บทที่ 2

สืบสวนเอกสาร

กวาวเครือขาว (*Pueraria candollei* Grah. var. *mirifica* (Airy Shaw & Suvatabandhu) Niyomdham) มีชื่อพ้องว่า *P. mirifica* Airy Shaw and Suvatabandhu Legumonosae-Papilionoideae ในระยะแรก ๆ เชื่อกันว่าเป็นหัวกวาวชนิด *Butea superba* จนกระทั่งปี ค.ศ. 1952 ม.จ. ลักษณกร เกษมสันต์ กสิน สุวตะพันธ์ และอารี โชว์ ได้ค้นพบว่า กวาวเครือขาวที่นำมาทำยานั้นเป็นหัวกวาวเครือชนิดใหม่ ซึ่งมีลักษณะคล้ายคลึงกับหัวกวาวชนิด *Butea superba* มาก พร้อมทั้งได้ตั้งชื่อหัวกวาวชนิดใหม่นี้ว่า *Pueraria mirifica* ในปี พ.ศ. 2538 ชวลิต ดำรงธรรม ได้บรรยายเกี่ยวกับกวาวเครือขาวไว้ในหนังสืออนุกรมวิธานพืชอักษร ก ฉบับราชบัณฑิตยสถานว่ากวาวเครือขาวขึ้นในป่าเบญจพรรณ บนพื้นที่สูงจากระดับน้ำทะเล 250-800 เมตร ในป่าสูงทางภาคเหนือ ภาคตะวันตก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย เป็นไม้เถาเลื้อยพาดพันต้นไม้ใหญ่ เป็นไม้ผลัดใบ ขนาดกลาง เถายาวประมาณ 5 เมตร ลำต้นเกลี้ยง เปลือกนอกของลำต้นมีสีน้ำตาลเข้มและค่อนข้างแข็ง มีหัวใต้ดินขนาดใหญ่ทำหน้าที่สะสมอาหาร ลักษณะค่อนข้างกลม และคอดยาวเป็นตอน ๆ ต่อเนื่องกัน (รูปที่ 1-ก) กิ่งอ่อน ยอดอ่อน ก้านช่อดอก และกลีบเลี้ยงมีขนสั้น ๆ ใบเป็นใบประกอบ มีใบย่อย 3 ใบ ก้านใบประกอบยาว 10-38 เซนติเมตร ใบย่อยใบกลางรูปไข่กว้าง 9-15 เซนติเมตร ยาว 15-30 เซนติเมตร ปลายมนถึงเรียวแหลม โคนสอบถึงมน ใบย่อยคู่ข้างขนาดใกล้เคียงกับใบกลาง ปลายมนถึงเรียวแหลม โคนเบี้ยว ด้านบนใบเกลี้ยง ด้านล่างมีขนสั้น ๆ ประปราย ก้านใบย่อยยาว 5-7 มิลลิเมตร (รูปที่ 1-ข) ดอกออกเป็นช่อตามปลายกิ่งยาว 20-30 เซนติเมตร ดอกมีรูปร่างคล้ายดอกแคขนาดเล็ก สีน้ำเงินอมม่วง ออกเป็นกระจุกในระยะผลัดใบ ดอกมีกลีบเลี้ยงยาว 6-7 มิลลิเมตร โคนติดกันเป็นรูปถ้วย ปลายแยกเป็น 4 แฉก กลีบดอกมี 5 กลีบ สีม่วงอมน้ำเงินอ่อน กลีบนอกสุดมีขนาดใหญ่ กลีบคู่กลางค่อนข้างกลมงอโค้ง กลีบคู่ในสุดติดกันเป็นรูปท้องเรือห่อเกสรเอาไว้ เกสรตัวผู้มี 10 อันแต่ส่วนก้านชูอับเรณูเชื่อมติดกัน (รูปที่ 1-ค) ฝักแบน รูปขอบขนาน ผิวเกลี้ยงหรือมีขนสั้นประปราย กว้าง 7 มิลลิเมตร ยาว 3 เซนติเมตร เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลเมื่อแก่ มีเมล็ด 3-5 เมล็ด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 1. แสดงลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของกวาวเครือขาว (ก) หัว (ข) ใบ และ (ค) ดอก

<u>สรรพคุณทางการแพทย์แผนไทยและแพทย์พื้นบ้านของกวาวเครือขาว</u>

จากเอกสารที่รวบรวมได้ พบว่ากวาวเครือขาวมีสรรพคุณมากมายดังนี้

หัวกวาวเครือขาวใช้เป็นยาอายุวัฒนะ โดยใช้ผงหัวกวาวเครือขาวผสมกับน้ำผึ้งกินเป็นยาบำรุง บำบัดโรคได้หลายชนิด และทำให้อายุยืน (ชวลิต ดำรงธรรม, 2538)

หัวกวาวเครือขาว ใช้เป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงเนื้อให้งอกงามเต่งตึงขึ้น ทำให้อวัยวะสืบพันธุ์และมดลูกเต่งโตโดยมีโลหิตคั่งมากขึ้น บำรุงเนื้อหนังให้เต่งตึง บำรุงสุขภาพให้สมบูรณ์ บำรุง

ความกำหนัด รับประทานมากอาจเป็นอันตรายได้ เปลือกและเถาแก้พิษงู (นันทวัน บุณยะประภัศร และ อรชุน โชคชัยเจริญพร, 2539)

ยาลูกกลอนที่มีส่วนผสมของกวาวเครือขาวและเปลือกของพญารากดำ มีสรรพคุณทำให้เจริญอาหาร และแก้โรคเบื่ออาหาร ท้องอืดเฟ้อจุกแน่นเป็นยาบำรุงโลหิต ผู้ที่รับประทานยานี้จะเป็นผู้ที่แข็งแรง ผิวพรรณผ่องใส อ้วนท้วนแข็งแรง เป็นยาขับเลือดร้ายในเรือนไฟ ขับประจำเดือนที่คั่งค้างมานานโดยเฉพาะเด็กสาวที่รอบเดือนไม่มาตามปกติ รับประทานยานี้แล้วจะมาตามปกติทันที สตรีที่หน้าเป็นฝ้าด่างดำมีรอยเหี่ยวย่นเนื่องจากเลือดคั่งค้างเน่าเสีย จะหายหากรับประทานยานี้ติดต่อสักสองเดือน นอกจากนี้แล้วแก้ระดูขาว มุตตฆาต ปวดท้อง ปวดเอว เป็นยารักษาประดง ปวดตามข้อตามกระดูก ปวดตามหลังบั้นเอว กระเบนเหน็บ เบาเหลืองขุ่นข้น รวมทั้งแก้โรคเบาหวานได้อีกด้วย เป็นยารักษาโรคฟกช้ำดำเขียว บวมตามเนื้อตัว ตาเหลืองดังขมิ้น แก้ริดสีดวงทวาร แก้โรคกระดูกเคลื่อนมาหลายปี รับประทานยานี้แล้วจะหาย และเมื่อรับประทานยานี้อยู่เรื่อย ๆ ร่างกายจะสดใสเปล่งปลั่ง นมจะตั้งเต้าเหมือนเด็กอายุ 17-18 ปี การเดินไปไหนก็คล่องแคล่วไม่เมื่อยล้า หญิงชราอายุ 60-80 ปี กินยานี้แล้วประจำเดือนที่หมดไปแล้วจะกลับมามีใหม่อีกและนมจะตั้งเต้าขึ้นมาอีก

ขนาดของหัวกวาวเครือขาวที่ใช้ตามตำรับโบราณมีหลายขนาน เช่น

1. ปอกเปลือกหัว หั่นตากแห้ง (โดยเร็วจะได้สีสวย) บดผงผสมน้ำผึ้งปั้นเป็นลูกกลอน
2. รับประทานกับน้ำนมโค นมแพะ ให้เอานม 1 ขวดต้มแล้วคลุกกับผงยาให้ปั้นลูกได้เท่าลูกพุทราอ่อนตากแห้ง กินวันละเม็ดก่อนนอน
3. กินกับน้ำนมควาย ต้มนมให้สุกผสมยากินเท่าเม็ดมะกล่ำ (เม็ดพริกไทย)

ข้อห้ามใช้ของหัวกวาวเครือขาว แพทย์พื้นบ้านแนะนำว่า ไม่ควรรับประทานกวาวเครือขาวมากหรือต่อเนื่องกันนานเกินไป จะทำให้มีอาการเต้านมโตเกินไป เต้านมดานแข็งเป็นก้อนและทำให้เกิดเป็นลมสาน (เนื้องอกหรืออาจเป็นมะเร็ง) ที่เต้านมได้ และสำหรับผู้ชายหากรับประทานมาก จะมีเยื่อหุ้มที่อัณฑะหนาตัวขึ้นและอาจนำไปสู่การเป็นลมสาน (มะเร็ง) ที่อัณฑะได้

ในตำรายาแผนโบราณกล่าวไว้ว่า ห้ามคนวัยหนุ่มสาวและหญิงตั้งครรภ์รับประทาน เมื่อรับประทานยานี้ห้ามรับประทานของดองเปรี้ยว ดองเค็ม และควรอาบน้ำวันละ 3 ครั้ง และห้ามตากอากาศเย็นเกินไป เมื่อรับประทานยานี้ 3-4 วัน จะทำให้เกิดอาการข้างเคียงคือ จะปวดครั่นตามเนื้อตัว ที่สะเอวและข้อต่อทุกแห่ง เมื่อมีอาการปวดดังกล่าว ให้อาบน้ำเย็นก็จะมีอาการดีขึ้นให้รับประทานยาต่อไปได้ไม่ต้องหยุดยา (หลวงอนุสารสุนทร, 2474)

องค์ประกอบทางเคมีของสารที่พบในกวาวเครือขาว

จากการศึกษาทางด้านเคมีของหัวกวาวเครือขาวพบว่ามีสารประกอบอยู่หลายชนิดที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนอีสโตรเจนจึงจัดให้อยู่ในกลุ่ม ของสาร phytoestrogens สารตัวแรกที่แยกออกมาได้คือ miroestrol (Bound and Pope, 1960) แต่เมื่อดูโครงสร้างพบว่าไม่ใช่สารจำพวกสเตียรอยด์ (steroid) (Benson, Cowie and Howsking, 1961) สารเคมีที่พบในหัวกวาวเครือขาวแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มคือ comarins isoflavone chromene และ sterol และสารตัวอื่น เช่น alkane alcohol (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารเคมีในหัวกวาวเครือขาว

สารกลุ่ม	สารเคมี	อ้างอิง
Coumarins	Coumestrol	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986, 1988
	Mirficoumestan	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1988
	Mirificoumestan glycol	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1988
	Mirificoumestan hydrate	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1988
Isoflavone	Daidzein	Ingham et al., 1986
	Daidzin (daidzen-7-o-glucoside)	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986
	Genistein	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986
	Genistin (genistein-7-o-glucoside)	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986, 1989
	Kwakhurin	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986
	Kwakhurin hydrate	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1989
	Mirificin (puerarin 6"-o-β-apiofuranoside)	Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986, Ingham et al.,1986
Isoflavone	Puerarin (diadzein-8-glucoside)	Nilandihi et al., 1957 Ingham, Tahara and Dziedzic, 1986, 1989 Ingham et al., 1986
	Puerarin 6"-monoacetate	Ingham et al., 1989
Chromene	Miroestrol	Schoeller, Dohrn and Hohweg, 1940 Bound and Pope, 1960 Jones and Pope, 1960
	Deoxymiroestrol	Chansakeaw et al., 2000
Sterol	β-sitosterol	Hoyodom, 1971
	Stigmatosterol	Hoyodom, 1971

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและผลต่อระบบสืบพันธุ์ของกวาวเครือขาว

การศึกษาทางเภสัชวิทยาของกวาวเครือขาวส่วนใหญ่เน้นไปที่การศึกษาผลคล้ายฮอร์โมนอีสโตรเจน ต่อระบบสืบพันธุ์ของผงป่นแห้งหรือสารสกัดจากหัวกวาวเครือขาว ซึ่งการทดลองเกือบทั้งหมดเป็นการศึกษาในสัตว์ทดลอง ดังนี้

จากการทดสอบโดยใช้วิธี Bioassay เมื่อให้ผงป่นแห้งจากหัวกวาวเครือขาว 1 มิลลิกรัม ให้ผลเทียบเท่ากับ ethinylestradiol ประมาณ 0.52-0.75 ไมโครกรัม โดยเปรียบเทียบจากน้ำหนักของมดลูกและปริมาณของเหลวในมดลูกของหนูแรทวัยเยาว์ (Yuthana Smitasir *et al.*, 1986) ส่วนการศึกษาในหนูแรทเพศเมียที่กินผงกวาวเครือขาวขนาด 100 มิลลิกรัม พบว่ามีผลยับยั้งการให้นมของหนูที่กำลังให้นม โดยยับยั้งการเจริญของต่อมน้ำนมและการสร้างน้ำนมคล้ายกับผลของอีสโตรเจน (จุรีภรณ์ ไชยเหล็ก และ ยุทธนา สมิตะสิริ, 2530)

นอกจากผลคล้ายฮอร์โมนอีสโตรเจนแล้ว ยังมีรายงานจำนวนมากเกี่ยวกับการศึกษาพิษวิทยาของกวาวเครือขาว โดยสามารถสกัดสารพิษออกมาจากหัวกวาวเครือขาวได้ และได้ตั้งชื่อสารพิษนั้นว่า butanin สารพิษนี้เมื่อฉีดให้กับสัตว์ทดลอง เช่น กบ หนูแรท หนูตะเภา และกระต่าย จะทำให้สัตว์มีอาการหายใจขัด ชักกระตุก และตายในที่สุด โดยที่หัวใจจะอยู่ในสภาวะที่บีบค้างอยู่ (อวย เกตุสิงห์, 2484)

ได้มีการศึกษาพิษของกวาวเครือขาวในนกกระทาญี่ปุ่น โดยผสมผงกวาวเครือขาวป่นแห้งลงในอาหารในปริมาณ 5% และ10% โดยน้ำหนักอาหาร ให้นกกระทากินติดต่อกันเวลานาน 15 30 และ 76 วัน ตามลำดับ ได้พบว่านกกระทาที่กินกวาวเครือขาวจะมีฝีหนองขึ้นตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย และมีการตายมากทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณและระยะเวลาที่ให้กวาวเครือขาวด้วย (อารี ช่วยชู และคณะ, 2527)

ได้มีการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อระบบภูมิคุ้มกัน พบว่ากวาวเครือขาวทำให้ระดับภูมิคุ้มกันต่อเม็ดเลือดแดงแกะต่ำลงในนกกระทากลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาวก่อนและพร้อมกับการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะ แต่ในกลุ่มที่ฉีดเม็ดเลือดแดงแกะก่อนได้รับกวาวเครือขาวยังคงมีระดับภูมิคุ้มกันไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังพบว่า กวาวเครือขาว 10% มีผลลดระดับภูมิคุ้มกันของนกกระทามากกว่ากวาวเครือขาว 5% และได้ศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการสร้างเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว จากการทดลองให้นกกระทาเพศผู้กินกวาวเครือขาวที่ผสมกับ อาหารไก่ 5% และ 10% พบว่ากวาวเครือขาวมีผลรุนแรงต่อระบบการสร้างเม็ดเลือดแดง โดยทำให้เปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดง (hematocrit) และความเข้มของสีเม็ดเลือดแดง (hemoglobin) ลดลง ส่วนผลต่อการสร้างเม็ดเลือดขาวยังไม่ชัดเจน แต่ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ต่ำลง แต่ชนิด neutrophil สูงขึ้น (ปกรณ์ ไทยานันท์ และคณะ, 2535)

ได้มีการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการสร้างโปรตีน แคลเซียม และโคเลสเตอรอล จากการทดลองให้นกกระทาเพศผู้และเพศเมียกินกวาวเครือขาวที่ผสมกับ อาหารไก่ 5% และ 10% พบว่า สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างปริมาณกวาวเครือขาวกับแคลเซียม และปริมาณกวาวเครือขาวกับโคเลสเตอรอลเฉพาะในนกเพศเมีย มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกวาวเครือขาวกับโปรตีน และในระยะหลังของการทดลอง ปริมาณแคลเซียม โปรตีน และโคเลสเตอรอลในเลือดนกกระทาเพศเมียมีปริมาณสูงกว่าเพศผู้ (Somboon Anuntalabhochai และ Suvit Jesrichai, 1986) ต่อมาได้มีการทำการทดลองให้นกกระทาเพศผู้กินกวาวเครือขาวที่ผสมกับ อาหารไก่ 5% และ 10% พบว่ากวาวเครือขาวมีผลทำให้นกกระทามีน้ำหนักตัวสูงขึ้น ทั้งโปรตีนรวม (total protein) อัลบูมิน (albumin) โกลบูลิน (globulin) และไขมันในเลือด (cholesterol) สูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะโกลบูลินและไขมันในเลือด (ปกรณ์ ไทยานันท์ และคณะ, 2535)

ได้มีการศึกษาผลของกวาวเครือขาวต่อการทำงานของตับในหนูแรทเพศผู้ จากการทดลองป้อนกวาวเครือขาวในปริมาณ 10 100 และ 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/ครั้ง วันละ 3 ครั้ง ให้หนูแรทเพศผู้ติดต่อกันเป็นเวลานาน 14 วัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม และผลทางด้านจุลพยาธิวิทยาของตับพบว่า มีการคั่งของเลือดใน central vein และที่ portal canal รวมทั้งขนาดของ sinusoid ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ขนาดเซลล์ตับในหนูกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือขาว 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/ครั้ง มีขนาดเล็กกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (อษธรา คันธเสรี และคณะ, 2530)

ได้มีการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของกวาวเครือขาวในหนูแรท จากการทดลองป้อนผงกวาวเครือขาวแขวนตะกอนในน้ำขนาด 10 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ให้หนูแรทเพศผู้และเพศเมีย ติดต่อกันเวลา 90 วัน พบว่าหนูทั้งสองเพศที่ได้รับกวาวเครือขาวขนาด 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน เจริญเติบโตช้ากว่ากลุ่มควบคุมและกินอาหารน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาบ่งชี้ว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีผลทำให้หนูเกิดภาวะโลหิตจางโดยมีเปอร์เซ็นต์ของเม็ดเลือดแดง จำนวนเม็ดเลือดแดงและปริมาณฮีโมโกลบิน ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญและมี % recticulocyte เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้สามารถกลับสู่ภาวะปกติได้ในหนูเพศผู้เมื่อหยุดให้กวาวเครือขาวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แต่ในหนูเพศเมียเฉพาะค่าเปอร์เซ็นต์เม็ดเลือดแดง และ %recticulocyte เท่านั้นที่กลับสู่ภาวะปกติ นอกจากนี้พบว่า กวาวเครือขาวขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดของหนูเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ การเปลี่ยนแปลงค่าชีรั่มชีวเคมีที่เด่นชัดคือ ระดับโคเลสเตอรอลลดลงอย่างมีนัยสำคัญในหนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาวทุกขนาด ส่วนเพศเมียลดลงในกลุ่มที่ได้รับกวาวเครือ

ขาวขนาด 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน ในการผ่าซากชันสูตรพบว่า หนูเพศผู้ที่ได้รับกวาวเครือขาว 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน มีน้ำหนักอัณฑะทั้งสองข้างต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ในหนูเพศเมียที่ได้รับกวาวเครือขาว 100 และ 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน ตรวจพบมดลูกมีลักษณะบวมเต่ง มีค่าของน้ำหนักที่แท้จริงและน้ำหนักสัมพัทธ์สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ทรงพล ชีวะพัฒน์ และคณะ, 2543)

ดังนั้นการศึกษาทางด้านพิษวิทยาในการศึกษาครั้งนี้ จะศึกษาผลของกวาวเครือขาวผลต่อการเจริญเติบโตโดยวัดจากน้ำหนักตัว น้ำหนักอาหารที่กิน ผลต่อระบบเลือดโดยวัดจากเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตรคริต จำนวนเม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ เช่น ลิมโฟซัยต์ โมโนซัยต์ อิโอสิโนฟิล และนิวโตรฟิล ผลต่ออวัยวะต่อการทำงานของตับและไตโดยดูจาก น้ำหนักตับ ไต ค่าทางชีวเคมีคลินิกที่แสดงถึงการทำงานของตับและไต เช่น BUN Creatinine Uric acid Cholesterol Triglyceride SGOT SGPT Alkaline phosphatase และลักษณะเนื้อเยื่อของตับ ไต ซึ่งค่าต่าง ๆ ที่ได้จากการตรวจวัดสามารถใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ผลทางพิษวิทยาได้ดังนี้

<u>การทำงานของไต</u>

ไตเป็นอวัยวะสำคัญในร่างกายที่รักษาสมดุลด้วยหน้าที่ในการขจัดและดูดซึมสารหลายชนิดทั้งชนิดที่ได้รับจากภายนอกและเกิดขึ้นในร่างกายเอง ผลการตรวจทางห้องปฏิบัติการที่ใช้ดูการทำงานของไตโดยดูจากค่า GFR คือปริมาตรของน้ำที่กรองออกจากพลาสมาผ่านผนังหลอดเลือดฝอยเข้าสู่ Bowman's spaces ใน 1 นาที การตรวจที่ใช้ประมาณค่า GFR นั้นจะตรวจสารภายในร่างกายเช่น urea และ creatinine

Blood urea nitrogen (BUN) คือความเข้มข้นของไนโตรเจนในซีรั่ม ความเข้มข้นในซีรั่มขึ้นกับการสร้าง urea ซึ่งผลิตที่ตับ และการดูดซึมกลับที่ tubules นอกเหนือจากการกรองโดย glomerulus ค่า BUN สามารถใช้ค่านี้ในการประเมินหรือติดตามภาวะ hydration การทำงานของไต การทนต่อโปรตีน และภาวะแคแทบอลิซึม

Creatinine และสารเริ่มต้น creatine เป็นสารไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในเลือด ตับสังเคราะห์ creatine ขึ้น จากนั้นสารนี้จะเข้าสู่กระแสเลือด แล้วถูกเซลล์กล้ามเนื้อเก็บเอาไว้ ส่วนหนึ่งอยู่ในรูป creatine phosphate สารในรูปแบบนี้ จะเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่ใช้ในการสร้าง ATP creatinine เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสลาย creatine และ creatine phosphate ปกติแล้วอัตราการสร้าง creatinine จะเท่ากับอัตราการขจัดออก

Uric acid เป็นสารไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนในเลือด จะสูงขึ้นในซีรั่มในภาวะหลังจากออกกำลังกายอย่างมาก ตื่นเต้น วิตกกังวลและหลังจากรับประทานอาหารที่มีไขมันมาก และจะต่ำใน

ภาวะการดูดซึมกรดยูริคกลับคืนโดยหลอดฝอยของไตลดลง (อ้างตาม วีกูล วีรานุวัตต์ และ กนกนาถ ชูปัญญา, 2525)

การทำงานของตับ

ตับเป็นอวัยวะที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย หน้าที่หนึ่งคือการสร้าง bilirubin ถูกขับออกทางท่อน้ำดีเข้าไปลำไส้ทำให้ไขมันที่เรารับประทานเข้าไปละลายง่ายขึ้นทำให้การดูดซึมดีขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลต่อการเมแทบอลิซึมของกรดอมิโน คาร์โบไฮเดรต ยาและฮอร์โมน การตรวจการทำงานของตับนั้นจะตรวจสารภายในร่างกายเช่น cholesterol triglyceride SGOT SGPT และ alkaline phosphatase

Cholesterol ไลปิดชนิดนี้มีโครงสร้างเป็นเสตียรอยด์ และเสตียรอยด์ส่วนมากก็มาจากโคเลสเตอรอล ซึ่งอยู่ในพลาสม่าเป็น 2 แบบด้วยกัน คือเป็นโคเลสเตอรอล เอสเทอร์ร้อยละ 75 โดยประกอบเป็นเอสเทอร์กับกรดไขมัน ส่วนอีกร้อยละ 25 จะอยู่ในรูปอิสระ

Triglyceride คือไลปิด ที่เป็นกลีเซอรอล ที่โมเลกุลของมันถูกทำให้เป็นเอสเทอร์ด้วยกรดไขมัน 3 โมเลกุล ไขมันของเนื้อเยื่อไขมันของร่างกายประมาณร้อยละ 95 เป็นไตรกลีเซอร์ไรด์ ซึ่งบางทีเรียกว่า neutral fat

Serum glutamic oxaolacetic acid transminase (SGOT) เอ็นซัยม์นี้ถูกใช้เป็นดัชนีบอกความผิดปกติของตับ และไวต่อการอักเสบและการตายของตับ เมื่อเซลล์ตับบาดเจ็บพร้อมกับมีการฉีกขาดของผนังพลาสม่า เอ็นซัยม์เหล่านี้จะรั่วเข้าไปในกระแสเลือดค่าของเอ็นซัยม์จะสูงขึ้นอย่างชัดเจน

Serum glutamic pyruvic acid transminase (SGPT) เอ็นซัยม์นี้ถูกใช้เป็นดัชนีบอกความผิดปกติของตับ เช่นเดียวกับ SGOT แต่ที่ตับจะมีความเข้มข้นของ SGPT มากที่สุด ดังนั้นค่านี้จะเฉพาะเจาะจงสำหรับภาวะ hepatocellular disease มากกว่า

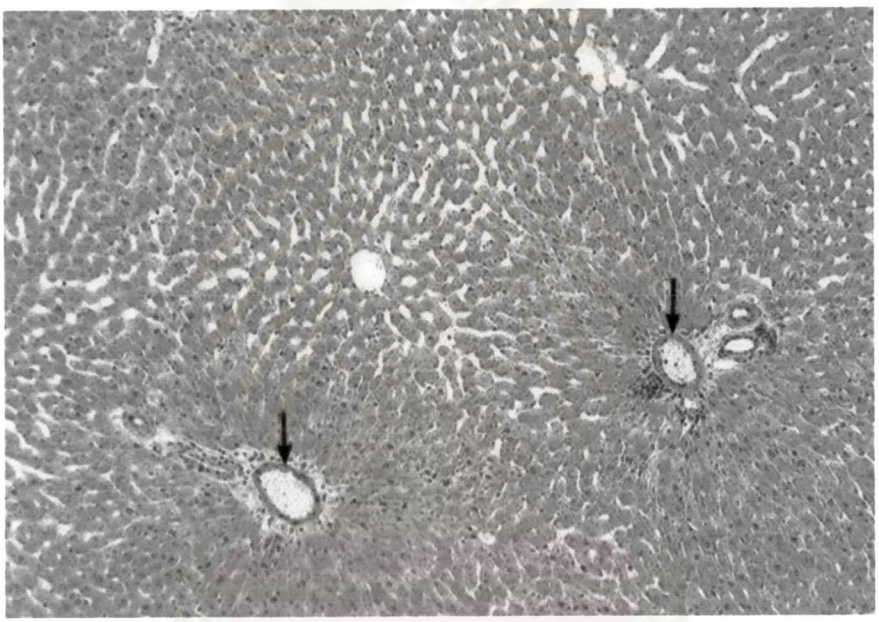
Alkaline phosphatase เอ็นซัยม์นี้ถูกใช้เป็นดัชนีบอกความผิดปกติของตับ ที่พบในเนื้อเยื่อหลายแห่งในร่างกาย รวมถึงตับ กระดูก ลำไส้เล็ก ไต รก และ เม็ดเลือดขาว ในผู้ใหญ่เอ็นซัยม์ส่วนใหญ่จะได้จากตับและกระดูก (อ้างตาม สุธาทิพย์ พิชญไพบูลย์, 2544)

ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อตับหนูแรท

ในหนูแรทโตเต็มวัยเนื้อเยื่อตับมีโครงสร้างเป็นhepatic lobule ประกอบด้วย central vein อยู่ตรงกลางและเซลล์ตับที่มีรูปร่างหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสทรงกลมอยู่ตรงกลางเซลล์ พบนิวเคลียส 1 นิวเคลียส ต่อเซลล์ หรือมากกว่า 1 นิวเคลียส เซลล์ตับเรียงตัวแนวรัศมี (radiate) ออกไปจาก central vein ในลักษณะของแท่งเซลล์ที่เรียกว่า hepatic cord ซึ่งจะมีเซลล์ตับเรียงตัวเป็นสองแถวติดกัน ระหว่าง hepatic cord เป็นทางผ่านของเลือดเรียกว่า sinusoid มีบริเวณที่

เรียกว่า portal triad มีแขนงของ hepatic artery ซึ่งเป็นหลอดเลือดแดงที่มีขนาดเล็กผนังของหลอดเลือดประกอบด้วยชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่มีความหนา portal vein เป็นเส้นเลือดขนาดใหญ่และผนังบาง และแขนงของ bile duct (รูปที่ 2)

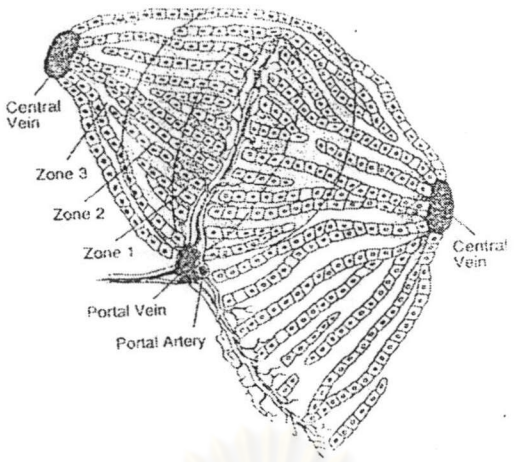
ถ้าพิจารณารูปแบบการเรียงตัวของเส้นเลือด จะได้ลักษณะโครงสร้างเป็นรูปคางหมูหรือรูปลิ่ม (hepatic acinus) ที่มีทางเดินของ portal triad เป็นด้านแคบของโครงสร้าง การมองเป็น acinus จะเห็นพื้นที่ของเซลล์ตับเป็น 3 บริเวณ ตามความใกล้ไกลจากแหล่งของเส้นเลือดที่นำออกซิเจนและอาหารเรียกเป็น zone 1, zone 2 และ zone 3 ตามลำดับ (รูปที่ 3) (Rappaport, 1963)



รูปที่ 2 ภาพแสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อตับหนูแรท แสดง central vein (v), portal vein (⟶) portal artery (a), bile duct (b)

กำลังขยาย X 40 ย้อมสี H & E

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 ภาพวาดแสดงโครงสร้างเนื้อเยื่อตับรูปแบบการเลี้ยงของเส้นเลือด เป็นรูปคางหมูหรือรูปลิ่ม (hepatic acinus) (Rappaport, 1963)

<u>ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อไตหนูแรท</u>

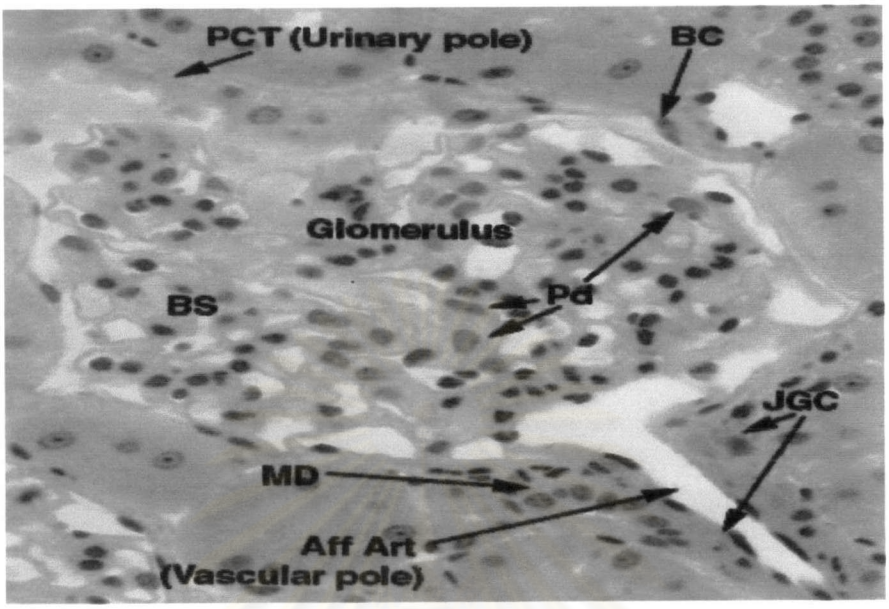
ในหนูแรทโตเต็มเนื้อเยื่อไตมีโครงสร้างแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ cortex และ medulla ในส่วน cortex ประกอบด้วย renal corpuscle เป็นท่อส่วนต้นมีปลายตันพองกลมแต่ถูกกดบุ๋มเพื่อเป็นที่ฝังของกลุ่มเส้นเลือดฝอย ประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ชนิด คือ

Bowman's capsule ลักษณะเป็นทรงกลมมีผนัง 2 ชั้น โดยผนังด้านหนึ่งเว้า ทำให้ดูคล้ายถ้วย ผนังแต่ละชั้นบุด้วยเซลล์ชั้นเดียวที่มีลักษณะแบนซึ่งเป็นเนื้อผิวชนิด simple squamous ผนังชั้นนอกเรียก parietal layer ผนังชั้นในเรียก visceral layer ซึ่งเนื้อผิวชั้นในนั้นย้อนกลับเข้าไปคลุมกลุ่มของเส้นเลือดฝอย เรียกเซลล์ในส่วนนี้ว่า podocytes

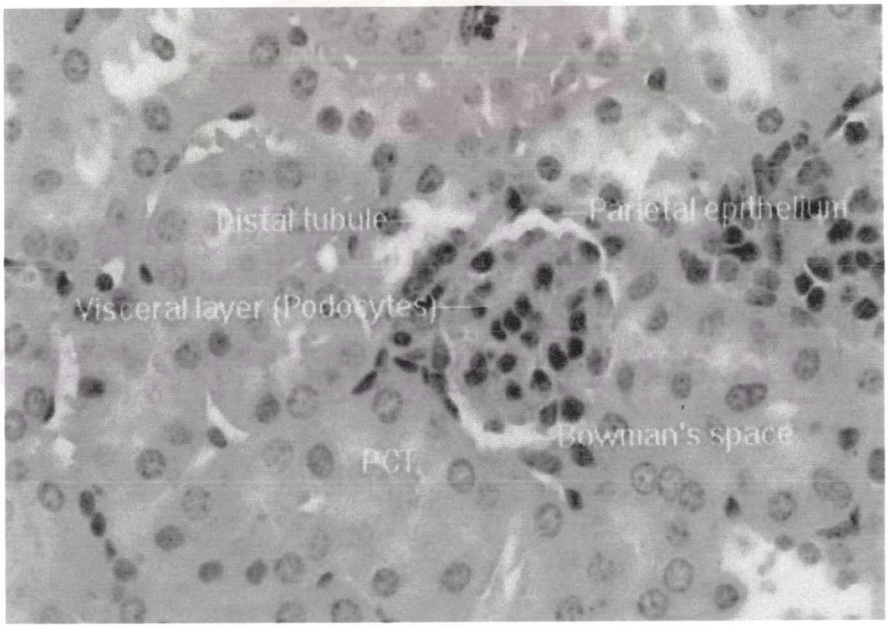
glomerulus เป็น glomerular capillaries พันกันที่แตกแขนงจาก afferent arteriole ซึ่งบุด้วย endothelial cells ส่วนของ nephron ยังประกอบด้วยส่วนที่ทำหน้าควบคุมความเข้มข้นของ urine คือ Juxtaglomerular apparatus ประกอบด้วย macula densa และ jaxtaglomerular cells (รูปที่ 4-ก)

ส่วนของท่อไต (renal tubule) ที่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ 1) proximal tubule บุด้วยเซลล์ชนิด simple, tall cuboidal epithelium ที่มี brush border (microvilli) ชัดเจน (ชิ้นเนื้อที่เตรียมมักเห็นเป็นเศษหลุดอยู่ในท่อ) ไซโตพลาสมของเซลล์ติดสีเข้ม โดยเฉพาะบริเวณฐาน nucleus กลม ขอบเขตของแต่ละเซลล์เห็นได้ไม่ชัดเจน 2) The thin segment บุด้วยเซลล์ชนิด simple squamous ไม่มี brush border แต่อาจพบ microvilli สั้น ๆ อยู่ประปราย nuclei โป่งนูนเข้าหากลางท่อ ลักษณะของท่อบริเวณนี้ดูคล้ายเส้นเลือดฝอย 3) Distal tubule บุด้วยเซลล์ชนิด low cuboidal epithelium ไม่มี brush border ทำให้เห็น lumen กว้าง nuclei กลมเล็ก ขอบเขตของแต่ละเซลล์เห็นไม่ชัดเจน ไซโตพลาสมติดสีจางกว่า อาจมี microvilli สั้น ๆ ประปรายหรือไม่มี ต่อ

จาก renal tubule คือท่อ collecting tubule บุด้วยเซลล์ชนิด simple cuboidal มีขอบเขตแต่ละเซลล์ชัดเจน นิวเคลียสกลมติดสีเข้ม ส่วนไซโตพลาสมติดสีชีดใส (รูปที่ 4-ข)



รูปที่ 4-ก ภาพแสดงลักษณะเนื้อเยื่อไตของหนูแรท แสดง Bowman's man capsule (BC) jaxtaglomerular cells (JGC), macula densa (MD), podocytes (Pd), basal striation (BS), proximal tubule (PCT), Afferent arteriole (Aff Art)
กำลังขยาย 400 เท่า ย้อมสี H&E



รูปที่ 4-ข ภาพแสดงลักษณะเนื้อเยื่อไตของหนูแรท แสดง proximal tubule (PCT)
กำลังขยาย 40 เท่า ย้อมสี H&E

ผลของ phytoestrogens ต่อระบบสืบพันธุ์

จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นเป็นผลของผงปนแห้งและสารสกัดหยาบจากหัวกวาวเครือขาวที่มีฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนอีสโตรเจน ต่อระบบสืบพันธุ์ ภายหลังพบว่าสาร phytoestrogens อื่น ๆ สามารถแสดงผลคล้ายฮอร์โมนอีสโตรเจนต่อระบบสืบพันธุ์ได้เช่นกัน เมื่อฉีด miroestrol ให้หนูแรทที่ตัดรังไข่ เพื่อเปรียบเทียบกับอีสตราไดออลและอีสโตรน พบว่า miroestrol มีอิทธิพลต่อการเจริญของต่อมน้ำนมเป็น 0.7 เท่าของอีสตราไดออล และ 2.2 เท่าของอีสโตรน (Benson *et al.*, 1961) เมื่อฉีด miroestrol เปรียบเทียบกับอีสตราไดออล 17 เบต้า เข้าใต้ผิวหนังหนูไมซ์วัยเยาว์ พบว่า miroestrol มีฤทธิ์เพิ่มน้ำหนักมดลูกเป็น 1.013 เท่า ของอีสตราไดออล 17 เบต้า (Lakshnakara Kashemsanta *et al.*, 1963) และเมื่อฉีด miroestrol ให้หนูไมซ์อายุ 4-5 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 วัน ติดต่อกันพบว่า มดลูกของหนูเหล่านี้โตขึ้นกว่าหนูปกติ 4-5 เท่า และเส้นเลือดที่มาเลี้ยงขยายใหญ่จนเห็นได้ชัดเจน (Jones and Pope,1960) เมื่อให้ miroestrol แก่หนูไมซ์วัยเยาว์ทางปาก แล้วตรวจ vaginal cornification พบว่าไมโรเอสตรอลจะออกฤทธิ์เป็น 0.66 เท่าของstilboestrol เมื่อให้ coumestrol แก่หนูไมซ์และหนูแรทพบว่า coumestrol สามารถลดอัตราการตกไข่ในหนูไมซ์ (Fredricks *et al.*, 1981) เพิ่มน้ำหนักมดลูกและยืดระยะอีสตรัสในหนูแรท ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่ง LH เพิ่มขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยอีสโตรเจน (Whitten *et al.*, 1993; Medlock *et al.*, 1995) จากรายงานการศึกษาผลของ phytoestrogens ในคน พบว่าผู้หญิงอายุระหว่าง 20-29 ปีเมื่อได้รับสารพวก isoflavones จากถั่วเหลืองซึ่งเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มของ phytoestrogens จะยืดระยะ follicular ของรอบประจำเดือนรวมทั้งยืดระยะเวลาที่ระดับฮอร์โมน progesterone เพิ่มขึ้นสูงสุด และลดระดับ LH และ FSH ในพลาสมา (Cassidy *et al.*, 1994; 1995) ในทางตรงกันข้ามจากรายงานที่ได้ทำการศึกษาผลของ phytoestrogens ในผู้หญิงสูงอายุที่ได้รับ phytoestrogens จากถั่วเหลืองทุกวันเป็นเวลานาน 6 สัปดาห์ พบวาไม่มีผลต่อระดับ LH และ FSH ในพลาสมา แม้ว่าจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ที่ช่องคลอด (Wilcox *et al.*, 1990; Baird *et al.*, 1995) และอาการร้อนวูบวาบ (hotflushes) (Adlercreutz, 1992; Knight and Eden, 1996)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับผลของกวาวเครือขาว และ phytoestrogens ต่อการเปลี่ยนแปลงของระบบสืบพันธุ์ จึงได้มีความสนใจศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของอีสโตรเจน ในปัจจุบันพบว่าตัวรับของอีสโตรเจนมีอยู่ 2 ชนิด คือ ER- α และ ER-β สำหรับ ER- α ถูกค้นพบก่อนโดยมีการถอดและแปลรหัสมาจากดีเอนเอบนโครโมโซมคู่ที่ 6 (Parker *et al.*, 1993) ส่วน ER-β ถูกค้นพบโดยมีการถอดและแปลรหัสมาจากดีเอนเอบนโครโมโซมคู่ที่ 14 (Kuiper *et al.*, 1996) นอกจากนั้นยังพบว่าสาร phytoestrogens มีความสามารถในการจับ (affinities) ต่อ ER-β มากกว่า ER- α (Kuiper *et al.*, 1997) เมื่ออีสโตรเจนเข้าสู่เซลล์ และจับกับตัวรับอีสโตรเจนที่อยู่

ในนิวเคลียสเกิดเป็น estrogen-receptor complex ซึ่งจะมีการปรับเปลี่ยนรูปทรงที่เรียกว่า conformational change ทั้งนี้ estrogen-receptor จะจับกันเป็นคู่ที่เรียกว่า dimerization โดยอาจจะจับกันเป็นลักษณะของ homodimer เช่น ER- α กับ ER- α หรือ ER-β กับ ER-β หรือจับกันเป็นลักษณะของ heterodimer เช่น ER- α กับ ER-β และเข้าจับกับดีเอ็นเอ ตรงตำแหน่ง estrogen responsive element (ERE) และกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ messenger RNA (mRNA) ซึ่งจะออกจากนิวเคลียสเข้าสู่ไซโตพลาสมและจับกับไรโบโซม (ribosome) และเกิดการสังเคราะห์โปรตีนซึ่งจะมีผลให้เกิดฤทธิ์ของอีสโตรเจนต่อไป (Speroff *et al.*, 1999) และจากการศึกษาในระดับโมเลกุลในปลายศตรวรรษที่ 20 ทำให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอีสโตรเจน ที่มีผลต่อเซลล์ต่างชนิดกันแตกต่างออกไปมากขึ้น เมื่ออีสตราไดออลจับกับตัวรับอีสโตรเจนตรงตำแหน่ง hormone binding domain จะกระตุ้นให้ estrogen-receptor complex มีการเปลี่ยนรูปทรงและเข้าจับกับดีเอ็นเอ และเกิดกระบวนการทรานสคริปชัน ซึ่งต่างจาก pure estrogen antagonist ที่เมื่อเข้าจับกับตัวรับอีสโตรเจนตรงตำแหน่งเดียวกัน จะป้องกันการเกิด dimerization ทำให้ไม่สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอ และไม่สามารถแสดงฤทธิ์ของอีสโตรเจนได้ (Fawell *et al.*, 1990) นอกจากนี้ ICI 182, 780 (estrogen antagonist) ยังป้องกันไม่ให้ตัวรับอีสโตรเจนซึ่งเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ในไซโตพลาสม เข้าสู่นิวเคลียส จึงเกิดการสะสมอยู่ในไซโตพลาสม และเกิดการสลายตัว (autolysis) ในที่สุด (Wolf *et al.*, 1995) ความสลับซับซ้อนของกลไกดังกล่าวอยู่ตรงที่มีสารบางกลุ่มที่ออกฤทธิ์คล้ายอีสโตรเจนในบางเซลล์ และออกฤทธิ์ต้านอีสโตรเจนในเซลล์อื่น ๆ ที่เรียกว่า Selective estrogen receptor modulators หรือ SERMs ได้แก่ tamoxifen และ raloxifene เป็นต้น (Labrie, 1992; MacGregor *et al.*, 1998; Goldstein *et al.*, 1998; Speroff *et al.*, 1999) การแสดงผลในการตอบสนองที่ต่างกันของ estrogen agonist และ estrogen antagonistในเซลล์ชนิดเดียวกันและ/หรือ เซลล์ต่างชนิดกัน อาจมีผลมาจาก

1) ชนิดของตัวรับอีสโตรเจน

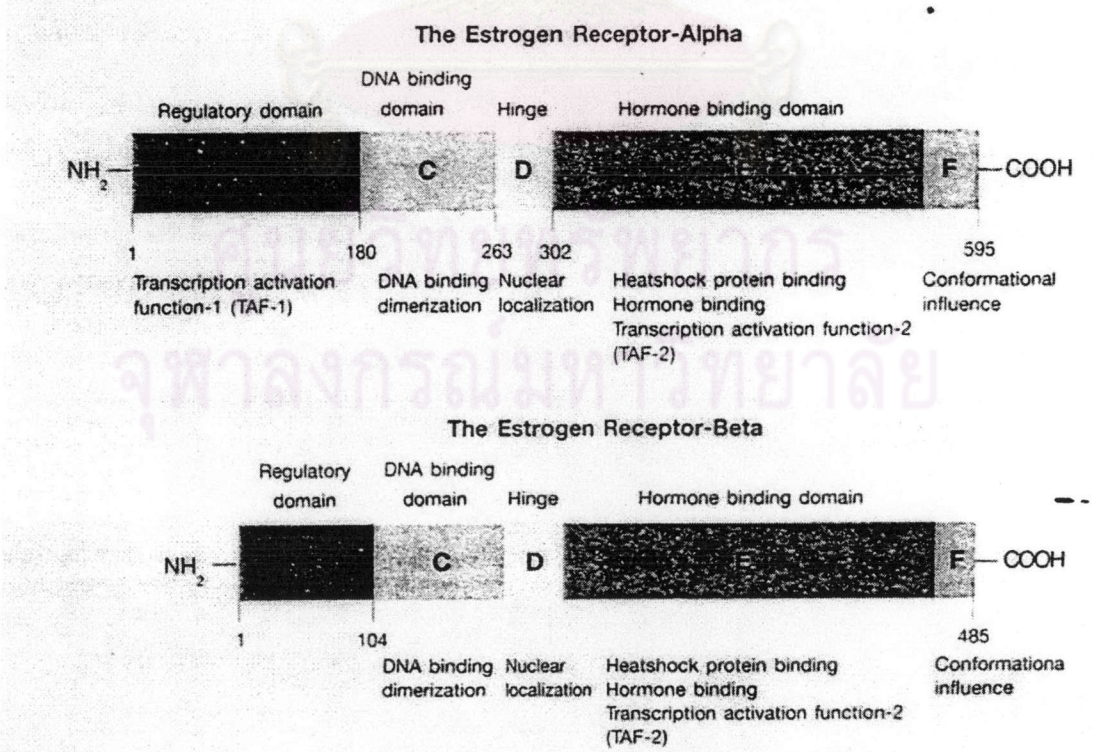
ตัวรับอีสโตรเจน ทั้งชนิด ER- α กับ ER-β มีส่วนของ DNA-binding domain และ estrogen binding domain ที่คล้ายคลึงกัน ต่างกันก็ตรงที่จำนวนกรดอะมิโนในแต่ละบริเวณที่มีมากน้อยไม่เท่ากัน (Speroff *et al.*, 1999) รูปที่ 5 จึงทำให้ตัวรับทั้งสองชนิดมีผลต่อกระบวนการทรานสคริปชันแตกต่างกันไป ขึ้นกับว่าในเซลล์นั้นมีเฉพาะ ER- α หรือ ER-β หรือมีทั้ง ER- α และ ER-β ในสัดส่วนมากน้อยต่างกันอย่างไร เมื่อเกิดการจับกันของอีสโตรเจนกับตัวรับ เกิดเป็น estrogen-receptor complex และเข้าจับกับดีเอ็นเอการเข้าจับนั้นเป็น homodimer หรือ heterodimer นอกจากนี้สารที่ต่างกันเมื่อเข้าจับกับตัวรับอีสโตรเจนที่ต่างกัน อาจมีผลกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการทรานสคริปชันของดีเอ็นเอได้

2) Transcription activation function (TAF)

ในส่วนปลายด้าน N-terminal A/B domain ของตัวรับอีสโตรเจน มีบริเวณที่เรียกว่า transcripton activation function-1 (TAF-1) และในส่วน estrogen binding domain มีบริเวณที่เรียกว่า TAF-2 ทั้ง TAF-1 และ TAF-2 เป็นบริเวณที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการทรานสคริปชันบนดีเอ็นเอ TAF ทั้งสองจะมีปฏิกิริยาต่อสารที่มาจับกับตัวรับอีสโตรเจนแตกต่างกันไป และยังมีผลแตกต่างกันตามชนิดของตัวรับอีสโตรเจน ว่าเป็น ER- α หรือ ER-β แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของบทบาทของสารในกลุ่ม SERMs ต่อเซลล์ซึ่งมี ER- α ER-β TAF-1 และ TAF-2 ที่แตกต่างกันไป (Brzozowski *et al.*, 1997; Shiau *et al.*, 1998; Kuiper *et al.*, 1999)

3) Estrogen responsive element (ERE) และ alternative pathway

กลไกต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้น เป็นกระบวนการที่ดำเนินผ่านทาง estrogen-receptor complex ซึ่งจับกับดีเอ็นเอบน estrogen responsive element อย่างไรก็ตาม ฤทธิ์ของสารในกลุ่ม SERMs สามารถดำเนินผ่านทางกลไกที่ไม่ต้องอาศัย ERE ซึ่งมีชื่อเรียกโดยรวมว่า indirect หรือ non-classical mechanism (Kuiper *et al.*, 1999) กล่าวโดยสรุปผลของ SERMs ว่าจะแสดงฤทธิ์ของ estrogen agonist หรือ estrogen antagonist ต่อเซลล์ต่าง ๆ จะแตกต่างกันไปตามกลไกที่ทำปฏิกิริยาว่าเป็นกลไกโดยตรงหรือโดยอ้อม



รูปที่ 5. แสดงบริเวณต่าง ๆ ในโมเลกุลของตัวรับอีสโตรเจนชนิด ER- α และ ER-β

<u>รอบวงสืบพันธุ์ของหนูแรท</u>

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทเพศเมีย (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์วิสตาร์ (Wistar) เป็นสัตว์ทดลองเนื่องจากหนูแรทมีขนาดใหญ่และทนทานต่อการทดลอง หนูแรทมีอายุพร้อมผสมพันธุ์ที่อายุประมาณ 100 วัน และมีอายุยืน (life-span) 3-3.5 ปี (ปานเทพ รัตนากรม, 2535) จากการศึกษาของ Aschheim (1961) และ Huang and Meites (1975) พบว่าหนูแรทเริ่มเข้าสู่สภาวะ aging เมื่ออายุได้ประมาณ 8-12 เดือน หรืออายุที่น้อยกว่านี้ ลักษณะที่บ่งชี้ว่าหนูแรทเริ่มเข้าสู่สภาวะ aging คือ เมื่อทำ vaginal smear พบว่ารอบวงสืบพันธุ์ของหนูแรทจะค่อย ๆ เปลี่ยน จากรอบวงสืบพันธุ์ปกติ เป็นรอบวงสืบพันธุ์ที่ผิดปกติและจากนั้นจะพบระยะอีสตรัสติดต่อกันเป็นเวลานาน หลังจากนั้นจึงเข้าสู่สภาวะท้องเทียมที่ทำ vaginal smear จะพบเฉพาะเซลล์ leukocyte และท้ายที่สุดจะไม่พบรอบวงสืบพันธุ์เลย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงใช้หนูแรทโตเต็มวัยเพศเมียอายุ 100 วัน และพบรอบวงสืบพันธุ์ปกติติดต่อกัน 3 รอบวงก่อนทำการทดลองเป็นตัวแทนของหนูวัยเจริญพันธุ์ และหนูแรทแก่เพศเมียอายุ 1 ปี และพบรอบวงสืบพันธุ์ที่ผิดปกติ ก่อนทำการทดลองเป็นตัวแทนของหนูแก่ ในการศึกษาผลของกวาวเครือขาวที่มีต่ออวัยวะสืบพันธุ์และฮอร์โมนเพศในหนูแรทโตเต็มวัยและหนูแรทแก่เพศเมีย

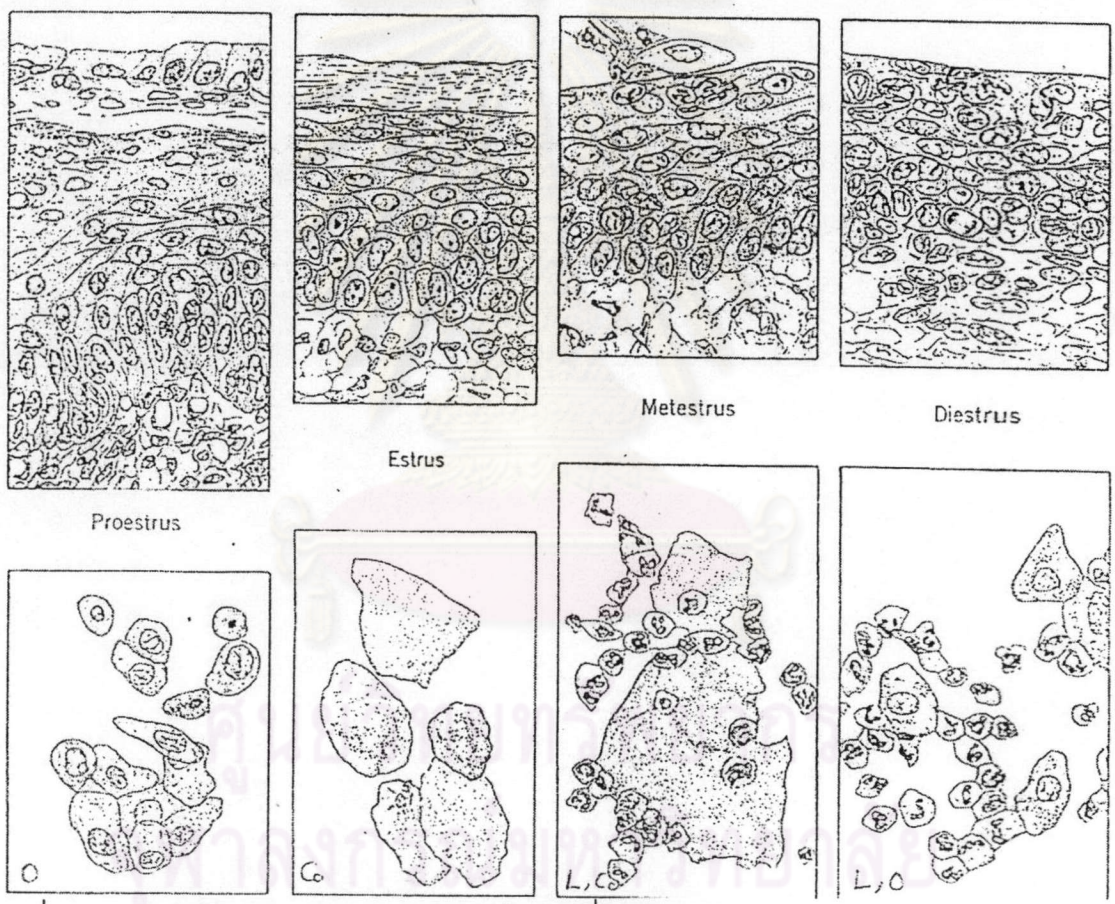
รอบวงสืบพันธุ์ (estrous cycle) ของหนูแรทแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้ (Long and Evans, 1922)

1.ระยะอีสตรัส (estrus) เป็นระยะเดียวที่หนูเป็นสัด (heat) และยอมให้หนูตัวผู้เข้าผสมพันธุ์ได้ ในระยะนี้ follicle ในรังไข่จะเติบโตขึ้นอย่างรวดเร็วจากการกระตุ้นของ FSH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) ซึ่งถูกกระตุ้นโดย GnRH จากสมองส่วน hypothalamus อีกทีหนึ่ง follicle จะหลั่งอีสโตรเจนออกมามาก ทำให้มดลูกมีขนาดโต ขยายใหญ่ เพราะมีปริมาณน้ำมาก เซลล์ที่ vaginal mucosa แบ่งตัวแบบ mitosis อย่างรวดเร็ว ทำให้มีเซลล์ใหม่เกิดขึ้นมาก ดันให้เซลล์อยู่ผิวนอกเปลี่ยนเป็นเซลล์แบบ squamous และ cornified cells หลุดออกมาที่ vaginal lumen ดังนั้นเมื่อทำการ vaginal smear ในช่วงต้นของระยะ estrus จะพบ cornified cells ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีลักษณะบางและมักไม่มีนิวเคลียส อาจจะพบเป็นเซลล์เดี่ยว หรืออยู่รวมกันเป็นกระจุก ส่วนในช่วงปลายของระยะ estrus จะพบ cornified cells ที่นิวเคลียสสลายไปรวมกันเป็นก้อนแข็ง ๆ ที่ vagina และอาจพบเม็ดเลือดขาว (leucocyte) บ้างเล็กน้อย การตกไข่ (ovulation) เกิดขึ้นในช่วงต้นของระยะ estrus นี้ หลังการตกไข่จะเกิด luteinization ของ follicle เปลี่ยนเป็น corpus luteum ขณะเดียวกันมดลูกจะมีขนาดเล็กลงเพราะเกิดการสูญเสียน้ำ

2. ระยะเมตอีสตรัส (metestrus) เป็นระยะที่เกิดขึ้นหลังการตกไข่ ภายในรังไข่มี corpus luteum และ follicle ขนาดเล็ก ขณะที่มดลูกหนูมีการหดตัวลดลง และมีเลือดไปเลี้ยงน้อยลง ที่ vaginal lumen จะมีเม็ดเลือดขาว (leukocyte) จำนวนมากและมี cornified cells บ้างเล็กน้อย

3. ระยะไดอีสตรัส (diestrus) เป็นระยะที่ corpus luteum ในรังไข่สลายตัว (functional regression) มดลูกมีขนาดเล็ก เลือดไปเลี้ยงน้อย และหดตัวเล็กน้อย vaginal mucosa บาง ทำให้เม็ดเลือดขาวผ่านออกมาสู่ vaginal lumen ได้ง่าย ในระยะนี้จะพบเม็ดเลือดขาวในการทำ vaginal smear

4. โปรอีสตรัส (proestrus) ระยะนี้ในรังไข่จะมี follicle ขนาดใหญ่พร้อมที่จะมีการตกไข่ (preovulatory swelling) เริ่มมีน้ำในมดลูก และมดลูกเริ่มหดตัวมากขึ้น เกิดการหนาตัวของ epithelium cell ที่ vagina ในการทำ vaginal smear จะพบเซลล์ค่อนข้างกลม เห็นนิวเคลียสชัดเจน เรียกว่า nucleated cell ซึ่งอาจจะพบอยู่เดี่ยว ๆ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ไม่พบเซลล์เม็ดเลือดขาวเลย



รูปที่ 6 แสดงเซลล์ในระยะต่าง ๆ ของรอบวงสืบพันธุ์ที่ตรวจพบจากการทำ vaginal smear

O = nucleated cell ที่ตรวจพบในระยะ proestrus

C_o = cornified cell ที่ตรวจพบในระยะ estrus

L = leukocyte cell ที่ตรวจพบในระยะ metestrus และ diestrus

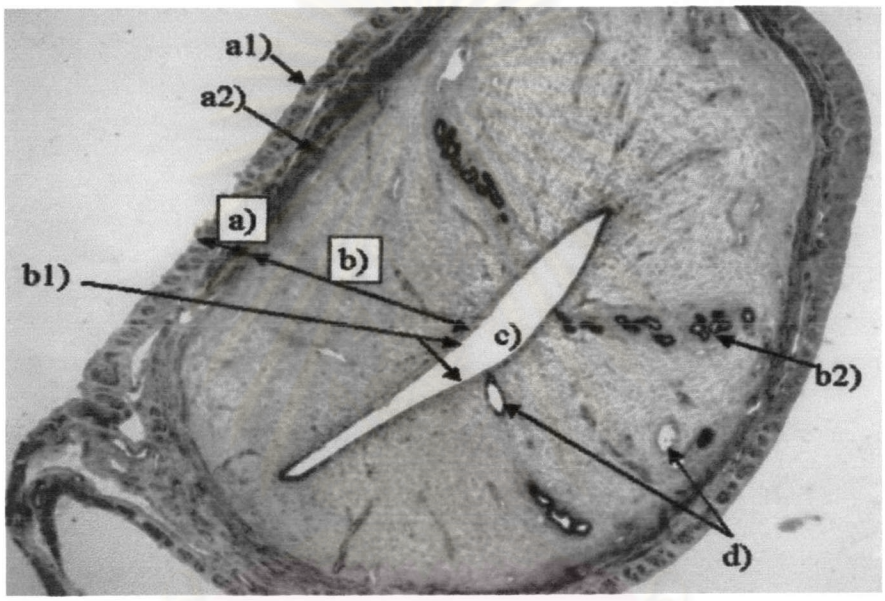
โครงสร้างผนังของมดลูกของหนูแรทแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ (รูปที่ 7)

mucosa อยู่ในสุดเรียก endometrium ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงตาม ovarian cycle บุด้วยเซลล์ชนิด simple columnar epithelium มี connective tissue stroma ที่มีเส้นเลือดจำนวนมาก

รองรับ ในชั้นนี้ มี simple tubular gland หรือเรียกว่า uterine gland ลักษณะดังกล่าวทำให้แบ่งชั้น endometrium ออกเป็น 2 บริเวณ ซึ่งมีโครงสร้างและหน้าที่ต่างกัน คือ บริเวณแรกหนาอยู่ด้านบนและลอกหลุดในระยะ menstrual phase เรียกว่า function layer บริเวณที่สองบางกว่าอยู่ติดกับชั้นกล้ามเนื้อเรียบและจะคงอยู่ตลอดไปไม่เปลี่ยนแปลงคือ basal layer

muscular coat เรียก myometrium มี smooth muscle เรียงตัวกันหลายชั้น แบ่งชั้นไม่ได้ชัดเจน ชั้นนี้หนามาก

serosa หรือ perimetrium เป็นเนื้อประสานชนิด loose areolar และเป็นส่วนที่คลุมด้วย serous membrane (mesothelium)



รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะโครงสร้างผนังของมดลูกของหนูแรทโตเต็มวัย แสดง ชั้น myometrium (a) ที่ประกอบด้วย circular muscle (a1) และ longitudinal muscle (a2) ชั้น endometrium (b) และ uterine lumen (c)
กำลังขยาย 40 เท่า ย้อมสี H&E

โครงสร้างรังไข่ของหนูแรทแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ (รูปที่ 8)

cortex คือ ผิวส่วนนอกที่มี follicle ฝังอยู่จำนวนมาก

medulla อยู่ถัดเข้ามามีเส้นเลือดและเส้นประสาทจำนวนมาก มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เป็นชนิด loose fibroelastic tissue ประกอบขึ้นเป็น stroma ของรังไข่ ที่ผิวของรังไข่แต่ละข้าง มีเนื้อผิวชนิด simple cuboidal บุอยู่ เรียกว่า germinal epithelium และใต้เนื้อผิวนี้มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรองรับอยู่เป็นชั้นหนาเรียกว่า tunica albuginea ส่วน ovarian follicle ที่

พบในส่วน cortex ของรังไข่มีชนิดต่าง ๆ กันตามอายุของการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. primodial follicles เป็น follicle ที่ประกอบด้วย primary oocyte 1 เซลล์และมีเซลล์แบน ๆ เรียก follicular cell ล้อมรอบชั้นเดียว นิวเคลียส มีขนาดใหญ่และไม่อยู่บริเวณกลางเซลล์ (eccentric)

2. growing follicles แบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

2.1 primary follicle (early และ late) ประกอบด้วย primary oocyte ซึ่งมีขนาดใหญ่ขึ้น มี zona pellucida หุ้มโดยรอบ และ follicular cell ขนาดใหญ่ขึ้นมีลักษณะเป็น cuboidal cell เรียงตัวรอบ oocyte เริ่มตั้งแต่เซลล์ชั้นเดียว (early) ต่อมาเพิ่มเป็นหลายชั้น (late)

2.2 secondary หรือ antral follicle มีขนาดใหญ่ขึ้น follicular cell เรียงตัวหลายชั้น เรียกว่า membrana granulosa ในระหว่างเซลล์เริ่มพบช่องว่าง ที่มี fluid ขังอยู่ เรียกว่า antrum เกิดขึ้นเป็นหย่อม ๆ และ connective tissue stroma เจริญมาล้อมรอบ follicular cell ซึ่งเปลี่ยนเรียกชื่อใหม่ว่า theca folliculi ส่วน oocyte เจริญเติบโตเต็มที่มีขนาดใหญ่และอยู่ด้านข้าง follicle โดยมีกลุ่ม granulosa cells ที่เรียกว่า cumulus oophorus ยึดติดกับผนังของ follicle

3. mature หรือ graafian follicle เป็น follicle เจริญเติบโตเต็มที่ พบเรียงตัวอยู่บริเวณผิว cortex ของรังไข่ประกอบด้วย

- secondary oocyte ลอยอยู่ใน fluid (liquor folliculi) มี zona pellucida และ corona radiata ล้อมรอบ
- membrana granulosa อยู่ที่ขอบของ follicle ซึ่งเมื่อถึงเวลาตกไข่ membrana granulosa จะแตกและ secondary oocyte หลุดออกไป
- theca folliculi เห็นชัดเจนทั้ง 2 ชั้น

หลังการตกไข่แล้ว follicle จะแฟบลง ภายในมีเลือดขังอยู่และผนังของ follicle เรียงตัวกันใหม่กลายเป็น corpus luteum ซึ่งมีสีเหลือง (yellow body) ภายใน corpus luteum ประกอบด้วย

- granulosa lutein cells เป็นเซลล์ของชั้น membrana granulosa ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น
- theca lutein cells คือ เซลล์ของ theca interna layer เดิมที่เปลี่ยนแปลงมีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์เหล่านี้พบอยู่ขอบนอกของ corpus luteum
- theca externa เดิมมี blood capillaries อยู่มาก ต่อมาเส้นเลือดฝอยเหล่านั้นแทรกเข้าไปอยู่ระหว่าง 2 ชั้นแรก

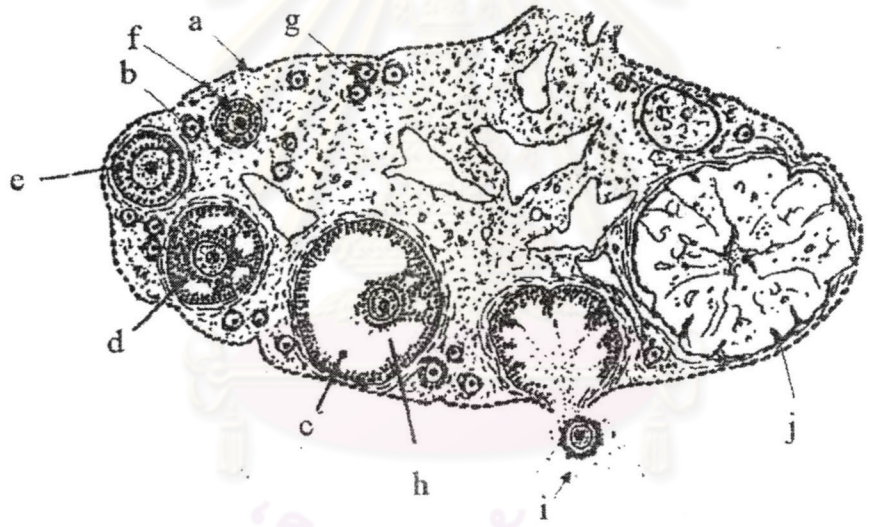
ถ้าไข่ไม่ถูกผสม corpus luteum จะฝ่อกลายเป็น corpus albicans โดย lutein cells มีขนาดเล็กลงและเสื่อมสลายไป ต่อมามีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเข้ามาแทนที่ให้เป็น fibrous tissue ที่มีสีขาวคล้ายแผลเป็น fresh tissue

ในรังไข่นอกจากจะพบ ovarian follicle แล้ว ยังพบ atretic follicle ซึ่งเป็น follicle ที่เสื่อม โดยมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นอยู่กับชนิดของ follicle ดังนี้

- oocyte มีการเสื่อมสลาย โดยเริ่มจากนิวเคลียสติดสีเข้ม ไซโตพลาสมขุ่นพร้อมกับเริ่มมี strands ของ vascularized connective tissue แทรกเข้าไปใน granulosa layer

- granulosa cell มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบหลุดออกมาจาก basement membrane เข้าไปอยู่ใน antrum ของ follicle มี hypertrophy ของ theca interna cells เกิดการแฟบลงของ follicle และมีการแทรกของเนื้อประสานเข้าไปอยู่ในโพรงของ follicle ส่วน zona pellucida พับแฟบลงและค่อย ๆ แตกสลายเข้าไปอยู่ในโพรงของ follicle เช่นกัน

- basement membrane ของ granulosa cell แยกออกจากชั้น theca interna และหนาขึ้นเรียก glassy membrane มีลักษณะเป็น wavy hyaline layer ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของการเสื่อมสลาย ต่อมา follicle จะสลายไปและมีเนื้อประสานเข้ามาแทนที่



รูปที่ 8 ภาพวาดลักษณะเนื้อเยื่อรังไข่ของหนูแรท แสดง superficial epithelium (a) stroma (b) graafian follicle (c) tertiary follicle (d) secondary follicle (e) primary follicle (f) primordial follicle (g) antrum (h) oocyte (i) corpus luteum (j)

ความสัมพันธ์ของมะเร็งเต้านมและกวาวเครือขาว

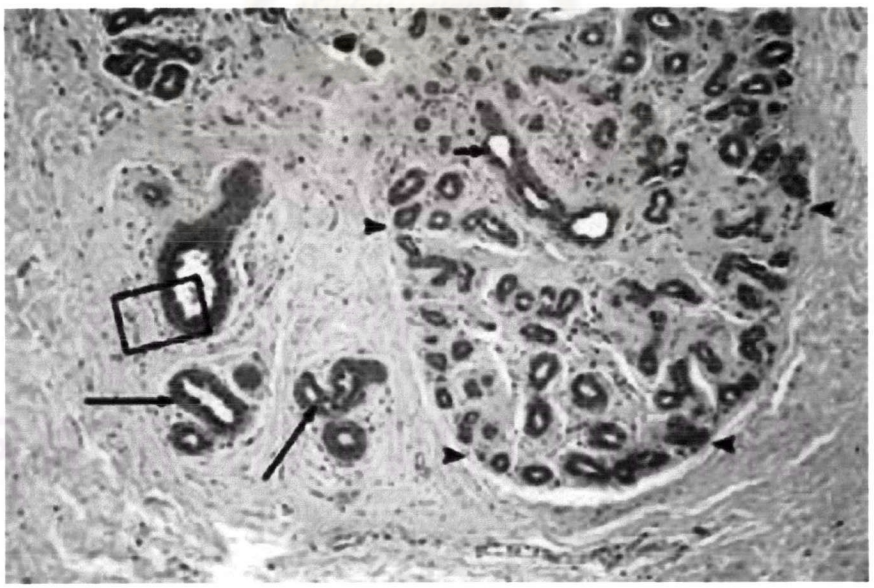
จากรายงานการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของอีสโตรเจนที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าสารที่พบใน กวาวเครือขาว และสารในกลุ่ม phytoestrogens นอกจากจะมีฤทธิ์เช่นเดียวกับอีสโตรเจน คือเป็น estrogen agonist แล้วยังสามารถยับยั้งการออกฤทธิ์ของอีสโตรเจน คือ เป็น estrogen antagonist ได้ด้วยและเนื่องจากความสัมพันธ์ของอีสโตรเจน และการเกิดมะเร็งเต้านม มาจากข้อมูลทางระบาดวิทยาที่พบว่าสตรีมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมมากกว่าบุรุษ 100-180 เท่า (Speroff *et al.*, 1999; Boring *et al.*, 1993) สตรีที่มีช่วงระยะเวลาที่รังไข่สร้างอีสโตรเจนได้นานกว่า จะมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมสูงขึ้น (Hortobagyi, 1998; Kelsey *et al.*, 1991) และอุบัติการของมะเร็งเต้านม มีความแตกต่างกันในแต่ละภูมิภาค โดยพบว่า ประชากรในแถบทวีปอเมริกา และยุโรปเหนือ มีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านมสูงกว่าประชากรทางเอเชียและแอฟริกา ทั้งนี้เชื่อว่าความแตกต่างทางด้านโภชนาการและการดำเนินชีวิต เป็นปัจจัยที่สำคัญต่ออุบัติการที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีรายงานที่แสดงให้เห็นว่าสตรีชาวเอเชียที่ย้ายถิ่นฐานไปอาศัยในประเทศสหรัฐอเมริกา มีอุบัติการของมะเร็งเต้านมสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยเฉพาะคนในรุ่นต่อ ๆ มา จนเทียบเท่าอุบัติการของคนผิวขาวในสหรัฐอเมริกา (Lippman, 1998) ในส่วนของปัจจัยทางโภชนาการ มีรายงานว่าการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดมะเร็งเต้านมในสตรีวัยหมดระดู (Lippman, 1998; Howe *et al.*, 1990) การรับประทานอาหารที่มีแคลอรี่สูง การบริโภคเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ทุกวัน พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็งเต้านมเช่นกัน (Lippman, 1998; Longnecker, 1994) ในทางตรงกันข้ามมีหลักฐานว่า สตรีชาวเอเชียซึ่งบริโภคอาหารที่มี phytoestrogens สูง เช่น อาหารจำพวกถั่วเหลือง มีอุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมต่ำกว่าสตรีในประเทศทางแถบตะวันตก ซึ่งบริโภคอาหารที่มี phytoestrogens ต่ำ (Ingram *et al.*, 1997) เมื่อทำการศึกษาในคนไข้ที่เป็นมะเร็งเต้านม พบว่า เมื่อให้สารกลุ่ม phytoestrogens เช่น diadzein equol enterodiol enterolactone และ matairesinol จะทำให้อุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมลดลง (David *et al.*, 1997) มีรายงานว่าในประเทศญี่ปุ่นมีอุบัติการณ์ของมะเร็งเต้านมและต่อมลูกหมากต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากว่าคนญี่ปุ่น ได้รับ phytoestrogens จากการบริโภคผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองอยู่เป็นประจำ โดยคิดเปรียบเทียบจากการบริโภคและการขับสาร phytoestrogens ออกมาทางปัสสาวะ รวมทั้งการเกิดมะเร็งที่สัมพันธ์กับฮอร์โมนระหว่างชาวฟินแลนด์ อเมริกัน และญี่ปุ่น พบว่าคนญี่ปุ่นซึ่งมีการขับถ่าย phytoestrogens ออกมาในปริมาณมากที่สุดนั้นมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งต่ำที่สุด (Adlercreutz *et al.*, 1991)

ในปี พ.ศ. 2536 มีรายงานถึงอุบัติการของมะเร็งในสตรีไทย โดยพบอุบัติการของมะเร็งเต้านมมากเป็นอันดับ 2 (16.3 ต่อ 100,000 รายต่อปี) รองลงมาจากมะเร็งปากมดลูก อย่างไรก็ตามมีข้อมูลที่แสดงถึงแนวโน้มที่จะพบอุบัติการของมะเร็งเต้านมสูงขึ้นดังเช่น การสำรวจระหว่างปี

พ.ศ. 2526-2530 ในจังหวัดเชียงใหม่ซึ่งพบอุบัติการ 13.7 ต่อ 100,000 รายต่อปี โดยเพิ่มขึ้นเป็น 16.9 ต่อ 100,000 รายต่อปี ในระหว่างปี พ.ศ. 2531-2534 (Parkin and Muir, 1992) ทั้งนี้พบแนวโน้มในลักษณะเดียวกันในประเทศสิงคโปร์ จีนและญี่ปุ่น (Yuan *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 1992 and Kato *et al.*, 1992) เชื่อว่า ส่วนหนึ่งอาจเนื่องมาจากพฤติกรรมการเจริญพันธุ์และการบริโภคที่เปลี่ยนไป โดยมีรายงานว่าคนไทยรับประทานอาหารที่มีแคลอรี่ เนื้อ และไขมันมากขึ้น (Vatanasapt *et al.*, 1993a; 1993b) ดังนั้นจึงทำให้สนใจที่จะศึกษาถึงผลของกวาวเครือขาวต่อการเกิดมะเร็งเต้านมในหนูแรทเพศเมียอายุ 50 วัน ที่ชักนำให้เป็นมะเร็งเต้านมโดยการให้สาร 7-12, DMBA ปริมาณ 170 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว (Kasara Na Bangchang, 1987) ในการทดลองครั้งนี้

<u>ลักษณะของพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อของเต้านม</u>

โครงสร้างของเต้านม ประกอบด้วย lobe หลาย ๆ lobe แต่ละ lobe มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นเยื่อหุ้ม ภายใน lobe แบ่งออกเป็น lobe ย่อย (lobule) ใน lobule ประกอบด้วย ต่อมน้ำนม (alveoli) ซึ่งมีเซลล์ชนิด simple cuboidal epithelium บุอยู่เซลล์มีรูปร่างเป็นลูกเต๋าสูงในระยะที่ inactive และเตี้ยในระยะที่ active นิวเคลียสกลม และมีท่อขนาดเล็กนำน้ำนมอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและไขมันที่วางตัวกันอย่างหลวม (loose connective tissue) ท่อประกอบด้วยเซลล์บุท่อชนิด pseudocolumnar epithelium (รูปที่ 9)



รูปที่ 9 ภาพแสดงลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อเต้านม แสดง terminal duct (➞) lobule (►) duct system (⟶) และ epithelium (▭)