



รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) การสกัด ทำบริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพกลุ่มโปรตีน เปปไทด์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกจากพืชวงศ์ขิง

(ภาษาอังกฤษ) Extraction, Purification, and Identification of Protein and Peptide with Anti-osteoclastogenic activity from Zingiberaceae Plants

รายนามคณะผู้วิจัย

(1) รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) การสกัด ทำบริสุทธิ์ และพิสูจน์เอกลักษณ์ ของสารออกฤทธิ์ชีวภาพกลุ่มโปรตีน เปปไทด์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกจากพืชวงศ์ขิง

(ภาษาอังกฤษ) Extraction, Purification, and Identification of Protein and Peptide with Anti-osteoclastogenic activity from Zingiberaceae Plants

รายนามคณะผู้วิจัย

(1) รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ กาญจนทัต

สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศ.ดร.สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการทำการทดลองในหนู รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานด้วยดีมาโดยตลอด

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ ได้ศึกษาปริมาณของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ และฤทธิ์ทางชีวภาพ จากหัวกวาวเครือขาวในธรรมชาติ เปรียบเทียบกับเซลล์กวาวเครือขาวที่เพาะเลี้ยงในอาหาร ผลปรากฏว่าปริมาณสารฟลาโวนอยด์จากเซลล์กวาวเครือขาวที่เพาะเลี้ยง (PMC) มีมากกว่าปริมาณจากหัวกวาวเครือขาวในธรรมชาติ (PMT) ผลการทดสอบฤทธิ์ในหนูทดลอง PMT แสดงฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างแรง ส่วน PMC มีฤทธิ์อ่อน จากการทดสอบในเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast cell) ทั้ง PMT และ PMC มีผลในการยับยั้งการเกิดเซลล์สลายกระดูก การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันด้วยวิธีการ DPPH สารสกัดจาก PMC มีค่า IC_{50} น้อยกว่า PMT จากการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์กวาวเครือขาว สามารถผลิตสารฟลาโวนอยด์ และมีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันมากกว่าหัวกวาวเครือขาวในธรรมชาติ ทั้งยังแสดงฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างอ่อน

ABSTRACT

The flavonoid contents of intact tubers and cell culture media were determined and physiological activities of *Pueraria mirifica* extracts were investigated. The total flavonoid contents from cell culture media (PMC) were higher than from tubers (PMT). Results from *in vivo* estrogenic activity assays indicated that PMT had a strong estrogenic activity in ovariectomized rats. The same amount of PMC exhibited a weak activity. *In vitro* osteoclast suppression investigations indicated that both PMT and PMC extracts exhibited anti-osteoclastogenic activities with low toxicities in a standard test cell line. Determination of the antioxidant potential using the DPPH assay revealed that the IC_{50} value for PMT was lower than for PMC. *P. mirifica* cell cultures produce more flavonoids and exhibit a mild estrogenic and more antioxidant activities than tubers.

คำสำคัญ

กวาวเครือขาว, ฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก, เอสโตรเจน, ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

Keywords

Pueraria, anti-osteoclastogenic, estrogen, antioxidation

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ	4
Abstract	5
คำสำคัญ/key words	6
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญภาพ	8
สารบัญตาราง	9
บทนำ	10
ระเบียบวิธีวิจัย	10
ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย	11
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	17
บรรณานุกรม	18

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้าที่
รูปที่ 1 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยกวางเครือขาวและการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ puerarin (ขาว), daidzin (เทา), genistin (เทาเข้ม), daidzein (เทาอ่อน), and genistein (ดำ) ค่าเฉลี่ย±SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %	13
รูปที่ 2 ความพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ของ PMT (○) และ PMC (●) ค่าเฉลี่ย±SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %	14
รูปที่ 3 ฤทธิ์การต้านเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ RAW264.7 ของ PMT และ PMC (50 mg/mL) A) Unstimulated cells, B) rRANKL+DMSO, C) rRANKL+PMT and D) rRANKL+PMC	15
รูปที่ 4 จำนวนเซลล์ RAW264.7 ที่เกิดการกลายสภาพ เมื่อทดสอบกับ PMT และ PMC (50 mg/mL)ค่าเฉลี่ย±SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %	16
รูปที่ 5 ผลของน้ำหนักรัต (A) และ %Co (B) ของหนูตัดรังไข่ ที่ทดสอบกับ PMT และ PMC (น้ำเปล่า; ○), 10 หรือ 50 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (●) PMT-10 and (■) PMT-50 และ 10 หรือ 50 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (▲) PMC-10 and (▼) PMC-50 *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %	17

สารตาราง

ตารางที่	หน้าที่
ตารางที่ 1 ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ของ PMT และ PMC	13
ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ค่า IC_{50} mg/mL) ของ PMT และ PMC โดยวิธี DPPH assay	18

บทนำ

การค้นหารสสารออกฤทธิ์จากพืชสมุนไพรเป็นกระบวนการสำคัญในการผลิตยารักษาโรคหลายชนิด ฤทธิ์ต่าง ๆ ที่ได้เกิดจากสารทุติภูมิ (Secondary metabolites) ที่ถูกสร้าง และสะสมภายในเซลล์พืช การเก็บเกี่ยวพืชสมุนไพรจากแหล่งธรรมชาติ อาจมีผลกระทบต่อระบบนิเวศ รวมทั้งการเพาะปลูกอาจใช้เวลาและทุนทรัพย์เป็นจำนวนมาก การเพาะเลี้ยงเซลล์พืชเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการผลิตสารทุติภูมิที่สำคัญนี้ได้ เพื่อรองรับต่อความต้องการจากอุตสาหกรรมต่าง ๆ⁽¹⁾

กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่มีความสนใจ ในการผลิตเป็นเครื่องสำอางในประเทศไทย เนื่องด้วยสรรพคุณต่างๆ เช่น บำรุงผิว และกระชับทรงอก เป็นต้น⁽²⁾ สารออกฤทธิ์ที่เป็นตัวการสำคัญในกวาวเครือขาวคือ สารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ daidzein, daidzin, genistein, genistin และ puerarin มีรายงานว่าสารสำคัญเหล่านี้มีฤทธิ์ต่างๆ เช่น ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์เอสโตรเจน⁽³⁾ สุกัญญาและคณะ⁽⁴⁾ รายงานฤทธิ์เอสโตรเจนของกวาวเครือขาว โดยการทดสอบในหนู ซึ่ง หทัยทิพย์และคณะ⁽⁵⁾ ได้รายงานผลการออกฤทธิ์เช่นเดียวกันในลิง จากนั้นนันทกรณและคณะ⁽⁶⁾ ได้รายงานว่ากวาวเครือขาวมีผลการยับยั้งภาวะกระดูกพรุนในหนู

ในแง่ของการผลิตสารนั้น จากการเพาะเลี้ยงเซลล์แคลลัสของกวาวเครือขาวได้ถูกรายงานโดย สุदारัตน์ และสัณห์⁽⁷⁾ ผลปรากฏว่าเซลล์แคลลัสสามารถผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ได้สูงกว่าหัวกวาวเครือขาวในธรรมชาติ ต่อมา ลติพรและคณะ⁽⁸⁾ และ ศิรินทราและคณะ⁽⁹⁾ ได้สรุปผลเช่นเดียวกันในการเพาะเลี้ยงเซลล์กวาวเครือขาว รวมทั้งมีหลายงานวิจัยที่รายงานผลของเซลล์เพาะเลี้ยงของพืชสมุนไพร และฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เช่น ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน และการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ เป็นต้น⁽¹⁰⁻¹²⁾

อย่างไรก็ตาม ยังมีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเซลล์เพาะเลี้ยง กวาวเครือขาว งานวิจัยนี้จึงเป็นการศึกษาการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์จากเซลล์กวาวเครือขาว ควบคู่กับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสารจากหัวกวาวเครือจากแหล่งธรรมชาติ

ระเบียบวิธีวิจัย

ตัวอย่างพืช

ตัวอย่างหัวกวาวเครือขาวอายุ 3 ปี เก็บจากอำเภอมะริม จังหวัดเชียงใหม่ และเมล็ดกวาวเครือขาวได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ยุทธนา สมิตะสิริ (วิทยากร บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่) ตัวอย่างพืชทั้งหมดได้รับการจำแนกโดย ดร.จันทรารักษ์ ไตรวานนท์ (สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง) และเก็บในรูปของตัวอย่างแห้ง (หมายเลข MFLU-307)

การเพาะเลี้ยงเซลล์กวางเครือขาว

นำเมล็ดกวางเครือขาวมาทำความสะอาดด้วยแอลกอฮอล์ 95% เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นพอกฆ่าเชื้อด้วยคลอโรกซ์ 15% เป็นเวลา 15 นาที และล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำกลั่นที่นิ่งฆ่าเชื้อแล้ว เมล็ดที่ปลอดเชื้อแล้วจะถูกล้างบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog's (MS)⁽¹³⁾ ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% หลังจากเมล็ดงอกเป็นต้นที่สมบูรณ์แล้ว จึงตัดเฉพาะส่วนรากมากระตุ้นให้เกิดเซลล์แคลลัสโดยใช้อาหารสูตร MS ที่เติมน้ำตาลซูโครส 3% naphthylacetic acid (NAA) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ benzyl adenine (BA) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน การเพาะเลี้ยงเซลล์แขวนลอยเตรียมโดยใช้เซลล์แคลลัสอายุ 4 สัปดาห์ ถ่ายลงขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 125 mL ที่บรรจุอาหารเหลวสูตรเดียวกับการกระตุ้นแคลลัส โดยใช้อัตราส่วนของน้ำหนักเซลล์สด 0.25 g ต่ออาหารปริมาตร 25 mL ขวดเพาะเลี้ยงจะถูกปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 100 rpm เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดสาร

ตัวอย่างแห้งจากหัวกวางเครือขาว และเซลล์เพาะเลี้ยง เตรียมโดยการอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักแห้งที่ได้คงที่ จากนั้นทำการบดให้เป็นผงละเอียดในการสกัดสารใช้ตัวอย่างแห้ง 1 g ต่อสารละลายเมทานอล 100 mL ทำการแช่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง แยกสารละลายมาอบแห้งจนเหลือในรูปสารสกัดหยาบ (Crude extract)

การวิเคราะห์ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์

การวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค HPLC (High performance liquid chromatography) ดัดแปลงจากวิธีการของวิชัยและคณะ⁽¹⁴⁾ ในการวิเคราะห์สารไอโซฟลาโวนอยด์ 5 ชนิด ได้แก่ daidzein, daidzin, genistein, genistin และ puerarin

การทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก

ทำการทดสอบสารสกัดกวางเครือขาวกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW 264.7 ตามวิธีของชนมน์รีและคณะ⁽¹⁵⁾ ด้วยวิธีการ TRAP staining assay และ MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

การทดสอบฤทธิ์เอสโตรเจน

ทำการทดสอบผงกวางเครือขาวกับหนูทดลอง ตามวิธีของสุกัญญาและคณะ⁽⁴⁾ ด้วยวิธีการ Vaginal cytology assay

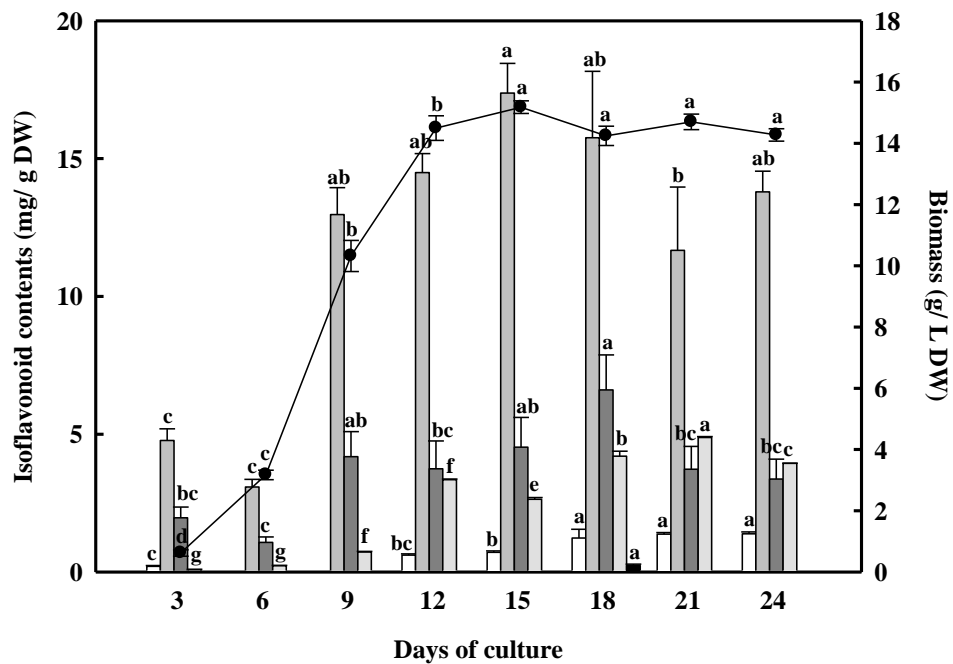
การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

ทำการทดสอบสารสกัดกวางเครือขาว ตามวิธีของวิชัยและคณะ⁽³⁾ ด้วยวิธีการ DPPH assay

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์กวางเครือขาว และปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์

อัตราการเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอย และการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ ได้แสดงในรูปที่ 1 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่า ในวันที่ 3-6 ของการเพาะเลี้ยงเซลล์มีการเจริญช้า (Lag phase) ในวันที่ 6-12 เซลล์มีการเจริญเร็ว (Exponential phase) และจากวันที่ 12 เป็นต้นไป เซลล์มีการเจริญคงที่ (Stationary phase) ในวันที่ 15 มีปริมาณน้ำหนักรวมเซลล์สูงสุด (15.19 ± 0.21 g/L ของน้ำหนักแห้ง) การผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์เริ่มมีปริมาณเพิ่มขึ้นในวันที่ 6 และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง (28.03 ± 1.66 mg/g ของน้ำหนักแห้ง) จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค HPLC ปรากฏว่า สาร daidzin และ genistin มีปริมาณมากที่สุดในกลุ่มของสารไอโซฟลาโวนอยด์ รวมทั้งตรวจพบได้ในทุกช่วงการเจริญ ในขณะที่ puerarin และ daidzein ปรากฏขึ้นหลังจากการเจริญในวันที่ 12 เป็นต้นไป ซึ่งเป็นไปได้ว่า daidzin และ genistin เป็นสารตั้งต้นของ puerarin และ daidzein ในส่วนของ genistein มีการตรวจพบในบางช่วงเวลา และสูญหายไประหว่างการผลิตสารของเซลล์ จากการเปรียบเทียบปริมาณสารฟลาโวนอยด์ ปรากฏว่าเซลล์เพาะเลี้ยง PMC (28.03 ± 1.66 mg/g ของน้ำหนักแห้ง) มีปริมาณมากกว่าในหัวกวางเครือ PMT (0.36 ± 0.12 mg/g ของน้ำหนักแห้ง) ถึง 77.86 เท่า ซึ่งมีสาร daidzin (15.76 ± 2.41 mg/g ของน้ำหนักแห้ง) มีที่สาคิดเป็นสัดส่วนจากปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดได้ถึง 56.22 % จากตารางที่ 1 แสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์เปรียบเทียบกัน PMC มีปริมาณสาร daidzin genistin และ daidzein มากกว่าใน PMT ถึง 394 330 และ 210 เท่า ตามลำดับ ถึงสอดคล้องกับหลายรายงานวิจัยที่เพาะเลี้ยงเซลล์กวางเครือขาวมา⁽⁷⁻⁹⁾

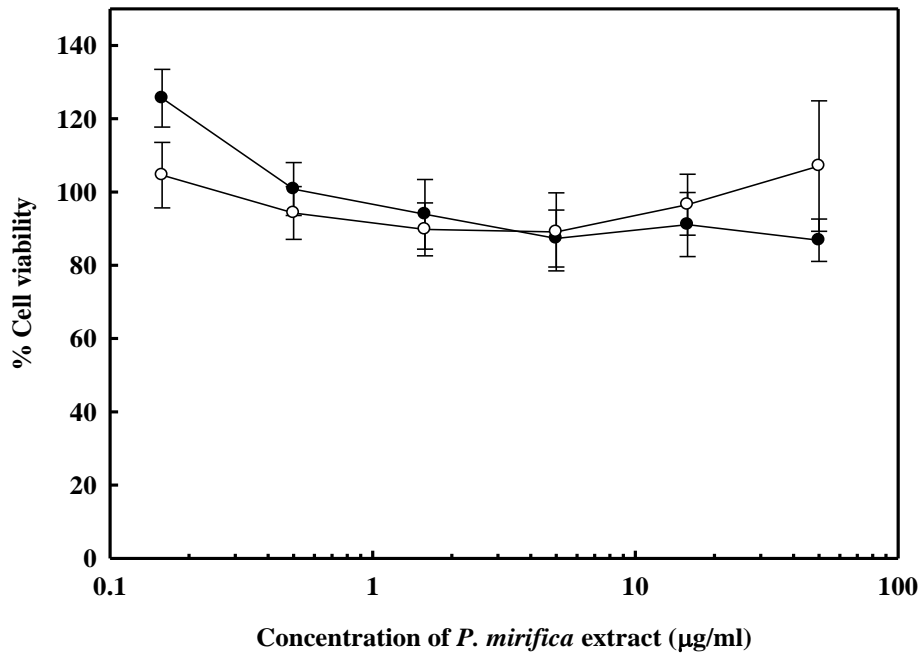


รูปที่ 1 การเจริญเติบโตของเซลล์แขวนลอยกวาวเครือขาวและการผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ puerarin (ขาว), daidzin (เทาเข้ม), genistin (เทาเข้ม), daidzein (เทาอ่อน), and genistein (ดำ) ค่าเฉลี่ย±SE และ ตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ตารางที่ 1 ปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ของ PMT และ PMC

Isoflavonoids	ผงตัวอย่าง (mg/g ของน้ำหนักแห้ง)					Total
	Puerarin	Daidzin	Genistin	Daidzein	Genistein	
PMT	0.27±0.09	0.04±0.01	0.02±0.01	0.02±0.01	0.01±0.00	0.36±0.12
PMC	1.23±0.32	15.76±2.41	6.61±1.27	4.20±0.18	0.23±0.05	28.03±1.66
PMC/PMT	4.55	394.00	330.50	210.00	23.00	77.86

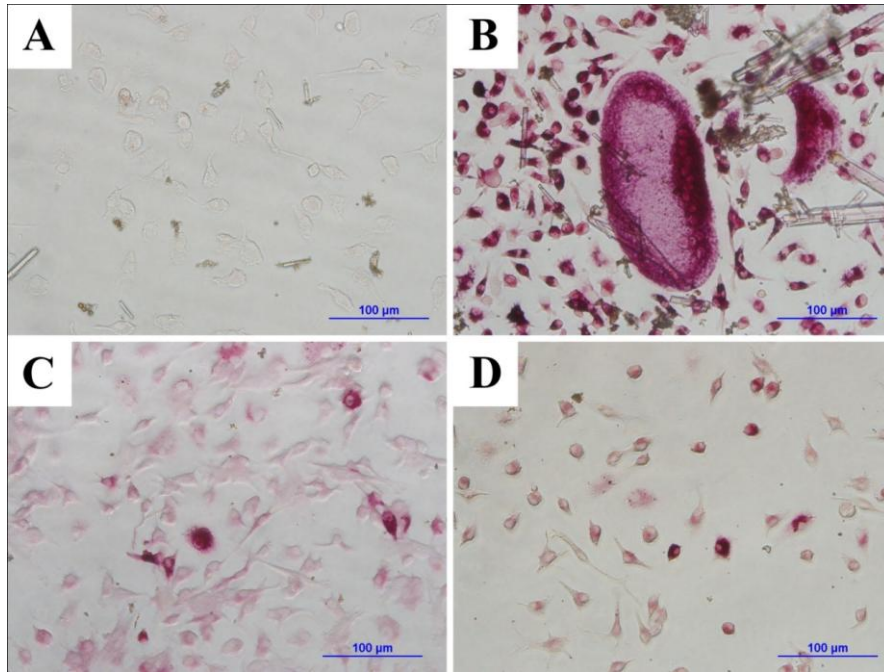
แสดงค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ (±SE).



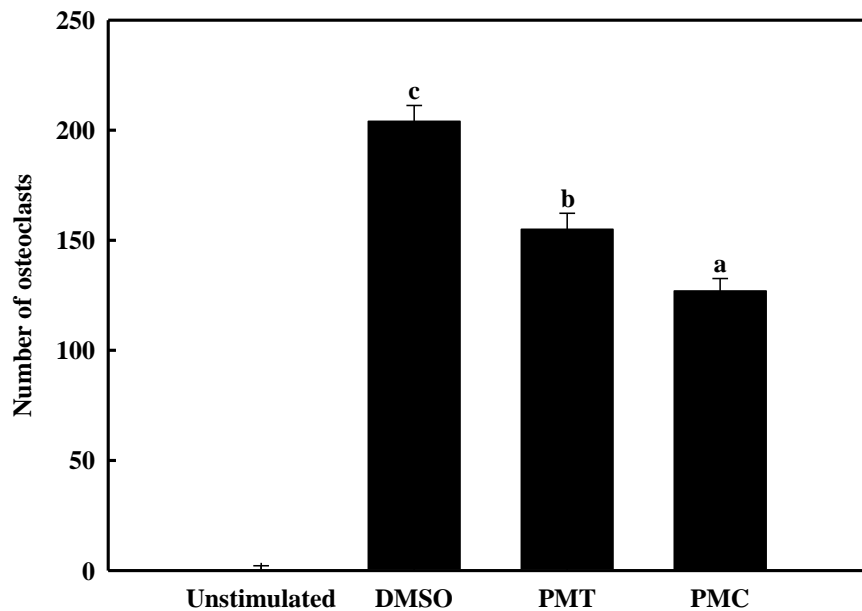
รูปที่ 2 ความพิษต่อเซลล์ RAW264.7 ของ PMT (○) และ PMC (●) ค่าเฉลี่ย±SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก

สารสกัดของ PMT และ PMC ได้ถูกทดสอบกับเซลล์แมคโครฟาจชนิด RAW264.7 ผลปรากฏว่า ทั้ง PMT และ PMC ที่ความเข้มข้น 0.158 ถึง 50 µg/mL ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability) อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 2 ในส่วนการทดสอบฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก เซลล์ RAW264.7 ได้ถูกปรับสภาพในสารละลายสกัดของ PMT และ PMC จากนั้นทำการกระตุ้นการเกิดเซลล์สลายกระดูก (Osteoclast differentiation) ด้วย RANKL และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นทำการนับเซลล์ที่เกิดการกลายสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 3) ผลปรากฏว่า PMT และ PMC มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์สลายกระดูก อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง (DMSO) โดยที่ PMC มีฤทธิ์ต้านมากกว่า PMT (รูปที่ 4) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวมีฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของนนทกรณ์และคณะ⁽⁶⁾ จากการทดสอบในหนู นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สาร puerarin เป็นตัวการในการออกฤทธิ์⁽¹⁶⁻¹⁸⁾



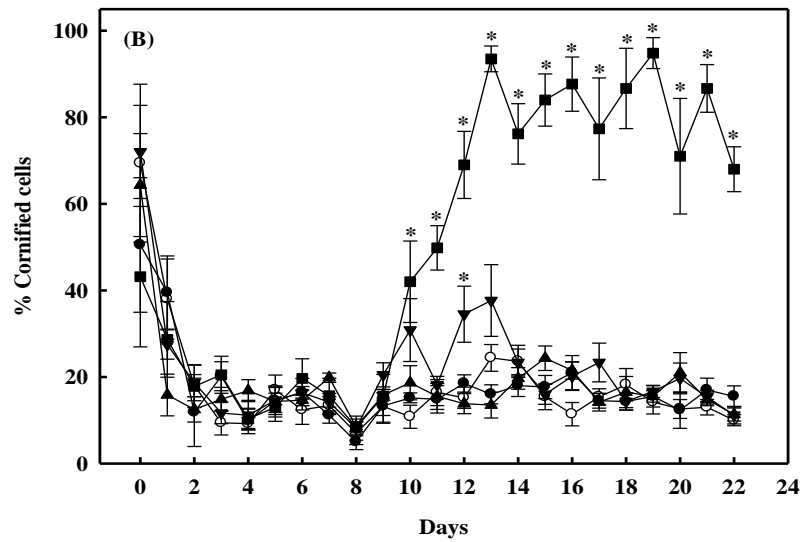
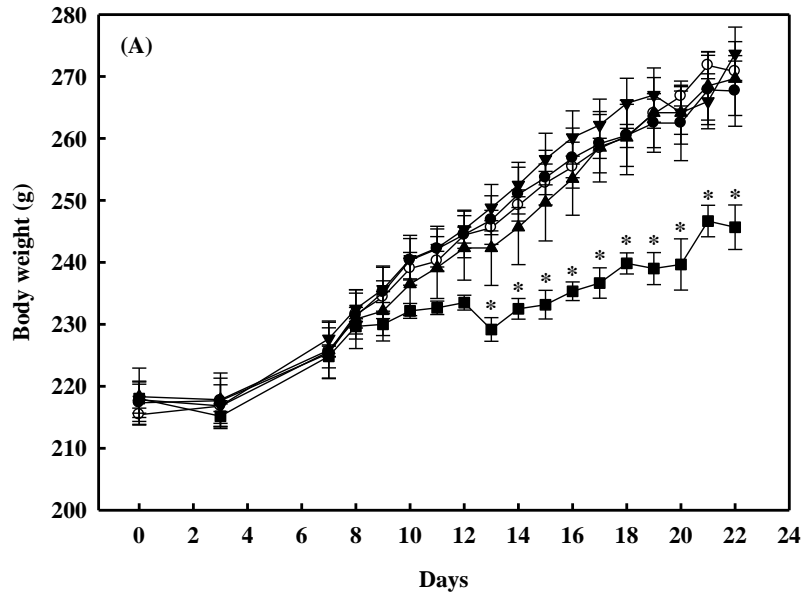
รูปที่ 3 ภาพการถ่ายภาพเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ RAW264.7 ของ PMT และ PMC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) A) Unstimulated cells, B) rRANKL+DMSO, C) rRANKL+PMT and D) rRANKL+PMC



รูปที่ 4 จำนวนเซลล์ RAW264.7 ที่เกิดการกลายสภาพ เมื่อทดสอบกับ PMT และ PMC (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ค่าเฉลี่ย \pm SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

ผลการทดสอบฤทธิ์เอสโตรเจน

หนูที่ถูกตัดรังไข่ออกจะมีผลทำให้มีพฤติกรรมการกิน และน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ ซึ่งเกี่ยวเนื่องจากการสูญเสียระดับเอสโตรเจนนั่นเอง⁽¹⁹⁻²¹⁾ จากการทดลอง หนูที่ได้รับ PMT 50 mg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (PMT-50) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มตัวอย่าง การเปลี่ยนแปลงนี้เกิดขึ้นในวันที่ 12 ของการทดลอง (รูปที่ 5A) สาเหตุ เนื่องจากการทดแทนของเอสโตรเจนจากหัวกวาวเครือนั่นเอง⁽²⁴⁻²⁵⁾ ในวันเดียวกันนี้ หนูที่ได้รับ PMC 50 mg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (PMC-50) มีฤทธิ์เอสโตรเจนเกิดขึ้นเช่นกัน แต่มีระยะเวลาที่สั้นกว่าใน PMT จึงสรุปได้ว่า PMC-50 มีฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างอ่อน แต่ PMT-50 มีฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างแรง จากการทดสอบ ในหนูที่ตัดรังไข่ทั้ง (รูปที่ 5) ซึ่งมีการรายงานข่าวสารที่เป็นตัวการออกฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างแรงในหัว กวาวเครือ คือ miroestrol and deoxymiroestrol⁽²⁶⁾ แต่ในส่วนของสารกลุ่มไอโซฟลาโวนอยด์ เช่น daidzein, genistein, และ puerarin กลับมีฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างอ่อน⁽²⁷⁾



รูปที่ 5 ผลของน้ำหนักตัว (A) และ %Co (B) ของหนูตัดรังไข่ ที่ทดสอบกับ PMT และ PMC (น้ำเปล่า; (O), 10 หรือ 50 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (●) PMT-10 and (■) PMT-50 และ 10 หรือ 50 mg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน (▲) PMC-10 and (▼) PMC-50 *แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

การทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน

จากผลการทดลองในตารางที่ 2 สารสกัดจาก PMC มีฤทธิ์ในการต้านออกซิเดชันดีกว่า PMT ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณสารไอโซฟลาโวนอยด์ที่มีมากกว่าเช่นกัน ซึ่งมีรายงานว่าสารไอโซฟลาโวนอยด์หลายชนิดนั้นมีต้านออกซิเดชัน⁽³⁾ แต่อย่างไรก็ตามฤทธิ์ที่เกิดขึ้นยังไม่สามารถเทียบเท่ากับสารมาตรฐานเช่น วิตามิน C (ascorbic acid) ซึ่งจัดว่ามีฤทธิ์อย่างอ่อน โดยวิธีของ Qusti และคณะ⁽²⁸⁾ แต่ยังถือว่ามีฤทธิ์ที่ดีกว่าพืชหลายชนิด⁽²⁹⁻³¹⁾

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (ค่า IC₅₀ mg/mL) ของ PMT และ PMC โดยวิธี DPPH assay

ตัวอย่าง	IC ₅₀ (mg/mL)
PMT	15.65±0.35 ^c
PMC	2.85±0.05 ^b
Ascorbic acid	0.02±0.00 ^a

ค่าเฉลี่ย±SE และตัวอักษรแสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าเพาะเลี้ยงเซลล์กวางเครือขาวสามารถผลิตสารไอโซฟลาโวนอยด์ได้ปริมาณมาก ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเซลล์สลายกระดูก และฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในเกณฑ์ที่ดี แต่กลับมีฤทธิ์เอสโตรเจนอย่างอ่อน ผลที่ได้อาจมีส่วนสำคัญในการผลิตยารักษาโรค พิจารณาจากการใช้สารไอโซฟลาโวนอยด์ในการรักษาโรคกระดูกพรุน และโรคมะเร็ง โดยที่มีผลข้างเคียงน้อยที่สุด ซึ่งยังคงต้องมีการศึกษา และพัฒนาต่อไป

บรรณานุกรม

1. Kamenarova K, Abumhadi N, Gecheff K, Atanassov A. Molecular farming in plants: An approach of agricultural biotechnology. *J. Cell Mol. Biol.* 4: 77-86 (2005)
2. Malaivijitnond S. Medical applications of phytoestrogens from *Pueraria mirifica* Thai herb. *Front. Med.* 6: 8-21 (2012)
3. Cherdshewasart W, Sutjit W. Correlation of antioxidant activity and major isoflavonoid contents of the phytoestrogen-rich *Pueraria mirifica* and *Pueraria lobata* tubers. *Phytomedicine.* 15: 38-43 (2008)
4. Jaroenporn S, Malaivijitnond S, Wattanasirmit K, Trisomboon H, Watanabe G, Taya K, Cherdshewasart W. Effect of *Pueraria mirifica*, an herb containing phytoestrogens, on reproductive organs and fertility of adult male mice. *Endocrine.* 30: 93-101 (2006)
5. Trisomboon H, Malaivijitnond S, Wattanasirmit S, Watanabe G, Cherdshewasart W, Taya K. The estrogenic effect of *Pueraria mirifica* on gonadotrophin levels in aged monkeys. *Endocrine.* 29: 129-134 (2006)
6. Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas.* 59: 137-148 (2008)
7. Thanonkeo S, Panichajakul S. Production of isoflavones, daidzein and genistein in callus cultures of *Pueraria candollei* Wall. Ex Benth. var. *mirifica*. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 28: 45-53 (2005)
8. Udomsuk L, Jarukamjorn K, Tanaka H, Putalun W. Production of isoflavonoids in callus cultures of *Pueraria candollei* var. *mirifica*. *Z. Naturforsch. C.* 64: 239-243 (2009)
9. Boonsongcheep P, Korsangruang S, Soonthornchareonnon N, Chintapakorn Y, Saralamp P, Prathanturarug S. Growth and isoflavonoid accumulation of *Pueraria candollei* var. *candollei* and *P. candollei* var. *mirifica* cell suspension cultures. *Plant Cell Tiss. Org.* 101: 119-126 (2010)
10. Furmanowa M, Nosov AM, Oreshnikov AV, Klushin AG, Kotin M, StaroŚciak B, Sliwińska A, Guzewska J, Bloch R. Antimicrobial activity of *Polyscias filicifolia* cell biomass extracts. *Pharmazie.* 57: 424-426 (2002)

11. Lim FL, Yam MF, Asmawi MZ, Chan LK. Elicitation of *Orthosiphon stamineus* cell suspension culture for enhancement of phenolic compounds biosynthesis and antioxidant activity. *Ind. Crop Prod.* 50: 436-442 (2013)
12. Zhan Y, Zou JH, Ma X, Dai J. Biotransformation of 14-deacetyl sinenxan A by *Ginkgo* cell suspension cultures and the cytotoxic activity evaluation. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 36: 43-46 (2005)
13. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum.* 15: 473-479 (1962)
14. Cherdshewasart W, Subthong S, Dahlan W. Major isoflavonoid contents of the phytoestrogen rich-herb *Pueraria mirifica* in comparison with *Pueraria lobata*. *J. Pharmaceut. Biomed.* 43: 428-434 (2007)
15. Wisutisitthiwong C, Buranaruk C, Pudhom K, Palaga T. The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF- κ B and MAPK pathways. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 415:361-366 (2011)
16. Zhang Y, Zeng X, Zhang L, Zheng X. Stimulatory effect of puerarin on bone formation through activation of PI3K/Akt pathway in rat calvaria osteoblast. *Planta Med.* 73: 341-347 (2007)
17. Wong R, Rabie B. Effect of puerarin on bone formation. *Osteoarth. Cartilage.* 15: 894-899 (2007)
18. Tiyasatkulkovi W, Charoenphandhu N, Wongdee K, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Malaivijitnond S. Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica*. *Phytomedicine.* 19: 1147-1155 (2012)
19. Pallier E, Aubert R, Lemonnier D. Effect of diet and ovariectomy on adipose tissue cellularity in mice. *Reprod. Nutr. Dev.* 20: 631-636 (1980)
20. Joyner JM, Hutley LJ, Cameron DP. Estrogen receptors in human preadipocytes. *Endocrine.* 15: 225-230 (2001)

21. Nazz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS. The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology*. 144: 3315-3320 (2003)
22. Silva LE, Castro M, Amaral FC, Antunes-Rodrigues J, Elias LL. Estradiol-induced hypophagia is associated with the differential mRNA expression of hypothalamic neuropeptides. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43: 759-766 (2010)
23. Tsai YC, Lee YM, Lam KK, Wu YC, Yen MH, Cheng PY. The role of hypothalamic AMP-activated protein kinase in ovariectomy-induced obesity in rats. *Menopause*. 17: 1194-1200 (2010)
24. Earley CJ, Leonard BE. Androgens, estrogens and their anti-hormones: effects on body weight and food consumption. *Pharmacol. Biochem. Be.* 11: 211-214 (1979)
25. Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokul P, Urasopon N, Cherdshewasart W. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen-rich herb. *J. Ethnopharmacol.* 107: 354-360 (2006)
26. Chansakaow S, Ishikawa T, Seki H, Sekine K, Okada M, Chaichantipyuth C. Identification of deoxymiroestrol as the actual rejuvenating principle of “Kwao Keur”, *Pueraria mirifica*. The known Miroestrol may be an artifact. *J. Nat. Prod.* 63: 173-175 (2000)
27. Malaivijitnond S, Tungmunnithum D, Gittarasanee S, Kawin K, Limjunyawong N. Puerarin exhibits weak estrogenic activity in female rats. *Fitoterapia*. 81: 569-576 (2010)
28. Qusti S, Abo-khatwa A, Lahwa M. Screening of antioxidant activity and phenolic content of selected food items cited in the Holly Quran. *Europ. J. Biol. Sci.* 2: 40-51 (2010)
29. Wu S, Ng L. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Monordica charantia* Linn. var. abbreviate Ser.) in Taiwan. *LWT-Food Sci. Technol.* 41: 323-330 (2008)
30. Wu N, Fu K, Fu Y, Zu Y, Chang F, Chen Y, Liu X, Kong Y, Gu C. Antioxidant activities of extracts and main component of Pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] leaves. *Molecules*. 14: 1032-1043 (2009)

31. Alsabri S, Zetrini A, Ermeli N, Mohamed S, Bensaber S, Hermann A, Gbaj A. Study of eight medicinal plants for antioxidant activities. *J. Chem. Pharm. Res.* 4: 4028-4031 (2012)



รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย)ฤทธิ์ในการต้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืช

(ภาษาอังกฤษ) Anti-osteoclastogenic activity of pure compounds extracted from plants
ภายใต้แผนงานวิจัย

(ภาษาไทย) การพัฒนายาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ

(ภาษาอังกฤษ) Development of Prototype Drugs from Medicinal Plants for Prevention of
Osteoporosis in Elderly

รายนามคณะผู้วิจัย

(1) รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชนิษฐา พุดหอม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(3) นางสาวสุพัตรา ซวลิตพงษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

รายงานการวิจัย

โครงการวิจัยเรื่อง

(ภาษาไทย) ฤทธิ์ในการต้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืช

(ภาษาอังกฤษ) Anti-osteoclastogenic activity of pure compounds extracted from plants
ภายใต้แผนงานวิจัย

(ภาษาไทย) การพัฒนายาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ

(ภาษาอังกฤษ) Development of Prototype Drugs from Medicinal Plants for Prevention of
Osteoporosis in Elderly

รายนามคณะผู้วิจัย

(1) รองศาสตราจารย์ ดร. ธนาภัทร ปาลกะ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(2) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา พุดหอม

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(3) นางสาวสุพัชรา ขวลิตพงษ์

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgements)

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหงและ Professor Jun Wu แห่ง Jinan University (China) สำหรับสารสกัดจากสมุนไพรที่ใช้ในการทำการทดลอง รวมทั้งขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานด้วยดีมาโดยตลอด

บทคัดย่อ

ความหนาแน่นของกระดูกมีการรักษาไว้ให้สมดุลโดยเซลล์สร้างกระดูกซึ่งทำหน้าที่สร้างกระดูกกับเซลล์สลายกระดูกซึ่งสลายกระดูก สาเหตุหลักของการเกิดภาวะกระดูกพรุนซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญในสังคมผู้สูงวัย คือ ความไม่สมดุลระหว่างเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูก การลดต่ำลงอย่างต่อเนื่องของมวลกระดูกนำไปสู่การเพิ่มความไวต่อการเกิดกระดูกหัก วิธีการป้องกันและบำบัดภาวะนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ในงานวิจัยนี้ เซลล์สลายกระดูกมีการเหนี่ยวนำมาจากเซลล์พรีเคอร์เซอร์ของแมโครฟาจที่มาจากไขกระดูก (BMMP) ของหนูเม้าส์โดยใช้ Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) เพื่อใช้ในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ชนิดนี้ ทำการคัดกรองเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์จากสารที่ทำให้บริสุทธิ์จากพืช โดยใช้การตรวจวัดแอกทิวิตีของ tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) โดยการย้อมเป็นตัวบ่งชี้ ในจำนวนสาร 21 ชนิดที่คัดกรอง ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากพืชสมุนไพร พบว่ามีสาร 3 ชนิดที่ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกที่เหนี่ยวนำโดย RANKL ที่ความเข้มข้นที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำหรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สารทั้งสามชนิดนี้มีรหัสของสาร คือ ASTP010, ASTP019 และ WJ10 ซึ่ง ASTP019 เป็นหนึ่งในสารในกลุ่มนี้ที่แยกได้จากว่านชัชมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb) และมีโครงสร้างเป็นสาร diarylheptanoid สารนี้มีค่า inhibitory concentration 50 (IC50) ต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกเท่ากับ 1.49 ไมโครโมลาร์ เมื่อทำการศึกษาในรายละเอียดเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ พบว่าการบำบัดเซลล์ด้วย ASTP019 ยับยั้งการแสดงออกของยีน nuclear factor of activated T cells (*NFATc1*) ทั้งในระดับการถอดรหัสและแปลรหัส ซึ่งโปรตีนนี้มีหน้าที่เป็นทรานสคริปชันแฟคเตอร์หลักของกระบวนการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก อีกทั้ง การแสดงออกของ *Cathepsin K* ซึ่งเป็นยีนภายใต้การควบคุมของ *NFATc1* ลดลงในเซลล์ที่ถูกบำบัดด้วย ASTP019 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับตัวทำละลาย จากนั้นศึกษาผลของ ASTP019 ต่อวิถีสัญญาณ mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ NF- κ B ซึ่งเป็นสองวิถีสัญญาณหลักปลายน้ำของ RANK ซึ่งพบว่าการกระตุ้นวิถีสัญญาณของ Extracellular Signal-regulated Kinase (Erk) มีการกดย่างจำเพาะโดยสารนี้เมื่อกระตุ้นด้วยสัญญาณ RANK/RANKL แต่โมเลกุลของวิถีสัญญาณอื่นในวิถีสัญญาณ MAPK และ NF- κ B ยังเป็นปกติ ดังนั้น จากผลทั้งหมดนั้น บ่งชี้ว่า ASTP019 ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกผ่านการกดวิถีสัญญาณ Erk ซึ่งสารนี้อาจพัฒนาเป็นยาป้องกันและบำบัดโรคกระดูกพรุนได้

ABSTRACT

Bone density is maintained by the balance between bone formation mediated by osteoblasts and bone resorption mediated by osteoclasts. The major causes of osteoporosis, a major health concern for aging communities, is an imbalance between osteoblasts and osteoclasts. The progressive decrease in bone mass leads to an increased susceptibility to bone fractures. New prevention and therapeutic measures to treat this condition is urgently needed. In this study, murine bone-marrow-derived macrophage progenitor (BMMPs) were induced to differentiate to become osteoclast using Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand (RANKL) in order to use for screening for compounds with anti-osteoclastogenesis activity. Screening was conducted to identify compound(s) with anti-osteoclastogenesis activity from plant derived compounds, using tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) staining and TRAP activity assay as indicators. Among twenty one purified compounds from medicinal plants, three compounds significantly suppressed RANKL-induced osteoclast differentiation at the concentration with low to no cytotoxicity. The three compounds were designated as ASTP10, ASTP19 and WJ10. One of these compounds, ASTP019, was isolated from *Curcuma comosa* Roxb. and has the structure in the group of diarylheptanoid. This compound has an inhibitory concentration 50 (IC₅₀) of osteoclastogenesis at 1.49 μ M. Detailed study was conducted to investigate the mode of action of this compound. ASTP019 treatment significantly suppressed the expression of nuclear factor of activated T cells (NFATc1), a transcriptional master regulator of osteoclast differentiation, at both transcription and translation level. Furthermore, the expression of *Cathepsin K*, a downstream gene of NFATc1, was also down-regulated in ASTP019-treated cells, as compared to the vehicle control treatment. The effect of ASTP019 treatment was further investigated on mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NF- κ B pathways which are two major downstream signaling pathways of RANK. The activation of Extracellular Signal-regulated Kinase (Erk) was specifically inhibited by this compound upon stimulation with RANK/RANKL signaling but other signaling molecules in the MAPK and NF- κ B were remained intact. Taken together, these results suggested that ASTP019

suppresses osteoclastogenesis via inhibition of Erk signaling pathways and this compound may be developed further as drug for prevention and treatment of osteoporosis.

คำสำคัญ

สารออกฤทธิ์ชีวภาพ โรคกระดูกพรุน เซลล์สลายกระดูก RANK/RANKL

Keywords

Bioactive compounds; osteoporosis; osteoclast; RANK/RANKL

สารบัญเรื่อง

	หน้าที่
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อ	4
Abstract	5
คำสำคัญ/key words	6
สารบัญภาพ	8
คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	9
1. บทนำ	10
2. การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	10
3. ระเบียบวิธีวิจัย	11
4. ผลการวิจัย	13
5. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	20
6. บรรณานุกรม	22
7. ภาคผนวก	23

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้าที่
รูปที่ 1 การเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกของเซลล์ไลน์ RAW264.7 หรือเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิ	14
รูปที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกของ ASTP10, ASTP19	16
รูปที่ 3 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ต้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืช 2 ชนิด (ASTP10, WJ10)	16
รูปที่ 4 ผลของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของ NFATc1	17
รูปที่ 5 ผลของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของ <i>Cathepsin K</i> mRNA ในเซลล์สลายกระดูก	18
รูปที่ 6 ผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ MAPK โดย RANK/RANKL	19
รูปที่ 7 ผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B โดย RANK/RANKL	20

คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

BMMP: Bone marrow-derived macrophage precursor

MAPK: mitogen-activated protein kinase

RANK: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B

RANKL: Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand

RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

TRAP: Tartrate-resistant Acid Phosphatase

บทนำ

จากการที่ประชากรโลกมีอายุเฉลี่ยยาวขึ้นทำให้คาดว่าผู้สูงอายุในประเทศต่างๆ รวมถึงประเทศไทยจะมีเพิ่มมากขึ้น กลุ่มโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการการชราภาพกลุ่มสำคัญหนึ่ง คือ โรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของกระดูก โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) เป็นโรคที่มีสาเหตุจากความไม่สมดุลของกระบวนการสร้างกระดูกและกระบวนการสลายกระดูก โดยกระบวนการเหล่านี้มีการทำงานโดยกลุ่มเซลล์หลักเฉพาะทาง คือ เซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) สำหรับกระบวนการสร้างกระดูก และเซลล์เซลล์สลายกระดูก (osteoclast) สำหรับกระบวนการสลายกระดูก เซลล์สลายกระดูกเป็นเซลล์ที่มีพัฒนาการมาจากกลุ่มเซลล์ของระบบสร้างเลือด (hematopoietic cells) และมีหน้าที่หลักในการสลายกระดูก (bone resorption) เพื่อการสร้างและซ่อมแซมกระดูกใหม่ ซึ่งสาเหตุหลักหนึ่งของการเกิดโรคกระดูกพรุน คือ การทำงานเกินของเซลล์สลายกระดูก ในปัจจุบันแม้จะมียาบำบัดอาการโรคกระดูกพรุนก็ตาม แต่ยาที่มีอยู่ในปัจจุบันมักเน้นบำบัดอาการและยังมีผลข้างเคียง ทำให้การพัฒนาป้องกันและบำบัดกลุ่มอาการความผิดปกติของการสลายกระดูกจึงมีความต้องการเพิ่มมากขึ้น สารออกฤทธิ์ชีวภาพใหม่ที่มีฤทธิ์กระตุ้นกระบวนการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกหรือสารที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ดังกล่าว คาดว่าจะเป็นสารตั้งต้นในการพัฒนาเพื่อป้องกันหรือยาบำบัดอาการของโรคกระดูกพรุนนี้ได้ ในโครงการวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ที่จะคัดกรองสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งเป็นสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากแหล่งพืชและศึกษากลไกการทำงานกวดการเปลี่ยนสภาพของสารดังกล่าวในระดับโมเลกุลในระดับ *in vitro* เพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานสำหรับต่อยอด

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

เซลล์สลายกระดูกเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีหลายนิวเคลียส (multinucleated giant cell) ที่มีพัฒนาการมาจากเซลล์สายมอโนไซต์/แมโครฟาจ (monocyte/macrophage lineage) เซลล์ประเภทนี้หลั่งกรดและเอนไซม์สำหรับย่อยสลายเพื่อสลายกระดูก Tartrate resistance acid phosphatase (TRAP) เอนไซม์ชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่ใช้เป็นเครื่องหมายในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเซลล์สลายกระดูกซึ่งมีความจำเพาะสูง ไซโตไคน์สองชนิด ได้แก่ RANK-L และ M-CSF มีบทบาทสำคัญในการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ที่ได้จากไขกระดูก (bone marrow cells) ในกลุ่มมัยอีลอยด์ [1] เซลล์สร้างกระดูกสามารถควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกได้โดยการหลั่งไซโตไคน์สองประเภทนี้ ซึ่งกระบวนการทั้งสองจะอยู่ในสภาวะมีความสมดุลในคนปกติ การไม่สมดุลระหว่างกระบวนการสร้างและการสลายกระดูกมักส่งผลให้เกิดภาวะการสูญเสียมวลกระดูกเกินปกติทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้

เมื่อเซลล์สลายกระดูกมีพัฒนาการสมบูรณ์แล้ว จะทำหน้าที่สลายกระดูกโดยจะจับกับโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน RGD บนกระดูกและเปลี่ยนโครงสร้างของไฮโดรพลาสมเป็น ruffle borders และหลังกรดและเอนไซม์เพื่อสลายกระดูกที่อยู่ด้านล่างของเซลล์ ซึ่งทำให้ผลึกอะพาไทต์ (apatite crystal) มีการสลายตัว กระบวนการเหล่านี้เป็นเป้าหมายของยาบรรเทาอาการของโรคกระดูกพรุนหลายชนิดในปัจจุบัน [2] ยาสำหรับบำบัดโรคกระดูกพรุนในปัจจุบันมีหลายชนิด เช่น bisphosphonates แต่มีปัญหาต่างๆ เช่น ผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ ราคาที่แพงสำหรับผู้ป่วยในประเทศ เป็นต้น

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากธรรมชาติที่สามารถต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกหรือกุดการทำงานสลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูกที่พัฒนาการสมบูรณ์แล้วมีศักยภาพสูงในการนำไปพัฒนาเป็นยาต้านการสลายกระดูกเพื่อชะลอภาวะการสูญเสียมวลกระดูกได้ อีกทั้ง ยังอาจสามารถใช้เป็นอาหารเสริมเพื่อป้องกันการเกิดอาการได้ ที่ผ่านมามีการรายงานเกี่ยวกับสารออกฤทธิ์เช่นนี้จากธรรมชาติ ทั้งจากพืชและจุลินทรีย์ที่สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกได้ [2]

Woo และคณะ (2004) รายงานว่า quercetin ซึ่งเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบมากในผลไม้และผัก โดยเฉพาะในสารสกัดจากหัวหอม สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของแอกติวิตีของ TRAP ได้ ในเซลล์หรืออสติโอคลาสต์ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L [3] อีกทั้ง ในปี 2006 กลุ่มวิจัยเดียวกันยังรายงานเกี่ยวกับ reveromycin A ซึ่งเป็นสารมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่มีหมู่คาร์บอกซิลิก 3 หมู่ ในโครงสร้างซึ่งแยกได้จากสารสกัดจุลินทรีย์ *Streptomyces* ซึ่งสารนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์สลายกระดูกตายแบบ apoptosis ได้แบบจำเพาะ โดยสารนี้กุดการทำงานของ isoleucyl-tRNA synthetase ในเซลล์สลายกระดูกแบบจำเพาะ [4]

ในปี 2010 Tang และคณะรายงานถึงไอโซฟลาโวนที่แยกได้จากพืชซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับเอสโตรเจนสามารถป้องกันการสูญเสียกระดูกได้ โดยเฉพาะ genestein ที่เป็นไอโซฟลาโวนกลุ่มหลักในถั่วเหลืองสามารถกุดการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกจากเซลล์ไขกระดูกและ RAW264.7 ที่เหนี่ยวนำโดย RANK-L และ M-CSF ได้ [5] อีกทั้ง ยังมีสารต้านการสลายกระดูกที่แยกได้จากเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น FK506 Concanamycin B ซึ่งแยกได้จาก *Streptomyces* sp. [2] และ prodigiosins ซึ่งแยกได้จาก *Serratia marcescens* เป็นต้น [6] ที่ผ่านมามีผู้วิจัยได้รายงานถึงสารในกลุ่มลิโมนอยด์ที่มีฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก ซึ่งออกฤทธิ์โดยการยับยั้งวิถีสัญญาณ NF- κ B และ MAPK ซึ่งอยู่ปลายน้ำจาก RANKL [7] จากการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่างๆ เหล่านี้และการศึกษาในเชิงลึกเกี่ยวกับวิถีสัญญาณที่นำไปสู่การเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกทำให้รู้ถึงโมเลกุลที่อาจเป็นเป้าหมายในการออกแบบยาต้านการกระดูกงอกได้ [8]

ระเบียบวิธีวิจัย

1) การเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกและการคัดกรองสาร

นำเซลล์ไลน์ RAW264.7 มากระตุ้นด้วย recombinant RANK-L (rRANK-L; Biogen) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 5 วัน พร้อมกับสารที่ทำการคัดกรองที่ความเข้มข้นสูงสุดที่ทำให้การอยู่รอดของเซลล์สูงกว่า 80% ขึ้นไป โดยใช้ข้อมูลจากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารทดสอบก่อนหน้านี้นำไปเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มี rRANK-L ผสมอยู่ ทุกๆ 2 วัน จากนั้นวัดการเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกโดยการย้อม tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) โดยวิธีที่อธิบายต่อไปนี้ ในกรณีของเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิ นำเซลล์ไขกระดูกจากหนูโมซ C57BL/6 หรือ BALB/c มากระตุ้นด้วย Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 25 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร นาน 3 วันหลังจากนั้น ใส่ rRANK-L เช่นเดียวกับเซลล์ไลน์ RAW264.7 และบ่มนาน 9 วัน หลังจากนั้นตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงสภาพโดยย้อมหาเอกทิวิตีของ TRAP เช่นเดียวกับเซลล์ไลน์ RAW264.7

2) การตรวจหาเอกทิวิตีของTRAP และการย้อมเซลล์เพื่อตรวจหา TRAP

หลังจากเหนี่ยวนำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกแล้ว ตรึงเซลล์ด้วย 10% formaldehyde และเติมสารละลาย p-nitrophenylphosphate ใน citrate buffer 50 มิลลิโมลาร์ (pH 4.6) ซึ่งเป็นซับสเตรทของ TRAP และเติม 0.1 N NaOH และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตรด้วยไมโครเพลทรีดเดอร์ สำหรับการย้อมหาเอกทิวิตีของ TRAP ในเซลล์สลายกระดูกนั้น นำเซลล์ที่เหนี่ยวนำเป็นเซลล์สลายกระดูกมาตรึงด้วย 10% formaldehyde นาน 10 นาที และล้างใน 95% เอทานอล จากนั้นเติม naphthol AS-MX phosphate 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ fast red violet LB salt 0.6 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใน sodium acetate buffer 50 มิลลิโมลาร์ (pH 5.0) ที่มี sodium tartrate 50 มิลลิโมลาร์ผสมอยู่ หลังจากล้างด้วยน้ำแล้วทำให้แห้ง ส่งภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และนับจำนวนเซลล์สลายกระดูกที่ย้อมติดสีแดงเข้มและมีมากกว่า 3 นิวเคลียสในหนึ่งเซลล์

3) Quantitative RT-PCR

บำบัดเซลล์ไขกระดูกหรือเซลล์ไลน์ RAW264.7 ด้วยสารสกัดจากพืชหรือตัวทำละลายควบคุม (Dimethyl sulfoxide; DMSO) ดังที่ระบุในแต่ละการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ เมื่อจะเก็บ RNA ทั้งหมด ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและเติมน้ำยา TriZol Reagent (Invitrogen) 1 มิลลิลิตรในหลอดและบ่มทิ้งไว้นาน 2 นาที จากนั้นดูดเก็บเซลล์ทั้งหมดและสกัด RNA ตามคู่มือของผู้ผลิต วัดปริมาณ RNA ที่ได้โดย Qubit Fluorometer (Invitrogen) และนำ RNA 100-500 นาโนกรัมไปเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ Reverse Transcriptase (Fermentas) จากนั้นนำ cDNA มาวัดปริมาณ mRNA เชิงสัมพันธ์ของ *NFATc1* และ *Cathepsin K* โดยใช้ไพรเมอร์และภาวะในการเพิ่มปริมาณดังตารางต่อไปนี้นำไปปฏิบัติโดยใช้ MJ Mini personal Thermal cycler (Bio-Rad) คำนวณระดับการแสดงออกเชิงสัมพันธ์ของ mRNA แต่ละชนิดโดยวิธี $2^{-\Delta\Delta CT}$ โดยใช้ β -actin เป็นชุดควบคุม

ตารางที่ 1 คู่ไพรเมอร์และภาวะในการเพิ่มปริมาณโดยวิธี PCR

Gene	Primer sequences	Annealing temp. (°C)	Product size (bp)
<i>NFATc1</i>	Forward: GGTAACTCTGTCTTTCTAACCTTAAGCTC Reverse: GTGATGACCCCAGCATGCACCAGTCACAG	62	240
<i>Cathepsin K</i>	Forward: GGCCAACTCAAGAAGAAA Reverse: GTACCCCTCTGCATTTAGC	58	225
<i>β-actin</i>	Forward: ACCAACTGGGACGACATGGAGAA Reverse: GTGGTGGTGAAGCTGTAGCC	55	380

4) Western blot

บำบัดเซลล์ตั้งที่ระบุในการทดลองที่ระยะเวลาต่างๆ ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้งและล้างเซลล์ด้วย cold PBS 1 ครั้ง และทำให้เซลล์แตกด้วย RIPA buffer ที่เติม protease inhibitor cocktail และ phosphatase inhibitor (Sigma Aldrich) หลังจากดูดผสมแล้วเก็บไลเซตของเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm นาน 5 นาที เก็บส่วนใสเพื่อนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน วัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid (PIERCE) และปรับปริมาณโปรตีนของแต่ละตัวอย่างให้เท่ากันและนำไปแยกตามขนาดด้วยวิธี SDS-PAGE โดยผสมตัวอย่างโปรตีนใน Laemli Buffer และต้มนาน 5 นาที แยกโปรตีนโดยใช้ 10% SDS-PAGE ด้วย Protein III system (Bio-Rad) โอนถ่ายโปรตีนไปยังแผ่นเยื่อ PVDF ด้วย semi-dry transfer Trans-Blot SD (Bio-Rad) และบ่มกับแอนติบอดีปฐมภูมิที่จำเพาะต่อ NFATc1, phosphor-MAPK หรือ total MAPK, phosphor-NF-κBp65 หรือ total NF-κBp65, IκBα (Cell Signaling Technology) และ β-actin (Millipore) และตรวจหาแอนติบอดีปฐมภูมิด้วยแอนติบอดีทุติยภูมิที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ Horseradish Peroxydase ตรวจหาสัญญาณโดยวิธี chemiluminescence

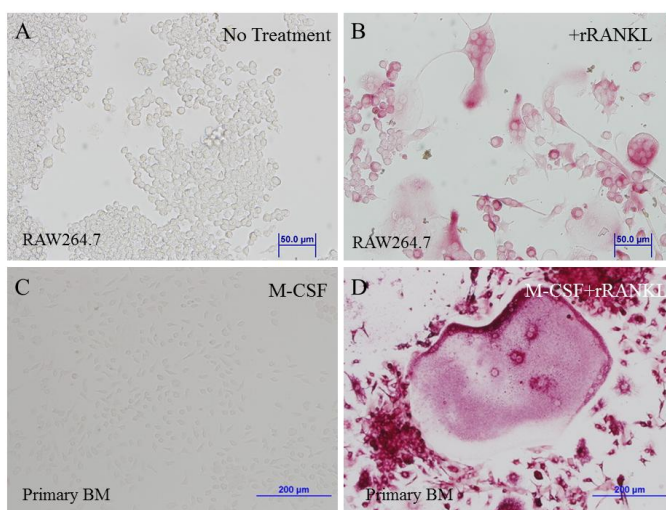
การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดย Student's t-test โดยใช้ SPSS software (SPSS15) ให้ความต่างอย่างมีนัยสำคัญมีค่า $p < 0.05$

ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

1) การทดสอบระบบการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูก

เพื่อหาภาวะที่เหมาะสมของระบบการคัดกรองสารที่มีฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูก จึงเหนี่ยวนำเซลล์ไลน์ RAW264.7 หรือเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิจากหนูไมซ์ให้เป็นเซลล์สลายกระดูกตั้งที่อธิบายข้างต้น และตรวจติดตามการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกโดยการย้อมเซลล์เพื่อตรวจวิเคราะห์ TRAP ดังแสดงในรูปที่ 1 ทั้งเซลล์ไลน์ RAW264.7 (A-B) และเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิ (C-D) ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย rRANKL ย้อมติดสีแดงเข้มที่บ่งชี้ถึงแอกทิวิตีของเอนไซม์ TRAP และยังสามารถสังเกตเห็นเซลล์ที่มีมากกว่า 3 นิวเคลียสจำนวนมาก ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้รับสัญญาณกระตุ้นจากรANKL ไม่พบมีเซลล์ที่ย้อมติดสี แสดงว่าระบบการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนสภาพสามารถใช้ในการคัดกรองสารออกฤทธิ์ต้านกระบวนการนี้ได้



รูปที่ 1 การเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกของเซลล์ไลน์ RAW264.7 หรือเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิ (A-B) เลี้ยงเซลล์ไลน์ RAW264.7 ภายใต้การมีหรือไม่มี rRANKL นาน 5 วัน และย้อมหาแอกทิวิตีของ TRAP (C-D) เลี้ยงเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิภายใต้การมี M-CSF หรือ M-CSF กับ rRANKL นาน 9 วันและย้อมหาแอกทิวิตีของ TRAP

2) การทดสอบฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกของสารทดสอบ

สรุปผลการรายงานผลก่อนหน้านี ในการทดสอบผลความเป็นพิษของสารสกัดบริสุทธิ์จากพืชที่นำมาทดสอบคัดกรองและแอกทิวิตีด้านการอักเสบ (ด้านการผลิตไนตริกออกไซด์จากเซลล์ไลน์ RAW264.7) ในตารางที่ 1 และนำความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ทำให้มีเซลล์อยู่รอดมากกว่า 80% (IC20) ไปทดสอบผลการด้านการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูก โดยใช้ตัวทำละลาย DMSO เป็นชุดควบคุมบวก ร่วมแสดงผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนสภาพของเซลล์สลายกระดูกในตารางที่ 1

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบความเป็นพิษ ฤทธิ์ต้านการอักเสบและฤทธิ์ต้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์
สลายกระดูกของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืช

รหัสตัวอย่าง	Cytotoxicity (IC ₅₀) (ไมโครโมลาร์)	Anti-inflammatory Activity (IC ₅₀) (ไมโครโมลาร์)	แอกทิวิตีต้านการ เปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ สลายกระดูก
ASTP001	12±3.41	เซลล์ตาย	-
ASTP002	> 50	> 50	-
ASTP003	> 50	> 50	-
ASTP004	> 50	> 50	-
ASTP005	> 50	> 50	-
ASTP006	> 50	> 50	-
ASTP007	> 50	> 50	-
ASTP008	> 50	> 50	-
ASTP009	> 50	> 50	-
ASTP010	17.35±2.25	5.28 ±9.49	+
ASTP011	> 50	> 50	-
ASTP012	> 50	> 50	-
ASTP013	> 50	> 50	-
ASTP014	> 50	> 50	-
ASTP015	> 50	> 50	-
ASTP016	ไม่ละลายใน DMSO		ND
ASTP017	> 50	> 50	-
ASTP018	> 50	> 50	-
ASTP019	> 50	25.31±2.10	+
ASTP020	> 50	30.0±3.58	-
ASTP021	> 50	> 50	-
ASTP022	> 50	> 50	-
ASTP023	17.56±1.30	เซลล์ตาย	-
ASTP024	> 50	> 50	-
ASTP025	> 50	> 50	-
ASTP026	> 50	> 50	-
ASTP027	> 50	> 50	-

ASTP028	> 50	> 50	-
ASTP029	> 50	25±4.31	-
ASTP030	> 50	> 50	-
ASTP031	> 50	> 50	-
ASTP032	ไม่ละลายใน DMSO		ND
ASTP033	ไม่ละลายใน DMSO		-
ASTP034	> 50	> 50	-
ASTP035	> 50	> 50	-
ASTP036	> 50	> 50	-
ASTP037	> 50	> 50	-
ASTP038	> 50	> 50	-
ASTP039	14±1.85	เซลล์ตาย	-
WJ10	> 50	> 50	+
WJ21	> 50	> 50	-
WJ22	> 50	> 50	-

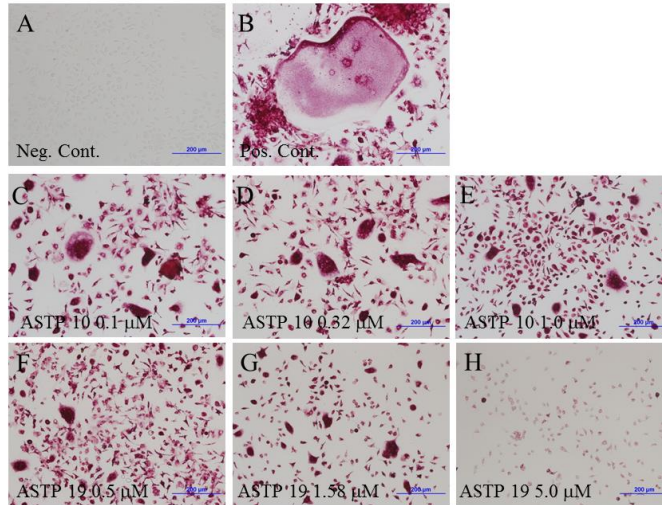
*ND: ไม่ได้ทำการทดสอบ

-: ไม่มีแอกทิวิตี (ร้อยละของการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงต่ำกว่า 10%)

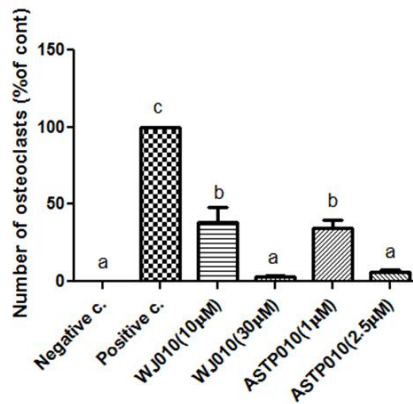
+: มีแอกทิวิตี (ร้อยละของการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงมากกว่า 50% ขึ้นไป)

จากการทดสอบฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพในเซลล์ไขกระดูกพบว่า มีสารที่มีฤทธิ์ 3 ชนิด ซึ่งมีฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก โดยสองชนิด (ASTP10, ASTP19) มีฤทธิ์กีดการอักเสบด้วย ในขณะที่ WJ10 ไม่มีฤทธิ์กีดการอักเสบ

เมื่อนำสารทั้งสามชนิดมาทดสอบยืนยันฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสารที่สามชนิดให้ผลด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกที่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ใช้ (รูปที่ 2 และ 3)



รูปที่ 2 ผลการทดสอบฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกของ ASTP10, ASTP19 นำเซลล์ไขกระดูกปฐมภูมิมาบำบัดด้วยตัวทำละลาย DMSO (A-B), ASTP10 (C-E), ASTP19 (F-H) ที่ความเข้มข้นต่างๆ และเหนี่ยวนำให้เป็นเซลล์สลายกระดูกตั้งที่ระบุข้างต้นและตรวจวัดแอกทิวิตีของ TRAP โดยการย้อมที่ระบุข้างต้น

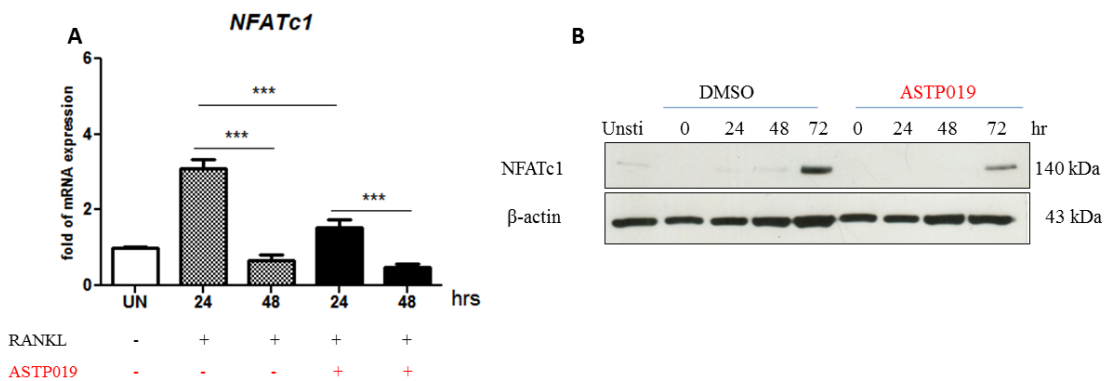


รูปที่ 3 ผลการเปรียบเทียบฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารบริสุทธิ์ที่สกัดจากพืช 2 ชนิด (ASTP10, WJ10) เหนี่ยวนำเซลล์ไขกระดูกให้เป็นเซลล์สลายกระดูกภายใต้การมี ASTP10, WJ10 ที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ DMSO และนับจำนวนเซลล์สลายกระดูก (ย้อมติดสีบ่งชี้แอกทิวิตี TRAP และมี 3 นิวเคลียสขึ้นไป) ผลที่แสดงเป็นผลที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ a, b, c แสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$

3) ผลของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของยีน NFATc1 ในระดับ mRNA และโปรตีน

เพื่อให้รู้ถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่มีฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก จึงเน้นศึกษาฤทธิ์ของ ASTP019 ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม diarylheptanoid ที่สกัดและทำให้บริสุทธิ์ได้จากवानชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) NFATC1 เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนที่

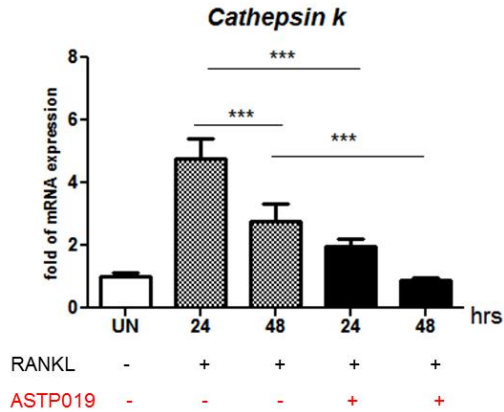
เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพเป็นเซลล์สลายกระดูกและยีนที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์สลายกระดูก โดยถือว่าเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญที่สุดในการควบคุมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ชนิดนี้ จึงนำเซลล์ไขกระดูกหรือเซลล์ไลน์ RAW264.7 มาบำบัดด้วย ASTP019 ที่ความเข้มข้น 1.8 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลาต่างๆ และติดตามการแสดงออกของ mRNA โดยวิธี quantitative RT-PCR และโปรตีนด้วย Western blot ดังแสดงในรูปที่ 4A ระดับการแสดงออกของ *NFATc1* mRNA เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นโดย RANK/RANKL โดยอยู่ในระดับสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงหลังจากเริ่มกระตุ้น ในขณะที่เซลล์ที่ได้รับการบำบัดด้วย ASTP019 มีการลดต่ำลงของระดับ *NFATc1* mRNA อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งผลกระทบของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของ *NFATc1* mRNA นั้นสอดคล้องกับระดับโปรตีนสะสมในเซลล์ที่ตรวจวัดโดยวิธี Western blot ดังแสดงในรูปที่ 4B ดังนั้น ASTP019 กดการแสดงออกของ *NFATc1* ในระดับการถอดรหัสของยีน ทำให้ระดับของโปรตีนที่มีการแปลรหัสลดต่ำลงด้วย



รูปที่ 4 ผลของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของ *NFATc1*

บำบัดเซลล์ไขกระดูก (A) หรือเซลล์ไลน์ RAW264.7 (B) ด้วย ASTP019 (1.8 ไมโครโมลาร์) หรือตัวทำละลายชุดควบคุม DMSO นาน 30 นาที ก่อนใส่ rRANKL ร่วมกับ M-CSF (A) หรือ rRANKL (B) และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ (A) แสดงผลการวัดระดับเชิงสัมพัทธ์ของ *NFATc1* mRNA โดยวิธี quantitative RT-PCR โดยนำผลของระดับ *NFATc1* มาเปรียบเทียบกับ β -actin *** แสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ (B) แสดงผลการวัดระดับโปรตีนโดย Western blot

เพื่อยืนยันผลของ ASTP019 ที่มีต่อการแสดงออกของ *NFATc1* จึงวัดระดับการแสดงออกของยีนที่มีการรายงานว่าอยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย *NFATc1* และมีความสำคัญต่อการทำหน้าที่เป็นเซลล์สลายกระดูก ได้แก่ Cathepsin K ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่สำคัญในการสลายกระดูกของเซลล์สลายกระดูก ดังแสดงในรูปที่ 5 ระดับ mRNA ของยีนนี้เพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย RANK/RANKL และเมื่อเซลล์ได้รับ ASTP019 ร่วมด้วยพบว่าระดับของ mRNA ของยีนนี้ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการลดต่ำลงของ *NFATc1*

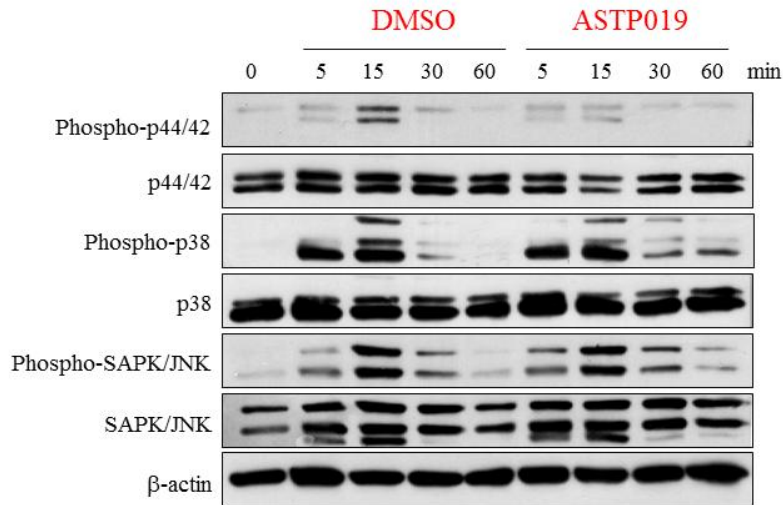


รูปที่ 5 ผลของ ASTP019 ต่อการแสดงออกของ Cathepsin K mRNA ในเซลล์สลายกระดูก บำบัดเซลล์ไขกระดูกด้วย ASTP019 (1.8 ไมโครโมลาร์) หรือตัวทำละลายชุดควบคุม DMSO นาน 30 นาทีก่อนใส่ rRANKL ร่วมกับ M-CSF และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ (A) แสดงผลการวัดระดับเชิงสัมพันธ์ของ Cathepsin K mRNA โดยวิธี quantitative RT-PCR โดยนำผลของระดับ Cathepsin K มาเปรียบเทียบกับ β -actin *** แสดงความต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

4) ผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณปลายน้ำของ RANK/RANKL ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก

วิถีสัญญาณปลายน้ำของ RANK/RANKL ประกอบด้วยวิถีสัญญาณหลัก 2 ส่วน ได้แก่ วิถีสัญญาณ Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) และ NF- κ B ซึ่งการกระตุ้นวิถีสัญญาณทั้งสองผ่านการเติมหมู่ฟอสเฟตที่โปรตีนส่งสัญญาณ นำไปสู่การแสดงออกของ NFATc1 ดังนั้น เพื่อศึกษาผลกระทบออกฤทธิ์ของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณเหล่านี้ จึงศึกษาผลกระทบของการได้รับ ASTP019 ต่อการเติมหมู่ฟอสเฟตของโปรตีนส่งสัญญาณต่างๆ

MAPK ประกอบด้วย 3 วิถีสัญญาณที่มีเอนไซม์ไคเนสหลัก ได้แก่ Extracellular Signal-regulated Kinase (Erk) (p42/44), p38 Kinase และ Stress-activated protein kinases (SAPK)/Jun amino-terminal kinases (JNK) (SAPK/JNK) โดยสามารถวัดระดับการกระตุ้นได้โดยการตรวจวัดระดับการเติมหมู่ฟอสเฟต ดังแสดงในรูปที่ 6 เมื่อเซลล์ไขกระดูกได้รับการกระตุ้นโดย RANK/RANKL แล้ว เอนไซม์ทั้งสามถูกเติมหมู่ฟอสเฟตอย่างรวดเร็วเพื่อให้มีแอกทิวิตี และมีการกำจัดหมู่ฟอสเฟตออกภายหลังการทำงานของเอนไซม์เพื่อควบคุมแอกทิวิตี เมื่อเซลล์ได้รับ ASTP019 พบว่าวิถีสัญญาณ Erk มีการลดต่ำลงของการเติมหมู่ฟอสเฟต ในขณะที่ p38 และ SAPK/JNK นั้นไม่มีผล

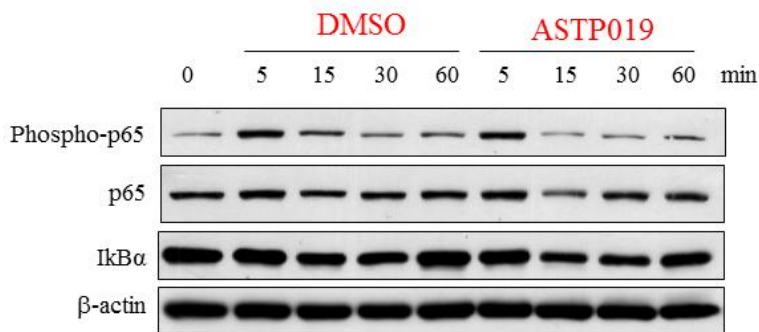


รูปที่ 6 ผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ MAPK โดย RANK/RANKL

บำบัดเซลล์ไขกระดูกด้วย ASTP019 (1.8 ไมโครโมลาร์) หรือตัวทำละลายชุดควบคุม DMSO นาน 30 นาทีก่อนใส่ rRANKL ร่วมกับ M-CSF และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ตรวจวัดระดับโปรตีนและระดับโปรตีนที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตของ MAPK โดยวิธี Western blot

วิถีสัญญาณ NF- κ B เป็นอีกวิถีสัญญาณที่มีความสำคัญปลายน้ำจาก RANK/RANKL ซึ่งโมเลกุลของวิถีสัญญาณหลักได้แก่ NF- κ B (p50, p65, c-Rel, RelB, NF- κ B2) ซึ่งที่ภาวะที่ไม่มีสิ่งเร้า โมเลกุลเหล่านี้จะคงอยู่ในไซโตพลาสซึมโดยมีโปรตีน I κ B α เป็นโปรตีนยึดจับ เมื่อมีสัญญาณกระตุ้น I κ B α จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟตและนำไปสู่การย่อยสลายโดยโปรตีเอโซม (proteasome) ทำให้ NF- κ B สามารถเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสได้ วิถีสัญญาณนี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสัญญาณการอักเสบ การเกิดมะเร็ง และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์รวมทั้งเซลล์สลายกระดูก

เพื่อศึกษาผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B จึงตรวจวัดระดับของ NF- κ Bp65 ที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตและระดับของ I κ B α ที่ถูกย่อยสลาย ดังแสดงในรูปที่ 7 NF- κ Bp65 มีการเติมหมู่ฟอสเฟตอย่างรวดเร็วหลังจากเซลล์ได้รับ RANK/RANKL และ ASTP019 ก็ไม่มีผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของโปรตีนนี้แต่อย่างใด สำหรับระดับของโปรตีน I κ B α พบว่ามีการลดต่ำลงเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้น ซึ่งสอดคล้องกับการกระตุ้น NF- κ Bp65 ซึ่ง ASTP019 ก็ไม่มีผลต่อการลดระดับของ I κ B α เช่นกัน



รูปที่ 7 ผลของ ASTP019 ต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ NF- κ B โดย RANK/RANKL บำบัดเซลล์ไขกระดูกด้วย ASTP019 (1.8 ไมโครโมลาร์) หรือตัวทำละลายชุดควบคุม DMSO นาน 30 นาที ก่อนใส่ rRANKL ร่วมกับ M-CSF และเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆ ตรวจวัดระดับโปรตีนและระดับโปรตีนที่มีการเติมหมู่ฟอสเฟตของ NF- κ B p65 และระดับของ NF- κ B p65 และ I κ B α โดยวิธี Western blot

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ได้ทำการคัดกรองสารสกัดจากพืชเพื่อหาสารออกฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก โดยพบว่ามีสาร 3 ชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ที่กระตุ้นด้วยรีคอมบิแนนท์ RANKL ซึ่งสารทั้งสามชนิดยังไม่เคยมีรายงานถึงฤทธิ์ดังกล่าวมาก่อน หนึ่งในสารนั้น คือ ASTP019 ซึ่งสกัดได้จากवानชัมดลูก ซึ่งเมื่อศึกษากลไกในระดับโมเลกุลพบว่า มีฤทธิ์กีดการกระตุ้นวิถีสัญญาณ Erk ของ MAPK ซึ่งเป็นวิถีสัญญาณปลายน้ำของ RANK/RANKL และควบคุมการแสดงออกของโปรตีน NFATc1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทหลักในการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้มีรายงานการทดสอบนำสารชนิดนี้ไปศึกษาฤทธิ์ในระดับ *in vivo* ในสัตว์ทดลองตัดรังไข่ซึ่งเป็นแบบจำลองของโรคกระดูกพรุน พบว่าสารนี้มีฤทธิ์ชะลอการลดลงของการสูญเสียมวลกระดูกได้ [9] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ ดังนั้น สารที่คัดกรองได้นี้จึงมีศักยภาพในการนำไปพัฒนาเป็นสารต้นแบบสำหรับป้องกันและ/หรือบำบัดอาการกระดูกพรุนต่อไปได้ สำหรับสารอีกสองชนิดที่พบว่ามีฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูกควรมีการศึกษาถึงกลไกในระดับโมเลกุลต่อไป และควรมีการนำไปทดสอบในสัตว์ทดลองแบบจำลองโรคกระดูกพรุนในขั้นต่อไป

ผลผลิต (Output) หรือตัวชี้วัด

1. ได้สารบริสุทธิ์ 3 ชนิดจากพืชที่มีฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก
2. รู้กลไกการออกฤทธิ์ของ ASTP019 ที่มีผลต่อการกระตุ้นวิถีสัญญาณ MAPK

3. นำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ Thailand Society of Biotechnology TSB2014 โดยการนำเสนอปากเปล่า (มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง ระหว่างวันที่ 27-29 พฤศจิกายน 2557)

ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินการกับแผนการดำเนินการที่ตั้งไว้ (Gantt Chart)

กิจกรรม	เดือน											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากพืช	√ ●	√ ●	√ ●									
ทดสอบฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์สลายกระดูก				√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●				
ศึกษาฤทธิ์ด้านการเปลี่ยนแปลงสภาพในระดับโมเลกุล							√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●

● หมายถึง กิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้วเสร็จ √ หมายถึง กิจกรรมที่วางแผนดำเนินการ

บรรณานุกรม

- [1] Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2000 Feb;43 (2):259-69.
- [2] Woo JT, Yonezawa T, Cha BY, Teruya T, Nagai K. Pharmacological topics of bone metabolism: antiresorptive microbial compounds that inhibit osteoclast differentiation, function, and survival. *J Pharmacol Sci* 2008 Apr;106 (4):547-54.
- [3] Woo JT, Nakagawa H, Notoya M, Yonezawa T, Udagawa N, Lee IS, et al. Quercetin suppresses bone resorption by inhibiting the differentiation and activation of osteoclasts. *Biol Pharm Bull* 2004 Apr;27 (4):504-9.
- [4] Woo JT, Kawatani M, Kato M, Shinki T, Yonezawa T, Kanoh N, et al. Reveromycin A, an agent for osteoporosis, inhibits bone resorption by inducing apoptosis specifically in osteoclasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 Mar 21;103 (12):4729-34.
- [5] Tang CH, Chang CS, Tan TW, Liu SC, Liu JF. The novel isoflavone derivatives inhibit RANKL-induced osteoclast formation. *Eur J Pharmacol* 2010 Dec 1;648 (1-3):59-66.
- [6] Woo JT, Ohba Y, Tagami K, Sumitani K, Kataoka T, Nagai K. Prodigiosin 25-C and metacycloprodigiosin suppress the bone resorption by osteoclasts. *Biosci Biotechnol Biochem* 1997 Feb;61 (2):400-2.
- [7] Wisutthiwong C, Buranaruk C, Pudhom K, Palaga T. The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF-kappaB and MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 2011 Nov 18;415 (2):361-6.
- [8] Wada T, Nakashima T, Hiroshi N, Penninger JM. RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trends Mol Med* 2006 Jan;12 (1):17-25.
- [9] Tantikanlayaporn D, Wichit P, Weerachayaphorn J, Chairoungdua A, Chuncharunee A, Suksamrarn A, Piyachaturawat P. Bone sparing effect of a novel phytoestrogen diarylheptanoid from *Curcuma comosa* Roxb. in ovariectomized rats. *PLoS One* 2013 Nov 8; 11: e78739

ภาคผนวก

งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มโครงการ

486,000 บาท

หมวดงบประมาณ	งบประมาณที่ได้รับ (บาท)	รายจ่าย (บาท)
1. งบบุคคลากร	356,400.00	356,400.00
1.1 ผู้ช่วยนักวิจัยทำงานเต็มเวลา		
วุฒิปริญญาตรี (13,300 บาท x 1 คน x 12 เดือน)	159,600.00	159,600.00
วุฒิปริญญาโท (16,400 บาท x 1คน x 12 เดือน)	196,800.00	196,800.00
2. งบดำเนินงาน		
2.1 ค่าตอบแทน	-	-
2.2.ค่าใช้สอย	11,250.00	11,250.00
2.2.1 ค่าจ้างเหมาบริการ	3,750.00	3,750.00
2.2.2 ค่าซ่อมแซม	7,500.00	7,500.00
2.3 ค่าวัสดุ	74,896.00	76,009.28
-วัสดุวิทยาศาสตร์	74,896.00	76,009.28
-วัสดุสำนักงาน	-	-
3. เงินอุดหนุนในการดำเนินงาน	43,454.00	43,454.00
รวม	486,000	487,113.28



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนายาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ
(Development of prototype drug from herbs for the prevention of osteoporosis
in aging persons)

โครงการย่อย : การพัฒนายาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ: การทดสอบฤทธิ์ใน
สัตว์ทดลอง
(Development of prototype drug from herbs for the prevention of osteoporosis
in aging persons: testing in laboratory animals)

ผู้วิจัย ศาสตราจารย์ ดร.สุจินดา มาลัยจิตรนนท์ และคณะ
สังกัด ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สนับสนุนโดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ปี พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ Dr. I. Sandford Schwartz, Chief Executive Officer จากบริษัท Smith Naturals Co. Ltd ซึ่งให้เกียรติเป็นที่ปรึกษางานวิจัยและสนับสนุนสารสกัดกวางเครือขาวที่ใช้งานวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณภาควิชาชีววิทยาและภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้การสนับสนุนสารเคมีและเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์ในการทำวิจัย และขอขอบคุณทุนอุดหนุนวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2556 ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยครั้งนี้จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ: การพัฒนายาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ: การทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลอง

ชื่อนักวิจัย: สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์¹, นรัตพล เจริญพันธุ์², สุกัญญา เจริญพร¹

สถาบัน: ¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; ²ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

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

เนื้อหางานวิจัย: โครงการวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบฤทธิ์ในการรักษาโรคกระดูกพรุนของกวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสารไฟโตเอสโตรเจนอย่างน้อย 17 ชนิด ในส่วนหัวของราก โดยมีรายงานก่อนหน้านี้ว่ากวาวเครือขาวสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกของหนูและลิงบาบูน (Tiyasatkulkovit et al., 2012; 2014) ในหลอดทดลองได้ ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้จึงทำการทดสอบผลในสัตว์ทดลอง 2 ชนิด คือ หนูแรท และลิงหางยาวเทศเมีย ก่อนที่จะนำไปทดสอบในคนต่อไป ดังนี้ **1) การศึกษาในหนูแรท** นำหนูแรท สายพันธุ์ SD เพศเมีย อายุ 6 เดือน มาตัดรังไข่และทิ้งไว้เป็นเวลา 4 สัปดาห์เพื่อชักนำให้เกิดโรคกระดูกพรุน จากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม ป้อนสารแขวนลอยกวาวเครือขาวขนาด 5, 25 และ 50 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน และฉีดสารพาราธิน 7 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน นาน 12 สัปดาห์ วัดความหนาแน่นกระดูกที่กระดูก tibia และกระดูก L4 ทุก ๆ 2 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโปร่งที่กระดูก tibia และ L4 มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 2 สัปดาห์เป็นต้นไป และกวาวเครือขาวขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน สามารถยับยั้งการสูญเสียกระดูกเนื้อโปร่งได้ที่กระดูกทั้งสองแห่ง **2) การศึกษาในลิงหางยาว** เริ่มจากการคัดเลือกลิงหางยาวเทศเมียวัยหลังหมดประจำเดือนที่เป็นโรคกระดูกพรุนตามธรรมชาติ โดยนำลิงหางยาวเทศเมียวัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหลังหมดประจำเดือน (pre-, peri- and post-menopause) มาทำการเปรียบเทียบความหนาแน่นกระดูกและมวลกระดูกที่กระดูก radius และ tibia พบว่าความหนาแน่นกระดูกและมวลกระดูกเริ่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อลิงเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนและลดลงต่ำสุดเมื่อเข้าสู่วัยหลังหมดประจำเดือน อย่างสัมพันธ์กับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลงและระยะเวลาที่นานขึ้นหลังหมดประจำเดือน และสัมพันธ์กับการลดลงของ osteocalcin ในพลาสมาและการเพิ่มขึ้นของ NTX ในปัสสาวะ จากนั้นคัดเลือกลิงวัยหลังหมดประจำเดือนและมีค่ามวลกระดูกต่ำกว่า 2SD ของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน จำนวน 10 ตัว มาแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ป้อนสารแขวนลอยกวาวเครือขาวขนาด 0 และ 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน นาน 12 เดือน และติดตามการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นกระดูกและมวลกระดูก และการหายของแผลที่กระดูก (bone healing) พบว่าเนื้อกระดูกและการหายของแผลที่กระดูกเริ่มเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในเดือนที่ 6 ของการทดลอง เนื่องด้วยการทดลองในลิงยังไม่ครบ 12 เดือนจึงต้องติดตามผลการทดลองต่อไป แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองที่ได้ในหนูแรทเทศเมียที่ตัดรังไข่และลิงหางยาวเทศเมียวัยหลังหมดประจำเดือนในเบื้องต้นสามารถสรุปได้ว่ากวาวเครือขาวเป็นพืชสมุนไพรที่มีศักยภาพสูงที่จะนำมาพัฒนาเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนเพื่อใช้ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้

คำสำคัญ: โรคกระดูกพรุน กวาวเครือขาว เอสโตรเจน หนูแรท ลิงหางยาว มวลกระดูก

Abstract

Project Title: Development of prototype drug from herbs for the prevention of osteoporosis in aging persons: testing in laboratory animals

Investigators: Suchinda Malaivijitnond¹, Narattaphol Charoeanphandhu², Sukanya Jaroenporn¹

Affiliation: ¹Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University; ²Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University

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

Abstract: This study aims to test the therapeutic effects of *Pueraria mirifica* (PM) Thai herb, which contains at least 17 phytoestrogens in its tuberous roots, in laboratory animals, because it was reported previously that PM can stimulate osteoblast and suppress osteoclast functions in rat and baboon bone cells *in vitro* (Tiyasatkulkovit et al., 2012; 2014). Two series of experiments, in female rats and monkeys, were set. **1) Study in rat:** 6 months old female SD rats were ovariectomized, kept for 4 weeks to induce bone loss and divided into 4 groups which were fed with 5, 25 and 50 mg/kgBW/day of PM (PM5, PM25 and PM50, respectively) and injected with 7 mg/kgBW/day of puerarin (PU) for 12 weeks. Bone mineral density (BMD) of tibia and fourth lumbar vertebra (L4) were measured every 2 weeks. It was found that trabecular (Tb) BMDs of both tibia and L4 were significantly decreased starting from 2 weeks after OVX ($p < 0.05$) and only PM50 could inhibit the loss at both bone sites. **2) Study in monkeys:** naturally occurring osteoporotic, post-menopausal long-tailed monkeys were first selected. BMDs and bone mineral contents (BMCs) of radius and tibia were compared between pre-menopausal, peri-menopausal and post-menopausal long-tailed macaques. The BMDs and BMCs of radius and tibia significantly decreased in peri-menopause ($p < 0.05$) and highly decreased in post-menopause monkeys, in correlation with a reduction of serum estradiol levels and the length of post-menopausal period. This also correlated with a decrease in plasma osteocalcin and increase in urinary NTX levels. Thus, 10 osteoporotic post-menopausal monkeys (bone mass lower than 2SD of those of pre-menopausal monkeys) were selected, divided into 2 groups, fed with 0 and 1000 mg/kgBW/day of PM (PM0 and PM1000, respectively), and changes of BMDs, BMCs and bone healing were followed up. It was found that BMDs, BMCs and bone healing on the PM1000 group were significantly higher those of the PM0 group ($p < 0.05$) starting from 6 months of the treatment. Although the treatment in monkeys has not done yet, it can preliminary conclude regarding the results in laboratory animals that PM has high potential to be developed as anti-osteoporotic drug for post-menopausal women.

Keywords: osteoporosis, *Pueraria mirifica*, estrogen, SD rat, long-tail macaques, bone mass

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	4
สารบัญเรื่อง	5
สารบัญภาพ	6
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	8
วัตถุประสงค์งานวิจัย	9
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	9
ระเบียบวิธีวิจัย	13
ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง	
- การทดลองในหนูแรท	15
- การทดลองในลิงหางยาว	22
การเผยแพร่ผลงานวิจัยและการนำไปใช้ประโยชน์	33
ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานกับแผนการดำเนินการที่ตั้งไว้	35
งานตามโครงการที่จะทำต่อไป	36
ปัญหาและอุปสรรค	36
บรรณานุกรม	37
คณะผู้วิจัย	41

สารบัญญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงการทำงานประสานกันระหว่าง osteoblast และ osteoclast ในการควบคุมสมดุลของกระดูก M-CSF และ OPGL/RANKL เป็น osteoblast factor ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของ osteoclast	10
รูปที่ 2 แสดงกระบวนการ bone remodeling cycle ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสลายกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoclast และกระบวนการสร้างกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoblast	11
รูปที่ 3 แสดงค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูกส่วนต่างๆของหนูแรท หลัง จากตัดรังไข่ (สัปดาห์ที่ 0) เป็นเวลา 16 สัปดาห์	17
รูปที่ 4 แสดงค่าความหนาแน่นกระดูก(BMD) ของกระดูกส่วนต่างๆตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 -16 ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับกวางเครือขาวที่ขนาดต่างๆ นาน 12 สัปดาห์	18
รูปที่ 5 แสดงค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูกส่วนต่างๆในหนูตัดรังไข่ ภายหลังได้รับกวางเครือขาว นาน 12 สัปดาห์	19
รูปที่ 6 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของกระดูกส่วน proximal tibial metaphysis ที่ย้อมด้วยสี Goldner's trichrome ในหนูตัดรังไข่ภายหลังได้รับกวางเครือขาวที่ขนาดต่างๆ	19
รูปที่ 7 แสดงค่า bone volume ของกระดูกส่วน proximal tibial metaphysis ในหนูตัดรังไข่ภายหลังได้รับกวางเครือขาว	20
รูปที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) และความหนาแน่นกระดูก (BMD) ที่กระดูก radius ของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri- menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	23
รูปที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) และความหนาแน่นกระดูก (BMD) ที่กระดูก tibia ของลิงวัยก่อน (pre-) วัยที่เข้าสู่ (peri-) และวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	24
รูปที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ Bone specific alkaline phosphatase (BAP) ในพลาสมา ของลิงวัยก่อน (pre-) วัยที่เข้าสู่ (peri-) และวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	25

	หน้า
รูปที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ osteocalcin (OC) ในพลาสมาของลิงวัยก่อน (pre-) วัยที่เข้าสู่ (peri-) และวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	26
รูปที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ Estradiol (E_2) ในพลาสมาของลิงวัยก่อน (pre-) วัยที่เข้าสู่ (peri-) และวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	26
รูปที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ follicle stimulating hormone (FSH) และ Luteinizing hormone (LH) ในพลาสมา ของลิงวัยก่อน (pre-) วัยที่เข้าสู่ (peri-) และวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)	27
รูปที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงของขนาดเส้นรอบวง (perimeter) ของแผลผ่าตัด จากภาพเอกซเรย์ในลิงที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับ กวาวเครือขาว (PM 1000)	30
รูปที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงพื้นที่ (area) ของแผลผ่าตัด จากภาพ เอกซเรย์ในลิงที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวาวเครือขาว (PM 1000)	30
รูปที่ 16 ภาพเอกซเรย์เปรียบเทียบแผลผ่าตัด (บริเวณกรอบสี่เหลี่ยม) ในเดือนที่ 0 และเดือนที่ 6 ระหว่างลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวาวเครือ ขาว (PM 1000)	31
รูปที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) ในกระดูก Radius (ซ้าย) และ tibia (ขวา) ระหว่างลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวาวเครือขาว (PM 1000) โดยจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มคือ metaphysis trabecular BMC, metaphysis cortical BMC และ diaphysis cortical BMC	32

1. หลักการเหตุผลและระบุสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

จากการที่ประชากรโลกมีอายุเฉลี่ยยาวขึ้นทำให้คาดว่าผู้สูงอายุในประเทศต่างๆ รวมถึงประเทศไทยจะมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น กลุ่มโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับการชราภาพที่สำคัญกลุ่มหนึ่ง คือ โรคกระดูกพรุน (osteoporosis) ซึ่งเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากความไม่สมดุลของกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) และกระบวนการสลายกระดูก (bone resorption) โดยกระบวนการเหล่านี้มีการทำงานโดยเซลล์ออสติโอเบลาสต์ (osteoblast) และเซลล์ออสติโอคลาสต์ (osteoclast) ตามลำดับ ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) เป็นฮอร์โมนที่ผลิตและหลั่งมาจากรังไข่ และในผู้หญิงที่เข้าสู่วัยหมดประจำเดือน หรือวัยทอง (post-menopausal women) จะอยู่ในภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการรักษาสมดุลของกระดูก (Compson et al., 1990) โดยเอสโตรเจนมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ เซลล์ออสติโอคลาสต์ ทำให้เกิดกระบวนการสลายกระดูกลดลง และพบว่าเซลล์ออสติโอเบลาสต์และเซลล์ออสติโอคลาสต์ มีตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptors) ทั้งชนิดแอลฟา (estrogen receptor alpha; ER α) และเบต้า (ER β) (Bland, 2000) ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนจะสามารถแสดงฤทธิ์ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ทั้งสองชนิดได้ โดยการจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน

ภาวะกระดูกพรุนเป็นภาวะที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ แต่สามารถหยุดยั้งการสูญเสียมวลกระดูกไม่ให้เกิดเพิ่มมากขึ้น และลดอัตราการเกิดกระดูกหักได้ ดังนั้นการป้องกันจึงเป็นวิธีการที่ดีที่สุด แต่คนส่วนใหญ่มักไม่เห็นความสำคัญที่จะป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุน จนกระทั่งมีอาการจึงจะเข้ารับการรักษา ปัจจุบันการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนทำได้โดย การออกกำลังกาย และรับประทานอาหารที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพียงพอ ส่วนในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งมีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จะให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทน (estrogen replacement therapy) พบว่าการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนสามารถลดอุบัติการณ์เกิดกระดูกหักได้ (Tongeson and Bell., 2001) แต่อาจทำให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตราย ได้แก่ ก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก มะเร็งต่อมลูกหมาก และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตัน (Sulak 1997; Canavan and Doshi, 1999; Lissin and Cooke, 2000; Fontanges et al., 2004; Smith, 2006) เป็นต้น ด้วยตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นดังกล่าว จึงได้มีการศึกษา วิจัย และค้นคว้ายา ที่ใช้รักษา หรือป้องกันภาวะกระดูกพรุน เพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้น

ในปัจจุบัน ธุรกิจในการผลิตยาเพื่อรักษาโรคกระดูกพรุน เป็นธุรกิจที่มีมูลค่าสูงมาก ดังเช่น บริษัท Pfizer ผลิตยา Prempro มีการจำหน่ายในท้องตลาดกปีละประมาณ 3,000 ล้านเหรียญสหรัฐ แต่ Primpro ก็มีผลข้างเคียงคือก่อให้เกิดมะเร็งเต้านม และเสี่ยงต่อภาวะลิ่มเลือดอุดตันที่หัวใจ นอกจากนี้ยังมียาอีกตัวที่นิยมใช้กันมากคือ Fosamax (alendronate) ที่ผลิตโดยบริษัท Merck ก็มีมูลค่าการตลาดที่ไม่ต่างจาก Primpro แต่ Fosamax ก็มีผลข้างเคียง คือ ทำให้กระดูกเปราะ ดังนั้นการพัฒนาการรักษาโรคกระดูกพรุนที่มีราคาถูกลงและมีผลข้างเคียงน้อยกว่าหรือไม่มีเลย จึงเป็นสิ่งจำเป็นเร่งด่วน ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนที่มีพืชและสมุนไพรที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจำนวนมากและหลากหลาย หากสามารถพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ป้องกันโรคกระดูกพรุนได้และลดอาการข้างเคียง จะเป็นการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรไทยและลดการนำเข้ายาที่มีอยู่แล้วจากต่างประเทศ นอกจากนี้ยังทำให้ประชากรไทยส่วนใหญ่ ที่มีฐานะยากจนที่มีภาวะกระดูกพรุนสามารถเข้าถึงยาได้อย่างทั่วถึง

โครงการวิจัยนี้ จึงมีจุดประสงค์จะนำพืชสมุนไพรในประเทศไทย ได้แก่ กวาวเครือขาว (*Pueraria mirifica*) และตะบูนดำ เป็นต้น ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่ได้ผ่านการวิเคราะห์หาสารที่มีฤทธิ์ในการป้องกันโรคกระดูกพรุนทางเคมี และได้ศึกษาฤทธิ์ของสารที่คัดกรองได้ในหลอดทดลองแล้ว (Urasopon et al., 2007; 2008; Wisutthiwong et al., 2011; Tiyasatkulovit et al., 2012) มาศึกษาต่อยอดในสัตว์ทดลอง ได้แก่

ในสัตว์ฟันแทะ และลิงหางยาว โดยมีเป้าหมายที่จะนำผลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในคนและไปผลิตเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุน ต่อไป ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้ร่วมมือกับบริษัท Siam Natural Co., Ltd. กรุงเทพฯ ที่ทำหน้าที่ผลิตกวาวเครือขาวที่ได้มาตรฐาน (standardized *Pueraria mirifica*) เพื่อส่งต่อไปให้กับบริษัทยา เช่น GlaxoSmithKline เพื่อนำไปผลิตยารักษาโรคกระดูกพรุนในคน

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวต่อการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก
2. เพื่อศึกษาผลของการให้สารสกัดตะบุนดำต่อการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียและเพศผู้ ที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนโดยการตัดต่อมบ่งเพศออก
3. เพื่อศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวต่อการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือนเพศเมีย

3. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

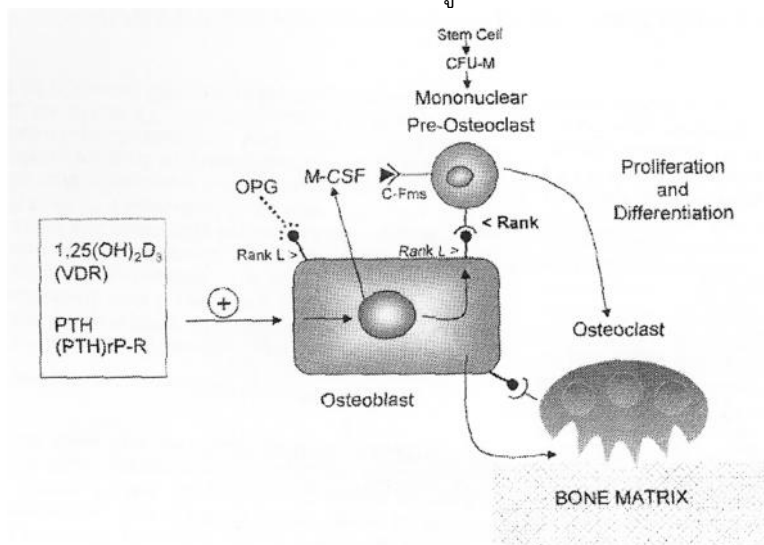
กระดูก (Bone)

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

เซลล์กระดูก ซึ่งมีอยู่สามชนิดด้วยกัน คือ osteoblast เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างกระดูก osteoclast เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีหลายนิวเคลียส ทำหน้าที่ในการสลายกระดูก และ osteocyte ซึ่งเป็น osteoblast ที่เจริญเต็มที่แล้ว โดยปกติแล้วเซลล์ทั้งสามชนิดนี้ทำงานร่วมกัน เพื่อทำให้เกิดกระบวนการซ่อมสร้าง และสลายกระดูก (bone remodeling cycle) ซึ่งเป็นวงจรที่เกิดขึ้นตลอดเวลา เพื่อคงสมดุล และความแข็งแรงของกระดูก (Nakamura, 2007)

โดยพบว่า osteoblast และ osteoclast จะมีการทำงานที่ประสานกัน (รูปที่ 1) โดยมียีนหลายชนิดที่ควบคุมการเจริญ (development) ของ osteoblast เช่น Core binding factor A1 (Cbfa1) หรือ Runx2, Osf2 และ AML3 (Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997) โดยยีนเหล่านี้จะมีผลกระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) และการเจริญ (maturation) โดยไปกระตุ้นการสร้างโปรตีนหลายชนิด เช่น osterix, osteoponin, osteocalcin, bone sialopactin, type I collagen, receptor activator of nuclear factor B (RANK-L) และ osteoprotegerin (OPG) Osteocalcin และ osteoponin จะช่วยในการสะสมแคลเซียม (mineralization) ในขณะที่ RANK-L และ OPG จะควบคุมการทำงานของ osteoclast โดย RANK-L จะจับกับ RANK receptor ที่อยู่บน pre-osteoclast (osteoclast precursor) ซึ่งจะไปกระตุ้น pre-osteoclast ให้กลายเป็น mature osteoclast ที่สามารถทำหน้าที่สลายกระดูกได้ ในขณะที่ OPG สามารถจับกับ RANK-L

ได้ ทำให้ RANK-L ไม่สามารถจับกับ RANK receptor ที่ pre-osteoclast ได้ ดังนั้น pre-osteoclast จึงไม่สามารถเปลี่ยนไปเป็น mature osteoclast ได้ การสลายกระดูกจะลดลง



รูปที่ 1 แสดงการทำงานประสานกันระหว่าง osteoblast และ osteoclast ในการควบคุมสมดุลของกระดูก M-CSF และ OPG/RANKL เป็น osteoblast factor ที่กระตุ้นการเปลี่ยนแปลง (differentiation) ของ osteoclast

ฮอร์โมนสำคัญที่มีบทบาทในการควบคุมสมดุลของกระดูก คือ ฮอร์โมนพาราไทรอยด์ (parathyroid hormone) และฮอร์โมนแคลซิโทนิน (calcitonin) ฮอร์โมนทั้งสองตัวนี้จะทำหน้าที่ตรงข้ามกัน โดยฮอร์โมนพาราไทรอยด์จะทำหน้าที่สลายกระดูกและฮอร์โมนแคลซิโทนินจะช่วยในการสร้างกระดูก (Jane and Gary, 2001)

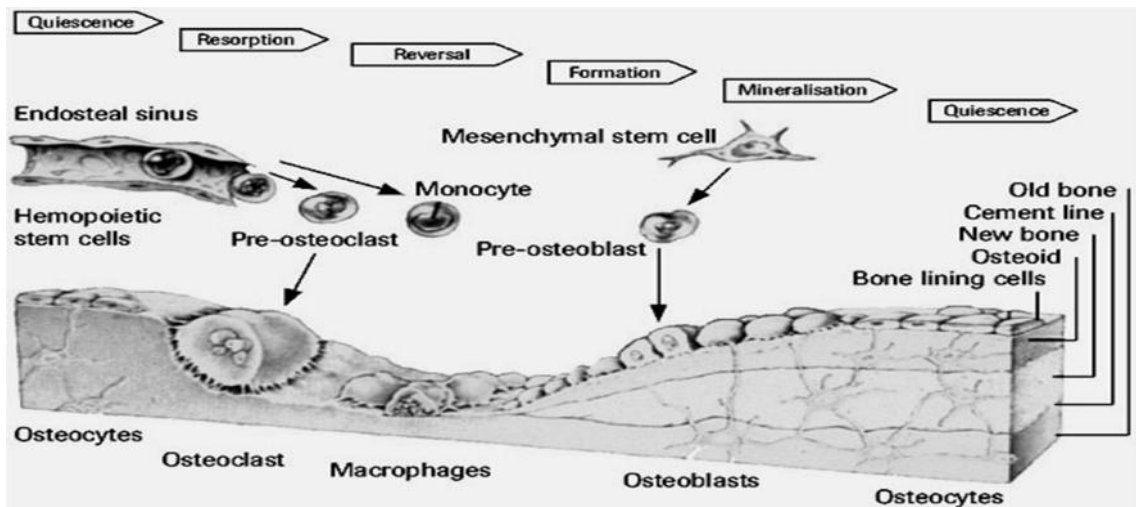
Bone remodeling cycle ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ (รูปที่ 2)

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

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

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

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



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการ bone remodeling cycle ซึ่งประกอบด้วยกระบวนการสลายกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoclast และกระบวนการสร้างกระดูก โดยการทำหน้าที่ของ osteoblast

ภาวะกระดูกพรุน (Osteoporosis)

กระดูกพรุน คือ ภาวะที่กระดูกมีความหนาแน่นของเนื้อกระดูกลดน้อยลง รวมทั้งมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างระดับจุลภาคของเนื้อเยื่อกระดูก ส่งผลให้กระดูกเปราะบาง ไม่สามารถรับน้ำหนัก หรือแรงกดได้ตามปกติ ทำให้กระดูกหักได้ง่าย (Kanis et al., 1994) โดยตำแหน่งที่หักบ่อย ได้แก่ กระดูกสันหลัง (spinal vertebra) กระดูกสะโพก (hip) และกระดูกข้อมือ (wrist) กลไกในการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้นเกิดได้จากสองกลไกด้วยกันคือ 1)เกิดจาก bone turnover สูงขึ้น เนื่องจากกระดูกมี remodeling unit เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดอัตราการสลายกระดูกมากขึ้นกว่าปกติ และ 2)เกิดจากกระบวนการ bone remodeling cycle imbalance โดยพบว่าเกิดกระบวนการ bone resorption มากกว่า กระบวนการ bone formation ซึ่งการเกิดภาวะกระดูกพรุนนั้น อาจเกิดจากกลไกใดกลไกหนึ่ง หรือเกิดจากทั้งสองกลไกร่วมกันก็ได้ (Compson, 2001)

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

เอสโตรเจนขึ้นจึงมีผลทำให้กระบวนการ bone formation เกิดขึ้นน้อยลง ด้วยเหตุผลดังกล่าว เมื่อเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนจึงทำให้เกิดความไม่สมดุลของกระบวนการ bone remodeling cycle ขึ้น ทำให้มีการสูญเสียมวลกระดูกมากกว่าปกติ และเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดกระดูกพรุนตามมา

กวาวเครือขาว

กวาวเครือขาว เป็นพืชสมุนไพรที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Pueraria mirifica* Airy Shaw & Suvatabandhu จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า หัวของกวาวเครือขาวประกอบไปด้วย สารไฟโตเอสโตรเจนหลายชนิด ที่พบมากได้แก่ กลุ่มของไอโซฟลาโวน ซึ่งประกอบด้วย daidzin, daidzein, genistin, genistein, puerarin และ mirificin เป็นต้น (Chanakaow et al., 2000; Ingham et al., 2002; Cherdshewasart et al., 2007a; 2008; Urasopon et al., 2008b) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กวาวเครือขาวสามารถลดระดับของฮอร์โมนพาราไทรอยด์ และระดับแคลเซียมในซีรัม ในลิงหางยาวแก่เพศเมีย ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Trisomboon et al., 2004) และต่อมา Urasopon และคณะ (2007 และ 2008a) ได้ทำการศึกษาผลของการให้กวาวเครือขาวทันทีภายหลังจากการตัดต่อมั่งเพศออก (ตัดรังไข่ในหนูเพศเมีย และตัดอัณฑะออกในหนูแรทเพศผู้ และหนูยังไม่ได้แสดงภาวะกระดูกพรุน) เป็นเวลานาน 90 วัน พบว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ตัดต่อมั่งเพศออกและไม่ได้รับกวาวเครือขาวแสดงภาวะกระดูกพรุน และพบว่ากวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การสูญเสียมวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูก ของกระดูกส่วนรยางค์ (long bone) และกระดูกส่วนแกนกลาง (axial bone) ในหนูทั้งสองเพศได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยขึ้นอยู่กับขนาดของกวาวเครือขาวที่ให้ และไม่มีผลแตกต่างกันระหว่างเพศ จากผลงานการวิจัยทั้งหมดนี้สามารถที่จะสรุปได้ว่า กวาวเครือขาวสามารถแสดงผลต่อกระดูกได้เช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจน นั่นคือ กวาวเครือขาวสามารถป้องกัน (prevention) การเกิดโรคกระดูกพรุนได้ และจากที่มีรายงานว่ากวาวเครือขาว มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเกิดและการเจริญของมะเร็งเต้านมได้ด้วย (Cherdshewasart et al., 2004; 2007b) ซึ่งเป็นข้อดีที่เหนือกว่าการใช้ฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสมุนไพรกวาวเครือขาว ในการรักษา (therapeutics) ภาวะกระดูกพรุนภายหลังจากที่อาการดังกล่าวได้เกิดขึ้นแล้ว โดยการตัดต่อมั่งเพศของหนูทั้งสองเพศออกและพักหนูไว้นาน 90 วัน เพื่อชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุน แล้วจึงทดลองให้กวาวเครือขาว โดยขณะนี้กำลังศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อเซลล์กระดูกหนูและลิงในหลอดทดลองจากโครงการวิจัยอื่น อย่างคู่ขนานกัน เพื่อให้เกิดความเชื่อมั่นและสามารถนำเอากวาวเครือขาวไปพัฒนาเป็นยารักษาผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ในอนาคต

ตะบูนดำ

ตะบูนดำ เป็นพืชวงศ์ Meliaceae เพียงชนิดเดียวที่จัดอยู่ในกลุ่มพืชป่าชายเลน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Xylocarpus moluccensis* องค์ประกอบทางเคมีหลักที่พบในส่วนต่างๆ ของพืชชนิดนี้ โดยเฉพาะในส่วน เมล็ด (seed kernel) คือสารประกอบลิโมนอยด์ประเภทต่างๆ ได้แก่ ลิโมนอยด์ประเภท phragmalin, mexicanolide, andirobin และ gedunin จากงานวิจัยที่ผ่านมา คณะผู้วิจัยต่างๆ มักมุ่งเน้นที่จะนำสารลิโมนอยด์เหล่านี้ไปทดสอบฤทธิ์ด้านการกีดกันของแมลงศัตรูพืชชนิดต่างๆ ตามการใช้งานในตำรับยาพื้นบ้าน แต่คณะผู้วิจัยของเราเป็นกลุ่มแรกที่ได้นำสารลิโมนอยด์จากตะบูนดำนี้มาคัดกรองฤทธิ์ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สลายกระดูก (anti-osteoclastogenic activity) ในหลอดทดลอง (in vitro) พบว่าลิโมนอยด์ประเภท gedunin โดยเฉพาะ 7-oxo-deacetylgedunin สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สลายกระดูกได้ดีมาก ด้วยค่า IC_{50} 4.14 mM และที่สำคัญคือมีความเป็นพิษต่ำมาก นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาการออกฤทธิ์ของลิโมนอยด์ชนิดนี้ด้วย (Wisutthiwong et al., 2011) ดังนั้นสารลิโมนอยด์ 7-oxo-

deacetylgedunin จึงน่าจะเป็น candidate ที่มีศักยภาพสูงที่จะพัฒนาเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนได้ อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง (in vivo) จะเป็นการทดสอบที่จำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งคณะผู้วิจัยจะทำการทดสอบในหนูแรทต่อไป

4. ระเบียบวิธีวิจัย

4.1. การทดสอบในหนูแรท

4.1.1. การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของกวาวเครือขาวในการรักษาโรคกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียที่ถูกชักนำให้เกิดโรคกระดูกพรุนโดยการตัดรังไข่ออก

เตรียมหนูทดลองอายุ 6 เดือน

สั่งซื้อหนูแรทเพศเมีย สายพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 180-220 กรัม มาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จำนวน 40 ตัว มาเลี้ยงไว้ที่ศูนย์สัตว์ทดลองคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 - 18.00 น.) และมีด 12 ชั่วโมง (18.00 - 06.00 น.) ได้รับน้ำและอาหารสำเร็จรูป (บริษัท เพอร์เฟค คอมพานีเยน กรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย) ตลอดเวลา จนกระทั่งหนูมีอายุได้ 6 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่หนูแรทมี peak bone mass

การทดลองนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ เลขรหัส 1223005

ศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ในระดับเซลล์และระดับอวัยวะของกวาวเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนที่เกิดจากภาวะพร่องฮอร์โมนเพศในหนูแรทเพศเมีย

นำหนูแรทมาตัดรังไข่ (สัปดาห์ที่ 0) เพื่อชักนำให้เกิดภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน แล้วติดตามการเปลี่ยนแปลงของความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูกแกนกลาง คือ 4th lumbar vertebra (L4) และกระดูกปลายค คือ tibia ที่บริเวณ metaphysis และ diaphysis ด้วยเครื่อง peripheral Quantitative Computed Tomography (pQCT) ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จนกระทั่งพบว่าหนูเกิดภาวะกระดูกพรุนจากนั้นจึงแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัวและเริ่มให้สารต่างๆ ทุกวัน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มล.

กลุ่มที่ 2 ฉีดพาราธินเข้าชั้นใต้ผิวหนัง ขนาด 0.7 มก./กก. น้ำหนักตัว ปริมาตร 0.2 มล.

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวขนาด 5 มก./กก. น้ำหนักตัว ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มล.

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวขนาด 25 มก./กก. น้ำหนักตัว ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มล.

กลุ่มที่ 5 ป้อนสารสกัดกวาวเครือขาวขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1.0 มล.

ป้อนสารในช่วงเวลา 08.00 – 10.00 น. ซึ่งน้ำหนักตัวหนูทุก ๆ 2 สัปดาห์ เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และใช้ค่าน้ำหนักตัวที่ได้ในแต่ละสัปดาห์มาปรับปริมาณการให้สาร ติดตามวัดมวลกระดูกและความหนาแน่นของกระดูกที่กระดูก right tibia และ 4th lumbar vertebra ด้วยเครื่อง pQCT ทุก ๆ 2 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการการุณยฆาตหนูและเก็บซีรัมเพื่อตรวจวัด bone markers ที่เกี่ยวข้องกับ bone formation และ bone resorption เก็บกระดูก tibia เพื่อตรวจวัดตรวจวัดอัตราการสร้างกระดูก (bone formation rate) และการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อกระดูกในระดับจุลภาค (bone histomorphometry)

4.2. การทดสอบในลิง

จากมีการทดลองมาก่อนหน้านี้ว่ากวางเครือขาวสามารถป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่ตัดต่อมบังเพศออก แต่จากข้อบังคับของ FDA (1994), JMHW (1999) และ CHMP (2006) ในการทดสอบความปลอดภัยของสารใด ๆ ที่ออกฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในคนจะต้องทำการทดสอบและวิจัยในสัตว์ ที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาและกายภาพ รวมทั้งลักษณะต่าง ๆ ของกระดูกและฮอร์โมนคล้ายกับคน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาผลของสารสกัดกวางเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนที่เกิดจากภาวะพร่องฮอร์โมนเพศในลิงหางยาวเพศเมีย

การทดลองนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการการควบคุมดูแลการเลี้ยง และการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ของคณะวิทยาศาสตร์ เลขรหัส 1123015

4.2.1. เปรียบเทียบค่ามวลกระดูก และความหนาแน่นกระดูกระหว่างลิงหางยาววัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหมดประจำเดือน

นำลิงหางยาวเพศเมีย (*Macaca fascicularis*) ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ที่ยังมีรอบประจำเดือนอยู่ (pre-menopausal monkey) ลิงหางยาวที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopausal monkey) และลิงหางยาวเพศเมียที่อยู่ในสภาวะหมดประจำเดือนอย่างน้อย 1 ปี อายุไม่ต่ำกว่า 20 ปี (post-menopausal monkey) จากหน่วยวิจัยไพรเมต คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เลี้ยงไว้ในเรือนเลี้ยง ที่ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 - 18.00 น.) และมีมืด 12 ชั่วโมง (18.00 - 06.00 น.) อุณหภูมิเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม ลิงได้รับอาหารวันละ 2 ครั้ง คือ เวลา 0900 - 1000 น. ลิงได้รับอาหารเม็ดสำเร็จรูป (บริษัท เพอร์เฟค คอมพานีเยน กรุ๊ป จำกัด ประเทศไทย) และเวลา 1400 - 1500 น. ลิงได้รับอาหารสด เช่น แดงกวาง มันเทศ และ กล้วย เป็นต้น

วัดค่ามวลกระดูก (BMC) และค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของลิงที่กระดูก distal radius และ proximal tibia ด้วยเครื่อง peripheral quantitative computed tomography (pQCT; Norland startec XCT Research SA+ pQCT, Starater, Pforzheim, Germany) นอกจากนั้นทำการเจาะเลือด (8.00-10.00 น.) และแยกเก็บพลาสมาเพื่อนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมน estradiol, luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) ด้วยวิธี radioimmunoassay (Malavijitnond et al., 1998; Malavijitnond and Varavudhi, 1998; Trisomboon et al., 2005) และตรวจวัดระดับของ bone formation marker คือ bone alkaline phosphatase (bone ALP; Queidel, CA, USA, Catalog no. 8012) และวัดระดับของ osteocalcin (OC; Queidel, CA, USA, Catalog no. 8002) และทำการรองเก็บปัสสาวะ (18.00-6.00 น.; 12 ชม.) เพื่อนำไปวัดค่า bone resorption marker คือ N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (NTX; Wampole Labs, NJ, USA, catalog no. OST0001) โดยค่า urinary NTX ที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับระดับ creatinine (Jaffe kinetic method)

4.2.2. ศึกษาผลของกวางเครือขาวต่อการประสานกลับคืนของเนื้อกระดูก (bone healing) ในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

คัดเลือกลิงหางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือนจากการทดลอง 4.2.1 ที่มีค่ามวลกระดูกต่ำกว่า 2SD ของลิงหางยาววัยก่อนหมดประจำเดือน จำนวน 10 ตัว มาผ่าตัดชิ้นกระดูก (bone biopsy) ในขนาด 1x1 เซนติเมตร บริเวณปีกสะโพก (Ilium bone) ออกมา 2 ตำแหน่ง จากนั้นแบ่งลิงออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารสำเร็จรูปตามปกติ (PM0)

กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารสำเร็จรูปที่ผสมกาวเครือขาวขนาด 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน (PM 1000) โดยให้สารทุกวัน ในช่วงเวลา 9.00-10.00 น. เป็นระยะเวลา 12 เดือน จากนั้นติดตามการประสานกลับคืนมาของเนื้อกระดูกในลิงแต่ละกลุ่มทุกๆ 2 เดือน โดยการเอกซเรย์ (Poskom X-Ray Model: PXP-60HF) ทำการวัดขนาดพื้นที่ (area) และเส้นรอบวง (perimeter) ของบริเวณที่ผ่าตัดกระดูกออกเทียบกับค่าเริ่มต้น (baseline) ก่อนการผ่าตัด

4.2.3. ศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของกาวเครือขาวต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนในลิงทางยาววัยหมดประจำเดือน

นำลิงที่ใช้ในการทดลองที่ 4.2.2. มาติดตามวัดมวลกระดูก (BMC) และความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูก distal radius และ proximal tibia ด้วยเครื่อง peripheral quantitative computed tomography (pQCT; Norland startec XCT Research SA+ pQCT, Starater, Pforzheim, Germany) ทุก ๆ 2 เดือน และเจาะเลือดในช่วงเวลา 8.00-10.00 น. และแยกเก็บพลาสมาเพื่อนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมน estradiol, luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) ด้วยวิธี radioimmunoassay (Malaivijitnond et al., 1998; Malaivijitnond and Varavudhi, 1998; Trisomboon et al., 2005) และตรวจวัดระดับของ bone formation marker คือ bone alkaline phosphatase (bone ALP; Queidel, CA, USA, Catalog no. 8012) และวัดระดับของ osteocalcin (OC; Queidel, CA, USA, Catalog no. 8002) และเก็บปัสสาวะที่ขับออกมาในช่วง 12 ชม. (18.00-6.00 น) เพื่อนำไปวัดค่า bone resorption marker คือ N-terminal cross-linking telopeptide of type I collagen (NTX; Wampole Labs, NJ, USA, catalog no. OST0001) โดยค่า urinary NTX ที่ได้จะนำไปปรับเทียบกับระดับ creatinine โดยวิธี Jaffe kinetic method

5. ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

5.1. ศึกษาผลสารสกัดกาวเครือขาวต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนที่เกิดจากภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่

5.1.1 ศึกษาผลของภาวะพร่องฮอร์โมนเพศ ต่อการเกิดภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่

การตัดรังไข่ออกทำให้ความหนาแน่นรวม (total BMD) ของกระดูก L4 ค่อย ๆ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนถึงสัปดาห์ที่ 16 ภายหลังจากการตัดรังไข่ ซึ่งการลดลงของ total BMD ของ L4 เกิดขึ้นอย่างสอดคล้องกับการลดลงของกระดูกเนื้อโปร่ง trabecular BMD ที่พบลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 จนถึงสัปดาห์ที่ 16 ภายหลังจากการตัดรังไข่ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่น cortical BMD (รูปที่ 3, A-C)

ในส่วน of กระดูก tibia พบว่าการตัดรังไข่ออกทำให้ความหนาแน่นรวม (total BMD) ของกระดูก tibia metaphysis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 และจะคงที่ไปจนถึงสัปดาห์ที่ 16 ภายหลังจากตัดรังไข่ ซึ่งการลดลงของ total BMD ของ tibia metaphysis เกิดขึ้นอย่างสอดคล้องกับการลดลงของกระดูกเนื้อโปร่ง trabecular BMD เช่นเดียวกับในกระดูก L4 ที่พบการลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ภายหลังจากตัดรังไข่ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของกระดูกเนื้อแน่น cortical BMD และการเปลี่ยนแปลงของ tibia diaphysis (รูปที่ 3, D-F) จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เมื่อตัดรังไข่ออกจะทำให้ความหนาแน่นกระดูกลดลง โดยการลดลงจะเกิดที่กระดูกปลายค่อนกระดูกแกนกลาง และเกิดในส่วน of กระดูกเนื้อโปร่ง แต่ไม่พบการ

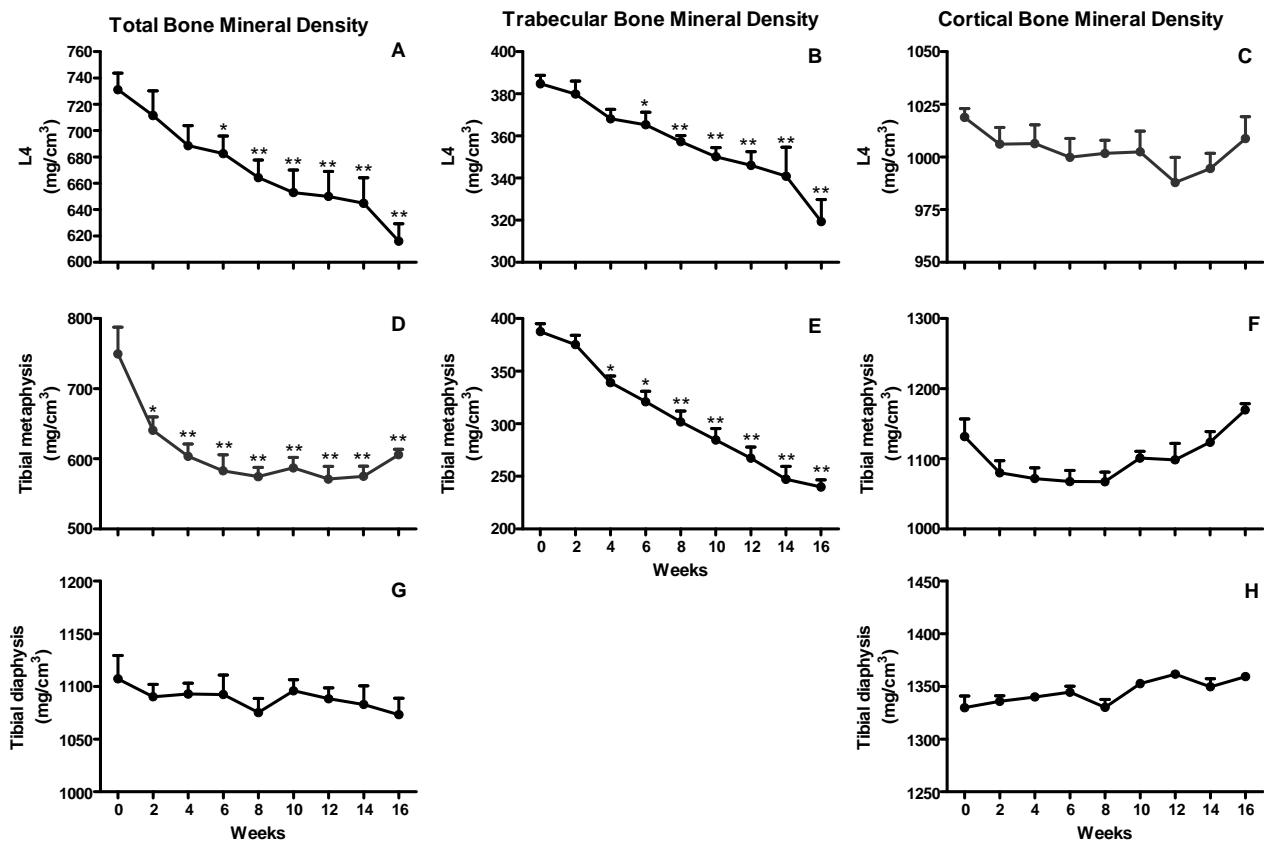
เปลี่ยนแปลงในกระดูกเนื้อแน่น โดยค่าความหนาแน่นของกระดูกยางค์ที่ลดลงในสัปดาห์ที่ 2 หลังตัดรังไข่ มีค่าต่ำกว่า 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (2SD) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะกระดูกพรุน

5.1.2. ศึกษาผลของการให้กวางเครือขาว ต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในหนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่

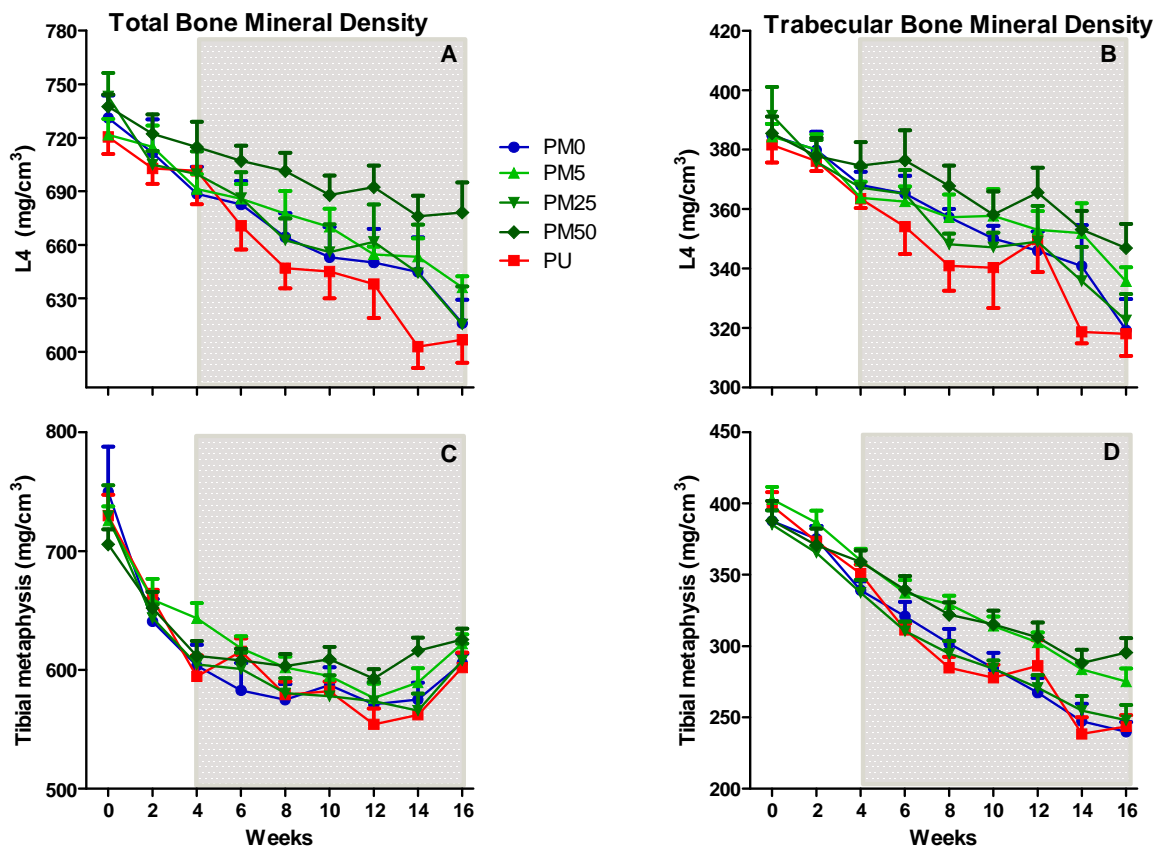
ภายหลังจากตัดรังไข่นาน 4 สัปดาห์ พบว่าความหนาแน่นของกระดูก trabecular ของกระดูก L4 และ tibia มีค่าต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับความหนาแน่นของกระดูกก่อนตัดรังไข่ (สัปดาห์ที่ 0) และเมื่อถึงหนูภายหลังการตัดรังไข่นาน 16 สัปดาห์ (PM0) ยิ่งทำให้การความหนาแน่นของกระดูกลดลงมากขึ้น แต่สภาวะดังกล่าวสามารถฟื้นคืนได้เมื่อหนูได้รับสารแขวนลอยกวางเครือขาวขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (รูปที่ 4)

เมื่อให้กวางเครือขาวขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (PM50) ในหนูที่ตัดรังไข่และทิ้งไว้นาน 4 สัปดาห์ พบว่าสามารถป้องกันการลดลงของค่าความหนาแน่นของกระดูกแกนกลาง L4 และกระดูกยางค์ tibia โดยไม่ให้ลดต่ำไปจากเดิม (รูปที่ 4) โดยพบว่าเมื่อให้กวางเครือขาวเป็นเวลา 12 สัปดาห์ มีผลทำให้ความหนาแน่นของทั้งกระดูกแกนกลาง L4 และกระดูกยางค์ tibia มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม (PM0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 5) ซึ่งเมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ของกระดูก tibia พบว่า กวางเครือขาวขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ทำให้เนื้อกระดูก (รูปที่ 6) เพิ่มขึ้น โดยไปเพิ่ม bone volume, trabecular number และ osteoblast surface และทำให้ trabecular separation ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (PM0) (รูปที่ 7) ในขณะที่ฟูราลินซึ่งเป็นสารไฟโตเอสโตรเจนที่มีปริมาณมากที่สุดในกวางเครือขาว ไม่มีผลต่อการป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนได้

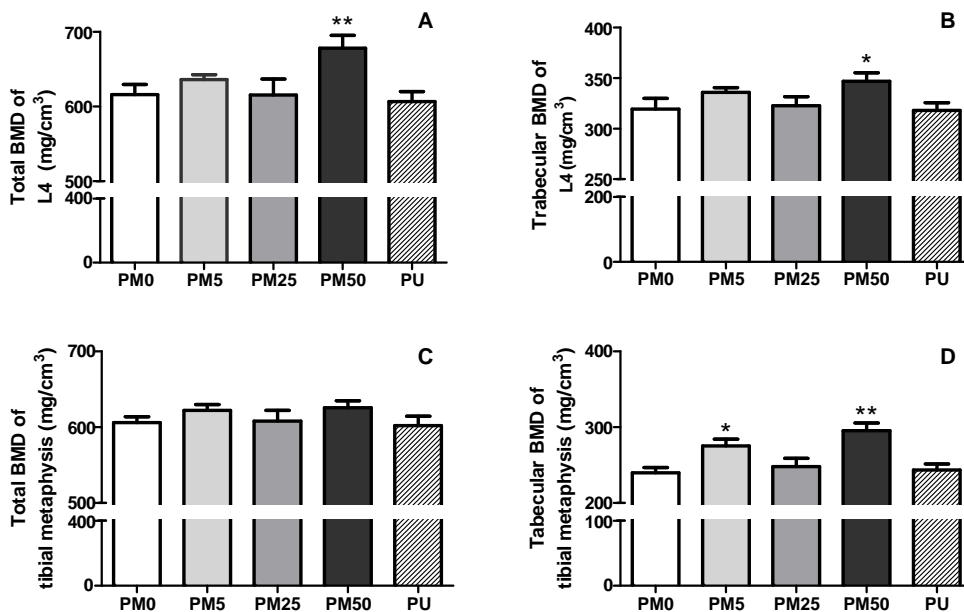
จากผลการทดลองครั้งนี้กล่าวได้ว่า กวางเครือขาวขนาดต่ำเพียง 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนในหนูเพศเมียได้ แต่ไม่สามารถรักษาให้เนื้อกระดูกกลับมาเท่าเดิม (สัปดาห์ที่ 0) ได้



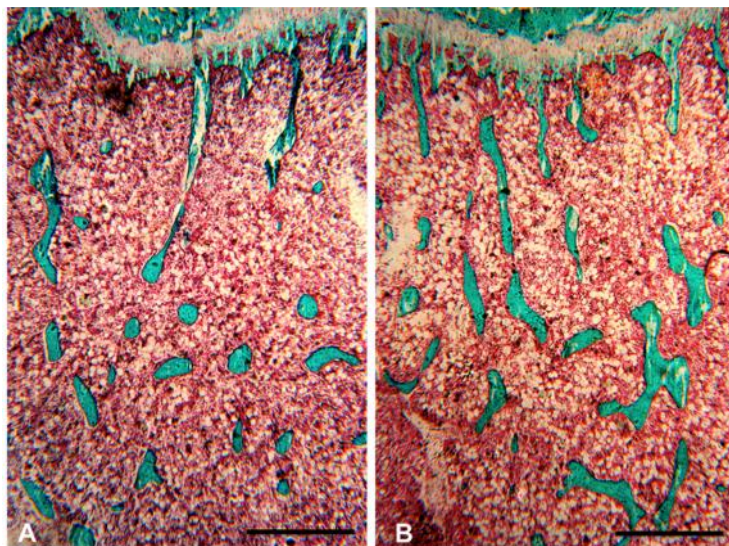
รูปที่ 3 แสดงค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูก 4 lumbar vertebra (L4; A-C), tibial metaphysis (D-F) และ tibial diaphysis (G-H) ในส่วนของ total BMD (A, D, G), trabecular BMD (B, E) และ cortical BMD (C, F, H) ของหนูแรทหลังจากตัดรังไข่ (สัปดาห์ที่ 0) เป็นเวลา 16 สัปดาห์ *,** = $p < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 0



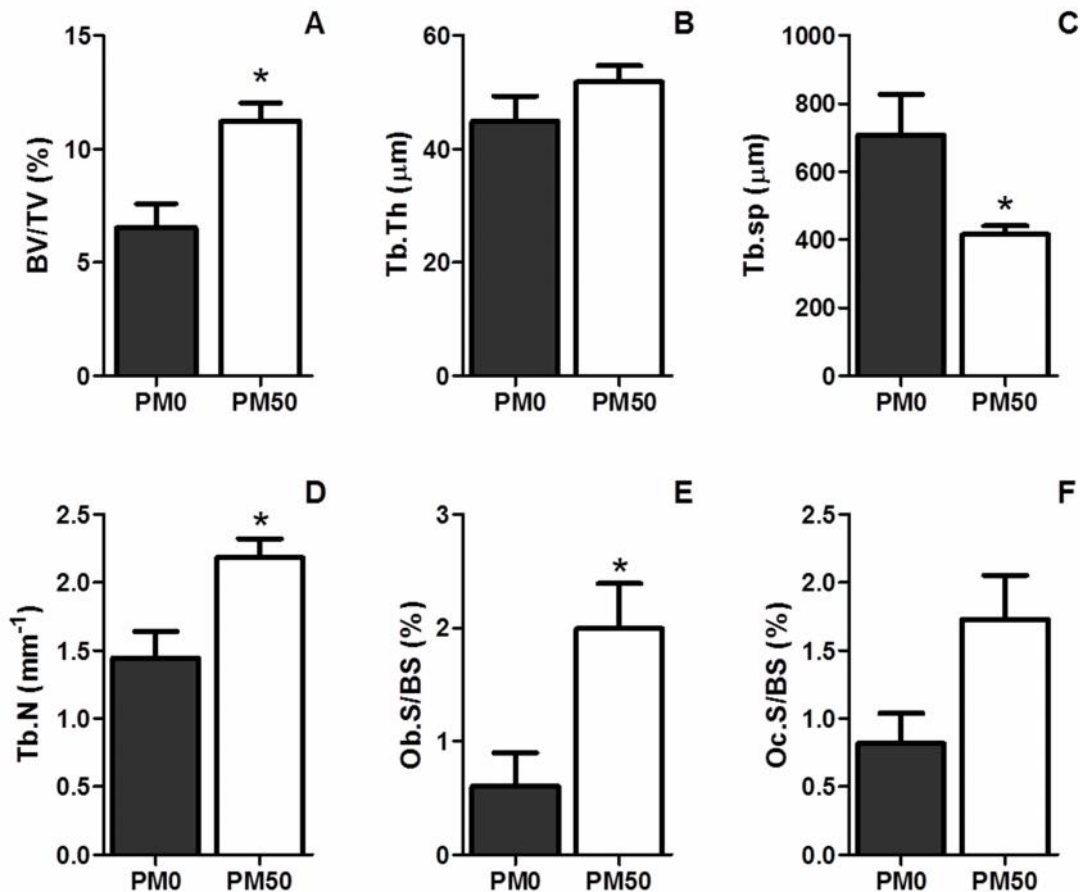
metaphysis (C-D) ในส่วนของ total BMD (A, C) และ trabecular BMD (B, D) ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 0 - 16 ในหนูตัวโตที่รับกาวเคลือบขนาด 0, 5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM5, PM25 และ PM50 ตามลำดับ) หรือ พูราลิน (PU) ขนาด 7.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PU) นาน 12 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 4 - 16, พื้นสีเทา)



รูปที่ 5 แสดงค่าความหนาแน่นกระดูก (BMD) ของกระดูก 4th lumbar vertebra (L4; A-B) และ tibial metaphysis (C-D) ในส่วนของ total BMD (A, C) และ trabecular BMD (B, D) ในหนูตัดรังไข่ภายหลังได้รับกวางเครือขนาด 0, 5, 25 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน (PM0, PM5, PM25 และ PM50 ตามลำดับ) หรือ พูราริน (PU) ขนาด 7.0 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วันนาน 12 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 16) *,** $P < 0.05$ และ 0.01 เมื่อเทียบกับ PM0



รูปที่ 6 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของกระดูกส่วน proximal tibial metaphysis ที่ย้อมด้วยสี Goldner's trichrome ในหนูตัดรังไข่ภายหลังได้รับกวางเครือขนาด 0 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0 (A) และ PM50 (B) ตามลำดับ) นาน 12 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 16) (Scale bars, 500 μ m)



รูปที่ 7 แสดงค่า bone volume (A), trabecular thickness (B), trabecular separation (C), trabecular number (D), osteoblast surface (E) และ osteoclast surface (F) ของกระดูกส่วน proximal tibial metaphysis ในหนูตัวเต็มวัยภายหลังได้รับกาวเคลือบขนาด 0 และ 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน (PM0 และ PM50 ตามลำดับ) นาน 12 สัปดาห์ (สัปดาห์ที่ 16) (* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับ PM0)

5.1.3. วิจารณ์และสรุปผลการทดลองในหนูแรท

การเกิดโรคกระดูกพรุนเนื่องจากมีภาวะพร่องของฮอร์โมนเอสโตรเจนเกิดจากการที่กระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) ลดลง แต่กระบวนการสลายกระดูก (bone resorption) เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูก (Devareddy et al., 2006) ในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาผลของการตัดรังไข่เพื่อชักนำให้มีภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนูแรท พบว่าสามารถชักนำให้หนูแรทเกิดการสูญเสียเนื้อกระดูกได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนหน้านี้ที่ว่า การตัดรังไข่ในหนูแรทเพศเมียสามารถชักนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนได้ (Fanti et al., 1998; Urasopon et al., 2008) โดยการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวขึ้นอยู่กับ ประเภท ตำแหน่ง และชนิดของเนื้อกระดูก โดยเริ่มพบการสูญเสียเนื้อกระดูกในกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ได้มากกว่ากระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ทั้งนี้เนื่องจากกลไกการทำงานของกระดูกเนื้อแน่นของหนูแรทไม่มีระบบการเปลี่ยนแปลงฮาร์เวเชียน (Harversian remodeling system) เหมือนในมนุษย์ (Kalu, 1991) ทำให้ถึงแม้จะมีการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนก็จะมีผลกระทบต่อการทำงานดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่าการสูญเสียเนื้อกระดูกของกระดูกเนื้อโปร่ง เกิดขึ้นที่ตำแหน่งหัวกระดูก (metaphysis) ของกระดูกเร็วกว่ากระดูก

แกนกลาง โดยพบการลดลงของความหนาแน่นของกระดูกยางค์ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2 หลังตัดรังไข่ และความหนาแน่นของกระดูกยางค์จะลดลงมากกว่า 2 เท่าของค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (2SD) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะกระดูกพรุน ในสัปดาห์ที่ 4 หลังจากตัดรังไข่ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการตัดรังไข่หนูเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูแรทเกิดภาวะกระดูกพรุนก่อนเริ่มให้กวางเครือขาว

การได้รับกวางเครือขาวหลังจากเกิดภาวะกระดูกพรุนพบว่า กวางเครือขาวในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน สามารถรักษาปริมาณของเนื้อกระดูกให้ฟื้นคืนมาได้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า กวางเครือขาวสามารถป้องกันการสูญเสียมวลกระดูกที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการตัดรังไข่ได้ (Urasopon et al., 2008) โดยพบว่ากวางเครือขาวมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) (Tiyasatkulkovit et al., 2012) ดังนั้นกวางเครือขาวจึงน่าจะมีผลในการกระตุ้นกระบวนการสร้างกระดูก (bone formation) ทำให้การสูญเสียเนื้อกระดูกลดลง แต่อย่างไรก็ตามการได้รับกวางเครือขาวในขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ภายหลังจากเกิดภาวะกระดูกพรุนเป็นเวลานาน 12 สัปดาห์ ยังไม่สามารถรักษาให้เนื้อกระดูกกลับมาเท่าเดิม (สัปดาห์ที่ 0) ได้

จากการศึกษานี้จึงสรุปได้ว่า กวางเครือขาวขนาด 50 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถรักษาปริมาณเนื้อกระดูกจากภาวะกระดูกพรุนหลังจากมีการลดลงของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ ดังนั้นกวางเครือขาวจึงอาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการสูญเสียของกระดูกของผู้ป่วยโรคกระดูกพรุนได้ แต่อย่างไรก็ตามจากข้อบังคับของ FDA (1994), JMW (1999) และ CHMP (2006) ในการทดสอบความปลอดภัยของสารใด ๆ ที่ออกฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาภาวะกระดูกพรุนในหญิงวัยหมดประจำเดือนจะต้องทำการทดสอบและวิจัยในสัตว์อย่างน้อย 2 ชนิด นั่นคือ 1) หนูแรท ทั้งนี้เนื่องจากหนูแรทเป็นสัตว์ที่มีข้อมูลพื้นฐานมาก รวมทั้งข้อมูลเกี่ยวกับกระดูก แต่เนื่องจากหนูแรทเป็นสัตว์ที่ไม่มีการเกิด trabecular และ Harverasian remodeling และการเกิดภาวะกระดูกพรุนของ cortical bone เกิดขึ้นอย่างช้า ๆ ต่างจากในคน รวมทั้งการที่ corpus luteum ของหนูแรทเพศเมียไม่มีการหลังฮอร์โมนเอสโตรเจน ดังนั้น 2) จึงต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ชนิดอื่นที่มีขนาดใหญ่กว่าหนูแรท เช่น ลิง ที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาและกายภาพ รวมทั้งลักษณะต่าง ๆ ของกระดูกและฮอร์โมนคล้ายกับคน ดังนั้นในการศึกษาวิจัยครั้งนี้จะทำการศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดกวางเครือขาวในการรักษาภาวะกระดูกพรุนในลิงหางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือน

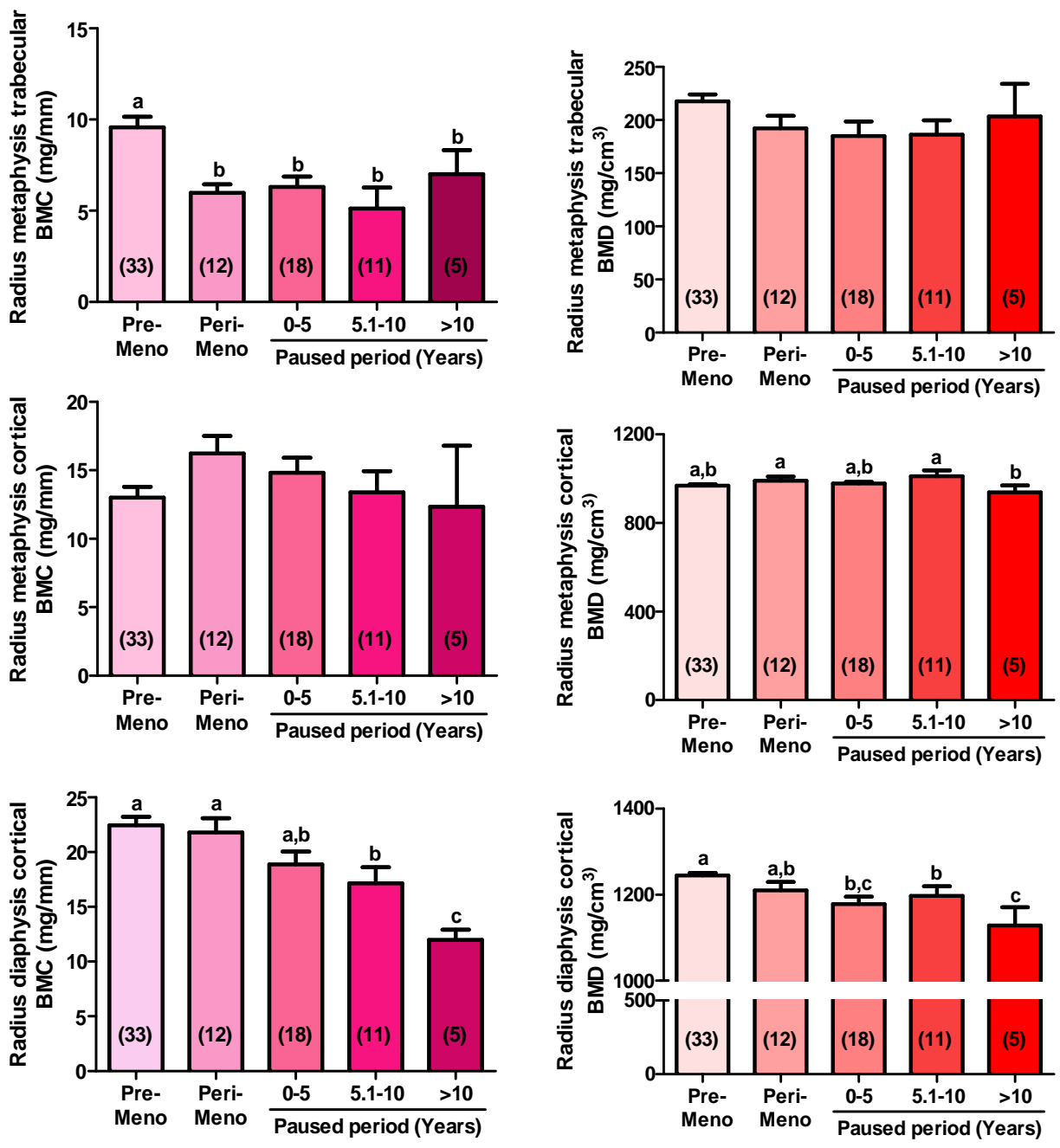
5.2. ศึกษาผลของสารสกัดกาวเครือขาวต่อการรักษาภาวะกระดูกพรุนในลิงทางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือน

5.2.1. เปรียบเทียบค่ามวลกระดูก ความหนาแน่นกระดูกระหว่างลิงทางยาววัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหมดประจำเดือน

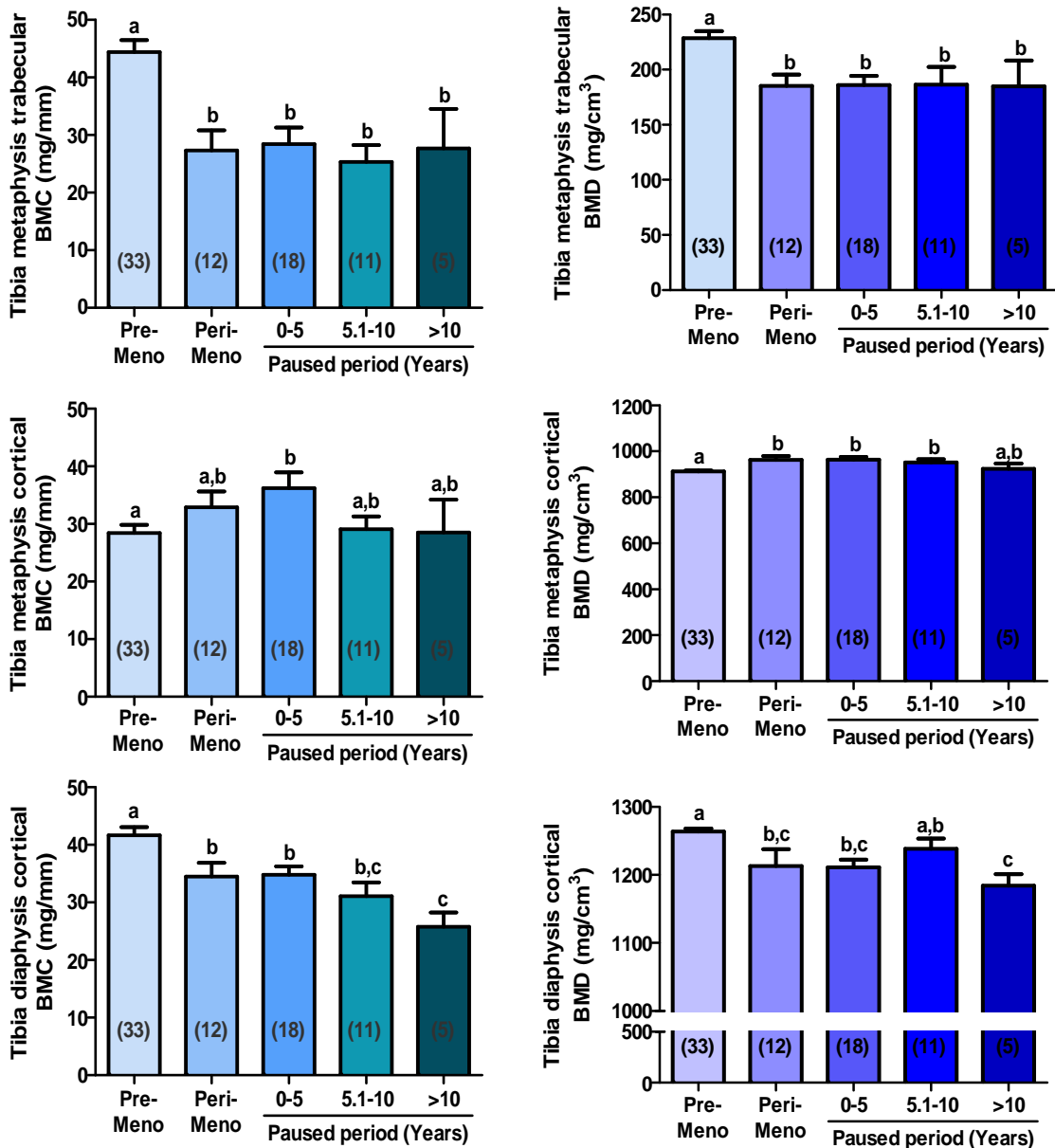
จากการวัดค่ามวลกระดูก (BMC) ของกระดูก radius พบว่าบริเวณส่วนหัวกระดูก (metaphysis) มวลกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ของลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงหลังหมดประจำเดือน (post-menopause) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.0003$) เมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน (pre-menopause) (รูปที่ 8 ซ้ายมือ) โดยการลดลงจะคงที่และไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่หมดประจำเดือน ทั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของมวลกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone) ในบริเวณนี้ ในส่วนแกนกลางกระดูก (diaphysis) พบว่ามวลกระดูกเนื้อแน่นของลิงหลังหมดประจำเดือนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.018$) เมื่อเทียบกับลิงที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และลิงก่อนหมดประจำเดือน และการลดลงนี้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง อย่างสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังหมดประจำเดือน

ในส่วนของค่าความหนาแน่นของกระดูก (BMD) ที่บริเวณหัวกระดูก พบว่าการเปลี่ยนแปลงส่วนใหญ่คล้ายกับค่ามวลกระดูก นั่นคือ ลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนและลิงหลังหมดประจำเดือน ความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโปร่งมีแนวโน้มลดลง เมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน ในขณะที่ความหนาแน่นของกระดูกเนื้อแน่น ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภายหลังจากที่ลิงหมดประจำเดือนนานอย่างน้อย 10 ปี ในส่วนแกนกลางกระดูก (diaphysis) พบว่าค่าความหนาแน่นของกระดูกเนื้อแน่นลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) ในลิงหลังหมดประจำเดือนเทียบกับลิงก่อนหมดประจำเดือน อย่างสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังหมดประจำเดือน (รูปที่ 8 ขวามือ)

การวัดค่ามวลกระดูกและความหนาแน่นกระดูกของกระดูก tibia พบการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกันกับกระดูก radius นั่นคือ มวลกระดูกและความหนาแน่นเนื้อโปร่ง (trabecular bone) ของลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และลิงหลังหมดประจำเดือน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.005$) เมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน (รูปที่ 9 ซ้ายมือ) โดยไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่หมดประจำเดือน และมวลและความหนาแน่นกระดูกเนื้อแน่นของลิงที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนและลิงหลังหมดประจำเดือน ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับลิงก่อนหมดประจำเดือน อย่างสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังหมดประจำเดือน (รูปที่ 9 ขวามือ)



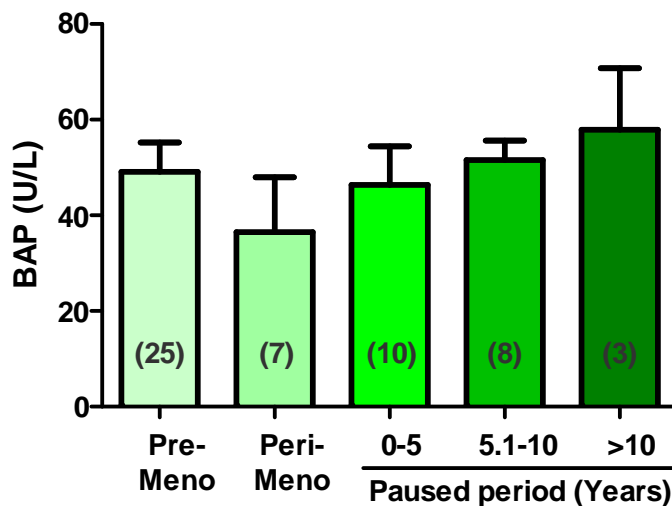
รูปที่ 8 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) และความหนาแน่นกระดูก (BMD) ที่กระดูก radius ในลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause) ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause) โดยจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มคือ radius metaphysis trabecular BMC, radius metaphysis cortical และ radius diaphysis cortical BMC



รูปที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) และความหนาแน่นกระดูก (BMD) ที่กระดูก tibia ในลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause) โดยจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มคือ tibia metaphysis trabecular BMC, tibia metaphysis cortical BMC และ tibia diaphysis cortical BMC

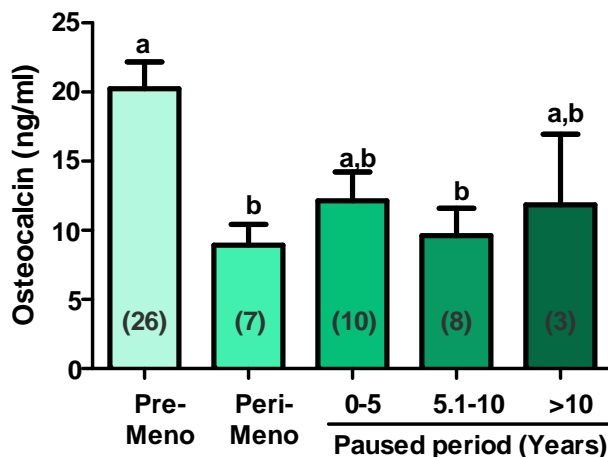
5.2.2. เปรียบเทียบค่า bone formation และ bone resorption marker ระหว่างลิงทางยาววัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหมดประจำเดือน

ระดับ Bone alkaline phosphatase ในพลาสมา ของลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (perimenopause) มีแนวโน้มลดลง ($p < 0.07$) เมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน (pre-menopause) และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นภายหลังจากหมดประจำเดือน และมีค่าใกล้เคียงกับลิงในกลุ่ม pre-menopause (รูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ Bone specific alkaline phosphatase (BAP) ในพลาสมา ของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)

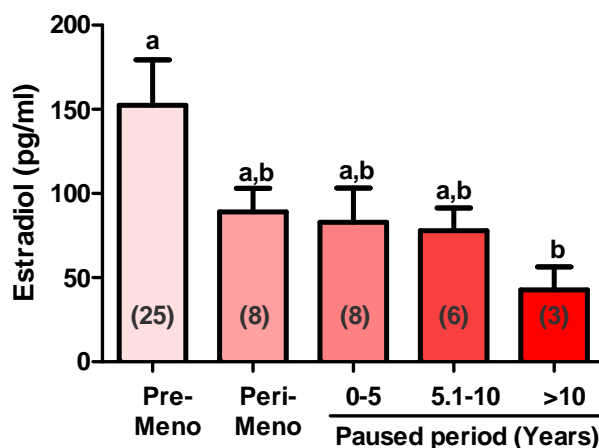
ระดับ osteocalcin ในพลาสมาของลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงหลังหมดประจำเดือน (post-menopause) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน (pre-menopause) (รูปที่ 11) และไม่ขึ้นกับระยะเวลาที่หมดประจำเดือน



รูปที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ osteocalcin ในพลาสมาของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)

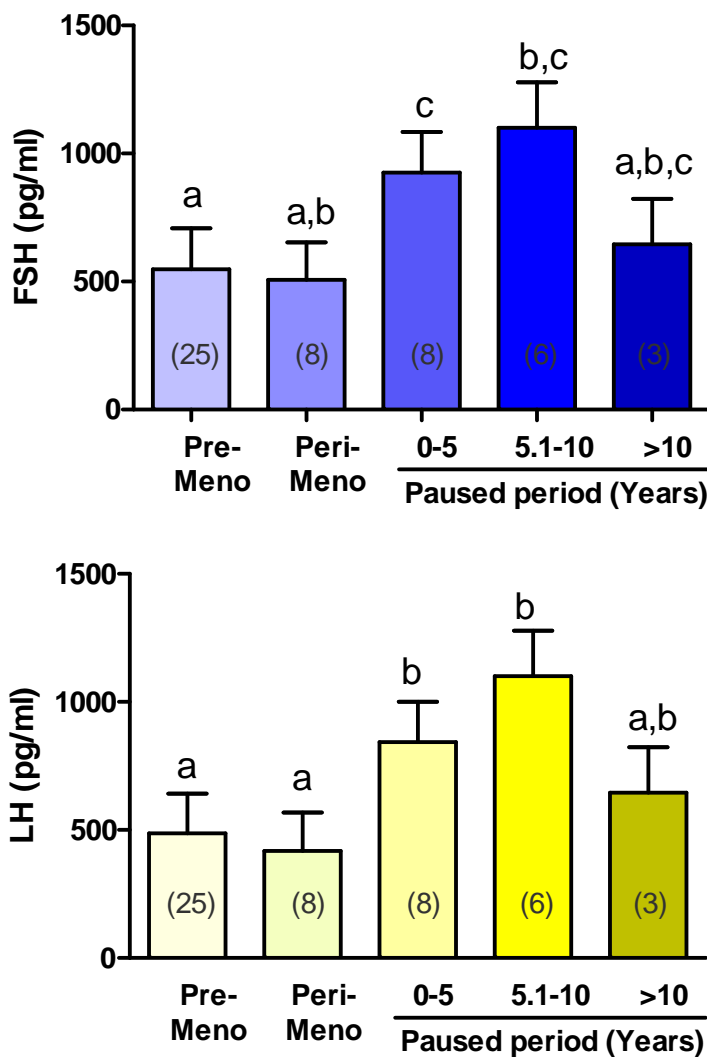
5.2.3. เปรียบเทียบค่า estradiol, luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) ระหว่างลิงหายาววัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหมดประจำเดือน

ระดับ estradiol ในพลาสมาของลิงกลุ่มที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) ค่อย ๆ ลดลงเมื่อเทียบกับลิงในกลุ่มที่ยังไม่หมดประจำเดือน (pre-menopause) และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในลิงหลังหมดประจำเดือน (post-menopause) มามากกว่า 10 ปี (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ estradiol ในพลาสมา ของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)

ระดับ FSH และ LH ในพลาสมาเพิ่มขึ้นอย่างสอดคล้องกับระดับ estradiol ที่ลดลง โดยเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในลิงหลังหมดประจำเดือน และสัมพันธ์กับระยะเวลาที่หมดประจำเดือนดังที่เคยมีรายงานมาแล้วในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน แต่ที่สิ่งที่น่าสนใจออกไปและไม่เคยมีรายงานมาก่อนในคน คือ ระดับ FSH และ LH ในพลาสมา กลับมาลดลงอีกครั้งในลิงที่หมดประจำเดือนนาน 10 ปี ซึ่งในระยะนี้ลิงส่วนใหญ่มีอายุมากกว่า 30 ปีขึ้นไป หรือเทียบเท่ากับผู้หญิงวัย 90 ปีขึ้นไป (รูปที่ 13)



รูปที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ follicle stimulating hormone (FSH) และ luteinizing hormone (LH) ในพลาสมา ของลิงวัยก่อนหมดประจำเดือน (pre-menopause), ลิงในวัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (peri-menopause) และลิงวัยหลังหมดประจำเดือน (post-menopause)

5.2.4. วิจัยและสรุปผลเปรียบเทียบค่ามวลกระดูก ความหนาแน่นกระดูก bone marker และระดับฮอร์โมนเพศระหว่างลิงหายาววัยก่อนหมดประจำเดือน วัยที่เข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และวัยหมดประจำเดือน

เมื่อเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของกระบวนการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกระดูก (bone remodeling) เนื่องจากภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน (Khosla et al., 2012; Weitzman et al., 2006) โดยอัตราการสลายกระดูก (bone resorption) จะมากกว่าอัตราการสร้างกระดูก (bone formation) ทำให้เกิดการสูญเสียมวลกระดูกจนเกิดเป็นโรคกระดูกพรุนในที่สุด (Recker et al., 2004) จากการศึกษาในลิงหายาวพบว่าปริมาณเอสโตรเจนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อถึงเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน และลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อระยะเวลาที่ลิงหมดประจำเดือนยาวนานขึ้น ทั้งนี้ที่กระดูก tibia เริ่มมีการลดลงของมวลกระดูกและความหนาแน่นของกระดูกตั้งแต่ช่วงเริ่มเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในมนุษย์ ที่พบว่าผู้หญิงกลุ่มที่เริ่มเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือนจะมีการเปลี่ยนแปลงของดัชนีชี้วัดมวลกระดูกและมีการลดลงของความหนาแน่นกระดูกอย่างรวดเร็ว คิดเป็น $-4.3 \pm 1.3 \text{ mg/cm}^3/\text{year}$ (Seifert-Klauss et al., 2012) ในขณะที่กระดูก radius เกิดการลดลงของมวลกระดูกและความหนาแน่นของกระดูกในช่วงที่ลิงหมดประจำเดือนแล้วเท่านั้น ทั้งนี้การที่กระดูกทั้ง 2 ชั้นเกิดการตอบสนองที่แตกต่างกันอาจเนื่องมาจากลักษณะการทำงานของกระดูกแต่ละชั้น กล่าวคือ เนื่องจากกระดูก tibia ทำหน้าที่ในการรองรับน้ำหนักตัว (weight bearing) ซึ่งโดยปกติจะเป็นบริเวณที่มี mechanical load สูง กระดูกบริเวณนี้จึงมักมีความหนาแน่นมาก (Klein-Nulend et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากลิงหายาวที่ใช้ในการทดลองอยู่ในกรงที่มีพื้นที่จำกัดทำให้มีการเคลื่อนไหวและการใช้งานกระดูกส่วน tibia น้อยกว่าปกติ mechanical load น้อยจึงทำให้เห็นผลของการลดลงของมวลกระดูกชัดเจนกว่ากระดูก radius ทั้งนี้นอกจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ลดลงแล้ว การเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมน FSH และ LH อาจจะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้เช่นกัน (Xu et al., 2009; Geng et al., 2013) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตรวจพบการกลับมาลดลงอีกครั้งของระดับฮอร์โมน FSH และ LH ภายหลังจากที่ลิงหมดประจำเดือนนานมากกว่า 10 ปี และไม่เคยพบรายงานลักษณะดังกล่าวในคน ทั้งนี้เนื่องจากการยากที่ผู้ทำวิจัยจะติดตามการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนในคนที่มีอายุมากกว่า 90 ปีได้ ดังนั้นการใช้ลิงหายาวที่มีลักษณะทางสรีรวิทยาและโครงสร้างของกระดูก และมีรูปแบบการหลังและระดับฮอร์โมนเพศคล้ายกับของคน ในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโรคกระดูกพรุนและภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จึงน่าจะเป็นสัตว์ทดลองที่ดีที่จะนำข้อมูลที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในคน

การเปลี่ยนแปลงของเนื้อกระดูกภายหลังการหมดประจำเดือนเกิดขึ้นทั้งที่บริเวณหัวกระดูกและบริเวณแกนกลางกระดูก โดยค่ามวลกระดูกและความหนาแน่นของกระดูกเนื้อโพรงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งที่กระดูก radius และ tibia ทั้งนี้เนื่องจากกระดูกเนื้อโพรงเกิดการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนได้เร็วกว่ากระดูกเนื้อแข็งถึง 5-10 เท่า (Ruimerman, 2005) จึงทำให้กระดูกเนื้อโพรงเกิดการสูญเสียเนื้อกระดูกอย่างรวดเร็ว ในส่วนของกระดูกเนื้อแน่นแม้ว่าอัตราการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกระดูกจะช้ากว่าแต่จากผลการทดลองพบว่าการลดลงของเนื้อกระดูกเนื้อแน่นทั้งที่กระดูก radius และ tibia เช่นกัน จากการศึกษาในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนรายงานว่า ภายหลังจากหมดประจำเดือนค่าความหนาแน่นของกระดูก radius ลดลง 1.9 ± 0.7 เปอร์เซ็นต์ต่อปี โดยกลไกการสูญเสียกระดูกเนื้อแน่นนั้นเกิดจากการสลายตัวของเนื้อกระดูกด้านใน (endosteal) ซึ่งจะสร้างความแข็งแรงของกระดูกลดลง และโอกาสเสี่ยงในการเกิดกระดูกหักเพิ่มขึ้น (Ahbough et al., 2003) ซึ่งการเกิดกระดูกหักในผู้สูงอายุนำไปสู่ความเสี่ยงในการทุพพลภาพ, อันตรายต่อชีวิต และการสูญเสียทางเศรษฐกิจอย่างมหาศาลอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ (Harvey et al., 2010)

ในส่วนของดัชนีชี้วัดการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกระดูก พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของทั้งดัชนีชี้วัดการสร้างมวลกระดูก และดัชนีชี้วัดการสลายกระดูก ซึ่งสะท้อนถึงการเพิ่มขึ้นของการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกระดูก

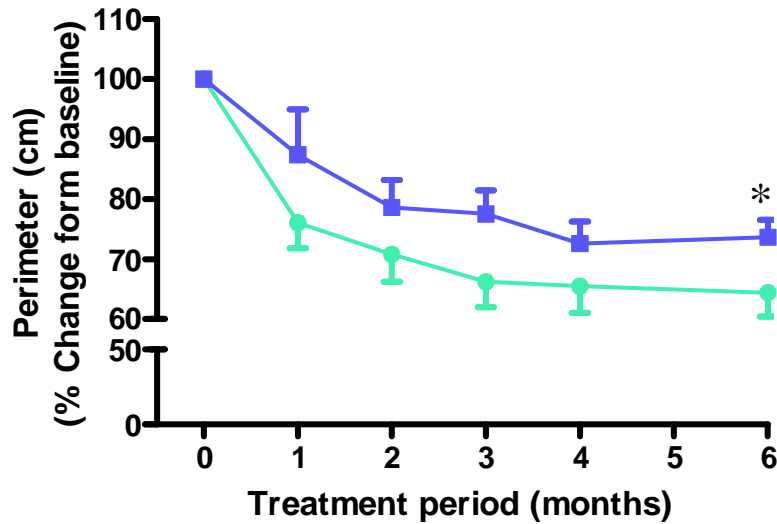
(bone turnover) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน ลิง (Legrand et al., 2003), คน (Lumachi et al., 2009) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า ระดับ osteocalcin ในพลาสมา มีแนวโน้มลดลงเมื่อถึงเข้าสู่วัยหมดประจำเดือนและหลังหมดประจำเดือน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนซึ่งพบว่าปริมาณ osteocalcin ในพลาสมา มีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความหนาแน่นของกระดูก (Susanto, 2003) โดยแม้ว่าทั้ง bone specific alkaline phosphatase และ osteocalcin จะเป็นดัชนีชี้วัดการสร้างมวลกระดูกทั้งคู่ แต่แท้จริงแล้ว ดัชนีชี้วัดมวลกระดูกทั้งสอง ชี้วัดมวลกระดูกในขั้นตอนที่แตกต่างกัน โดย bone specific alkaline phosphatase จะบ่งชี้การพัฒนาของเซลล์ต้นกำเนิดไปเป็นเซลล์ osteoblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างเนื้อกระดูก จากนั้นกระดูกใหม่ที่เพิ่มสร้างจะเกิดการเชื่อมแร่ธาตุแคลเซียมและฟอสเฟต ซึ่งดัชนีชี้วัดกระบวนการเชื่อมแร่ธาตุ คือ osteocalcin (Foreberg et al., 1999) ดังนั้นจากพบการทดลองครั้งนี้จากกล่าวได้ว่าร่างกายอาจมีการกระตุ้นการสร้างเซลล์ Osteoblast เพิ่มมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากการลดลงของเชื่อมแร่ธาตุในกระดูก กอปรกับมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการสลายกระดูก ทำให้เนื้อกระดูกโดยรวมลดลงในที่สุด

จากการศึกษาสรุปได้ว่าการลดลงของมวลกระดูกนั้นเกิดขึ้นตั้งแต่วัยที่กำลังเข้าสู่การหมดประจำเดือน และการลดลงจะเพิ่มมากขึ้นภายหลังจากหมดประจำเดือนแล้ว ดังนั้นการรักษาโรคกระดูกพรุนภายหลังจากที่หมดประจำเดือนไปแล้วนั้นอาจล่าช้าเกินไป ช่วงที่เหมาะสมในการรักษาคือช่วงก่อนหมดประจำเดือน (late pre-menopause) หรือช่วงที่กำลังเข้าสู่ภาวะหมดประจำเดือน (early peri-menopause)

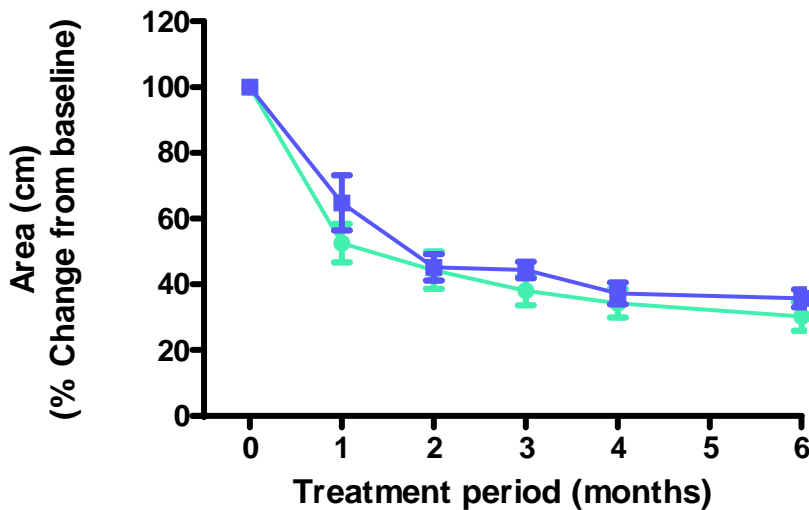
5.3 ศึกษาผลของกวางเครือขาวต่อการประสานกลับคืนของเนื้อกระดูก (bone healing) ในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

5.3.1. ศึกษาผลของกวางเครือขาวต่อการประสานกลับคืนของเนื้อกระดูก (bone healing) ในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

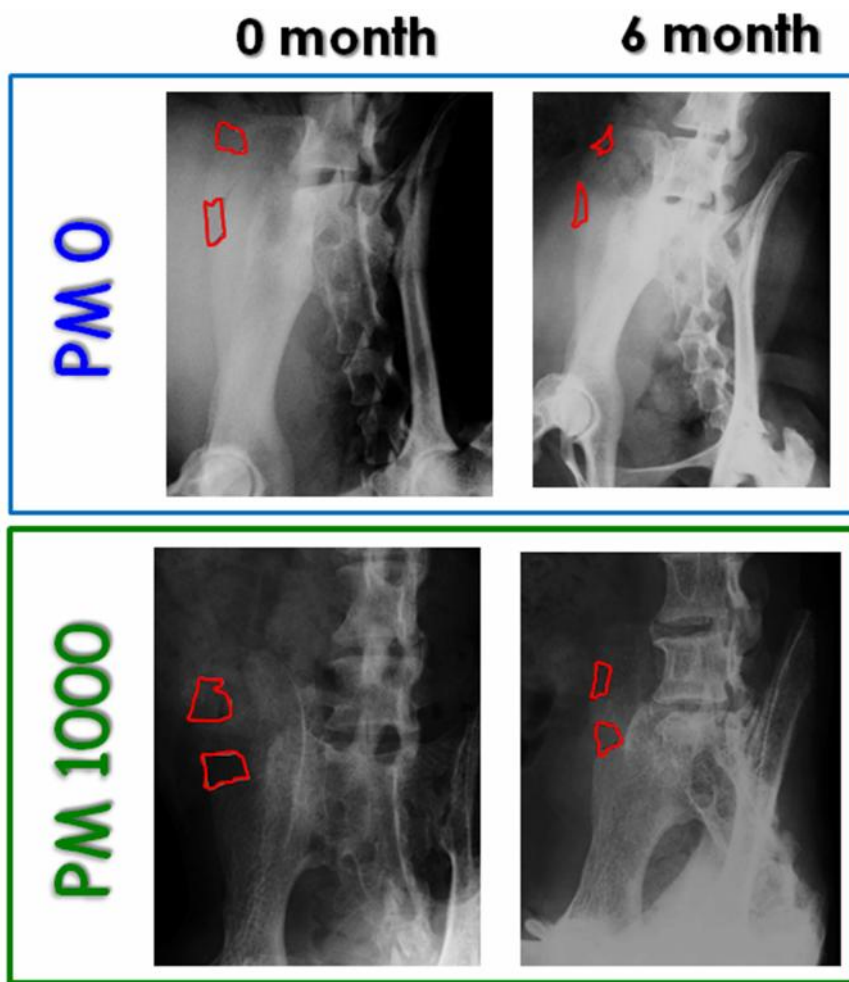
เมื่อให้กวางเครือขาวขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว/วัน ผสมกับอาหารเม็ดสำเร็จรูปแก่ลิงหางยาววัยหลังหมดประจำเดือนเป็นระยะเวลา 6 เดือนพบว่าขนาดเส้นรอบวง (perimeter) (รูปที่ 14) และพื้นที่ (area) (รูปที่ 15) ลดลงเมื่อเทียบกับลิงที่ได้รับอาหารปกติ โดยจะเห็นผลชัดเจนในส่วนของเส้นรอบวง (perimeter) ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)



รูปที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดเส้นรอบวง (perimeter) ของบริเวณที่มีการผ่าตัดเอาเนื้อกระดูกออก (bone biopsy) ในลิงที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวางเครือขาว (PM 1000) ซึ่งขนาดเส้นรอบวงที่ลดลงบ่งชี้ถึงการประสานของเนื้อกระดูกที่เกิดขึ้นได้เร็วกว่า



รูปที่ 15 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ (area) ของบริเวณที่มีการผ่าตัดเอาเนื้อกระดูกออก (bone biopsy) ในลิงที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวางเครือขาว (PM 1000) ซึ่งขนาดเส้นรอบวงที่ลดลงบ่งชี้ถึงการประสานของเนื้อกระดูกที่เกิดขึ้นได้เร็วกว่า



รูปที่ 16 ภาพเอกซเรย์เปรียบเทียบบริเวณที่มีการผ่าตัดเอาเนื้อกระดูกออก (เส้นสีแดง) ในเดือนที่ 0 และเดือนที่ 6 ระหว่างลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวางเครือขาว (PM 1000)

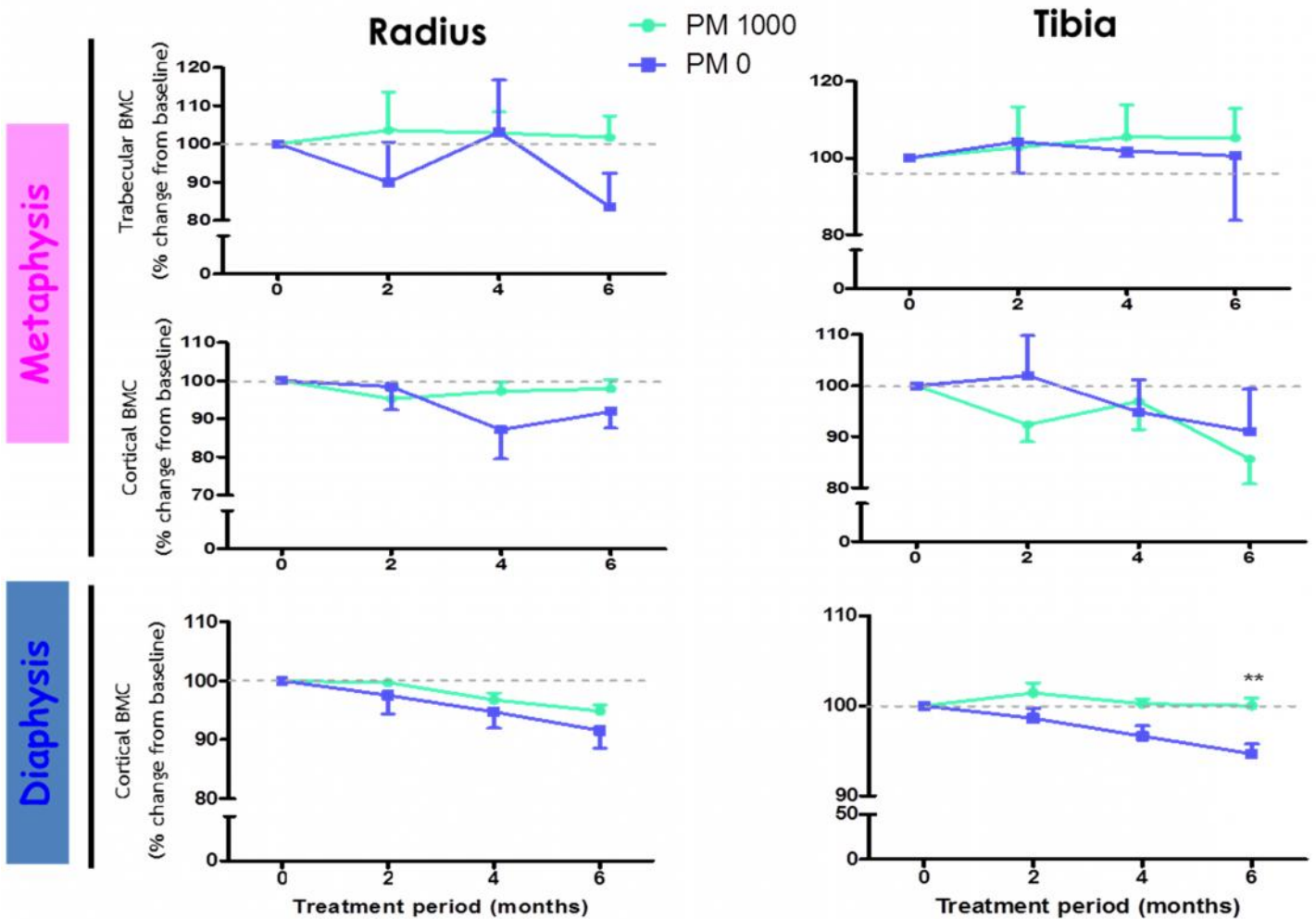
5.3.2. วิจัยและสรุปผลการทดลองการศึกษาผลของกวางเครือขาวต่อการประสานกลับคืนของเนื้อกระดูก (bone healing) ในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

จากผลการทดลอง เมื่อให้สารแขวนลอยกวางเครือขาวแก่ลิงหางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือนเป็นเวลานาน 6 เดือน พบว่าลิงกลุ่มที่ได้รับกวางเครือขาวมีการประสานของกระดูกได้เร็วกว่าลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติแต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองที่มีก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการกระตุ้นการประสานกระดูกของพูรารินในกระต่าย (Wong and Rabie, 2007) และผลของอีควอล (equol) ในหนูแรท (Kolios et al., 2009) แต่ด้วยจากการผลัดเปลี่ยนหมุนเวียนกระดูกในลิงนั้นเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ เราจึงจะสามารถเห็นผลในการกระตุ้นการประสานเนื้อกระดูกในลิงหางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือนได้ ภายหลังจากให้สารนานถึง 6 เดือน แต่อย่างไรก็ตามจากผลที่ได้ได้เพิ่มมูลค่าให้แก่พืชสมุนไพรกวางเครือขาว ซึ่งนอกจากจะนำไปใช้ในการรักษาโรคกระดูกพรุนแล้ว ยังอาจจะพัฒนาไปเป็นยาเพื่อเร่งการประสานเนื้อกระดูกในคนที่กระดูกหักได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่มักเกิดการหักของกระดูกบริเวณตะโพก

5.4. ศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

5.4.1. ศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของกวาวเครือขาวต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

จากผลการทดลองที่ได้ทั้งในกระดูก radius และ tibia ทั้งส่วน metaphysis (ที่ประกอบด้วยส่วนของกระดูกเนื้อโปร่ง (trabecular bone) และส่วนกระดูกเนื้อแน่น (cortical bone)) และส่วน diaphysis (ที่ประกอบด้วยกระดูกเนื้อแน่นเป็นหลัก) มีการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางเดียวกัน และอย่างสอดคล้องกับผลของการประสานของเนื้อกระดูกในข้อ 5.3.1. พบว่าเมื่อให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวในขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน แก่ลิงหางยาวเพศเมียวัยหมดประจำเดือนเป็นเวลานาน 6 เดือน ทำให้กระดูกเนื้อแน่นในส่วน diaphysis มีค่าสูงกว่าลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติแต่เพียงอย่างเดียว ($p < 0.05$) (รูปที่ 17)



รูปที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยของมวลกระดูก (BMC) ในกระดูก radius (ซ้าย) และ tibia (ขวา) ระหว่างลิงกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (PM0) และลิงที่ได้รับกวาวเครือขาว (PM 1000) โดยจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มคือ metaphysis trabecular BMC, metaphysis cortical BMC และ diaphysis cortical BMC ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับ PM0

5.4.2. วิจารณ์และสรุปผลการทดลองการศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของกาวเครือขาวต่อการรักษาโรคกระดูกพรุนในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือน

ในการวัดค่ามวลกระดูกพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปลิงที่หมดประจำเดือนมีการสูญเสียมวลกระดูกอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะกระดูกเนื้อแข็ง (cortical bone) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้า ทั้งบริเวณปลายกระดูก (metaphysis) และแกนกลางกระดูก (diaphysis) โดยในการให้สารแขวนลอยกาวเครือขาวพบว่าสามารถช่วยลดการสูญเสียมวลกระดูกได้ในส่วนของ cortical diaphysis ทั้งที่กระดูก radius และ tibia แม้ว่าผลการทดลองนี้จะไม่แล้วเสร็จ แต่ผลการทดลองที่ได้ในเบื้องต้นนี้ก็เป็นที่น่าพอใจในการพัฒนากาวเครือขาวไปเป็นยารักษาโรคกระดูกพรุนเพื่อใช้ในคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเพิ่มมวลกระดูกในส่วน of กระดูกเนื้อแน่นของ diaphysis ซึ่งอยู่บริเวณกึ่งกลางของกระดูกยาวชนิด long bone ที่มักจะหักก่อนส่วนอื่น ๆ เมื่อได้รับแรงกระแทก

6. การเผยแพร่ผลงานวิจัยและการนำไปใช้ประโยชน์

6.1. การนำเสนอผลงานในการประชุมวิชาการนานาชาติ

6.1.1. วิทยากรรับเชิญ (Keynote speaker)

Malaivijitnond S, Anukulthanakorn K, Jaroenporn S, Parhar I. 2014. Neuroprotective and neurotherapeutic actions of *Pueraria mirifica* Thai herb. Chulalongkorn University-Peking University The 4th Life Science Symposium “Advance in Medical Biotechnology”. Faculty of Science, Chulalongkorn University. 26-27 March 2014 (Plenary Lecture).

6.1.2. วิทยากรรับเชิญ (Invited speaker)

Malaivijitnond S, Urasopon N., Tiyasatkulkovit W., Kittivanichkul D., Charoenphandhu N. 2014. Anti-osteoporotic effects of phytoestrogens containing plant *pueraria mirifica*: in vitro and in vivo approaches. The 7th Intercongress symposium of the AOSCE. 18-23 March 2014. National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan (Invited Symposium Lecture).

Malaivijitnond S. 2014. Anti-osteoporotic effects of phytoestrogens containing plant *Pueraria mirifica*: in vivo and in vitro approaches. Seminar Series at Keio University of Medical School, Japan. 18 November 2014.

Malaivijitnond S. 2014. Anti-osteoporotic effects of phytoestrogens containing plant *Pueraria mirifica*: in vivo and in vitro approaches. Seminar Series at Department of Neuroscience, Jikei University School of Medicine, Japan. 19 November 2014.

Malaivijitnond S. 2015. Primate models for efficacy testing of phytopharmaceutical products. 31st Annual Meeting and International Research Conference in Pharmaceutical Sciences (JSPS-NRCT and IAMPS) “Advanced Science and Technology in Pharmaceutical Research” January 22 - 23, 2015 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University 10th, Thailand.

6.1.3. การนำเสนอผลงานแบบปากเปล่า

Kittivanichkul D, **Malaivijitnond S.** 2014. Changes In Bone Mineral Density And Content In Pre-, Peri- And Post-Menopausal Cynomolgus Monkeys. The 7th Intercongress symposium of the AOSCE. 18-23 March 2014. National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan

6.1.4. การนำเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

Kittivanichkul D, Watanabe G, Nagaoka K, **Jaroenporn S, Malaivijitnond S.** 2014. Changes in bone mass of pre-, peri- and post-menopausal cynomolgus monkeys. 1st seminar of the Indulging in science research, 27 February 2014, Tokyo University of Agriculture and Technology, Japan.

Suthon S, **Jaroenporn S, Malaivijitnond S.** 2014. Therapeutic effects of Pueraria candolleivar. mirifica and puerarin on ovariectomy induced-osteoporotic rat. การประชุมวิชาการสรีรวิทยา สมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 43 ประจำปี 2557, พัทยา, ชลบุรี, 23-25 เมษายน 2557.

6.2. บทความในวารสารวิชาการนานาชาติ

Kittivanichkul D, Watanabe G, Nagaoka K, **Malaivijitnond S.** 2014. Changes in bone mineral density and content in naturally occurred menopausal cynokolgus monkeys. Menopause. Submission.

7. ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินงานกับแผนการดำเนินการที่ตั้งไว้ (Gantt Chart)

กิจกรรม	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.
1.การทดสอบทางชีวภาพของกาวเครือขาวในหนูแรทเพศผู้และเพศเมียที่ถูกชักนำให้อยู่ในภาวะกระดูกพรุน (การทดลองที่ 4.1.)	←.....→ ←————→											
2.การทดสอบทางชีวภาพของตะบูนดำในหนูแรทเพศผู้และเพศเมีย	←.....→											
3.การตรวจวัดค่ามวลและความหนาแน่นกระดูกในลิงทางยาววัยหมดประจำเดือนเปรียบเทียบกับลิงทางยาววัยเจริญพันธุ์ (การทดลองที่ 4.2.1.)	←.....→ ←————→											
4. การทดสอบทางชีวภาพของกาวเครือขาวในลิงทางยาววัยหมดประจำเดือน (การทดลองที่ 4.2.2 และ 4.2.3)	←.....→ ←————→											

หมายเหตุ : 1. ให้ระบุเดือนที่เริ่มดำเนินการวิจัยตามสัญญารับทุน

2. ยังไม่สามารถทดสอบสารสกัดตะบูนดำ (7-OXO) ในสัตว์ทดลองได้ในขณะนี้ เนื่องจากตะบูนดำออกผลเพียงปีละครั้งเท่านั้น และการทดสอบในสัตว์ทดลองต้องใช้สารสกัดจำนวนมาก โดยผลตะบูนดำหนัก 500 กิโลกรัม สามารถสกัดสาร 7-OXO ได้เพียง 20 มิลลิกรัมเท่านั้น

←.....→ หมายถึง งานหรือกิจกรรมที่วางแผนไว้ว่าจะทำตามข้อเสนอโครงการ

←————→ หมายถึง งานหรือกิจกรรมที่ทำได้แล้ว

8. งานตามโครงการที่จะทำต่อไป

- การทดสอบทางชีวภาพของกวางเครือขาว (การทดลองที่ 4.2.2 และ 4.2.3) ในลิงหางยาววัยหมดประจำเดือนต่อไปจนครบ 12 เดือน

9. คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา พร้อมวิธีการแก้ปัญหา (ถ้ามี)

- การทดสอบทางชีวภาพของตะบูนดำในหนูแรทเพศผู้และเพศเมียมีความล่าช้า เนื่องจากตะบูนดำออกผลปีละครั้ง ในช่วงเดือน สิงหาคม ถึง ตุลาคม และสกัดได้ในปริมาณน้อยไม่เพียงพอต่อการทดสอบในสัตว์ทดลอง จึงทำให้ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของตะบูนดำในหนูแรทเพศเมียได้ ขณะนี้ผู้วิจัยได้ดำเนินการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพตัวใหม่ คือ สาร collinin ซึ่งเป็นสารทุติยภูมิในกลุ่ม geranyloxycoumarin ที่พบในพืชวงศ์ส้ม Rutaceae เช่น *Zanthoxylum schinifolium* โดยสามารถสกัด collinin ได้จากใบหรือเปลือกหุ้มลำต้นของ *Zanthoxylum schinifolium* พบว่าสาร collinin สามารถยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกและยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สลายกระดูกวัยอ่อนไปเป็นเซลล์สลายกระดูกเจริญวัยได้ และได้มีการนักวิจัยจึงได้คิดค้นวิธีสังเคราะห์สาร collinin ในห้องปฏิบัติการจากสารตั้งต้น pyrogallol และ propiolic acid ได้เป็นผลสำเร็จ (Curini et al., 2003) ซึ่งลักษณะดังกล่าวจัดเป็นหัวใจสำคัญที่จะพัฒนาสารใด ๆ ก็ตามที่พบในพืชและไปเป็นยาเพื่อใช้ในคน ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงจะดำเนินการสังเคราะห์สาร collinin และนำมาทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลองต่อไป

บรรณานุกรม

- Ahlborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. 2003. Bone loss and bone size after menopause. *N Engl J Med.* 349:327–334.
- Alatalo S, Penq Z, Janckila A, aija H, Vihko P, Halleen J. 2003. A novel immunoassay for the eterination of tartrate resistant acid phosphatase 5b from rat serum. *J Bone Mine Res.* 18:134–139.
- Bland R. 2000. Steroid hormone receptors expression and action in bone. *Biochem Soc Med Res Soc.* 98:217–204.
- Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J. 2005. Effect of low-level lifetime exposure to cadmium on calciotropic hormones in aged female rats. *Arch Toxicol* 79:636–646.
- Canavan T P, Doshi NR. 1999. Endometrial cancer. *Am Fam Phys.* 59: 3069 – 3077.
- Chansakaow S, Ishikawa T, Sekine K, Okada M, Higuchi Y, Kudo M, Chaichantipyuth C. 2000. Isoflavonoids from *Pueraria mirifica* and their estrogenic activity. *Planta Med.* 66:572–575.
- Chen X, Anderson JB. 2002. Isoflavones and bone: Animal and human evidence of efficacy. *J Musculo Neuro Interac.* 2:352–359.
- Cherdshewasart W, Panrisaen R, Picha P. 2007b. Pretreatment with phytoestrogen-rich plant decrease breast tumor incidence and exhibits lower profile of mammary ERalpha and ERbeta. *Maturitas.* 58:174–181.
- CHMP. 2006. Guideline on the evaluation of medicinal products in the treatment of primary osteoporosis. London: European Medicines Agency.
- Compson JE. 1990. Osteoporosis. *Clin Endocrinol.* 33:653–682.
- Compson JE. 2001. Sex steroid and bone. *Physiol Rev.* 81:419–447.
- Deal C. 2009. Potential new drug targets for osteoporosis. *Rheumatology.* 5:21–27.
- Delmas P. 2000. Markers of bone turnover for monitoring treatment of osteoporosis with antiresorptive drugs. *Osteo Inter.* 6:66–76.
- Devareddy L, Khalil DA, Smith BJ, Lucas EA, Soung do Y, Marlow DD, Arjmandi BH. 2006. Soy moderately improves microstructural properties without affecting bone mass in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *Bone.* 38:686–693.
- Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M. 2000. Androgen deficiency indduce high turnover osteopenia in aged male rat: A sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res.* 15:1085–1098.
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH. 1998. The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int.* 8:274–281.
- FDA. 1994. Guideline for the preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. In Products DoMaED, editor. Rockville, MD: Food and Drug Administration.

- Fontanges E, Fontana A, Delma P. 2004. Osteoporosis and breast cancer. *Joint Bone Spine*. 71:102–110.
- Froberg MK, Garg UC, Stroneck DF, Geis M, McCullough J, Brown DM. 1999. Changes in serum osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase are associated with bone pain in donors receiving granulocyte-colony-stimulating factor for peripheral blood stem and progenitor cell collection. *Transfusion*. 39:410–414.
- Gao HY, Yamaguchi M. 1999. Anabolic effect of daidzein on cortical bone tissue culture: Comparison with genistein effect. *Mol Cel Biochem*. 194:93–98.
- Geng W, Yan X, Du H, Cui J, Li L, Chen F. 2013. Immunization with FSH fusion protein antigen prevents bone loss in a rat ovariectomy-induced osteoporosis model. *Biochem Biophys Res Commun*. 434:280–286.
- Harvey N, Dennison E, Cooper C. 2010. Osteoporosis: impact on health and economics. *Nat Rev Rheumato*. 6:99–105.
- Hill PA, Orth M. 1998. Bone remodeling. *J Orthodon*. 25:101–107.
- Huges DE, Boyce BF. 1997. Apoptosis in bone physiology and disease. *J Clin Pathol*. 50:132–137.
- Jimi E, Ikebe T, Takahashi N, Herata M, Suda T, Koga T. 1996. Interleukin 1 alpha activates all NF- κ B-like factor in osteoclast-like cells. *J Biol Chem*. 271:4605–4608.
- JMHW. 1999. Guideline Concerning the Clinical Evaluation Method for Anti-Osteoporosis Agents, Pharmaceutical Examination No. 742. The Prefectural Bureau of Health Management, Section of Examination and Control, Bureau of Drug Safety, Japanese Ministry of Health and Welfare.
- Kalu DN. 1991. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner*. 15:175–191.
- Kanis JA, Melton LJ, Christian JC, Khaltaev N. 1994. The diagnosis of osteoporosis. *Osteo Inter*. 9: 1137–1147.
- Khosla S, Oursler MJ, Monroe GD. 2012. Estrogen and the skeleton. *Trends Endocrinol Metab*. 23:576–581.
- Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. 2012. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater*. 24:278–291.
- Kolios L, Sehmisch S, Daub F, Rack T, Tezval M, Stuermer KM, Stuermer EK. 2009. Equol but not genistein improves early metaphyseal fracture healing in osteoporotic rats. *Planta Med*. 75:459–465.
- Legrand JJ, Fisch C, Guillaumat PO, Pavard JM, Attia M, De Jouffrey S, Claude JR. 2003. Use of biochemical markers to monitor changes in bone turnover in cynomolgus monkeys. *Biomarkers*. 8:63–77.
- Lissin LW, Cooke JP. 2000. Phytoestrogen and cardiovascular health. *J Am Coll Cardio*. 35: 1403–1410.

- Lumachi F, Ermani M, Camozzi V, Tombolan V, Luisetto G. 2009. Changes of Bone formation markers osteoclastin and Bone-specific alkaline phosphatase in Postmenopausal women with osteoporosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1173:E60–63.
- Malaivijitnond S, Chansri K, Kijkuokool P, Urasopon N, Cherdshewasard W. 2006. Using vaginal cytology to assess the estrogenic activity of phytoestrogen – rich herb. *J Ethnopharmacol.* 107: 354–360.
- Malaivijitnond S, Patthama K, Cherdshewasart W, Watanabe G, Kazuyoshi T. 2004. Different effects of *Pueraria mirifica*, a herb containing phytoestrogens, on LH and FSH secretion in gonadectomized female and male rats. *J Pharmacol Sci.* 96: 428–435.
- Manosroi A, Saowakon S, Manosroi J. 2004. Preliminary chronic toxicity study of herbal formulations containing red Kwao Krua (*Butea superba* Roxb.) or white Khao Krua (*Pueraria mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu) in Wistar rats. *SWU J Pharm Sci.* 9: 1–12. (in Thai)
- Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. 1998. Phytoestrogens. *J Clin Endocr Met.* 83: 297 – 303.
- Nakamura H. 2007. Morphology, function and differentiation of bone cells. *J Hard Tiss Biol.* 16: 15–22.
- Ohta H, Makita K, Komukai S, Nozawa S. 2002. Bone resorption versus estrogen loss following oophrectomy and menopause. *Maturitas.* 43: 27–33.
- Papapoulos S. 2008. Bisphosphonates: how do they work. *Best Practice & Research.* 22: 831–847.
- Recker R, Lappe J, Davies KM, Heaney R. 2004. Bone remodeling increases substantially in the years after menopause and remains increased in older osteoporosis patients. *J Bone Miner Res.* 19:1628–1633.
- Riggs BL, Khosla S, Melton J. 2002. Sex steroid and the construction and conservation of adult skeleton. *Endocr Rev.* 23:279–302.
- Riggs BL. 1982. Changes in bone mineral density of proximal femur and spine with aging: Differences between the postmenopausal and senile osteoporosis syndrome. *J Clin Invest.* 70:716–733.
- Ruimerman R. 2005. Modeling and remodeling in bone tissue. University Press Facilities, Eindhoven.
- Seifert-Klauss V, Fillenberg S, Schneider H, Lappa P, Mueller D, Kiechle M. 2012. Bone loss in premenopausal, perimenopausal and postmenopausal women: results of a prospective observational study over 9 years. *Climacteric.* 15:433–440.
- Shimokawa S, Kumamoto T, Ishikawa T, Takashi M, Higuchi Y, Chaichantipyuth C, Chansakaow S. 2013. Quantitative analysis of miroestrol and kwakhurin for standardization of Thai miracle herb “Kwao Keur” (*Pueraria mirifica*) and establishment of simple isolation procedure for highly estrogenic miroestrol and deoxymiroestrol. *Nat Prod Res.* 27:371–378.

- Smith EP, Boyd J, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubahn DB, Korach KS. 1994. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med.* 331:1056–1061.
- Smith MR. 2006. Treatment-related osteoporosis in men with prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 12:6315s–6319s.
- Sugimoto E, Yamaguchi M. 2000. Stimulating effect of daidzein in osteoblast MC3T3 – E1 cells. *Biochem Pharm.* 59: 471–475.
- Sulak PJ. 1997. Endometrial cancer and hormone replacement therapy: Appropriate use of progestin to oppose endogenous and exogenous. *Endoc Met Clin North America.* 26:399–412.
- Susanto L. 2011. Serum osteocalcin and bone mineral density in postmenopausal women. *Universa Medicina.* 3:155–161.
- Tiyasatkulkovit W, Charoenphandhu N, Wongdee K, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Malaivijitnond S. 2012. Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica*. *Phytomedicine.* 19:1147–1155.
- Tongerson D, Bell S. 2001. Hormone replacement therapy reduces the risk of nonvertebral fracture in postmenopausal woman. *JAMA.* 285:2891–2891.
- Trisomboon H, Malaivijitnond S, Suzuki J, Hamada Y, Watanabe G, Taya K. 2004. Long-term treatment effects of *Pueraria mirifica* phytoestrogens on parathyroid hormone and calcium levels in aged menopausal cynomolgus monkeys. *J Reprod Dev.* 50:639–645.
- Urasopon N, Hamada Y, Asaoka K., Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2007. *Pueraria mirifica*, a phytoestrogen-rich herb, prevent bone loss in orchidectonized rats. *Maturitas.* 56:322–331.
- Urasopon N, Hamada Y, Cherdshewasart W, Malaivijitnond S. 2008. Preventive effects of *Pueraria mirifica* on bone loss in ovariectomized rats. *Maturitas.* 59:137-148.
- Weitzmann NM, Pacifici R. 2006. Estrogen deficiency and bone loss an inflammatory tale. *J Clin Invest.* 116:1186–1194.
- Wisutitthiwong C, Buranaruk C, Pudhom K, Palaga T. 2011. The plant limonoid 7-oxo-deacetoxygedunin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by suppressing activation of the NF- κ B and MAPK pathways. *Biochem Biophys Res Commun.* 415:361–366.
- Wong R, Rabie B. 2007. Effect of puerarin on bone formation. *Osteoarthritis Cartilage.* 15:894–899.
- Xu ZR, Wang AH, Wu XP, Zhang H, Sheng ZF, Wu XY, Xie H, Luo XH, Liao EY. 2009. Relationship of age-related concentrations of serum FSH and LH with bone mineral density, prevalence of osteoporosis in native Chinese women. *Clin Chim Acta.* 400:8–13.

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ ศาสตราจารย์ ดร.สุจินดา มาลัยจิตรนนท์

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3309901338672

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0 2218 5275 โทรสาร 0 2218 5275

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

ผู้ร่วมงานวิจัย

ชื่อ ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ดร.นรัตถพล เจริญพันธุ์

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3100900121134

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400

โทรศัพท์ 0 2201 5505 โทรสาร 0 2354 7154

E-mail: naratt@narattsys.com

ชื่อ อาจารย์ ดร.สุกัญญา เจริญพร

หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน 3240500104754

สถานที่ติดต่อ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 0 2218 5275 โทรสาร 0 2218 5275

E-mail: sjaroenporn@yahoo.com

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ชื่อ Dr. I. Sandford Schwartz, Chief Executive Officer

สถานที่ติดต่อ Smith Naturals Co. Ltd., 90 Fifty fifth Plaza ถนนสุขุมวิท 55 กรุงเทพฯ 10110

โทรศัพท์ 0 2714 9358-60 โทรสาร 0 27149362

E-mail: ceo@smithnat.com



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แบบรายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยย่อย

ชื่อโครงการวิจัย (ย่อย) ที่ 4

(ภาษาไทย) การพัฒนาต้นแบบจากสมุนไพรในการป้องกันโรคกระดูกพรุนในผู้สูงอายุ: อนุภาคไมโคร/นาโนพอลิเมอร์ชีวภาพยึดเกาะเยื่อเมือกสำหรับนำส่งสารออกฤทธิ์จากสมุนไพรเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการรักษา

(ภาษาอังกฤษ) Development of prototype drug from herb for the prevention of Osteoporosis and in Aging Person: Mucoadhesive Biopolymer micro/nanoparticles for Delivery of Anti-osteoclastogenic agents

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2557 จำนวนเงิน 424,000.00 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 15 เดือน เริ่มทำการวิจัยเมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 ถึง 25 มีนาคม พ.ศ. 2558

รายงานความก้าวหน้าของการวิจัย ครั้งที่ 1 ระยะเวลา 26 พฤศจิกายน พ.ศ. 2556 ถึง 7 มีนาคม พ.ศ. 2557

รายนามคณะผู้วิจัย พร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัดและหมายเลขโทรศัพท์

1. หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวนิช

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-7596

2. หัวหน้าโครงการวิจัยย่อยที่ 4

2.1 รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมืองสิน

หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-218-7596

3. ผู้ร่วมงานวิจัย

3.1 ดร. กฤษณา ศิริเลิศมุกุล

หน่วยงานที่สังกัด สถาบันวิจัยโลหะและวัสดุ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวง
วังใหม่ เขตปทุมวัน กทม

โทรศัพท์ 02-2184218

หัวข้อรายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย ดังนี้

1. หลักการเหตุผลและสาเหตุที่ต้องดำเนินการวิจัย

โดยทั่วไป ผู้สูงอายุจะมีความสามารถในการดูดซึมสารอาหารได้น้อยเนื่องจากการเสื่อมการทำงานของระบบทางเดินอาหาร [1] ทำให้เมื่อได้รับสารอาหารหรือตัวยาในปริมาณที่คิดว่าเพียงพอแก่ความต้องการของร่างกาย แต่อาจได้รับประโยชน์เหล่านั้นได้ไม่เต็มเพียงพอ เนื่องจากสารอาหารหรือยาจะถูกดูดซึมในลำไส้ได้น้อย ดังนั้น อาจทำให้ผู้สูงอายุมีภาวะโรคต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบสมอง เช่น อัลไซเมอร์ หรือ โรคกระดูกพรุน โรคกระดูกพรุน (Osteoporosis) เป็นโรคหนึ่งที่เกิดจากความผิดปกติของการสร้างและซ่อมแซมกระดูก

โรคกระดูกพรุนในกลุ่มผู้สูงอายุจัดว่าเป็นปัญหาสาธารณสุขและปัญหาเศรษฐศาสตร์ที่ได้รับความสำคัญโรคหนึ่ง เนื่องจากการรักษาผู้ป่วยสูงอายุที่เป็นโรคเนื่องจากกระดูกพรุนจะเสียค่าใช้จ่ายสูงกว่า ระยะเวลาในการรักษานานขึ้น และต้องการผู้ดูแลอย่างใกล้ชิด การเฝ้าระวังหรือการป้องกันไม่ให้เป็นโรคกระดูกพรุนในกลุ่มผู้สูงอายุจึงเป็นสิ่งสำคัญ

ปัจจุบันแม้ว่าจะมีอาหารเสริมต้านกระดูกพรุน วิตามินและเกลือแร่ ยาบำบัดอาการโรคกระดูกพรุนก็ตาม แต่สารออกฤทธิ์ดังกล่าวอาจไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอที่จะเฝ้าระวังหรือรักษาผู้ป่วยสูงอายุได้ เนื่องจากความสามารถในการดูดซึมตัวยาในลำไส้ได้น้อยเพราะระบบการดูดซึมในลำไส้ของผู้สูงอายุเริ่มเสื่อมเมื่อเวลาผ่านไป ประกอบกับระยะเวลาที่สารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนจะอยู่ในลำไส้ได้น้อยเกินไป และสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนอาจสลายตัวเมื่อผ่านกระเพาะอาหารทำให้ปริมาณชีวภาพสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนลดน้อยลงกว่าปริมาณที่มีประสิทธิภาพในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุน ดังนั้น จึงมีรายงานว่าทำให้ไฟเพอรินหรือของผสมที่มีไฟเพอรินเป็นส่วนประกอบพร้อมกับยาและผลิตภัณฑ์เสริมอาหารอื่นๆ สามารถเพิ่มชีวปริมาณพร้อมใช้ในกระแสเลือดได้ เพิ่มระดับสารในเลือด และเพิ่มประสิทธิภาพของยาและสารอาหาร

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการดูดซึมสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนในระบบทางเดินอาหารของผู้สูงอายุเพื่อป้องกันและรักษาอาการกระดูกพรุนดังกล่าว โดยทำการกักเก็บสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนไว้ในอนุภาคไมโคร/นาโนพอลิเมอร์ชีวภาพเพื่อปกป้องสารออกฤทธิ์ต้านกระดูก

พรุณไม่ให้สลายตัวในกระเพาะอาหารเนื่องจากพอลิเมอร์ชีวภาพดังกล่าวจะคงสภาพในสภาวะกรดของกระเพาะอาหาร และสามารถบวมตัวได้ดีที่ภาวะลำไส้เล็กซึ่งเป็นตำแหน่งการดูดซึมสารออกฤทธิ์ทั่วไป

ดังนั้นเมื่ออนุภาคกักเก็บสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณเข้าสู่ลำไส้เล็กจะเริ่มบวมตัวและสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณจะค่อยๆ ถูกปลดปล่อยด้วยอัตราเร็วตามที่ต้องการออกมาจากอนุภาคดังกล่าว เพื่อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด นอกจากนี้ เพื่อเพิ่มระยะเวลาของอนุภาคกักเก็บสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณในลำไส้เล็กให้ยาวนานขึ้น และเพิ่มการดูดซึม พอลิเมอร์ที่มีสมบัติยึดเกาะเยื่อเมือกได้ดีที่ลำไส้เล็กจะถูกพัฒนาขึ้นและนำมาประยุกต์ใช้เพื่อให้ยาอยู่ในลำไส้ได้นานยิ่งขึ้น

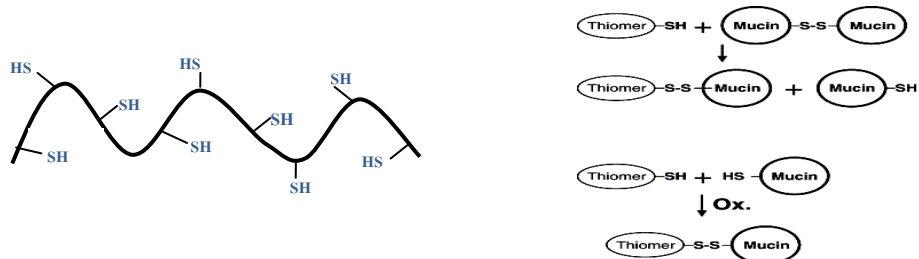
2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาอนุภาคไมโคร/นาโนพอลิเมอร์ชีวภาพที่มีสมบัติเกาะติดเยื่อเมือกสำหรับกักเก็บและนำส่งสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณไปยังตำแหน่งเป้าหมายแบบควบคุมอัตราการปลดปล่อย

2.2 เพื่อศึกษากลไกการเสริมฤทธิ์ระหว่างสารสกัดไพเพอรินและสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณอื่นๆ เพื่อป้องกันหรือรักษาโรคกระดูกพรุณ

3. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

พอลิเมอร์ในระบบนำส่งยาแบบยึดติดเยื่อเมือก ซึ่งปัจจุบันไทโอเลเทตพอลิเมอร์ หรือ ไทโอเมอร์ เป็นกลุ่มของพอลิเมอร์ยึดเกาะเยื่อเมือกที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีหมู่ไทออล (-SH) ในสายโซ่ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยาเป็นพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) กับมีวคัสไกลโคโปรตีนเป็นชั้นเจลมีวคัสได้ ทำให้ระบบนำส่งยายึดติดเนื้อเยื่อได้นานขึ้น ช่วยเพิ่มความเข้มข้นยาเฉพาะที่ หรือเพิ่มการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด อีกทั้งยังช่วยควบคุมการปลดปล่อยให้เกิดช้า ๆ และคงที่ในปริมาณที่ต้องการ โดยไม่ทำให้ยาเกิดการปลดปล่อยหรือตัวยาถูกทำลายไปก่อน สำหรับพอลิเมอร์ที่เลือกใช้ในระบบนำส่งยา ได้แก่ ไคโทซาน อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่จะเลือกตัดแปรไคโทซานด้วยอนุพันธ์ไทออลเพื่อใช้ให้นำส่งยาที่มีสมบัติเป็นไฮโดรฟิลิก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะพัฒนาไคโทซานให้มีความเหมาะสมกับสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุณซึ่งมีสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก โดยเลือกตัวตัดแปรไคโทซาน คือ 5-amino-2-mercaptobenzimidazole ซึ่งจัดเป็นสารกลุ่มแอริลไทออล ที่มีวงอะโรมาติก [1] เป็นองค์ประกอบส่งผลให้ไทโอเลเทตไคโทซานมีความไม่ชอบน้ำ อีกทั้งการมีหมู่ไทออล [2] จะเพิ่มความสามารถในการยึดติดเยื่อเมือกให้นานขึ้น จากสมบัติทั้งสองประการจะทำให้แก้ปัญหาข้างต้นของตัวยาดังกล่าวได้

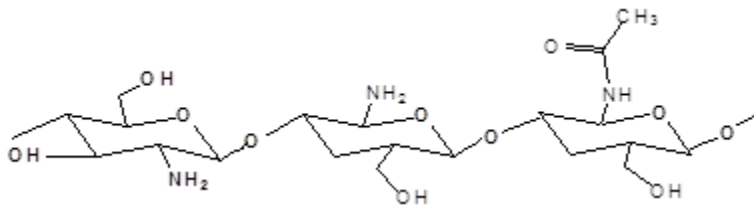


รูปที่ 1 (i) ไทโอเลเทตพอลิเมอร์ หรือ ไทโอเมอร์ (ii) การเกิดพันธะไคซัลไฟด์ระหว่างไทโอเมอร์กับมิวซิน [2]

ในปี ค.ศ. 2010 Zhang และคณะ [9] เตรียมอนุภาคไมโครเมตร-นาโนเมตรของไคโทซานด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสเปรย์ซึ่งพบว่า จากสภาวะที่เหมาะสมทำให้ได้อนุภาคของไคโทซานขนาด 124 นาโนเมตร และประยุกต์ใช้กับระบบนำส่งยาโดยวิธีการกิน ต่อมาในปี ค.ศ. 2011 Adam และคณะ [10] เตรียมอนุภาคไมโครเมตร-นาโนเมตรของ poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) ซึ่งบรรจุยาเซเลโคซิบอยู่ภายใน ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสเปรย์ พบว่า อนุภาคโดยส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 1-5 ไมโครเมตร ซึ่งยาจะมีความเป็นอสัณฐาน จึงทำให้ยามีความสามารถในการละลายน้ำได้มากขึ้นรวมถึงปรับปรุงชีวปริมาณพร้อมใช้ของยาเซเลโคซิบ และการปลดปล่อยของตัวยาก็ดีขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 10 วัน

จากงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้นนั้น พบว่าอนุภาคระดับไมโครเมตร-นาโนเมตร จะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายน้ำและชีวปริมาณพร้อมใช้ของยาได้ และพอลิเมอร์จะช่วยกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยยา

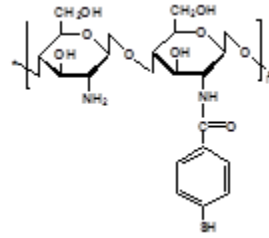
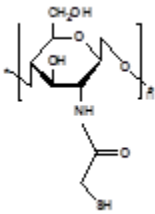
ไคโทซาน (รูปที่ 3) เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ และมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อร่างกาย รวมทั้งยังมีสมบัติยึดติดเยื่อเมือก โดยไคโทซานจะเกิดพันธะกับมิวซินในเนื้อเยื่อ ผ่านการบวมตัวคล้ายเจลในน้ำ ที่ซึ่งสายโซ่ของไคโทซานจะคลายตัวออกและพันเข้ากับสายโซ่ที่อยู่ในเยื่อเมือกบริเวณเนื้อเยื่อ [2] จากสมบัติดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาเพิ่มสมบัติเกาะติดเยื่อเมือกของไคโทซานดังต่อไปนี้



รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของไคโทซาน

ในปี ค.ศ. 2001 Kast และคณะ [11] ปรับปรุงสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของ chitosan-thioglycolic acid (TGA) (รูปที่ 4 (i)) พบว่าช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการยึดติดเยื่อเมือกได้ดีกว่าไคโทซาน 10 เท่า ต่อมาในปี ค.ศ. 2010 Millotti และ คณะ [1] ได้ปรับปรุงสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของ chitosan-4-mercaptobenzoic acid (รูปที่ 4 (ii)) โดยใช้แอร์ลิทออล พบว่า สมบัติการยึดติดเยื่อเมือกดีกว่าไคโทซาน 60 เท่า กล่าวคือ ช่วง pka ของแอร์ลิทออล อยู่ในช่วงของ pH ของระบบลำไส้ ประกอบกับโครงสร้างของ 4-mercaptobenzoic acid ส่งผลให้พอลิเมอร์มีความเป็นไฮโดรโฟบิกและการยึดติดกับ

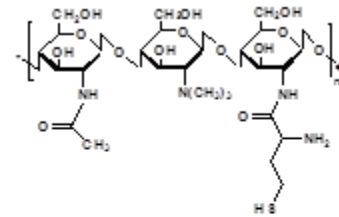
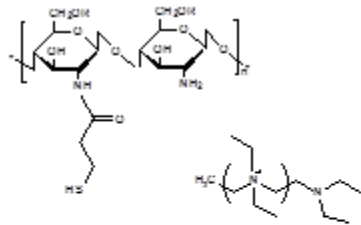
โมเลกุลมีวชิเพิ่มขึ้น ซึ่งทั้ง chitosan-thioglycolic acid (TGA) และ chitosan-4-mercaptobenzoic acid ยังคงสมบัติการบวมตัวและการสลายทางชีวภาพได้ดี



รูปที่ 4(i) โครงสร้างทางเคมีของ chitosan-thioglycolic acid

(ii) โครงสร้างทางเคมีของ chitosan-4-mercaptobenzoic acid [1]

ในปี ค.ศ. 2009 Zambito และคณะ [12] สังเคราะห์ไทโอเลเทดควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโทซาน (N+-Ch-SH) เพื่อเพิ่มการซึมผ่านของยาในลำไส้ โดยการคอนจูเกตซิงมิทิวส์ไพริดีนส์ไคโทโพรพิโนเอตลงบนควอเทอร์นารีแอมโมเนียมไคโทซาน (N+-Ch) ซึ่งเมื่อถูกรีดิวซ์โมเลกุลดังกล่าว จะเกิดการเปลี่ยนรูปเป็น N+-Ch-SH (รูปที่ 5(i)) มีปริมาณหมู่ไทออล 4.5 และ 5.2% ตามลำดับ ซึ่งการมีอยู่ของหมู่ไทออลทำให้การนำส่งและการดูดซึมยาในลำไส้เพิ่มขึ้น



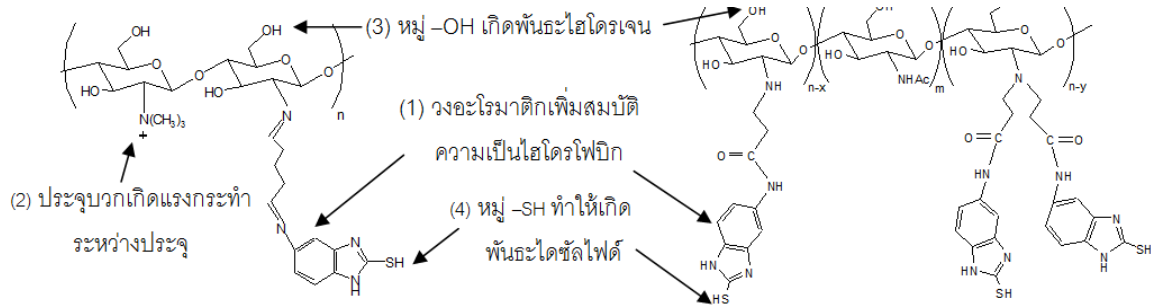
รูปที่ 5(i) โครงสร้างทางเคมีของ N⁺-Ch-SH conjugates [8]

(ii) โครงสร้างทางเคมีของ Trimethylhomocysteinethiolactone chitosan (TM-HT-CS) [9]

ในปี ค.ศ. 2012 Juntapram และคณะ [13] ดัดแปรไคโทซานเพื่อเพิ่มสมบัติยึดติดเยื่อเมือกในระบบนำส่งยาผ่านการคอนจูเกตไฮโมซิสเตอิน-ไทโอแลกโตน (HT) ลงบน ไคโทซาน (CS) และไตรเมทิลไคโทซาน (TM-CS) ที่อัตราส่วน CS และ TM-CS ต่อ HT 1:0.1 %w/w พบว่า ไฮโมซิสเตอิน-ไทโอแลกโตนไคโทซาน (HT-CS) และไตรเมทิลไฮโมซิสเตอิน-ไทโอแลกโตนไคโทซาน (TM-HT-CS) (รูปที่ 5 (ii)) มีปริมาณของหมู่ไทออล 64.15 และ 32.48 มิลลิโมลต่อกรัม ตามลำดับ และความสามารถในการยึดติดเยื่อเมือกของพอลิเมอร์ดังกล่าว ที่ pH 1.2 เพิ่มขึ้น 3.67 และ 6.33 เท่าเมื่อเทียบกับไคโทซานที่ไม่ผ่านการดัดแปร

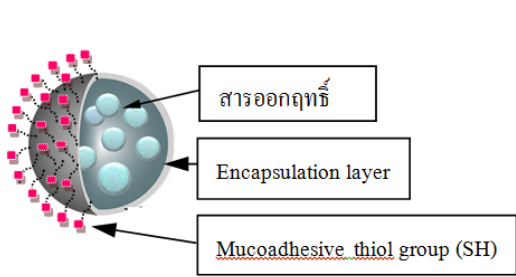
ในปี ค.ศ. 1998 Genta และคณะ [14] เตรียมอนุภาคไคโทซานเพื่อเป็นระบบนำส่งยาอีโอฟิลินโดยใช้กลูตารัลดีไฮด์เป็นสารเชื่อมขวางด้วยเทคนิคอิมัลชัน และศึกษาผลความเข้มข้นของกลูตารัลดีไฮด์ที่มีต่อสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของอนุภาคไคโทซาน พบว่าที่ความเข้มข้นน้อยสุด คือ 5% v/v ของกลูตารัลดีไฮด์ยังคงสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของไคโทซานได้ดี

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะดัดแปรไคโทซานให้มีสมบัติไม่ชอบน้ำเพื่อนำส่งยาชีวavasแตตินโดยการติด 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (MBI) เข้ากับไคโทซาน (CS) และไทรเมทิลไคโทซาน (TM-CS) (รูปที่ 8) โดยใช้กลูตารัลดีไฮด์ หรือเมทิลอะคริเลต เป็นสารเชื่อม เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีโครงสร้าง ดังรูปที่ 6 ซึ่งประกอบด้วย 1) วงอะโรมาติกของหมู่ MBI จะเพิ่มสมบัติความไม่ชอบน้ำของพอลิเมอร์ 2) หมู่ไทรเมทิลไคโทซานซึ่งเป็นพอลิเมอร์ประจุบวกสามารถเกิดแรงกระทำระหว่างประจุ กับหมู่ซิวเอิลิก และ ซัลเฟต ซึ่งเป็นประจุลบของมิวคัสไกลโคโปรตีน [11,12] 3) หมู่ -OH เกิดพันธะไฮโดรเจนกับมิวคัสไกลโคโปรตีน 4) หมู่ -SH ทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์กับซีสเทอีนของมิวคัสไกลโคโปรตีน

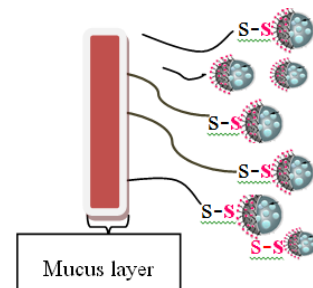


รูปที่ 6 โครงสร้างที่มีผลในการยึดติดเยื่อเมือก

สำหรับขั้นตอนการเตรียมอนุภาคไมโครเมตร-นาโนเมตร ของ MBI-CS และ TM-MBI-CS เพื่อกักเก็บและควบคุมการปลดปล่อยชีวavasแตตินนั้น งานวิจัยนี้เลือกเทคนิคอิลีกโตรสเปรย์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายสะดวก ซึ่งเทคนิคนี้สามารถผลิตอนุภาคขนาดเล็ก (รูปที่ 7(i)) และการกระจายตัวของอนุภาคแคบ อีกทั้งยังเป็นเทคนิคใหม่สำหรับยาดังกล่าว โดยอนุภาคไมโครเมตร-นาโนเมตร ของ MBI-CS และ TM-MBI-CS จะแสดงการเกิดปฏิกิริยา เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) กับมิวคัสไกลโคโปรตีนเป็นชั้นเจลมิวคัส (รูปที่ 7(ii))



รูปที่ 7 (i) อนุภาคระดับไมโคร-นาโนเมตรที่บรรจุชีวavasแตติน



(ii) การเกิดปฏิกิริยาของ CS-MBI เป็นพันธะไดซัลไฟด์ (S-S) กับมิวคัสไกลโคโปรตีนเป็นชั้นเจลมิวคัส

4. ระเบียบวิธีวิจัย

สรุปขอบเขตงานวิจัยในระยะเวลา 12 เดือน ได้ดังนี้

เมื่อจัดเตรียมพอลิเมอร์สำหรับนำส่งสารออกฤทธิ์ให้มีสมบัติตามที่ต้องการแล้วจากนั้นจึงเป็นขั้นตอนการประยุกต์ทางเภสัชกรรม ซึ่งจะดำเนินการดังต่อไปนี้

4.1) เตรียมอนุภาค CS และ TM-CS ที่ตัดแปรด้วย MBI ซึ่งบรรจุซิมวาสแตตินซึ่งเป็นสารต้นแบบ ด้วยเทคนิคอิเล็กโทรสเปรย์

4.2) พิสูจน์เอกลักษณ์, หาปริมาณกลุ่มไทอลและโดซัลไฟด์ โดยวิธีของ Ellman และศึกษาสมบัติการยึดติดเยื่อเมือกของอนุภาค

4.3) วิเคราะห์สัณฐานวิทยาและขนาดของอนุภาคโดยที่บรรจุซิมวาสแตตินโดยใช้ SEM และ particle sizer

4.4) วิเคราะห์หาประสิทธิภาพในการกักเก็บยา (% encapsulation) ด้วยเทคนิค HPLC [17]

4.5) ศึกษาการปลดปล่อยซิมวาสแตติน จากอนุภาค ณ สภาวะเลียนแบบระบบทางเดินอาหารในร่างกาย ที่อุณหภูมิ 37 ± 2 °C

4.6 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผลการทดลอง และเขียนผลงานเพื่อเผยแพร่ผลงานวิจัยดังกล่าว

5. ผลการวิจัยและการวิเคราะห์ผลการวิจัย

เพื่อให้ผลการวิจัยครบถ้วนจึงขอแนบเอกสารแนบการตีพิมพ์เผยแพร่ผลงานดังต่อไปนี้

Kongsong M, Songsurang K, Sangvanich P, Siralermukul K, Muangsin N. Design, synthesis, fabrication and in vitro evaluation of mucoadhesive 5-amino-2-mercaptobenzimidazole chitosan as low water soluble drug carriers. Eur J Pharm Biopharm. 2014 Nov;88(3):986-997. doi: 10.1016/j.ejpb.2014.08.016.

6. ผลผลิต (Output) หรือตัวชี้วัดในแต่ละช่วงรายงานความก้าวหน้า

สามารถสังเคราะห์อนุพันธ์โคโตซานได้และพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อนำไปขึ้นรูปและกักเก็บยา

7. ตารางเปรียบเทียบผลการดำเนินการกับแผนการดำเนินการที่ตั้งไว้

กิจกรรม	เดือน												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	

1. ค้นหาข้อมูล	√ ●											
2. เตรียมพอลิเมอร์ MA-CS และพินิจเอกลักษณะและสมบัติต่างๆ	√ ●											
3. เตรียมพอลิเมอร์ MBI-CS และ TM-MBI-CS และพินิจเอกลักษณะและสมบัติต่างๆ			√ ●	√ ●								
4. ขึ้นรูปพอลิเมอร์ที่สังเคราะห์ได้เพื่อเก็บสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุน พร้อมศึกษาประสิทธิภาพการกักเก็บการปลดปล่อยสารออกฤทธิ์ต้านกระดูกพรุนในระบบทางเดินอาหาร			√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●			
5. ศึกษาประสิทธิภาพในการใช้ยา ร่วมกัน								√ ●	√ ●	√ ●	√ ●	√ ●

● หมายถึง กิจกรรมที่ได้ดำเนินการแล้วเสร็จ √ หมายถึง กิจกรรมที่วางแผนดำเนินการ

8. งบประมาณที่ได้ใช้จ่ายไปแล้วนับตั้งแต่เริ่มโครงการ

รายการ	งวดที่ 1	งวดที่ 2	รวมเงิน
1. งบบุคคลากร			
1.1 ผู้ช่วยนักวิจัยทำงานเต็มเวลา - ค่าจ้างชั่วคราว ปริญญาเอก จำนวน 1 คน 2 เดือน (1 x 2 x 12,600 = 25,200 บาท)	25,200	79,000	104,000

2. งบดำเนินงาน			
2.1 ค่าตอบแทน			
2.1.1 ค่าตอบแทนคณะวิจัย	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก
2.2.ค่าใช้สอย	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก
2.3 ค่าวัสดุ			
1) ค่าวัสดุวิทยาศาสตร์	48,151	104,378	152,529
2) วัสดุสำนักงาน	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก	ยังไม่เบิก
รวมงบประมาณ	73,351	183,378	256,729

9. งานตามโครงการที่จะทำต่อไป เปลี่ยนจากยาซึมวาสเตตินซึ่งเป็นยาต้นแบบ เป็นพูลารินซึ่งเป็นสารสกัดจากกราวเครือ

10. คำชี้แจงเกี่ยวกับอุปสรรคหรือปัญหา

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. นงนุช เหมือนสิน)

หัวหน้าโครงการย่อยที่ 4

10 มกราคม 2558



Research paper

Design, synthesis, fabrication and in vitro evaluation of mucoadhesive 5-amino-2-mercaptobenzimidazole chitosan as low water soluble drug carriers



Mullika Kongsong^a, Kultida Songsurang^a, Polkit Sangvanich^b, Krisana Siralermukul^c, Nongnuj Muangsin^{d,*}

^a Program of Petrochemistry and Polymer Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^b Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^c The Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

^d Biomaterials and Bioorganic Chemistry Research Group, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 May 2014

Accepted in revised form 26 August 2014

Available online 16 September 2014

Keywords:

Low water soluble drug
Drug carrier
Mucoadhesive chitosan
Thiolated chitosan
Electrospray
Microspheres

ABSTRACT

Mucoadhesive thiolated chitosan suitable as a carrier for low water soluble drugs was designed and synthesized by conjugating 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (MBI) using methylacrylate (MA) as the linking agent. A 14.4% degree of substitution of MA, as determined by ¹H NMR analysis, and 11.86 ± 0.01 μmol thiol groups/g of polymer, as determined by Ellman's method, was obtained. The MBI-MA-chitosan had an 11-fold stronger mucoadhesive property compared to unmodified chitosan at pH 1.2, as determined by the periodic acid: Schiff colorimetric method. Chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan were fabricated as well-formed microspheres using electrospray ionization, including an entrapment efficiency of simvastatin (SV) of over 80% for the MBI-MA-chitosan. The mucoadhesiveness of the SV-loaded MBI-MA-CS microspheres was still higher than that for SV-loaded chitosan at pH 1.2 and 6.4. The SV-loaded MBI-MA-CS microspheres revealed a reduced burst effect and an increased release rate (more than fivefold higher than pure SV) of SV over 12 h.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Over the past few years, mucoadhesive polymers have received attention as excipients for various drug delivery systems, especially for oral system due to their possibility to localize the drug at the target site, a prolonged residence time and sustained drug release at the target site [1]. Drugs that are absorbed through the mucosal lining of tissues can enter directly into the blood stream via an increased drug concentration gradient in the mucosa, and as a result the bio-availability of the drug is improved over those that cannot or do so less efficiently [2,3]. Due to these advantages, many attempts have been made to improve the mucoadhesive properties of polymeric carriers.

Abbreviations: MBI, 5-amino-2-mercaptobenzimidazole; MA, methylacrylate; SV, simvastatin; TM-HT, N,N-trimethylchitosan-homocysteine thiolactone; EI, electrospray ionization; MBI-MA-chitosan, thiolated chitosan; PAS, periodic acid Schiff.

* Corresponding author. Biomaterials and Bioorganic Chemistry Research Group, Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. Tel./fax: +66 2 2187635.

E-mail address: nongnuj.ms@gmail.com (N. Muangsin).

Chitosan (poly[β -(1-4)-2-amino-2-deoxy-d-glucopyranose]) is a partially deacetylated derivative of chitin, a polysaccharide consisting of the copolymers of glucosamine (GluN) and N-acetylglucosamine (GluNAc). Chitosan has been widely used as a pharmaceutical excipient based on its non-toxic, high biocompatible, biodegradable and versatile chemical and physical properties [4,5]. Because of its beneficial properties, such as mucoadhesiveness, adsorption enhancement and antibacterial activity, chitosan is a promising candidate for the development of conventional and novel drug delivery systems. The presence of $-\text{NH}_2$ and $-\text{OH}$ groups, together with the cationic groups of chitosan are considered to be responsible for the binding to the mucosa layer via non-covalent bonds (hydrogen bonds and ionic interactions as well as the weaker van der Waal's interactions with the mucus layer) resulting in a good mucoadhesive property [6,7].

From the various modification strategies, the introduction of thiol groups on the polymeric backbone of chitosan (so called thiolated chitosan) has become of particular interest for biomaterial and biomedical applications. This is because of the enhanced mucoadhesive and enzyme-inhibitory traits of thiolated chitosan that results from the oxidation and disulfide exchange reaction

with cysteine rich sub-domains of mucus glycoproteins [8]. For example, chitosan–thioglycolic acid conjugates [9] exhibit up to a 10-fold higher mucoadhesiveness than that of unmodified chitosan and are used as a new scaffold material for tissue engineering [10]. Moreover, thiolated chitosan nanoparticles have been used to enhance the bioavailability of leuprolide following nasal administration [11], while N,N,N-trimethylchitosan-homocysteine thiolactone (TM-HT)-chitosan/alginate polyelectrolyte complex particles have been used for camptothecin delivery [12]. Thiomers show different properties according to their ionization (pK_a) value, charge, lipophilicity and hydrophilicity of the attached ligand. Additionally, the effectiveness of alkyl thiolated chitosan derivatives can be further improved by immobilizing aromatic mercaptan molecules, including chitosan-4-mercaptobenzoic acid [13] and chitosan-6-mercaptanicotinic acid, which exhibit an aryl entity as these are supposed to show a higher reactivity at intestinal pH values and are associated with improved mucoadhesiveness.

However, the thiolated polymers that have been developed to date are not compatible or suitable as carriers for hydrophobic drugs. The poor interaction of these thiolated polymers with hydrophobic drug molecules often results in a faster, less sustained drug release, low percent encapsulation which affects their potential applications in pharmaceutical fields [14].

Simvastatin (SV) is practically insoluble in water (maximum solubility of $\sim 30 \mu\text{g/mL}$) [15] and so is poorly absorbed from the gastrointestinal (GI) tract with, for example, an absorption of less than 5% after a 40 mg oral dose [16]. Therefore, there are requirements to improve the release profile to be faster or give a higher rate than pure simvastatin in order to enhance the absorption at the gastrointestinal and lower loss of drug during administration.

On the other hand, nano/microparticles based on multifunctional polymers exhibit a variety of beneficial features for the enhanced uptake of orally administered drugs. Nanoparticulate drug delivery systems can protect the embedded drug from enzymatic degradation and exhibit mucoadhesive, permeation enhancing and controlled release properties [3]. Various methods for the preparation of composite micro- or nano-particles have been reported [17]. One technique for the preparation of particles is electrospray ionization (EI), where the liquid (polymer solution) is atomized by means of electrical forces. The polymer flows out of the nozzle in the form of a droplet when a high voltage is applied [18,19].

The aim of this work was to design and synthesize a mucoadhesive thiolated chitosan suitable as a carrier for the delivery of hydrophobic drugs with high %encapsulation and give higher release rate than pure simvastatin. This was achieved by modification of chitosan with 5-amino-2-mercaptobenzimidazole (MBI) using methylacrylate (MA) as a linker agent. The thiolated chitosan based microparticles were prepared by EI including with the encapsulation of SV as a model hydrophobic drug.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Chitosan with an 85% degree of deacetylation (M_w of 500 kDa) was provided by Seafresh Co. Ltd. (Thailand). MBI, MA, mucin (type II) from porcine, basic fuchsin (pararosaniline), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDAC), sodium metabisulphite, periodic acid, 5,5'-Dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB), sodium borohydride (NaBH_4), sodium tripolyphosphate (TPP) were purchased from Aldrich Co., USA. SV was obtained as a gift sample from Silom Medical Co., Ltd. (Thailand). Tween 20 was obtained from Sigma–Aldrich Co., USA. Dialysis tubing (molecular weight cut-off (M_wCO) 12–14 kDa) was obtained by Membrane Filtration

Products, Inc., USA. All other chemicals were commercially available and used as received.

2.2. Synthesis of thiolated chitosan (MBI-MA-chitosan)

The preparation of thiolated chitosan was performed via a two-step reaction (Scheme 1). The first step was the preparation of N-carboxyethyl chitosan methyl ester (MA-chitosan) from chitosan and MA by the Michael addition. To 1 g of chitosan dissolved in 100 mL of 1% (v/v) acetic acid was added 0.50 mL of MA and 40.0 mL of methanol. The mixture was stirred at 60 °C for 3 days and then concentrated under reduced pressure to remove the excess MA and MeOH. The remaining mixture was then precipitated with excess acetone and harvested by centrifugation (12,000 rpm for 2 min). The pellet was dialyzed (M_wCO 12–14 kDa) against 3 changes of 1 L of methanol over 1 day prior to being air dried to obtain the MA-chitosan as a pale-yellow powder at a yield of $\sim 90\%$.

The second step was the coupling of MBI onto the MA-chitosan. For this 0.1 g of MBI dissolved in 10 mL methanol was slowly added to 100 mL of MA-chitosan under stirring. EDAC as a coupling agent was added to the mixture and the mixture was stirred at 60 °C under nitrogen (N_2) atmosphere for 2 days. The reaction mixture was then precipitated with excess acetone and harvested by centrifugation (12,000 rpm for 2 min). The pellet was re-dissolved in water and dialyzed (M_wCO 12–14 kDa) against 3 changes of 1 L of methanol for 2 days in the dark prior to being lyophilized at $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ and 0.01 mbar. The dry product as white powder obtained at about 65% yield was stored at 4 °C before use.

2.3. Preparation of SV-loaded chitosan polymer microspheres

Chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan microspheres were prepared by EI. Briefly, a 1% (w/v) chitosan or the respective modified chitosan solution in 1% (v/v) aqueous acetic acid was prepared. SV was dissolved in minimal amount of EtOH and then 2 mL of Tween 80. The mixing of the SV/Tween 80 and chitosan was performed at a 1:1, 2:1 and 4:1% (w/w) final ratio of SV: polymer ratio.

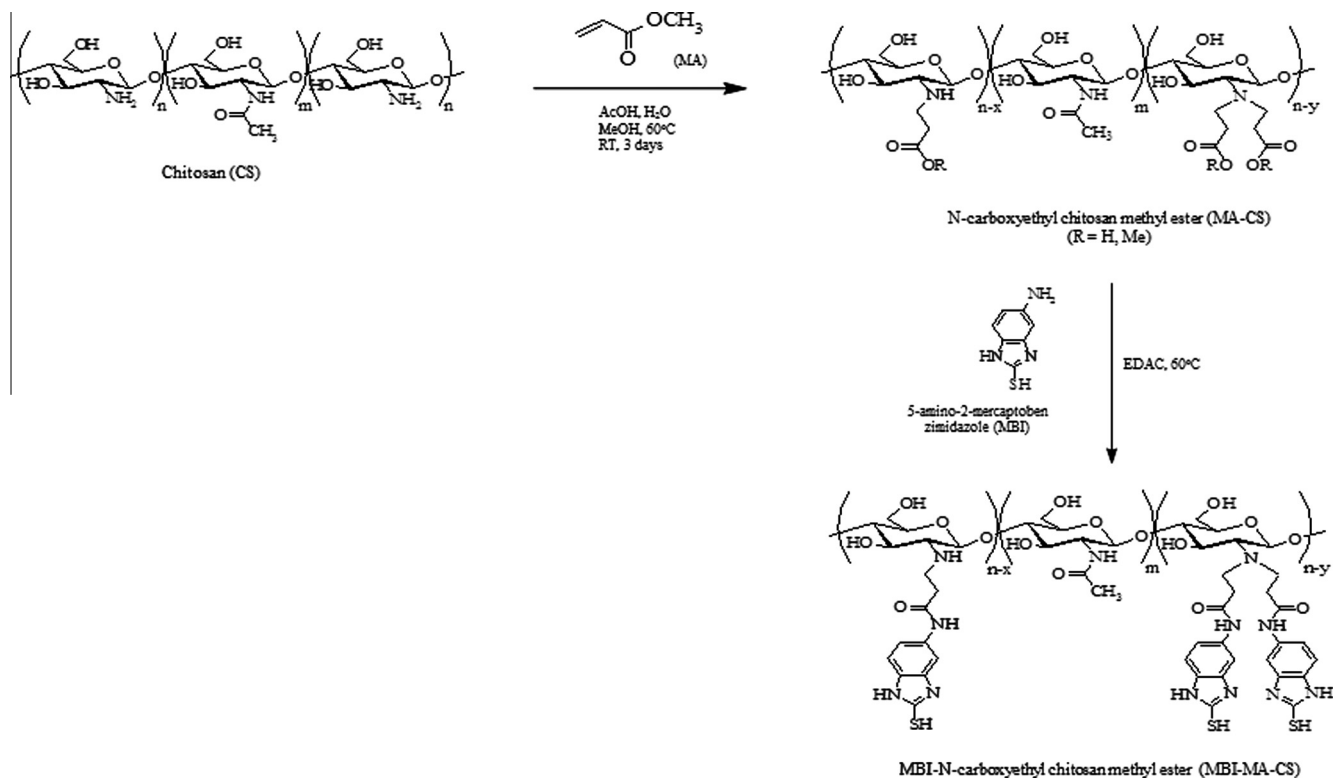
Then 5 mL of this chitosan/polymer solution was placed into a syringe pump and fed through silicone tubing and into the needle. Particles generated by application of a high potential difference electric field and the liquid jet was collected into a coagulant bath containing 40 mL of 5% (w/v) TPP solution, stirred at 300 rpm. The formed microspheres were then harvested as a pellet by centrifugation at 12,000 for 5 min, washed in deionized water three times and freeze dried. The chitosan and modified chitosan microspheres without SV loading were prepared in the same method as mentioned above except without the addition of the SV.

Preliminary studies to optimize the electrospray parameters with respect to the formed particle sizes and size distribution (polydispersity (PDI)), evaluated the solution flow rate fixed at 1 mL/h, applied voltage (10, 15 and 20 kV), size of the gauge needle (24–26 G), and the working distance between the needle tip and TPP coagulant solution (about 100 mL) as a sequential univariate analysis.

2.4. Characterization of chitosan and its derivatives

2.4.1. ^1H nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)

^1H NMR spectra were recorded on a Bruker NMR spectrometer operated at 400 MHz. $\text{D}_2\text{O}/\text{CF}_3\text{CO}_2\text{H}$ at 1% (v/v) was used to dissolve 5 mg of chitosan or the respective chitosan derivative (MA-chitosan and MBI-MA-chitosan). The degree of substitution (DS) of MA carboxylic and methyl ester groups ($[\text{COOH} + \text{COOMe}]$) were determined by ^1H NMR spectroscopy as previously described [20], using Eq. (1);



Scheme 1. Synthesis of the N-carboxyethyl chitosan methyl ester (MA-chitosan) and the MBI-carboxymethyl chitosan methyl ester (MBI-MA-chitosan).

$$DS [COOH + COOMe] (\%) = (250[H_2]) / ([H_3 - H_6]), \quad (1)$$

where $[H_2]$ is the integral of the chemical shift of the methylene proton at 2.32 ppm and $[H_3 - H_6]$ is the integral of the chemical shift between 3.6 and 4.2 ppm.

2.4.2. Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR)

The chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan were prepared as potassium bromide pellets. FT-IR spectra were performed by a Nicolet 6700 Fourier transform infrared spectrometer in the region from 4000 cm^{-1} to 400 cm^{-1} .

2.4.3. Determination of the thiol group and disulfide bond content

The DS of thiol groups in the modified polymers was determined spectrophotometrically using Ellman's method [21]. This reaction is now widely used for the assay of cholinesterase and the estimation of sulfhydryl groups in tissues [22]. Briefly, 0.5 mg of MBI-MA-chitosan and, as controls, chitosan and MA-chitosan, was added to 500 μL of 0.5 M phosphate buffer pH 8.0 and then 500 μL of Ellman's reagent (3 mg of DTNB dissolved in 10 mL of 0.5 M phosphate buffer pH 8.0) was added. The samples were incubated for 2 h at room temperature and the absorbance was measured at a wavelength of 450 nm. L-Cysteine hydrochloride standards (10–70 $\mu\text{mol/L}$) were used to calculate the amount of thiol moieties on MBI-MA-chitosan. The amount of disulfide bonds was quantified after reduction with NaBH_4 as described previously [23].

2.4.4. Thermogravimetric analysis (TGA)

The thermal stability of each of the samples was evaluated using thermogravimetric analysis (TGA) using a PerkinElmer Pyris Diamond TG/DTA machine under a N_2 flow at a rate of 30 mL/min. Approximately 5 mg of sample was placed in an alumina pan, sealed and heated from 25 to 500 °C at a ramp rate of 10 °C/min.

2.5. In vitro bioadhesion of mucin to chitosan and the modified chitosan

2.5.1. Mucus glycoprotein assay

The periodic acid schiff (PAS) colorimetric method is widely used for the analysis of mucins, glycoproteins and other polysaccharides in tissues and cells [24], and was utilized here for the detection of the free mucin concentration following on the adsorption of mucin onto the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan.

Standard calibration curves were prepared from mucin standard solutions (0.025–0.5 mg/mL) and 100 μL aliquots of the solution were transferred in triplicate into a 96-well microtiter plate and the absorbance at 555 nm was recorded.

2.5.2. Adsorption of mucin on chitosan and the modified chitosans

A 0.05% (w/v) mucin solution was prepared in three essentially isotonic buffers of different pH, namely simulated gastric fluid (SGF) (0.1 N HCl, pH 1.2), simulated cervical fluid (SCF) (0.1 M sodium acetate buffer, pH 4.0), and simulated intestinal fluid (SIF) (0.1 M phosphate buffer, pH 6.4). We prepared three stock solutions of mucin for each pH (1.2, 4.0 and 6.4) in volumetric flask in order to get accurate concentration of mucin. Chitosan and its two derivatives were each individually dispersed (at 5 mg/mL final) in the above mucin solutions, vortexed and then shaken at 37 °C for 2 h. The sample (chitosan or modified chitosan) with bound mucin was then removed by centrifugation at 12,000 rpm for 2 min and harvested the unbound mucin containing supernatant. The free mucin concentration was calculated by the PAS assay with reference to the calibration curve (Section 2.5.1). The amount of mucin adsorbed to the microspheres was calculated as the difference between the total amount of mucin added and the free mucin content in the supernatant. Moreover, all experiments were performed in triplicate to get more accurate results.

2.6. Swelling of chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan

The swelling behavior of the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan was studied as cast films by observing the change in the diameter of a disk over time when immersed at room temperature in SGF, SCF or SIF (isotonic buffers at pH 1.2, 4.0 and 6.4, respectively). One gram of the polymer was dissolved in 50 mL of 1% (v/v) aqueous lactic acid to yield a 1% (w/v) polymer solution. Then the solution was poured into a tray (8 × 10 cm) and air dried to obtain the respective film. The dried films were cut into 5.0 mm diameter circles and each one was immersed in 10 mL of one of SGF (pH 1.2), SCF (pH 4.0) or SIF (pH 6.4). The swelling properties were determined by measuring the change in the diameters of each film at various time intervals (0–24 h). The swelling ratio (Sw) for each sample determined at time t was calculated from Eq. (2) as previously reported [25];

$$Sw = 100(D_t - D_0)/D_0, \quad (2)$$

where D_t is the film diameter at time t and D_0 is the initial film diameter.

2.7. Scanning electron microscopy (SEM)

The surface morphology of chitosan and modified chitosan with/without SV microspheres was examined by scanning electron microscopy (SEM). The samples were mounted onto an aluminum stub using double-sided carbon adhesive tape and coated with gold–palladium at 50 mA for 6 min through a sputter coater. The particles were observed via scanning electron microscope under high vacuum at an ambient temperature with a beam voltage of 10–20 kV.

2.8. Particle size and zeta potential

The anhydrous particle size of chitosan and modified chitosan with/without SV microspheres was evaluated from the SEM analysis (Section 2.7). The hydrated particle size and size distribution of each sample and their zeta potential were evaluated by dynamic light scattering (DLS) with a particle size analyzer (Zetasizer nano series, Malvern instruments). Microspheres were suspended in an aqueous 5% (w/v) TPP solution and sonicated for 2 min prior to assaying immediately. The scattered light was collected at an angle of 90° through fiber optics and converted to an electrical signal by an avalanche photodiode. All samples were run in triplicate with the number of runs set to 5 and run duration set to 10 s.

2.9. Determination of the SV encapsulation efficiency (EE)

UV spectroscopy was used to determine the SV encapsulation efficiency (EE). Briefly, the dried SV immobilized onto the modified microspheres (2 mg) were immersed in 10 mL of EtOH. The mixture was stirred at room temperature for 30 min. The amount of SV released into the EtOH was then determined by measuring the absorbance at 238 nm and converted to the SV concentration by reference to the standard curve, formed from different concentrations (3–20 ppm) in the same solvent. The standard curve was found to be highly accurate and reproducible, with a coefficient of determination of 0.999. All experiments were repeated three times. The EE of SV was calculated according to Eq. (3);

$$EE (\%) = (100 \times W_E)/(W_T), \quad (3)$$

where W_E is the weight of drug in the particles and W_T is the total weight of the SV added to the solution in the synthesis of the particles.

2.10. In vitro SV release

The release of SV from chitosan and the modified chitosan microspheres was evaluated at pH 1.2 (SGF), pH 4.0 (SCF) and pH 6.4 (SIF) at 37 ± 2 °C by dialysis bag diffusion which can potentially reduce a burst effect of drug release and sampling and media replacement. Each accurately weighed sample (~10 mg) was enclosed in a dialysis bag (M_w CO 3.5 kDa) and the sealed bag immersed into 50 mL of the appropriate buffer (SGF, SCF or SIF) in a 250 mL flask and shaken at 100 rpm at 37 ± 2 °C. At the specified time interval (0, 10, 20, 30 and 45 min, and 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 12 h) a 3-mL sample was withdrawn for analysis and replaced by an equal volume of fresh dissolution medium to maintain a constant volume. Each 3-mL sample was analyzed by UV–Vis spectrophotometry at 238 nm and converted to the concentration of released SV by interpolation from the respective calibration curve derived from known SV concentrations (10–100 µg/mL) in the respective buffer. The percentage of cumulative SV release was calculated as 100 (amount of released SV)/(amount of SV before release).

3. Results and discussion

3.1. Formation and characterization of MA-chitosan and MBI-MA-chitosan

The reaction of chitosan and MA to form MA-chitosan was performed via Michael addition between the β-carbon of the α,β-unsaturated-carbonyl group of MA and the amino groups of chitosan [20]. Then MBI was covalently reacted at the carboxylic group and the methyl ester group of MA-chitosan via the formation of amide bonds. The reaction is summarized in Scheme 1.

3.2. ¹H NMR analysis

The chemical structures of chitosan and the two modified chitosans were characterized by ¹H NMR, as shown in Fig. 1. The peaks at chemical shifts 4.39, 3.25–3.46, 2.71 and 1.61 ppm were ascribed to the H1 (GluN), H3–H6, H2 (GluN) and acetyl (GluNAc) protons in the chitosan skeleton (Fig. 1a), respectively. The appearances of new proton positions at 3.1 and 2.7 ppm were assigned to the Hb and Hc, respectively, of the side chain of MA (Fig. 1b). That the new proton positions were at a different position compared to the peak of MA (6.3(d), 6.1(t) and 5.9(d) ppm) was attributed to the alkene proton. The DS of MA [COOH + COOMe] on chitosan in the MA-chitosan and MBI-MA-chitosan was 14.4% and 12.6%, respectively. The amount of MBI immobilized in the MA-chitosan derived polymers is comparatively very low because –NH₂ groups on aromatic ring of MBI used as nucleophile is less active than aliphatic compounds. The spectra of MBI-MA-chitosan showed the protons of the aromatic ring at between 7.1 and 7.5 ppm (Fig. 1c), which were shifted from the 6.3 and 6.7 in the MA-chitosan (Fig. 1d). Overall, the ¹H NMR spectra confirmed that MA-chitosan and MBI-MA-chitosan were successfully prepared.

3.3. Fourier transformed infrared spectroscopy (FT-IR)

The FT-IR spectrum of chitosan (Fig. 2a) showed a broad absorption at 3446 cm⁻¹ assigned to the stretching vibration of the O–H and N–H bonds. The absorption at 2928 and 2900 cm⁻¹ are related to C–H stretching. The characteristic chitosan peaks that correspond to the amide C=O stretching and the N–H bending (amide I band) were observed at 1645 and 1593 cm⁻¹, respectively. The absorption in the 1146–840 cm⁻¹ region was due to the polysaccharide skeleton, including the symmetric stretching of the glycosidic bonds (C–O–C) and the skeletal vibration of the

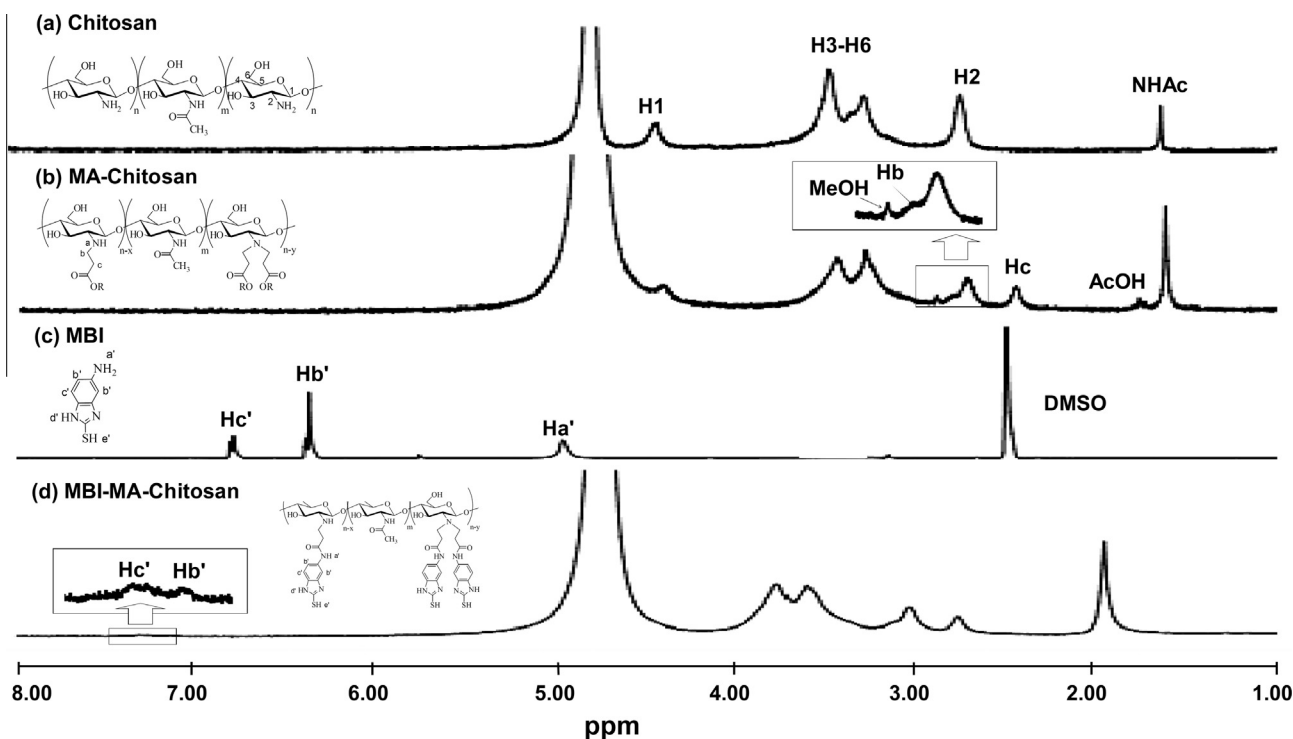


Fig. 1. Representative of ^1H NMR spectra of (a) chitosan, (b) MA-chitosan, (c) MBI, and (d) MBI-MA-chitosan.

C—O stretching. After coupling of MA onto the C-2 amine groups of chitosan, the characteristic signal at 1720 cm^{-1} (Fig. 2b), attributed to the stretching vibration of the C=O ester of MA-chitosan, appeared and the N—H bending peak was shifted to 1562 cm^{-1} (amide II band). Moreover, the broad overlapping bands and decreased intensity in the $1153\text{--}848\text{ cm}^{-1}$ region results from the coupling of the C—N axial stretching and N—H angular deformation range. The MBI-MA-chitosan spectrum (Fig. 2c) showed new absorption peaks at 1640 and 1615 cm^{-1} that were attributed to the amide C=O stretching and secondary amine of MBI-MA-chitosan, respectively. The absorption band at 1468 cm^{-1} was attributed to the aromatic C=C stretching and the peaks at 612 cm^{-1} corresponded to the thiol group. Overall, the FT-IR spectra confirm the presence of the thiol and MA groups and so the successful preparation of MA-chitosan and MBI-MA-chitosan.

In order to define the interaction between the SV payload and the polymer in the microspheres, samples of CS, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan with a SV loading of 1% (w/w) were investigated.

The FT-IR spectrum of SV (Fig. 2d) revealed the —OH stretching absorption band at 3547 cm^{-1} and C—H stretching vibrations at 3012 , 2952 , and 2872 cm^{-1} . The main characteristic peaks of SV at 1721 and 1695 cm^{-1} were due to the stretching bands of ester and lactone carbonyl group. The C—H in-plane bending vibration and skeletal C—C vibrations were observed in the $1350\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ region, while the C—H out-of plane bending modes were of weak intensity in the $600\text{--}900\text{ cm}^{-1}$ region.

The FT-IR spectrum of 1% (w/w) SV-loaded chitosan microspheres (Fig. 2e) revealed additional absorption peaks at 1711 cm^{-1} corresponding to the ester stretching peaks of SV. The peak at 1225 cm^{-1} was due to the C—H in-plane bending vibration and those at 894 , 795 and 664 cm^{-1} were the C—H in-plane bending vibrations of SV. That these SV characteristic peaks were shifted when encapsulated in the chitosan or modified chitosan suggesting interactions between SV and the chitosan based polymers.

The 1% (w/w) SV-loaded MA-chitosan and MBI-MA-chitosan microspheres (Fig. 2f and g), also showed the C=O ester stretching peak at 1715 cm^{-1} and additional absorption peaks at 2960 cm^{-1}

and 2963 cm^{-1} due to the C—H stretching vibrations of SV. The other peaks have a nearly additional absorption in the position of SV and 1% (w/w) SV-loaded chitosan.

The FT-IR spectra of the SV-loaded chitosan and modified chitosans microspheres were broadly similar but differed in the position of the characteristic peaks of SV, which may be shifted compared to that of pure SV because of the effect of TPP. Thus, the FT-IR spectra appeared to confirm the successful loading of SV in chitosan and the modified chitosan (MA-chitosan and MBI-MA-chitosan) microspheres.

3.4. TGA of chitosan and the modified chitosans

The thermal stability and thermal behavior of chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan, were obtained by TGA. The TG curve of chitosan showed two stages of weight loss, the first being water loss and volatile products (6% of the total weight) at $50\text{--}150\text{ }^\circ\text{C}$, while the second stage at $325\text{--}350\text{ }^\circ\text{C}$, with a derivative TG (DTG) peak at $326\text{ }^\circ\text{C}$ and a weight loss of 45% of the total weight, was ascribed to the degradation of the chitosan backbone (Fig. 3a). In contrast, the MA-chitosan and MBI-MA-chitosan also showed a first stage water loss at $50\text{--}180\text{ }^\circ\text{C}$ (Fig. 3b and c), at 10% and 8% of the total weight respectively, but differed from chitosan in that the second weight loss, the degradation of the polymer, occurred at the lower temperature of $290\text{ }^\circ\text{C}$ with a 35% weight loss for MA-chitosan, and at $308\text{ }^\circ\text{C}$ with a 40% total weight loss for MBI-MA-chitosan. The results demonstrate a reduction in the thermal stability of MA-chitosan and MBI-MA-chitosan compared to chitosan, which presumably reflects the change in the crystalline structure of chitosan following the introduction of MA and MBI side chains. In addition, the amide bond in the MBI-MA-chitosan is easily broken.

The TGA thermograms for the 1% (w/v) SV loaded chitosan (Fig. 3d) and MA-chitosan (Fig. 3e) microparticles also showed a two-stage weight loss of water loss and then polymer degradation. The chitosan decomposition occurred at $300\text{--}350\text{ }^\circ\text{C}$ with a DTG peak at $329\text{ }^\circ\text{C}$ for a 20% total weight loss, while for MA-chitosan

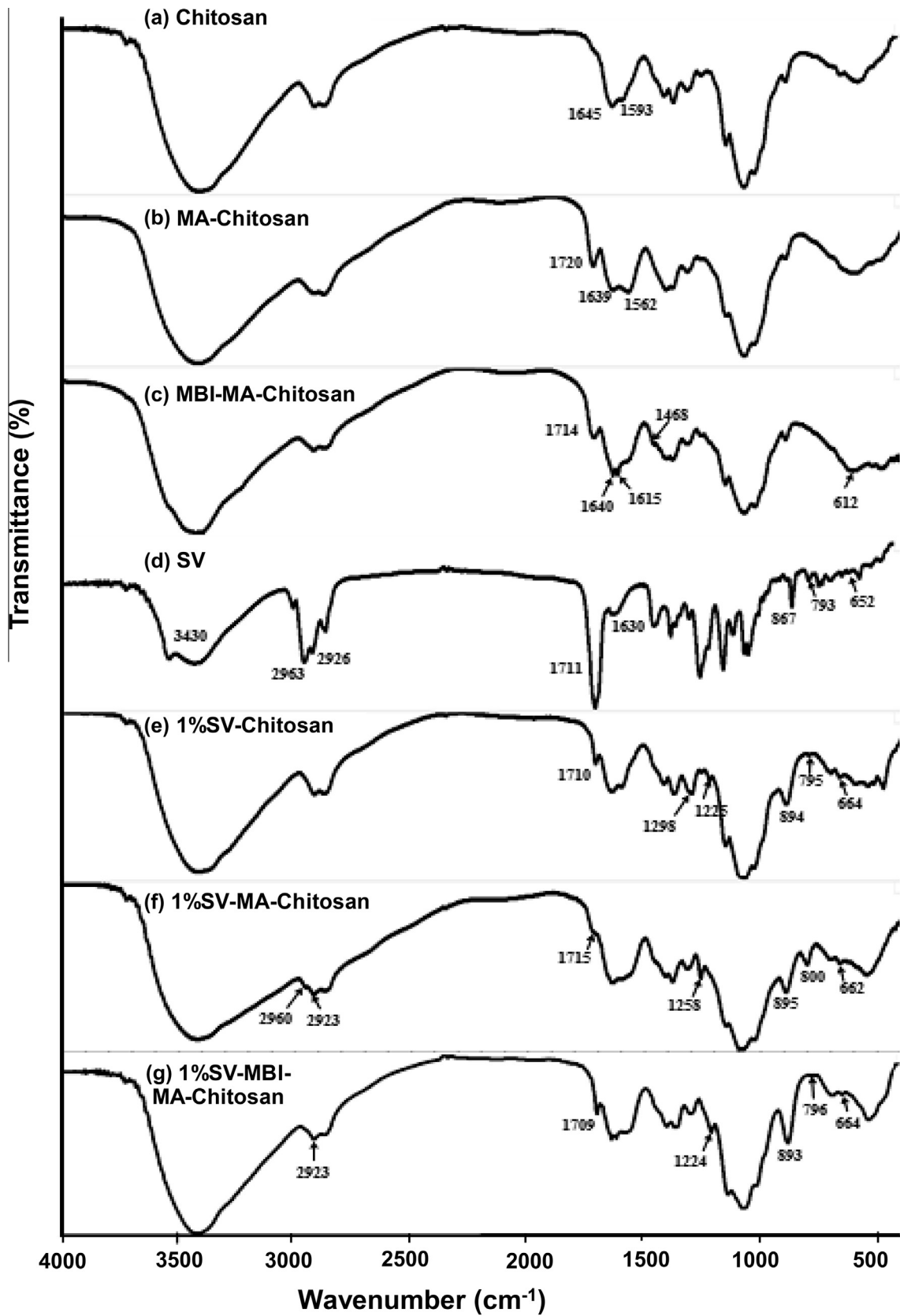


Fig. 2. FTIR spectra of (a) chitosan, (b) MA-chitosan, (c) MBI-MA-chitosan, (d) SV, (e) 1% (w/w) SV-loaded chitosan, (f) 1% (w/w) SV-loaded MA-chitosan, and (g) 1% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan.

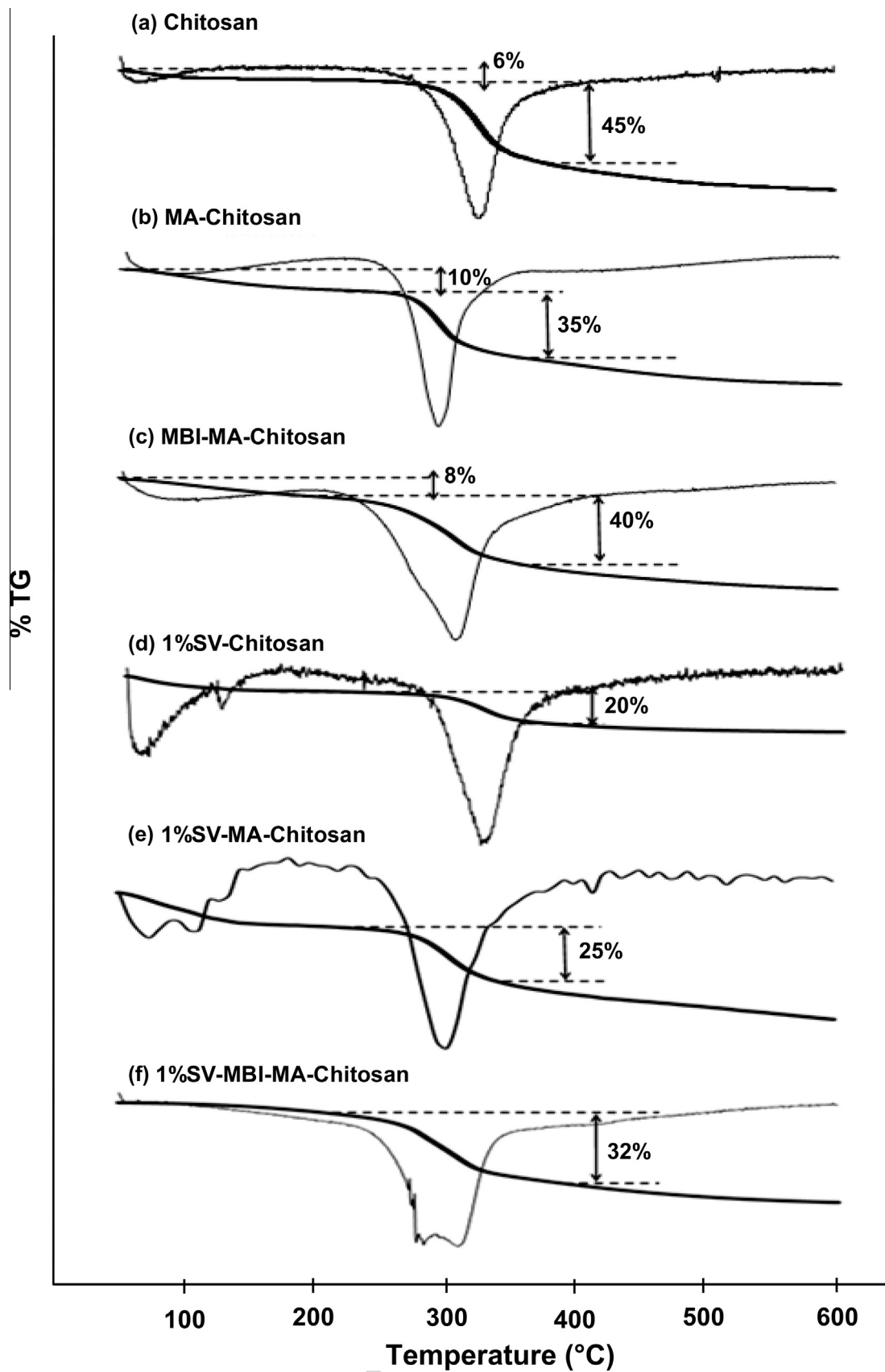


Fig. 3. TGA analysis (TG and DTG) of (a) chitosan, (b) MA-chitosan, (c) MBI-MA-chitosan, (d) 1% (w/w) SV-loaded chitosan, (e) 1% (w/w) SV-loaded MA-chitosan, and (f) 1% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan.

and MBI-MA-chitosan the decomposition occurred with a DTG peak at 309 °C and 315 °C, respectively, accounting for a loss of 25% and 35% of the total weight. That SV loading of the polymers increased the DTG peak reflects that the SV was entrapped by the respective polymers. Indeed, the TGA curve of the SV-loaded MBI-MA-chitosan microparticles appeared as combination of the MBI-MA-chitosan and SV degradation (Fig. 3f). The higher polymer decomposition temperature of the SV-loaded MBI-MA-chitosan than the MBI-MA-chitosan is likely to reflect the inter- and intramolecular disulfide interactions.

Overall, the SV-loaded polymer microparticles showed a higher thermal stability than the corresponding unloaded ones. It is well established that intramolecular interactions increase the thermal stability of polymers, and so leads to a higher decomposition temperature.

3.5. Quantification of the thiol levels in MBI-MA-chitosan

Ellman's reagent is very useful as a sulfhydryl assay reagent because of its specificity for —SH groups at a neutral pH and short reaction time. DTNB reacts with a free sulfhydryl group on MBI-MA-chitosan to yield a mixed disulfide and 2-nitro-5-thiobenzoic acid (TNB), a measurable product at 450 nm. The linearity range for the L-cysteine hydrochloride standards at 450 nm was 10–150 μmol/L, with a linear equation, obtained by the least square method, of $y = 0.008x + 0.001$.

From this, the amount of free thiol groups and disulfide bonds immobilized in the MBI-MA-chitosan derived from a 1:0.1 (w/w) ratio of MBI-MA-chitosan were found to be 11.86 μmol/g and 6.54 μmol/g polymer, respectively, while neither were detected in the chitosan or MA-chitosan (Table 1).

3.6. Mucoadhesive properties

The mucoadhesive properties of the modified chitosans with or without SV loading in SGF, SCF and SIF were determined compared to that for chitosan with or without SV loading in order to evaluate the effect of media pH. The PAS colorimetric method, used to quantify the level of mucin in the aqueous solution [26], was found to have a linearity range within 0.1–0.5 mg/mL and with linear equations, as obtained by the least square method, of $y = 0.257x - 0.021$, $y = 0.758x + 0.020$ and $y = 1.266x + 0.009$ in SGF, SCF and SIF, respectively.

The amount of mucin that was adsorbed onto a polymer has been reported to depend on the ionization of sialic acid and charged amino acids in the mucus glycoproteins, as well as the charged groups in the polymer, and this is pH-dependent (pK_a and pI for sialic acid and mucin are 2.6 and ~3–5, respectively) [3]. Therefore, the different forms of the glycoprotein will be influenced by the pH of the environment.

At a pH of 1.2 chitosan showed poor mucoadhesive ability but those for MA-chitosan and MBI-MA-chitosan were about 10.3- and 11-fold higher, respectively (Table 1). The amino groups of the chitosan backbone would nearly all be protonated to $-\text{NH}_3^+$ groups at pH 1.2 (pK_a of chitosan is 6.5–6.8), but the sialic acid on the mucin would also be protonated and so uncharged ($-\text{COOH}$ and $-\text{SO}_3\text{H}$ groups) leading to a reduced electrostatic interaction with chitosan but only hydrogen bonds and van der Waal's interactions. When the chitosan was coupled with MA, the aliphatic side chain of MA provided further hydrophobic interactions with the CH_2/CH_3 groups of the mucin side chain, while the carboxylic group of the MA side chain can form strong hydrogen bonds with the $-\text{COOH}$ and $-\text{SO}_3\text{H}$ groups of the mucus glycoprotein leading to an increased mucoadhesiveness. For the MBI-MA-chitosan, in addition to the MA (as above) it contained $-\text{SH}$ groups and so exhibited a slightly stronger mucoadhesiveness compared to MA-chitosan. However, that the increased mucoadhesion of MBI-MA-chitosan over that for MA-chitosan was only slight probably reflects the steric inhibition effect of the aromatic ring that hinders hydrogen bonding between the $-\text{COOH}/-\text{COOCH}_3$ groups of MA and the $-\text{COOH}/-\text{SO}_3\text{H}$ groups of mucin. Furthermore, the $-\text{SH}$ groups on the MBI-MA-chitosan can react with the $-\text{SH}/-\text{S}-\text{S}$ (cysteine and cystine) groups on the mucin to form disulfide bridges via oxidation.

At pH 4.0, the amino groups of chitosan are still mostly protonated ($-\text{NH}_3^+$), but the sialic acid groups of mucin are mostly deprotonated and so charged ($-\text{COO}^-$ and $-\text{SO}_3^-$). This leads to increased ionic interactions with chitosan and so the 4.7-fold higher mucoadhesion than at pH 1.2. The mucoadhesiveness of MA-chitosan and MBI-MA-chitosan were also increased at pH 4 (1.3- and 1.2-fold, respectively) over that at pH 1.2 and so remained higher (2.8- and 2.9-fold, respectively) than that for chitosan. Therefore, the effect of electrostatic, hydrogen and hydrophobic effects impact on the mucoadhesion of chitosan and the modified chitosans at low pH values.

At pH 6.4, the amino groups of chitosan would be ~50% deprotonated and so the electrostatic interaction between the positive charges of chitosan backbone ($-\text{NH}_3^+$) with the $-\text{COO}^-$ and $-\text{SO}_3^-$ groups on the mucin would be decreased. However, the actual level of total bound mucin to the chitosan was not significantly decreased compared to that at pH 4.0. In contrast, the mucoadhesion of the MA-chitosan and MBI-MA-chitosan was significantly decreased at pH 6.4 (2.3- and 1.5-fold, respectively) compared to that at pH 4.0. That the MA-chitosan still bound 1.25-fold more mucin than chitosan at pH 6.4 reflects, as at the other pH values, is a result of the hydrophobic interactions between the $-\text{CH}_3$ moieties and $-\text{CH}_2$ side chain on the polymer with the $-\text{CH}_3$ groups on the mucin side chains. For the MBI-MA-chitosan, in addition the thiolate anions ($-\text{S}^-$; $pK_a \sim 2.6$) would lead to a greater extent of oxidation and nucleophilic attack forming covalent disulfide bonds between the thiol group of MBI-MA-chitosan and the cysteine-rich subdomains of the mucus glycoprotein [27]. Therefore, the hydrogen bonding, hydrophobic and covalent effects impact more on the

Table 1

Degree of substitution and mucoadhesive properties in different pH solutions of the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan with or without SV loading at 1% (w/w).

Sample	DS of MA (%) ^a	Thiol groups (μmol/g) ^b	Disulfide groups (μmol/g) ^c	Mucoadhesion of polymer (mg) ^d			Mucoadhesion of 1% (w/w) SV-loaded polymer (mg) ^d		
				pH 1.2	pH 4.0	pH 6.4	pH 1.2	pH 4.0	pH 6.4
Chitosan	0.0	0.0	0.0	0.07 ± 0.01	0.33 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01
MA-chitosan	14.38	0.0	0.0	0.72 ± 0.01	0.93 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.42 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.29 ± 0.02
MBI-MA-chitosan	12.64	11.86 ± 0.01	6.54 ± 0.02	0.77 ± 0.01	0.97 ± 0.02	0.66 ± 0.02	0.44 ± 0.01	0.73 ± 0.01	0.35 ± 0.02

^{b-d} Data are shown as the mean ± SD and are derived from three independent repeats.

^a Degree of substitution (%) of MA groups on the respective chitosans.

^b Total number of thiol groups on the chitosan polymer (μmol/g of polymer).

^c Total number of disulfide groups on the chitosan polymer (μmol/g of polymer).

^d Mucoadhesion is shown as the amount of adsorbed mucin (mg).

mucoadhesion of chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan at the higher pH.

Loading of the microspheres with SV at 1% (w/w) decreased their mucoadhesiveness, although the magnitude of this decrease was least for chitosan (1.14- to 1.18-fold over the three pH values). However, the mucoadhesion of the SV-loaded MA-chitosan and MBI-MA-chitosan was still greater than that for the SV-loaded chitosan, especially at pH 1.2 (7- and 7.33-fold, 2.34- and 2.51-fold, and 1.07- and 1.29- fold higher, respectively, at pH 1.2, 4.0 and 6.4, respectively).

Note that the chitosan and modified chitosans are likely to have formed a polyelectrolyte complex between the charged amine groups and the hydroxyl groups of TPP, explaining why the positive charged amine groups of chitosan was insufficient to increase the mucoadhesion.

3.7. Swelling study

The swelling properties are of paramount importance to consider as they influence the adhesive/cohesive properties as well the drug release. However, most mucoadhesive delivery systems are targeted to the small intestine where they will reach the mucosal membrane in a partially hydrated form. Excessive water uptake results in overhydration and a loss of mucoadhesion. Therefore, a moderate swelling behavior is indispensable for adequate interdiffusion between the polymer chains and mucosa since this provides the basis for sufficient adhesiveness [13].

Swelling can be affected by many factors, such as the cross-linking density and the hydrateability of the materials, and the ionic strength and pH value of the media [28]. Thus, the swelling behavior was measured in three broadly isotonic buffers of differing pH, being SGF (pH 1.2), SCF (pH 4.0) and SIF (pH 6.4), and the Sw was calculated as detailed in Section 2.6.

The chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan polymers showed essentially the same pattern of change in the Sw with time (data not shown). With respect to that after 60 min as a representative time point (Fig. 4), as the pH value increased the degree of the observed Sw decreased for all three polymers, ranging from 1.13- to 1.25-fold lower for MBI-MA-chitosan at pH 4 and 6.4 compared to pH 1.2, up to 1.33- to 1.75-fold, and 1.22- to 1.81-fold, for MA-chitosan and chitosan, respectively. Regardless, the MA-chitosan and MBI-MA-chitosan presented a lower Sw than that of chitosan in all three different pH media, which is likely to be due to that the attachment of MA and MBI on the chitosan reduced the overall

hydrophilicity, and so lead to a diminished water uptake compared to chitosan.

Considering the swelling behavior of polymer cast films and polymer microspheres, the polymer cast films significantly increase swelling ratio while polymer microspheres are very little water swelling in an aqueous environment. The difference between swelling behavior of the polymer cast films and the polymer microspheres because the microspheres can be form by using TPP which is crosslinking agent resulting in dense structure of polymer. On the other hand, the polymer cast films do not using any crosslinking agent.

In addition, this could be explained from the pH-dependent charge balance of MBI-MA-chitosan, MA-chitosan and chitosan, where the degree of swelling between these three polymers is modified in accord with their charge balance, shown schematically in Fig. 4. In a strong acidic medium (pH 1.2), the protonated (positively charged) amino groups of chitosan repel each other and hydrogen bonds were dissociated, inducing the network to become loose and leading to an increase degree of swelling and water uptake. At pH 4.0, some of the amino groups of chitosan were deprotonated (NH_3^+), reducing the repulsion in the polymer chains and so leading to a decreased degree of swelling. For MA-chitosan and MBI-MA-chitosan the reduction in swelling at pH 4.0 compared to pH 1.2 was less marked than that for chitosan due to the ester and carboxylic groups of the MA side chain that hydrogen bonded between the polymer chains resulting in a decreased access to and uptake of water absorption. With respect to the larger Sw of MBI-MA-chitosan (1.25-fold at pH 1.2 up to 1.75-fold at pH 6.4) at pH 4.0 and 6.4 the thiolate groups were negatively charged and so repulsion between the polymer segments is induced, while steric hindrance from the aromatic group inhibits intramolecular interactions and so increases the swelling compared to that in MA-chitosan.

At a high pH (pH 6.4), the amino groups of chitosan are ~50% deprotonated and so interchain repulsion in the polymer and swelling is reduced. Furthermore, re-association of the interchain hydrogen bonds and consequently weaker interactions between the polymer chains and the aqueous media, leads to a decreased water absorption and swelling. That MBI-MA-chitosan swelled more than MA-chitosan reflects that (i) the thiolate groups remain charged leading to electrostatic repulsion between polymer segments, and (ii) the steric inhibition by the aromatic side chain of MBI-MA-chitosan reduces intra-chain bonding. However, the polymers have only a relatively low density of thiol groups compared to that for the amine groups, and so the affects of the amino group are dominant.

3.8. Morphology

Chitosan and modified chitosans are used in the pharmaceutical field, particularly as a vehicle for controlled drug delivery. Accordingly, the ability to make suitable payload carriers from chitosan based polymers by a relatively easy method is important. Here, we evaluated the suitability of EI as a synthesis method for the MA- and MBI-MA-modified chitosans as potential low water soluble drug carriers.

Preliminary (univariate analysis based) optimization of the EI parameters revealed the optimal conditions of a 21 kV applied voltage, 8 cm working distance, 0.5 mL/h flow rate, and a 26 G needle (data not shown) with high percentage yield. The percent yield of microparticles from EI based is in relation to the amount of chitosan.

SEM analysis of the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan microparticles formed under these conditions with or without SV-loading revealed the successful fabrication of microspheres (Fig. 5). Those without SV were comparable to those loaded with SV in terms of being in a generic spherical shape with a smooth surface without visible pores.

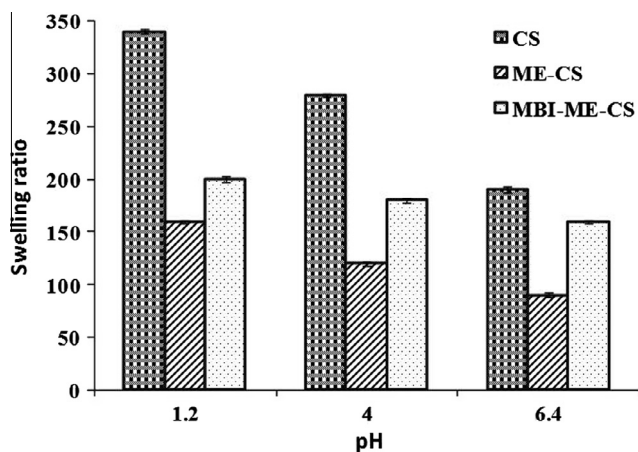


Fig. 4. Swelling ratio (Sw) of the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan preparations. The data are shown at equilibrium (60 min swelling time) as the mean \pm 1 SD and are derived from three independent repeats.

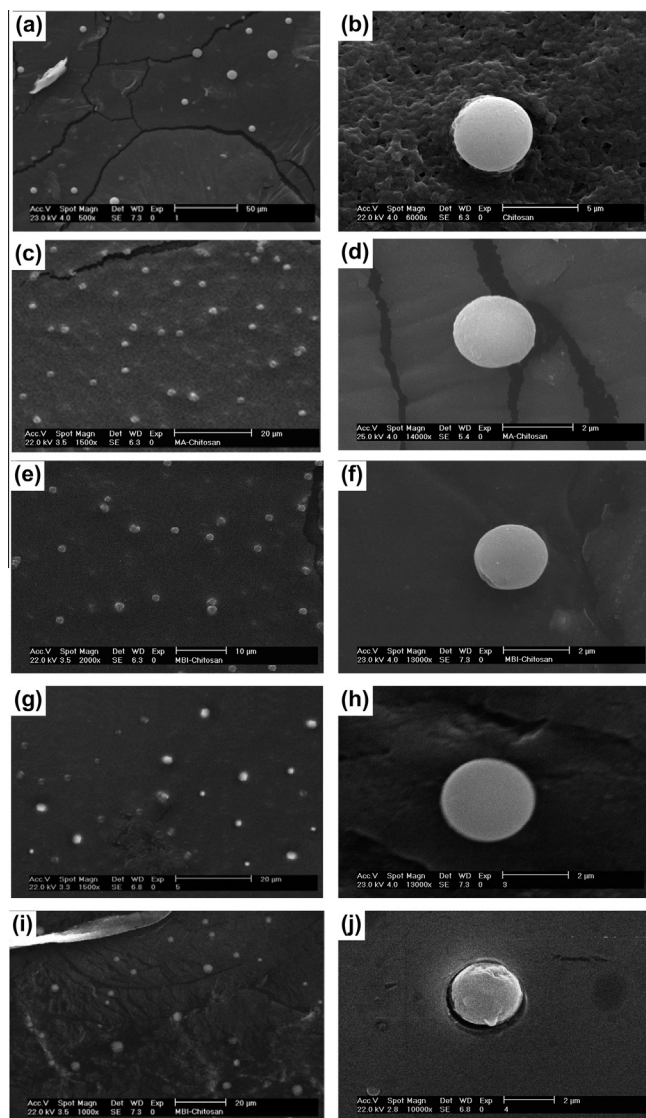


Fig. 5. SEM images of (a and b) chitosan, (c and d) MA-chitosan, (e and f) MBI-MA-chitosan microspheres, and (g and h) 1% (w/w) SV-loaded MA-chitosan, and (i and j) 1% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

3.9. Particle size, size distribution and zeta potential

The particle size and size distribution of the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan with and without SV loading are summarized in Table 2. The size of the anhydrous particles, as measured by SEM, showed that without SV the chitosan particles were the largest followed by MA-chitosan and then MBI-MA-chitosan. After loading with SV at 1% (w/w), the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan particles were larger (1.2-, 1.4- and 1.5-fold, respectively), and further increasing the SV loading level increased the particle size (1.27-fold at 4% (w/w) SV over that at 1% (w/w), indicating that the particles could encapsulate more SV.

The hydrated particle size, as measured by DLS, of chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan with and without SV were only slightly larger than the corresponding anhydrous particle sizes (1.03- to 1.15-fold), suggesting very little water swelling in an aqueous environment. The particle size distribution, as the PDI that ranges from 0 (monodisperse) to 1 (polydisperse), was fairly broad for chitosan and relatively narrow for the two modified chitosans.

Zeta potential is the electric potential of a particle in dispersion and provides information on the overall surface charge of the particles, and how this is affected by changes in the environment (e.g., pH, the presence of counter-ions, adsorption) [29]. It is a parameter which is very useful for the assessment of the physical stability of the colloidal dispersion, the overall surface charge of the particles and how this is affected by changes in the environment. The surface charge can greatly influence the particle stability in suspension through electrostatic repulsion between particles and so reduce agglomerate formation. From the results, the zeta potential of the formulation without drug was strongly negative, whereas those with drug became less negative (Table 2). This is due to the cationic charge present on the drug having neutralized the surface charges existed on the formulation surface. Moreover, using TPP as a solution gave rise to negative zeta potential of formulation.

The chitosan and MA-chitosan microparticles had a negative charge of -15.12 and -18.38 mV, respectively, because of the bound TPP (Table 2). This increased for the MBI-MA-chitosan due to the S^- anion on the MBI side chains in addition to the surface TPP complexed with the chitosan amine groups.

The loading of these particles with 1% (w/w) SV slightly reduced the zeta potential (1.14-, 1.27- and 1.18-fold or by 1.82, 3.87 and 3.3 mV for chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan, respectively), but the MBI-MA-chitosan particles even with a 4% (w/w) SV loading should be reasonably stable in aqueous dispersion.

Table 2

Mean particle diameter, particle size distribution (PDI), zeta potential, and SV encapsulation efficiency (EE) of chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan particles with or without SV-loading.

Abbreviations	Anhydrous particle size (μm) ^a	Hydrated particle size (μm) ^b	Zeta potential (mV) ^b	Polydispersity Index (PDI) ^b	EE (%) ^c
<i>Without SV</i>					
Chitosan	4.5 ± 0.05	4.65 ± 0.09	-15.1 ± 1.2	0.73 ± 0.10	–
MA-chitosan	2.0 ± 0.15	2.30 ± 0.15	-18.4 ± 0.9	0.45 ± 0.15	–
MBI-MA-chitosan	1.7 ± 0.08	1.94 ± 0.13	-21.5 ± 0.7	0.39 ± 0.01	–
<i>With SV</i>					
1% (w/w) SV-loaded chitosan	5.4 ± 0.05	5.62 ± 0.08	-13.3 ± 1.3	0.75 ± 0.05	53.0 ± 0.03
1% (w/w) SV-loaded MA-chitosan	2.8 ± 0.15	3.12 ± 0.15	-14.5 ± 0.1	0.53 ± 0.05	70.90 ± 0.01
1% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan	2.6 ± 0.12	2.81 ± 0.20	-18.2 ± 1.4	0.49 ± 0.15	64.83 ± 0.01
4% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan	3.3 ± 0.05	3.53 ± 0.05	-16.1 ± 1.0	0.67 ± 0.02	82.10 ± 0.01

Data are shown as the mean \pm SD and are derived from three independent repeats.

^a Anhydrous particle size measured by SEM.

^b Hydrated particle size, polydispersity index and zeta potential measured by DLS with a particle size analyzer.

^c EE encapsulation efficiency (%) of SV into the polymer particles.

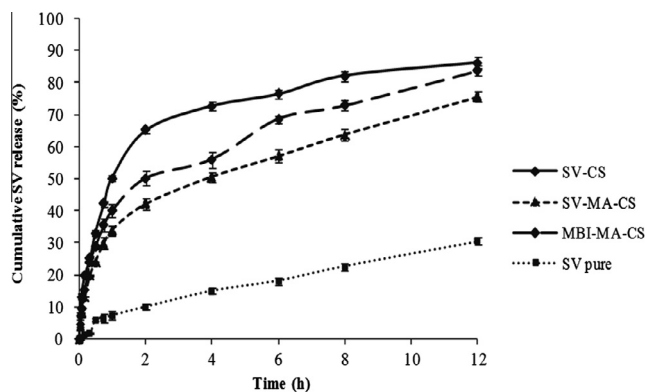


Fig. 6. Release profiles of SV from (a) 1% (w/w) SV-loaded chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan in SGF (pH 1.2), (b) 1% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan in pH 1.2, 4.0 and 6.4, (c) 1% and 4% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan in SGF (pH 1.2). The data are shown as the mean \pm 1 SD and are derived from three independent repeats.

3.10. Simvastatin encapsulation efficiency

The EE of SV into the chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan microspheres is summarized in Table 2. For the 1% (w/w) SV loaded samples the MA-chitosan showed the highest EE (70.9%), while chitosan had the lowest (53%), revealing the improved compatibility between SV and the modified chitosans over chitosan. Increasing the SV loading level in the MBI-MA-chitosan from 1% (w/w) to 2% and 4% (w/w) increased the EE obtained to 70.3% and 82.1%, respectively. (Table 2), and illustrates that EI can produce a high EE of SV.

3.11. In vitro SV release profiles

From the release profiles, pure simvastatin without any formulation show the most sustained release profile in all pH tested because simvastatin is a poor water soluble drug and therefore it gradually swells and dissolve.

The release of SV from 1% (w/w) SV-loaded polymer (chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan) particles was evaluated over 12 h in SGF, SCF and SIF. The release profiles in SGF (pH 1.2) showed an initial burst release (1 h) for all three polymers, due to the presence of free SV on the particle surface (Fig. 6a). However, the burst effect was more marked for the SV-loaded chitosan (50% SV release) than when loaded in the MA-chitosan or MBI-MA-chitosan (33% and 40% SV release, respectively). After 2 h (65%, 42% and 50% SV release from chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan, respectively), the SV was then gradually released from the polymers over the remaining 10 h reaching 76%, 57% and 63%, and 86%, 76% and 84% total SV release after 6 and 12 h, respectively. Thus, MA-chitosan showed the slowest sustained release of SV, which likely reflects its hydrophobic nature and its diminished water uptake capability.

With respect to the SV release from the 1% (w/w) SV loaded MBI-MA-chitosan in media of decreasing acidity (Fig. 6b), increasing the pH caused a slight delayed release of the SV, but a similar pattern of SV release of an initial burst (1 h), fast release rate (post burst to 2 h) and then a slow sustained release for the remaining 10 h was seen. The reduced rate of SV release with increasing pH is consistent with the decreased Sw with increasing pH (Section 3.7).

Finally, increasing the amount of SV loading (and EE, see Table 2) on the MBI-MA-chitosan from 1% to 4% (w/w) resulted in a faster release profile of SV at pH 1.2 with about 50% of the total SV being released in 1 h, but still displayed a sustained release thereafter over the 12 h period. In the same way a similar trend (but differing magnitude) in the release profile for the 4% (w/w)

loaded MBI-MA-chitosan compared to the 1% (w/w) loaded particles was observed at pH 4.0 and 6.4 (data not shown).

Finally, the decreased particle size observed with a modified chitosan implies an increase in the number of particles and therefore an increase in surface area for drug adsorption. The higher drug loading also gave the higher drug encapsulation efficiency, while the burst effect for all formulations is relatively comparative in the range of 20% within the first 1 h and then prolonged release to 80% of drug loading within 12 h. The results suggested that these carriers can reduce the amount of simvastatin contained in the oral formulation in order to maintain the similar release profile.

4. Conclusion

In this study, mucoadhesive thiolated chitosan was successfully synthesized by covalent attachment under mild conditions. The immobilization of thiol groups (MBI) onto the MA-chitosan ($11.86 \pm 0.01 \mu\text{mol/g}$ of polymer) resulted in strongly improved mucoadhesive properties at all three tested pH values (pH 1.2, 4.0 and 6.4), and especially at pH 1.2 (11-fold higher mucoadhesion than chitosan). The chitosan, MA-chitosan and MBI-MA-chitosan particles were fabricated and loaded with SV using EI, where an 82% EE could be obtained with 4% (w/w) SV-loaded MBI-MA-chitosan. The obtained microspheres not only reduced the burst effect but also increased the release rate of SV within 12 h at more than fivefold higher than pure SV. Moreover, the mucoadhesiveness of the SV-loaded MBI-MA-chitosan microspheres remained higher than that for the SV-loaded chitosan microspheres at all three tested pH values.

Acknowledgments

This research was financially supported by the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund) to M.K.; the Integrated Innovation Academic Center: IIAC Chulalongkorn University Centenary Academic Development Project to N.M. (RES560530064-FW). The comments of three anonymous reviewers are gratefully appreciated. Thanks are also given to Dr. Robert Butcher of the PCU, Faculty of Science, Chulalongkorn University, for constructive comments and English corrections.

References

- [1] A. Bernkop-Schnurch, C.E. Kast, D. Guggie, Permeation enhancing polymer in oral delivery of hydrophilic macromolecule: thiomers/GSH system, *J. Controlled Release* 93 (2003) 1510–1518.
- [2] V.K. Yadav, A.B. Gupta, R. Kumar, J.S. Yadav, B. Kumar, Mucoadhesive polymers: means of improving drug delivery, *J. Chem. Pharm. Res.* 2 (2010) 418–432.
- [3] S.K. Tillo, T.M. Rasala, V.V. Kale, Mucoadhesive microparticulate drug delivery system, *Int. J. Pharm. Sci.* 9 (2011) 52–56.
- [4] V. Dodane, V.D. Vilivalam, Pharmaceutical applications of chitosan, *Int. J. Pharm. Sci.* 6 (1998) 246–253.
- [5] M. Dash, F. Chiellini, R.M. Ottenbriteb, E. Chiellini, Chitosan-A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 36 (2011) 981–1014.
- [6] J.D. Smart, The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion, *J. Controlled Release* 57 (2005) 1556–1568.
- [7] G.K. Mythri, M. Kavitha, Novel mucoadhesive polymer – a review, *J. Appl. Pharm. Sci.* 8 (2011) 37–42.
- [8] V.M. Leitner, G.F. Walker, A. Bernkop-Schnurch, Thiolated polymers: evidence for the formation of disulphide bonds with mucus glycoproteins, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 56 (2003) 207–214.
- [9] M.D. Hornof, C.E. Kast, A. Bernkop-Schnurch, In vitro evaluation of the viscoelastic properties of chitosan–thioglycolic acid conjugates, *Eur. J. Pharm.* 55 (2003) 185–190.
- [10] A. Anitha, N. Deepa, K.P. Chennazhi, S.V. Nair, H. Tamura, R. Jayakumar, Development of mucoadhesive thiolated chitosan nanoparticles for biomedical applications, *Carbohydr. Polym.* 83 (2011) 66–73.
- [11] G. Shahnaz, A. Vetter, J. Barthelme, D. Rahmat, F. Laffleur, J. Iqbal, G. Perer, W. Schlocker, S. Donnhaput, P. Augustijns, A. Bernkop-Schnorch, Thiolated

- chitosan nanoparticles for the nasal administration of leuprolide: bioavailability and pharmacokinetic characterization, *Int. J. Pharm.* 428 (2012) 164–170.
- [12] K. Juntapram, N. Praphairaksit, K. Siraleartmukul, N. Muangsin, Electrospayed polyelectrolyte complexes between mucoadhesive N,N,N-trimethylchitosan-homocysteine thiolactone and alginate/carrageenan for camptothecin delivery, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 1–11.
- [13] G. Millotti, C. Samberger, E. Frohlich, D. Sakloetsakun, A. Bernkop-Schnurch, Chitosan-4-mercaptopbenzoic acid: synthesis and characterization of a novel thiolated chitosan, *J. Mater. Chem.* 20 (2010) 2432–2440.
- [14] M. Prabakaran, S. Gong, Novel thiolated carboxymethyl chitosan-g-b-cyclodextrin as mucoadhesive hydrophobic drug delivery carriers, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 117–125.
- [15] K. Margulis-Goshen, S. Magdassi, Formation of simvastatin nanoparticles from microemulsion, *Nanomed.: Nanotechnol., Biol. Med.* 5 (2009) 274–281.
- [16] R. Tiwari, K. Pathak, Nanostructured lipid carrier versus solid lipid nanoparticles of simvastatin: comparative analysis of characteristics, pharmacokinetics and tissue uptake, *Int. J. Pharm.* 20 (2011) 2432–2440.
- [17] N.M.V.R. Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1–27.
- [18] S. Zhang, K. Kawakami, One-step preparation of chitosan solid nanoparticles by electrospray deposition, *Int. J. Pharm.* 397 (2010) 211–217.
- [19] Y.X. Xu, X. Ren, M.A. Hanna, Chitosan/clay nanocomposites preparation and characterization, *J. Appl. Polym. Sci.* 99 (2006) 1684–1691.
- [20] H. Sashiwa, Chemical modification of chitosan. Part 15: Synthesis of novelchitosan derivatives by substitution of hydrophilic amine using *N*-carboxyethylchitosan ethyl ester as an intermediate, *Carbohydr. Res.* 338 (2003) 557–561.
- [21] B. Osuna, D. Teutonico, S. Arpicco, C. Vauthier, G. Ponchel, Characterization of chitosan thiolation and application to thiol quantification onto nanoparticle surface, *Int. J. Pharm.* 340 (2007) 173–181.
- [22] A. Dietza, H.M. Rubinstein, Laboratory note standardization of the ellman reaction, *Clin. Biochem.* 35 (1972) 136–138.
- [23] K. Kafedjiiski, A.H. Krauland, M.H. Hoffer, A. Bernkop-Schnourch, Synthesis and in vitro evaluation of a novel thiolated chitosan, *J. Appl. Biomater.* 26 (2005) 819–826.
- [24] M. Kilcoyne, J.Q. Gerlach, Periodic acid-Schiff's reagent assay for carbohydrates in a microtiter plate format, *Anal. Biochem.* 416 (2011) 18–26.
- [25] L.C. Michael, In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers, *Int. J. Pharm.* 78 (1992) 43–48.
- [26] N.V. Majeti, R. Kumar, A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.* 46 (2000) 1–27.
- [27] A. Bernkop-Schnurch, Thiomers: a new generation of mucoadhesive polymers, *J. Controlled Release* 57 (2005) 1569–1582.
- [28] K. Juntapram, N. Praphairaksit, K. Siraleartmukul, N. Muangsin, Synthesis and characterization of chitosan-homocysteine thiolactone as a mucoadhesive polymer, *Carbohydr. Polym.* 87 (2012) 2399–2408.
- [29] A. Sharipova, S. Aidarova, P. Cernoch, R. Miller, Effect of surfactant hydrophobicity on the interfacial properties of polyallylamine hydrochloride/sodium alkylsulphate at water/hexane interface, *Colloids Surf., A* 30 (2012) 235–243.