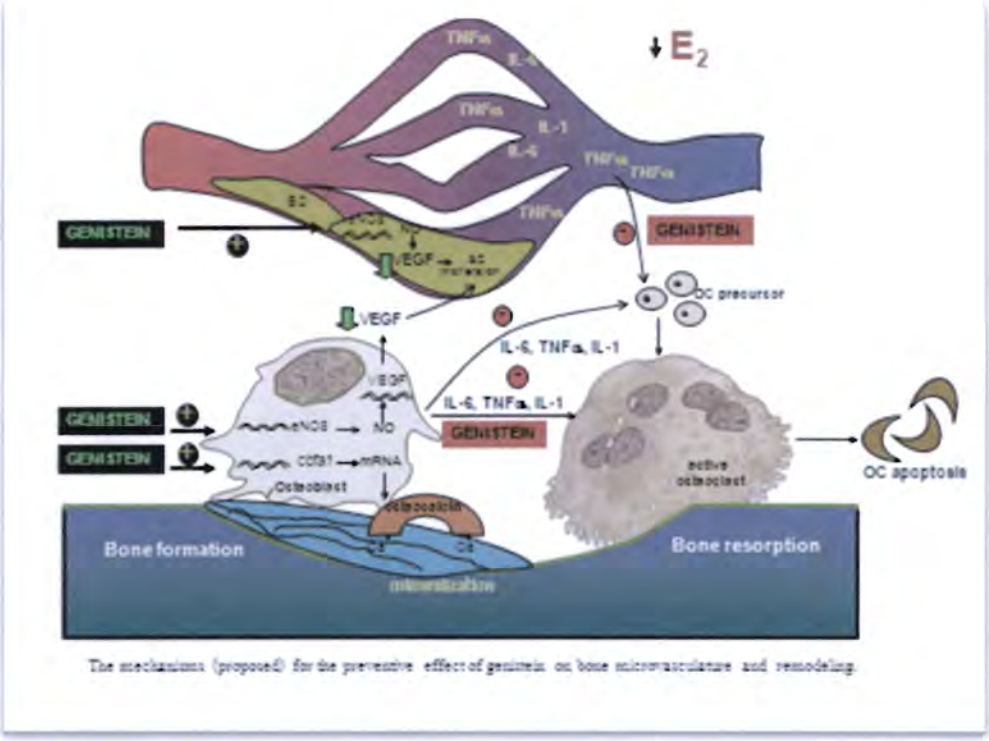
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แบบรายงานฉบับสมบูรณ์

ผลของเจนิสตีนต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง

The effects of genistein on the alteration of bone vascularization in ovariectomized rats



The mechanisms (proposed) for the preventive effect of genistein on bone microvasculature and remodeling

คณะผู้วิจัย

รศ.นพ.ประสงค์ ศิริวิริยะกุล

รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

นางสาว อัจฉรียา ชนาวิรัตน์

ภาควิชาสรีรวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

แบบรายงานฉบับสมบูรณ์

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย / โครงการวิจัย

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) **ผลของเจนิสตีนต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระดูกในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง**

(ภาษาอังกฤษ) **The effects of genistein on the alteration of bone vascularization in ovariectomized rats**

2. รายละเอียดเกี่ยวกับผลงานความก้าวหน้าของการวิจัย

1. คณะผู้วิจัย และสัดส่วนที่ทำงานวิจัย (%)

รศ.นพ.ประสงค์ ศิริวิริยะกุล

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หมายเลขโทรศัพท์ 02-252-7854 ต่อ 115

02-256-4267 ต่อ 115

แฟกซ์ 02-252-7854

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย ผลการตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน (30%)

รศ.ดร. สุทธิลักษณ์ ปทุมราช

ภาควิชา สรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมลล์ suthilukp@yahoo.com

หมายเลขโทรศัพท์ 02-252-7854 ต่อ 104

02-256-4267 ต่อ 104

แฟกซ์ 02-252-7854

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย ผลการตรวจวิเคราะห์ทางหลอดเลือด (30%)

นางสาว อัจฉรียา ชนาวิรัตน์

สหสาขาสรีรวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อีเมลล์ atchareeyaka@yahoo.com

หมายเลขโทรศัพท์ 01-6558430

สัดส่วนที่ทำงานวิจัย การทดลองในห้องปฏิบัติการ (40%)

หน่วยงานหลักที่รับผิดชอบงานวิจัย และที่อยู่ พร้อมทั้งชื่อหน่วยงานและลักษณะของการร่วมงานวิจัยกับหน่วยงานอื่น (ถ้ามี)

Microcirculation research unit, ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ประเภทของการวิจัย Experimental Design for Natural product and menopausal

3. สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาการที่ทำการวิจัย Microcirculation and Reproductive hormone

4. คำสำคัญ (keywords) genistein, bone remodeling, bone vascularization, ovariectomized rats

5. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในสภาวะพร่องเอสโตรเจนจะก่อให้เกิดปัญหาต่อหลายๆระบบของร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งระบบหัวใจและหลอดเลือด และ กระดูก ทำให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดและกระดูกพรุน จากการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ และการเสียสมดุลของการสร้างและสลายกระดูก

จากปัญหาดังกล่าวจึงมีการใช้เอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนทดแทน เพื่อบรรเทาอาการต่างๆที่เกิดขึ้นหลังจากหมดประจำเดือนรวมถึงโรคหัวใจและหลอดเลือดและกระดูกพรุน ในสตรีวัยหมดประจำ เดือน มีรายงานทางระบาดวิทยาถึงผลของการให้ฮอร์โมนทดแทนต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดว่าสามารถให้ผลทั้งทางตรงและทางอ้อม ต่อระบบไหลเวียนโลหิตและเมตาบอลิซึมของ liproprotein ตามลำดับ (Farhat, 1996) รวมถึงป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ เกี่ยวกับกระดูกมีผลป้องกันไม่ให้เกิดภาวะกระดูกพรุน โดยควบคุมการสร้างและสลายกระดูกให้อยู่ในภาวะสมดุล (Hayashi *et al*.,1995) ลดจำนวนของ proinflammatory cytokine ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของเซลล์สลายกระดูก และช่วยคงสภาพหลอดเลือดบริเวณกระดูกให้ปกติซึ่งอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์กระดูก

อย่างไรก็ตามการให้ฮอร์โมนเอสโตรเจนทดแทนเป็นเวลานาน อาจมีความเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งเต้านม, มะเร็งเยื่อบุมดลูก, hypercoagulable stage, hypertriglyceridemia และ angiogenesis (Baker *et al*., 2000; Lissin and cooke, 2000) ด้วยเหตุนี้ในปัจจุบันจึงมีความสนใจศึกษาค้นคว้ากันอย่างกว้างขวาง ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่จะใช้ทดแทนฮอร์โมนสังเคราะห์ดังกล่าว ซึ่ง Phytoestrogen เป็นสารกลุ่มที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษาโดยเฉพาะอย่างยิ่ง เจนิสตีน ที่อยู่ในกลุ่ม isoflavone มีการนำมาศึกษามากที่สุด

เจนิสตีนพบในผลิตภัณฑ์ที่ได้จากถั่วเหลือง คนเอเชียโดยเฉพาะชาวญี่ปุ่น มีการบริโภคถั่วเหลืองอย่างมากเป็นประจำอย่างต่อเนื่อง และ พบว่าอุบัติการณ์การเกิดภาวะต่างๆที่เป็นปัญหา หลังจากหมดประจำเดือนคือโรคหัวใจและหลอดเลือดและกระดูกพรุนพบน้อยกว่า สตรีวัยหมดประจำเดือนในแถบยุโรป จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาถึงผลของเจนิสตีนต่อหลอดเลือดและกระดูก

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าเจนิสตีนมีฤทธิ์คล้ายคลึงกับเอสโตรเจน ทำให้หลอดเลือดเกิดการตอบสนองต่อ acetylcholine และช่วยป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ใน mesenteric microcirculation ของหนูที่ถูกตัดรังไข่เมื่อให้เจนิสตีนเป็นเวลา 3 และ 6 สัปดาห์ แต่ผลของเจนิสตีนที่ต่างจากเอสโตรเจนคือ ไม่มีผลต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์สตรี ซึ่งเป็นผลดี (Khemapech *et al*., 2003)

ทั้งนี้คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะทำการศึกษาบทบาทการป้องกันหลอดเลือดในกระดูกของเจนีสตีน โดยมีสมมติฐานว่า หากเจนิสตีนสามารถออกฤทธิ์คล้ายคลึงกับเอสโตรเจนที่บริเวณหลอดเลือดที่กระดูก และยังป้องกันการเกิดกระดูกพรุนได้ น่าจะเป็นข้อสนับสนุนอีกประการหนึ่งในการใช้เจนิสตีนทดแทน เพื่อป้องกันหรือชะลอการเกิดกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน

6. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

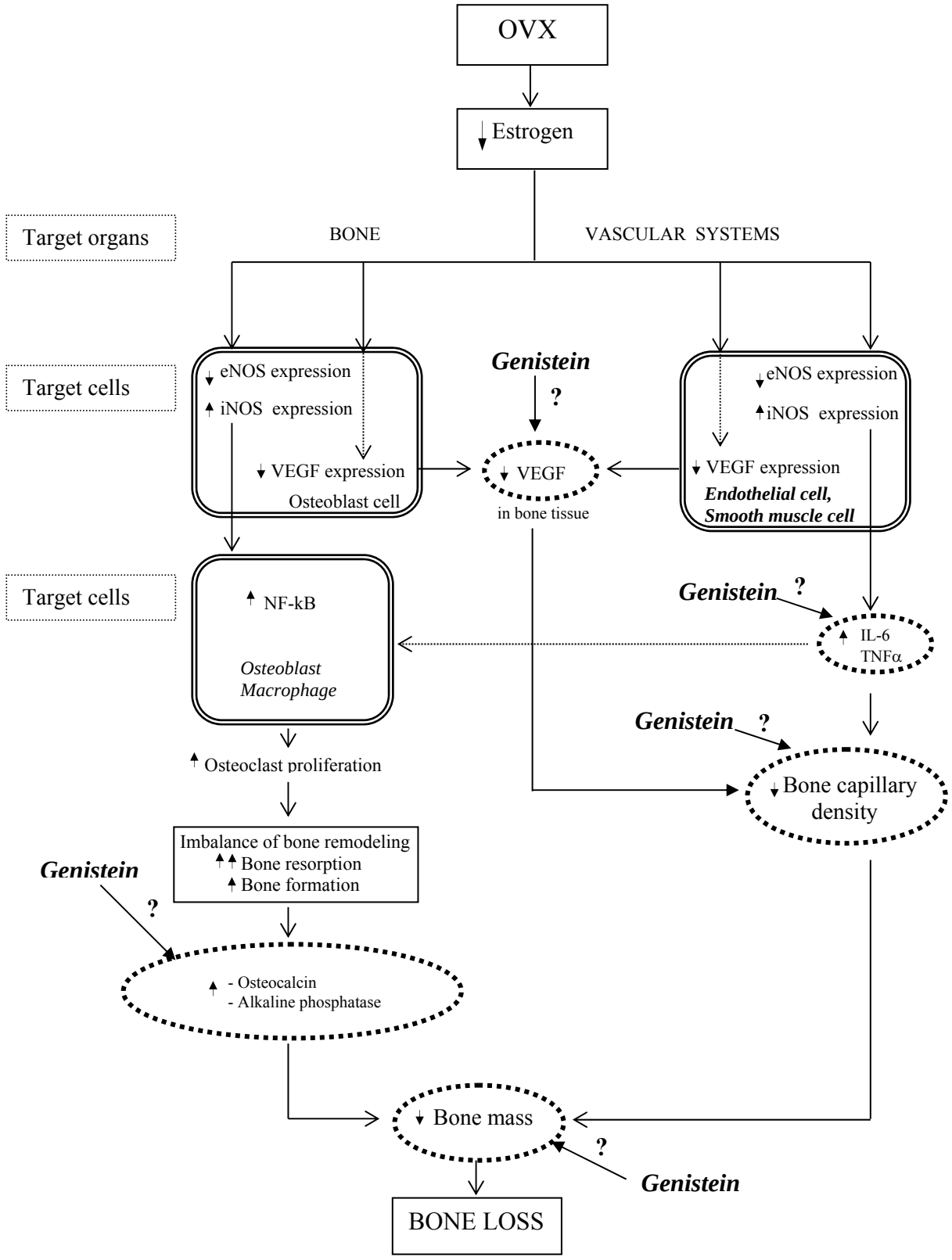
6.1 เพื่อศึกษาผลของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยที่กระดูก และ ระดับของ vascular endothelial growth factor (VEGF) ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง

6.2 เพื่อศึกษาผลของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของกระดูก, ซีรั่ม osteocalcin, TNF-α และ IL-6 ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ทั้งสองข้าง

7. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้ใช้สัตว์ทดลอง(หนูขาว เพศเมีย) เป็นโมเดล โดยจะทำการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง เสมือนสตรีวัยหมดประจำเดือนที่มีสภาวะพร่องฮอร์โมนเอสโตรเจน จากนั้นจะให้เจนิสตีนทดแทน และทำการตรวจวัดความหนาแน่นของหลอดเลือดที่กระดูก รวมถึงความหนาแน่นของกระดูกโดยเปรียบเทียบผลของเจนิสตีนในกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับสารที่เวลา 1 และ 3 สัปดาห์ ทั้งนี้คาดว่าเจนิสตีนจะให้ผลที่กระดูกเหมือนกับเอสโตรเจนและสตรีวัยหมดประจำเดือนจะมีทางเลือกในการใช้สารจากธรรมชาติทดแทนฮอร์โมนสังเคราะห์ ซึ่งกำลังเป็นประเด็นอยู่ในขณะนี้

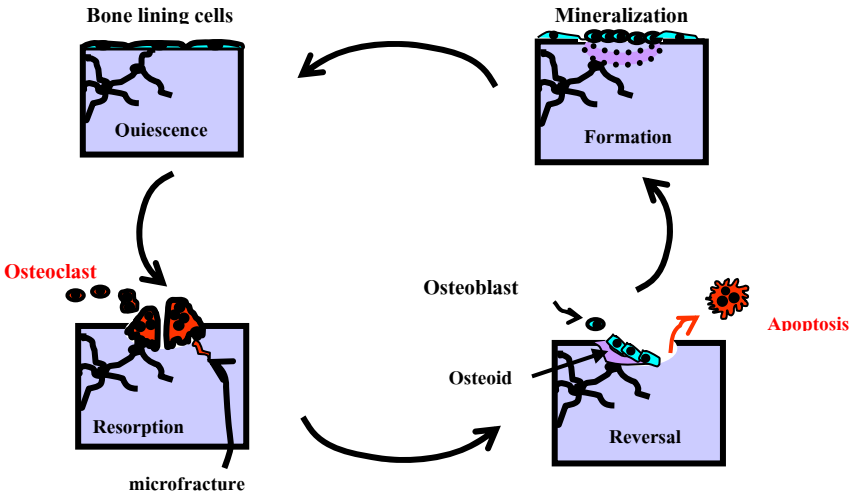
8. ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด ของโครงการวิจัย (Conceptual Framework)



9. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

Bone remodeling

กระบวนการสร้างและสลายกระดูก (bone remodeling) เป็นวงจรที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิต โดยมีสองขั้นตอนที่สำคัญคือขั้นตอนการสร้างกระดูกอาศัยเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) และการสลายกระดูกอาศัยเซลล์สลายกระดูก (osteoclast) ในสภาวะปกติการสร้างและสลายกระดูกจะเกิดขึ้นอย่างสมดุล แต่เมื่อใดที่ปัจจัยบางอย่างที่มีส่วนควบคุมการสร้างและสลายกระดูกผิดปกติไปจะทำให้เกิดการเสียสมดุล และมีผลต่อเนื้อกระดูกและความแข็งแรงของกระดูกตามมา (Van't Hof RJ and Ralston SH.,2001) หากมีการสลายกระดูกมากกว่าการสร้างจนเสียสมดุลจะทำให้เกิดความผิดปกติของกระดูกที่เราทราบกันดีคือ โรคกระดูกพรุน(Osteoporosis) จากการสูญเสียเนื้อกระดูก (Bone loss) ซึ่งเราสามารถตรวจสอบระดับการสร้างและสลายกระดูกได้หลายวิธีด้วยการใช้เครื่อง Dual emission X-ray absorptionmetry, Ultrasonography, Bone ash และการตรวจ Biomarkers ทั้งในเลือดและปัสสาวะ Biomarkers ที่บ่งชี้ถึงการสร้างกระดูกคือ Osteocalcin, Alkaline phosphatase ตรวจวัดได้ในซีรั่ม ส่วนตัวบ่งชี้ถึงการสลายกระดูกคือ



รูปที่1. วงจรการสร้างและสลายกระดูก (ปรับมาจาก Van't Hof RJ and Ralston SH, 2001)

บทบาทของเอสโตรเจนต่อกระดูกและหลอดเลือด

เอสโตรเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการควบคุมสมดุลของ bone remodeling โดยส่งเสริมการสร้างกระดูก และ ยับยั้งการสลายกระดูก เอสโตรเจนมีผลต่อเซลล์กระดูกโดยอาศัย Nitric oxide (NO) เป็นตัวกลาง ในการกระตุ้นการทำงานของ Osteoblast และ ยับยั้งการทำงานของ Osteoclast (O'Shaughnessy *et al*., 2000)

ในปี 1997 Hughes และคณะรายงานว่าเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการทำงานของ Osteoclast และเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis โดยเอสโตรเจนจะทำให้มีการลดลงของ cytokine IL-1,IL-6,TNFα ที่เป็นตัวยับยั้งการเกิด apoptosis สอดคล้องกับการรายงานของ Binbin และ Shifeng, 2003 ที่ว่า เมื่อมีการลดลงของ

ฮอร์โมนเอสโตรเจนจากรังไข่ ในสตรีวัยหมดประจำเดือน จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ Proinflammatory cytokine ซึ่งตัวที่ได้รับความสนใจมากที่สุดได้แก่ IL-1,IL-6 และTNFα และยังมีงานวิจัยอีกมากที่รายงานว่าเอสโตรเจนสามารถยับยั้งการสร้าง Proinflammatory cytokine จาก macrophage

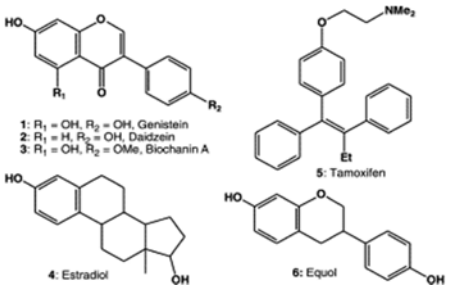
เอสโตรเจนยังมีผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต คือลดการเกิด Atherosclerosis โดยลด low-density lipoprotein (LDL) และ Inflammatory processesในหลอดเลือด และยังมีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระอีกด้วย เอสโตรเจนเปรียบเสมือน vasodilator และ hypotensive agent โดยการจับกับตัวรับเอสโตรเจนชนิดอัลฟ่า ที่ผนังของเอนโดทีเลียและกระตุ้นการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ทำให้มีการสร้าง NO มากขึ้นและเกิด Vasodilation ตามมา และยังมีผลโดยตรงต่อ Vascular smooth muscle cell (VSM) ด้วย (Richard, 2002) ดังนั้นเอสโตรเจนจึงมีส่วนในการควบคุม Vascular tone และ Blood flow ในอวัยวะต่างๆ โดยผ่านทั้ง เอนโดทีเลีย และ VSM

Phytoestrogens

Phytoestrogen เป็นเอสโตรเจนจากพืช มีโครงสร้างเป็น diphenolic compound ซึ่งทั้งโครงสร้างและคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเอสโตรเจนในสัตว์ ทำให้สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนและหลังจากจับกับตัวรับแล้วจะให้ผลที่เหมือนกับผลของเอสโตรเจนคือ ป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลีย และยับยั้ง bone loss และให้ผลไม่เหมือนกับเอสโตรเจน ในระบบสืบพันธุ์ของสตรี (Yoon-Bok Lee, 2004 และ Squadrito, 2000) และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม (Terreaux, 2003)

มีการแบ่งกลุ่มของ phytoestrogen ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ Isoflavone, Lignan และ Coumestans ซึ่ง Isoflavone เป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจนำมาศึกษามากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ เจนิสตีน ที่พบมากในถั่วเหลือง

Genistein



รูปที่2. Structures of isoflavone phytoestrogens in relation to estradiol. (Dixon RA, Ferreira D.2002)

เจนิสตีนมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกับ 17□-estradiol อย่างมาก (รูปที่2) สามารถจับกับตัวรับเอสโตรเจนและ sex steroid binding protein ได้ และสามารถออกฤทธิ์เหมือนและไม่เหมือนกับเอสโตรเจนซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของตัวรับเอสโตรเจน (Barnes และคณะ, 2000)

การรายงานด้านระบาดวิทยาเกี่ยวกับผู้ที่รับประทานอาหารที่มี isoflavone หรือ flavonoid อยู่มาก โดยเฉพาะในสตรีญี่ปุ่นจะทำให้ลดอุบัติการณ์การเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดลง จากการลดลงของ LDL และมีการเพิ่มขึ้นของ HDL (Merz Demlow และ คณะ, 2000)

ในปี 2000 Squadrito และคณะ รายงานว่า ผลของเจนิสตีน ขนาด 0.2 mg/kg/day ที่ให้ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ เป็นเวลา 28 วัน ทำให้มี ระดับของเจนิสตีนในกระแสเลือดสูงขึ้นและมีผลต่อการทำงานของ NOS ช่วยป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ ต่อมาในปี 2003 Khemapech และคณะ มีรายงานสนับสนุนผลการทดลองดังกล่าวโดยได้ทำการศึกษาในหนูตัดรังไข่ที่ให้ เจนิสตีน ขนาด 0.25 mg/kg/day เป็นเวลา 21 วัน พบว่าเอนโดทีเลียลเซลล์บริเวณ mesenteric microcirculation สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย acetylcholine ได้ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมผลของเจนิสตีนต่อ endothelial function และ bone mineral density

ตารางที่ 1 แสดงผลของการให้เจนิสตีนในหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง เพื่อศึกษาผลในการป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียและการสูญเสียเนื้อกระดูก รวมถึงดัชนีชี้วัดการสร้างกระดูก (bone marker enzymes)โดยแต่ละการทดลองจะมีความแตกต่างกันในชนิดสัตว์ทดลอง, ขนาดของเจนิสตีน และระยะเวลาที่สัตว์ทดลองได้รับเจนิสตีน

Table 1. ผลการศึกษาฤทธิ์ของเจนิสตีนในสัตว์ทดลองต่อ endothelial function (EF), bone mineral density (BMD) , biomarkers of bone formation และ bone resorption

Author(s)	**Animal model**	**Treatment genistein (mg/kg BW)**	**Treatment duration**	**EF/BMD**	**Bone marker enzymes**
Squadrito *et al.,* 2000	OVX rats	0.20, sc	28 days	prevent endothelial dysfunction	-
Khemapech *et al*., 2003	OVX rats	0.25, sc	21 days	prevent endothelial dysfunction	-
Anderson et al., 1998	OVX rats	0.50, P.O.	14 days	increase femoral ash	Not assessed
Fanti et al., 1998	OVX rats	0.05,0.25, sc	21 days	Both doses had similar Tibial BMD as sham	Increase serum OC; no change in resorption markers
Ishimi et al., 2000	OVX mice	0.70, sc	14 days	prevent trabecular bone	Not assessed

				loss	
Binbin Li, and Shifeng 2003	OVX rats	0.45, P.O.	84 days	Prevent femoral bone loss, decrease IL-1 and TNFα	Increase serum OC and ALP

EF; Endothelial function

OC; Osteocalcin, ALP; Alkaline phosphatase

ในปี 2003 Mekraldi และคณะรายงานผลการให้เอสโตรเจนขนาด 5 μg/kg/day เป็นเวลา 14 วันในหนูที่ถูกตัดรังไข่ พบว่าเอสโตรเจนสามารถป้องกันการเสียสมดุลของ bone remodeling และป้องกันการเปลี่ยนแปลงทั้งจำนวนและขนาดของหลอดเลือดที่กระดูกได้ โดยกระตุ้นการทำงานของยีน Vascular endothelial growth factor (VEGF) และ eNOS ในกระดูก ซึ่งเมื่อมีการพร่องของเอสโตรเจนจะมีการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ VEGF, eNOS และ เซลล์กระดูก ก่อนการตรวจพบว่าเกิด bone loss และยังพบว่าจำนวนหลอดเลือดที่กระดูกมีความสัมพันธ์กับการทำงานของ osteoblast อีกด้วย ผลดังกล่าวได้จากการศึกษาจำนวนและขนาดของหลอดเลือดที่กระดูกและการทำงานของเซลล์กระดูกบริเวณ Tibia metaphysic ของหนูเพศผู้ (Barou, 2002) สอดคล้องกับผลการวิจัยของ Dulax และ คณะ ในปี 2000 ที่พบว่านอกจาก NO จะช่วยให้การทำงานของหลอดเลือดเป็นปกติแล้ว ยังทำให้มีการแสดงออกของยีน VEGF ใน Vascular smooth muscle cell ซึ่งผลนี้อาจมีความสำคัญต่อการคงสภาพของหลอดเลือดให้เป็นปกติได้

จากการรวบรวมข้อมูลสรุปได้ว่า เจนิสตีน สามารถป้อกับการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ และ เอสโตรเจน ก็สามารถป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ได้, ป้องกันการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระดูกซึ่งสัมพันธ์กับ bone loss ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงสนใจที่จะศึกษาว่าเจนิสตีนจะสามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดที่กระดูกเหมือนกับเอสโตรเจนได้หรือไม่ และถ้าได้จะมีกลไกในการออกฤทธิ์ผ่านทาง VEGF และ Proinflammatory cytokine อย่างไร

10. เอกสารอ้างอิง ของโครงการวิจัย

Anderson JJ, Ambrose WW, Garner SC. (1998) Biphasic effects of genistein on bone tissue in the ovariectomized, lactating rat model. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*217, 345-350.

Baker VL, Leitman D and Jaffe RB. (2000) Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology. *Obstetrical and Gynecological Survey* 55:7, S21-S47.

Barnes S, Kim H, DarleyUsmar V, Patel R, Xu J, Boersma B, Luo M. (2000) Beyond ER beta: estrogen receptor binding is only part of the isoflavone story. *J Nutr* 130,656S-657S.

Barou O, Mekraldi S, Vico L, Boivin G, Alexandre C, Lafage-Proust MH. (2002) Relationships between trabecular bone remodelling and bone vascularization: a quantitative study. *Bone* 30, 604-12.

Binbin L and Shifeng Y. (2003) Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Bio Pharm Bull* 26(6), 780-86.

Dixon RA, Ferreira D. (2002) Genistein. *Phytochemistry*, 60 (3), 205-211.

Dulax J, Jozkowicz A, Dembinska-Kiec A *et al*. (2000) Nitric oxide induces the synthesis of vascular endothelial growth factor by rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Bio* .20, 659-666.

Farhat MY, Lavigne MC and Ramwell PW, (1996) The vascular protective effects of estrogen. *FASEB* 10, 615-624.

Fanti P, Monier-Faugere MC *et al*. (1998) The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis International* 8, 274-81.

Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ and Chaudhuri G. (1992) Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11259–11263.

Hughes DE, Wright KR, Mundy GR, and Boyce BF. (1994) TGF beta 1 induces osteoclast apoptosis in vitro (Abstract). *J Bone Miner Res* 9 *Suppl*: S71.

Ishimi Y, Araj N *et al*. (2000) Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophy Res Comm* .274, 697-701.

Khemapech S, Monsiri M, Patumraj S, Siriviriyakul P. (2003) Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemo Micro*. 29: 271-77.

Lissin LW and Cooke JP. (2000) Phytoestrogen and cardiovascular health. *J.Am. Coll. Cardiol*. 35, 1403-1410.

Mekraldi S, Lafage-Proust MH, Bloomfield S *et al.*(2003) Changes in vasoactive factors associated with altered vessel morphology in the tibial metaphysis during ovariectomy-induced bone loss in rats. *Bone.*32*,* 630-41.

Merz Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR and Kurzer MS. (2000) Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **71**, 1462–1469.

O'Shaughnessy MC, Polak JM, Afzal F, MHukkanen MV, Huang P, MacIntyre I and Buttery LD. (2000) Nitric oxide mediates 17β-estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **277**, 604–610.

Richard EW. (2002) Estrogen and vascular function.*Vascular Pharmacology* 38, 73-80.

Squadrito F, Altavilla D, Squadrito G *et al*. (2000) Genistein supplementation and estrogen replacement therapy improve endothelial dysfunction induced by ovariectomy in rats. *Cardiovascular Research*.45, 454-62.

Terreaux C, Polasek J, Hostettmann K. (2003) Plant Constituents with hormonal effects.*Current Organic chemistry* 7, 1151-61.

Van't Hof RJ and Ralston SH. (2001) Nitric oxide and bone. *Immunology* 103(3), 255-61.

Yoon-Bok Lee, Hyong JL *et al*. (2004) Evaluation of the prevention effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68(5), 1040-45.

11. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลที่ได้จากการศึกษาจะทำให้ทราบถึงบทบาทของเจนิสตีนต่อหลอดเลือดที่กระดูก ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างและสลายกระดูก จึงอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการส่งเสริมให้ใช้สารจากธรรมชาติ เพื่อป้องกันหรือชะลอการเกิดภาวะกระดูกพรุนที่พบในสตรีวัยหมดประจำเดือน

12. แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารที่เกี่ยวข้องกับกระดูกและสตรีวัยหมดประจำเดือน เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยในมนุษย์ต่อไป รวมถึงการตีพิมพ์และเผยแพร่ในระดับนานาชาติ

13. วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง

การวิจัยนี้จะทำการทดลองที่หน่วยหลอดเลือดจุลภาค ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้จะใช้หนูขาวเพศเมีย อายุ 10 สัปดาห์ (น้ำหนัก 220-280 กรัม) จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกทำให้สลบก่อนทำการผ่าตัด ในกลุ่มตัดรังไข่จะทำการตัดรังไข่ออกทั้งสองข้าง และสัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับสารทดสอบทันทีหลังจากการผ่าตัด เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองสัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายด้วย Absolute $MgSO_4$ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร

วิธีการทดลอง

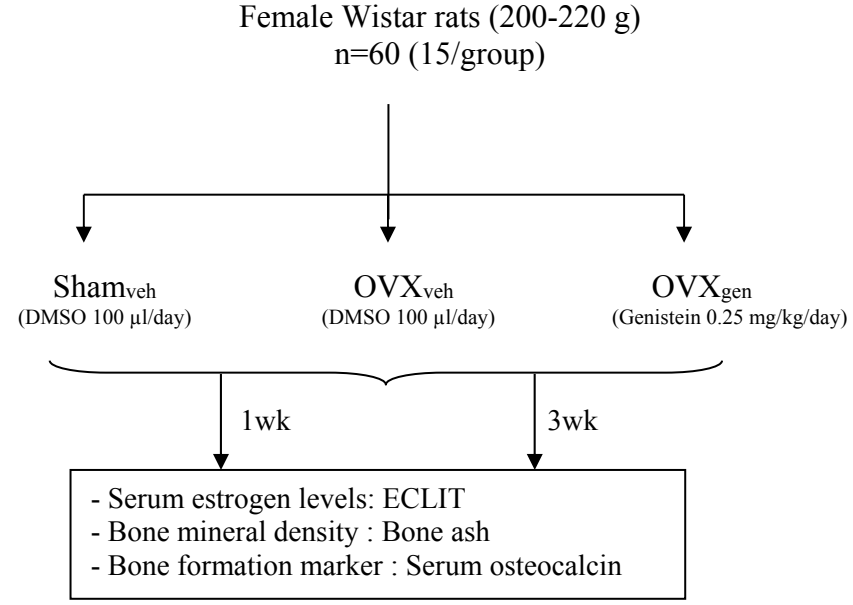
การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของกระดูก (ใช้เจนิสตีนขนาด 0.25 mg/kg/day) ที่สามารถป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียลเซลล์ (Khemapech *et al*., 2003)

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของกระดูก และ ระดับ osteocalcin ในซีรั่ม โดยแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม $sham_{veh}$ สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{veh} สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{gen} สัตว์ทดลองจะได้รับ เจนิสตีนขนาด 0.25mg/kg/day



หลังจากให้สารทดลองเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ จะทำการสลบสัตว์ทดลองและเก็บเลือดเพื่อตรวจวัดระดับเอสโตรเจน และ osteocalcin ในซีรั่ม เก็บกระดูก Tebia ด้านซ้าย เพื่อตรวจวัด Bone mineral density

การตรวจวัดระดับเอสโตรเจนในซีรั่ม

นำเลือดที่ได้ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ได้ซีรั่มที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^{o}C$, 10 นาที นำซีรั่มที่ได้ไปตรวจหาระดับเอสโตรเจนด้วยวิธี electrochemiluminescence immunoassay (ECLIT) โดยใช้ชุดทดสอบจากบริษัทที่เชื่อถือได้

Bone mineral density : bone ash

นำกระดูก Tibia ด้านซ้าย ที่ลอกเนื้อเยื่อออกแล้ว นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100°C ใช้เวลา 48ชั่วโมง และ ชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำกระดูกไปเผาจนเป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 600°C ใช้เวลา 16ชั่วโมงทิ้งให้เย็นและ ชั่งน้ำหนัก

$$\text{ความหนาแน่นของแร่ธาตุในกระดูก} = \frac{\text{Ash weight}}{\text{Dry weight}} \times 100$$

Bone formation marker assay

ระดับ osteocalcin ในซีรั่ม ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการสร้างกระดูก สามารถตรวจวัดด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) โดยใช้ชุดทดสอบจากบริษัทที่เชื่อถือได้

การทดลองที่ 2 ศึกษากลไกของเจนิสตีนต่อหลอดเลือดที่กระดูกและการสร้างและสลายกระดูก

เพื่อตรวจหากลไกของเจนิสตีนที่ออกฤทธิ์ผ่านทาง VEGF, TNF-α และ IL-6 และตรวจวัดความหนาแน่นของหลอดเลือดที่กระดูก

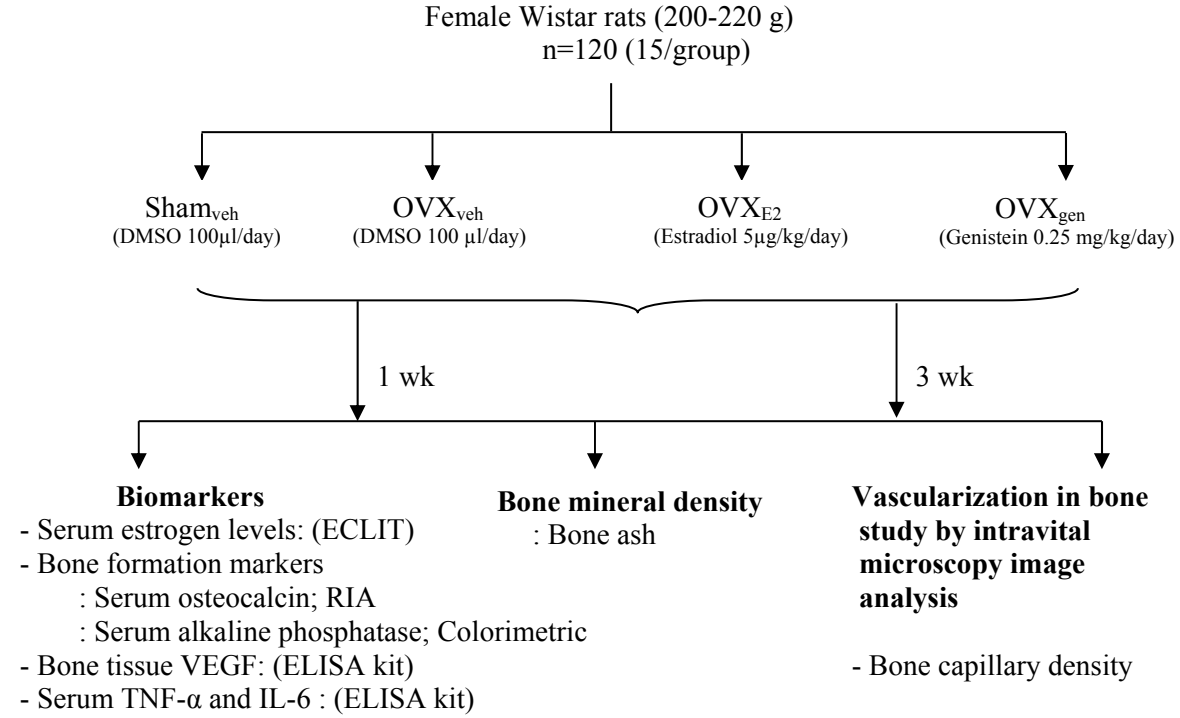
โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเป็น 4 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่ม $sham_{veh}$ สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{veh} สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{E2} สัตว์ทดลองจะได้รับ 17β- estradiol ขนาด 5µg/kg/day

กลุ่ม OVX_{gen} สัตว์ทดลองจะได้รับ เจนิสตีนขนาด 0.25mg/kg/day



เมื่อสิ้นสุดระยะการให้สารทดลองสัตว์ทดลองจะถูกทำให้สลบและทำการตรวจวัดความหนา แน่นของหลอดเลือดที่กระดูก จากนั้นทำการเก็บเลือดเพื่อตรวจวัดค่าต่างๆ และเก็บกระดูก Tebia ด้าน ซ้ายเพื่อตรวจหา bone mineral density และ ด้านขวาเพื่อตรวจหา VEGF

Bone formation marker assay

ระดับ Osteocalcin และ Alkaline phosphataseในซีรั่ม ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการสร้างกระดูก สามารถตรวจวัดด้วยวิธี Radioimmunoassay (RIA) และ Colorimetric assay ตามลำดับ โดยใช้ชุดทดสอบจากบริษัทที่เชื่อถือได้

Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) for bone tissue VEGF

นำกระดูก Tibia ด้านขวามาบดให้ละเอียดใส่สารละลายและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเลา 10 นาที ที่ 4 ^{o}C, เก็บส่วน supernstant ที่ -70^{o}C จนกว่าจะทำการตรวจวัดระดับ VEGF โดยใช้ ELISA-Kit (Chemicon, USA) นำผลการทดลองเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในสัดส่วน Picograms per milliliter (pg/ml) of tissue sample

Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) for serum TNF-α and IL-6

นำซีรั่มที่ได้มาตรวจวัดระดับ TNF-α และ IL-6 (Salvatore *et al*., 2003) ด้วย ELISA-Kit (Chemicon, USA) นำผลการทดลองเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานในสัดส่วน Picograms per milliliter (pg/ml) of serum

Bone capillary density of femur

ทำการ Canulate ที่หลอดเลือด Jugular vein ของสัตว์ทดลอง จากนั้นตรวจหาความหนาแน่นของหลอดเลือดบริเวณกระดูก Femur โดยการฉีด FITC-dextran เข้าทาง Jugular vein และศึกษาด้วยกล้อง Intravital fluorescense microscopy จากนั้นคำนวณหาความหนาแน่นโดยใช้โปรแกรม Digital image analysis

14. ระยะเวลาทำการวิจัยและแผนการดำเนินงานตลอดการโครงการวิจัย

ระยะเวลาทำการวิจัยรวมทั้งสิ้น 1 ปี 10 เดือน งานวิจัยนี้มีแผนงานตามระบุในตาราง

Activity	เดือน					
	1-4	5-8	9-12	13-16	17-18	19-24
1. Review literature						
- หาข้อมูลและทบทวนวรรณกรรม	↔					
- สำรวจและเตรียมความพร้อมของเครื่องมือ	↔					
- เตรียมและสั่งซื้อสารเคมี	↔					
2. Experimental design						
- ทำการทดลองที่ 1		↔				
- ทำการทดลองที่ 2		↔	↔			
3. Data analysis						
- วิเคราะห์ผลการทดลองที่ 1			↔			
- วิเคราะห์ผลการทดลองที่ 2			↔	↔		
4.Writing and submitting the full-report						↔

15. ผลการทดลอง

15.1 ผลของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของกระดูก (ใช้เจนิสตีนขนาด 0.25 mg/kg/day) ที่สามารถป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียเซลล์ (Khemapech *et al*., 2003)

เพื่อทดสอบฤทธิ์ของเจนิสตีนต่อความหนาแน่นของกระดูก และ ระดับ osteocalcin ในซีรั่ม

<u>ตารางที่ 15.1</u> แสดงผลการศึกษา Bone mineral density: bone ash ที่กระดูก femur ด้านซ้าย ในหนู ทั้ง 3 กลุ่มที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ หลังการตัดรังไข่

Group	Femur Bone-Ash/Dry matter (%)	
	1 week	3 weeks
$Sham_{veh}$ (n=8)	63.26±1.32	64.18±0.47
OVX_{veh} (n=8)	63.29±0.83	63.53±0.19
OVX_{gen} (n=8)	63.20±0.47	63.81±0.16

จากผลการทดลองพบว่า Bone mineral density: bone ash ที่กระดูก femur ด้านซ้าย ในกลุ่ม OVX_{veh} ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม $Sham_{veh}$ และ OVX_{gen} ที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์หลังจากการทำ OVX

คาดว่าในช่วงเวลาดังกล่าวยังอยู่ในช่วงแรกของการขาดฮอร์โมน estrogen จึงยังไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของมวลกระดูกมากนัก

15.2 ผลการการทดลอง Bone formation marker assay

ระดับ osteocalcin ในซีรั่ม ใช้เป็นดัชนีบ่งบอกถึงการสร้างกระดูก ตรวจวัดด้วยวิธี Radio-immunoassay (RIA) โดยใช้ชุดทดสอบจากบริษัทที่เชื่อถือได้

ตารางที่ 15.2 แสดงผลของ ระดับซีรั่ม osteocalcin

Group	Serum Osteocalcin (ng/ml)	
	1 week	3 weeks
$Sham_{veh}$ (n=10)	44.01±13.06	34.75±9.58
OVX_{veh} (n=10)	51.93±12.32	56.17±7.37***
OVX_{gen} (n=10)	55.67±5.85	46.76±8.57*, #

* $p< 0.05$, *** $p< 0.001$ significantly different as compared to $Sham_{veh}$.

# $p< 0.05$, significantly different as compared to OVX_{veh}

จากผลการทดลองพบว่า serum osteocalcin เพิ่มขึ้นในกลุ่ม OVX_{veh} และ OVX_{gen} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม $Sham_{veh}$ แต่ในกลุ่ม OVX_{gen} พบว่ามีระดับของ serum osteocalcin เพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่ม OVX_{veh} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงเวลาที่ 3 สัปดาห์

คาดว่าในช่วงเวลาที่ 3 สัปดาห์หลังจากการขาดฮอร์โมน estrogen ส่งผลให้ bone remodeling เสียสมดุล กระดูกจึงต้องมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ bone formation marker ที่ลดลง จึงทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ osteocalcin ในช่วงเวลาสั้นๆ เพื่อรักษาสมดุลของ bone remodeling ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 1991 (Kalu et al) และ 1993 (Marie et al)

15.3 ผลการการทดลอง 17β-estradiol

ตารางที่ 15.3 แสดงผลของ ระดับ ซีรั่ม Estradiol (pg/ml)

Group	Serum Estradiol (pg/ml)	
	1 week	3 weeks
$Sham_{veh(n=10)}$	28.09±10.83	25.86±5.10
$OVX_{veh(n=10)}$	18.61±3.26*	16.97±1.94***
$OVX_{gen(n=10)}$	19.03±2.09*	18.35±3.53**

* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$ significantly different as compared to $Sham_{veh}$.

จากผลการทดลองพบว่าระดับ serum estrogen ในกลุ่ม OVX_{veh} และ OVX_{gen} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม $Sham_{veh}$ แสดงว่าการให้ genistein ไม่มีผลต่อระดับ estrogen ทั้งในช่วง 1 และ 3 สัปดาห์

การทดลองที่ 2 ศึกษากลไกของเจนิสตีนต่อหลอดเลือดที่กระดูกและการสร้างและสลายกระดูก

สัตว์ทดลองนำมาเลี้ยงโดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่ม $sham_{veh}$ สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{veh} สัตว์ทดลองจะได้รับ DMSO10% ขนาด 100µl/day

กลุ่ม OVX_{E2} สัตว์ทดลองจะได้รับ 17β- estradiol ขนาด 5µg/kg/day

กลุ่ม OVX_{gen} สัตว์ทดลองจะได้รับ เจนิสตีนขนาด 0.25mg/kg/day

สัตว์ทดลองทั้งสามกลุ่มกำลังเลี้ยงไว้ให้ครบ 1 และ 3 สัปดาห์

15.4 ผลการทดลองทำการศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในกระดูก โดยใช้ femur chamber (Figure 3) และใช้ Confocal laser scanner เพื่อทำการบันทึกภาพ bone microcirculation **(Figure 4)**

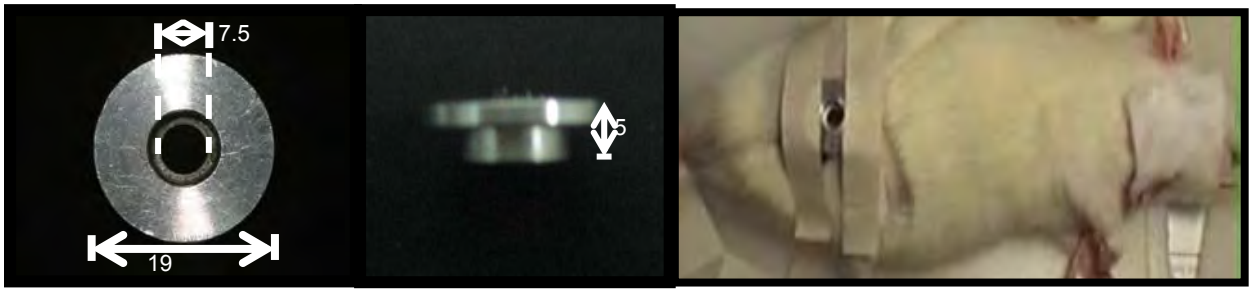


Figure 3 แสดงการวาง femur chamber ลงบนบริเวณที่จะทำการศึกษา

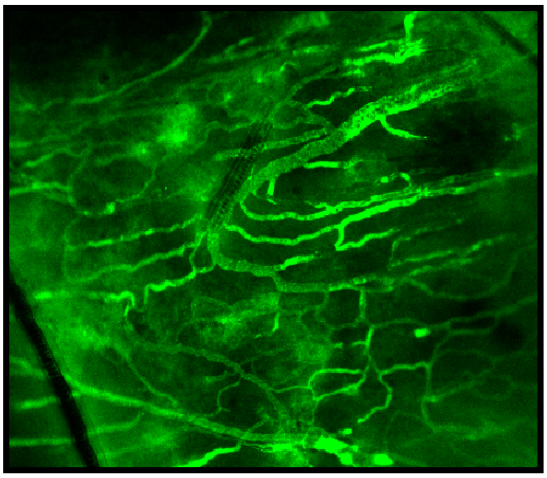


Figure 4 ภาพบันทึก bone microcirculation

หลังจากได้ภาพ bone microcirculation จาก Confocal laser scanner ครบทุกกลุ่มแล้ว จึงนำมาวิเคราะห์ หาปริมาณความหนาแน่นของ หลอดเลือดฝอย (capillary density , CD) โดย Image Pro Software เพื่อหาพื้นที่ของแต่ละ capillary แล้วนำพื้นที่ของ capillary ทั้งหมดมารวมกัน (ดังภาพ **Figure 5.3)** และทำการคำนวณเป็นเปอร์เซนต์ ต่อพื้นที่ที่ทำการศึกษา (window frame 350x350 μm^2) ตามสมการ คือ

% Capillary density (CD) = (Sum of capillary area/Total area) x 100

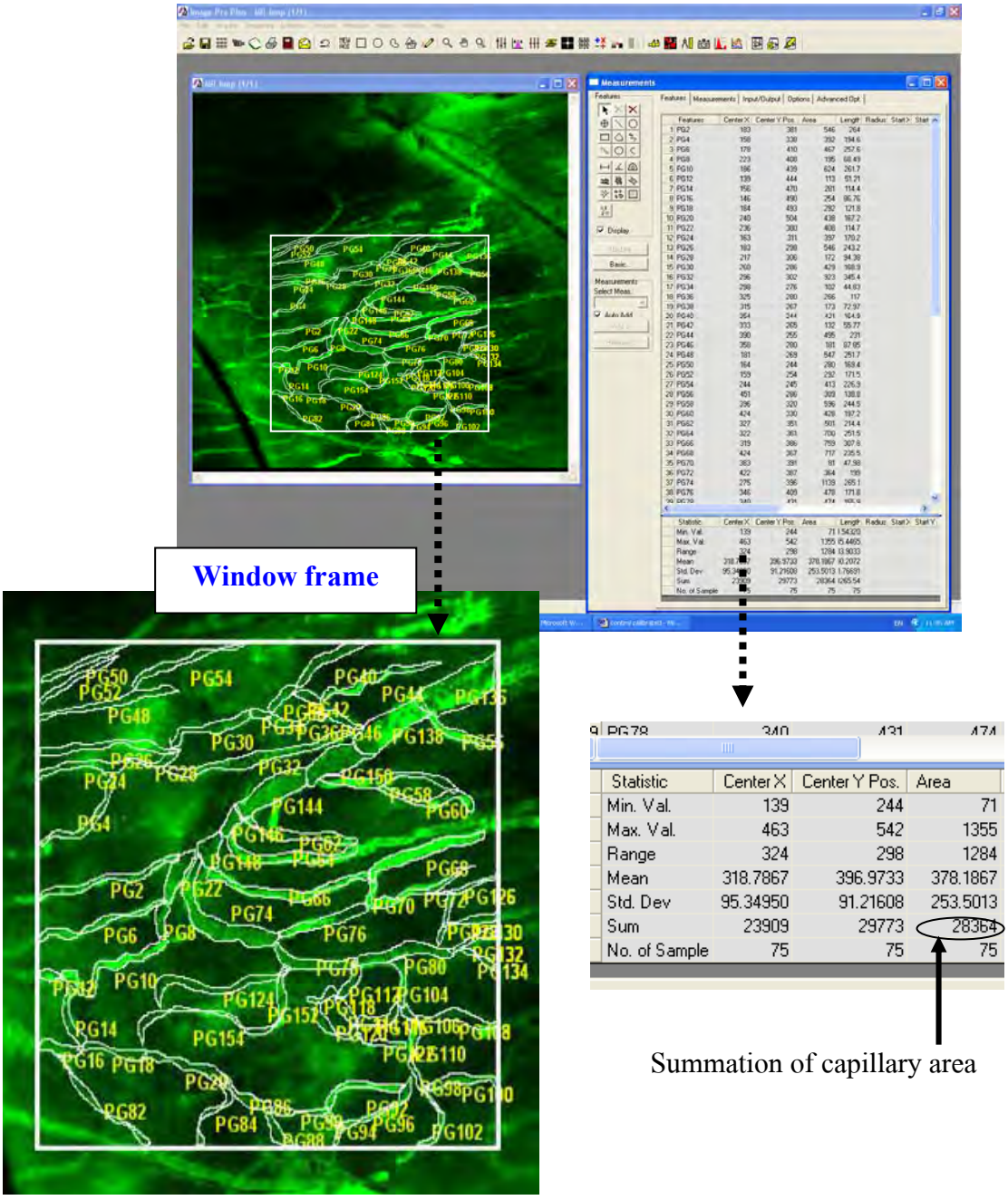


Figure 5 แสดงการใช้Image Pro software เพื่อหาพื้นที่ของแต่ละ capillary แล้ว รวมกันเป็น Capillary Density per frame of study ซึ่งใช้ window frame เดียวกันทุกกลุ่ม

15.5 ผลการทดลองทำการศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในกระดูก

<u>ตารางที่ 15.5</u> แสดงผลการศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในกระดูก femur ในหนู ทั้ง 3 กลุ่มที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ หลังการตัดรังไข่

Values were expressed as means ± SD. (n = 8)

Group	Capillary density (%)	
	1 week	3 weeks
$Sham_{veh}$(n=8)	23.85±0.52	25.36±0.71
OVX_{veh} (n=8)	20.40±1.00*	18.37±0.67***
OVX_{E2} (n=8)	24.70±2.04	22.08±1.10$^{*,\#\#}$
OVX_{gen} (n=8)	24.76±1.60$^{\#}$	21.36±1.16$^{**,\#}$

Each value is the mean ± SEM (n=8).

* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$, *** $p< 0.001$ significantly different as compared with $Sham_{veh}$.

$^{\#}$ $p< 0.05$, $^{\#\#}$ $p< 0.01$ significantly different as compared with OVX_{veh}

จากผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในกระดูก femur ของกลุ่ม OVX_{veh} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม $Sham_{veh}$, OVX_{E2} และกลุ่ม OVX_{gen} ที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ หลังตัดรังไข่ แสดงว่า genistein สามารถช่วยป้องกันการสูญเสียหลอดเลือดฝอยในกระดูกได้เหมือน estrogen ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Mekraldi และคณะ (2003) ที่พบว่าการขาด estrogen ทำให้จำนวนหลอดเลือดของกระดูกลดลง และเมื่อได้รับ estrogen พบว่า estrogen สามารถป้องกันการสูญเสียของหลอดเลือดได้

15.6 ผลการการทดลองศึกษาผลของเจนิสตีนต่อ serum TNF-α และ IL-6 (ng/ml)ในหนูทั้ง 3 กลุ่มที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ หลังการตัดรังไข่โดย วิธี Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ตารางที่ 15.6 แสดงผลการศึกษา ผลของเจนิสตีนต่อ serum TNF- α และ IL-6 (ng/ml) ในพล่าสมา ในหนู ทั้ง 3 กลุ่มที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ หลังการตัดรังไข่

Values were expressed as means ± SD. (n = 8)

Group	TNF-α (ng/ml)		IL-6 (ng/ml)	
	1 week	3 weeks	1 week	3 weeks
$Sham_{veh}$(n=8)	0.168±0.01	0.148±0.04	0.306±0.06	0.420±0.10
OVX_{veh}(n=8)	0.289±0.18*	0.207±0.05**	0.315±0.02	0.421±0.04
OVX_{E2} (n=8)	0.272±0.09	0.160±0.05#	0.414±0.22*	0.421±0.04
OVX_{gen}(n=8)	0.204±0.03	0.154±0.01#	0.303±0.06	0.440±0.09

* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$ significantly different as compared to $Sham_{veh}$.

# $p< 0.05$ significantly different as compared to OVX_{veh}

จากผลการทดลองว่ากลุ่ม OVX_{veh} ทั้งในช่วงเวลาที่ 1 และ 3 สัปดาห์ มีการเพิ่มขึ้นของระดับ serum TNF-α อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกลับกลุ่ม $Sham_{veh}$ แต่ระดับ IL-6 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hughes และคณะ (1996) ซึ่งพบว่าการขาด estrogen ส่งผลให้ T-cell มีการสร้าง TNF-α มากขึ้น และที่สำคัญพบว่ากลุ่ม OVX_{gen} มีระดับ TNF-α ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม OVX_{veh} จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า genistein ออกฤทธิ์คล้าย estrogen ในการยับยั้งการเกิดการอักเสบในภาวะ OVX

15.7 ผลการทดลองทำการศึกษาวิเคราะห์หา VEGF ใน serum โดยวิธี Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

ตารางที่ 15.7 แสดงผลการศึกษาค่า VEGF ใน serum ในหนู ทั้ง 3 กลุ่มที่ช่วงเวลา 1 และ 3 สัปดาห์หลังการตัดรังไข่

Values were expressed as means ± SD. (n = 8)

Group	Serum VEGF level (pg/ml)	
	1 week	3 weeks
$Sham_{veh}$ (n=8)	256.20±15.67	254.40±10.48
OVX_{veh} (n=8)	176.00±17.49*	177.65±27.93**
OVX_{E2} (n=8)	214.70±18.65	262.60±24.22#
OVX_{gen} (n=8)	212.10±32.05	258.15±37.36#

Each value is the mean ± SEM (n=8).

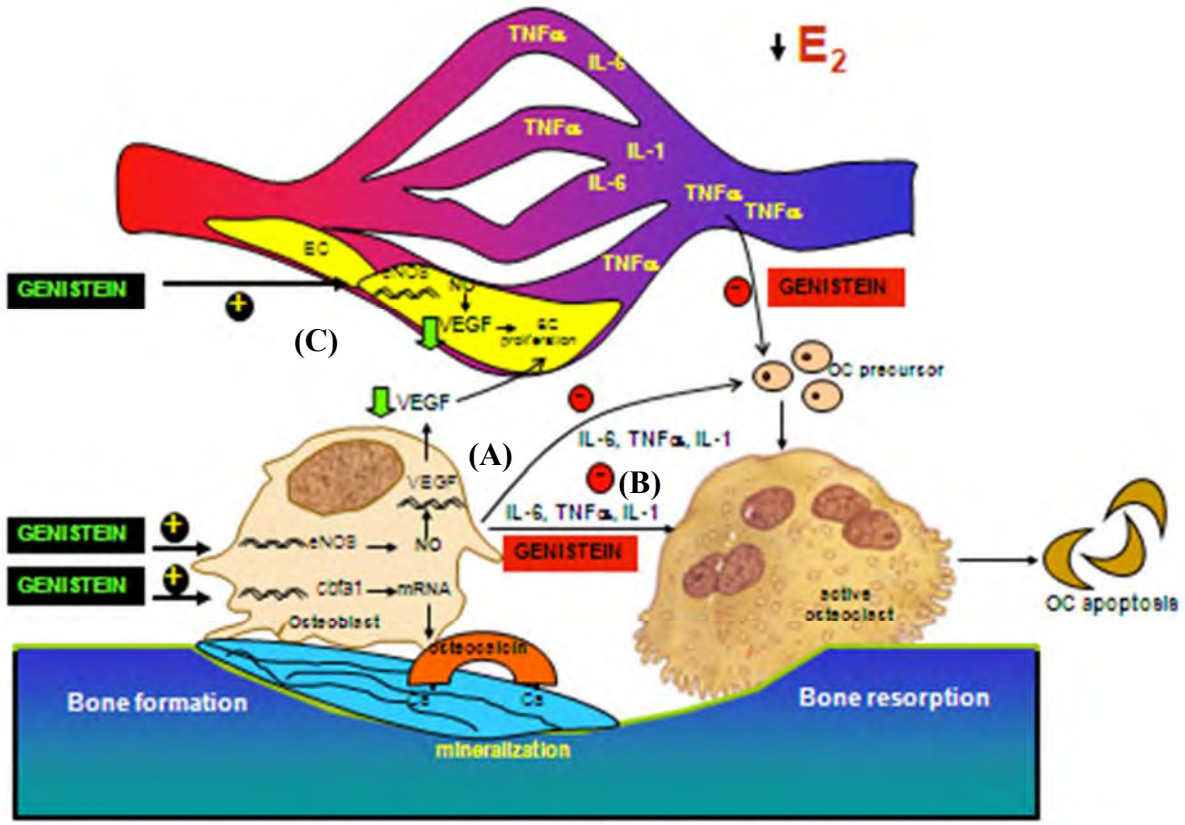
* $p< 0.05$, ** $p< 0.01$ significantly different as compared with $Sham_{veh}$.

# $p< 0.05$ significantly different as compared with OVX_{veh}

จากผลการทดลองพบว่าระดับ VEGF ของกลุ่ม OVX_{veh} ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม $Sham_{veh}$ และพบว่า genistein สามารถป้องกันการลดลงของระดับ VEGF ได้เหมือน estrogen สอดคล้องกับผลการทดลองการศึกษาความหนาแน่นของหลอดเลือดฝอยในกระดูกและงานวิจัยของ Yen และคณะ (2004, 2005) ที่พบว่า estrogen ควบคุมกระบวนการ angiogenesis โดยตรง โดยผ่าน VEGF ซึ่งไปออกฤทธิ์ที่ endothelial cell และ osteoblast

16. สรุปผลการทดลอง

Genistein (0.25 mg/kg) สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ bone vascularization และ bone remodeling ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ pro-inflammatory cytokines และการลดลงของระดับ VEGF โดยสามารถสรุปและแสดงดังรูปที่ 16.1



The mechanisms (proposed) for the preventive effect of genistein on bone microvasculature and remodeling.

รูปที่ 16.1 แสดงกลไกของเจนนีสตีนต่อการป้องกันการเสียสมดุลของ Bone remodeling ของหนูที่ถูกตัดรังไข่เมื่อให้เจนิสตีนเป็นเวลา 1 และ 3 สัปดาห์ (ระยะแรกของการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน) ในภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยสรุปจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ในภาวะพร่องเอสโตรเจน จะมีการเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติของหลอดเลือดที่กระดูกเกิดขึ้นก่อนการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูก และการได้รับเจนิสตีนทดแทนสามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดขนาดเล็กที่กระดูกและการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูกในช่วงแรกที่เกิดภาวะพร่องเอสโตรเจนได้ โดยมีกลไกผ่านทางการป้องกันการลดลงของ VEGF (A) ที่มีผลต่อความหนาแน่นของหลอดเลือดขนาดเล็กที่กระดูก และป้องกันการเพิ่มขึ้นของ proinflammatory cytokine เช่น TNF-α (B) และป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดธีเลียเซลล์ (C) จึงส่งผลต่อการป้องกันการสลายกระดูกได้ ดังนั้นจากผลการวิจัยในครั้งนี้จะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติคือ ถั่วเหลือง เพื่อมาใช้เป็นฮอร์โมนทดแทน ตั้งแต่ในช่วงแรกที่เกิดภาวะพร่องเอสโตรเจน ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดและการสูญเสียมวลแร่ธาตุของกระดูกในสตรีวัยหมดประจำเดือนได้ต่อไป

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าข้อความดังกล่าวเป็นจริงทุกประการ

(ลงชื่อ) .....

(รศ.นพ.ประสงค์ ศิริวิริยะกุล)

ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย / หัวหน้าโครงการวิจัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

ภาคผนวก

1. ผลงานตีพิมพ์

1.1. Atchareeya Chanawirat, Sirima Khemapech, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2006;34(1-2):309-314.

1.2. Atchareeya Chanawirat, Prasong Siriviriyakul, and Suthiluk Patumraj. A novel femur bone window chamber for in vivo studies of bone microcirculation. *Asian Biomed*. 2007;1(3):301-305.

2. การเผยแพร่ผลงานวิจัย

2.1. Atchareeya Chanawirat, Sirima Khemapech, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Roles of genistein on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *1st International Conference Natural Product for Health and Beauty*, Maha Sarakham, 2005

2.2. Atchareeya Chanawirat, Sirima Khemapech, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats with genistein replacement therapy. *การประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34*, 2548

2.3. Prasong Siriviriyakul, Atchareeya Chanawirat, Pattarin Sridulyakul, Natchaya Wongeakin, and Suthiluk Patumraj. The alteration of bone vascularization in bilateral ovariectomized rats using Confocal laser microscopy. *Biomedical Engineering Conference*. Chulalongkorn University, 2005

2.4. Atchareeya Chanawirat, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Confocal laser images of bone vascularization in bilateral ovariectomized rats. . *การประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35*, 2549

2.5. Kasiyaphat Atchareeya, Patumraj Suthiluk, and Siriviriyakul Prasong. Genistein supplementation prevents bone microvascular dysfunction and bone loss consequently in early phase of ovariectomized rats. *การประชุมวิชาการแห่งชาติด้านสูงวัยและผู้สูงอายุ*, โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์, 2550

2.6. Kasiyaphat Atchareeya, Patumraj Suthiluk, and Siriviriyakul Prasong. Preventive effects of genistein on bone microvascular dysfunction and consequently bone loss in early phase of ovariectomized rats. *การประชุมวิชาการสรีรวิทยาสมาคมแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 36*, 2550

3. รางวัลการเผยแพร่ผลงานวิจัย

3.1. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า ระดับดีมาก หัวข้อ Role of genistein on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats ในการประชุมวิชาการสรีรวิทยาแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 34, 2548

3.2. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบโปสเตอร์ ระดับดีมาก หัวข้อ Roles of genistein on bone microcirculation and bone mass density in bilateral ovariectomized rats ในการประชุมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 6, 2549

3.3. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า ระดับดี หัวข้อ Effect of genistein on bone capillary density, TNF-alpha and bone loss in ovariectomized rats ในงาน Chula Medical Expo คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2550

3.4. การนำเสนอผลงานวิจัยแบบปากเปล่า ระดับดี หัวข้อ Genistein supplementation could prevent bone microvascular dysfunction and consequent bone loss ในการประชุมบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 8, 2550

4. ผลงานตีพิมพ์ที่ทำเพิ่มเติมจากทุนวิจัย

4.1. Atchareeya Chanawirat, Prasong Siriviriyakul, and Suthiluk Patumraj. Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in bone venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008;38(4):235-243.

5. การเผยแพร่ผลงานที่ทำเพิ่มเติมจากทุนวิจัย

5.1. Atchareeya Chanawirat, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Roles of genistein on bone microcirculation and bone mass density in bilateral ovariectomized rats. *24th European Conference on Microcirculation*, Amsterdam, 2006

5.2. Atchareeya Chanawirat, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Roles of genistein on bone microcirculation and bone mass density in bilateral ovariectomized rats. *The 6th National Symposium on Graduate Research*, Chulalongkorn University, 2006

5.3. Atchareeya Chanawirat, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Effects of genistein on early phase ovariectomy-induced bone microvascular dysfunction and bone loss in rats. *7th International soy symposium*, Bangkok, Thailand, 2007

5.4. Atchareeya Chanawirat, Suthiluk Patumraj, and Prasong Siriviriyakul. Genistein supplementation could prevent bone microvascular dysfunction and bone loss. *8th National Grad Research Conference*, Mahidol University, Thailand, 2007

Clinical Hemorheology and Microcirculation 34 (2006) 309–314
IOS Press

Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats

Atchareeya Chanawirat [a,*], Sirima Khemapech [b], Suthiluk Patumraj [c] and Prasong Siriviriyakul [c]

[a] *Interdepartment of Physiology, Graduate School, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

[b] *Subdivision of Police Nursing College, Bangkok 10330, Thailand*

[c] *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Abstract. The objective of this study is to examine roles of genistein in postmenopausal induced-endothelial dysfunction and bone loss, the ovariectomized (OVX) rat model was used. The animals were divided into three groups of sham treated with vehicle (DMSO 100 μl/day; $Sham_{veh}$), OVX treated with vehicle (OVX_{veh}) and OVX treated with genistein (0.25 mg/kg/day; OVX_{gen}). At 3 and 7 weeks after the surgery, endothelial dysfunction in mesenteric microcirculation of each group was determined by using intravital fluorescence microscopy and analyzed with digital image software. The parameters of bone mass density (BMD) and bone formation marker were represented by percentage of ash/dry matter and osteocalcin activity (using radioimmunoassay (RIA)), respectively. Mean arterial pressures (MAP) in OVX_{veh} groups were significantly increased compared to their aged-matched sham groups ($p < 0.05$). Interestingly, the treatment of genistein could significantly attenuate this abnormality ($p < 0.001$). Besides, it could increase the vascular response to acetylcholine (Ach; 10^{-6} M) significantly compared to OVX-rats ($p < 0.05$). Moreover, BMD and osteocalcin activity were significantly increased in Ovx_{gen} as well. Therefore, our findings suggested that genistein supplementation could effectively prevent endothelial dysfunction and bone loss in OVX-rat model.

Keywords: Genistein, endothelial dysfunction, bone, ovariectomized rat

1. Introduction

It is know that estrogen deficiency lead to various problems in different system including cardiovascular system and bone remodeling. It is believed that cardiovascular disease and bone loss were caused by endothelial dysfunction, and imbalance of bone formation and bone resorption, respectively.

Estrogen replacement therapy (ERT) has a significant benefit for postmenopausal women, such as improvement of menopausal symptoms, cardiovascular disease and protection from osteoporosis. Several underlying mechanisms of ERT-cardiovascular protection have been postulated, including its indirect action on lipid profile, or its direct properties of: antioxidant, thrombotic inhibitor, and nitric oxide (NO) stimulator [1,2].

Estrogen clearly inhibits bone remodeling, bone resorption, but enhances bone formation. Estrogen can stimulate both activity and mRNA of eNOS [3] and osteoblasts [4]. However, ERT may raise a

* Corresponding author. E-mail: medpsr@hotmail.com.

1386-0291/06/$17.00 © 2006 – IOS Press and the authors. All rights reserved

risk of breast cancer, endometrial hyperplasia, hypercoagulable stage, hypertriglyceridemia and angiogenesis [5,6]. Therefore, many investigators have much interest in development for other modalities. A group of compounds, which has been used by many investigators, is phytoestrogens, particular genistein. However, the direct evidence on whether genistein can improve endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats has not yet been clarified.

2. Materials and methods

2.1. Animal preparation

Female Wistar rats, 10-weeks old (220–280 g·bw; obtained from National Laboratory Animal Center of Salaya Campus, Mahidol University, Bangkok), were used in this study. The animals were feed on normal food and tap water *ad libitum* under controlled environmental conditions of 12-hr light/dark period. After the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg.bw), a bilateral ovariectomized was then performed (OVX rats) [7]. Sham operated animals were used as controls.

After three weeks of washout period, an experimental procedure for testing endothelial vasodilation response was performed on samples from both groups ($OVX_{3\text{-week}}$ and $Sham_{3\text{-week}}$) to confirm that the lack of estrogen had already induced the endothelium to become dysfunction, so that we could use this endothelial dysfunction for further study of the action of genistein.

When endothelial dysfunction has been demonstrated and confirmed, three weeks after the ovariectomized procedure, the new groups of ovariectomized and sham rats were then prepared and further divided into three groups of sham-treated with vehicle (DMSO 100 μl/day sc; $Sham_{veh}$), OVX-treated with vehicle (DMSO 100 μl/day; OVX_{veh}) and OVX-treated with genistein (0.25 mg/kg/day; OVX_{gen}) [8]. Treatment with DMSO or genistein was begun at the beginning of the fourth week after the ovariectomized surgery [9], and an experimental protocol for making a direct visualization of mesenteric microcirculation was performed in each group.

2.2. Intravital fluorescence videomicroscopy

On the day of experiment, the rats were anesthetized with intraperitoneal injection of 45 mg/kg bw of sodium pentobarbital. After the tracheostomy, polyethylene catheters were inserted into the left common carotid artery (PE 90) and the left external jugular vein (PE 20) for monitoring arterial blood pressure and intravenous drug administration, respectively. The catheter that was inserted into the left common carotid artery was connected to the pressure transducer and the polygraph system (Nihon Koden, Japan) as which the arterial blood pressure and heart rate were able to be recorded.

After the abdomen was opened, the distal of ileum was then exteriorized flatly over a mesenteric chamber. The mesenteric tissue was superfused continuously with Krebs–Ringer solution (135.7 NaCl, 4.7 KCl, 2.52 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 7.14 $NaHCO_3$, 1.18 KH_2PO_4, 1.64 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ in mmol/l) and maintained at 37°C.

The mesenteric microcirculation of the distal ileum was observed using an epi-illumination fluorescent microscope (Nikon, Optiphot-2 model, Japan). To visualize the microcirculation, 0.2 ml of 5% fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-Dx-250, MW = 250,000) was used. The image of selected arterioles was observed on a black and white video monitor (Sony, GM-1411 QM) by using a ×20

objective len and a $\times 10$ eyepiece (CFI Plan Fluor). Video images of microvessels were stored on videotape (Sony, SLV-X 311) connected with the video timer (VTG-55, For-A, Japan). Arteriolar diameters within the studied area were measured by off-line analysis using a digital image program (Global Lab Image II; Data Translation, MA, USA). Then the changes of means arteriolar diameters were expressed as percentage based on norepinephrine- (NE; 10^{-5} M) preconstricted diameter [7].

2.3. Vascular response

The endothelial function was examined by using both endothelium-dependent and endothelium-independent vasodilators, acetylcholine (Ach; 10^{-6} M) and sodium nitroprusside (SNP; 10^{-7} M), respectively. The changes of arteriolar diameters were determined for both applications of Ach and SNP by using intravital fluorescence videomicroscopy as mentioned above.

2.4. Bone ash

Left tibia bone were placed in 70% alcohol and dried at 100°C for forty-eight hours, then weighed and recorded. After that the dried bone was ashed in covered crucibles at 600°C for 16 hours, cooled, and finally weighed to determine the percentage of mineral content.

2.5. Serum osteocalcin

Serum levels of osteocalcin (OC), which is normally used an index of bone formation were determined by radioimmunoassay (RIA) with a commercial available kit.

2.6. Data analysis

All data were express as means $\pm$ SEM. One-way analysis of variance (ANOVA using the SPSS program (Version 10.0)) was used to compare mean values. Significant differences between means of each group were determined by Post hoc test, with significance defined at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), and body weight (BW)

After three weeks of washout period, a significant increase in MAP was observed in OVX compared to sham group ($p < 0.001$) (Table 1). Four weeks after treatment, both of body weight and MAP of OVX group were significantly higher than those of sham group ($p < 0.05$). The administration of genistein did not significantly effect in MAP. However, heart rate was unchanged among these groups.

3.2. Vascular response

The relaxant effect of Ach has significantly decreased in $OVX_{3\text{-week}}$ when compared with $Sham_{3\text{-week}}$ (Fig. 1). However, genistein supplementation showed a significant improvement in endothelium-dependent vasodilation (Fig. 2). Interestingly, the results also showed that there was no significant difference between OVX_{gen} and $Sham_{veh}$ for those Ach-induced responses.

Table 1

Mean ± SEM of body weight (BW), mean arterial pressure (MAP), and heart rate (HR) were demonstrated for $Sham_{3\text{-week}}$, $OVX_{3\text{-week}}$ washout period ($n = 7$)

Group	% change of BW	MAP (mmHg)	HR (beat/min)
$Sham_{3\text{-week}}$	7.48 ± 3.88	120.95 ± 3.06	358.57 ± 12.04
$OVX_{3\text{-week}}$	25.27 ± 3.59***	141.33 ± 4.71*	351.43 ± 41.40^{ns}

*$p < 0.05$ significantly difference compared to shams. ^{ns}Non-significantly difference compared to shams.
***$p < 0.001$ significantly difference compared to shams.

Table 2

Mean ± SEM of body weight (BW), mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) were demonstrated for $Sham_{veh}$, OVX_{veh}, OVX_{gen} groups after fours weeks treatment ($n = 7$)

Group	% change of BW	MAP (mmHg)	HR (beat/min)
$Sham_{veh}$	7.89 ± 3.13	118.10 ± 6.39	377.14 ± 29.28
OVX_{veh}	48.55 ± 3.68***	139.99 ± 8.16*	368.57 ± 22.68^{ns}
OVX_{gen}	12.98 ± 3.84^{ns}	123.33 ± 7.97^{ns}	368.57 ± 22.68^{ns}

*$p < 0.05$ significantly difference compared to shams. ***$p < 0.001$ significantly difference compared to shams. ^{ns}Non-significantly difference compared to shams.

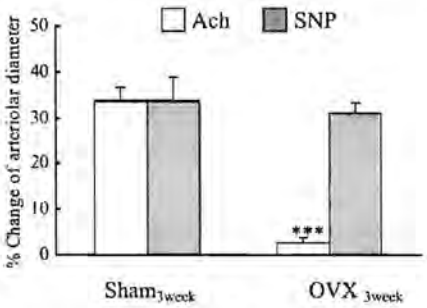


Fig. 1. 10^{-6} M Ach and 10^{-7} M SNP-vasodilatory responses demonstrated for $Sham_{3\text{-week}}$, $OVX_{3\text{-week}}$ ($n = 7$). ***$p < 0.001$ vs. sham.

3.3. Bone ash content and bone formation marker

Bone ash content of the left tibia and serum concentration of osteocalcin of OVX_{veh} group were significantly lower than $Sham_{veh}$ ($p < 0.05$). However, daily injection of OVX rats with genistein can attenuate these changes significantly comparing with OVX group ($p < 0.05$) (Figs 3A and 3B).

4. Discussion

In the present study, the results indicated that after three weeks of washout period, the endothelium-dependent vasodilation induced by Ach had significantly decreased in $OVX_{3\text{-week}}$ rats (Fig. 1). This implied that the lack of estrogen had caused endothelial cell dysfunction. Since our results demon-

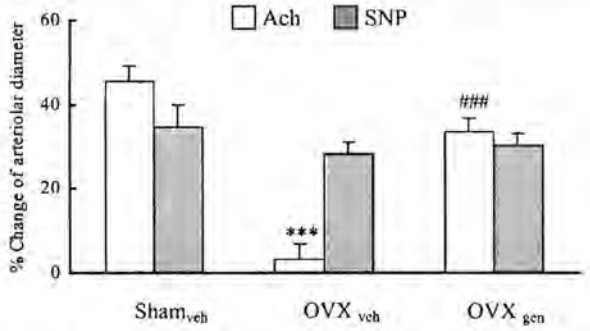


Fig. 2. Effect of genistein on 10^{-6} M Ach and 10^{-7} M SNP-vasodilatory responses demonstrated for $Sham_{veh}$, OVX_{veh}, OVX_{gen} ($n = 7$). $^{***}p < 0.001$ vs. sham, $^{\#\#\#}p < 0.001$ vs. OVX_{veh}.

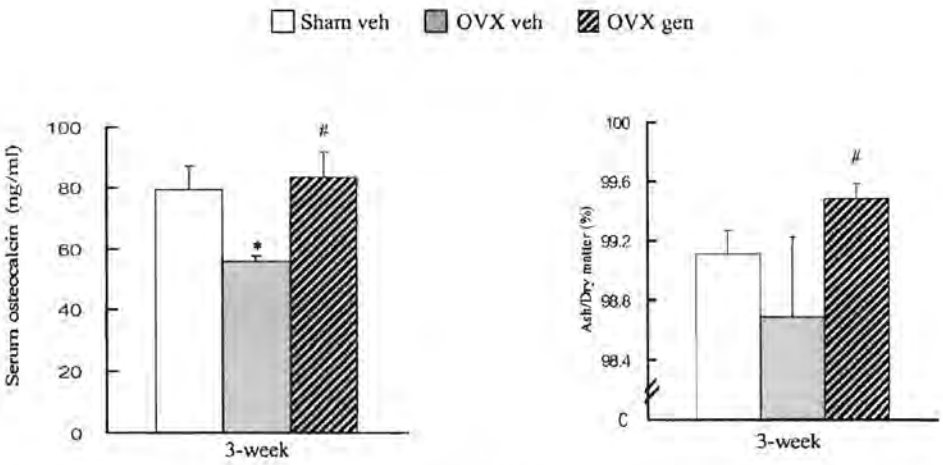


Fig. 3. Effect of genistein on serum osteocalcin and percentage of Ash/Dry matter in ovariectomized rats treated for 3 weeks. $^{*}p < 0.05$ vs. sham, $^{\#}p < 0.05$ vs. OVX_{veh}.

strated that MAP of both groups of $OVX_{3\text{-week}}$ and OVX_{veh} were significantly increased compared to the controls. This finding was more indirectly supported the effect of estrogen on enhancing endothelial vascular regulation function. Interestingly, our study had further demonstrated that genistein supplementation could restore such those effects of lacking estrogen (Table 2). Estrogen has been shown to have protective effects on vascular functions which may be mediated either by the increased production of the endothelial nitric oxide (NO), or by a reduction in endothelin-1 (ET-1) production [10]. According to our results, it might say that genistein may behave as like estrogen, in particular on enhancing endothelial functions.

Osteocalcin is a protein that is secreted by mature osteoblasts, and it has been shown to correlate with the bone turnover rate, including both active bone formation and resorption. Because of our results showed that there was a significant decrease in osteocalcin in OVX_{veh} group, therefore, it supported the evidence that estrogen has its role on bone formation [11]. Interestingly, our findings have importantly indicated that genistein could significantly replacement for estrogen on preventing osteocalcin to decrease even in the ovariectomized state. The previous studies have reported only that genistein could exhibit

estrogenic action on bone formation [11]. However, our study has added more information specifically that genistein was also able to protect against ovariectomy-induced bone loss.

The results of our experiment have demonstrated that genistein supplementation has beneficial effects on both vascular endothelial function, and on bone metabolism. It might be used as a therapeutic agent in postmenopausal women in the future.

References

[1] M.Y. Farhat, M.C. Lavigne and P.W. Ramwell, The vascular protective effects of estrogen, *FASEB* **10** (1996), 615–624.
[2] R.J. Gonzales, B.R. Walker and N.L. Kanagy, 17β-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **280** (2001), L555–L564.
[3] T. Hayashi, K. Yamada and T. Esaki, Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **214** (1995), 847–855.
[4] K.E. Armour and S.H. Ralston, Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells, *Endocrinology* **139** (1998), 799–802.
[5] L.W. Lissin and J.P. Cooke, Phytoestrogen and cardiovascular health, *J. Am. Coll. Cardiol.* **35** (2000), 1403–1410.
[6] V.L. Baker, D. Leitman and R.B. Jaffe, Selective estrogen receptor modulators in reproductive medicine and biology, *Obstetr. Gynecol. Survey* **55**(7) (2000), S21–S47.
[7] S. Khemapech, S. Patumraj and P. Siriviriyakul, Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29** (2003), 271–277.
[8] J. Case and C.A. Davison, Estradiol alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation, *JPET* **291** (1999), 524–530.
[9] P. Kenemans, R. Barentsen and P. van de Weijer, *Practice HRT*, Medical Forum International BV, The Netherlands, 1996, pp. 63–78.
[10] R.K. Dubey, E.K. Jackson, P.J. Keller, B. Imthurm and M. Rosselli, Estradiol metabolites inhibit endothelin synthesis by an estrogen receptor-dependent mechanism, *Hypertension* **37** (2001), 640–644.
[11] L. Binbin and Y. Shifeng, Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation, *Biol. Pharm. Bull.* **26** (2003), 780–786.

Asian Biomedicine Vol. 1 No. 3 October 2007;301-305

Technical report

A novel femur window chamber for *in vivo* studies of bone microcirculation

Atchareeya Kasiyaphat[a], Prasong Siriviriyakul[b], Suthiluk Patumraj[b]
[a]*Department of Sport Science, Faculty of Physical Education, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110;* [b]*Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Background: Due to technical difficulties of *in vivo* observation of blood flow and microvessels in bone, no study has been done concerning the role of blood flow in bone remodeling.
Objective: To develop a new window chamber for microscopic observation of the microcirculation in living bone, and to examine the utility of the chamber using rat femur in health and diseases.
Methods: A stainless chamber (19 mm in diameter and 5 mm in height) with a circular window (7.5 mm in diameter) for microscopic observation was developed. The chamber was put on rat femur which was exposed for direct observation of the microvasculature. Intravital observation was made of bone blood flow and microvessels, using fluorescence videomicroscopy and confocal laser microscopy. The utility of the chamber was examined based on images of microcirculation (normal and abnormal) in the femur bone.
Results and conclusions: Images of rat femur microvasculature were enhanced in the quality by use of the femur window chamber. The new chamber provides a powerful tool for *in vivo* studies of the bone microcirculation in health and diseases.

Keywords: Bone, confocal laser microscopy, femur bone, fluorescence videomicroscopy, leukocyte adhesion, microcirculation, window chamber.

The dynamics of bone remodeling may be determined by complex sequential interaction between bone cells and microcirculation [1]. Blood flow in the bone may be intimately related to bone remodeling, bone formation and resorption [2-7]. However, no study has been done on the role of blood flow in bone remodeling; mainly due to technical difficulties of *in vivo* observation of bone blood flow and microvessels.

A number of window chambers for intravital observation of microcirculation have been developed in various organs and tissues, including cranial windows [8-10], dorsal skin chambers [11-13] and iris devices [14, 15]. However, there are very few bone window chambers available for direct microscopic observation except for the Hansen-Algenstaedt chamber [16].

In this study, we developed a new window chamber for intravital observation of the microcirculation in femur by modifying the femur window previously used by Hansen-Algenstaedt et al. [10]. The new window chamber could prevent scatter of light and enhance focusing on the object. With the use of this window chamber, we could obtain good quality microscopic images of the bone microcirculation.

Correspondence to: Dr. Suthiluk Patumraj, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand; E-mail: suthilukp@yahoo.com

Materials and Methods

Design of a femur chamber

We developed a stainless steel chamber for rat femur as shown in **Fig. 1.** The size was designed based on the structure of rat femur. It was approximately 19 mm in diameter and 5 mm in height. The chamber was also designed to have a closed and circular window (approximately 7.5 mm in diameter and 5 mm in height) for microscopic observation. The chamber was positioned on the study area of the femur. Prior to placement of the chamber, the femur was exposed around the study area for direct observation of bone blood flow and the microvasculature.

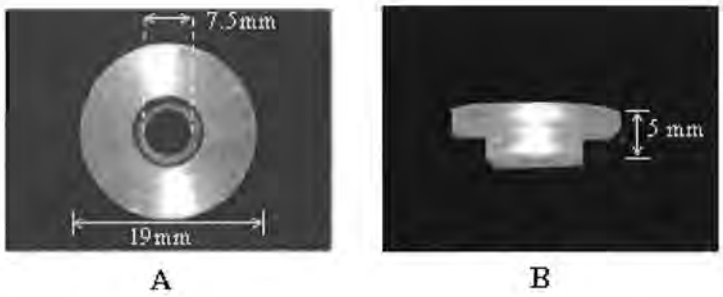


Fig. 1 A newly developed window chamber for rat femur.

Performance test of the window chamber

We examined the performance of our newly developed window chamber in the rat femur under a fluorescence videomicroscopic system and a confocal laser microscopic system. The performance of the window chamber was evaluated based on the quality of images of bone microcirculation obtained with and without the chamber.

Animal preparation

Rats were anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg bw, i.p.). After tracheotomy, a polyethylene catheter was inserted into the left external jugular vein for injection of fluorescent tracers.

A longitudinal skin incision was made approaching the femur laterally. The femur was carefully exposed by blunt dissection between the flexors and extensors muscles to visualized bone vasculature. Our femur chamber was positioned on the study area for an enhanced deeper focus (**Fig. 2**).

Microscopic obsveration

After anesthesia, fluorescent tracers were injected to visualize the microcirculation in the femur. The bone microcirculation was observed using an epi-illumination fluorescence videomicroscope (Optiphot-2, Nikon, Japan) with a 50 W mercury lamp. The video images were achieved through a silicon intensified target television camera (Hamamutsu Photonics, Japan, USA) [11-12], which was projected on a video monitor (GM-1411 QM, Sony, Japan) using 20X objective lens (CF Plan Fluor, Nikon, Japan). The selected area was then recorded in real-time by a videotape recorder (SLV-X311, Sony, Japan) connected to a video timer (VTG-55, FOR-A, Japan) throughout the experimental period.

Confocal microscopic observation

The bone microvasculature was observed under a confocal laser microscope (EZ-C1, Nikon, Japan). An objective lens of 10X and a laser unit (488 argon)

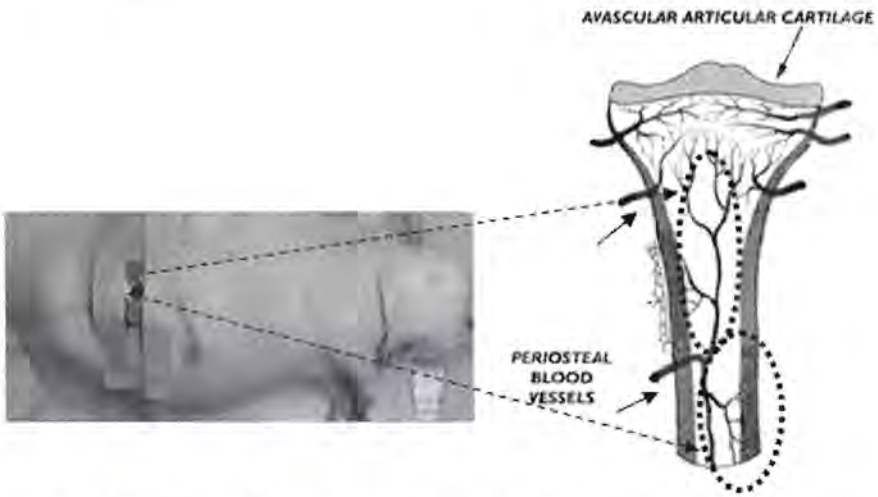


Fig. 2 The location of the femur chamber is shown. The bone microcirculation, feeding from arteries that penetrated through priosteal membrane, can be observed via this chamber.

were used. Fluorescein isothiocyanate (FITC)-dextran (50 ml of 0.5 % FITC-dextran, Sigma Chemical, USA) was injected intravenously to visualize the intralumen of microvessels.

Pathophysiological application

As an example of bone pathophysiology, we studied microvascular disorders, such as increased interaction between leukocytes and endothelial cells, in ovariectomized rats [17].

Results

Figure 3 (A, B) show examples of video images of bone microcirculation in an era of the femur with (**B**) and without (**A**) use of the window chamber. We note that the use of femur chamber provided better quality images. Apparently, leukocytes could not be identified without the chamber, but with use of the chamber, leukocytes and endothelial cells interaction could be observed in femur postcapillary venules (diameter =15-25 mm).

Figure 4 shows a confocal microscopic image of femur microvessels that was taken with use of the femur window chamber. By using the femur window chamber, we could observe the femur bone microcirculation under a confocal laser microscopic system.

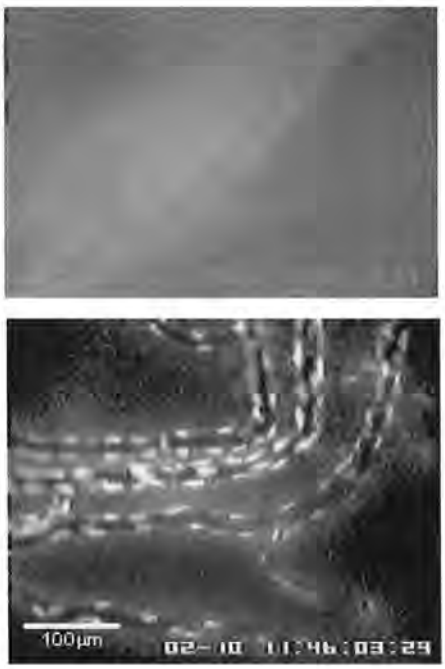
Figure 5 shows an example of fluorescence video image. Apparently, a number of leukocyte adhered to the venular wall in post-capillaries of ovareictomized rats.

Discussion

In the present study, we have made a femur window chamber by modifying the femur window previously used by Hansen-Algenstaedt et al. [16]. The chamber could improve the quality of images obtained under a fluorescence microscope as well as confocal laser microscope. In fact, the chamber helped to prevent the scatter of light, so that the light was condensed and passed through the window of the chamber, resulting in enhancement of the focusing on the object.

With use of this femur chamber, the leukocyte-endothelial cell interaction in sham and ovariectomized rats could be evaluated using intravital fluorescence videomicroscopy. Moreover, their microvascular network of bone capillaries was demonstrated clearly by using confocal laser microscopy.

In conclusion, this novel femur window chamber provides a powerful tool for *in vivo* studies of bone microcirculation. In particular, it will be useful for investigation of the *in vivo* model of estrogen depletion induced pathogenesis in the future.



A Without chamber x20

B. With chamber x20

Fig. 3 Examples of video images of the microcirculation in an era of femur bone with (**B**) and without (**A**) use of the window chamber.

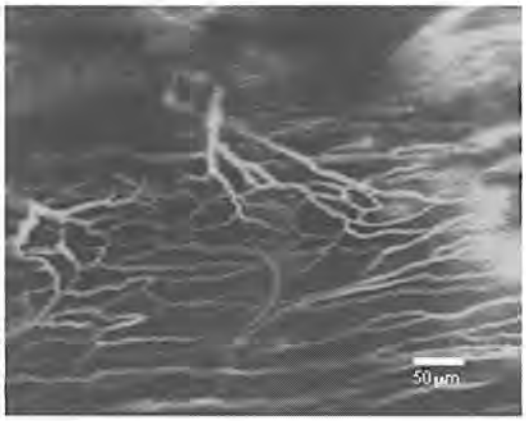


Fig. 4 A confocal microscopic image of the femur bone microcirculation observed with use of the femur window chamber. After penetration through priosteal membrane, the microvascular network of capillaries branched were performed and run along the bone.

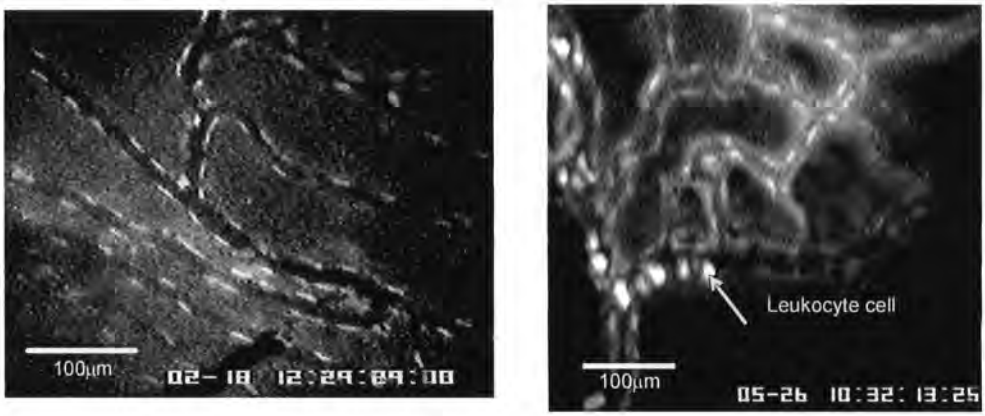


Fig. 5 Fluorescence video images obtained in normal (sham) (**a**) and ovariectomized rats (**b**) (bar: 100 μm). In (**b**), there appeared turtosity microvascular network and leukocyte adhesion.

Acknowledgements

We would like to express our deep appreciation to the Rachasuda Foundation for supporting our confocal laser microscopic system. This research was supported partially by The National Research Fund. The authors have no conflict of interest to declare.

References

1. Michel L. Circulation intraosseuse: de la physiologie 'a la pathologi. Rev Rhum. 2002;69:484-91.
2. Roxane CS, Ronald FZ, Kevin RF, Robert CB. Evaluation of laser-Doppler perfusion imaging for measurement of blood flow in cortical bone. J Appl Physiol. 2001;90:1314-8.
3. Salvatore C, Emanuela M, Laura D, Tiziana G, Rosanna DP, Zaira R. Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice. Endocrinol. 2003; 144:1098-107.
4. Kitasawa R, Kimble RB, Vannice JL, Kung VT, Pacifici R. Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice. J Clin Invest. 1994;94:2397-406.
5. Bismar H, Diel I, Ziegler R, Pfilschifter J. Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement. J Clin Endocrinol Metab. 1995;80:3351-5.
6. Passeri G, Girasole G, Jilka RL, Manolagus SC. Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal. Endocrinol. 1993; 133:822-8.
7. Chanawirat A., Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyakul

S. Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. Clin Hemorheol Microcirc. 2006;34:309-14.

8. Yamaguchi S, Yamakawa S, Niimi H. Red cell velocity and microvessel diameter measurement by a two fluorescent tracer method under epifluorescence microscopy; application to cerebral microvessels of cat. Int J Microcirc Clin Exp. 1992;11:403-16.
9. Jariyapongskul A, Patumraj S, Yamaguchi, Niimi H. The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ-induced diabetic rats. Clin Hemorheol Microcirc. 2002;27:67-76.
10. Jariyapongskul A, Yamaguchi S, Patumraj S. Long-term oral vitamin C supplementation improves cerebral vasodilatory impairment in diabetes: in vivo evidence using diabetic rats. Asian Biomed. 2007;1: 159-66.
11. Lehr H, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscope in nude mice. Am J Pathol. 1993;143: 1055-62.
12. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. Clin Hemorheol Microcirc. 2005;33:127-35.
13. Duansak N, Yoysungnoen P, Somchaichana J, Bhattarakosol P, Wirachwong P, Patumraj *S*. Correlation between hypoxia-inducible factor and vascular endothelial growth factor expressions under tumor neovascularization in hepatocellular carcinoma cell-implanted mice. Asian Biomed. 2007;1 (in press).
14. Jariyapongskul A, Rungiaroen T, Kasetsuwan N, Patumraj S, Niimi H. Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin-induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy. Clin. Hemorheol. Microcirc. 2006;34:273-82.
15. Jariyapongskul A, Rungiaroen T, Kasetsuwan N, Patumraj S, Seki J, Niimi H, Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats. Microvasc Res. 2007;74:32-8.
16. Hansen-Algenstaedt N, Schaefer C, Wolfram L, Joscheck C, Schroeder M, Algenstaed P, et al. Femur window- a new approach to microcirculation of living bone in situ. J Orthopaedic Res. 2005;23:1073-82.
17. Kasiyaphat A, Siriviriyakul P, Patumraj P. Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in bone venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats. Clin Hemorheol Microcirc. 2008; (in press).

Clinical Hemorheology and Microcirculation 38 (2008) 235–243
IOS Press

Preventive effects of genistein on leukocyte adhesion in femur venules and on bone-loss induced in ovariectomized female rats

Atchareeya Kasiyaphat [a], Prasong Siriviriyakul [b] and Suthiluk Patumraj [b,*]

[a] *Department of Sport Science, Faculty of Physical Education, Srinakharinwirot University, Bangkok 10110, Thailand*

[b] *Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand*

Received 1 July 2007
Revised 27 September 2007
Accepted 1 October 2007

Abstract. This study was aimed to examine effects of genistein on leukocyte adhesion in femur microcirculation in relation to bone-loss induced in ovariectomized female rats. Sixty-four female Wistar rats were divided into 4 groups: sham (daily treated with vehicle; DMSO, sc; 100 μl/day), ovariectomized rat treated with vehicle (OVX_{veh}), 17β-estradiol treated-ovariectomized rat (OVX_{E2}, 5 μg/kg/day, sc) and genistein treated-ovariectomized rat (0.25 mg/kg/day, sc; OVX_{gen}). One and three weeks after the ovariectomy, blood flow perfusion (BF) in femur tissue was measured using laser Doppler flowmetry. Leukocyte adhesion in femur venules (15–30 μm in diameter) of each group was evaluated by intravital fluorescence videomicroscopy. The bone mineral content (BMC) was measured and expressed in terms of ratio of ash-to-dry matter weight. Serum osteocalcin and alkaline phosphatase levels were determined using chemiluminescence immunoassay. In both one and three week-OVX_{veh}, leukocyte adhesion increased significantly, compared to their age-matched sham groups, but it decreased significantly in OVX_{gen}, compared to OVX_{veh} ($p < 0.05$). In three week-OVX_{gen}, both BF and BMC increased significantly, but osteocalcin and alkaline phosphatase levels decreased, compared to those of three week-OVX_{veh}. In conclusion, genistein supplementation could effectively prevent bone-loss and microvascular endothelial dysfunction induced by estrogen deficiency.

Keywords: Genistein, leukocyte adhesion, bone blood flow perfusion, bone loss, ovariectomized rat

1. Introduction

Estrogen is a female hormone produced by the ovaries. Estrogen deficiency leads to imbalance of bone remodeling, namely, osteoporosis. During the past few years, it has been demonstrated that bone remodeling is influenced by complex sequential interactions between bone cells and blood flow perfusion [1]. In particular when estrogen depletion occurs, growth factors and pro-inflammatory cytokines, carried through the microcirculation, may be responsible for the imbalance of bone remodeling [2–9]. Moreover, estrogen is able to up-regulate the expression of endothelial nitric-oxide-synthase (eNOS)

*Corresponding author: S. Patumraj, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand. E-mail: suthilukp@yahoo.com.

1386-0291/08/$17.00 © 2008 – IOS Press and the authors. All rights reserved

and also increase the bioactivity of nitric oxide (NO) in endothelial cells [10–13]. Therefore, one may suppose that bone remodeling imbalance should be closely related with bone microvascular dysfunction during estrogen deficiency.

In a previous study [14], we showed that both 17β-estradiol and genistein supplementation could prevent bone-loss and abnormal response of mesenteric arterioles to acetylcholine in ovariectomized rats.

The objective of this article is to examine the effects of genistein supplementation on femur microvascular dysfunction and bone-loss in estrogen depletion, using a bilateral ovariectomized rat model. In the present study, we made intravital microscopic observation of femur microcirculation by using a femur chamber modified from Ruther's one [15]. Particularly, we quantitatively examined leukocyte-endothelial cell interaction in femur microvascular network in relation to bone-loss and bone biomarkers.

2. Materials and methods

2.1. Animal preparation

Sixty-four female Wistar rats, 10-weeks old (220–280 g; obtained from National Laboratory Animal Center of Salaya Campus, Mahidol University, Bangkok), were used for this study. The experiment was conducted according to the guideline for experimental animals suggested by The National Research Council of Thailand (1999).

After the rats were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (45 mg/kg bw), a bilateral ovariectomized was then performed (OVX rats) [14]. Sham operated animals were used as controls.

Animals were divided into four groups as follows: sham rats ($n = 8$) treated with vehicle (DMSO 100 µl/day sc; Sham), OVX rats ($n = 8$) treated with vehicle (DMSO 100 µl/day; OVX_{veh}), OVX-treated with estradiol (17β-estradiol, 5 µg/day; sc; OVX_{E2} ($n = 8$)) and OVX-treated with genistein (0.25 mg/kg/day; sc; OVX_{gen} ($n = 8$)). In the above, DMSO and genistein were injected subcutaneously immediately after the ovariectomy [14,16]. All the animals were fed by normal food and tap water *ad libitum* under controlled environmental conditions of 12-hour light/dark period until the experiment.

2.2. Femur chamber preparation

On the day of experiment, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg bw; ip). After the tracheostomy, a polyethylene catheter (PE 20) was inserted into the left external jugular vein for intravenous drug administration.

For intravital microscopic observation of femur microcirculation, we devised a new femur chamber by modifying Ruther's one [15]. The femur chamber preparation was described in detail in [17]. Briefly, the present femur has a closed and circular window of approximately 7.5 mm in diameter. A 150 mm longitudinal skin incision was made so as to approach the femur from the lateral. The femur was exposed by blunt dissection between the flexors and extensors muscles. The femur chamber was positioned on the study area of the femur.

2.3. Bone blood flow perfusion

Before placing the femur chamber on the study area, blood flow perfusion (BF) in the femoral bone tissue was measured using a laser Doppler flowmetry (Model ALF 21, Advance Co., Japan). A fiber optic needle probe (wavelength 780 nm; 1 mm diameter) was used for the present measurement. It was fixed at 1 mm above the femur bone and vertical to the tissue. The BF was measured at 6 different points along the middle line of the femur bone, and their mean value was used for the result of femur bone BF [18].

2.4. Intravital fluorescence videomicroscopy

The rat was anesthetized with sodium pentobarbital (45 mg/kg bw; ip). The tracheostomy was performed. The arterial blood pressure was recorded in the common carotid artery via a pressure transducer (Nihon-Kohden, Japan). The jugular vein was cannulated for injection of acridine orange (Sigma Chemical Co., USA; 5 mg/100 ml in normal saline) to label leukocytes [19]. The bone microcirculation was observed using an epi-illumination fluorescence video microscope (Optiphot-2, Nikon, Japan) with a 50 W mercury lamp.

By placing the femur chamber on the study area, we achieved the video images through the SIT videocamera (C2400, Hamamutsu Photonics, Japan) [19], which was projected on a video monitor (GM-1411 QM, Sony, Japan) using 20× (or 40×) objective lens (CF Plan Fluor, Nikon, Japan). The selected area was then recorded in real-time by a videotape recorder (SLV-X311, Sony, Japan) connected to a video timer (VTG-55, FOR-A, Japan) throughout the experimental period.

2.5. Leukocyte adhesion

Based on the recorded video images, we counted the number of leukocytes which adhered to the endothelial wall (or remained stationary more than 30 seconds) in postcapillary venules (15–30 μm in diameter) appeared in femur chamber. We counted number of adherent leukocytes in three venules selected in one rat. Using the number (N) of adherent leukocytes and the length of venule (L, μm) averaged over the three measured venules, we expressed the degree of leukocyte adhesion (Cn) in terms of cells/100 um vessel length as follows [19–21]:

$$Cn = \frac{N}{L} \times 100.$$

2.6. Bone mineral content

At the end of each experiment, the left femur bone was removed and placed in 70% alcohol and dried at 100°C for 48 hours. After cooling inside desiccators, they were weighed and recorded as dry matter weights. Then, dried bone was burned in covered crucibles at 600°C for 16 hours. After cooling to ambient temperature inside desiccators, the cooled bone ash was weighed and expressed in terms of the percentage of ash-to-dry matter weight [22].

2.7. Bone formation markers

Bone formation was assessed by measuring the levels of bone-specific alkaline phosphatase and osteocalcin (markers of early and mature osteoblast function) in the serum. Two ml of blood sample were collected in polypropylene tubes, stored at room temperature for 1 hour and then centrifuged at 3000 rpm at 4°C for 20 minutes. Each sample was then stored at −20°C until analysis. Levels of serum osteocalcin and serum alkaline phosphatase were measured by chemiluminescent assay with a commercial available kit (Roach Diagnostics Co., Germany) [22].

2.8. Statistical analysis

Results were expressed as means ± SD. One-way analysis of variance (ANOVA) was made to examine the difference of each parameter. The data were analyzed by using the SPSS program (version 11.5) for Windows.

3. Results

3.1. Bone blood flow perfusion

Blood flow perfusion (BF) measured in the femoral bone tissue of OVX_{veh} is shown in Fig. 1. At one or three weeks after ovariectomy, the BF decreased significantly compared to their aged-matched sham groups ($p < 0.05$). Interestingly, at three weeks, the BF levels of OVX_{E2} and OVX_{gen} were significantly higher than their age-matched OVX_{veh} group.

3.2. Leukocyte adhesion

Figure 2 shows an example of fluorescence videoimage to demonstrate leukocytes adhesion in bone capillary venules for three groups of sham, OVX_{veh} and OVX_{gen}. In the fluorescence images, leukocytes

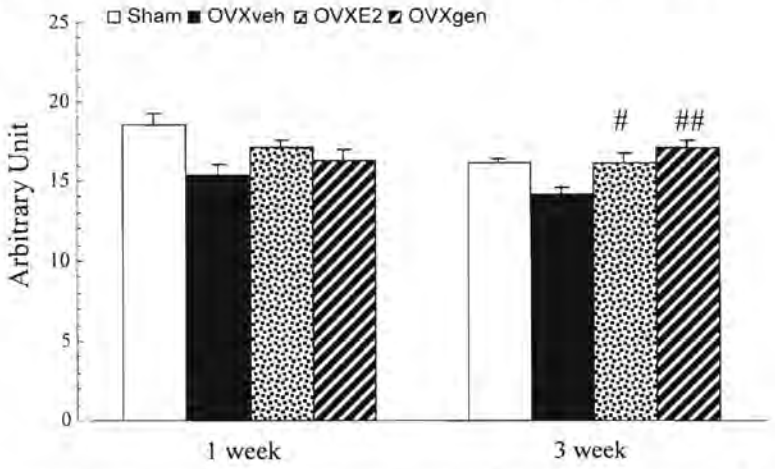


Fig. 1. Effect of genistein on femur blood flow perfusion 1 and 3 weeks after ovariectomy ($n = 8$). $^{*}p < 0.05$ vs. sham and $^{\#}p < 0.05$, $^{\#\#}p < 0.01$ vs. OVX_{veh}.

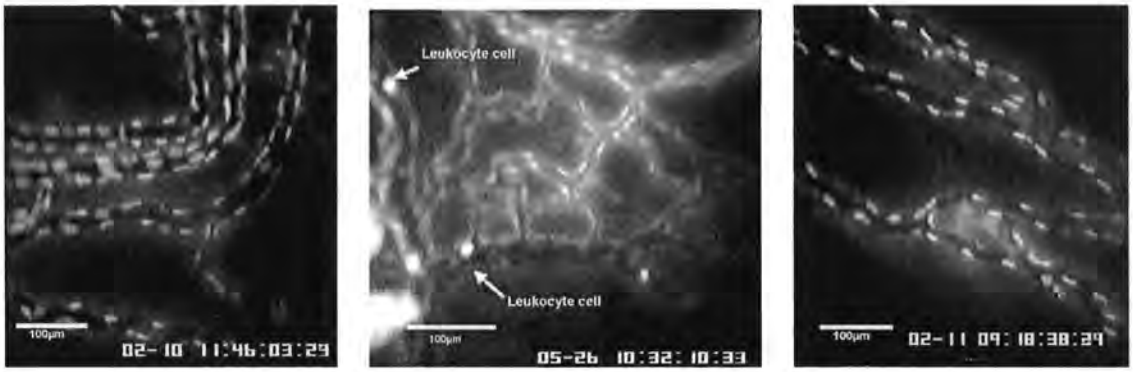


Fig. 2. Fluorescence videomicroscopic images to demonstrate leukocyte adhesion 3 weeks after treatment in sham (a), OVX_{veh} (b) and OVX_{gen} groups (c) (X20).

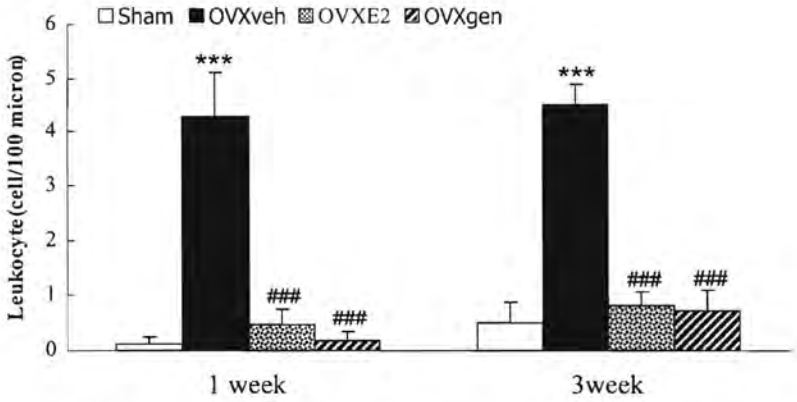


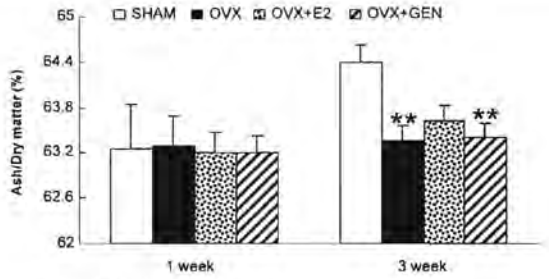
Fig. 3. Effect of genistein on leukocyte adhesion in femur postcapillary venules 1 and 3 weeks after ovariectomy ($n = 6$). $^{***}p < 0.001$ vs. sham, $^{###}p < 0.001$ vs. OVX_{veh}.

could be easily observed by its motion, round shape and big size. In the OVX_{veh} image appeared several leukocytes adhere to bone venular endothelium.

The degrees of leukocyte adhesion (Cn) calculated for sham, OVX_{veh}, OVX_{E2} and OVX_{gen} groups are shown in Fig. 3. Apparently, the leukocyte adhesion in bone venules increased significantly at 1 and 3 weeks after ovariectomy, compared to the sham group. In OVX_{veh} and OVX_{gen} groups, however, leukocyte adhesion were reduced significantly compared to that in OVX_{veh} group. This indicated that genistein or estradiol treatment suppressed the leukocyte adhesion in bone venules.

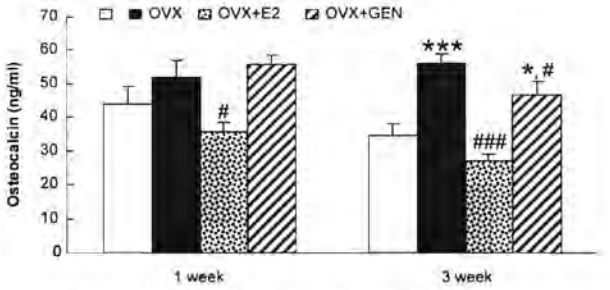
3.3. Bone mineral content and bone formation marker

Figure 4(A)–(C) showed the results of bone mineral content of the left of femur and serum concentration of osteocalcin and alkaline phosphatase, respectively. The results demonstrated that



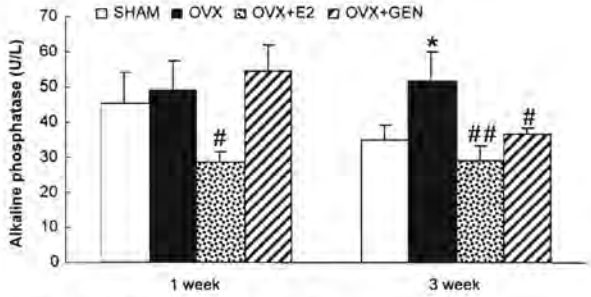
**$p<0.01$ significantly different, compared to Sham.

(A)



*$p<0.05$, ***$p<0.001$ significantly different, compared to Sham.
#$p<0.05$, ###$p<0.001$ significantly different, compared to OVX_{veh}.

(B)



*$p<0.05$ significantly different compared to Sham.
#$p<0.05$, ##$p<0.01$ significantly different compared to OVX_{veh}.

(C)

Fig. 4. Effects of genistein on bone mineral density (A), serum osteocalcin (B) and alkaline phosphatase level (C) 1 and 3 weeks after ovariectomy.

genistein could attenuate the changes of bone mineral content, osteocalcin and alkaline phosphatase levels significantly compared to 3 week-OVX_{veh} group ($p < 0.05$). It is noted that ovariectomy-induced changes of bone mineral content, BMC, (not bone density) means that there is a change on the primary bone-forming minerals, including calcium, phosphorus, magnesium and zinc.

4. Discussion

In the present rat model (mean arterial blood pressure: 141.3 ± 4.7 mmHg for OVX_{veh} group, and 121.0 ± 3.1 mmHg for sham group) [14], femur blood flow perfusion decreased with the increase in number of leukocytes adhering to femur venular endothelium after one week ovariectomy (Figs 1–3). These findings indicated that estrogen depletion caused femur microvascular endothelial dysfunction or femur microvascular abnormality. On the other hand, bone mineral content decreased with the increase in osteocalcin and alkaline phosphatase levels three weeks after ovariectomy (Fig. 4). Interestingly, the results indicated that the femur microvascular abnormality occurred *prior* to the loss of bone mineral content.

The estrogen deficiency-induced femur microvascular dysfunction and bone-loss could be prevented by supplementation of genistein. In the present ovariectomized rat model, one and three-week supplementation of genistein or 17β-estradiol reduced the leukocyte-endothelial cell interaction significantly, compared to those without the supplementation (OVX_{veh}). This suggests that genistein may play as an agent of anti-inflammation to femur microvascular endothelium like estrogen. There are several reports to indicate that pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6) and tumor necrosis factor (TNF-α) increased spontaneously, associated with the declined ovarian function with menopause [3–9,24]. The present enhancement of leukocyte adhesion in femur microvessels may be a reflection of such spontaneous increase in pro-inflammatory cytokines induced by estrogen deficiency. According to Santizo et al. [25], during cerebral ischemia in female rats, basal leukocyte adhesion increase significantly under estrogen-depletion, compared to the normal level. The abnormality could be attenuated with estrogen supplementation. The ovariectomized-induced chronic estrogen depletion might be associated with an enhanced leukocyte adhesion in femur microcirculation.

During the past few years, it has been demonstrated that estrogen plays role in up-regulating of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression and so increase NO generation [1–4]. Constitutive NO production by endothelium is well known for its anti-adhesive properties [24,25]. It is reasonable to suppose that the enhanced leukocyte adhesion to femur venular endothelium may be due to NO reduction under estrogen deficiency.

In the present study, femur blood flow perfusion decreased significantly, compared to that in sham. An adequate blood supply in bone tissue is essential for maintenance of the function of bone cells. Certainly, the abnormality of femur microcirculation affects bone remodeling, including change of bone mineral content. When genistein was supplemented in the ovariectomized rats, femur blood flow perfusion increased markedly. This may be a reason why genistein could attenuate the decreased bone mineral content significantly 3 weeks after ovariectomy. The estrogen deficiency-induced imbalance of bone remodeling may be linked with the abnormal function of microcirculation after estrogen depletion [26, 27]. However, the mechanism underlying the action of genistein on bone cells and pro-inflammatory cytokines induced by estrogen deficiency remains to be studied in the future.

Osteocalcin is a protein that is secreted by mature osteoblasts, being correlated with the bone turnover rate (active bone formation and resorption) [1,23]. The present experimental results showed that osteocalcin and alkaline phosphatase increased significantly in OVX_{veh} group. We note that the increased in bone biomarkers (osteocalcin and alkaline phosphatase) could be prevented by full replacement of estrogen and by genistein supplementation. Therefore, the present study provided an *in vivo* evidence to indicate that: (i) genistein could exhibit estrogenic actions on endothelium and bone cells and also (ii) genistein could prevent bone-loss during estrogen deficiency.

In conclusion, genistein supplementation could effectively prevent both femur microvascular endothelial dysfunction and consequent bone-loss. Genistein might be useful for prevention of bone-loss in postmenopausal women.

Acknowledgements

This study was supported by the Research Fund from Chulalongkorn Graduate School and Ratchadapiseksompotch Fund, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

References

[1] M. Laroche, Circulation intraosseuse: de la physiologie 'a la pathologi, *Rev. Rhum.* **69** (2002), 484–491.
[2] C.S. Roxane, F.Z. Ronald, R.F. Kevin and C.B. Robert, Evaluation of laser-Doppler perfusion imaging for measurement of blood flow in cortical bone, *J. Appl. Physiol.* **90** (2001), 1314–1318.
[3] C. Salvatore, M. Emanuela, D. Laura, G. Tiziana, D.P. Rosanna and R. Zaira, Inducible nitric oxide synthase mediates bone loss in ovariectomized mice, *Endocrinology* **144** (2003), 1098–1107.
[4] R.C. Tostes, Effects of estrogen on the vascular system, *Braz. J. Med. Biol. Res.* **36** (2003), 1143–1158.
[5] R. Pacifici, L. Rifas, R. McCracken, I. Vered, C. McMurtry, L.V. Avioli and W.A. Peck, Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin 1 release, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989), 2398–2402.
[6] R. Pacifici, C. Brown, E. Puscheek, E. Fredrich, E. Slatopolsky, D. Maggio, R. McCracken and L. Avioli, Effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood mononuclear cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991), 5134–5138.
[7] R. Kitasawa, R.B. Kimble, J.L.Vannice, V.T. Kung and R. Pacifici, Interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor binding protein decrease osteoclast formation and bone resorption in ovariectomized mice, *J. Clin. Invest.* **94** (1994), 2397–2406.
[8] H. Bismar, I. Diel, R. Ziegler and J. Pfilschifter, Increased cytokine secretion by human bone marrow cells after menopause or discontinuation of estrogen replacement, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **80** (1995), 3351–3355.
[9] G. Passeri, G. Girasole, R.L. Jilka and S.C. Manolagus, Increased interleukin-6 production by murine bone marrow and bone cells after estrogen withdrawal, *Endocrinology* **133** (1993), 822–828.
[10] M.Y. Farhat, M.C. Lavigne and P.W. Ramwell, The vascular protective effects of estrogen, *FASE* **10** (1996), 615–624.
[11] R.J. Gonzales, B.R. Walker and N.L. Kanagy, 17β-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta, *Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.* **280** (2001), L555–L564.
[12] T. Hayashi, K. Yamada and T. Esaki, Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **214** (1995), 847–855.
[13] K.E. Armour and S.H. Ralston, Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells, *Endocrinology* **139** (1998), 799–802.
[14] S. Khemapech, S. Patumraj and P. Siriviriyakul, Genistein replacement therapy for vasodilation disorder in bilateral ovariectomized rats, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **29** (2003), 271–277.
[15] N. Hansen-Algenstaedt, C. Schaefer, L. Wolfram, C. Joscheck, M. Schroeder, P. Algenstaedt and W. Ruther, Femur window – a new approach to microcirculation of living bone in situ, *J. Orthopaed. Res.* **23** (2005), 1073–1082.
[16] J. Case and C.A. Davison, Estradiol alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation, *JPET* **291** (1999), 524–530.
[17] A. Kasiyaphat, P. Siriviriyakul and S. Patumraj, A novel window chamber for direct microscopic observation of the microcirculation in fumur bone, *Asian Biomed.* **1** (2007), 301–305.
[18] M.J. Kowalski, E.H. Schemitsch, P.J. Kregor, D. Senft and M.F. Swiontkowski, Effect of periosteal stripping on cortical bone perfusion: a laser Doppler study in sheep, *Calcif. Tissue Int.* **59** (1996), 24–26.
[19] A. Jariyapongskul, S. Patumraj, S. Yamaguchi and H. Niimi, The effect of long-term supplementation of vitamin C on leukocyte adhesion to the cerebral endothelium in STZ-induced diabetic rats, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **27** (2002), 67–76.
[20] A. Jariyapongskul, T. Rungiaroen, N. Kasetsuwan, S. Patumraj and H. Niimi, Chronic changes of the iris microvasculature of streptozotocin-induced diabetic rats using fluorescence videomicroscopy, *Clin. Hemorheol. Microcir.* **34** (2006), 273–282.
[21] A. Jariyapongskul, T. Rungiaroen, N. Kasetsuwan, S. Patumraj, J. Seki and H. Niimi, Long-term effects of oral vitamin C supplementation on the endothelial dysfunction in the iris microvessels of diabetic rats, *Microvasc. Res.* **74** (2007), 32–38.

[22] F. Deyhim, B.J. Stoecker, G.H. Brusewitz and B.H. Arjmandi, The effects of estrogen depletion and isoflavones on bone metabolism in rats, *Nutr. Res.* **23** (2003), 123–130.
[23] S. Zeni, C. Gomez-Acotto, S. Di Greorio and C. Mautalen, Differences in bone turnover and skeletal response to thyroid hormone treatment between estrogen-depleted and repleted rats, *Calcif. Tissue Int.* **67** (2000), 173–177.
[24] A.G. Hudetz, J.D.Wood and J.P. Kampine, Nitric oxide synthase inhibitor augments post-ischemic leukocyte adhesion in the cerebral microcirculation *in vivo*, *Neural Res.* **21** (1999), 378–384.
[25] R.A. Santizo, S. Andeson, Y. Shuhua, H.M. Koenig and D.A. Pelligrino, Effects of estrogen on leukocyte adhesion after transient forebrain ischemia, *Stroke* **31** (2000), 2231–2235.
[26] L. Binbin and Y. Shifeng, Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation, *Biol. Pharm. Bull.* **26** (2003), 780–786.
[27] A. Chanawirat, S. Khemapech, S. Patumraj and P. Siriviriyakul, Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats, *Clin. Hemorheol. Microcirc.* **34** (2006), 309–314.