรือ Mass spectrometry อีกทั้งยังมีส่วนช่วยในการเพิ่มมูลค่าของพืชชนิดนี้ หากมีการพัฒนาในเชิงอุตสาหกรรมต่อไป
4. ผลงานวิจัยนี้จะสามารถนำไปจดสิทธิบัตรในการสร้างนวัตกรรมและองค์ความรู้ใหม่ ของสารสกัดด้วยเอทานอลจากพืชที่มีฤทธิ์เฉพาะตัวซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการคุ้มครองกำเนิด

5. ผลงานวิจัยนี้สามารถนำไปตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ความรู้แก่สาธารณชนได้ต่อไปในอนาคต
6. ผลงานวิจัยนี้น่าจะมีศักยภาพในการนำไปใช้จริงในทางคลินิก โรงพยาบาลต่างๆ และกระทรวงสาธารณสุข เป็นการเสริมสร้างความแข็งแกร่งทางระบบการศึกษาวิจัยเพื่อองค์ความรู้ใหม่ทางการแพทย์
7. ผลงานวิจัยนี้จะเกื้อหนุนให้เกิดการผลิตนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีประสิทธิภาพทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และวิทยาศาสตร์ชีวเคมี
8. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย รายงานในที่ประชุมสัมมนาวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

บทที่ 2

วิธีวิจัย

ทฤษฎี สมมุติฐาน หรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

อนุมูลอิสระเกี่ยวข้องกับความผิดปกติต่างๆ ในร่างกายก่อให้เกิดโรคหลายโรค เช่น โรคมะเร็ง โรคหัวใจ รวมถึงความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ (Agarwal *et al.*, 2003) ระดับอนุมูลอิสระในระบบสืบพันธุ์ที่มากเกินไปทำให้ลดความสมบูรณ์พันธุ์ รบกวนการทำงานของเซลล์อสุจิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมซึ่งถูกรบกวนได้ง่าย โดยปกติร่างกายจะมีการรักษาระดับอนุมูลอิสระให้อยู่ในสภาวะปกติโดยมีระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Sanocka and Kurpisz, 2004) งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาผลของอนุมูลอิสระต่อกระบวนการลดความสมบูรณ์พันธุ์ เพื่อคิดค้นยาคุมกำเนิดเพศชายชั่วคราวจากสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกับด้วยแอลกอฮอล์ซึ่งมีรายงานว่าสามารถลดความสมบูรณ์พันธุ์ในสัตว์ทดลองได้ จึงมีความน่าเป็นไปได้สูง อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นความรู้พื้นฐานในการพัฒนาตัวยาสำคัญต่ออนาคต และจะเป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชชนิดนี้ซึ่งพบได้ทั่วทุกภาคของประเทศไทย

ตรวจเอกสาร

อนุมูลอิสระ

อนุมูลอิสระ (free radical) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว 1 ตัวหรือมากกว่า จึงเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและมีแนวโน้มที่จะทำปฏิกิริยากับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย (Cheng *et al.*, 2002) สามารถออกซิไดซ์ (oxidize) ไขมัน กรดอะมิโน และคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งเป็นสาเหตุให้ดีเอ็นเอก่อกลายพันธุ์ (mutation) (Wei and Lee, 2002) อนุมูลอิสระเป็นคำที่เรียกรวมโมเลกุลจำพวกอนุมูลออกซิเจน เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide; O_2^-) ไฮดรอกซิล (hydroxyl; OH) เปอร์ออกซิล (peroxyl; RO_2) และอัลคอกซิล (alkoxyl; RO) รวมทั้งโมเลกุลจำพวกที่ไม่ใช่อนุมูลอิสระ (nonradicals) ที่อาจเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (oxidizing agents) หรือเปลี่ยนเป็นสารอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น กรดไฮโปคลอรัส (HOCl) โอโซน (ozone; O_3) เปอร์ออกซิไนไตรท์ (peroxynitrite; $ONOO^-$) ซิงเกิลออกซิเจน (singlet oxygen; 1O_2) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Wiseman and Halliwell, 1996) อนุมูลอิสระพบในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ออกซิเจนหายใจ ได้แก่ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ซึ่งอาจเป็นประโยชน์หรือโทษต่อร่างกายก็ได้ (Droge, 2002)

(Agarwal *et al.*, 2003) และเอนไซม์เอนโดทีเลียลไนตริกออกไซด์ซินเทต (endothelial nitric oxide synthetase; enos) ที่พบเฉพาะในอสุจิระยะโตเต็มวัยของคน บอกเป็นนัยว่าไนตริกออกไซด์ (nitric oxide; NO) อาจเกี่ยวข้องกับสรีรวิทยาอสุจิ หากรูปแบบการแสดงออกของเอนไซม์อีโนส (enos) ในอสุจิผิดปกติ จะส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิเนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxic oxidants) มีมากเกินไป (O'Bryan *et al.*, 1998) การผลิตอนุมูลอิสระที่มากเกินไปเกิดจากอสุจิที่ยังไม่เจริญ อสุจิที่ผิดปกติและจากเม็ดโลหิตขาวที่ปนเปื้อนในทางเดินกระเพาะปัสสาวะและระบบสืบพันธุ์ (genitourinary tract) ที่ติดเชื้อในชายที่เป็นหมันโดยไม่ทราบสาเหตุ (Sikka, 2001) เนื่องจากเชื้อหุ้มเซลล์อสุจิระยะโตเต็มวัยในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acids; PUFA) สูงและขาดเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจำพวก ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส อาจเป็นเพราะในเซลล์อสุจิที่โตเต็มที่ไม่มีไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ทำให้อสุจิถูกทำลายจากอนุมูลอิสระได้ง่าย โดยกระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (Sanocka and Kurpisz, 2004) อนุมูลอิสระสามารถแทรกตัวเข้าไปทำลายดีเอ็นเอของอสุจิได้ (Saleh *et al.*, 2003) ซักน่าให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ (Karihtala and Soini, 2007) เร่งกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) ในเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell) ทำให้จำนวนอสุจินับได้ลดลงซึ่งเกี่ยวข้องกับการเป็นหมันในเพศชายและการลดคุณภาพของน้ำอสุจิ (Agarwal *et al.*, 2003)

แม้ว่าในอสุจิจะขาดเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระแต่ร่างกายก็มีการชดเชยให้มีระบบของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำอสุจิ และในเซลล์อสุจิระยะโตเต็มวัย ซึ่งประกอบด้วยซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส คาตาเลสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส รวมทั้งสารเคมีที่ไม่ใช่เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น กรดแอสคอร์บิกหรือวิตามินซี (ascorbic acid; vitamin C) โทโคเฟอรอลหรือวิตามินอี (tocopherol; vitamin E) กรดยูริก (uric acid) กลูตาไธโอนรีดิวซ์ (reduced glutathione) (Sanocka and Kurpisz, 2004) ไพรูเวท (pyruvate) (Van Dop *et al.*, 1977) เทาริน (taurine) ไฮโปเทาริน (hypotaurine) และอัลบูมิน (albumin) (Alvarez and Storey, 1983) อย่างไรก็ตามอนุมูลอิสระปริมาณน้อยที่พบในร่างกายผู้ที่แข็งแรงไม่ได้สร้างความเสียหายให้กับอสุจิแต่กลับมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสรีรวิทยาของอสุจิ เช่น การเปลี่ยนแปลงอย่างทันทีทันใดของการเคลื่อนไหวที่หางสเปิร์ม (hyperactivation) คาพาซิเทชัน (capacitation) และปฏิกิริยาที่ถุงอโครโซม (acrosome reaction) เป็นต้น ช่วยให้อสุจิผ่านชั้นเปลือกนอกของไข่ (zona pellucida) ช่วยให้อสุจิเจาะเข้าไปในเซลล์โอโอไซต์ระยะโตเต็มวัยของตัวเมีย (de Lamirande *et al.*, 1997) มีส่วนร่วมในกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสและการส่งผ่านสัญญาณในเซลล์ซึ่งควบคุมการเจริญเติบโตและ

ความสามารถของอสุจิ ดังนั้นปริมาณของอนุมูลอิสระในเซลล์จึงเป็นตัวชี้วัดสำคัญที่จะบอกว่าเซลล์จะมีชีวิตอยู่ต่อไปหรือไม่โดยมีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องดังนี้

Imai *et al.*, (2001) รายงานว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของชายที่เป็นหมันจำนวนทั้งหมด 73 คน ชนิดโอลิโกแอสทีโนซุโอสเปิร์มเมีย (oligoasthenozoospermia) ระดับกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 4 (GPX4) ลดลงซึ่งเอนไซม์นี้แสดงออกเฉพาะที่ส่วนกลาง (mid piece) ของเซลล์อสุจิระยะเต็มวัยและการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ นอกจากนั้นลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการจัดเรียงโครงสร้างของเซลล์อสุจิที่ขาดกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส 4 ยังผิดปกติด้วย ซึ่งเกิดจากสภาวะการทำลายจากการแย่งชิงอิเล็กตรอน (oxidative damage) ที่มากขึ้นในเซลล์อสุจิดังกล่าว การศึกษานี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่แสดงถึงความบกพร่องของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่อการเป็นหมัน

Uratal *et al.*, 2001 รายงานว่าการให้เอนโดทอกซิน (endotoxin) เพื่อเหนี่ยวนำการสร้างอนุมูลอิสระมากขึ้นส่งผลให้การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิลดลงและเสนอแนะว่าการรักษาที่เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเป็นอีกวิธีหนึ่งสำหรับชายที่เป็นหมันจากการติดเชื้อแบคทีเรียในระบบสืบพันธุ์

จากข้อมูลที่น่าเสนอทั้งหมดกล่าวได้ว่าอนุมูลอิสระเป็นตัวการสำคัญที่กำหนดสรีรวิทยาและการมีชีวิตของเซลล์อสุจิ การศึกษาการไม่ทำงานของท่อพอกอสุจิ (epididymis) จากสภาวะออกซิเดทีฟสเตรสผ่านทางระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการพัฒนากลยุทธ์การคุมกำเนิดรูปแบบใหม่ ในอนาคตงานวิจัยด้านการคุมกำเนิดจะมุ่งเน้นไปที่การศึกษาอนุมูลอิสระและเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งจะทำให้เกิดแนวความคิดใหม่ๆ ในการพัฒนาคุมกำเนิดในเพศชาย มิใช่เพียงแค่อับยั้งเซลล์อสุจิแต่ยังเป็นการสร้างความเสียหายให้กับเซลล์อสุจิผ่านทางกลไกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ การศึกษาในลักษณะนี้ตั้งอยู่บนพื้นฐานของกิจกรรมเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและเกี่ยวข้องกับการส่งผ่านสัญญาณภายในเซลล์อสุจิ การขัดขวางกระบวนการของระบบเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระจะทำให้ปริมาณของอนุมูลอิสระมากขึ้นหรือเปลี่ยนแปลงกระบวนการเจริญของเซลล์อสุจิ (maturation) ลดความสามารถของเซลล์อสุจิในการผสมพันธุ์ (Vernet *et al.*, 2004)

นอกจากการศึกษาเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระแล้วการศึกษาโปรตีนในเซลล์อสุจินั้นเป็นสิ่งสำคัญยิ่ง เนื่องจากดีเอ็นเอของเซลล์อสุจิในท่อพอกอสุจิหลังจากถูกปล่อยมีรูปร่างเป็นเกลียวพันกันและอัดแน่น (tightly supercoiled) มากกว่าดีเอ็นเอของเซลล์ยูคาริโอต (eukaryote) ทั่วไปประมาณ 6 เท่า โยดีเอ็นเอของเซลล์อสุจิในอันทะจะมีการถอดรหัสพันธุกรรมอย่างซ้ำๆ (Ward and Coffey, 1991) หลังจากนั้นจะเปลี่ยนแปลงอย่างมากขณะที่เจริญอยู่ในท่อพอกอสุจิ ทำให้มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการผสมกับไข่ในท่อ นำไข่อันเป็นการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนมากกว่าการเปลี่ยนแปลงในระดับการแสดงออกของยีน (Fraser, 1998) โดยปกติโปรตีนเป็นส่วนประกอบที่

พบมากที่สุดภายในเซลล์จึงเป็นเป้าหมายสำคัญของอนุมูลอิสระโดยคาดว่า อนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radical) มีประสิทธิภาพชักนำให้โปรตีนถูกทำลายมากที่สุด (Stadtman and Berlett, 1997) โครงสร้างโปรตีนเปลี่ยนแปลงจากกระบวนการออกซิเดชัน (protein oxidation) ซึ่งเกิดจากการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyls) และหมู่คาร์บอนิล (carbonyls) ในโมเลกุลโปรตีนผลในระดับทุติยภูมิส่งผลให้โปรตีนแตกหัก (protein fragmentation) เกิดโครงสร้างตาข่าย (crosslinking) และไม่พับตัว (unfolding) (Dean *et al.*, 1997) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ การเติมหมู่ไนโตรเจน (nitrosylation) (Ischiropoulos, 1998) หรือเพอรอกซีไนไตรท์ (peroxynitrite) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระรุนแรง (strong oxidant) เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไนตริกออกไซด์กับซูเปอร์ออกไซด์ (Ischiropoulos and Al-Mehdi, 1995) การเกิดไนเตรชัน (nitration) โดยการเติมหมู่อดีนิล (adenylation) ในกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine residues) ในเอนไซม์บางชนิด เช่น ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (Stadtman and Berlett, 1997) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงหน้าที่โปรตีนซึ่งรบกวนเมแทบอลิซึมของเซลล์ ในช่วงหลายปีนี้มีการศึกษาผลของโปรตีนที่ถูกออกซิไดซ์ (oxidized proteins) ต่อการเกิดพยาธิสภาพ ได้แก่ โรคจากการเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) โรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดแดงตีบ (atherosclerosis) ภาวะแก่ชรา (Cabiscol *et al.*, 2000) สำหรับการศึกษาผลของอนุมูลอิสระต่อรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในระบบสืบพันธุ์หนูยังมีน้อย โดย Wagenfeld *et al.* (1998) ศึกษาผลของการให้ออร์นิดาโซล (ornidazole) ต่อโปรตีนในพลาสมาที่อวัยวะสืบพันธุ์ พบการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์กับการคุมกำเนิด (contraception-associated protein 1; CAP1) ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25 กิโลดาลตัน นอกจากนั้นยังมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในระบบสืบพันธุ์หนูดังนี้

Kaur *et al.* (2006) ได้ศึกษาผลของไดเอทิลมาลีเอท (diethyl maleate; DEM) ต่อภาวะเจริญพันธุ์ของหนูเพศผู้เมื่อนำฉีดเข้าเยื่อช่องท้อง (intraperitoneal injection) 2 สัปดาห์ ลดระดับกลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione) เพิ่มระดับกลูตาไธโอนรูปออกซิไดซ์ (oxidized glutathione) ในอวัยวะ ความเข้มข้นออกซิเจนและการเคลื่อนที่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ศึกษาการแสดงออกของปัจจัยถอดรหัสพันธุกรรม (transcription factor) เช่น ยีนซีจุน (cjun) และซีฟอส (cfos) รวมทั้ง ยีนแอล-กลูตามิลซิสเตอีนซินเทส (L-glutamyl cysteine synthetase; GCS) และแมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (manganese superoxide dismutase; MnSOD) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบรีเวอร์สทรานสคริปต์ (RT-PCR) พบระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) ของยีนซีจุนและซีฟอสลดลงในลูกอัมพาต ในขณะที่ระดับเอ็มอาร์เอ็นเอของแอล-กลูตามิลซิสเตอีนซินเทสและแมงกานีสซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเพิ่มขึ้น สะท้อนให้เห็นว่าไดเอทิลมาลีเอท ส่งผลให้เกิดออกซิเด

ที่พืชตรงต่อความสามารถในการเจริญพันธุ์ในหนูเพศผู้และมีผลกระทบต่อส่วนประกอบอื่นในระบบเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระและปัจจัยควบคุมการถอดรหัสของยีน

Zubkova and Robaire (2004) ศึกษาการตอบสนองของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระส่วนต่างๆ ต่อสารก่ออนุมูลอิสระแอล-บูโทไธโอนิน-เอส, อาร์-ซัลฟอกซิมินหรือบีเอสโอ (L-buthionine-S,R-sulfoximine; BSO) ในท่อพักอสุจิ ตรวจจับน้ำอสุจิและตับหนู การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับอายุพบในตับและท่อพักอสุจิ การลดลงของกลูตาไธโอนส่งผลทำลายเนื้อเยื่อหนูอายุ 4 เดือนและ 21 เดือน อย่างเห็นได้ชัด บีเอสโอมีผลลดการเคลื่อนที่ของอสุจิระยะโตเต็มวัยในหนูทั้งสองกลุ่มอายุโดยเฉพาะอย่างยิ่งในหนูกลุ่มอายุมาก

มะระจีนก

พืชหลายชนิดเป็นแหล่งของสารลดความสมบูรณ์พันธุ์ตามธรรมชาติในสมัยโบราณหลายประเทศนำพืชเหล่านี้มาควบคุมความสมบูรณ์พันธุ์ แม้ว่าพืชพื้นเมืองหลายชนิดสามารถลดการกำเนิดลงได้แต่มีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติยับยั้งกระบวนการการสร้างอสุจิ (antispermatogenic process) (Naseem *et al.*, 1998) มะระจีนกเป็นพืชชนิดหนึ่งในจำนวนนั้นที่นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ มีชื่อเรียกทางวิทยาศาสตร์ว่า โมมอร์ดิกา คาแรนเทีย (*Momordica charantia* L.) ชื่อทั่วไปอื่นๆที่รู้จักกันดีเช่น บวบขบ (Bitter Gourd) คาเรลลี (Caraille) หรือบอลเซิมแอปเปิล (Balsam apple) อยู่ในตระกูลบวบ (Cucurbitaceae) เป็นพืชเขตร้อน ปัจจุบันพบอยู่ทั่วไป มะระจีนกเป็นพืชล้มลุก ลำต้นเป็นเถาเลื้อย ดอกเจริญมาจากข้อ มีผลรูปเหลี่ยม ผิวเปลือกขรุขระ มีปุ่มยื่นออกมา ผลอ่อนมีสีเขียวกลายเป็นสีส้มเหลืองเมื่อสุกงอม (Sathishseker and Subramanian, 2005) ผลอ่อนเป็นแหล่งของวิตามินซี วิตามินเอ ฟอสฟอรัสและเหล็ก แต่ละส่วนของมะระจีนกมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน เมล็ดมะระจีนกประกอบด้วยน้ำมัน 32 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งกรดสเตียริก (stearic acid) กรดไลโนเลอิก (linoleic acid) กรดโอเลอิก (oleic acids) ไพริมิดีนนิวคลีโอไซด์ไโซไซควิน (pyrimidine nucleoside vicine) อัลฟา-โมมอร์คาร์อิน (alpha-momorcharin) เบตา-โมมอร์คาร์อิน เลคติน (lectins) และโมเลกุลที่คล้ายอินซูลิน (Insulin-like molecules) (Scartezzini and Speroni, 2000) สารออกฤทธิ์ทางเคมี ได้แก่ โมมอร์คาร์อินส์ (momorcharins) โมมอร์ดีโนล (momordenol) โมมอร์ดีซิลิน (momordicilin) โมมอร์ดีซินส์ (momordicins) โมมอร์ดีซินิน (momordicinin) โมมอร์ดีน (momordin) โมมอร์โดลอล (momordolol) คาแรนทิน (charantin) คาเร็น (charine) คริปโตแซนทิน (cryptoxanthin) คูเคอร์บิตินส์ (cucurbitins) คูเคอร์บิตาซินส์ (cucurbitacins) คูเคอร์บิตานส์ (cucurbitanes) ไสโคลอาร์ทีนอลส์ (cycloartenols) ไดออสจีนิน (diosgenin) กรดอีเลโอสเตียริก (elaeostearic acid) อิริโธรไดออล (erythrodiol) กรดคาแลกตูโรนิก

(galacturonic acids) กรดเจนทิซิก (gentisic acid) กอยาไกลโคไซด์ (goyaglycosides) กอยาซาโปนินส์ (goyasaponins) มัลติฟลอเรนอล (multiflorenol) (Husain *et al.*, 1994; Scartezzini and Speroni, 2000; Parkash *et al.*, 2002) และสารออกฤทธิ์อื่นๆ เช่น ไกลโคไซด์ (glycosides) ซาโปนินส์ (saponins) อัลคาลอยด์ (alkaloids) ฟิกซ์ออยล์ (fixed oils) ไตรเทอร์ปีนส์ (triterpenes) โปรตีนและสเตอรอยด์ (steroids) มีฤทธิ์ในการรักษาบาดแผล กำจัดพยาธิ ยาขับระดู ต้านไวรัส หัด และตับอักเสบ ในประเทศตุรกีมีการใช้ผลแก่รักษาบาดแผลและแผลในกระเพาะอาหารได้เป็นอย่างดี ในประเทศอินเดียมีรายงานการใช้มะระจีนรักษาเบาหวาน ทำแท้ง กำจัดพยาธิ ยาคุมกำเนิด เพศหญิง รักษามาลาเรีย ยาระบาย บรรเทาอาการปวดประจำเดือน ขับน้ำนม รักษาโรคไขข้อ โรคผิวหนัง โรคกระดูกขาวย ริคสีดวงทวาร โรคปอดบวม โรคผิวหนังที่มีลักษณะแดงเป็นวง โรคไขข้ออักเสบและโรคหิด และเป็นผักรับประทานได้ (Grover and Yadav, 2004)

เนื่องจากมะระจีนก็มีสรรพคุณในการรักษามากมาย งานวิจัยในช่วงหลายสิบปีที่ผ่านมาให้ความสำคัญกับมะระจีนอย่างมาก เป็นต้นว่ามะระจีนช่วยรักษาเบาหวาน (Grover *et al.*, 2001; Vikrant *et al.*, 2001; Reyes *et al.*, 2006) ยับยั้งไวรัส เช่น ไวรัสเอดส์ (Lee-Huang *et al.*, 1990; Lee-Huang *et al.*, 1995; Schreiber *et al.*, 1999; Au *et al.*, 2000) งูสวัด (Bourinbaier and Lee-Huang 1996; Schreiber *et al.*, 1999) โปลิโอ ยับยั้งมะเร็ง (Clafin *et al.*, 1978; Jilka *et al.*, 1983; Lee-Huang *et al.*, 1995; Kusamran *et al.*, 1998; Singh *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 1999; Tazzari *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2001) ต้านอนุมูลอิสระ (Sathishsekar and Subramanian, 2005; Wu and Ng, 2007) รักษาโรคกระเพาะ (Yesilada *et al.*, 1999; Gürbüz *et al.*, 2000) รักษาการติดเชื้อ คลอเรสเตอรอลต่ำในเลือด (hypocholesteremia) (Jayasooriya *et al.*, 2000; Ahmed *et al.*, 2001; Noguchi *et al.*, 2001) ไตรกลีเซอไรด์ต่ำผิดปกติ (hypotriglyceridemic) ความดันโลหิตต่ำ (hypotension) (Wang and Ng, 2001) กระตุ้นภูมิคุ้มกันและฆ่าแมลง (Telang *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2006) มะระจีนก็มีฤทธิ์ในการลดความสมบูรณ์พันธุ์ทั้งในเพศชายและเพศหญิง ในเพศหญิงออกฤทธิ์ทำให้แท้งโดยสารที่มีชื่อว่าโมมอร์คาร์ดินและเบตา-โมมอร์คาร์ดิน (beta-Momorcharin) (Grover and Yadav, 2004) ในประเทศจีนมีการสำรวจว่าเมล็ดมะระจีนกใช้เป็นยาคุมกำเนิดในเพศหญิงได้อย่างมีประสิทธิภาพ

มีรายงานการศึกษาในหนูแรทเพศผู้ว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกด้วยแอลกอฮอล์ออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการสร้างอสุจิ (anti-spermatogenic activity) โดยลดจำนวนสเปออร์มาโทไซต์ (spermatocytes) สเปออร์มาทิดส์ (spermatids) และเซลล์อสุจิระยะเต็มวัย (spermatozoa) และลดกัมมันตภาพของแอนโดรเจน (androgenic activities) (Naseem *et al.*, 1998)

เทสโทสเทอโรน (testosterone)

การศึกษาต่อมไร้ท่อวิทยาของระบบสืบพันธุ์จำเป็นต้องมีการวัดระดับฮอร์โมน โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจความไม่สมบูรณ์พันธุ์ชายและหญิง (Amballi *et al.*, 2007) มีรายงานว่า Kuku *et al.* (1998) วัดระดับโกนาโดโทรปิน (gonadotropins) โพรแลคติน (prolactin) และเทสโทสเทอโรนในชายที่เป็นหมันพบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ของชายจำนวนนี้มีระดับฮอร์โมนในซีรัมผิดปกติหนึ่งชนิดหรือมากกว่า Olson (1991) วิเคราะห์ภาวะเจริญพันธุ์ในสุนัขโดยตรวจสอบร่างกายวิเคราะห์น้ำอสุจิ วัดฮอร์โมน ตรวจชิ้นเนื้ออัณฑะและการใช้เข็มแทงผ่านผิวหนังบริเวณอัณฑะเข้าไปในท่อพักน้ำเชื้อ (epididymal aspiration) de Souza *et al.* (2004) ประเมินภาวะเจริญพันธุ์ในสุนัขโดยใช้วิธีเจาะดูดด้วยเข็มขนาดเล็กเพื่อตรวจทางเซลล์วิทยา (fine needle aspiration cytology; FNAC) วัดระดับเทสโทสเทอโรนในซีรัม วัดปริมาณอัณฑะและวิเคราะห์น้ำอสุจิ Stricker *et al.* (2006) เน้นความสำคัญของการอ้างอิงค่าฮอร์โมนที่เกี่ยวกับการเจริญพันธุ์ในช่วงมีประจำเดือน งานวิจัยเหล่านี้ประสบความสำเร็จได้เนื่องจากมีการอ้างอิงระดับฮอร์โมน

ฮอร์โมนสำคัญในเพศชายมีหลายชนิดโดยเทสโทสเทอโรนสำคัญที่สุด งานวิจัยเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์ในเพศชายจำนวนมากมีการประเมินระดับของเทสโทสเทอโรนในร่างกาย (Morrow *et al.*, 1986; Dalsenter *et al.*, 1997; Trentacoste *et al.*, 2001; Kamischke *et al.*, 2003; Babu *et al.*, 2004; Chang *et al.*, 2004; Morales *et al.*, 2004; Isidori *et al.*, 2005; Mikhail, 2006; Gupta and Kachhawa, 2007) เทสโทสเทอโรนเกี่ยวข้องกับการพัฒนาลักษณะเพศชาย ผลผลิตจากอัณฑะในปริมาณมากและผลผลิตจากต่อมหมวกไตในปริมาณน้อย ส่วนในเพศหญิงรังไข่จะทำหน้าที่ผลิตเทสโทสเทอโรนจัดอยู่ในกลุ่มฮอร์โมนเพศชาย (androgen) มีหน้าที่ในร่างกายตลอดชีวิตโดยแบ่งเป็น 3 ช่วงคือ 1) ช่วงตั้งครรภ์และหลังเกิด (perinatal period) ช่วยพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ 2) วัยหนุ่มกระตุ้นการเปลี่ยนแปลงของร่างกายให้เจริญเป็นผู้ใหญ่ มีอวัยวะเพศและอัณฑะใหญ่ขึ้น ใบหน้าขยาย มีขนบริเวณหัวหน้า เสียงทุ้ม กล้ามเนื้อขยายและส่วนสูงเพิ่มขึ้น 3) วัยผู้ใหญ่ ช่วยรักษาความต้องการทางเพศ ผลิตอสุจิ มีขน ช่วยพัฒนากระดูกและกล้ามเนื้อให้มีขนาดใหญ่และแข็งแรง นอกจากเทสโทสเทอโรนจะมีผลกับการเจริญและพัฒนาลักษณะทางเพศชาย ได้แก่ อวัยวะเพศและหนวดเคราแล้ว ยังสัมพันธ์กับพฤติกรรมทางสังคม ได้แก่ จิตวิทยา ความรุนแรง การแสดงอำนาจ พฤติกรรมทางเพศ รวมถึงประสบการณ์ทางสังคม เช่น การแข่งขัน มีส่วนทำให้เทสโทสเทอโรนเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้เช่นเดียวกัน

ร่างกายควบคุมการสร้างเทสโทสเทอโรนโดยอาศัยการส่งสัญญาณทางเคมีจาก 2 แหล่งคือ ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ไปยังอัณฑะเพื่อกระตุ้นการผลิตเทสโทสเทอโรน ไฮโปทาลามัสควบคุมการผลิตฮอร์โมนในต่อมใต้

สมองส่วนหน้าโดยโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน (gonadotropin-releasing hormone; GnRH) กระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้สร้างฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมน (follicle-stimulating hormone; FSH) และลูทีไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone; LH) ลูทีไนซิงฮอร์โมนส่งสัญญาณให้อัณฑะคัดหลังเทสทอสเทอโรน เทสทอสเทอโรนที่มากเกินไปจะส่งสัญญาณไปยังขั้วที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้าผลิตลูทีไนซิงฮอร์โมนและเทสทอสเทอโรนน้อยลง เทสทอสเทอโรนน้อยเกินไปต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะถูกกระตุ้นให้ผลิตลูทีไนซิงฮอร์โมนมากขึ้นซึ่งกระตุ้นอัณฑะให้ผลิตเทสทอสเทอโรนมากขึ้น ระดับเทสทอสเทอโรนในเพศชายเปลี่ยนแปลงตลอดทั้งวัน โดยมีระดับสูงสุดในตอนเช้า ระดับของเทสทอสเทอโรนที่ต่ำสัมพันธ์กับอายุโดยพบว่าเมื่อชายอายุมากขึ้นร่างกายจะผลิตเทสทอสเทอโรนน้อยลงซึ่งเรียกว่า แอนโดรอปอส (andropause) นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับโรคของต่อมที่ผลิตและควบคุมเทสทอสเทอโรนรวมถึงเนื้อเยื่ออัณฑะที่เสียหายสามารถทำให้เทสทอสเทอโรนต่ำได้ ความเสียหายนี้อาจเกิดมาจากอุบัติเหตุ การติดเชื้อในลูกอัณฑะ มะเร็งอัณฑะ การฉายแสงหรือการให้สารเคมีในการรักษามะเร็งอัณฑะ โรคที่มีผลกับไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองส่วนหน้า ซึ่งได้แก่ โรคมะเร็ง การติดเชื้อและโรคภูมิคุ้มกันเนื้อเยื่อของตนเอง (autoimmune disease) ยาที่มีผลกับการทำงานต่อมของใต้สมองส่วนหน้า เช่น มอร์ฟินและสเตอรอยด์ รวมถึงโรคทางพันธุกรรมจากความผิดปกติของโครโมโซม สัญญาณที่บ่งบอกว่ามีเทสทอสเทอโรนในระดับต่ำประกอบด้วย ลดความต้องการทางเพศ อวัยวะเพศไม่แข็งตัว จำนวนอสุจิที่นับได้ลดลง ลดความสมบูรณ์พันธุ์ หน้าอกมีขนาดใหญ่ขึ้น หรืออาจมีอาการคล้ายผู้หญิงหมดประจำเดือน เช่น เป็นผื่นคัน ไม่มีสมาธิ และหูด

การตรวจเทสทอสเทอโรนโดยทั่วไปมักใช้การวัดเทสทอสเทอโรนในซีรัม แม้ว่าเทสทอสเทอโรนจะมีอยู่มากในอัณฑะทั้งในหนูแรทและคน การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นเทสทอสเทอโรนที่พบในอัณฑะหนูแรทมิใช่ตัวบ่งชี้การสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ซึ่งมากกว่าความเข้มข้นเทสทอสเทอโรนทั้งหมดที่พบในเลือดหนูแรทหลายเท่า แสดงให้เห็นว่าเทสทอสเทอโรนปริมาณมากในอัณฑะไม่มีหน้าที่ทางชีววิทยา (Jarow *et al.*, 2005) ในเพศชายเมื่อแสดงอาการว่ามีระดับเทสทอสเทอโรนต่ำซึ่งเป็นสัญญาณของกลุ่มอาการฮอร์โมนเพศต่ำกว่าปกติ (hypogonadism) หรือมีอาการโตช้าผิดปกติในเด็กชาย มักเริ่มต้นด้วยการวินิจฉัยระดับเทสทอสเทอโรนในซีรัมซึ่งหมุนเวียนอยู่ในเลือดประมาณ 98 เปอร์เซ็นต์รวมตัวอยู่กับโปรตีนโกลบูลินในซีรัม (sex hormone binding globulin; SHBG) และอัลบูมินประมาณ 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์อยู่ในรูปอิสระในพลาสมา เนื่องจากโกลบูลินจับกับเทสทอสเทอโรนด้วยแรงแน่นและเวลานานกว่าจะหลุดออกจากกัน คาดว่าไม่พบเทสทอสเทอโรนรูปอิสระก่อนจะแยกตัวออกไปเพื่อจับกับตัวรับฮอร์โมนกลุ่มเพศชาย (androgen receptor) ในทางกลับกันอัลบูมินจับกับเทสทอสเทอโรนด้วยแรงอ่อนกว่า และการ

แยกตัวระหว่างเทสโทสเตอโรนกับอัลบูมินเกิดได้เร็ว ดังนั้นจึงคาดว่าจะพบทั้งเทสโทสเตอโรนที่จับกับ อัลบูมินและเทสโทสเตอโรนที่เป็นอิสระในเนื้อเยื่อเป้าหมาย (Matsumoto and Bremner, 2004) เนื่องจากความแปรปรวนของโปรตีนขนส่งเทสโทสเตอโรน (testosterone transport protein) ส่งผลโดยตรงกับระดับความเข้มข้นเทสโทสเตอโรน เทสโทสเตอโรนรูปอิสระเท่านั้นที่เหมาะสมในการวินิจฉัยกลุ่มอาการผลิตฮอร์โมนเพศต่ำกว่าปกติ (Winters *et al.*, 1998)

การวินิจฉัยเทสโทสเตอโรนเริ่มขึ้นเมื่อ 30 ปีที่แล้วโดยการพัฒนาเทคนิคที่เรียกว่า อาร์ไอเอ (RIAs) ซึ่งสามารถทำได้แม้จะใช้เลือดปริมาณน้อยหลังจากสกัดสารอินทรีย์และการแยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟี หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาการวิเคราะห์ทางด้านอิมมูโนวิทยา (immunoassay) เพื่อตรวจสอบเทสโทสเตอโรนและฮอร์โมนชนิดอื่น เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอาร์ไอเอแบบเก่า การวิเคราะห์เทสโทสเตอโรนในปัจจุบันรวดเร็วและจำเพาะกว่าใช้ซีรัมปริมาณน้อยกว่า ไม่เกี่ยวข้องกับการสกัดหรือโครมาโตกราฟี และมีราคาถูกกว่า ปัจจุบันการวัดระดับเทสโทสเตอโรนมีหลายวิธี เช่น วิธีอาร์ไอเอ ชุดตรวจทางอิมมูโนวิทยา รวมทั้งชุดตรวจทางอิมมูโนวิทยาแบบแพลตฟอร์มอัตโนมัติ (automates platform immunoassays) ซึ่งมักตรวจโดยสารเรืองแสง (chemiluminescent) (Matsumoto and Bremner, 2004) การวิเคราะห์เทสโทสเตอโรนโดยใช้วิธีโคทเอเคอร์ (Coat-A-Count Total testosterone assay) เป็นการวิเคราะห์เทสโทสเตอโรนอีกวิธีหนึ่งที่นิยมใช้เนื่องจากทดสอบเพียงขั้นเดียว และไม่มี การสกัด ควบคู่ไปกับกระบวนการไฮโครไลซิสของกรด ใช้วัดระดับเทสโทสเตอโรนในซีรัมที่ยังไม่ได้สกัดหรือพลาสมาที่ใส่เฮพาริน (heparinized plasma) รวมถึงตัวอย่างปัสสาวะ โดยติดฉลากสารเทสโทสเตอโรน (analog) ด้วยไอโอดีน-125 เพื่อแข่งกับเทสโทสเตอโรนอิสระในพลาสมาเข้าจับกับแอนติซีรัมที่จำเพาะกับเทสโทสเตอโรน (testosterone-specific antiserum) ที่เคลือบอยู่บนผิวหลอดโพลีโพรพิลีน (polypropylene tube) โดยคาดว่าจะไม่มีอิทธิพลจากโกลบูลินและอัลบูมินที่มีต่อความเข้มข้นเทสโทสเตอโรนรูปอิสระ (Winters *et al.*, 1998)

จากหลักฐานจำนวนมากในสมัยโบราณของหลายประเทศ รวมทั้งรายงานสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์แสดงให้เห็นว่ามะเร็งขึ้นก็มีฤทธิ์ทำให้เป็นหมันในคนและสัตว์ทดลอง เนื่องจากอนุมูลอิสระเป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการเป็นหมัน การศึกษาฤทธิ์ในการทำให้เป็นหมันในมะเร็งขึ้นกว่าเกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระจึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง โดยการศึกษาและทำความเข้าใจอนุมูลอิสระผ่านทางกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและการแสดงออกของโปรตีนควบคู่ไปกับการตรวจสอบระดับเทสโทสเตอโรนเพื่อตรวจสอบภาวะการเจริญพันธุ์ เนื่องจากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของฮอร์โมนและความผิดปกติในการสืบพันธุ์ยังมีจำนวนน้อย (de Souza *et al.*, 2004) และยังไม่มีการวินิจฉัยความสัมพันธ์ระหว่างเทสโทสเตอโรนและอนุมูล

อิสระ การศึกษานี้จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการค้นหาวิธีคุมกำเนิดและยาคุมกำเนิดในอุดมคติของเพศชายในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูเพศผู้พันธุ์วีสตาร์จากสำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล น้ำหนักตั้งแต่ 250-300 กรัม อายุประมาณ 8 อาทิตย์ ขังหนูไว้ในกรงเดี่ยวในห้องที่ระบายอากาศดี อุณหภูมิประมาณ 25-36±1 องศาเซลเซียส ช่วงสว่าง 12 ชั่วโมง มีช่วงเวลาระหว่าง 6.00-18.00 น. ช่วงมืด 12 ชั่วโมง มีช่วงเวลาระหว่าง 18.00-6.00 น. ให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูป และจัดน้ำดื่มให้กินได้ตลอดเวลา หนูทั้งหมดจะได้รับการปรับตัวเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ได้ทดลองความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศผู้โดยให้หนูเพศผู้แต่ละตัวผสมพันธุ์กับหนูเพศเมีย 2 ตัว ในช่วงผสมพันธุ์ทำวาไจนาลสเมียร์ (vaginal smear) ถ้าหนูเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้แล้วให้แยกเพศเมียนั้นออกมา หลังจากนั้น 8-10 วัน นำมาตรวจความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูเพศผู้โดยการนับสัดส่วนเปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนกับคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) ถ้าหนูเพศผู้ตัวใดมีการเจริญพันธุ์เฉลี่ยสูงกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะนำอั้นตะมาใช้ทดสอบต่อไปโดยข้างหนึ่งใช้ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและอีกข้างหนึ่งใช้ทดสอบรูปแบบโปรตีน

2. การสกัดสารจากมะระขี้นก

นำผลมะระขี้นกสุกที่หาได้ในท้องถิ่นมาตากให้แห้งใช้เวลาประมาณ 4-5 วัน นำเมล็ดตากแห้ง ทำเป็นผง และสกัดด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยชุดอุปกรณ์ซอกซ์เลท (soxhlet apparatus) ยี่ห้อไฟเร็กซ์ ประเทศสหรัฐอเมริกา หลังจากนั้นระเหยเอธานอลออกด้วยอีแวปอเรเตอร์ (evaporator) ยี่ห้อบูซิ ประเทศสวีเดนแลนด์ และทำให้แห้งด้วยฟิซดรายเออร์ (freeze dryer) ยี่ห้อฮีโต เอฟดี3 ประเทศเดนมาร์ก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เตรียมสารละลายเพื่อนำมาทดลองโดยละลายสารที่สกัดได้ด้วยไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) 1.5 มิลลิลิตร

3. แผนการทดลอง

หลังจากประเมินความสมบูรณ์พันธุ์หนูเพศผู้แล้ว แบ่งหนูเพศผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์จำนวน 21 ตัว ออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว ดังนี้:

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ป้อนดีเอ็มเอสโอ (DMSO) 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 400 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ละลายในดีเอ็มเอสโอ (DMSO) 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 800 มิลลิกรัม น้ำหนักแห้ง/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ละลายในดีเอ็มเอสโอ (DMSO) 1.5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 42 วัน

หนูทั้งหมดจะถูกฆ่าโดยสลบด้วยอีเธอร์หลังการให้สารครั้งสุดท้าย 24 ชั่วโมง บันทึกน้ำหนัก แล้วแยกชิ้นส่วนอวัยวะออกมาโดยนำไปแช่น้ำเกลือความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ ทันที ลอกชิ้นส่วนไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก ชั่งน้ำหนักอวัยวะในหน่วยมิลลิกรัม

4. การทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์

การหาค่าความสมบูรณ์พันธุ์ โดยใช้วิธีผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยใช้หนูเพศเมีย 2 ตัว ชั่งร่วมกับหนูเพศผู้ 1 ตัว ในกรงสแตนเลสภายในเวลา 7 วัน ทำวาไจนาลสเมียร์หนูเพศเมียทุกวัน ในช่วงเช้า เวลาระหว่าง 8.00-9.00 น. วิธีการทำวาไจนาลสเมียร์ใช้สำลีพันก้าน (cotton tip stick) จุ่มในโซเดียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ สอดเข้าไปในช่องคลอดเบาๆ ลึกประมาณ 5-8 มิลลิเมตร ชูดเบาๆ และสเมียร์ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด จากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อสังเกตหาระยะการเป็นสัด รวมทั้งสังเกตร่องรอยของการผสมพันธุ์คือ หากหนูเพศผู้ได้ผสมพันธุ์กับหนูเพศเมียแล้วจะพบอสุจิที่คงค้างอยู่บริเวณนี้ ซึ่งถ้าหากพบเช่นนั้นแล้วให้แยกหนูเพศเมียออกจากกรงเพื่อแยกเลี้ยงเป็นเวลา 8-10 วัน เมื่อครบตามเวลาที่กำหนดหนูเพศเมียจะถูกทำให้สลบ และผ่าตัดแยกรังไข่และมดลูกออกมาเพื่อนับจำนวนตัวอ่อนที่ฝังตัวบนปีกมดลูก จำนวนตัวอ่อนบนปีกมดลูกจะถูกจดบันทึกไว้ จากนั้นนำรังไข่มาตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียมจากเนื้อเยื่อรังไข่จดบันทึกจำนวนคอร์ปัสลูเทียมที่สังเกตได้จากนั้นนำมาหาเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์โดยคำนวณจากสูตรข้างล่างนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ฝังตัว}}{\text{จำนวนคอร์ปัสลูเทียม}} \times 100$$

5. การชั่งน้ำหนักตัว

บันทึกน้ำหนักตัวหนูเพศผู้เพื่อปรับปริมาณสารสกัดทุกๆ 1 อาทิตย์

6. การวัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส และคาตาเลส ในอวัยวะ

วัดกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดสตามวิธีของ Paglia and Valente (1967) โดยมีหลักการและวิธีการคือ กลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดส เร่งปฏิกิริยาการออกซิเดชัน (oxidation) ของกลูตาไรโอนโดยควิมีนไฮโดรเปอร์ออกไซด์ (cumene hydroperoxide) ในกรณีที่มีนิโคตินาไมด์ดีเอ็นไอไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตไดแอสเฟอเรส (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate diaphorase) และกลูตาไรโอนรีดักเตส ออกซิไดซ์กลูตาไรโอนถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูปรีดิวซ์ (reduced form) ร่วมกับการออกซิเดชันของ นิโคตินาไมด์ดีเอ็นไอไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต ไดแอสเฟอเรสไปเป็นนิโคตินาไมด์ดีเอ็นไอไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟตไดแอสเฟอเรสที่มีประจุบวก และวัดได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงที่ 340 นาโนเมตร ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) กิจกรรมของกลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดสวัดได้โดยใช้ชุดเครื่องมือแรนเซล (Ransel kit) ของบริษัท แรนด็อกซ์ลาบอราทอรีส์ (Randox Laboratories, Ltds, UK)

กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสวัดโดยใช้ชุดเครื่องมือแรนเซลดังที่ได้กล่าวมาแล้วเช่นเดียวกัน มีหลักการดังนี้คือ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเกี่ยวข้องกับการดิสมิวเตชันของอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และโมเลกุลออกซิเจน (molecular oxygen) วิธีนี้ใช้แซนทีน (xanthine) และแซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase) เป็นตัวให้กำเนิดอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ 2-(4-ไอโอดิโนล)-3-(4-ไนโตรฟีนอล)-5-ฟีนิลเตตระโซเลียม คลอไรด์ (2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride) เพื่อเปลี่ยนเป็นสารสีแดงของสีฟอร์มazan (formazan dye) กิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสวัดโดยการยับยั้งปฏิกิริยานี้

วัดกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสจากการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ตามวิธีของ Aebi (1984) กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสวัดในหน่วย Bergmeyer ซึ่งหมายถึงมิลลิโมลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ย่อยสลายต่อนาทีต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 7 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

สำหรับการวิเคราะห์ห้ระดับของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไรโอนเปอร์ออกซิเดสและคาตาเลสในชิ้นเนื้อเยื่อเตรียมโดยนำเนื้อเยื่อให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ในเอสทีอีบัฟเฟอร์ (STE buffer) (พีเอช 7.4) ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส (sucrose) 0.25 โมลาร์ (M) ทริส-ไฮโดรคลอไรด์ (Tris-HCl) 10 มิลลิโมลาร์และกรดเอทิลีน-ไดเอมีนเตตระอะซีติก (ethylene-

diaminetetraacetic acid) 1 มิลลิโมลาร์ ที่ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นเนื้อเยื่อในบัฟเฟอร์นี้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยเซนติฟิวส์ (centrifuge) ที่ $15000 \times g$ เป็นเวลา 30 นาที นำของเหลวชั้นบน (supernatant) ลักษณะขุ่นที่แยกตัวออกมาปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ $12000 \times g$ ของเหลวชั้นบนขุ่นชั้นที่ได้นำมาใช้ประเมินกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและกลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสโดยใช้ชุดเครื่องมือที่กล่าวไว้ข้างต้น วัดค่าของโปรตีนในเนื้อเยื่อที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยวิธีของลาวรี (Lowry's method) (Lowry *et al.*, 1951) กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสในเนื้อเยื่อแสดงออกเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัม โปรตีน กิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสแสดงออกเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อนาที

7. การตรวจสอบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนโดยวิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

7.1 การสกัดโปรตีน

นำอวัยวะมาทำให้ชิ้นเนื้อเล็กๆ แล้วทำให้เป็นเนื้อเดียวกันในไอซ์โคล (ice-cold) ทริส (Tris) 40 มิลลิโมลาร์ สารละลายเอดีทีเอ (EDTA) พีเอช 7.0 ที่มีตัวยับยั้งเอนไซม์โปรตีเอส (protease) 2 มิลลิโมลาร์ (น้ำหนักเนื้อเยื่อ: ปริมาณบัฟเฟอร์เป็นสัดส่วน 1:3) หลังจากการสกัดโปรตีนบนน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้ว นำเนื้อเยื่อที่ถูกทำให้เป็นเนื้อเดียวกันไปปั่นเหวี่ยงที่ $15000 \times g$ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเก็บสารละลายชั้นบน ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยแบ่งสารละลายชั้นบนส่วนหนึ่งไปวัดความเข้มข้นโปรตีน โดยวิธีของลาวรี โดยใช้โบทินซีรัมอัลบูมิน (bovine serum albumin; BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

7.2 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมตัวอย่างโดยผสมโปรตีนที่สกัดได้กับแลมลิแซมเปิลบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 2 เท่า (2X Laemmli sample buffer) (Laemmli, 1970) ซึ่งประกอบด้วยสารรีดิวซิง (reducing agent) คือเบตาเมอร์แคปโทเอทานอล (β -mercaptoethanol) ใช้วิธีแยกโปรตีนบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลระบบไม่ต่อเนื่อง (discontinuous system) โดยใช้ตัวอย่างโปรตีน 12 ไมโครกรัม และใช้เปอร์เซ็นต์เจล 12 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก/ปริมาตร ทั้งชั้นบน (stacking) และชั้นล่าง (separating) ย้อมเจลโดยใช้สีคูมาสซีบลู (coomassie blue)

8. การวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในซีรัมและในของเหลวอัมตะ

วัดความเข้มข้นเทสโทสเตอโรน ในหนูเพศผู้กลุ่มเดียวกันเพื่อสำรวจพฤติกรรมทางเพศ หลังจากฆ่าหนูโดยสลบด้วยอีเธอร์แล้วเก็บเลือด นำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเซนติฟิวส์แยกซีรัมออกมาและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวิเคราะห์ ซีรัมและสารละลายที่ได้จากการสกัดโปรตีนในอัมตะจะนำมาใช้วัดความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนในซีรัมและในอัมตะต่อไป วัดความเข้มข้นของเทสโทสเตอโรนโดยวิธีวิเคราะห์ทางอิมมูโนวิทยาค่ายรังสีหรืออาร์ไอเอโดยใช้ชุดเครื่องมือโคท-เอ-เคาท์นั้โททัลเทสโทสเตอโรน ปีเปต 50 ไมโครลิตรของชุดมาตรฐานเพื่อสร้างกราฟมาตรฐาน ชุดควบคุมและซีรัมหรือสารละลายจากอัมตะหนูแรท ลงไปในแต่ละหลอดที่ทำสัญลักษณ์ไว้ หลังจากนั้นเติมเทสโทสเตอโรนที่ติดฉลากไอโอดีน-125 1 มิลลิลิตร ลงไปทุกหลอดทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วเทสารที่เหลือในหลอดทดลองออกให้หมดทุกหลอดยกเว้นหลอดโททัลเคาท์ (total count) ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2 ถึง 3 นาที แล้วนับค่าเป็นเวลา 1 นาที ในเครื่องนับรังสีแกมมา (Gamma counter) แต่ละตัวอย่างทดลองทำ 2 ซ้ำ แล้วนำค่าเฉลี่ยที่ได้มาใช้ในหน่วยนาโนกรัม/มิลลิลิตร

9. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (mean± SE) สำหรับความแตกต่างของน้ำหนักตัว ระดับเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร้ออกซิเดส ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสและคาตาเลส รวมทั้งความเข้มข้นเทสโทสเตอโรน ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มทดลอง (Completely Random Design; CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูล (Analysis of Variance; ANOVA) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มตัวอย่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

10. สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการกลาง ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11. ระยะเวลาทำการวิจัย

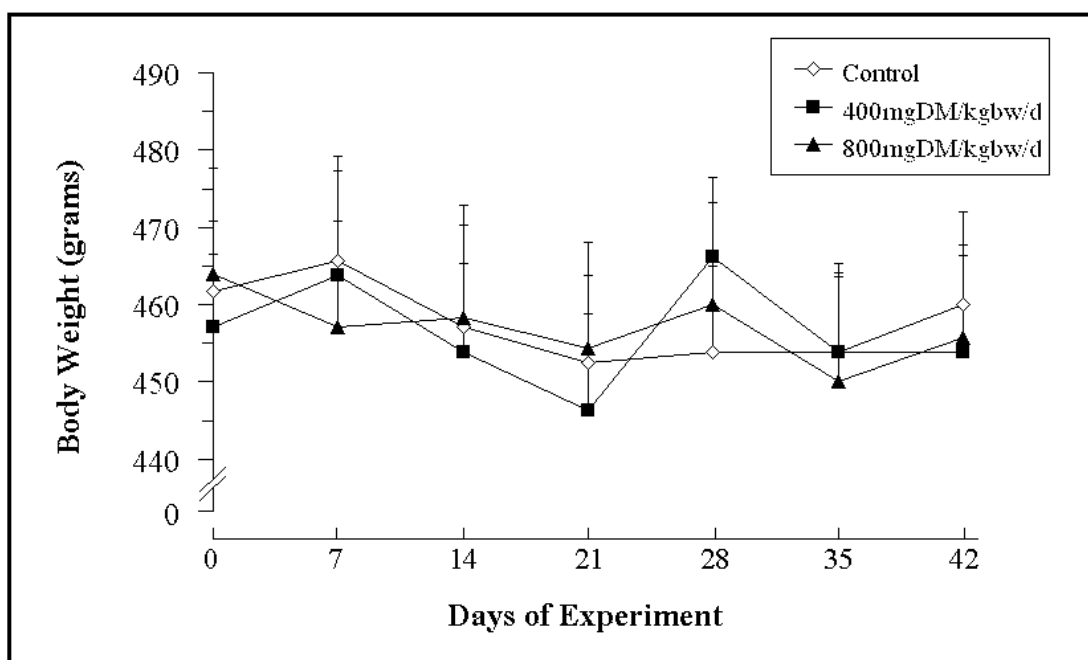
เดือนตุลาคม พ.ศ. 2551-เดือนกันยายน พ.ศ.2552

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว

น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ก่อนการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 461.67 ± 9.1 , 457.14 ± 9.44 และ 464 ± 13.63 กรัม ตามลำดับ (ภาพที่ 1) น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 460 ± 11.95 , 453.75 ± 12.67 และ 455.71 ± 11.92 กรัม ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันตลอด 42 วันของการทดลอง ($P > 0.05$)



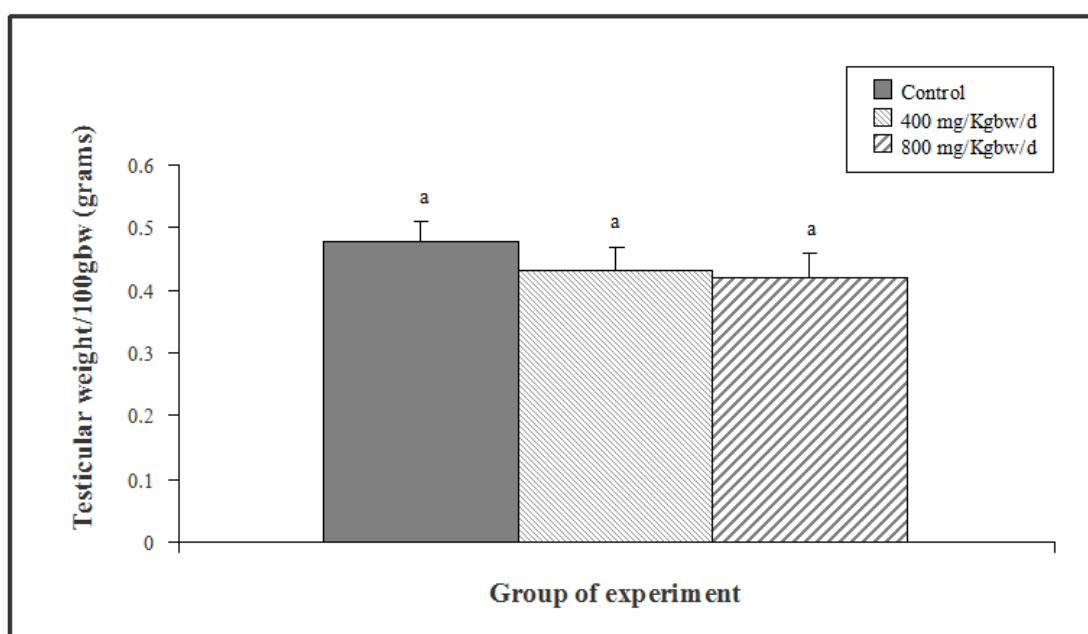
ภาพที่ 1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของหนูวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลองตลอดการทดลอง 42 วัน

ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$

2. การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักอวัยวะในระบบสืบพันธุ์

2.1 น้ำหนักเฉลี่ยของอัณฑะ

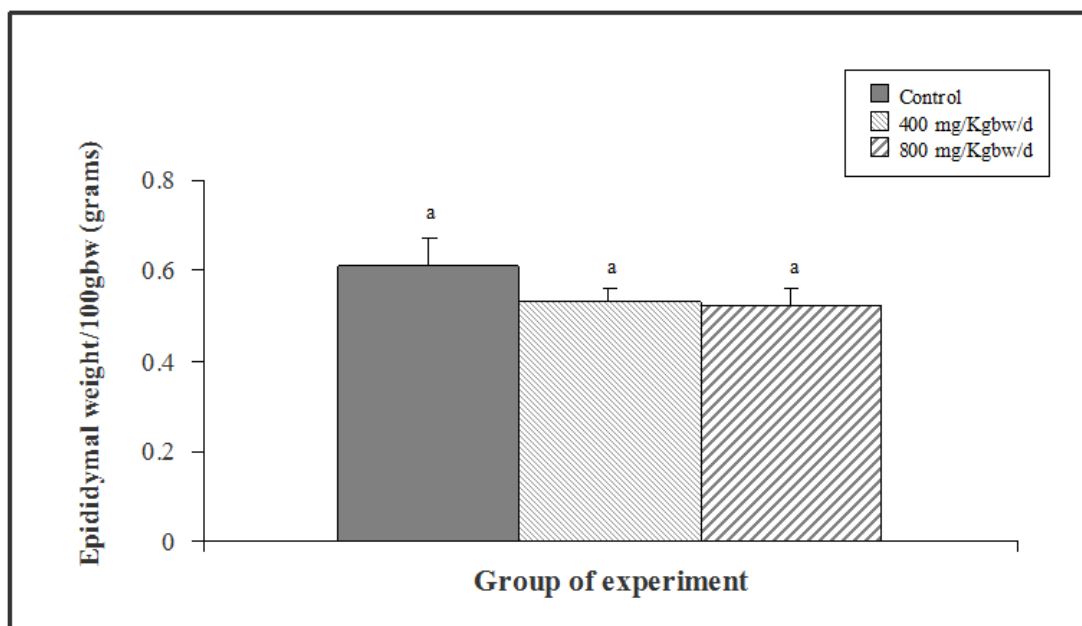
น้ำหนักเฉลี่ยของอัณฑะของหนูกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.48 ± 0.03 , 0.43 ± 0.04 และ 0.42 ± 0.04 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ (ภาพที่ 2.1) และพบว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยอัณฑะอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)



ภาพที่ 2 .1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยอัณฑะ (กรัมต่อ 100 กรัม น้ำหนักตัว) หนูวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง ตัวอักษรเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$

2.2 น้ำหนักเฉลี่ยของท่อทักเชื้ออสุจิ

น้ำหนักเฉลี่ยของท่อทักเชื้ออสุจิหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.61 ± 0.06 , 0.53 ± 0.06 และ 0.52 ± 0.05 กรัมต่อน้ำหนักตัว 100 กรัมตามลำดับ (ภาพที่ 2.2) จากการทดลองพบว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของท่อทักเชื้ออสุจิ ($P > 0.05$)

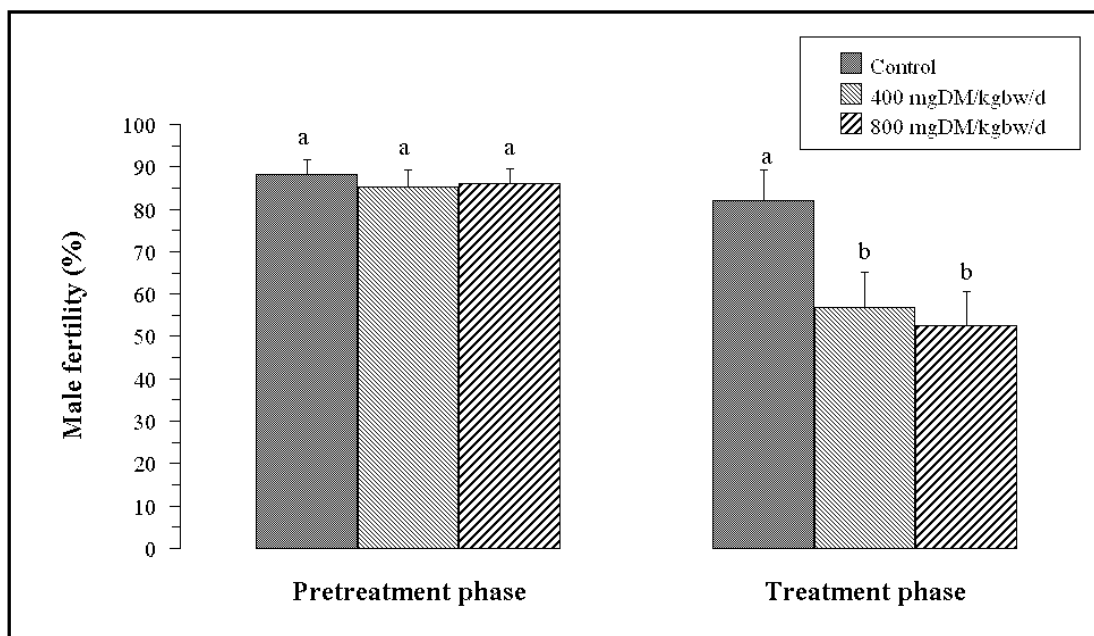


ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อ 100 กรัมน้ำหนักตัว) ของท่อพักเชื้ออสุจิหนูวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลองเมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง

ตัวอักษรเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$

3.ความสมบูรณ์พันธุ์

เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เมื่อเริ่มการทดลอง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 88.09 ± 3.65 , 85.34 ± 3.88 และ 85.98 ± 3.51 ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์พันธุ์ระหว่างกลุ่มการทดลองไม่แตกต่างกันเมื่อเริ่มการทดลอง ($P > 0.05$) เปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์เฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 หลังให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนเป็นเวลา 42 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 82.05 ± 7.18 , 56.93 ± 8.13 และ 52.42 ± 8.12 ตามลำดับ พบว่าค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์พันธุ์ของกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ลดลงเป็น 57 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์พันธุ์ 82 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) การเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดเป็นสองเท่าไม่ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยความสมบูรณ์พันธุ์ของกลุ่มที่ให้สารสกัดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน มีแนวโน้มส่งผลลดความสมบูรณ์พันธุ์มากกว่าที่ระดับสารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน

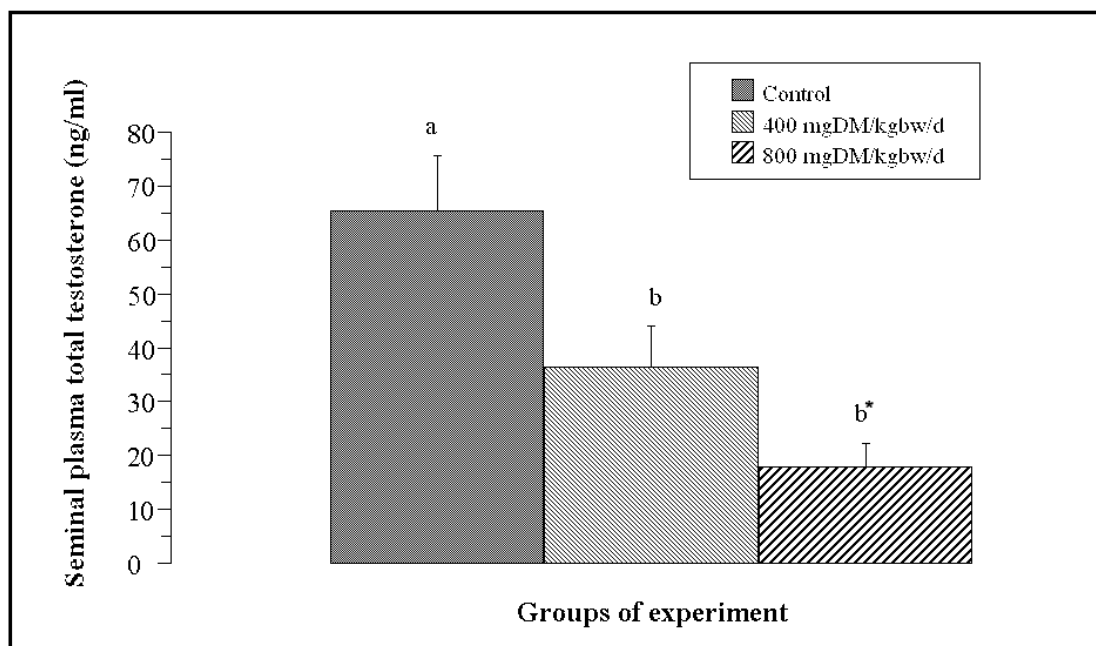


ภาพที่ 3 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์ความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูvistาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เปรียบเทียบก่อนเริ่มการทดลอง (pretreatment phase) และเมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง (treatment phase)

^s ^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

4. การเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอณฑะ

ระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอณฑะเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 65.20 ± 10.37 , 36.45 ± 7.61 และ 18.17 ± 4.67 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 4) การให้สารสกัดจากมะระขี้นก 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ส่งผลระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอณฑะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามการลดลงของระดับเทสโทสเตอโรนเมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ($P > 0.05$)



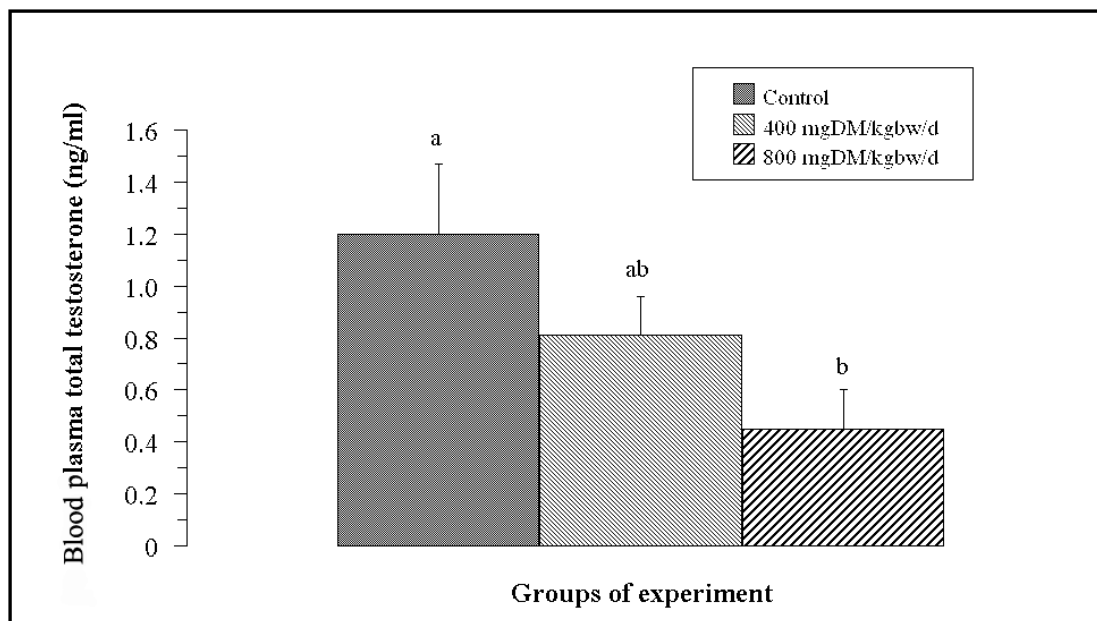
ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงระดับเทสโทสเทอโรนเฉลี่ย (นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร) ในของเหลวอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง

^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$ (*)

5. การเปลี่ยนแปลงของระดับเทสโทสเทอโรนในพลาสมาเลือด

ระดับเทสโทสเทอโรนในพลาสมาเลือดเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.20 ± 0.27 , 0.81 ± 0.15 และ 0.45 ± 0.15 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร. ตามลำดับ (ภาพที่ 5) ระดับความเข้มข้นของเทสโทสเทอโรนในพลาสมาเลือดในกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) แต่เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 800 มก. มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน พบว่าระดับความเข้มข้นของเทสโทสเทอโรนในพลาสมาเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีน 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน

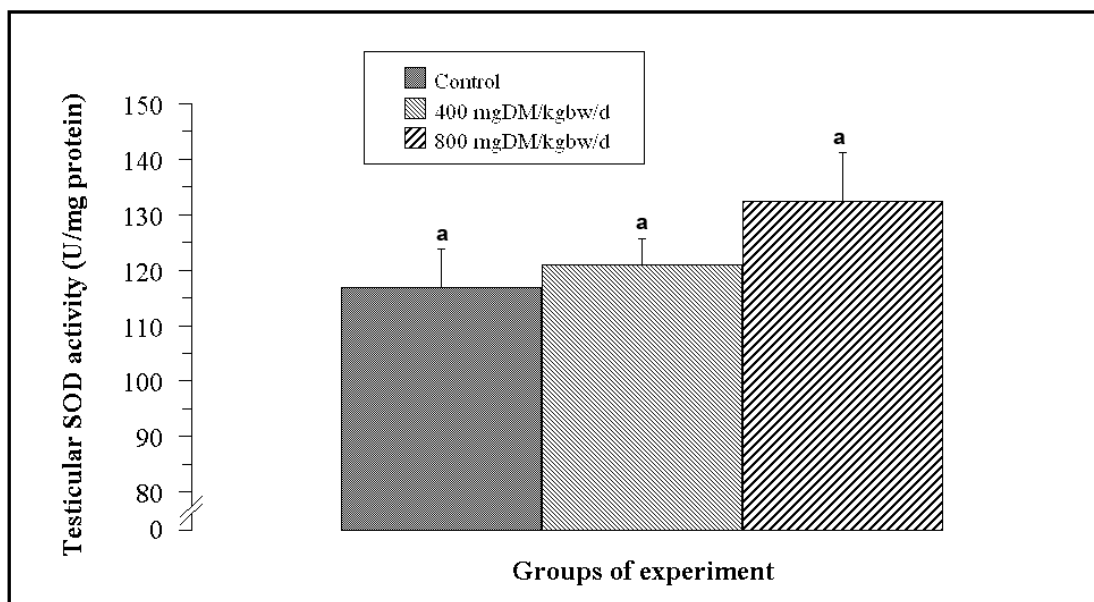


ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงระดับเทสโทสเตอโรนเฉลี่ยในพลาสมาเลือดของหนูวิสตาห์แต่ละกลุ่ม การทดลอง ตลอดการทดลอง 42 วัน

^{a,b}; ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.01$

6. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในของเหลวอัมตะ

กิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสในของเหลวอัมตะเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 116.94 ± 6.79 , 120.97 ± 4.74 และ 132.49 ± 8.74 ยูนิตต่อ มิลลิกรัม โปรตีนตามลำดับ (ภาพที่ 6) จากการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

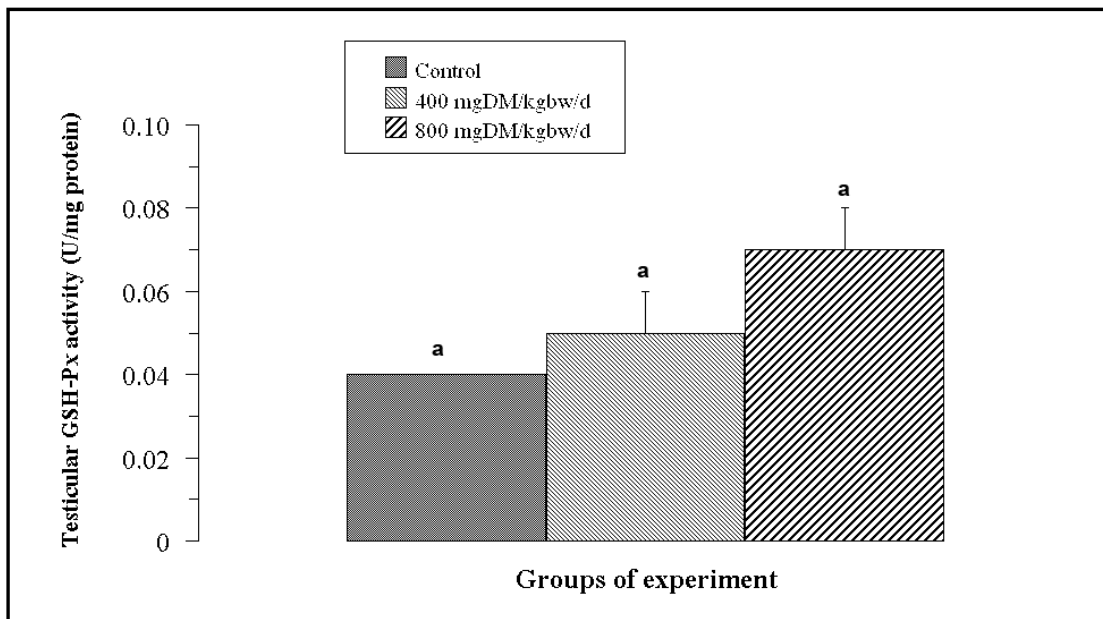


ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (หน่วยต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน) ในของเหลวอันทะหนุวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง

ตัวอักษรเดียวกันแสดงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P>0.05$

7. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร้ออกซิเดสในของเหลวอันทะ

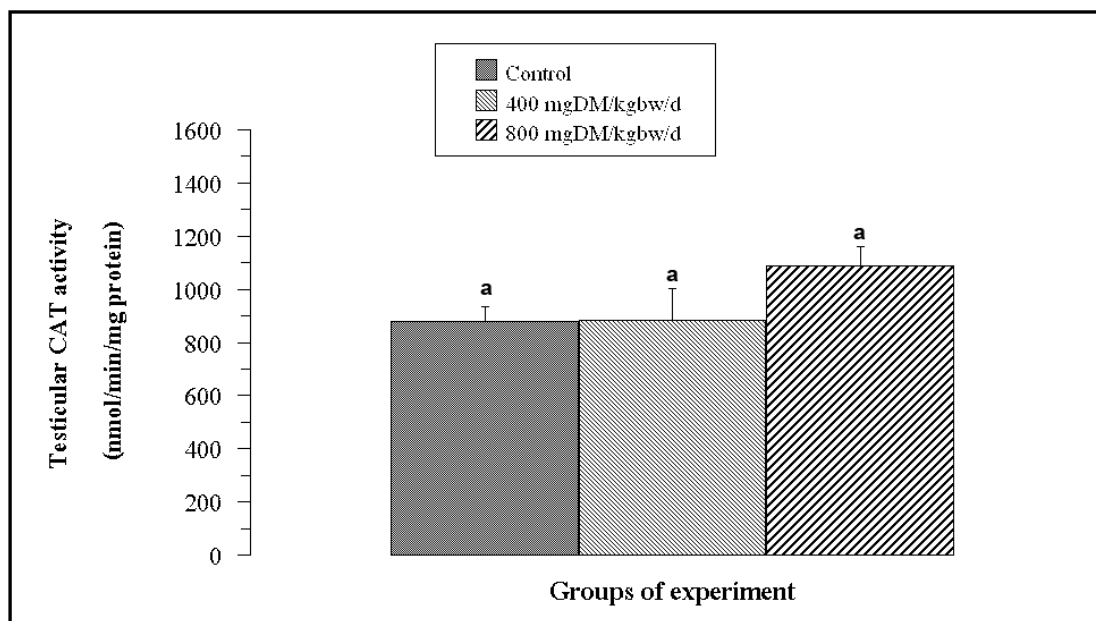
กิจกรรมของเอนไซม์กลูตาไรโอนเปอร้ออกซิเดสในของเหลวอันทะเจลี่ยของหนุแรทเพส ผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.04 ± 0.00 , 0.05 ± 0.01 และ 0.07 ± 0.01 หน่วยต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน ตามลำดับ (ภาพที่ 7) จากการทดลองไม่พบความแตกต่าง ($P>0.05$) ระหว่างกิจกรรมของ กลูตาไรโอนเปอร้ออกซิเดสในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 7 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (ยูนิตต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีน) ในของเหลวอัมชะหนูวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง ตัวอักษรเดียวกันแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P > 0.05$

8. การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสในของเหลวอัมชะ

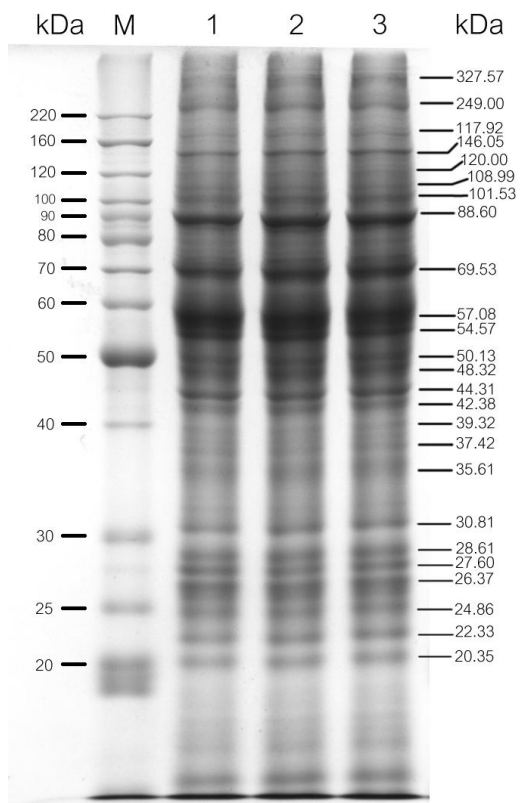
กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสในของเหลวอัมชะเฉลี่ยของหนูแรทเพศผู้ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 879.77 ± 53.53 , 883.91 ± 117.37 และ 946.14 ± 48.88 นาโนโมลต่อ 1 นาทีต่อ 1 มิลลิกรัม โปรตีนตามลำดับ (ภาพที่ 8) จากการทดลองไม่พบความแตกต่าง ($P > 0.05$) กิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลสในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง



ภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์คาตาเลส (นาโนโมลต่อ 1 นาทีต่อ 1 มิลลิกรัมโปรตีน) ในของเหลวอัณฑะเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง ตัวอักษรเดียวกันแสดงความไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P>0.05$

9. รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน

รูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในอัณฑะจากการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ไม่มีความแตกต่าง (ภาพที่ 9) พบแถบโปรตีน 27 แถบ ไม่แตกต่างกันในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนอยู่ระหว่าง 12.2-327.6 กิโลดาลตัน (kilodalton) และแถบโปรตีนที่เด่นชัดมีน้ำหนักโมเลกุล 88.6, 69.5 และ 57.2 กิโลดาลตัน



ภาพที่ 9 รูปแบบโปรตีนของเหล่าอ้นทะเลหนูวิสตาร์แต่ละกลุ่มการทดลอง เมื่อวันที่ 42 ของการทดลอง

หมายเหตุ: ตรวจสอบรูปแบบโปรตีนโดยวิธีโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส และย้อมสีคูมาสซีบลู

ช่อง M= โปรตีนมาตรฐาน (marker)

ช่อง 1= โปรตีนจากอ้นทะเลหนูวิสตาร์กลุ่ม 1

ช่อง 2= โปรตีนจากอ้นทะเลหนูวิสตาร์กลุ่ม 2

ช่อง 3= โปรตีนจากอ้นทะเลหนูวิสตาร์กลุ่ม 3

บทที่ 4

สรุป

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกความเข้มข้น 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วันต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในหนูวิสตาร์ สรุปได้ดังนี้

1. สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นก 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วันส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์หนูวิสตาร์เพศผู้ 57 และ 52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
2. สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะและน้ำหนักต่อพักเชื้ออสุจิของหนูวิสตาร์เพศผู้
3. สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วันส่งผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและในพลาสมาเลือด
4. สารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและคาตาเลสในอวัยวะหนูวิสตาร์เพศผู้
5. การป้อนสารสกัดจากเมล็ดมะระขี้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ติดต่อกันเป็นเวลา 42 วัน ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของโปรตีนในอวัยวะหนูวิสตาร์เพศผู้

วิจารณ์

สารสกัดเมล็ดมะระขี้นกด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ประมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ไม่ส่งผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะและน้ำหนักต่อพักเชื้ออสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในกลุ่มการทดลองทั้ง 3 กลุ่ม Naseem *et al.* (1998) รายงานไว้ว่าสารสกัดเมล็ดมะระขี้นกมีแนวโน้มทำให้น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น ท่อพักเชื้ออสุจิ ต่อมลูกหมาก เซมินัลเวสิเคิล (seminal vesicle) และลิเวเตอร์แอนไน (levator ani) มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งรายงานไว้ว่าเกิดจากฤทธิ์ทำให้เกิดลักษณะความเป็นเพศชาย (androgenic activity) นอกจากนั้นยังพบว่าเนื้อเยื่ออวัยวะและท่อพักเชื้ออสุจิบางบริเวณถูกทำลายเนื่องจากกระบวนการสร้างอสุจิมีการหยุดชะงักจากการศึกษาทางมิชชีวิทยา แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก

อัมตะและท่อพักเชื้ออสุจิ แสดงว่าสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกไม่ส่งผลข้างเคียงในการลดน้ำหนักอวัยวะในระบบสืบพันธุ์

การให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติแก่หนูวิสตาร์เพศผู้ แต่พบว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกปริมาณ 1,200 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ทำให้หนูวิสตาร์ตายไปครึ่งหนึ่ง (LD₅₀) และทำให้อวัยวะภายในเช่น ตับ ปอด หัวใจเปลี่ยนแปลงสภาพ (Abalaka *et al.*, 2009) การให้สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากผลมะระจีนกปริมาณปานกลางเป็นระยะเวลายาวนานไม่ก่อให้เกิดความเสียหายที่ตับ อย่างไรก็ตามการให้สารสกัดจากผลมะระจีนก 500 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ส่งผลการสังเคราะห์ไตรไอโอโรโรนิน (triiodothyronine; T₃) และไทรโรซีน (thyroxine; T₄) ในซีรัมและเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) ที่ตับ (Panda and Kar, 2000) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตับจากการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก ปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน อย่างมีนัยสำคัญ

เอนไซม์สร้างอนุมูลอิสระมีหน้าที่สำคัญป้องกันอนุมูลอิสระที่มากเกินไป เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสเป็นเอนไซม์ชนิดแรกที่มีหน้าที่ในการป้องกันอนุมูลอิสระออกซิเจนในเซลล์ โดยการทำปฏิกิริยาเปลี่ยนอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (O₂⁻) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) และโมเลกุลออกซิเจน (Mates *et al.*, 1999) คาตาเลสเป็นเอนไซม์ที่มีเหล็กเป็นองค์ประกอบ (hemoprotein) ทำหน้าที่ทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และปกป้องเนื้อเยื่อจากอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล เป็นที่ทราบกันว่าซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออนเป็นสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์คาตาเลสซึ่งมีหน้าที่ในการล้างพิษไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสมีหน้าที่เบื้องต้นในการลดความเสียหายจากสภาวะออกซิเดทีฟสเตรส โดยการล้างพิษไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นี้คาตาเลสจะเข้าร่วมทำงานเมื่อความเข้มข้นของเอนไซม์กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสถึงระดับอิ่มตัวด้วยสารตั้งต้น (substrate) (Bhattacharya and Ghosal, 200) การทดลองนี้คณะผู้วิจัย พบว่ากิจกรรมของซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและคาตาเลสในของเหลวอัมตะของหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คาดว่าสารสกัดเมล็ดมะระจีนกไม่ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในอัมตะหนู แต่พบกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและคาตาเลสเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตสมีกิจกรรมเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดสและคาตาเลสในกลุ่มที่ให้สารสกัด การเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิ

เตสและคาตาเลสในกลุ่มที่ให้สารสกัดนี้อาจเนื่องมาจากการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์เองหรืออาจได้รับการชักนำจากอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระทั้งสามชนิดไม่สอดคล้องกับการลดความสมบูรณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในหนูทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก คาคว่าฤทธิ์ยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ของสารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกไม่เกี่ยวข้องกับการชักนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระที่มากขึ้น ผลการศึกษาหนึ่งรายงานว่าการให้สารสกัดจากผลมะระจีนกปริมาณ 400 และ 500 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน เป็นเวลา 15 วันในหนูแรทก่อให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันขึ้นในตับ (Panda and Kar, 2000) และ Geva *et al.* (1996) รายงานไว้ว่าเซลล์อสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้รับความเสียหายง่ายจากระบบลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

สารสกัดจากมะระจีนกส่งผลกระทบต่อฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาและในของเหลวอันทะหนุวิสตาร์เพศผู้ Russel *et al.* (1987) กล่าวว่า การลดลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนอาจเกิดจากการลดลงของลูทีไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone; LH/ICSH) และฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมน (follicle-stimulating hormone; FSH) ฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมนมีหน้าที่กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดอสุจิ (spermatogonia) ไปเป็นเซลล์สเปิร์มาโตไซต์ (spermatocyte) รวมทั้งมีหน้าที่ในการรักษากระบวนการสร้างเซลล์อสุจิให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง ทั้งฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมนและลูทีไนซิงฮอร์โมนสำคัญต่อกระบวนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และการพัฒนาของเซลล์สเปิร์มาติด (spermatid) (Haneji *et al.*, 1984) ฮอร์โมนเพศผู้จำเป็นต่อการสร้างเซลล์อสุจิ (Mohri *et al.*, 1975) การยับยั้งการหลั่งโกนาโดโทรปิน (gonadotropin) อาจส่งผลให้หลังเทสโทสเตอโรนลดลงทำให้หยุดกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (Mali *et al.*, 2002) งานวิจัยจำนวนมากแสดงผลจากการลดลงของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเมื่อให้สารสกัดจากพืช Naseem *et al.* (1998) รายงานว่าการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนก 25 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ส่งผลลดการสร้างเซลล์อสุจิ ยับยั้งการสร้างสเปิร์มในหนูแรท Russel *et al.* (1987) รายงานว่าการพัฒนาการสร้างเซลล์อสุจิที่ไม่สมบูรณ์จากการให้สารสกัดจากเมล็ดมะระจีนกเกิดขึ้นจากการลดลงของเทสโทสเตอโรน Ewing *et al.* (1980) รายงานว่าการให้สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากราก *Martynia annua* ส่งผลลดลูทีไนซิงฮอร์โมนและเทสโทสเตอโรนแต่ไม่ส่งผลต่อฟอลลิเคิลสติมูเลตติงฮอร์โมน เนื่องจากลูทีไนซิงฮอร์โมนเป็นฮอร์โมนที่มีหน้าที่กระตุ้นการสร้างเทสโทสเตอโรน

สำหรับการทดลองนี้คณะผู้วิจัยพบว่าระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อให้สารสกัดปริมาณ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะระจีนก 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน และระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดลดลงในกลุ่มที่ให้สารสกัด

400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีแนวโน้มสอดคล้องกับระดับของเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ยิ่งทางสถิติเมื่อให้สารสกัด 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและลดลงมากกว่าของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดมะระขึ้นก 400 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สะท้อนให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดมะระขึ้นกส่งผลต่อการลดลงของระดับเทสโทสเตอโรนทั้งในพลาสมาเลือดและในของเหลวอัณฑะ Dohle *et al.* (2003) อธิบายไว้ว่าเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะออกฤทธิ์โดยตรงต่อเซลล์เซอร์โทลี (sertoli cells) ปริมาณเทสโทสเตอโรนที่ลดลง ลดการแสดงออกของยีนสังเคราะห์ตัวรับฮอร์โมนเพศผู้ (androgen receptor) ในเซลล์เซอร์โทลี จากการทดลองพบว่าสัดส่วนของปริมาณเทสโทสเตอโรนในอัณฑะมีสัดส่วนสูงกว่าในพลาสมาเลือดประมาณประมาณ 50 เท่า สอดคล้องกับ Turner *et al.* (1984) ซึ่งรายงานว่เทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะมีปริมาณสูงกว่าเทสโทสเตอโรนในพลาสมาเลือดประมาณ 50 เท่าเช่นกัน โดยระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะ 50-70 นาโนกรัม/มิลลิลิตร มีความสำคัญต่อกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิในหนูแรท (Zirkin *et al.*, 1989; Jarow *et al.*, 2005) และในมนุษย์ (Matsumoto and Bremner, 1985) แสดงให้เห็นว่าเทสโทสเตอโรนระดับสูงในของเหลวอัณฑะไม่ออกฤทธิ์ควบคุมการผลิตอสุจิ กล่าวคือรูปที่ออกฤทธิ์ของเทสโทสเตอโรนคือเมแทบอลิต์ 5-ไดไฮโดรเทสโทสเตอโรนหรือดีเอชที (5-dihydrotestosterone; DHT) มีปริมาณเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ในของเหลวอัณฑะหนูแรท (Turner *et al.*, 1984) ซึ่งส่วนมากฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจับอยู่กับโปรตีนในของเหลวในท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) (Jarow *et al.*, 2005) การลดลงของเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะประมาณสองในสามส่วนไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ อย่างไรก็ตามหากระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะมีค่าต่ำกว่านี้จะมีผลโดยตรงต่อจำนวนเซลล์อสุจิ (Zirki *et al.*, 1989) สำหรับการทดลองนี้คณะผู้วิจัยพบว่าการให้สารสกัดเมล็ดมะระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ลดระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะในระดับที่ต่ำกว่ากำหนด โดย Zirkin *et al.* (1989) รายงานว่าระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะที่ต่ำกว่า 2 ใน 3 ของค่าปกติ 50-70 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจะรบกวนกระบวนการสร้างเซลล์ จากการทดลองพบว่าการสารสกัดจากมะระขึ้นกปริมาณ 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน ส่งผลลดเทสโทสเตอโรนในของเหลวอัณฑะต่ำกว่าระดับ 2 ใน 3 ของค่าปกติ 55.57-75.57 นาโนกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร ระดับของเทสโทสเตอโรนที่ลดลงอาจเกี่ยวข้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่ระบุว่าเมล็ดมะระขึ้นกมีผลยับยั้งการสร้างสเตอรอยด์ เนื่องจากพบการเพิ่มขึ้นของคลอเลสเตอรอลและไขมันชนิดซุนาโคฟิลิก (sunadophilic lipid) (Naseem *et al.*, 1998)

อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานสรุปแน่ชัดว่าสารสกัดมะเร็งขึ้นก็มีผลโดยตรงต่อการลดการคัดหลั่งโกนาโดโทรปินรีลีสซิงฮอร์โมน (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) โดยกลุ่มเซลล์ประสาทในไฮโปทาลามัสหรือมีผลลดการสังเคราะห์โกนาโดโทรปิน (Gonadotropins) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า จากผลการทดลองคาดว่าสารสกัดเมล็ดมะเร็งขึ้นก็มีผลกระทบต่อลดการสังเคราะห์เทสโทสเตอโรนโดยเซลล์ลีดิก (Leydig's cells) ส่งผลต่อการทำงานของเซลล์เซอร์โทลีและการผลิตอสุจิตามลำดับ

จากการทดลองสารสกัดเมล็ดมะเร็งขึ้นก็ไม่ส่งผลกระทบต่อรูปแบบของโปรตีนในของเหลวในอวัยวะของกลุ่มทดลองทั้ง 2 กลุ่ม โปรตีนส่วนใหญ่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 12.2-327.6 กิโลดาลตันรูปแบบของโปรตีนคล้ายกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง คาดว่าสารสกัดเมล็ดมะเร็งขึ้นกรบกวารูปแบบของโปรตีนในของเหลวอวัยวะ Chinoy (1984) รายงานว่าโปรตีนบางชนิดในของเหลวอวัยวะเกี่ยวข้องกับการทำหน้าที่เป็นตัวรับฮอร์โมนเพศผู้ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของอวัยวะ อย่างไรก็ตามโปรตีนจำนวนน้อยชนิดในของเหลวอวัยวะถูกควบคุมโดยเทสโทสเตอโรน (Shabanowitz and Killian, 1987) ในการทดลองนี้พบระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะลดลงแต่ไม่พบรูปแบบที่ต่างกันของโปรตีนในกลุ่มที่ให้สารสกัดเมล็ดมะเร็งขึ้น 400 และ 800 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม/วัน

การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดเมล็ดมะเร็งขึ้นก็มีผลลดความสมบูรณ์พันธุ์ คาดว่ากลไกหนึ่งเกิดจากการลดระดับเทสโทสเตอโรนในของเหลวอวัยวะและในพลาสมาเลือดมากกว่ากลไกของกิจกรรมของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระและชนิดรูปแบบโปรตีนของของเหลวในอวัยวะ

ข้อเสนอแนะ

อนาคตคาดว่าจะทำการวิจัยแยกสารออกฤทธิ์จากเมล็ดมะระขี้นกเพื่อทดสอบกลไกลด
ความสมบูรณ์เพศ

เอกสารอ้างอิง

- Abalaka, M.E., O.S. Olonitola, J.A. Onaolapo and H.I. Inabo. 2009. Evaluation of acute toxicity of *Momordica charantia* extract using Wistar Rats to determine safety levels and usefulness of the plant in ethnochemotherapy. **Int. Jor. P. App. Scs.** 3(4): 1-6.
- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105: 121-6.
- Agarwal, A., R.A. Saleh and M.A. Bedaiwy. 2003. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertil. Steril.** 79: 829-43.
- Ahmed, I., M.S. Lakhani, M. Gillett, A. John and H. Raza. 2001. Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effect of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes Res. Clin. Pract.** 51: 155-61.
- Alvarez, J.G. and B.T. Storey. 1983. Taurine, hypotaurine, epinephrine and albumin inhibit lipid peroxidation in rabbit spermatozoa and protect against loss of motility. **Biol. Reprod.** 29: 548-55.
- Amballi, A.A., O.A. Dada, A.O. Adeleye and J. Salu. 2007. Evaluation of the determination of reference ranges for reproductive hormones (prolactin, FSH, LH and testosterone) using enzyme immune assay method. **Sci. Res. Essays** 2: 135-138.
- Au, T.K., R.A. Collins, T.L. Lam, T.B. Ng, W.P. Fong, D.C. Wan. 2000. The plant ribosome inactivating proteins luffin and saporin are potent inhibitors of HIV-1 integrase. **FEBS Lett.** 471: 169-72.
- Babu, S.R., M.D. sadhnani, M. Swarna, P. Padmavathi and P.P. Reddy. 2004. Evaluation of FSH, LH and testosterone levels in different subgroups of infertile males. **Ind. J. Clin. Biochem.** 19: 45-49.

- Bhattacharya, A. and S. Ghosal. 2000. Antioxidant activity of tannoid principles of *Embllica officinalis* (amla) in chronic stress induced changes in rat brain. **Indian. J. Exp. Biol.** 38: 877-880.
- Blomhoff, R. 2005. Dietary antioxidants and cardiovascular disease. **Curr. Opin. Lipidol.** 16: 47-54.
- Bourinbaiar, A.S. and S. Lee-Huang. 1996. The activity of plant-derived antiretroviral proteins MAP30 and GAP31 against herpes simplex virus in vitro. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 219: 923-9.
- Cabiscol, E., J. Tamarit and J. Ros. 2000. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int. Microbiol.** 3: 3-8. Cited E.R. Stadtman. 1992. Protein oxidation and aging. **Science** 257: 1220-1224.
- Chang, C., Y.T. Chen, S.D. Yed, Q. Xu, R.S. Wang, F. Guillou, H. Lardy and S. Yed. 2004. Infertility with defective spermatogenesis and hypotestosteronemia in male mice lacking the androgen receptor in Sertoli cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101: 6876-81.
- Cheng, F.C., J.F. Jen and T.H. Tsai. 2002. Hydroxyl radical in living systems and its separation method. **J. Chromatogr. B.** 781: 481-496.
- Chinoy, N.J. 1984. Structure and function of epididymis in relation to vulnerable point of intervention for male fertility regulation. **Indian Rev. Life. Sci.** 4: 37-68.
- Chitra, K.C., C. Latchoumycandane and P.P. Mathur. 2002. Effect of nonylphenol on the antioxidant system in epididymal sperm of rats. **Arch. Toxicol.** 76: 545-551.
- Clafin, A.J., D.L. Vesely, J.L. Hudson, C.B. Bagwell, D.C. Lehotay, T.M. Lo, M.A. Fletcher, N.L. Block and G.S. Levey. 1978. Inhibition of growth and guanylate cyclase activity of

- an undifferentiated prostate adenocarcinoma by an extract of the balsam pear (*Momordica charantia* abbreviata). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 75: 989-93.
- Colborn, T., F.S. vom Saal and A.M. Soto. 1993. Developmental effect of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. **Environ. Health Perspect.** 101: 378-384.
- Dalsenter, P.R., A.S. Faqi and I. Chahoud. 1997. Serum testosterone and sexual behavior in rats after prenatal exposure to lindane. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 50: 360-6.
- de Lamirande, E., H. Jiang, A. Zini, H. Kodama and C. Gagnon. 1997. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Rev. Reprod.** 2: 48-54.
- de Souza, F.F., D.P. Leme, E. Uechi, L.A. Trinca and M.D. Lopes. 2004. Evaluation testicular fine needle aspiration cytology and serum testosterone levels in dogs. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** 41: 98-105.
- Dean, R.T., S. Fu, R. Stocker and M.J. Davies. 1997. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochem. J.** 324: 1-18.
- Dohle, G.R., M. Smit and R.F.A. Weber. 2003. Androgens and male fertility. **World J. Urol.** 21: 341-345.
- Droge, W. 2002. Free radicals in physiological control of cell function. **Physiol. Rev.** 82: 47-95.
- Ewing, L.L., J.C. Davis and B.R. Zirkin. 1980. Regulating testicular function: a spatial and temporal view. **Inter. Rev. Physiol.** 22: 41-115.
- Fraser, L.R. 1998. Fertilization promoting peptide: an important regulator of sperm function *in vivo*?. **Rev. Reprod.** 3: 151-4.

- Garrido, N., M. Meseguer, J. Alvarez, C. Simon, A. Pellicer and J. Remohi. 2004. Relationship among standard semen parameters, glutathione peroxidase/ glutathione reductase activity, and mRNA expression and reduced glutathione content in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile men. **Fertil. Steril.** 82: 1059-1066.
- Geva, E., B. Bartoov, N. Zabludovsky, J.B. Lessing, L. Lerner-Geva and A. Amit. 1996. The effect of antioxidant treatment on human spermatozoa and fertilization rate in an in vitro fertilization program. **Fertil. Steril.** 66: 430-434.
- Gracy, R.W., J.M. Talent, Y. Kong and C.C. Conrad. 1999. Reactive oxygen species: the unavoidable environmental insult?. **Mutation Research** 428: 17-22.
- Grover, J.K. and S.P. Yadav. 2004. Pharmacological action and potential uses of *Momordica charantia*: a review. **J. Ethnopharmacol.** 93: 123-32.
- Grover, J.K., V. Vats, S.S. Rathi and R. Dawar. 2001. Traditional Indian anti-diabetic plants attenuate progression of renal damage in streptozotocin induced diabetic mice. **J. Ethnopharmacol.** 76: 233-8.
- Gupta, R.S. and J.B. Kachhawa. 2007. Evaluation of contraceptive activity of methanol extract of *Dendrophthoe falcata* stem in male albino rats. **J. Ethnopharmacol.** 112: 215-8.
- Gürbüz, I., C. Akyüz, E. Yesilada and B. Sener. 2000. Anti-ulcerogenic effect of *Momordica charantia* L. fruits on various ulcer model in rats. **J. Ethnopharmacol.** 71: 77-82.
- Haneji, T., M. Maekawa and Y. Nishimune. 1984. Vitamin A and FSH synergistically induce differentiation of type A spermatogonia in adult mouse cryptorchid testes *in vitro*. **Endocrinology** 114: 801-5.

- Huang, P.L., Y. Sun, H.C. Chen, H.F. Kung and S. Lee-Huang. 1999. Proteolytic fragments of anti-HIV and anti-tumor proteins MAP30 and GAP31 are biologically active. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 262: 615-23.
- Husain, J., I.J. Tickle and S.P. Wood. 1994. Crystal structure of momordin, a type I ribosome inactivating protein from the seeds of *Momordica charantia*. **FEBS Lett.** 342: 154-158.
- Imai, H., K. Suzuki, K. Ishizaka, S. Ichinose, H. Oshima, I. Okayasu, K. Emoto, M. Umeda and Y. Nakagawa. 2001. Failure of the expression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in the spermatozoa of human infertile males. **Biol. Reprod.** 64: 674-83.
- Ischiropoulos, H. 1998. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. **Arch. Biochem. Biophys.** 356: 1-11.
- Ischiropoulos, H. and A.B. Al-Mehdi. 1995. Peroxynitrite-mediated oxidative protein modifications. **FEBS Lett.** 364: 279-82.
- Isidori, A.M., E. Giannetta, D. Gianfrilli, E.A. Greco, V. Bonifacio, A. Aversa, A. Isidori, A. Fabbri and A. Lenzi. 2005. Effects of testosterone on sexual function in men: results of a meta-analysis. **Clin. Endocrinol. (Oxf).** 63: 381-94.
- Jarow, J.P., W.W. Wright, T.R. Brown, X. Yan and B.R. Zirkin. 2005. Bioactivity of androgens within the testes and serum of normal men. **J. Androl.** 26: 343-8.
- Jayasooriya, A.P., M. Sakono, C. Yukizaki, M. Kawano, K. Yamamoto and N. Fukuda. 2000. Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol-free and cholesterol-enriched diets. **J. Ethnopharmacol.** 72: 331-336.

- Jilka, C., B. Strifler, G.W. Fortner, E.F. Hays and D.J. Takemoto. 1983. In vivo antitumor activity of the bitter melon (*Momordica charantia*). **Cancer Res.** 43: 5151-5.
- Kamischke, A., A. Baumgardt, J. Horst and E. Nieschlag. 2003. Clinical and diagnostic features of patients with suspected Klinefelter syndrome. **J. Androl.** 24: 41-8.
- Karihtala P. and Y. Soini. 2007. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancy. **APMIS** 115: 81-103.
- Kaur, P., S. Kalia and M.P. Bansal. 2006. Effect of diethyl maleate induced oxidative stress on male reproductive activity in mice: redox active enzymes and transcription factors expression. **Mol. Cell. Biochem.** 291: 55-61.
- Kuku, S.F., P.A. Akinyanju and J.O. Ojeifo. 1988. Serum levels of gonadotropins, prolactin, and testosterone in oligo/azoospermic Nigerian males. **Int. J. Fertil.** 33: 40-41.
- Kusamran, W.R., A. Ratanavila and A. Tepsuwan. 1998. Effects of neem flowers, Thai and Chinese bitter melon fruits and sweet basil leaves on hepatic monooxygenases and glutathione S-transferase activities, and in vitro metabolic activation of chemical carcinogens in rats. **Food Chem. Toxicol.** 36: 475-84.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature** 227: 680-685.
- Lee-Huang, S., P.L. Huang, P.L. Huang, A.S. Bourinbaier, H.C. Chen and H.F. Kung. 1995. Inhibition of the integrase of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 by anti-HIV plant proteins MAP30 and GAP31. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 92: 8818-22.

- Lee-Huang, S., P.L. Huang, P.L. Nara, H.C. Chen, H.F. Kung, P. Huang, H.I. Huang and P.L. Huang. 1990. MAP 30: a new inhibitor of HIV-1 infection and replication. **FEBS Lett.** 272: 12-8.
- Levrant, J., H. Iwase, Z.H. Shao, T.L.V. Hoek and P.T. Schumacker. 2002. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ros generation. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.** 284: 594-98.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. **J. Biol. Chem.** 193: 265-275.
- Mahajan, A. and V.R. Tandon. 2004. Antioxidants and rheumatoid arthritis. **J. Indian Rheumatol. Assoc.** 12: 139-142.
- Mali, P.C., A.S. Ansari and M. Chaturvedi. 2002. Antifertility effect of chronically administered *Martynia annua* root extract on male rats. **J. Ethnopharmacol.** 82: 61-2.
- Mates, J.M., C. Perez-Gomez and I.N. De Castro. 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. **Clin. Biochem.** 32: 595-603.
- Matsumoto, A.M. and W.J. Bremner. 1985. Stimulation of sperm production by human chorionic gonadotropin after prolonged gonadotropin suppression in normal men. **J. Androl.** 6: 137-143.
- Matsumoto, A.M. and W.J. Bremner. 2004. Editorial: Serum testosterone assays-accuracy matters. **J. Clin. Endocrinol. Metab.** 89: 520-4.

Mikhail, N. 2006. Does testosterone have a role in erectile function?. **Am. J. Med.** 119: 373-82.

Mohri, H., D.A.I. Suter, P.D.C. Brown-Woodman, I.G. White and D.D. Ridley. 1975.

Identification of the biochemical lesion produced by α -chlorohydrin in spermatozoa.

Nature 255: 75-7.

Morales, A., J. Buvat, L.J. Gooren, A.T. Guay, J.M. Kaufman, H.M. Tan and L.O. Torres. 2004.

Endocrine aspects of sexual dysfunction in men. **J. Sex. Med.** 1:69-81.

Morrow, A.F., H.W.G. Baker and H.G. Burger. 1986. Different testosterone and LH relationships

in infertile men. **J. Androl.** 7: 310-315.

Nader-Djalal, N., P.R. Knight, K. Thusu, B.A. Davidson, B.A. Holm, K.J. Johnson and P.

Dandona. 1998. Reactive oxygen species contribute to oxygen-related lung injury after acid aspiration. **Anesth. Analg.** 87: 127-33.

Nakabeppu, L., D. Tsuchimoto, H. Yamaguchi and K. Sakumi. 2007. Oxidative damage in

nucleic acids and Parkinson's disease. **J. Neurosci. Res.** 85(5): 919-934.

Naseem, M.Z., S.R. Patil, S.R. Patil, Ravindra and R.S. Patil. 1998. Antispermatoxic and

androgenic activities of *Momordica charantia* (Karela) in albino rats. **J.**

Ethnopharmacol. 61: 9-16.

National Institutes of Child Health and Human Development (NICHD). 2000. From cells to

selves: reproductive health for the 21st century.

- Noguchi, R., Y. Yasui, R. Suzuki, M. Hosokawa, K. Fukunaga and K. Miyashita. 2001. Dietary effects of bitter gourd oil on blood and liver lipids of rats. **Arch. Biochem. Biophys.** 396: 207-12.
- O'Bryan, M.K., A. Zini, C.Y. Cheng and P.N. Schlegel. 1998. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. **Fertil. Steril.** 70: 1143-7.
- Olson, P.N. 1991. Clinical approach for evaluating dogs with azoospermia or aspermia. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.** 21: 591-608.
- Paglia, D.E. and W.N. Valentile. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab Clin. Med** 70: 158.
- Panda, S. and A. Kar. 2000. Excess use of *Momordica charantia* extract may not be safe with respect to thyroid function and lipid peroxidation. **Current Science** 79: 222-224.
- Parkash, A, T.B. Ng and W.W. Tso. 2002. Purification and characterization of charantin, a anapin-like ribosome-inactivating peptide from bitter gourd (*Momordica charantia*) seed. **J. Pept. Res.** 59: 197-202.
- Reyes, B.A., N.D. Bautista, N.C. Tanquilut, R.V. Anunciado, A.B. Leung, G.C. Sanchez, R.L. Magtoto, P. Castronuevo, H. Tsukamura and K.I. Maeda. 2006. Anti-diabetic potentials of *Momordica charantia* and *Andrographis paniculata* and their effects on estrous cyclicity of alloxan-induced diabetic rats. **J. Ethnopharmacol.** 105: 196-200.
- Rosenfeld, J.A., P.M. Zahorik, W. Saint and G. Murphy. 1993. Women's satisfaction with birth control. **J. Fam Pract.** 36: 169-73.

Russel, L.D., L.E. Alger and L.G. Nequin. 1987. Hormonal control of pubertal spermatogenesis.

Endocrinology 120: 1615-32.

Saleh, R.A., A. Agarwal, R.K. Sharma, T.M. Said, S.C. Sikka and A.J. Thomas. 2003. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. **Fertil. Steril.** 80: 1431-6.

Steril. 80: 1431-6.

Sanocka, D. and M. Kurpisz. 2004. Reactive oxygen species and sperm cell. **Reprod. Biol. Endocrinol.** 2: 1-7.

Endocrinol. 2: 1-7.

Sathishsekar, D. and S. Subramanian. 2005. Antioxidant properties of *Momordica Charantia*

(bitter gourd) seeds on streptozotocin induced diabetic rats. **Asia Pac. J. Clin. Nutr.** 14: 153-8.

_____ and _____. 2005. Beneficial effect of *Momordica Charantia* seeds in the treatment of STZ-induced diabetes in experimental rats. **Biol. Pharm. Bull.** 228: 978-83. Cited C. Ganguly, S.

De and S. Das. 2000. Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica Charantia*. **Eur. J. Cancer Prev.** 9: 283-8.

Scartezzini, P. and E. Speroni. 2000. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. **J. Ethnopharmacol.** 71: 23-43.

Schreiber, C.A., L. Wan, Y. Sun, L. Lu, L.C. Krey and S. Lee-Huang. 1999. The antiviral agents, MAP30 and GAP31, are not toxic to human spermatozoa and may be useful in preventing the sexual transmission of human immunodeficiency virus type 1. **Fertil. Steril.** 72: 686-90.

Steril. 72: 686-90.

- Shabanowitz, R.B. and G.J. Killian. 1987. Two dimensional electrophoresis of protein in principal cells, spermatozoa and fluid associated with the rat epididymal. **Biol. Reprod.** 36: 753-768.
- Sikka, S.C. 2001. Relative impact of oxidative stress on male reproductive function. **Curr. Med. Chem.** 8: 851-62.
- Singh, A., S.P. Singh and R. Bamezai. 1998. *Momordica Charantia* (Bitter Gourd) peel, pulp, seed and whole fruit extract inhibits mouse skin papillomagenesis. **Toxicol. Lett.** 94: 37-46.
- Singh, R.K., R.C. Dhiman and P.K. Mittal. 2006. Mosquito larvicidal properties of *Momordica Charantia* (family: Cucurbitaceae). **J. Vector Borne Dis.** 43: 88-91.
- Stadtmanand, ER. and B.S. Berlett. 1997. Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. **Chem. Res. Toxicol.** 10: 485-94.
- Stricker, R., R. Eberhart, M.C. Chevallier, F.A. Quinn, P. Bischof and R. Stricker. 2006. Establishment of detailed reference values for luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, estradiol, and progesterone during different phases of the menstrual cycle on the Abbott Architect analyzer. **Clin. Chem. Lab. Med.** 44: 883-887.
- Sun, Y., P.L. Huang, J.J. Li, Y.Q. Huang, L. Zhang, P.L. Huang and S. Lee-Huang. 2001. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma-associated virus. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 287: 983-94.

- Tazzari, P.L., D. de Toterò, A. Bolognesi, N. Testoni, S. Pileri, S. Roncella, G. Reato, H. Stein, M. Gobbi and F. Stirpe. 1999. An Epstein-Barr virus-infected lymphoblastoid cell line (D430B) that grows in SCID-mice with the morphologic features of a CD30+ anaplastic large cell lymphoma, and is sensitive to anti-CD30 immunotoxins. **Haematologica** 84: 988-95.
- Telang, M., A. Srinivasan, A. Patankar, A. Harsulkar, V. Joshi, A. Damle, V. Deshpande, M. Sainani, P. Ranjekar, G. Gupta, A. Birah, S. Rani, M. Kachole, A. Giri and V. Gupta. 2003. Bitter gourd proteinase inhibitors: potential growth inhibitors of *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. **Phytochemistry** 63: 643-52.
- Thompson, H.L. and J.M. Wilton. 1991. Effects of anaerobiosis and aerobiosis on interactions of human polymorphonuclear leukocytes with the dental plaque bacteria *Streptococcus mutans*, *Capnocytophaga ochracea*, and *Bacteroides gingivalis*. **Infect. Immun.** 59: 932-940.
- Trentacoste, S.V., A.S. Friedmann, R.T. Youker, C.B. Breckenridge and B.R. Zirkin. 2001. Atrazine effects on testosterone levels and androgen-dependent reproductive organs in peripubertal male rats. **J. Androl.** 22: 142-8.
- Turner, T.T., C.E. Jones, S.S. Howards, L.L. Ewing, B. Zegeye and G.L. Gunsalus. 1984. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. **Endocrinology** 115: 1925-1932.
- Urata, K., H. Narahara, Y. Tanaka, T. Egashira, F. Takayama and I. Miyakawa. 2001. Effect of endotoxin-induced reactive oxygen species on sperm motility. **Fertil. Steril.** 76: 163-6.

- Valko, M., D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur and J. Telser. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int. J. Biochem. Cell. Biol.** 39: 44-84.
- Van Dop, C., S.M. Hutson and H.A. Lardy. 1977. Pyruvate metabolism in bovine epididymal spermatozoa. **J. Biol. Chem.** 252: 1303-8.
- Vernet, P., R.J. Aitken and J.R. Drevet. 2004. Antioxidant strategies in the epididymis. **Mol. Cell. Endocrinol.** 216: 31-9.
- Vikrant, V., J.K. Grover, N. Tandon, S.S. Rathi and N. Gupta. 2001. Treatment with extracts of *Momordica charantia* and *Eugenia jambolana* prevents hyperglycemia and hyperinsulinemia in fructose fed rats. **J. Ethnopharmacol.** 76: 139-43.
- Wagenfeld, A., C.H. Yeung, K. Strupat and T.G. Cooper. 1998. Shedding of a rat epididymal sperm protein associated with infertility induced by ornidazole and alpha-chlorohydrin. **Biol. Reprod.** 58: 1257-65.
- Wang, H.X. and T.B. Ng. 2001. Studies on the anti-mitogenic, anti-phage and hypotensive effects of several ribosome inactivating proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.** 128: 359-66.
- Ward, W.S. and D.S. Coffey. 1991. DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells. **Biol. Reprod.** 44: 569-74.
- Waris, G. and H. Ahsan. 2006. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **J.Carcinog.** 11: 5-14.

- Wei, Y.H. and H.C. Lee. 2002. Oxidative Stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging. **Exp. Biol. Med. (Maywood)** 227: 671-82.
- Winters, S.J., D.E. Kelley and B. Goodpaster. 1998. The analog free testosterone assay: are the results in men clinically useful?. **Clin. Chem.** 44: 2178-82.
- Wiseman, H. and B. Halliwell. 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. **Biochem. J.** 313: 17-29.
- Wu, S.J. and L.T. Ng. 2007. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. abbreviate Ser.) in Taiwan. **LWT-Food Science and Technology** doi: 10.1016/j.lwt.2007.03.003.
- Yesilada, E., I. Gürbüz and H. Shibata. 1999. Screening of Turkish anti-ulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. **J. Ethnopharmacol.** 66: 289-93.
- Zirkin, B.R., R. Santulli, C.A. Awoniyi and L.L. Ewing. 1989. Maintenance of advanced spermatogenic cells in the adult rat testis: quantitative relationship to testosterone concentration within the testis. **Endocrinology** 124: 3043-3049.
- Zubkova, E.V. and B. Robaire. 2004. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. **Biol. Reprod.** 71: 1002-8.