



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของน้ำกระชาย
ในหนูขาววัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์

โดย

ผศ.ดร. ไพวรรณ สุตวรรค

สิงหาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การประเมินฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของน้ำกระชาย ในหนูขาววัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์

ผศ.ดร.ไพวรรณ สุตวรรค

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. กนกพร แสนเพชร ที่ปรึกษาโครงการที่ให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะความช่วยเหลือและการแก้ปัญหาต่างๆ ในงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ดี

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการวิจัย ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ การแพทย์ ภาควิชาสัตตศาสตร์และนรีเวชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ อาคารสัตว์ทดลอง ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ โรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับสถานที่ วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและสิ่งอำนวยความสะดวกที่ใช้ในการศึกษา

ขอขอบพระคุณ Ms Lucy Coomb ในการตรวจแก้ไขต้นฉบับภาษาอังกฤษให้ถูกต้องตามหลักไวยากรณ์เพื่อส่งตีพิมพ์ในวารสาร

ขอขอบคุณผู้ช่วยวิจัยและนักศึกษาทุกท่านที่มีส่วนร่วมทำให้งานวิจัยครั้งนี้บรรลุวัตถุประสงค์และขยายขอบข่ายวัตถุประสงค์การงานวิจัยได้ครอบคลุมมากยิ่งขึ้น

และท้ายที่สุดนี้ขอขอบคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่และมหาวิทยาลัยเชียงใหม่ สำหรับงบประมาณในการสนับสนุนในการเผยแพร่ผลงานวิจัยและการตีพิมพ์ในวารสาร

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	3
บทคัดย่อภาษาไทย	5-7
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ (Abstract)	8-10
Executive Summary	11-15
เนื้อหางานวิจัย	
บทนำ	16-20
วิธีการดำเนินงานวิจัย	21-24
ผลการวิจัย	25-37
อภิปรายผลการทดลอง	38-39
สรุปผลการวิจัย	40
เอกสารอ้างอิง	41-45
Output ที่ได้จากโครงการ	46-48
ภาคผนวก 1	49-56
ภาคผนวก 2	57-61
ภาคผนวก 3	62-65
ภาคผนวก 4	66-72

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180115

ชื่อโครงการ : การประเมินฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของน้ำกระชายในหนูขาววัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร.ไพวรรณ สุตวรรณ์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

E-mail Address : pasudwan@med.cmu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 4 ปี 3 เดือน (15 พฤษภาคม 2551 – 14 สิงหาคม 2555)

วัตถุประสงค์ : การประเมินผลของน้ำกระชายคั่นต่อพฤติกรรมทางเพศ น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ความหนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสตินิไดโอนและเอสตราไดออล ลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและการประเมินความเป็นพิษในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์

วิธีวิจัย : นำหนูกลุ่มทดลองทั้งในวัยก่อนเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์ (กลุ่มละ 32 ตัว) มาป้อนน้ำกระชายสดคั่นขนาด 60, 120 และ 600 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 30 วัน ส่วนกลุ่มควบคุมป้อนด้วยน้ำกลั่นวันละ 1 มล. ทำการประเมินพฤติกรรมทางเพศช่วงวันที่ 26-30 หลังจากช่วงการป้อนสารหนูทุกตัวถูกทำให้สลบในวันที่ 31 ทำการเก็บเลือดเพื่อนำมาวิเคราะห์ทำการเตรียมซีรัมเพื่อวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสตินิไดโอนและเอสตราไดออล ฝ่าชำแหะและชั่งน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ ประเมินความหนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule และความเป็นพิษ

ผลการวิจัย : ในกลุ่มวัยเจริญพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของพฤติกรรมทางเพศของหนู (การเกี้ยวพาราสี ความถี่ในการขี่คร่อม ช่วงเวลาในการขี่คร่อมครั้งแรก ความถี่ในการสอดใส่อวัยวะเพศ และช่วงเวลาในการสอดใส่อวัยวะเพศครั้งแรก) ตลอดช่วง 30 นาทีในการ

สังเกต เมื่อมีการแบ่งช่วงเวลาในการศึกษาพฤติกรรมทางเพศเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 นาที หนูขาวเพศผู้ทุกกลุ่มมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีและความถี่ในการขี่คร่อมในช่วง 10 นาทีแรกมากกว่าช่วง 10 นาทีที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขณะที่ความถี่ในการสอดใส่อวัยวะเพศไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงเวลา หนูขาวมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 2 และความถี่ในการขี่คร่อมที่ความเข้มข้น 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 3 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) เพิ่มความหนาแน่นของอสุจิที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว เพิ่มคุณภาพอสุจิทุกความเข้มข้นในหน่วยเจริญพันธุ์ นอกจากนี้การศึกษาทางจุลกายวิภาคยังพบระยะที่ VII-VIII ของ seminiferous epithelium เด่นชัดในหนูที่ได้รับการทดสอบทุกความเข้มข้นอย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์พบว่าในการสังเกตตลอดช่วง 30 นาทีพฤติกรรมทางเพศไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการแบ่งช่วงเวลาในการสังเกตพฤติกรรมทางเพศเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 นาทีใน 30 นาที พบว่าพฤติกรรมการขี่คร่อมที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัวมีความถี่สูงสม่ำเสมอตลอดทั้ง 3 ช่วง ขณะที่กลุ่มควบคุมมีความถี่สูงในการขี่คร่อมเฉพาะช่วง 10 นาทีแรกเท่านั้น น้ำกระชายคั้นไม่มีผลต่อความหนาแน่นของอสุจิและคุณภาพของอสุจิ และระยะที่ VII-VIII ของ seminiferous epithelium อย่างมีนัยสำคัญ

ในหนูทั้งสองกลุ่มอายุ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสเตนไดโอนและเอสตราไดอล น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะ, เอพิไดไมส, ถุงน้ำเชื้อและต่อมลูกหมาก) ระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายคั้นกับกลุ่มควบคุม การสังเกต seminiferous epithelium และจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของตับและไตด้วยเทคนิคพาราฟินไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูทั้งวัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์และมีค่าโลหิตวิทยาของเม็ดเลือด (ค่าฮีมาโทคริต จำนวนเม็ดเลือดขาวและการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาว) เป็นอยู่ในช่วง

ปกติ น้ำกระชายคั้นมีผลให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule ที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ลดลง

สรุปผล : น้ำกระชายคั้นสามารถเพิ่มภาวะเจริญพันธุ์ได้โดยการเพิ่มพฤติกรรมทางเพศในการเกี่ยวพาราสีและความถี่ในการจี๋คร่อม ความหนาแน่นคุณภาพของอสุจิ ระยะของ seminiferous epithelium ที่ขึ้นอยู่กับวัยของหนู และน้ำกระชายคั้นที่ความเข้มข้นสูงไม่ได้เป็นพิษต่อหนูขาวเพศผู้ทั้งสองวัย

Keyword: กระชาย, พฤติกรรมทางเพศ, อสุจิ, ภาวะสืบพันธุ์, จุลพยาธิวิทยา

Abstract

Project Code : MRG5180115

Project Title : Evaluation of the sexual enhancing activity of *Boesenbergia rotunda* (L.)

Mansf. Juice in premature and mature male rats

Investigator : Paiwan Sudwan Faculty of Medicine, Chiang Mai university

E-mail Address : pasudwan@med.cmu.ac.th

Project Period : 4 years 3 months (15 may 2008 - 14 Aug 2012)

Objective : To determine if *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., juice could promote an increase of the sexual behavior, reproductive organ weights, epididymal sperm density and quality, androgenic and estradiol hormones, testicular histology, and at same time, produce toxicity in premature and mature male rats.

Methods : The premature and mature male rats (n = 32 each) were orally administrated with *B. rotunda* rhizome juice at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg bw for 30 days, whereas controls received distilled water 1 ml/day. Sexual behaviors were tested between days 26–30. After the treatment periods, all animals were anesthetized on day 31. Their blood was collected for hematological analysis. Serum was prepared to

determine testosterone, androstenedione (ADD) and estradiol levels. The reproductive organs were dissected and weighed. The sperm density and quality, testicular histology and the diameter of seminiferous tubules were evaluated, and toxicity.

Results : In mature group, there was no significant changes of rat's sexual behavior in the whole 30 minutes of observation (courtship behavior; mount frequency, MF; mount latency, ML; intromission frequency, IF; and intromission latency, IL). When the observation was conducted at three 10-min intervals over a 30 min period, the courtship behavior and mount frequency of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation ($P \leq 0.05$), while intromission frequency had no significant difference in three 10-min periods. Male rats receiving *B. rotunda* juice at the doses of 600 mg/kg BW had significantly higher courtship in the 2nd 10-min observation and at the doses of 60 mg/kg BW. higher mount frequency in the 3rd 10-min observation than the control group. *B. rotunda* juice showed a significant increase ($P \leq 0.05$) in the sperm density at the doses of 600 mg/kg BW, the sperm quality and number of the stages VII to VIII of seminiferous epithelium at all doses.

In premature rats, the whole 30 min period of observation, all sexual parameters of treated rats were not significantly different from those of controls. However, when the observation was conducted at three 10-min intervals over a 30 min period, the MF of rats treated with 600 mg/kg. BW of the juice was found consistent throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation. *B. rotunda* juice did not significantly affect the sperm density and quality, and number of the stages VII to VIII of seminiferous epithelium.

In both age groups, there were no significant differences in serum testosterone, androstenedione and estradiol levels, and the relative weight of the reproductive organs (testis, caudal epididymis, seminal vesicle and prostate gland) between the control and treated groups. The histopathological changes of liver and kidney were not observed in treated rats in both treated premature and mature male rats and hematological analyses (hematocrit, WBC or differential cell count) were in normal range. *B. rotunda* extract at the dose of 600 mg/kg BW significantly decreased the diameter of seminiferous tubules of the male rats.

Conclusion : *B. rotunda* juices could enhance fertility by improving courtship and mount frequency behavior, density and quality of sperm, stages of seminiferous epithelium, and its effect is age dependable. *B. rotunda* juice did not modify the testosterone, ADD and estradiol levels, or the sexual organ weights, during the 30 days of treatment, and high concentration of juice could be safely consumed.

Keyword: *Boesenbergia rotunda*, sexual behavior, sperm, reproductive organ,

histopathology

Executive summary

Executive summary : บทนำ

การหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction, ED) เป็นอาการที่พบได้สูงในบุรุษเพศ ที่มีความสัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น (Rosen, 1996) และเป็นปัญหาหลักของภาวะบกพร่องทางเพศ (sexual dysfunctions) มักมีสาเหตุมาจากความบกพร่องของระบบประสาท หลอดเลือดแดง กล้ามเนื้อเรียบและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผลข้างเคียงจากยาที่ใช้รักษาโรคทางกาย ภาวะทางจิตใจ รวมทั้งระดับฮอร์โมนที่ผิดปกติและการรูปแบบการใช้ชีวิตที่ไม่เหมาะสม ส่งผลทั้งทางตรงและทางอ้อมไปยังระบบไหลเวียนโลหิตในองคชาติ ปัจจัยเหล่านี้สามารถรักษาได้ด้วยยา วิทยาการทางการแพทย์ จิตบำบัดและการแพทย์ทางเลือก (alternative therapy) การใช้พืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการบำรุงกำลังและกระตุ้นกำหนัด (aphrodisiacs) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความนิยมอย่างสูงแทบทุกภูมิภาคของโลก ซึ่งส่วนใหญ่นำมาใช้โดยการบดแล้วสับต่อกันมา รวมทั้งประเทศไทยก็มีการนำพืชที่เชื่อว่ามีสรรพคุณกระตุ้นกำหนัดมาใช้หลายชนิด เช่น โด่ไม่รู้ล้ม กำลังเสือโคร่ง ตะโกนา มักกระตือรือร้น และกระชายดำ เป็นต้น (Thai Holistic Health Foundation, 2003; Electronic library, 2005; Satingmor Community, 2005; Thai Tambon. Kumpone Tambon, 2006; The Institute of Thai Traditional Medicine, 2006, The Institute of Thai Traditional Medicine, 2007)

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการบันทึกและกล่าวอ้างไว้ในตำราพืชสมุนไพรว่าสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนัด แม้ปัจจุบันจะได้มีรายงานวิจัยที่ประเมิณฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของสารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชายในหนูขาวเพศผู้ (Sudwan *et. al.*, 2007a) รวมถึงการประเมินด้านความปลอดภัยในหนูที่ได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชาย (Saenphet and Sudwan, 2007) ที่แสดงแนวโน้มว่ากระชายมีแนวโน้มจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึง

ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่สูงสุดเป็นประเด็นที่ยังท้าทายต่อไป เนื่องด้วยการออกฤทธิ์ของ กระจายต่อพฤติกรรมทางเพศยังไม่สามารถแสดงผลให้เห็นอย่างเด่นชัดตามสรรพคุณที่กล่าว อ้าง ทั้งนี้การออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะของสัตว์ทดลอง ขนาดและเวลาที่ สัตว์ได้รับสารสกัด รวมถึงวิธีการสกัดสาร ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลของน้ำ กระจายสดคั้นต่อพฤติกรรมทางเพศ น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ความหนาแน่นและคุณภาพ ของอสุจิ ระดับฮอร์โมนเพศ ลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและความเป็นพิษในหนูขาววัยก่อน และวัยเจริญพันธุ์ หากผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ชัดให้เห็นได้ว่ากระจายมีสรรพคุณในการกระตุ้น กำหนดในหนูขาวทั้งสองวัยก็จะใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้สำหรับผู้บริโภคและหาแนวทาง ส่งเสริมผลิตภัณฑ์ในพืชที่มีประสิทธิภาพในการกระตุ้นกำหนดต่อไป

วัตถุประสงค์ (Objectives)

ศึกษาผลของน้ำกระจายคั้นต่อพฤติกรรมทางเพศ น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ความ หนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ ของอสุจิ และระดับฮอร์โมน testosterone, androstenedione (ADD) และ estradiol ต่อลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและความเป็นพิษในหนูขาวเพศผู้วัย ก่อนและวัยเจริญพันธุ์

Executive summary : วิธีการดำเนินการวิจัย (Research methodology)

การวิจัยครั้งนี้ศึกษาในหนูขาว *Rattus norvegicus* สายพันธุ์ Wistar ช่วงวัยก่อนเจริญ พันธุ์ อายุ 4 สัปดาห์ และวัยเจริญพันธุ์ อายุ 6 สัปดาห์ เพศผู้จำนวนกลุ่มละ 32 ตัว จากสำนัก สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา จ.นครปฐม มาทำการทดลองและดูแลตาม มาตรฐาน โดยผ่านการพิจารณาอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง คณะ แพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เริ่มทำการทดลองโดยแบ่งหนูเพศผู้แต่ละวัยออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มทดลอง 3 กลุ่มและกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มทดลองจะได้รับการป้อนน้ำกระชายคั้นที่มีขนาด 60, 120 และ 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ส่วนกลุ่มควบคุมป้อนด้วยน้ำกลั่นวันละ 1 มล. เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 30 วัน ทำการประเมินพฤติกรรมทางเพศช่วงวันที่ 26-30 และเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการศึกษาน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule ความหนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ ระดับฮอร์โมน testosterone androstenedione (ADD) และ estradiol ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและความเป็นพิษ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS.

Executive summary : ผลการวิจัย

1. พฤติกรรมทางเพศ (การเกี้ยวพาราสี ความถี่ในการขี่คร่อม ช่วงเวลาในการขี่คร่อมครั้งแรก ความถี่ในการสอดใส่อวัยวะเพศ และช่วงเวลาในการสอดใส่อวัยวะเพศครั้งแรก) ตลอดช่วงการสังเกต 30 นาทีในหนูขาวเพศผู้ทั้งสองวัยไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ
2. เมื่อมีการแบ่งช่วงเวลาในการศึกษาพฤติกรรมทางเพศเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 นาที
 - 2.1 หนูขาวเพศผู้ทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองของหนูทั้งสองวัยมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีและความถี่ในการขี่คร่อมในช่วง 10 นาทีแรกมากกว่าช่วง 10 นาทีที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขณะที่ความถี่ในการสอดใส่อวัยวะเพศไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงเวลา
 - 2.2 หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์มีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 2 และความถี่ในการขี่คร่อมที่ความเข้มข้น 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 3 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

2.3 หนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์มีพฤติกรรมการขี่คร่อมที่ความเข้มข้น 600 มก./กก.

น้ำหนักรัตว์ มีความถี่สูงสม่ำเสมอตลอดทั้ง 3 ช่วง ขณะที่กลุ่มควบคุมมีความถี่สูงในการขี่คร่อมเฉพาะช่วง 10 นาทีแรก

3. หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์มีความหนาแน่นของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกินน้ำกระชายสดคั้นที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักรัตว์ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์
4. หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์มีคุณภาพอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกินน้ำกระชายสดคั้นทุกความเข้มข้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์
5. หนูทั้งสองช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสเตนไดโอนและเอสตราไดอล น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะ, เอพิไดไดมิส, ถุงน้ำเชื้อและต่อมลูกหมาก) ระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุม
6. หนูทั้งสองช่วงอายุมีลักษณะทางจุลกายวิภาคเป็นปกติเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุมของ seminiferous epithelium ที่ด้วยศึกษาด้วยเทคนิคพาราฟิน แต่หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์มีระยะที่ VII-VIII ของ seminiferous epithelium เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกินน้ำกระชายสดคั้นทุกความเข้มข้น ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์
7. หนูทั้งสองช่วงอายุที่กินน้ำกระชายสดคั้นที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักรัตว์ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule น้ำหนักรัตว์เล็กกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ
8. หนูทั้งสองช่วงอายุไม่พบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของตับและไตที่ด้วยศึกษาด้วยเทคนิคพาราฟินเมื่อย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H&E) และ periodic acid-Schiff (PAS)
9. หนูทั้งสองช่วงอายุมีระดับโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดและน้ำหนักรัตว์เป็นปกติ

Executive summary : สรุปผลการวิจัย

น้ำกระชายคั้นสามารถเพิ่มภาวะเจริญพันธุ์ได้โดยการเพิ่มพฤติกรรมทางเพศในการ
 เกี่ยวพาราสิ และความถี่ในการชี่คร่อม ความหนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ การเจริญระยะที่
 VII-VIII ของ seminiferous epithelium ที่ขึ้นอยู่กับวัยของหนูและพบว่าน้ำกระชายสดคั้นความ
 เข้มข้นสูง (600 มก./กก. น้ำหนักตัว) ที่กินต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน ไม่ได้เป็นพิษต่อหนูขาวเพศ
 ผู้ทั้งสองวัย

เนื้อหางานวิจัย - บทนำ

การหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction, ED) เป็นอาการที่พบได้สูงในบุรุษเพศ มักมีสาเหตุมาจากความบกพร่องของระบบประสาท หลอดเลือดแดง กล้ามเนื้อเรียบ และเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผลข้างเคียงจากยาที่ใช้รักษาโรคทางกาย ภาวะทางจิตใจ รวมทั้งระดับฮอร์โมนที่ผิดปกติและการรูปแบบการใช้ชีวิตที่ไม่เหมาะสม สามารถรักษาได้ด้วยยา วิทยาการทางการแพทย์ จิตบำบัดและการแพทย์ทางเลือก (alternative therapy) การใช้พืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการบำรุงกำลังและกระตุ้นกำหนัด (aphrodisiacs) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความนิยมอย่างสูงแทบทุกภูมิภาคของโลก รวมทั้งประเทศไทยก็มีการนำพืชที่เชื่อว่ามีสรรพคุณกระตุ้นกำหนัดมาใช้หลายชนิด เช่น โดไม่รู้ล้ม กำลังเสือโคร่ง ตะโกนา ม้ากระทืบโรง และกระชายดำ เป็นต้น (Thai Holistic Health Foundation, 2003; Electronic library, 2005; Satingmor Community, 2005; Thai Tambon. Kumpone Tambon, 2006; The Institute of Thai Traditional Medicine, 2006, The Institute of Thai Traditional Medicine, 2007)

กระชาย (*Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการบันทึกและกล่าวอ้างไว้ในตำราพืชสมุนไพรว่าสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนัด เป็นพืชล้มลุกอยู่ในตระกูล Zingiberaceae ส่วนเหง้าและรากมักใช้เป็นเครื่องปรุงในอาหารในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ ข้อมูลทางพฤกษศาสตร์พบว่าส่วนหัวของกระชายมีสาร 1,5 - Cineol, Boesenbergin A, dl- Pinostrobin Corphor, flavonoid, Chromene (Hemhongs, 1998), panduratin C, panduratin A, hydroxypanduratin A, helichrysetin, 2',4',6'-trihydroxyhydrochalcone, and uvangoletin (Cheenpracha *et al.*, 2006) เป็นองค์ประกอบในงานสาธารณสุขมูลฐานใช้เป็นสมุนไพรที่มีสรรพคุณแก้ปวดมวนในท้อง แก้กษัย ท้องอืด ท้องเฟ้อ และบำรุงกำลัง (Pongpamorn, 1982; Chomchalow *et al.*, 2003) นอกจากนี้ยังใช้เป็นยาบำรุงหัวใจ แก้อาการเหน็ดเหนื่อย ขับปัสสาวะพิการ แก้บิดมูกเลือด ท้องเดิน รวมทั้งรักษาโรค

กามตายด้านหรือบำรุงกำหนัด (The Institute of Thai Traditional Medicine, 2007; Pongpamorn, 1982; Association of Traditional Medicine School, 1981; Pongpamorn, 1982; Theingburanathum, 1995; Deewiset, 1999, Wutythamaweche, 2000).) และไม่มีพิษ เหนียวปล้น (Hemhongs, 1998) กระจายจึงเป็นสมุนไพร (Medicinal plant) อีกชนิดหนึ่งที่ถูกนำมาใช้กันแพร่หลายในการส่งเสริม ป้องกัน คงไว้ รักษาและฟื้นฟูเพื่อให้สภาพร่างกายทำงานได้ตามปกติ เช่นเดียวกับการใช้สมุนไพรในประชากรประมาณ 80% ของโลกที่นำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาโรค (Gurib-Fakim, 2006) และใช้กันแพร่หลายมากกว่า 80,000 ชนิด การนำมาใช้มักเริ่มจากความเชื่อที่ใช้สืบทอดกันมา ในปัจจุบัน สมุนไพรที่มีสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนัดนั้นได้รับความสนใจอย่างมากและมีการศึกษาวิจัยเพื่อประเมินฤทธิ์หรือสรรพคุณดังกล่าว มีการใช้ที่ปลอดภัยและได้พัฒนาในเชิงการค้า เช่น *Eurycoma longifolia*, *Tribulus terrestris*, *Lepidium meyenii* and *Butea superba* (Ang and Ngai, 2001; Cicero *et al.*, 2001; Gauthaman *et al.*, 2002; Ang *et al.*, 2003; Cherdshewasart and Nimsakul, 2003; Tajuddin *et al.*, 2004; Neychev and Mitev, 2005).

เนื่องด้วยภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Erectile dysfunction, ED) เป็นภัยที่คุกคามที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพกายและจิตในบุรุษเพศในปัจจุบันมากขึ้น หลายประเทศได้ส่งเสริมให้มีการวิจัยสมุนไพรเพื่อจะพัฒนาไปเป็นสมุนไพรหรือยาตัวใหม่ในการรักษาภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (ED) เช่น การศึกษาผลของ *Eurycoma longifolia* หรือโสมมาเลเซีย ในการกระตุ้นกำหนัดในหนูเพศผู้ที่ไม่มีพฤติกรรมทางเพศ (noncopulator male rats) (Ang and Ngai, 2001) พบว่าพืชพื้นบ้านชนิดนี้มีผลทำให้พฤติกรรมทางเพศของหนูดีขึ้น ต่อมา มีการศึกษาลายคลึงกันในสารสกัดจาก *Montanoa tomentosa* ในหนูเพศผู้ที่เฉื่อยชาทางเพศ (sexually inactive animals) พบว่าพืชชนิดนี้สามารถเหนี่ยวนำหนูแสดงพฤติกรรมทางเพศได้ (Carro-Juárez และคณะ; 2004) ทำนองเดียวกัน Tajuddin *et al.* (2004) ได้ศึกษาฤทธิ์และผลข้างเคียงของ *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) พบว่าพืชชนิดนี้สามารถ

เพิ่มกิจกรรมทางเพศ (sexual activity) ในหนูปกติเพศผู้และไม่มีผลให้เกิดแผลในกระเพาะอาหาร จึงสนับสนุนให้มีการใช้พืชชนิดนี้ในภาวะ sexual disorders ได้

Tribulus terrestris เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เพื่อเพิ่มสมรรถภาพทางเพศในกลุ่มบุรุษเพศชาวบัลแกเรีย จีน และอินเดีย Gauthaman *et al.*, (2002) ได้ศึกษาในแง่ของพฤติกรรมทางเพศและความดันภายในอวัยวะเพศ (intracavernous pressure; ICP) ในหนูปกติและหนูที่ถูกตัดอัณฑะ พบว่าสารสกัดจาก *Tribulus terrestris* มีผลทำให้น้ำหนักของต่อมลูกหมากและพฤติกรรมทางเพศเพิ่มขึ้น ต่อมา Neychev and Mitev (2005) จึงนำ *Tribulus terrestris* มาศึกษาระดับฮอร์โมนเพศชายในคนและพบว่าพืชชนิดนี้ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมน testosterone ในซีรัมของคนกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้ในแถบแอนเดียมีความเชื่อว่า *Lepidium meyenii* หรือ Maca สามารถเพิ่มพลังงานและความสามารถในการสืบพันธุ์ จึงถูกนำมาศึกษาและพบว่า Maca มีผลต่อพฤติกรรมทางเพศแบบเฉียบพลันและเรื้อรังจริง (Cicero *et al.*, (2001)

สำหรับประเทศไทยมีพืชที่ใช้กันมายาวนานและเชื่อว่ามีสรรพคุณกระตุ้นกำหนดหรือเสริมสมรรถภาพแก่บุรุษเพศหลายชนิด เช่น โด่ไม่รู้ล้ม (*Elephantopus scaber*) กำลังเสือโคร่ง (*Betula alnoides*) ม้ากระทืบโรง (*Ficus pubigera*) ตะโกนา (*Diospyros rhodocalyx*) (Thai Holistic Health Foundation, 2003; Electronic library, 2005; Satingmor Community, 2005; The Institute of Thai Traditional Medicine, 2006) พืชบางชนิด เช่น กวาวเครือแดง (*Butea superba*) ได้รับการศึกษาและยอมรับว่ามีสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนดจริง โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากกวาวเครือแดงสามารถเพิ่มการแข็งตัวของอวัยวะเพศในผู้ป่วยที่มีภาวะหย่อนสมรรถภาพทางเพศและไม่มีพิษต่อร่างกาย (Cherdshewasart and Nimsakul, 2003) ในปี 2004 Deethae ศึกษาในโด่ไม่รู้ล้มและตะโกนาพบว่าสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่ำจากโด่ไม่รู้ล้มสามารถเพิ่มความสามารถทางเพศ (sexual potency) แต่จะให้ผลตรงกันข้ามในสารสกัดที่มีความเข้มข้นสูง สำหรับสารสกัดหยาบของตะโกนามีผลในการเพิ่มจำนวนอสุจิแต่ไม่มี

ผลต่อความสามารถทางเพศ. Sudwan และคณะ (2006a) ได้ประเมินฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของสารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชายดำในหนูขาวเพศผู้เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 60 วัน พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดกระชายดำขนาด 60, 120 และ 240 มก./กก. ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมน testosterone แต่ทำให้ระดับฮอร์โมน estradiol ลดลง (Sudwan and Saenphet, 2007a) หนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 240 มก./กก. มีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีในช่วง 10 นาทีแรกน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมและพบการเกิด vacuole ในเซลล์ตับขึ้น (Sudwan et al., 2006) อย่างไรก็ตามสารสกัดกระชายดำขนาด 60 มก./กก. มีผลทำให้ความหนาแน่นของอสุจิเพิ่มขึ้น (Sudwan et al., 2007b) และขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง seminiferous tubule เพิ่มขึ้น (Sudwan and Saenphet 2007a)

ภาวะปัจจุบัน กระชาย (*Boesenbergia rotunda*) ถูกนำมาใช้และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายจากความเชื่อว่ามีคุณสมบัติในการเสริมสมรรถภาพทางเพศ และเป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ได้มีการบันทึกและกล่าวอ้างไว้ในตำราพืชสมุนไพรไทยว่าสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนัด มีรายงานวิจัยที่ประเมินฤทธิ์เสริมสมรรถภาพทางเพศของสารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชายในหนูขาวเพศผู้ขนาด 60, 120 และ 240 มก./กก. เป็นเวลา 60 วัน พบว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากกระชายทุกขนาดมีผลทำให้น้ำหนักของอัณฑะและเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule เพิ่มขึ้น และยังพบว่ากระชายขนาด 60 มก./กก. มีผลทำให้น้ำหนักของ seminal vesicle เพิ่มขึ้น (Sudwan et al., 2007a) โดยสารสกัดขนาดดังกล่าวไม่มีพิษต่อสัตว์ทดลอง (Saenphet and Sudwan, 2007) แม้ว่าผลการทดลองพบว่ากระชายมีแนวโน้มจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระบบสืบพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่สูงสุดยังเป็นประเด็นที่ยังท้าทายต่อไป เนื่องด้วยการออกฤทธิ์ของกระชายต่อพฤติกรรมทางเพศ และระดับฮอร์โมนเพศชายยังไม่ได้แสดงผลให้เห็นอย่างเด่นชัดตามสรรพคุณที่กล่าวอ้าง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะของสัตว์ ขนาดและเวลาที่สัตว์ได้รับสารสกัด รวมถึงวิธีการสกัดสาร ดังนั้น การศึกษารังนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผล

ของน้ำกระชายสดต่อพฤติกรรมทางเพศ ความหนาแน่นและคุณภาพของตัวอสุจิ ระดับฮอร์โมน testosterone androstenedione (ADD) และ estradiol และลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะในหนูขาววัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์ ซึ่งหากผลการวิจัยครั้งนี้ชี้ชัดให้เห็นได้ว่ากระชายมีสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนดในหนูขาวทั้งสองวัย ก็จะใช้เป็นแนวทางในการเลือกใช้สมุนไพรสำหรับผู้บริโภคและส่งเสริมผลิตภัณฑ์ในพืชที่มีสรรพคุณในการกระตุ้นกำหนดต่อไป

เนื้อหางานวิจัย - วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของน้ำกระชายคั่นต่อพฤติกรรมทางเพศในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์
2. ศึกษาผลของน้ำกระชายคั่นต่อน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ความหนาแน่น รูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิ และระดับฮอร์โมน testosterone, androstenedione (ADD) และ estradiol ในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์
3. ศึกษาผลของน้ำกระชายคั่นต่อลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์และวัยเจริญพันธุ์
4. การศึกษาผลของน้ำกระชายคั่นต่อลักษณะจุลกายวิภาคของตับและไตในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์
5. การศึกษาผลของน้ำกระชายคั่นต่อค่าโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดในหนูขาวเพศผู้วัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์

เนื้อหางานวิจัย - วิธีการดำเนินงานวิจัย

การเตรียมสัตว์ทดลอง

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ใช้หนูขาว *Rattus norvegicus* สายพันธุ์ Wistar ทั้งสองเพศ น้ำหนักประมาณ 90-110 และ 200-240 กรัม ในช่วงวัยก่อน อายุ 4 สัปดาห์ และวัยเจริญพันธุ์ อายุ 6 สัปดาห์ตามลำดับ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม มาทำการทดลองและดูแลตามมาตรฐานที่ได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (No. 11/2551)

การเตรียมน้ำกระชายสด

นำหัวกระชายสด (*Boesenbergia rotunda*) จากจังหวัดเชียงใหม่มาปั่นด้วยเครื่องปั่น และคั้นน้ำ เพื่อนำมาป้อนสัตว์ทดลองตามขนาดที่ต้องการ

การแบ่งกลุ่มการทดลอง

เตรียมแบ่งหนูเพศผู้ออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วนคือ

ส่วนที่ 1 เป็นหนูเพศผู้ก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Pre-mature male rat) จำนวน 32 ตัว แบ่งเป็น กลุ่มทดลอง 3 กลุ่มและกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มทดลองจะได้รับการป้อนน้ำกระชายสดที่มีขนาด 60, 120 และ 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ส่วนกลุ่มควบคุมป้อนด้วยน้ำกลั่นวันละ 1 มล. เป็นเวลาต่อเนื่องกัน 30 วัน

ส่วนที่ 2 เป็นหนูเพศผู้วัยเจริญพันธุ์ (Mature male rat) จำนวน 32 ตัว ที่ได้มีการแบ่งกลุ่มและการทดลองเช่นเดียวกับส่วนที่ 1

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการประเมินพฤติกรรมทางเพศ น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule ความหนาแน่น รูปร่างและการเคลื่อนที่ของ อสุจิ ระดับฮอร์โมน testosterone และ estradiol (Sudwan *et al.*, 2007a) ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะ ลักษณะจุลพยาธิวิทยาของตับและไต และค่าโลหิตวิทยาของเม็ดเลือด

การประเมินพฤติกรรมทางเพศ

เตรียมหนูเพศเมีย

โดยวิธีการทำ Vaginal Smear ในหนูเพศเมียทุกตัว (กลุ่มละ 20 ตัว) ในช่วงเวลา 08:00 – 09:00 น. คัดเลือกหนูที่อยู่ในระยะ estrous phase มาทดสอบพฤติกรรมทางเพศ

การทดสอบพฤติกรรมทางเพศ (Sexual behavior testing)

นำหนูเพศผู้มาใส่ในกรงที่ทำการทดสอบ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที เพื่อการปรับตัว แล้วจึงหย่อนหนูเพศเมียลงไปในกรง สังเกตและบันทึกพฤติกรรมทางเพศด้วยวีดีทัศน์เป็นเวลา 30 นาที

ระดับฮอร์โมนเพศ

สลับหนูและทำการผ่าตัดเพื่อนำเลือดจากหัวใจห้องล่างซ้าย เพื่อเตรียม serum และนำมาศึกษาระดับฮอร์โมน testosterone และ estradiol ด้วยวิธี electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) และระดับฮอร์โมน androstenedione (ADD) ด้วยวิธี radioimmunoassay (RIA)

การประเมิน น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ความหนาแน่นและคุณภาพของอสุจิ

ชำแหละอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อนำมาชั่งน้ำหนัก และนำ epididymis 1 ข้างมาศึกษาความหนาแน่นของอสุจิด้วย hemocytometer และศึกษารูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule

นำอัณฑะ 1 ข้างมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะเพื่อศึกษาลักษณะโดยทั่วไปและความชุกของระยะที่ VII-VIII เทียบกับระยะอื่นๆ ของ seminiferous tubule ด้วยเทคนิคที่ใช้ paraffin ที่นำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H&E) และ periodic acid-Schiff (PAS) และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์

ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของตับและไต

นำตับและไตมาตัดเป็นชิ้นเล็ก เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ด้วยเทคนิคพาราฟินและย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H&E) และ periodic acid-Schiff (PAS) และแปลผลโดยพยาธิแพทย์

ระดับโลหิตวิทยาของเม็ดเลือด

นำเลือดที่ได้มาวัดและจำแนกค่าต่างๆ ของเลือดและเม็ดเลือด

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ analysis of variance (ANOVA) และ least significant difference (LSD) ในกรณีที่ค่าความแปรปรวนไม่เท่ากันวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney test ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0 และกำหนดค่าระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $P \leq 0.05$

เนื้อหางานวิจัย - ผลการวิจัย

1. พฤติกรรมทางเพศ (การเกี้ยวพาราสี ความถี่ในการขี่คร่อม ช่วงเวลาในการขี่คร่อมครั้งแรก ความถี่ในการสอดใส่อวัยวะเพศ และช่วงเวลาในการสอดใส่อวัยวะเพศครั้งแรก)
ตลอดช่วงการสังเกต 30 นาทีในหนูขาวเพศผู้ กลุ่มวัยเจริญพันธุ์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของพฤติกรรมทางเพศของหนูทุกค่าพารามิเตอร์ (ตาราง 1)

ตาราง 1 Sexual behavior parameters of mature male rats treated with *B. rotunda* juice (60, 120 and 600 mg/kg) and control groups. MF = mount frequency, IF = intromission frequency, ML = Mount latency.

Parameter (Mean±S.D.)	Groups (n=8 each)			
	Control	60 mg/kg	120 mg/kg	600 mg/kg
Courtship	652.00±160.04	795.88±87.41	773.38±113.93	846.50±69.87
MF	8.75±5.90	18.50±10.74	17.38±10.84	19.62±9.21
IF	1.88±4.22	6.62±14.40	2.38±4.24	2.34±5.61
ML	170.12±388.77	43.00±43.60	16.25±10.17	24.00±20.37
IL	1424.6±695.54	1354.9±784.59	1180.8±856.47	1402.5±736.20

There were no significant differences; one-way ANOVA.

Data expressed as mean and standard deviation (SD).

เมื่อมีการแบ่งช่วงเวลาในการศึกษาพฤติกรรมทางเพศเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 นาที หนูขาวเพศผู้ทุกกลุ่มมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีและความถี่ในการขี่คร่อมในช่วง 10 นาทีแรกมากกว่าช่วง 10 นาทีที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ขณะที่ความถี่ในการสอดใส่

อวัยวะเพศไม่มีความแตกต่างกันทั้ง 3 ช่วงเวลา หนูขาวมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสีที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 2 (ตาราง 2) และความถี่ในการจี๋คร่อมที่ความเข้มข้น 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ในช่วง 10 นาทีที่ 3 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ดังตารางที่ 3

ตาราง 2 Times of courtship behavior (seconds) of male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10-min observations over a 30 min period;. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

Groups (n=8 each)	Day 26-30		
	1 st 10 min	2 nd 10 min	3 rd 10 min
Control	342.12±82.44 ^a	163.62±64.89 ^b	146.25±47.27 ^b
60 mg/kg	363.75±54.83 ^a	204.00±66.29 ^{bc}	192.12±63.82 ^{bc}
120 mg/kg	342.88±26 ^a	226.12±27.45 ^{bc}	208.38±77.64 ^{bc}
600 mg/kg	396.00±42.05 ^a	239.88±35.43 ^c	210.62±35.20 ^{bc}

^{a,b,c} The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

ตาราง 3 MF (numbers) of mature male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10 minute observations over a 30 min period;. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

Groups (n=8 each)	Day 26-30		
	1 st 10 min	2 nd 10 min	3 rd 10 min
Control	7.25±5.12 ^a	0.88±0.99 ^{bc}	0.62±1.41 ^b
60 mg/kg	11.62±7.54 ^a	3.12±3.40 ^{bc}	3.75±2.77 ^c
120 mg/kg	14.62±9.94 ^a	2.00±2.07 ^{bc}	0.75±1.17 ^{bc}
600 mg/kg	15.25±7.29 ^a	2.12±1.25 ^{bc}	2.25±1.83 ^{bc}

^{a,b,c} The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

ในหนูเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์พบว่าในการสังเกตตลอดช่วง 30 นาทีพฤติกรรมทางเพศ ไม่มีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตาราง 4) มีหนูที่ได้รับน้ำกระชายคั้น เพียง 2 ตัว (1 ตัวที่ความเข้มข้น 60 มก./กก. น้ำหนักตัว และ 1 ตัวที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว ที่มีพฤติกรรมการสอดใส่อวัยวะเพศ

ตาราง 4 Sexual behavior parameters of premature male rats treated with *B. rotunda* juice (60, 120 and 600 mg/kg) and control groups. MF = mount frequency, IF = intromission frequency, ML = Mount latency.

Parameter (Mean±S.D.)	Groups (n=8 each)			
	Control	60 mg/kg	120 mg/kg	600 mg/kg
Courtship	600.50±164.59	611.12±164.20	699.88±149.65	627.00±157.57
MF	15.62±13.22	15.50±13.82	14.62±8.09	14.08±12.23
IF	0.00±0.00	0.38±1.06	0.00±0.00	0.50±1.41
ML	289.25±525.76	75.88±102.59	17.25±13.92	29.88±22.21

There were no significant differences; one-way ANOVA.

Data expressed as mean and standard deviation (SD).

อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการแบ่งช่วงเวลาในการสังเกตพฤติกรรมทางเพศเป็น 3 ช่วงๆ ละ 10 นาทีใน 30 นาที พบว่าหนูขาวเพศผู้วัยก่อนเจริญพันธุ์ทุกกลุ่มมีพฤติกรรมการเกี้ยวพาราสี (ตาราง 5) และความถี่ในการขี่คร่อมในช่วง 10 นาทีแรกมากกว่าช่วง 10 นาทีที่ 2 และ 3 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่ป้อนด้วยน้ำกระชายสดคั้นที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว มีพฤติกรรมการขี่คร่อม มีความถี่สูงสม่ำเสมอตลอดทั้ง 3 ช่วง ขณะที่กลุ่มอื่นมีความถี่สูงในการขี่คร่อมในช่วง 10 นาทีแรกมากกว่าช่วง 10 นาทีที่ 2 และ/หรือ 3 เท่านั้น (ตาราง 6)

ตาราง 5 Times of courtship behavior (seconds) of male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10-min observations over a 30 min period;. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

Groups (n=8 each)	Day 26-30		
	1 st 10 min	2 nd 10 min	3 rd 10 min
Control	313.12±72.13 ^a	160.88±70.74 ^b	128.50±55.46 ^b
60 mg/kg	318.88±61.86 ^a	162.12±63.33 ^b	130.12±62.67 ^b
120 mg/kg	359.38±113.88 ^a	163.38±58.04 ^b	147.25±55.88 ^b
600 mg/kg	315.62±43.78 ^a	168.50±75.40 ^b	142.88±60.14 ^b

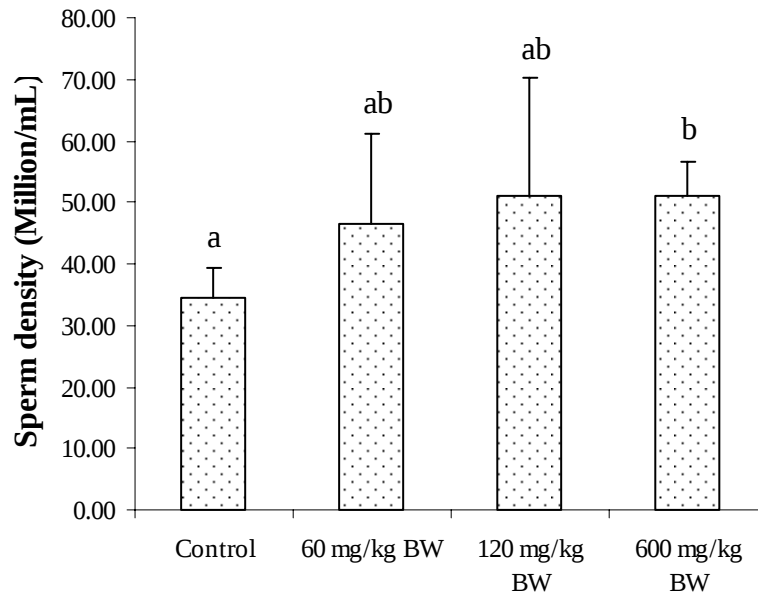
^{a,b} The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

ตาราง 6 MF (numbers) of premature male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10 minute observations over a 30 min period;. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

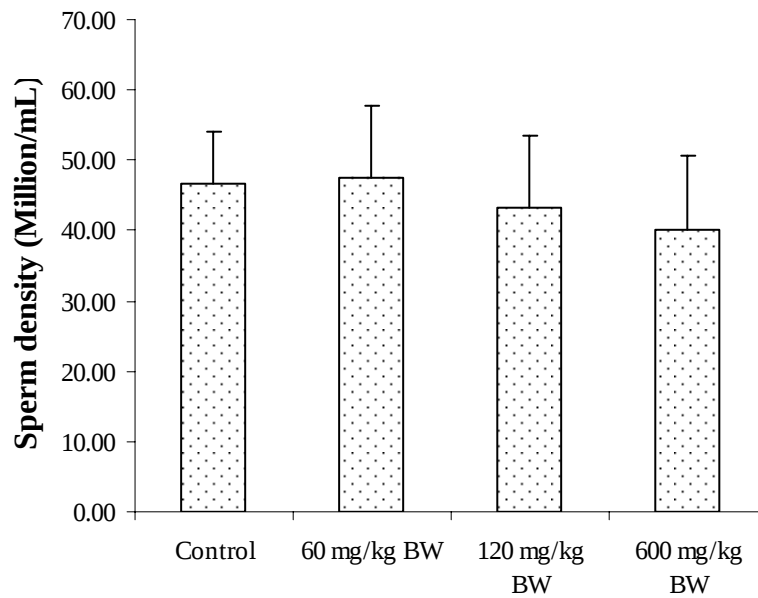
Groups (n=8 each)	Day 26-30		
	1 st 10 min	2 nd 10 min	3 rd 10 min
Control	10.88±11.06 ^{ab}	2.00±1.85 ^e	2.75±2.19 ^{bde}
60 mg/kg	9.50±7.56 ^{ac}	2.12±2.10 ^{be}	3.88±4.58 ^{bcde}
120 mg/kg	9.75±4.13 ^a	1.50±1.31 ^e	3.12±4.55 ^{bde}
600 mg/kg	7.25±5.70 ^{ad}	3.62±4.63 ^{bde}	3.50±4.50 ^{bde}

^{a,b,c,d,e} The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

2. ความหนาแน่นของอสุจิ - หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์ที่กินน้ำกระชายสดคั้นระดับความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว มีความหนาแน่นของอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (รูป 1) แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหน่วยก่อนเจริญพันธุ์ (รูป 2)

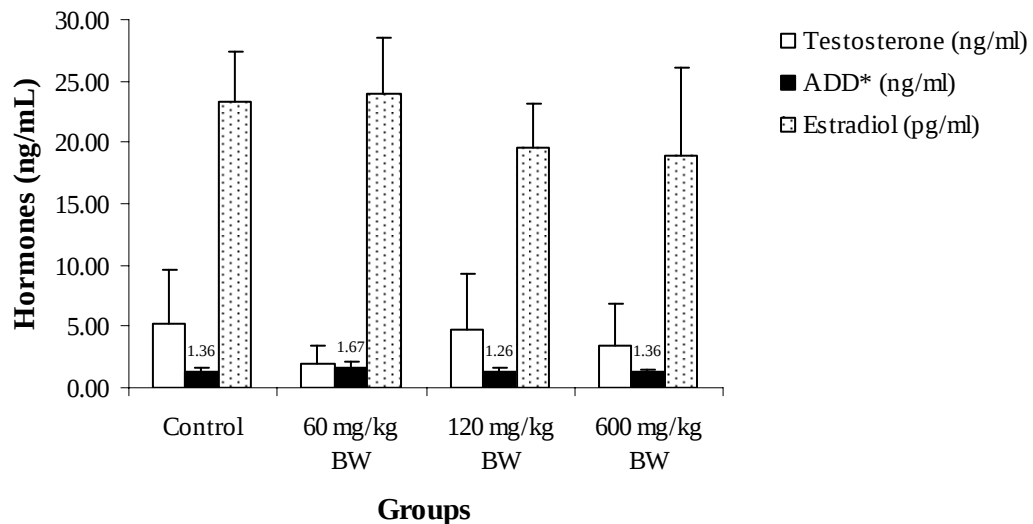


شکل 1 Sperm density of mature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA; there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD

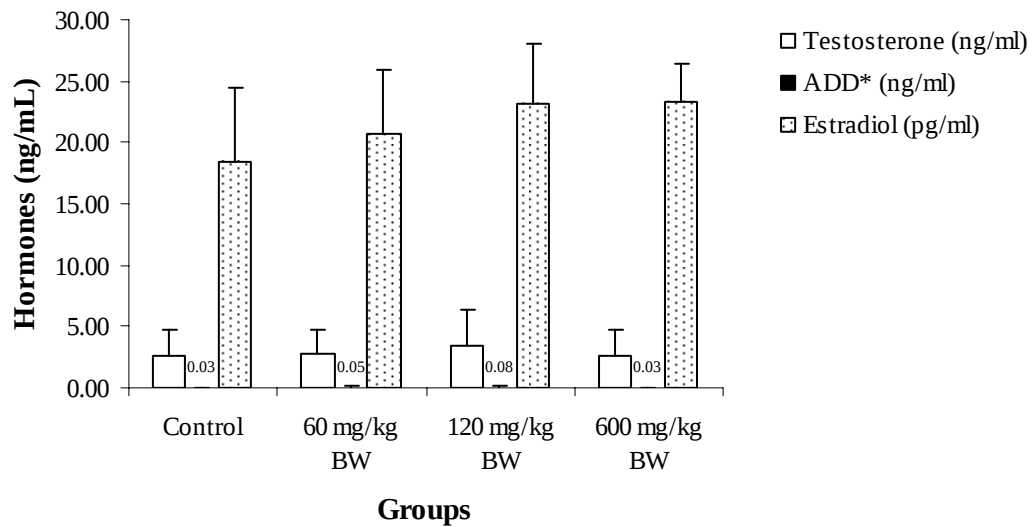


شکل 2. Sperm density of premature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA; there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD

3. **คุณภาพของอสุจิ** - หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์ที่กินน้ำกระชายสดคั้นระดับความเข้มข้น 60, 120 และ 600 มก./กก. น้ำหนักตัว มีคุณภาพอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหน่วยก่อนเจริญพันธุ์ (ภาคผนวก 1)
4. **ระดับฮอร์โมนเพศ** - หนูทั้งสองช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสติไนไดโอนและเอสตราไดออล ระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุม (รูป 3 และ 4)



รูป 3 Testosterone, androstenedione (ADD) and estradiol levels of mature male rats treated with *B. rotunda* extract for 30 days (one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test (*); there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD.



รูป 4 Testosterone, androstenedione (ADD) and estradiol levels of premature male rats treated with *B. rotunda* extract for 30 days (one-way ANOVA and Kruskal-Wallis Test (*); there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD.

5. น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะ เอพิไดไมซิส ถุงน้ำเชื้อและต่อมลูกหมาก) - หนูทั้งสองช่วงอายุไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน แอนโดรสติไนไดโอนและเอสตราไดออล ระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุม (รูป 5 และ 6)

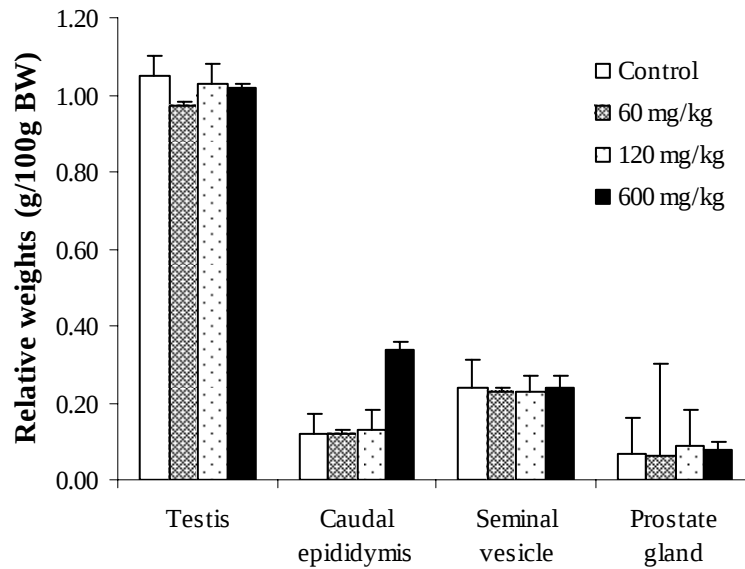


Figure 5 Relative reproductive organ weights (g/100 g body weight) of mature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA; there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD.

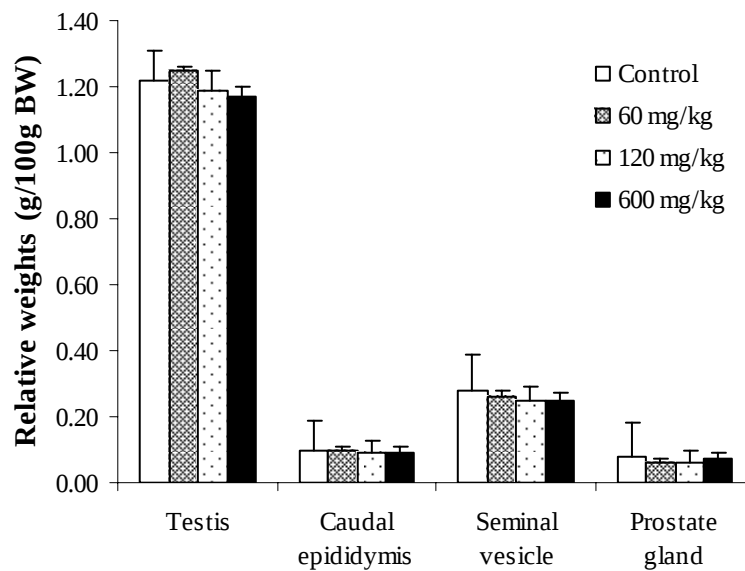
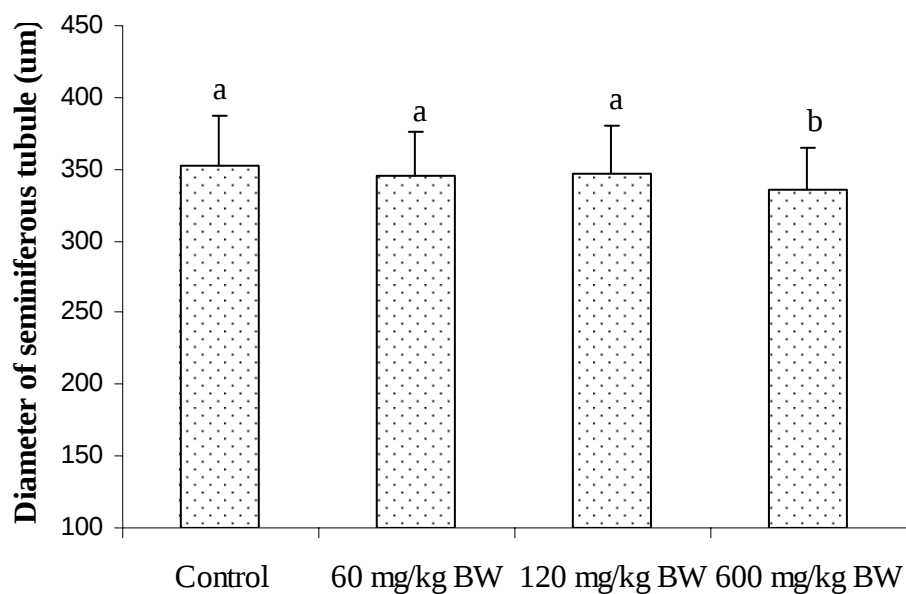


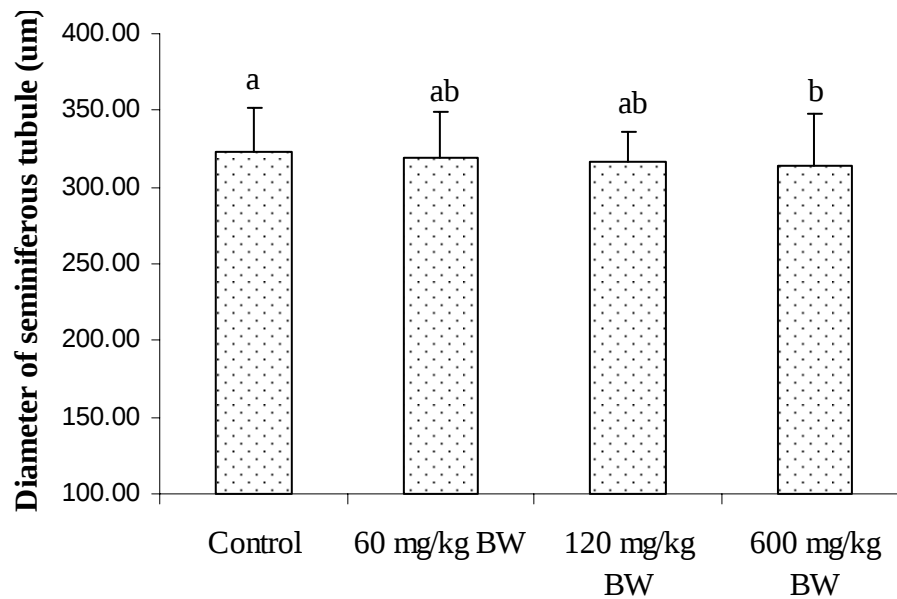
Figure 6 Relative reproductive organ weights (g/100 g body weight) of premature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA; there were no significant differences). The data were expressed as mean $\pm$ SD.

6. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะ - หนูทั้งสองช่วงอายุมีลักษณะทางจุลกายวิภาคเป็นปกติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุมของ seminiferous epithelium ที่ด้วยศึกษาด้วยเทคนิคพาราฟิน แต่หนูขาวเพศผู้วัยเจริญพันธุ์มีระยะที่ VII-VIII ของ seminiferous epithelium เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อกินน้ำกระชายสดคั้นทุกความเข้มข้น ซึ่งไม่พบการเปลี่ยนแปลงในหนูวัยก่อนเจริญพันธุ์ (ภาคผนวก 1)

7. ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule - หนูทั้งสองช่วงอายุที่กินน้ำกระชายสดคั้นที่ความเข้มข้น 600 มก./กก. น้ำหนักตัว มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule น้ำหนักตัวเล็กกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูป 7 และ 8)



รูป 7 Diameter of seminiferous tubule of mature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA followed by LSD; $bP < 0.05$, compared with the control group). Cross-sections of seminiferous tubules were measured in each of 32 animals using a calibrated ocular micrometer under $40 \times$ objective lens (groups; $n = 160$ each)



รูป 8 Diameter of seminiferous tubule of premature male rats treated with *B. rotunda* juice for 30 days (one-way ANOVA followed by LSD; $bP < 0.05$, compared with the control group). Cross-sections of seminiferous tubules were measured in each of 32 animals using a calibrated ocular micrometer under $40 \times$ objective lens (groups; $n = 160$ each)

8. ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของตับและไต - หนูทั้งสองช่วงอายุไม่พบลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา (histopathology) ของตับและไตที่ด้วยศึกษาด้วยเทคนิคพาราฟินเมื่อย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H&E) และ periodic acid-Schiff (PAS) (ภาคผนวก 3)

9. หนูทั้งสองช่วงอายุมีระดับโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดเป็นปกติ

หนูทั้งวัยก่อน (ตาราง 8 และภาคผนวก 2) และวัยเจริญพันธุ์ (ตาราง 7 และ 8) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของจำนวนเม็ดเลือดขาวและการนับแยกชนิดเม็ดเลือดขาวระหว่างกลุ่มที่กินน้ำกระชายสดคั้นกับกลุ่มควบคุม และมีค่าฮีมาโทคริตอยู่ในเกณฑ์ปกติ

ตาราง 7. Hematological examinations of mature male rats treated with *B. rotunda* juice during 30 days compared with control. ANOVA followed by LSD ($P<0.05$) and Kruskal-Wallis Test (*). There were no significant differences.

Parameters	Group of male rats			
	Control (mean $\pm$ SD)	60 mg/kg (mean $\pm$ SD)	120 mg/kg (mean $\pm$ SD)	600 mg/kg (mean $\pm$ SD)
Hematocrit (%)	51.63 $\pm$ 3.02 ^a	49.50 $\pm$ 3.30 ^{ab}	49.50 $\pm$ 4.24 ^b	48.29 $\pm$ 3.53 ^{ab}
Total WBC (cu.mm)	4282.5 $\pm$ 1788.10	3610.0 $\pm$ 2319.11	4576.2 $\pm$ 1535.85	5428.6 $\pm$ 1668.97
Neutrophil (%)	15.77 $\pm$ 2.72	17.88 $\pm$ 6.22	15.75 $\pm$ 4.33	13.72 $\pm$ 3.31
Eosinophil* (%)	0.25 $\pm$ 0.47	0.38 $\pm$ 0.75	0.25 $\pm$ 0.47	0.43 $\pm$ 0.78
Basophil (%)	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00
Lymphocyte* (%)	80.98 $\pm$ 2.44	79.63 $\pm$ 7.59	80.37 $\pm$ 5.51	81.86 $\pm$ 3.98
Monocyte* (%)	3.00 $\pm$ 1.92	2.13 $\pm$ 1.36	3.63 $\pm$ 2.39	4.00 $\pm$ 2.94

ตาราง 8. Hematological examinations of premature male rats treated with *B. rotunda* juice during 30 days compared with control. ANOVA followed by LSD ($P<0.05$) and Kruskal-Wallis Test (*). There were no significant differences.

Parameters	Group of male rats			
	Control (mean $\pm$ SD)	60 mg/kg (mean $\pm$ SD)	120 mg/kg (mean $\pm$ SD)	600 mg/kg (mean $\pm$ SD)
Hematocrit (%)	47.60 $\pm$ 2.57	48.39 $\pm$ 1.77	48.96 $\pm$ 1.80	47.49 $\pm$ 1.66
Total WBC (cu.mm)	4679.06 $\pm$ 3000.61	2647.97 $\pm$ 2014.17	2254.22 $\pm$ 1856.67	4124.53 $\pm$ 1165.05
Neutrophil (%)	21.04 $\pm$ 5.39	19.96 $\pm$ 3.13	16.96 $\pm$ 3.47	17.96 $\pm$ 2.69
Eosinophil* (%)	1.04 $\pm$ 0.60	1.42 $\pm$ 0.77	1.00 $\pm$ 0.36	0.58 $\pm$ 0.39
Basophil (%)	0.75 $\pm$ 0.50	0.96 $\pm$ 0.58	0.46 $\pm$ 0.31	0.46 $\pm$ 0.08
Lymphocyte* (%)	75.00 $\pm$ 5.87	75.76 $\pm$ 3.85	78.54 $\pm$ 2.00	78.67 $\pm$ 2.38
Monocyte* (%)	2.08 $\pm$ 0.50	2.38 $\pm$ 0.58	3.12 $\pm$ 1.73	2.46 $\pm$ 0.25

10. หนูทั้งสองช่วงอายุมีน้ำหนักเพิ่มเป็นปกติและมีชีวิตรอดทุกตัวตลอดช่วง 30 วันในการป้องกันน้ำกระชายคั้น

เนื้อหางานวิจัย - บทวิจารณ์

Results of the experiments indicate that all doses of *B. rotunda* juice produced no significant changes in the courtship behavior, MF, IF, ML and IL in the whole 30 min period of observation between treated and control groups. We found similar patterns of courtship behavior in three 10-min intervals over a 30 min period of all groups as in mature male rats treated with *K. parviflora* (Sudwan *et al*, 2006) and *B. rotunda* extracts (Sudwan *et al*, 2007a). Here, *B. rotunda* juice at the dose of 600 mg/kg bw affected the pre-mature male rats in MF by consistent behavior throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation, and *B. rotunda* juice at the dose of 600 mg/kg bw affected the mature male rats in courtship and the dose of 60 mg/kg bw affected the mature male rats in MF, being a sign of sexual potential of male, reflecting its ability to copulate the female. Because mount is one type of stereotyped copulatory responded (Phaus *et al*, 2006), it can be assumed that *B. rotunda* juice is necessary to maintain the time for copulation quality in the longer period.

The present study, *B. rotunda* juice could not promote the androgenic and estradiol hormones, reproductive organ weights. However, this research demonstrated that sperm density, sperm qualities, number of the stages VII to VIII of seminiferous epithelium, courtship and MF were facilitated by *B. rotunda* juice, it can be assumed to advantage in male reproductive system and its effect is age dependable. Moreover, the previous studies of the ethanolic extract of *B. rotunda* caused an increase in the sexual organ weights and seminiferous tubular diameter (Sudwan *et al*, 2007a), and secretory granules in Sertoli cell (Sudwan and Saenphet, 2007b).

Our results showed no significant difference between body weight of the male rats. All groups had a significant increase in body weight. There were no histopathological changes of liver and kidney or no significant difference of WBC or differential cell count in all rats as the works on mature rats (Saenphet *et al*, 2007). All values were at a normal level (Sharp and La Regina, 1998). Thus, continuous high concentration of *B. rotunda* juice could not harm pre-mature or mature male rats, which could support the use of *B. rotunda* as a traditional medicine for primary health care without toxicity (Hemhongsai, 1998; Chomchalow *et al*, 2006; Saenphet *et al*, 2007).

เนื้อหางานวิจัย - สรุปผลการวิจัย

น้ำกระชายคั้นสามารถเพิ่มภาวะเจริญพันธุ์ได้โดยการเพิ่มพฤติกรรมทางเพศในการ
 เกี่ยวพาราสี และความถี่ในการช้คร่อม ความหนาแน่น รูปร่างและการเคลื่อนที่ของอสุจิ การ
 เจริญระยะที่ VII-VIII ของ seminiferous epithelium ที่ขึ้นอยู่กับวัยของหนูไม่มีผลต่อระดับ
 ฮอรโมนเพศในซีรัม น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย และพบว่าน้ำกระชายสดคั้นความ
 เข้มข้นสูง (600 มก./กก. น้ำหนักตัว) ที่กินต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน ไม่ได้เป็นพิษต่อหนูขาวเพศ
 ผู้ทั้งสองวัย

เนื้อหางานวิจัย – เอกสารอ้างอิง

- Ang H.H., Ikeda S. and Gan E.K. 2003. Effects of *Eurycoma longifolia* Jack on sexual qualities in middle ages male rats. *Phytomedicine.*, 10(6-7): 590-593.
- Ang H.H. and Ngai T.H. 2001. Aphrodisiac evaluation in non-copulator male rats after chronic administrator of *Eurycoma longifolia* Jack. *Fund Clin Pharmacol.*, 15(4), 265-268.
- Association of Traditional Medicine School. 1981. Traditional Medicine, Bangkok: Traditional Medicine Association Printing; pp 5-6.
- Carro-Juárez M., Cervantes E., Cervantes-Méndez M. and Rodríguez-Manzo G. 2004. Aphrodisiac properties of *Montanoa tomentosa* aqueous crude extract in male rats. *Pharmacol Biochem Be.*, 78, 129-134.
- Chaophya abhaibhubejhr hospital. 2005. *Boesenbergia rotunda* (KraChay): Herbal tea. Prachinburi: Herbal Product R&D Project.
- Cheenpracha S., Karalai C., Ponglimanont C., Subhadhirasakul S. and Tewtrakul S. 2006. Anti-HIV-1 protease activity of compounds from *Boesenbergia pandurata*. *Bioorgan Med Chem.*, 14, 1710-1714.
- Cherdshewasart W. and Nimsakul N. 2003. Clinical trial of *Butea superba*, an alternative herbal treatment for erectile dysfunction. *Asian J Androl.*, 5(3), 243-246.
- Chomchalow N., Bansiddhi J. and MacBaine C. Amazing Thai medicinal plants. 2003. Horticultural Research Institute (HRI), Department of Agriculture and Horticultural Science Society of Thailand (HSST). Bangkok.
- Churdboonchart V. 2000. Thai vegetables; Food and drug. Bangkok: Amarin Printing.

- Cicero A.F.G., Bandieri E. and Arletti R. 2001. *Lepidium meyenii* Walp. improves sexual behavior in male rats independently from its action on spontaneous locomotor activity. J Ethnopharmacol., 75, 225-229.
- Deethae W. 2004. Effects of crude extracts of *Elephantopus scaber* Linn. and *Diospyros rhodocalyx* Kurz. on sexual potency in male rats. Master Thesis in Biology. Faculty of Graduate Studies, Chiang Mai University.
- Deewiset K. 1999. Thai pharmacy. Bangkok: The WVO Office of Printing Mill. p36.
- Electronic library. 2005. "Herb fermented in white whiskey" [online]. Available http://www.elib-online.com/doctors/herb_alcohol02.html (March 30, 2006).
- Gauthaman K., Adaikan P.G. and Prasad R.N.V. 2002. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats. Life Sci., 71(12), 1385-1396.
- Gurib-Fakim A. 2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol Aspects Med., 27(1), 1-93.
- Hemhongs P. 1998. Thai herbal health. 1st ed. The Office of the Primary Health Care, Ministry of Public Health. Bangkok: The WVO Office of Printing Mill. pp 46-47.
- Neychev V.K. and Mitev V.I. 2005. The aphrodisiac herb *Tribulus terrestris* does not influence the androgen production in young men. J Ethnopharmacol., 101(1-3), 319-323.
- Pongpamorn P.C. 1982. Textbook of traditional medicine. Bangkok: Umnuaysarn. pp 170-171.
- Roche Diagnostics GmbH. 2004. Testosterone. Indianapolis: US Customer Technical Support.

- Rosen R.C. 1996. Erectile dysfunction: The medicatization of male sexuality. Clin Psychol Rev., 16(6), 497-519.
- Satingmor Community. 2005. "Medicinal plants" [online]. Available <http://www.geocities.com/satingmor/samunprai.html> (March 30, 2006).
- Saenphet K., Sudwan P., Saenphet S., Wangpakapattanawong P. and Thamprasert K. 2007. Safety evaluation of ethanolic extracts from *Boesenbergia Rotunda* (L.) mansf. on male rats. Poster presentation at the International workshop on medicinal and aromatic plants, Chiang Mai, Thailand, 15-18 January, 2007. 126.
- Sharp P.E. and La Regina M.C. 1998. The laboratory rat. New York: CRC Press.
- Sudwan P. and Saenphet K. 2006. *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker involves testicular histology and estradiol in male rats. Abstract. 10th International Congress of Ethnobiology; Ethnobiology: Food, Health, and Cultural Landscape on The International Society of Ethnobiology, Chiang Rai, Thailand, p.154-155.
- Sudwan P. and Saenphet K. 2007a. Effect of *Kaempferia parviflora* Wall. Ex. Baker on reproductive organs, seminiferous tubule and testosterone level in male rats. Oral presentation at the International workshop on medicinal and aromatic plants, Chiang Mai, Thailand, 15-18 January, 2007. 29.
- Sudwan P. and Saenphet K. 2007b. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on Ultrastructure of Sertoli Cells and Spermatozoa in Male Albino Rats. Poster presentation at the Globals summit on medicinal and aromatic plants. Chiang Mai, Thailand, November 21-24, 2007.

- Sudwan P., Saenphet K., Aritajat S. and Sitasuwan N. 2007a. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behaviour of male rats. Asian J Androl., 9(6), 849-55.
- Sudwan P., Saenphet K. and Saenphet S. 2007b. Sperm density and ultrastructure of Sertoli cells in male rats treated with *Kaempferia parviflora* Wall. ex. Baker extract. Southeast Asian J Trop Med Public Health, 38 (Suppl 1), 249-254.
- Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S. and Suwansirikul S. 2006. Effects of *Kaempferia parviflora* Wall. ex Baker on sexual activity in male rats and its toxicity. Southeast Asian J Trop Med Public Health;37 (Suppl 3), 210-215.
- Tajuddin., Ahmad S., Latif A. and Qasmi I.A. 2004. Effect of 50% ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. (clove) on sexual behaviour of normal male rats. BMC Complement Altern Med., 4, 1-17.
- Thai Holistic Health Foundation. 2003. "Satho: Medicinal wine" [online]. Available <http://www.thaihof.org/herb/abstract/> (March 30, 2006).
- Thai Tambon. Kumpone Tambon, Pratumrachawongsa Amphur, Amnatcharoen. 2006. "Krachaidum wiskey" [online]. Available <http://www.thaitambon.com> (March 30, 2006).
- The Institute of Thai Traditional Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. 2006a. "Aprodisiac plants" [online]. Available http://www.dtam.moph.go.th/ittm_web/articles/herb_man/herbman11.htm (March 30, 2006).

The Institute of Thai Traditional Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. 2006b. "Product champion" [online].

Available <http://ittm.dtam.moph.go.th/index.html> (March 30, 2006).

The Institute of Thai Traditional Medicine, Department for Development of Thai Traditional and Alternative Medicine, Ministry of Public Health. 2007. "Krachai". [online]. Available http://ittm.dtam.moph.go.th/Service/herb_data/herb_ssm03.htm (October 14, 2007).

Theingburanathum W. 1995. Dictionary: Diseases and Thai herbs. Bangkok: Uksornpittaya. p13.

Wutythamaweck W. 2000. Encyclopedia of Thai herbs I. Bangkok: Phet 69 Printing. pp 40-44.

Output

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ 1 เรื่อง คือ

Yotarlai S, Chaisuksunt V, Saenphet K, **Sudwan P.** 2011. Effects of *Boesenbergia rotunda* juice on sperm qualities in male rats. J Med Plants R 5(16), 3861-3867. (มี impact factor 0.879; ปี 2010) (ภาคผนวก 1)

2. ผลงานตามที่ได้คาดว่าจะตีพิมพ์ ได้แก่

2.1 Sexual activity in pre-mature male rats treated with *Boesenbergia rotunda* (L.)

Mansf. juice. (อยู่ระหว่างการเตรียมส่งตีพิมพ์)

2.2 *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice did not affect androgenic and estradiol

levels in pre-mature and mature rats. (อยู่ระหว่างการเตรียม manuscript)

2.3 Sexual activity in mature male rats treated with *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf.

juice and toxicological evaluation. (อยู่ระหว่างการเตรียม manuscript)

3. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์

3.1 เชิงสาธารณะ

ข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการพิจารณาเลือกใช้สมุนไพรที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ สำหรับเพศชายซึ่งมีแนวโน้มสูงที่จะได้ผลคล้ายคลึงกับการศึกษาในสัตว์ทดลอง และยังไม่พบความผิดปกติทางโลหิตวิทยาของเม็ดเลือดและลักษณะจุลพยาธิวิทยาของตับและไตในหนูขาวเพศผู้ทั้งสองวัย

3.2 เชิงวิชาการ

3.2.1 ทราบสรรพคุณของน้ำกระชายคั้นสดต่อพฤติกรรมทางเพศและระบบสืบพันธุ์

สำหรับในหนูขาวเพศผู้ทั้งวัยก่อนและวัยเจริญพันธุ์ โดยไม่พบความผิดปกติทาง

โลหิตวิทยาของเม็ดเลือดและความผิดปกติทางจุลพยาธิวิทยาของตับและไตในสัตว์ทดลอง ข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการพิจารณาศึกษาและเลือกใช้กระชายเป็นสมุนไพรที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ในมนุษย์ต่อไป

- 3.2.2 สร้างนักวิจัยที่สนใจศึกษาทางด้านสมุนไพรต่อระบบสืบพันธุ์ และยังนำช่วยพัฒนาการเรียนการสอน โดยมีนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท สาขากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จำนวน 2 คน มีความสนใจศึกษาวิจัยในหัวข้อที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้ โดยมีข้าพเจ้าเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และมีนักศึกษาชั้นปีที่ 2 สาขาแพทยศาสตร์ จำนวน 1 คน สนใจมาเป็นผู้ช่วยวิจัยในช่วงปิดภาคเรียน นอกจากนี้ยังสามารถนำรูปและผลจากงานวิจัยไปใช้สอนในการบรรยายและปฏิบัติการ ทำให้เพิ่มทักษะในการเรียนทางด้านเซลล์ เนื้อเยื่อ จุลกายวิภาคศาสตร์และการศึกษาวิจัยทางวิทยาศาสตร์ กายวิภาคศาสตร์มากยิ่งขึ้น

4. อื่น ๆ

4.1 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติและตีพิมพ์เป็น Proceeding

ในวารสารนานาชาติ จำนวน 1 เรื่อง

Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice did not affect androgenic and estradiol levels in premature male rats. Asian J Androl. 2009; 11(5 Suppl 1): 164-65. (ภาคผนวก 2)

(Poster presentation at the Third Asia – Pacific Forum on Andrology.

Nanjing, China, October 10-13, 2009.)

4.2 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการระดับนานาชาติแบบ Poster จำนวน 2 เรื่อง

1. **Sudwan P**, Saenphet K, Suwansirikul S. 2008. Sexual activity in premature male rats treated with *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice. In: Poster presentation at the Joint International Tropical Medicine Meeting 2008. Bangkok, Thailand, October 13-14, 2008. (ภาคผนวก 3)
2. Phante S, **Sudwan P**, Saenphet K. 2008. Evaluation of epididymal sperm morphology and motility in Pre-puberty male rats given *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice. In: Poster presentation at the Joint International Tropical Medicine Meeting 2008. Bangkok, Thailand, October 13-14, 2008. (ภาคผนวก 3)

4.3 การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการนักวิจัยรุ่นใหม่พบमेธีวิจัยอาวุโส เพื่อนำเสนอความก้าวหน้าของงานวิจัย จำนวน 2 ครั้ง

4.3.1 ได้เสนอผลงานแบบ poster presentation ในการประชุมทางวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 9” วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552 โรงแรมฮอติเดย์อินน์ริสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ เรื่อง Sexual activity in premature male rats treated with *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice (ภาคผนวก 4)

4.3.2 1 ได้เสนอผลงานแบบ poster presentation ในการประชุมทางวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว ครั้งที่ 9” วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553 โรงแรมฮอติเดย์อินน์ริสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ เรื่อง *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice did not affect androgenic and estradiol levels in premature male rats (ภาคผนวก 4)

ภาคผนวก 1

Full Length Research Paper

Effects of *Boesenbergia rotunda* juice on sperm qualities in male rats

Sudawadee Yotarlai¹, Vipavadee Chaisuksunt¹, Kanokporn Saenphet² and Paiwan Sudwan^{1*}

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

Accepted 20 May, 2011

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. is one of Thai medicinal plants locally known for its male sexual enhancing effect. However, the study of other impacts of this plant on the male reproductive system is still very rare. To investigate the effects of *B. rotunda* on sperm qualities, the fresh juice of this plant was tested on both pre-mature and mature male rats by oral administration at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg.bw for 30 days. The results showed that *B. rotunda* juice significantly progressively increased the motility of sperm at the doses of 60 and 120 mg/kg.bw and enhanced the number of normal sperm at all doses in the mature rats. Additionally, significant prominent stages VII to VIII of seminiferous epithelium was found in treated mature rats at all doses. There was no effect of *B. rotunda* on the pre-mature rats. These findings suggest that the *B. rotunda* juices could enhance fertility by improving the quality of sperm and its effect is age dependable.

Key word: *Boesenbergia rotunda*, sperm morphology, sperm motility, seminiferous epithelium, pre-mature rat, mature rat.

INTRODUCTION

The World Health Organization (WHO) has recognized infertility as an important public health issue (Vayena et al., 2001). A study reported that approximately 15% of couples had had the experience of infertility at least once in their lifetime (Evers, 2002). Hassun et al. (2005) reviewed that this problem effected on male factors of 51.2% of conjugal infertility and the males in 39% of these couples had idiopathic reasons with abnormal semen analyses. Furthermore, the reduction of sperm qualities, closely related to increasing age has been reported in humans (Auger et al., 1995).

Many medicinal plants are widely used to treat or relieve different aspects of male infertility for long times. Evidently, several studies in animals have shown that the sperm qualities of males' reproduction could be improved by various medicinal plants such as *Lepidium meyenii*, *Hibiscus sabdariffa*, *Zingiber officinale* and Korean ginseng (Bustos-Obregón et al., 2005; Amin and Hamza, 2006; Park et al., 2007). In Thailand, *Boesenbergia*

rotunda (L.) Mansf., commonly known as "Krachai", belongs to the Zingiberaceae family and is widely distributed as commercial cultivation in the provinces of Kanchanaburi, Nakhon Pathom, Nakhon Sawan and Ratchaburi (Chomchalow et al., 2006). Fresh rhizomes have a characteristic aroma and slightly pungent taste that are used for cooking in traditional medicine for health-promotion. The rhizomes of *B. rotunda* were found to contain a variety of antioxidant active compounds such as panduratin A, cardamonin, 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone, 2',4'-dihydroxy-6'-methoxychalcone, 4'-hydroxypanduratin A (Shindo et al., 2006). Moreover, there have been reported that some derivatives isolated from *B. rotunda* rhizomes have anti-dengue-2 virus NS3 protease (Kiat et al., 2006), anti-*Helicobacter pylori* activity (Bhamarapavati et al., 2006) and has anti-inflammatory properties (Boonjaraspinyo et al., 2010). It had also been reported to remedy many diseases such as anti-flatulent, stomach discomfort, diuretic, leucorrhea, anti-dysenteric and treatment of oral disease (Chomchalow et al., 2006). Interestingly, a recent study of *B. rotunda* extract in male rats found that it could increase the diameter of seminiferous tubules and the testicular and seminal vesicle weights (Sudwan et al., 2007).

*Corresponding author. E-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th. Tel: +66-53-945-312 ext. 208, +66-081-366-1526. Fax: +66-53-945-304

Even though there have been a number of studies investigating the actions of *B. rotunda*'s derivatives, scientific information about the effects of this plant on reproductive properties is still very few. The present study is aimed to investigate the effects of *B. rotunda* on the sperm qualities in both pre-mature and mature rats by using two sperm parameters, that is, sperm motility and sperm morphology as the assessment. The histological morphology of seminiferous epithelium was also evaluated.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of *B. rotunda* juice

The fresh *B. rotunda* rhizomes from Chiang Mai Province, Thailand were weighed before being washed several times and then air-dried. These rhizomes were sliced into small pieces, blended with a fruit extractor and then filtered. The *B. rotunda* juice was prepared every 3 days and kept at 4°C in a refrigerator.

Animals and treatment

Sixty-four male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) were purchased from the National Laboratory Animal Centre, Salaya, Nakhon Pathom, Thailand. Pre-mature rats, aged 4 weeks and mature rats, aged 6 weeks ($n = 32$ each) were housed (3 rats / cage) under standard conditions, controlled temperature at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ with 12/12 h light / darkness regimen and were fed commercial diet (CP, Mice feed No. 082) and water.

They were then acclimatized for one week before starting the experiments. Each of the animals' age groups were divided into 4 batches ($n = 8$ each) and were fed by needle-feeding into the esophagus with *B. rotunda* juice at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg.bw for 30 days, respectively. The control group only received distilled water at 1 ml/ day. After 30 days, the animals were sacrificed to remove the reproductive organs. The experimental procedure is in accordance with the institutional guides for the Animal Care and Use (No. 11/2551) and approval obtained from the Animal Ethics committee, Faculty of Medicine, Chiang Mai University.

Sperm motility analysis

The sperm were collected from the right caudal epididymis which was dissected to release the sperm into 10 ml of normal saline (0.9% NaCl). Then, the sperm were placed on the slide and covered with a cover slip for motility analysis under a light microscope using x40 objective lens. Sperm motility classification was divided into four patterns; the progressive, the non-progressive, the circle, and the non-motile sperm. A total of 200 sperm were counted per animal.

Sperm morphology analysis

Sperm in normal saline was smeared on a clean slide. The slide was air-dried and fixed in methanol. Subsequently, it was stained with methylene blue and basic fuchsin on a hot plate. Then, sperm morphology was assessed under the light microscope using x40 objective lens. The morphological features of individual spermatozoa were classified into four patterns; the normal, the sperm with abnormal head and normal tail, the sperm with

abnormal head and tail, and the sperm with normal head and abnormal tail. A total of 600 sperm were identified per animal.

Seminiferous epithelium examination

The left testes were dissected and then fixed with 4% paraformaldehyde, dehydrated in a graded series of ethanol, and finally embedded in paraffin wax. Paraffin blocks were cut at 5 μm thick and stained with periodic acid-Schiff's reaction (PAS) and counter-stained with hematoxylin. The sampling cycles of seminiferous epithelium 20 tubule profiles for each section were identified according to Hess (1990) and then the stages VII to VIII were counted. The histological appearances of testicular tissue were also observed.

Data analysis

The sperm motility and morphology data were expressed by mean $\pm$ standard deviation (SD) and analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. In case of the homogeneity of variances showing significant differences, the Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney test were used. The SPSS version 17.0 was employed for all statistical analysis. The differences were considered statistically significant when the probability was less than 5%.

RESULTS

Effect on sperm motility of male rats

During the experiment with *B. rotunda* juice, no clinically abnormal signs or death were observed in any group of the animals. There were no significant changes in the sperm motility of pre-mature rats treated with *B. rotunda* juice when compared to the control (Table 1). The progressive movement of sperm was significantly increased in mature groups receiving at the doses of 60 and 120 mg/kg.bw ($p < 0.05$) when compared with the control group (Table 2).

Effect on sperm morphology of male rats

Types of sperm abnormality

Abnormal head, hairpin neck or bent tail was normally found in all of rats treated with *B. rotunda* juice including the control groups (Figure 1). In all pre-mature groups, the sperm morphology was not affected by the administration of *B. rotunda* juice at any dose (Table 3). On the contrary, the mature rats treated with *B. rotunda* juice at the all doses showed a significant increase in the number of normal sperm and decrease ($p < 0.05$) in that of the abnormal sperm tails when compared to the control (Table 4).

Histological appearance of the seminiferous epithelium

Generally, normal histological characteristics of the

Table 1. Numbers of the motile and non-motile sperm of the pre-mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days, compared with control (mean $\pm$ SD).

Group	Number of motile sperm			Number of non-motile sperm
	Progressive	Non-progressive	Circle	
Control	15.50 $\pm$ 7.66	33.17 $\pm$ 11.99	2.17 $\pm$ 2.48	149.17 $\pm$ 6.85
<i>B. rotunda</i> juice (60 mg/kg.bw)	20.86 $\pm$ 11.72	27.00 $\pm$ 4.55	4.14 $\pm$ 5.67	148.00 $\pm$ 16.31
<i>B. rotunda</i> juice (120 mg/kg.bw)	16.62 $\pm$ 11.26	24.12 $\pm$ 9.01	4.87 $\pm$ 6.60	155.12 $\pm$ 22.53
<i>B. rotunda</i> juice (600 mg/kg.bw)	13.75 $\pm$ 9.22	25.25 $\pm$ 12.74	4.37 $\pm$ 5.50	157.00 $\pm$ 14.73

There were no significant differences between groups.

Table 2. Numbers of the motile and non-motile sperm of the mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days, compared with control (mean $\pm$ SD).

Group	Number of motile sperm			Number of non-motile sperm
	Progressive	Non-progressive	Circle	
Control	27.43 $\pm$ 10.13 ^a	27.42 $\pm$ 11.63	4.14 $\pm$ 5.49	141.00 $\pm$ 16.20
<i>B. rotunda</i> juice (60 mg/kg.bw)	40.62 $\pm$ 13.28 ^b	20.50 $\pm$ 9.71	4.62 $\pm$ 8.45	134.50 $\pm$ 18.31
<i>B. rotunda</i> juice (120 mg/kg.bw)	54.87 $\pm$ 11.68 ^c	19.25 $\pm$ 9.85	4.37 $\pm$ 7.73	116.50 $\pm$ 14.06
<i>B. rotunda</i> juice (600 mg/kg.bw)	44.00 $\pm$ 25.18 ^{abc}	20.00 $\pm$ 13.62	5.37 $\pm$ 5.53	130.62 $\pm$ 23.84

^{a,b,c} Different letters indicate significant differences between groups within each column. The mean differences are significant at the 0.05 level.



Figure 1. Morphological classification of rat epididymal sperm. Normal sperm (A); sperm with different patterns of abnormal heads (B1-4); sperm with both abnormal head and tail (C1-3); sperm with different patterns of abnormal tails (D1-2). The scale bar shown in the figure represents 10 μ m.

seminiferous epithelium were observed in both pre-mature and mature rats of the treated and control groups.

The morphologies of seminiferous epithelium were in normal arrangement (Figures 2 and 3). The number of

Table 3. Numbers of the normal and abnormal sperm of the pre-mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days, compared with control (mean $\pm$ SD).

Group	Number of normal sperm	Number of abnormal sperm		
		Head only	Head and tail	Tail only
Control	76.07 $\pm$ 8.97	3.00 $\pm$ 1.56	6.79 $\pm$ 4.08	113.50 $\pm$ 7.28
<i>B. rotunda</i> juice (60 mg/kg.bw)	77.67 $\pm$ 10.19	2.83 $\pm$ 0.96	5.38 $\pm$ 3.77	114.12 $\pm$ 7.41
<i>B. rotunda</i> juice (120 mg/kg.bw)	84.00 $\pm$ 10.15	3.21 $\pm$ 1.77	4.00 $\pm$ 2.34	108.79 $\pm$ 10.48
<i>B. rotunda</i> juice (600 mg/kg.bw)	76.83 $\pm$ 12.74	2.80 $\pm$ 0.98	5.29 $\pm$ 4.54	115.08 $\pm$ 9.43

There were no significant differences between groups.

Table 4. Numbers of the normal and abnormal sperm of the mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days, compared with control (mean $\pm$ SD).

Group	Number of normal sperm	Number of abnormal sperm		
		Head only	Head and tail	Tail only
Control	57.83 $\pm$ 5.24 ^a	2.31 $\pm$ 1.27	4.10 $\pm$ 2.23	135.75 $\pm$ 4.34 ^a
<i>B. rotunda</i> juice (60 mg/kg.bw)	82.24 $\pm$ 14.29 ^b	1.79 $\pm$ 1.20	2.33 $\pm$ 1.55	113.62 $\pm$ 13.47 ^b
<i>B. rotunda</i> juice (120 mg/kg.bw)	76.04 $\pm$ 14.45 ^b	1.71 $\pm$ 0.92	3.33 $\pm$ 1.15	118.92 $\pm$ 13.78 ^b
<i>B. rotunda</i> juice (600 mg/kg.bw)	81.33 $\pm$ 17.51 ^b	1.18 $\pm$ 0.56	2.79 $\pm$ 2.00	114.71 $\pm$ 15.55 ^b

^{a,b} Different letters indicate significant differences between groups within each column. The mean differences are significant at the 0.05 level.

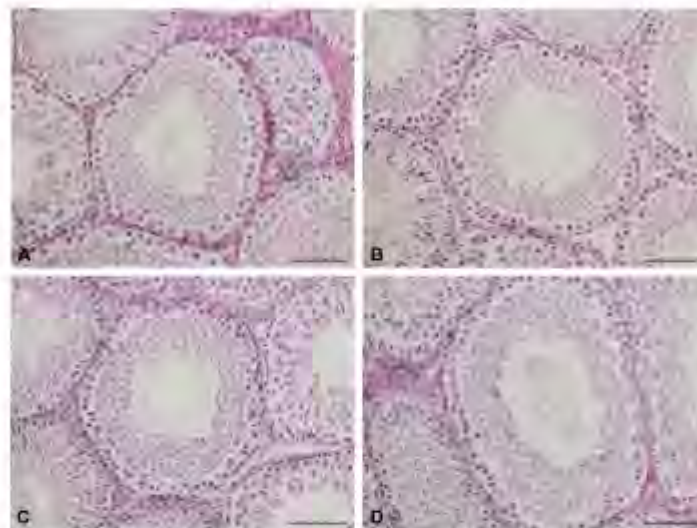


Figure 2. Histological feature of the stage VII to VIII of seminiferous epithelium of the pre-mature rats compared between the control group (A) and *B. rotunda* juice treated groups at 60 mg/kg.bw (B), 120 mg/kg.bw (C), and 600 mg/kg.bw (D). The bar shown in each figure represents 100 μ m.

the stages VII to VIII of seminiferous epithelium were not significantly different in the treated pre-mature rats at

all doses ($p < 0.05$) when compared to the control (Figure 4). However, the mature rats treated with all doses of

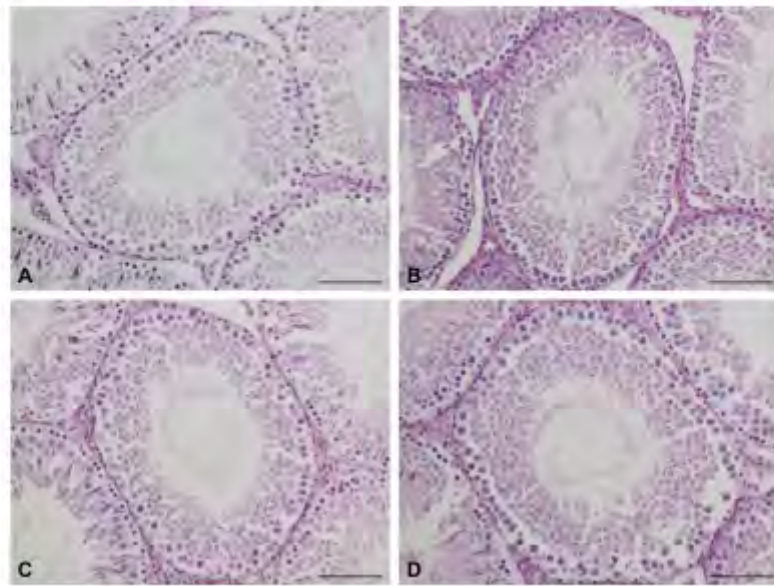


Figure 3. Histological features of the stage VII to VIII of seminiferous epithelium of the mature rats compared between the control group (A) and *B. rotunda* juice treated groups at 60 mg/kg.bw (B), 120 mg/kg.bw (C), and 600 mg/kg.bw (D). The bar shown in each figure represents 100 μ m.

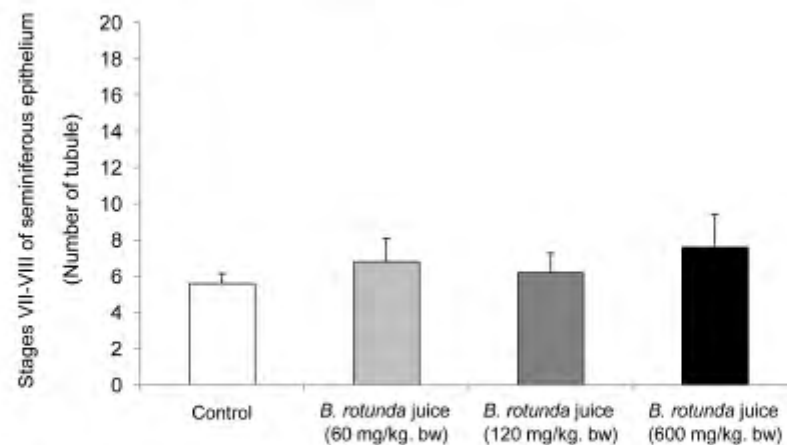


Figure 4. Numbers of stages VII to VIII of seminiferous epithelium of the pre-mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days compared with control (mean $\pm$ SD).

B. rotunda juice showed a significant increase ($p < 0.05$) in the number of the stages VII to VIII of seminiferous

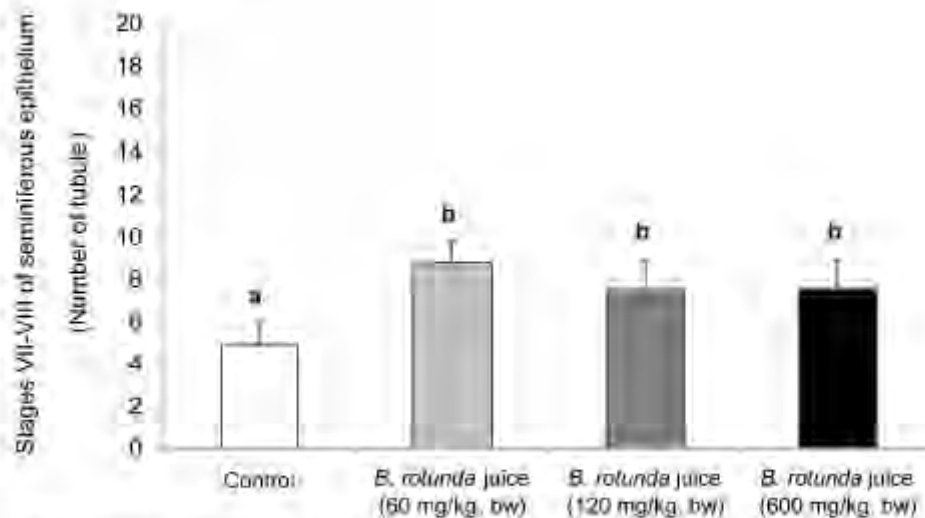


Figure 5. Numbers of stages VII to VIII of seminiferous epithelium of the mature rats administered with varying doses of *B. rotunda* juice for 30 days compared with control (mean $\pm$ SD). ^{ab} Different letters indicate significant differences between groups. The mean differences are significant at the 0.05 level.

epithelium (Figure 5).

DISCUSSION

Many native medicinal plants have been used for prevention, relief and remedy of many aspects of male reproduction. In the present study, *B. rotunda* juice obviously showed positive effects on sperm qualities in mature male rats. The results may be promoted by the antioxidant activity of flavonoid ingredients which has been found in the rhizomes of *B. rotunda* (Shinda et al., 2006). Similarly, antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* exhibited the protective effect of testicular tissue and sperm quality by encouraging scavengers of free radicals from oxidative stress and lipid peroxidation (Amin and Hamza, 2006). Evidently, antioxidant activity results in preserving and enhancing the process of spermatogenesis in mice as reported by D'cruz and Mathur (2005). In light of this previous evidence, antioxidant property of *B. rotunda* may be responsible for better quality of sperm and therefore, could improve fertility.

The motility and maturation of sperm are associated with the spermatogenesis and are also dependent on many factors. A transcription factor exclusively cAMP-responsive element modulator (CREM), is one of the factors involved in the regulation of gene expression by cAMP, which is an important role in germ cell

differentiation that effects round spermatids. In addition, CREM activator proteins found in the germ cells of the testes of mature animals were abundantly expressed in pachytene spermatocytes and round spermatids. These proteins had the highest exhibit in spermatogenic stages VII to VIII of seminiferous epithelium (Delmas et al., 1993; Walker and Habener, 1996; Behr and Weinbauer, 2001). Moreover, Park et al. (2007) reported that the increase of sperm motility in rats may have been caused CREM activation. Taken together, it is possible that *B. rotunda* juice could improve the sperm parameters via CREM activation in mature rats, but not in the pre-mature ones. Furthermore, the motility of sperm needed the energization of adenosine triphosphate (ATP), which is synthesized by the mitochondria in the body of the tail (Guyton and Hall, 2006) as well as plasma membrane Ca^{2+} -dependent ATPase 4 (PMCA4), highly enriched in the sperm tail, is important for male fertility by implicating calcium signal transduction in sperm motility (Schulz et al., 2004). Although, *B. rotunda* juice may enhance the mitochondrial activity and improve the PMCA signal pathway and results in increasing the progressivity movement in mature rats at the doses of 60 and 120 mg/kg, bw, at the dose of 600 mg/kg, bw, there was no effect. The results suggest that the highest concentration of *B. rotunda* juice were caused by the excess phytoestrogen in the rats and the estrogen which induce a biphasic response by inhibiting protein kinase that effected the decrease of ATP synthesis (Clarke et al.,

2001; Cederroth et al., 2008) of mitochondria activity in sperm. In contrast, mature rats receive *B. rotunda* juice at the doses of 60 and 120 mg/kg. bw showing a dose-dependent response of sperm progressive movement; this may be due to concentrations been appropriated and not because of excess estrogen. However, further study should be done to verify if *B. rotunda* could activate CREM and sperm energy.

The present study demonstrated that the number of the stages VII to VIII of seminiferous epithelium in the mature testes rats treated with *B. rotunda* juice was higher than that of the control group. Since the stages VII to VIII in the cycle composed of step 7 of the round spermatids and step 19 of the elongated spermatids (Hess, 1990), the more number of the stages VII to VIII of seminiferous epithelium in the mature rats could result in increasing the number of mature sperm released from the testes. Consistently, Bustos-Obregón et al. (2005) reported that the increase in length of stages VII to VIII seminiferous epithelium in mice resulted from improvement in the late stages of spermatogenesis.

In conclusion, *B. rotunda* juice could significantly improve sperm production and qualities in mature male rats. It is possible that *B. rotunda* juice could promote this effect via anti-oxidant property and may stimulate CREM activation, but the precise mechanism needs to be further investigated.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by The Thailand Research Fund (TRF) MRG5180115 and Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. The authors would like to thank The Animal Laboratory Building, Faculty of Science, Chiang Mai University, Thailand for providing the animal experimental venue and Dr. Supap Saenphet and Miss Lamaiporn Lueinta for their helpful technical assistance.

REFERENCES

Amin A, Hantza AA (2006). Effects of Roselle and Ginger on dislalin-induced reproductive toxicity in rats. *Asian J. Androl.*, 8(5): 607-612.

Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N. Engl. J. Med.*, 332(5): 281-285.

Behr R, Weinbauer GF (2001). cAMP response element modulator (CREM): an essential factor for spermatogenesis in primates? *Int. J. Androl.*, 24(3): 126-135.

Bhamarapravati S, Juthapiruth S, Mahachai W, Mahady G (2006). Antibacterial activity of *Boesenbergia rotunda* (L.) Manst. and *Mystica fragrans* Houtt. against *Helicobacter pylori*. *Songklanakorn J. Sci. Technol.*, 28: 157-163.

Boonjarasapinyo S, Boonmars T, Aromdee C, Kaewsamut B (2010). Effect of fingerroot on reducing inflammatory cells in hamster infected with *Opisthorchis viverrini* and N-nitrosodimethylamine administration. *Parasitol. Res.*, 106(6): 1485-1489.

Bustos-Obregón E, Yucra S, Gonzales GF (2005). *Lepidium mayenii* (Maca) reduces spermatogenic damage induced by a single dose of malathion in mice. *Asian J. Androl.*, 7(1): 71-76.

Cederroth CR, Vinciguerra M, Gjinovci A, Kuhre F, Klein M, Cederroth M, Galle D, Suter M, Neumann D, James RW, Doerge DR, Wallmann T, Meda P, Foti M, Rohrer-Jeanraud F, Vassalli JD, Nef S (2008). Dietary phytoestrogens activate AMP-activated protein kinase with improvement in lipid and glucose metabolism. *Diabetes*, 57(5): 1176-1185.

Chomchalow N, Bansiddhi J, Chantrasmi V (2006). Amazing Thai medicinal plants. Royal Flora Ratchaphruek 2006, Horticultural Research Institute and Horticultural Science Society of Thailand, Bangkok. Pp. 10-11.

Clarke R, Leonessa F, Welch JN, Skaar TC (2001). Cellular and molecular pharmacology of antiestrogen action and resistance. *Pharmacol. Rev.*, 53(1): 25-71.

D'Cruz SC, Mathur PP (2005). Effect of piperine on the epididymis of adult male rats. *Asian J. Androl.*, 7(4): 363-368.

Delmas V, Vander HF, Mellstrom B, Jegou B, Sassone-Corsi P (1993). Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. *Mol. Endocrinol.*, 7(11): 1502-1514.

Evers JL (2002). Female subfertility. *Lancet*, 360(9327): 151-159.

Guyton AC, Hall JE (2006). Textbook of medical physiology. 11th ed. WB Saunders, Philadelphia. Pp. 997-999.

Hassun FPA, Cadenho AP, Lima SB, Ortiz V, Srougi M (2005). Single nucleotide polymorphisms of the heat shock protein 90 gene in varicocele associated infertility. *International Braz. J. Urol.*, 31: 236-242.

Hess RA (1990). Quantitative and qualitative characteristics of the stages and transitions in the cycle of the rat seminiferous epithelium: light microscopic observations of perfusion-fixed and plastic-embedded testes. *Biol. Reprod.*, 43(3): 525-542.

Kiat TS, Phippen R, Yusof R, Ibrahim H, Khalid N, Rahman NA (2006). Inhibitory activity of cyclohexenyl chalcone derivatives and flavonoids of fingerroot, *Boesenbergia rotunda* (L.), towards dengue-2 virus NS3 protease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 16(12): 3337-3340.

Park WS, Shin DY, Kim Do R, Yang WM, Chang MS, Park SK (2007). Korean ginseng induces spermatogenesis in rats through the activation of cAMP-responsive element modulator (CREM). *Fertil. Steril.*, 88(4): 1000-1002.

Schuh K, Cartwright EJ, Jankevics E, Bundschuh K, Liebermann J, Williams JC, Arnesilla AL, Emerson M, Coeandy D, Knobloch KP, Neyes L (2004). Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. *J. Biol. Chem.*, 279(27): 28220-28226.

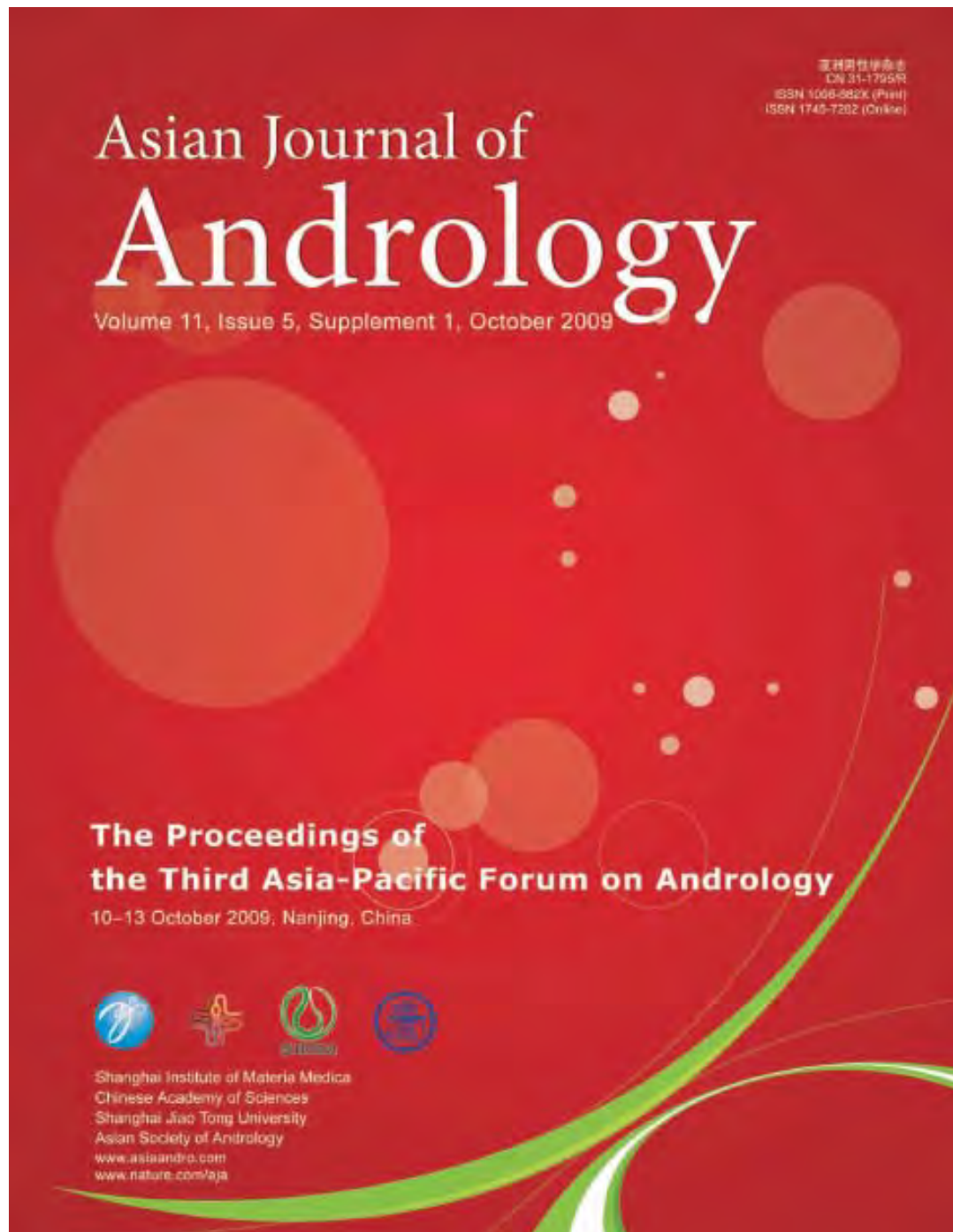
Shindo K, Kato M, Kinoshita A, Kobayashi A, Koike Y (2006). Analysis of antioxidant activities contained in the *Boesenbergia pandurata* Schult. Rhizome. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70(9): 2281-2284.

Sudwan P, Saenphet K, Antajat S, Silasuwat N (2007). Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Manst. on sexual behaviour of male rats. *Asian J. Androl.*, 9(6): 849-855.

Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD (2001). Medical, ethical and social aspects of assisted reproduction. Current practices and controversies in assisted reproduction: Report of a WHO meeting, Geneva, Switzerland.

Walker WH, Habener JF (1996). Role of transcription factors CREB and CREM in cAMP-regulated transcription during spermatogenesis. *Trends Endocrinol. Metab.*, 7(4): 133-138.

ภาคผนวก 2





pelvic endometriosis and altered basal body temperature (BBT). **Methods:** This study population consisted of infertile couples who have been diagnosed as having endometriosis. **Results:** A significant association was found between the presence of pelvic endometriosis and the appearance of a late decline in BBT during the early follicular phase of the menstrual cycle. A temperature of 97.80°C on the first 3 days of the menses is associated with pelvic endometriosis. **Conclusion:** A relatively common problem in women is endometriosis. The association between endometriosis and infertility is clearly established. It is proposed that endometriosis has the potential to produce pathology in two ways: 1) Hypothalamic-pituitary-ovarian axis and luteal phase abnormalities. 2) Peritoneal inflammatory response. The findings of this study support the clinical diagnosis of endometriosis in infertile women. The BBT chart analysis may be useful as a clinical adjunct when endometriosis is suspected.

E-mail: mabashed@btb.net.bd / bashed23@dhaka.net

Pt8-15

Effect of Uremia and kidney transplantation on testicular volume and male reproductive ability

Long-Gen Xu¹*, Hui-Ming Xu², Xiao-Feng Zhu¹, Ying Wu¹
¹117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013, China

²Zhejiang Family Planning Science and Technology Institute, Hangzhou 310012, China

Aim: To investigate the effect of Uremia and kidney transplantation on testicular volume and male reproductive ability. **Methods:** 40 Uremia patients' semen samples and 40 kidney transplantation patients' semen samples were tested. And calculate as: Fertility index (FI) = sperm concentration (10^6 mL^{-1}) $\times$ sperm viability $\times$ sperm normal morphology rate. Thirty of these Uremia patients were monitored for testicular volume by color ultrasound before and after kidney transplantation. **Results:** FI in normal fertility people was 13.03 (14.26), FI in kidney transplantation patients was 7.19 (10.18), and FI in Uremia patients was 0.23 (0.76). Testicular volume of Uremia patients: which on the left side before surgery was ($6.82 \pm 1.49 \text{ mL}$), and on the right side before surgery ($7.46 \pm 1.89 \text{ mL}$). At 1 month, 3 months, and 1 year after kidney transplantation, the left side of Testicular volume rose to 8.25 ± 1.67 , 9.31 ± 1.56 , 9.80 ± 1.51 ; and the right side of testicular volume to 9.18 ± 1.76 , 10.41 ± 1.43 , 11.09 ± 1.45 . The FI and testicular volume had statistics differences ($P < 0.01$) between Uremia patients and after kidney transplantation groups. **Conclusion:** Uremia reduces Male testicular volume and impairs reproductive ability, but they can be improved by successful kidney transplantation.

E-mail: xulonggen@sina.com

Pt8-16

The suitable time for male renal transplant recipients to father pregnancy and childbirth

Long-Gen Xu*, Shu Han, Yong Liu, Hong-Wei Wang, Yi-Rong Yang, Feng Qiu, Wan-Ling Peng, Li-Gong Tang, Jing Fu, Xiao-Feng Zhu, Qi-Zhe Song, Xian-Fan Ding, You-Hua Zhu
 Center for Renal Transplantation, the 117th Hospital, Hangzhou

310013, China

Aim: To determine the appropriate time for male renal transplant recipients to father pregnancy after transplantation. **Methods:** A total of 212 cases of male renal transplant recipients who fathered 216 children after transplantation, including four cases of the two-child birth, among eight organ transplant centers in China between December 1981 and August 2007, were retrospectively analyzed and their children's growth and development status were investigated. **Results:** The 212 renal transplant recipients fathered 216 children 15-204 (46.91 ± 26.19) months after transplantation, including 115 boys and 101 girls. Among them, 20 recipients fathered 20 offspring, including three preterm birth (15.0%), 15-24 (21.00 ± 2.94) months after transplantation; 192 recipients fathered 196 offspring, including six preterm birth (3.1%), 25-204 (49.56 ± 26.06) months after transplantation. The newborn babies weighed 1 950-4 600 ($3 253 \pm 379$) g. One boy suffered from a pair of soft toe. All other children were normally developed as indicated in physical examination. **Conclusion:** It would be appropriate for male renal transplant recipients with normal renal function to father pregnancy and have offspring two years after transplantation.

E-mail: xulonggen@sina.com

Pt8-17

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. juice did not affect androgenic and estradiol levels in premature male rats,

Paiwan Sudwan¹*, Kanokporn Saenphet², Supap Saenphet²

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Aim: To determine if Krachai, *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., juice could promote an increase of the androgenic and estradiol hormones, reproductive organ weights and epididymal sperm density, and at same time, produce toxicity in premature male rats. **Methods:** Thirty-two premature male Wistar rats (4 weeks old) were equally divided into a control and three *B. rotunda* juice-treated groups. *B. rotunda* juice was orally administered at the doses of 60, 120 and 600 mg kg^{-1} body weight, to treated groups of male rats ($n = 8$), daily for 30 days and the controls received a similar amount of distilled water. After the treatment periods, all animals were anesthetized on day 31. Their blood was collected for hematological analysis. Serum was prepared for the electrochemoluminescence immunoassay (ECLIA) to determine testosterone and estradiol levels and the radioimmunoassay (RIA) to determine androstenedione (ADD) levels. The reproductive organs were dissected and weighed and the epididymal sperm density was evaluated. **Results:** There were no significant differences in serum testosterone, androstenedione and estradiol levels, the relative weight of the reproductive organs (testis, caudal epididymis, seminal vesicle and prostate gland) and sperm density between the control and treated groups. Toxicological study revealed no significant difference of hematocrit, WBC or differential cell count. **Conclusion:** *B. rotunda* juice did not modify the testosterone,



ADD and estradiol levels, the sexual organ weights, or the epididymal sperm density during the 30 days of treatment, and high concentration of juice could not harm premature male rats.

E-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th

Pt8-18

Long toxicity of Shen Yan Ling tablet and its effect on the reproductive function in rats

Yu-Gui Cui¹, Xing-Hai Wang^{2*}, Ding-Zhi Ma², Yue Jia¹, Rui-Fen Cai¹, Li Gao¹, Ming-De Yang¹, Jian-Sun Tong²

¹Center of Clinical Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

²Jiangsu Province Family Planning Institute, Nanjing 210036, China

Background: Shen Yan Ling is an innovative Chinese traditional medicine composed with Li Gong Teng, Huang Qi, and others. This compound has conclusively curative effect on renal diseases with low side effect. **Aim:** To investigate the long toxicity of Shen Yan Ling and its effect on the reproductive function. **Methods:** Shen Yan Ling was provided by Jiangsu Kangyuan Pharmaceutical Company and the experiment was approved by the Chinese Regulation of New Drug Research before Clinical Application. Adult SD rats were divided into four equal groups (20 rats in each group with male to female ratio 10:10) as follows: low dose of Shen Yan Ling (1.25 g kg⁻¹), middle dose (2.50 g kg⁻¹), high dose (5.00 g kg⁻¹) and control. The standard test of long toxicity was designed to observe the asked parameters, and to observe serum hormones and testicular and epididymis sperm. **Results:** Compared with controls, general status and body weight were normal after 3 months of treatment with Shen Yan Ling. Parameters of blood cytology and biochemistry fluctuated in the normal range, without any significant changes ($P > 0.05$). Compared with control, the mass coefficient of main organs did not change significantly and a slight change in hepatic and pulmonary pathology in high dose group was found. Although serum sexual hormones did not change significantly, sperm counts in testis and epididymis reduced significantly in high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Shen Yan Ling has no significant long-accumulated toxicity on rats after 3 months of treatment with the designed doses (1.25 to 5.00 g kg⁻¹) but it exerts negative effect on the reproductive function if treated with high dose of long term.

E-mail: njxhw@online.com

Pt8-19

Application of the continuous measurement of urine β -fsh excretion in patients with pubertal disorders

Yu-Gui Cui^{1*}, Lin Song², Xiao-Fang Yang², Ting Feng¹, Qin-Qin Pan¹, Fu-Song Di¹

¹Center of Reproductive Medicine, The First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

²Department of Applicative Toxicology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China

Aim: To evaluate the significance of urine β -FSH excretion

in the clinical practice and pathophysiological study by continuously measuring the urine β -FSH excretion in the patients with puberty disorders including precocious and delayed puberty. **Methods:** Five male volunteers (aged 5, 19, 22, 27 and 33 years) and four female volunteers (aged 5, 28, 28 and 33 years) were selected as control. Four patients with the hypogonadotropic hypogonadism (Kallmann's syndrome or IHH aged 17, 17, 19, 24 years), five patients with hypergonadotropic hypogonadism (Klinefelter's syndrome, aged 16, 16, 17, 20, 22 years), four patients with the central precocious puberty (aged 3, 5, 5, 7 years) and one patient with isosexual peripheral precocious puberty (breast development, aged 5 years) were involved to collect their early-morning urine samples for 30 to 32 days. One normal men and one normal woman collected urine samples for 63 to 64 days. The urine β -FSH was assayed with the method of EIA, then corrected by creatinine (Cr) concentration. **Results:** The urine β -FSH level of normal adult men was $1.16 \pm 0.20 \mu\text{g mg}^{-1} \text{Cr}$ with small peak variation in their curves, while normal adult women have higher baseline ($3.12 \pm 0.68 \mu\text{g mg}^{-1} \text{Cr}$) and very sharp peak variation in curves corresponding with their cycles. Patients with the hypogonadotropic hypogonadism had lower levels of urine β -FSH, and patients with idiopathic hypogonadism had higher levels with irregular fluctuation, than matching men. Meanwhile, patients with the central precocious puberty had much higher levels of urine β -FSH with irregular peaks, and patients with isosexual peripheral precocious puberty had almost normal levels, than their cotemporary children. The patterns were coincident with the clinical characteristics and serum FSH levels. **Conclusion:** The urine β -FSH excretion was a useful parameter for the clinical classify diagnoses and pathophysiological study on puberty disorders.

E-mail: cuiygnj@njmu.edu.cn

Pt8-20

No needle no scalpel vasectomy (NNSV): an Indian experience

RCM Kaza^{1*}, Baljit Kaur², Jasvinder Singh³, Sachin Patil³

¹Department of Surgery, Maulana Azad Medical College, New Delhi, India

²Male Family Planning Center, Civil Hospital, Amritsar, India

³Maulana Azad Medical College, New Delhi, India

Aim: To test the feasibility and effectiveness of jet injector anesthesia technique i.e. "no needle no scalpel vasectomy" (NNSV) over traditional needle anesthesia technique in no scalpel vasectomy (NSV). **Methods:** This study was conducted in: 1) Department of Surgery and Department of Family Planning, Maulana Azad Medical College and Lok Nayak Hospital, New Delhi, India. 2) Civil Hospital, Amritsar, Punjab. Inclusion criteria and exclusion criteria were set according to our current practice guidelines and national standards. After informed consent 700 clients were randomized in to two groups: group A underwent NSV with jet injector anesthesia and group B underwent NSV with traditional needle injection anesthesia. For group A Medajet XL® jet injector and for group B 26" gauge needle with 5 mL syringe were used for giving local anesthesia. Medajet XL® was used as explained by Ronald S Weiss and Philip S Li. Both the groups were compared in terms of time

Correspondence to Dr Paiwan Sudwan (pasudwan@med.cmu.ac.th)

[illegible]

ภาคผนวก 3



Joint International Tropical Medicine
Meeting 2008

“Tropical Medicine in the -omics Era”

Abstracts

13 - 14 October 2008

Imperial Queen's Park Hotel, Bangkok, Thailand

JITMM2008

EVALUATION OF EPIDIDYMAL SPERM MORPHOLOGY AND MOTILITY IN PRE-PUBERTY MALE RATS GIVEN *BOESENBERGIA ROTUNDA* JUICE

Sudawadee Phante¹, Paiwan Sudwan¹,
Kanokporn Saenphet²

¹ Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

² Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. is the medicinal plant widely used for sexual potential promotion. The purpose of this study was to test the ability of this plant on pre-puberty male rat's reproduction by evaluating morphology and motility of their sperm. Oral administration of *B. rotunda* root juice at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg, bw was conducted in pre-puberty male rats for 30 days. The control group only received distilled water at 1 ml/day. After treatment period, the caudal epididymis was dissected and the fresh epididymal sperm samples were prepared to assess sperm morphology and motility parameters. It was found that neither the morphology nor the motility of sperm in all treated groups was different from those of control group. Therefore, the treatment did not affect spermatogenesis and morphology of caudal epididymis. It could be concluded that *B. rotunda* juice at all doses used in this study did not promote rat's sperm quality. ♦

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, pre-puberty rat, sperm, morphology, motility

SEXUAL BEHAVIOR IN PREMATURE MALE RATS TREATED WITH *BOESENBERGIA ROTUNDA* (L.) MANSF JUICE

Paiwan Sudwan¹, Kanokporn Saenphet²,
Songkiet Suwansirikul¹

¹ Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

² Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

The present study was designed to investigate whether the *Boesenbergia rotunda* (Krachai), a medicinal plant recommended for sexual enhancing property, could promote the sexual behavior of premature male rats or not. Safety evaluation of this plant was also conducted with the emphasis of the histopathology of liver and kidney. Thirty-two 4-week-old male rats were equally divided into four groups. Three experimental groups were orally administered with *B. rotunda* rhizome juice at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg bw for 30 days, whereas controls received distilled water 1 ml/day. The results showed that only two treated rats (1 from 60 and 1 from 600 mg/kg bw) presented their intromission behavior. In the whole 30 min period of observation, all sexual parameters (courtship behavior; mount frequency, MF; mount latency, ML; intromission frequency, IF; and intromission latency, IL) of treated rats were not significantly different from those of controls. However, when the observation was conducted at three 10-min intervals over a 30 min period, the MF of rats treated with 600 mg/kg, bw of the juice was found consistent throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was higher in the 1st 10-min period than in the 2nd and 3rd 10-min periods. This consistent frequency of mounting may reflect the better copulating potency of rats. The histopathological changes of liver and kidney were not observed in treated rats. These results indicated that the high concentration of *B. rotunda* juice could be safely consumed.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, sexual behavior, premature rat, histopathology, medicinal plant

ภาคผนวก 4

บทคัดย่อ การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมาวิจัยอาวุโส สกว.
ครั้งที่ 9

วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552

โรงแรมสอริเตย์อินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



Sexual Activity in Premature Male Rats Treated with *Boesenbergia Rotunda* (L.) MANSF. Juice

Sudwan, P.^{1*}, Saenphet, K.², Suwansirikul, S.¹

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

Abstract

The present study was designed to investigate whether the *Boesenbergia rotunda* (Kuntze) medicinal plant recommended for sexual enhancing property, could promote the sexual behavior of premature male rats. Safety evaluation of this plant was also conducted with emphasis on the histopathology of liver and kidney. Thirty-two 4-week-old male rats were equally divided into four groups. Three experimental groups were orally administrated with *rotunda* rhizome juice at the doses of 60, 120 and 600 mg/kg bw for 30 days, whereas controls received distilled water 1 ml/day. The results showed that only two treated rats (1 from 60 mg/kg bw and 1 from 600 mg/kg bw) presented their intromission behavior. In the whole 30 min period of observation, all sexual parameters (courtship behavior; mount frequency, MF; mount latency, ML; intromission frequency, IF; and intromission latency, IL) of treated rats were not significantly different from those of controls. However, when the observation was condensed into three 10-min intervals over a 30 min period, the MF of rats treated with 600 mg/kg bw of *rotunda* juice was found consistent throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation. This consistent frequency of mounting may reflect the better copulating potency of rats. The histopathological changes of liver and kidney were not observed in treated rats. These results indicated that the high concentration of *B. rotunda* juice could be safely consumed.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, sexual behavior, premature rat, histopathology, medicinal plant

*Corresponding author.

Tel.: 0-5394-5312 ext. 208, 08-1366-1526; Fax: 0-5394-5304

E-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th

บทคัดย่อ
การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์
 คุณพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัย
 ของอาจารย์รุ่นใหม่ และคุณส่งเสริมนักวิจัยรุ่นใหม่

**การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พว เมธีวิจัยอาวุโส สกว.
 ครั้งที่ 10**

วันที่ 14-16 ตุลาคม 2553

โรงแรมฮอติเต็ยอินน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ
 จังหวัดเพชรบุรี

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)



สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.)



***Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Juice did not Affect Androgenic and Estradiol Levels in Premature Male Rats**Sudwan, P.^{1*}, Saenphet, K.², Saenphet, S.²¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand**Abstract**

Aim: To determine if Krachai, *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf., juice could promote an increase of the androgenic and estradiol hormones, reproductive organ weights and epididymal sperm density, and at same time, produce toxicity in premature male rats. **Methods:** Thirty-two premature male Wistar rats (4 weeks old) were equally divided into a control and three *B. rotunda* juice-treated groups. *B. rotunda* juice was orally administered at the doses of 60, 120 and 600 mg kg⁻¹ body weight, to treated groups of male rats ($n = 8$), daily for 30 days and the controls received a similar amount of distilled water. After the treatment periods, all animals were anesthetized on day 31. Their blood was collected for hematological analysis. Serum was prepared for the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) to determine testosterone and estradiol levels and the radioimmunoassay (RIA) to determine androstenedione (ADD) levels. The reproductive organs were dissected and weighed and the epididymal sperm density was evaluated. **Results:** There were no significant differences in serum testosterone, androstenedione and estradiol levels, the relative weight of the reproductive organs (testis, caudal epididymis, seminal vesicle and prostate gland) and sperm density between the control and treated groups. Toxicological study revealed no significant difference of hematocrit, WBC or differential cell count. **Conclusion:** *B. rotunda* juice did not modify the testosterone, ADD and estradiol levels, the sexual organ weights, or the epididymal sperm density during the 30 days of treatment, and high concentration of juice could not harm premature male rats.

Keywords: *Boesenbergia rotunda*, androgenic hormones, estradiol, premature rat, toxicity**Outputs**

1. Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S. *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. juice did not affect androgenic and estradiol levels in premature male rats. Asian J Androl 2009; 11(5 Suppl 1): 164-65.

*Corresponding author.

Tel.: 08-1366-1526, 0-5394-5312 ext. 208; Fax: 0-5394-5304

E-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th



Sexual Activity in Premature Male Rats Treated with *Boesenbergia Rotunda* (L.) Mansf. Juice

Paiwan Sudwan^{1*}, Kanokporn Saenphet², Songkiet Suwansirikul¹

¹Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

²Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

*Correspondence: Paiwan Sudwan, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand, Tel 66-53-94-5312 ext 208, 66-81-366-1526 Fax 66-53-945304 E-mail: pasudwan@med.cmu.ac.th

Aim

The present study was designed to investigate whether the *Boesenbergia rotunda* (Krachai), a medicinal plant recommended for sexual enhancing property, could promote the sexual behavior of premature male rats. Safety evaluation of this plant was also conducted with the emphasis on the histopathology of liver and kidney.

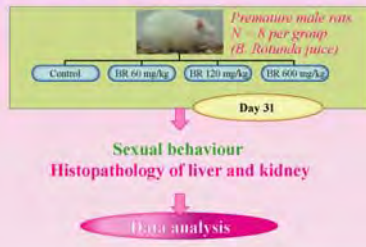
Keyword: *Boesenbergia rotunda*, sexual behavior, premature rat, histopathology, medicinal plant

Introduction

Boesenbergia rotunda (L.) Mansf. (Krachai) is a medicinal plant recommended for sexual enhancing property and belongs to the Zingiberaceae family (1, 2). It is sometimes referred to as "Thai ginger" and has long been used among Thai men (3, 4). Its rhizomes have been used as an antiflatulent, for stomach discomfort, leukorrhea, diuretic and antidiabetic and treatment of oral diseases (2). It was previously reported that the ethanolic extract from *B. rotunda* at the doses of 60, 120 and 240 mg/kg for 60 days significantly increased the relative testicular weight and the diameter of the seminiferous tubules and at the dose of 60 mg/kg also significantly increased the relative weight of the seminal vesicle (5). Moreover, the electron micrographs showed this plant extract increased granules of Sertoli cells while they presented the normal morphology of spermatozoa (6). Ethanolic extracts from *B. rotunda* tended to have positive effects on reproductive male rats and were evaluated to be safe (7). This study will make the plant fully apparent in various doses and times (8, 9) in various solvent extraction or method of extraction (10), or in condition of male rats (10-12). It is recommended to continue study on the effects of the *B. rotunda* on sexual activity.

The aim of this research was to investigate the effects of the *B. rotunda* juice on sexual activity of premature male rats with safety evaluations regarding the histopathology of liver and kidney.

Material and methods



Results

The results showed that only two treated rats (1 from 60 and 1 from 600 mg/kg bw) presented their intromission behavior (Table 1).

Table 1. Percentages of sexual behavior of male rats treated with *B. rotunda* juice (60, 120 and 600 mg/kg) and control groups between day 26-30. MF = mount frequency, IF = intromission frequency.

Parameters	Groups			
	Control (n=8)	60 mg/kg (n=8)	120 mg/kg (n=8)	600 mg/kg (n=8)
Courtship (%)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)
Intimidation (mg)	423.50 (21.50)	445.75 (22.25)	384.50 (20.40)	458.25 (24.12)
MF (%)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)

There were no significant differences. Data expressed as median and interquartile range.

In the whole 30 min period of observation, all sexual parameters (courtship behavior, mount frequency, MF; mount latency, ML; intromission frequency, IF; and intromission latency, IL) of treated rats were not significantly different from those of controls (Table 2).

Table 2. Sexual behavior parameters of male rats treated with *B. rotunda* juice (60, 120 and 600 mg/kg) and control groups. MF = mount frequency, IF = intromission frequency, ML = mount latency.

Parameters	Groups			
	Control (n=8)	60 mg/kg (n=8)	120 mg/kg (n=8)	600 mg/kg (n=8)
Courtship (s)	445.75 (22.25)	445.75 (22.25)	445.75 (22.25)	445.75 (22.25)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
MF (%)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)	100 (8/8)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)
Intimidation (mg)	117.50	111.50	117.50	111.50
IF (%)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)	3.00 (2/6)

There were no significant differences. Data expressed as median and interquartile range.

Figure 1

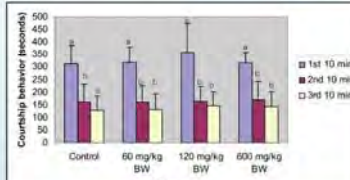


Figure 1. Times of courtship behavior (seconds) of male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10-min observations over a 30 min period. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

a,b,c,d,e The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

In general, the doses of *B. rotunda* juice had no significant differences, while three 10-min intervals of *B. rotunda* treatment had significant effects.

However, when the observation was conducted at three 10-min intervals over a 30 min period, the MF of rats treated with 600 mg/kg bw of the juice was found consistent throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation (Figure 2).

Figure 2

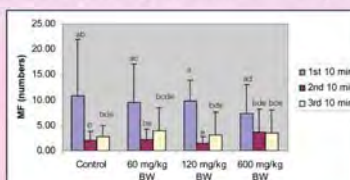


Figure 2. MF (numbers) of male rats receiving *B. rotunda* juice at different doses for 26-30 days, in three 10 min observations over a 30 min period. 1st 10 min = 1st 10 min observation, 2nd 10 min = 2nd 10 min observation, 3rd 10 min = 3rd 10 min observation.

a,b,c,d,e The mean differences are significant at the 0.05 level; Two-way ANOVA followed by one-way ANOVA and LSD.

In general, the doses of *B. rotunda* juice had no significant differences, while three 10-min intervals of *B. rotunda* treatment had significant effects.

Additional result, there were no histopathological changes of liver and kidney in male rats with consuming *B. rotunda* juice for 30 days.

Discussion

Results of the experiments indicate that all doses of *B. rotunda* juice produced no significant changes in the courtship behavior, MF, IF, ML and IL in the whole 30 min period of observation between treated and control groups. We found similar patterns of courtship behavior in three 10-min intervals over a 30 min period of all groups as in mature male rats treated with *K. parviflora* (Sudwan et al., 2006) and *B. rotunda* extracts (Sudwan et al., 2007). Here, *B. rotunda* juice at the dose of 600 mg/kg bw affected the rats in MF by consistent behavior throughout the three 10-min periods, while that of control and other treated group was highest in the 1st 10-min observation, being a sign of sexual potential of male, reflecting its ability to copulate the female. Because mount is one type of stereotyped copulatory response (13), it can be assumed that *B. rotunda* juice is necessary to maintain the time for copulation quality in the longer period. Also in recent works on mature rats (7), the histopathological changes of liver and kidney in treated groups were not observed. Continuous high concentration of *B. rotunda* juice were safely consumed, even though the animals were of premature age. This supported the assumption that this plant can be used as a medicine for primary health care without toxicity (1, 2, 7). Further studies are necessary to demonstrate the effects of this juice on reproductive organs, histology evaluation of sex glands or sex hormones.

In conclusion, *B. rotunda* juice at 600 mg/kg bw consistent MF of rat throughout the three 10-min periods, and the high concentration of *B. rotunda* juice could be safely consumed.

Acknowledgements

This work was supported by The Thailand Research Fund (TRF: MRG5180115) and Faculty of Medicine, Chiang Mai University, Thailand. Special thanks to the Animal Facility Unit, Department of Biology, Faculty of Science, Chiang Mai University for providing necessary research facilities, Mr Apirij Jitjansom, Ms. Sudavadee Phantao and Ms. Lamsaorn Lucinta for their practical assistance.

References

1. Hardsong P. Thai Herbal Health. 1998 (in Thai).
2. Chemsakul N, Rattakul N, Chantaram V. Aromatic Thai Medicinal Plants. 2006.
3. Waiyathornach W. Encyclopedia of Thai Herbs. 2000 (in Thai).
4. Chongsakul A. Boesenbergia rotunda (Krachai). J Herbal Tea. 2003.
5. Sudwan P, Saenphet K, Ariyarat S, Suwansirikul S. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behavior of male rats. 2007.
6. Sudwan P, Saenphet K. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on the structure of Sertoli cells and spermatozoa in male albino rats. 2007.
7. Saenphet K, Sudwan P, Saenphet S, Wangkumratnawong P, Thongsant K. Safety evaluation of ethanolic extracts from *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on male rats. 2007.
8. Waiyathornach W, Saenphet K, Sudwan P, et al. Reversible antiproliferative and antifertility activities of *Boesenbergia rotunda* (L.) in male albino rat. 2001.
9. Waiyathornach W, Saenphet K, Sudwan P, et al. Androgenic effect of *Boesenbergia rotunda* (L.) in male albino rat. 2004.
10. Sang H, Kim H. The aphrodisiac effect in non-rodent male rats after chronic administration of *Boesenbergia rotunda* (L.) extract. J Ethnopharmacol. 2001.
11. Ganesan K, Adhikari PK, Prasad RN. Aphrodisiac properties of *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae) in normal and castrated rats. 2002.
12. Ganesan K, Adhikari PK, Prasad RN, et al. Aphrodisiac properties of *Boesenbergia rotunda* (Zingiberaceae) in normal and castrated rats. 2002.
13. Sudwan P, Saenphet K, Saenphet S, Suwansirikul S. Effect of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual activity of male rats and its toxicity. 2006.
14. Rattakul N, Chantaram V. Effects of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. on sexual behavior and fertility of male rats. 2000.
15. Flinn J, Kippes J, Conzone S. Conditioning and sexual behavior. A review. 2001.

Outputs

Sudwan P, Saenphet K, Suwansirikul S. Sexual Activity in Premature Male Rats Treated with *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. Juice. Poster presentation at the Joint International Tropical Medicine Meeting 2008, Bangkok, Thailand, 13-14 October, 2008.

