เอสโทรเจนิกแอกติวิตีเชิงปริมาณของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* จากแหล่งต่าง ๆในประเทศไทยในหนูตัดรังไข่

นางสาว ยศพร กิจสมัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547
ISBN 974-53-1171-5

QUANTITATIVE ESTROGENIC ACTIVITY OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* FROM VARIOUS PARTS OF THAILAND IN OVARIECTOMIZED RATS

Miss Yosaporn Kitsamai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2004

ISBN 974-53-1171-5

Thesis Title	Quantitative estrogenic activity of White Kwao Krua *Pueraria mirifica* from various parts of Thailand in ovariectomized rats
By	Miss Yosaporn Kitsamai
Field of Study	Biotechnology
Thesis Advisor	Associate Professor Wichai Cherdshewasart, Ph.D.
Thesis Co-advisor	Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.

Accepted by the Faculty of Science, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree

.....Dean of the Faculty of Science

(Professor Piamsak Menasveta, Ph.D.)

THESIS COMMITTEE

.....Chairman

(Assistant Professor Wichase Khonsue, D. Hum and Env.)

.....Thesis Advisor

(Associate Professor Wichai Cherdshewasart, D.Sc.)

.....Thesis Co-advisor

(Associate Professor Suchinda Malaivijitnond, Ph.D.)

.....Member

(Associate Professor Nattaya Ngamrojanavanich, Ph.D.)

.....Member

(Assistant Professor Chanpen Chanchao, Ph.D.)

ยศพร กิจสมัย : เอสโทรเจนิกแอกติวิตีเชิงปริมาณของกวาวเครือขาว *Pueraria mirifica* จากแหล่งต่างๆในประเทศไทยในหนูตัดรังไข่ (QUANTITATIVE ESTROGENIC ACTIVITY OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* FROM VARIOUS PART OF THAILAND IN OVARIECTOMIZED RATS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.ดร.วิชัย เชิดชีวศาสตร์ อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์, 135 หน้า ISBN 974-53-1171-5

ศึกษาเอสโทรเจนิกแอกติวิตีของกวาวเครือขาวที่เก็บจากแหล่งต่างๆ ทั่วประเทศไทยจำนวน 25 จังหวัดในหนูแรทเพศเมียตัดรังไข่ให้สารแขวนลอยกวาวเครือขาวขนาด 10, 100, 1,000 มก./กก.นน. ตัว/วัน ในน้ำกลั่น 0.7 มล. เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ป้อนน้ำกลั่น 0.7มล./วัน และกลุ่มที่ฉีด17β -estradiol การทดลองแบ่งเป็น 3 ระยะคือระยะก่อนการทดลอง ระยะทดลอง และระยะหลังการทดลอง ระยะละ 14 วัน และใช้การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดโดยการทำ vaginal smear เป็นดัชนีบ่งชี้ พบว่าวันแรกที่มีการเกิด cornified cell หลังจากให้กวาวเครือขาวขนาด 100 มก./กก./วัน และช่วงระยะเวลาการเกิด cornified cell เมื่อให้กวาวเครือขาวขนาด 1,000 มก./กก./วัน สามารถนำมาใช้เป็นดัชนีในการจำแนกเอสโทรเจนิกแอคติวิตีของกวาวเครือขาวได้ จากผลการทดลองพบว่า กวาวเครือขาวแสดงฤทธิ์เอสโทรเจนิกตามขนาดที่ให้นั่นคือ กวาวเครือขาวในขนาด 10 มก./กก./วัน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผนังช่องคลอด ในขณะที่กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มก./กก./วัน สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดได้เร็วและนานกว่าขนาด 100 มก./กก./วัน และการเจริญของเซลล์ผนังช่องคลอดสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูก กวาวเครือขาวจากจังหวัดกาญจนบุรีกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดได้เร็วภายในเวลา4 วัน หลังให้กวาวเครือขาวขนาด 100มก./กก./วัน และคงฤทธิ์อยู่ได้นานกว่าสายพันธุ์อื่นนาน 18 วัน และฤทธิ์ดังกล่าวหลังให้กวาวเครือขาวในขนาด 1,000 มก./กก./วัน เทียบเท่ากับการให้ 17 β- estradiol ขนาด 200ไมโครกรัม /100กรัม นน.ตัว/วัน และกวาวเครือขาวจากจังหวัดอุตรดิตถ์มีฤทธิ์ในเชิงเอสโทรเจนิกต่ำสุด สามารถกระตุ้นการเจริญของเซลล์ที่ผนังช่องคลอดได้ในวันที่ 8 หลังให้กวาวเครือขาวขนาด1,000 มก./กก./วัน และคงฤทธิ์อยู่ได้นานประมาณ 9 วัน และเมื่อดูในภาพรวมแล้ว กวาวเครือขาวจากภาคกลางสามารถแสดงฤทธิ์ในเชิงเอสโทรเจนิกได้สูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญของหนูในแต่ละกลุ่ม พบว่า กลุ่มควบคุมมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตลอดการทดลอง ขณะที่กลุ่มทดลองที่ได้รับกวาวเครือขาวน้ำหนักตัวหนูจะลดลงตามขนาดของกวาวเครือที่ให้ ในการตรวจสอบทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของตับหนูที่ได้รับกวาวเครือขาวจากจังหวัดกาญจนบุรีในขนาด1000 มก./กก./วัน ไม่พบความผิดปกติ อาจกล่าวได้ว่ากวาวเครือขาวทั้ง 25 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่มีความเป็นพิษ งานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางชี้นำในการคัดเลือกวัตถุดิบที่มีคุณภาพดีของกวาวเครือขาวเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมด้านต่างๆต่อไป

ลายมือชื่อนิสิต.....ยศพร กิจสมัย.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2547..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4672378823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: *Pueraria mirifica*, Estrogenic activity, Ovariectomy

YOSAPORN KITSAMAI: QUANTITATIVE ESTROGENIC ACTIVITY OF WHITE KWAO KRUA *Pueraria mirifica* FROM VARIOUS PART OF THAILAND IN OVARIECTOMIZED RATS, THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WICHAI CHERDSHEWASART, D.Sc., THESIS COADVISOR: ASSOC. PROF. SUCHINDA MALAIVICHITNOND. Ph.D,135pp.

To quantify the estrogenic activity of White Kwao Krua (WKK: *Pueraria mirifica*) collected from 25 provinces throughout Thailand, the vaginal cytology assay in ovariectomized rats was used as an indicator. Rats were fed with WKK at the doses of 10, 100, 1,000 mg/kgBW/day suspended in 0.7 ml of distilled water, and compared to rats fed with 0.7 ml distilled water only and injected with a single dose of 17β- estradiol. The treatment schedule was separated into 3 periods; pre-treatment, treatment and post-treatment. The duration for each period was 14 days. From this study, it was found that the first day of appearance of cornified cells after 100 mg/kgBW/day of WKK treatment and the durations of occurrence of cornified cell during 1,000 mg/kgBW/dayof WKK treatment could be used as an indicator to rank the estrogenic activity of WKK. The estrogenic activity of WKK was a dose dependent. WKK at 10 mg/kgBW/day could not stimulate the vaginal cell and the vaginal cornification in rats treated with 1,000 mg/kgBW/day of WKK was occurred faster and longer than that of rats treated with 100 mg/kgBW/day. Changes of vaginal cells after WKK treatment were agreed with the increase of uterus weight. It was found that WKK collected from Kanchanaburi was the most potent in term of induction of vaginal cornification. The proliferation of vaginal epithelium was faster (4 days after 100 mg/kgBW/day of WKK treatment) and longest (for 18 days during 1,000 mg/kgBW/day of WKK treatment). The estrogenic activity of WKK collected from Kanchanaburi at dosage of 1,000 mg/kgBW/day was equated to that of 17β- estradiol at the dose of 200 μg /100gBW/day. When the estrogenic activity was related to the regions, WKK collected from the central part showed the highest estrogenic activity. The body weight of rats in the control group was significantly increased throughout the study period, however, the body weight gain was decreased in rats fed with WKK, in a dose-dependent manner. The histological examination of rats liver treated with 1,000 mg/kgBW/day of WKK showed no signs of abnormality, it may conclude that WKK collected from the 25 provinces has considerably safe for human use. This study should be a practical guide to search for plant materials or set up a plantation of *P. mirifica* with high estrogenic activity to serve the market demand.

Student's signature.....Yosaporn Kitsamai.....

Field of study.....Biotechnology..... Advisor's signature.....

Academic year.....2004..... Co- advisor's signature.....

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis would not have been completed without good gesture from many people. I would like to express my deepest gratitude and appreciation to Assoc. Prof. Dr. Wichai Cherdshewasart, my advisor for his excellent instruction, encouragement, guidance and support throughout this thesis. Without his kindness and understanding, this work would not have been accomplished.

My grateful thank to Assoc. Prof. Dr. Suchinda Malaivijitnond for her guidance, valuable advice and especially the experimental facillities. In addition, I want to thank the thesis committee; Assist. Prof. Dr. Wichase Khonsue, Assoc. Prof. Dr. Nattaya Ngamrojanavanich, Assist. Prof. Dr. Chanpen Chanchao for serving as chairman and members of the thesis committee, respectively, whose comments are especially helpful.

I would like to express my sincere gratitude to Biotechnology Program and especially to Mrs. Sunan Limtiumcharoen for her help.

My acknowlegement is expressd to all staff members of the Primate Laboratory and Department of Biology for their help in laboratory and discussion. I also thank them for their sincerity and friendships.

Sincere thanks to all my friends: Miss Kanyawan Satirawut, Mr. Gade Pulcharoen, Miss Wanravee Sangkapong, Miss Suttijit Sriwatcharakul and all members in Kwoa Krua Labolatory especially Miss Rattana Panriansaen for her useful suggestions. Special thanks are also extended to Mr. Peerasit Surakiatchai for his pratical help.

Thanks go toward to everyone whose name, is not mentioned here for his suggestions, assistance, advice concerning the experimental techniques and the encouragement during the periods of this research. I am also indebted to all experimental rats for their sacrifications which bring me to succeed in my study.

At last, I would like to give my deepest gratitude to my family for their unlimited love, understanding, and the support throughout my life.

CONTENTS

CONTENTS

(continued)

LIST OF TABLES

LIST OF TABLES

(continued)

LIST OF TABLES

(continued)

LIST OF TABLES

(continued)

LIST OF TABLES

(continued)

LIST OF FIGURES

LIST OF FIGURES

(continued)

LIST OF FIGURES

(continued)

LIST OF FIGURES

(continued)

LIST OF FIGURES

(continued)

ABBREVIATIONS

BW	Body weight
Co	Cornified cell
DW	Distilled water
Day	Day of study period
D	Day of treatment period
D'	Day of posttreatment
E_2	17β -estradiol
FSH	Follicle stimulating hormone
g	Gram
kg	Kilogram
l	Litre
L	Leucocyte cell
LH	Lutinizing hormone
M	Molar
mg	Milligram
ml	Millilitre
O	Nucleated cell
OVX	Ovariectomy
PM	*Pueraria mirifica*
µg	Microgram
µl	Microlitre
°C	Degree Celcius