



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสารสกัดรากพุทช้อนต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียและเพศผู้

โดย ดร. หทัยรัตน์ เครือไวยสุวรรณ และคณะ

พฤษภาคม 2553

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ผลของสารสกัดรากพุดซ้อนต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียและเพศผู้

ผู้วิจัย

1. ดร. หทัยรัตน์ เครือไวยสุวรรณ

2. ศาสตราจารย์ ดร. ประเสริฐ โศภน

สังกัด

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : MRG5180271

ชื่อโครงการ : ผลของสารสกัดรากพุทซ้อนต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียและเพศผู้

ชื่อนักวิจัย : ดร. หทัยรัตน์ เครือไวยวรรณ

E-mail Address : hathairatk@hotmail.com

ระยะเวลาโครงการ: 2 ปี (15 พ.ค. 2551 ถึง 14 พ.ค. 2553)

บทคัดย่อ

สารสกัดรากพุทซ้อน (*Tabernaemontana divaricata* root extract) ถูกนำมาใช้ทางการแพทย์พื้นบ้านเพื่อรักษาโรคหรือภาวะต่างๆ มาเป็นเวลานาน การศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงผลของสารสกัดหยาบจากรากพุทซ้อนต่อระบบสืบพันธุ์ และฮอร์โมนเพศของหนูเพศเมียและเพศผู้ การทดลองทำโดยแบ่งหนู ICR mice อายุ 6 สัปดาห์ ทั้งเพศเมียและเพศผู้ออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยหนูแต่ละกลุ่มได้รับสารสกัดรากพุทซ้อนที่ละลายใน propylene glycol โดยการป้อนทางปากในขนาด 0, 125, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ ติดต่อกันเป็นเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ หลังสิ้นสุดการทดลองในแต่ละช่วงระยะเวลา หนูทุกกลุ่มถูกนำมาศึกษาโดยการเก็บเลือดจากหัวใจเพื่อนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมน testosterone ในหนูเพศผู้และ estradiol และ progesterone ในหนูเพศเมีย ตรวจนับความเข้มข้นและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ซึ่งน้ำหนัก testis, epididymis และ seminal vesicle ในหนูเพศผู้และ ovary และ uterus ในหนูเพศเมีย และศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดรากพุทซ้อนในปริมาณ 125 และ 250 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์มีความเข้มข้นของตัวอสุจิเพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่เมื่อได้รับสารสกัดติดต่อกันเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์กลับได้ผลตรงกันข้ามคือความเข้มข้นของตัวอสุจิมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทั้ง 2 ช่วงระยะเวลาที่ศึกษา สำหรับผลต่อน้ำหนักตัว น้ำหนักของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางจุลกายวิภาคและระดับฮอร์โมนเพศพบว่าการได้รับสารสกัดรากพุทซ้อนทุกขนาดไม่มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับสารสกัดรากพุทซ้อนในขนาด 125, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ไม่ทำให้เกิดผลกระทบข้างเคียงต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูทั้งสองเพศ และยังสามารถเพิ่มปริมาณอสุจิได้อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้สารสกัดในขนาด 125 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ สารสกัดรากพุทธรักษา ระบบสืบพันธุ์ ฮอริโมนเพศ ตัวอสุจิ

Abstract

Project Code : MRG5180271

Project Title : Effect of *Tabernaemontana divaricata* root extract on mice reproductive system after long-term exposure

Investigator : Dr. Hathairat Kruevaisayawan

E-mail Address : hathairatk@hotmail.com

Project Period : 2 years (15 May 2008 – 14 May 2010)

Abstract

Tabernaemontana divaricata root extract (TDE) has been used as traditional medicine for prevention and treatment of many diseases or conditions for a long time. The objective of this study was to investigate the effect of TDE on reproductive system and sex hormones in female and male mice. Adult female and male mice were divided into 4 groups (10 mice / group). Mice were fed daily with TDE suspended in propylene glycol at the dose of 0, 125, 250 and 500 mg/kg BW/day for 4 and 8 weeks. After treatment of each period, blood samples were collected by cardiac puncture for measurement of serum testosterone levels in male mice and measurement of serum estradiol and progesterone in female mice. Sperm concentration and motility from cauda epididymis was determined. The testis, epididymis, seminal vesicle, ovary, and uterus were dissected and weighed. The histopathological examination of reproductive organs was performed. The results showed that the treatment of 125 and 250 mg/kg BW/day of TDE for 4 weeks significantly increased sperm concentration ($P < 0.05$) when compared to the control group but no significant differences when treatment for 8 weeks. There were no significant differences in sperm motility, serum testosterone, estradiol and progesterone levels between each group. TDE treatment did not significantly change the body weights and the relative weights of reproductive organs when compared to the control group. Histology of reproductive organs was normal in all groups. These results demonstrated that the oral administration of TDE at the dose of 125, 250 and 500 mg/kg BW/day had no adverse effects on reproductive system of both male and female

mice; moreover, sperm concentration after treatment for 4 week at the dose of 125 and 250 mg/kg BW/day was significantly increased.

Keywords: *Tabernaemontana divaricata*, reproductive system, sex hormones, sperm

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย): ผลของสารสกัดรากพุทธรักษาต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียและเพศผู้

(ภาษาอังกฤษ): Effect of *Tabernaemontana divaricata* root extract on mice reproductive system after long-term exposure

2. รหัสโครงการ: MRG5180271

3. ชื่อหัวหน้าโครงการ

นางสาว หทัยรัตน์ เครือไวยสุวรรณ

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

จังหวัด พิษณุโลก รหัสไปรษณีย์ 65000

โทรศัพท์ 055-964673 โทรสาร 055-964770

e-mail: hathairatk@hotmail.com

4. สาขาที่ทำการวิจัย:

สมุนไพรและชีววิทยาระบบสืบพันธุ์

6. ระยะเวลาดำเนินงาน

2 ปี

7. ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) เป็นโรคความเสื่อมทางระบบประสาทที่พบมากในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุ โดยประมาณ 24 ล้านคนทั่วโลกที่เป็นโรคความจำเสื่อม ส่วนใหญ่ (ประมาณ 60%) เป็นอัลไซเมอร์ (Ferri et al., 2005) โดยผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปจะมีความเสี่ยงสูงขึ้น และจะยิ่งมีอัตราเสี่ยงสูงขึ้นในช่วงอายุระหว่าง 75 – 84 ปี โรคนี้ในวันข้างหน้าจะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้น เนื่องจากประชากรผู้สูงอายุมีมากขึ้นในทุกประเทศรวมทั้งประเทศไทยด้วย นอกเหนือจากอายุแล้วยังเกี่ยวข้องกับเพศด้วยโดยเพศหญิงจะมีโอกาสเป็นอัลไซเมอร์มากกว่าเพศชาย (Jorm et al., 1987) ซึ่งไม่มีใคร

ทราบสาเหตุ ลักษณะเด่นของพยาธิสภาพที่พบในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ คือมีการสะสมของ amyloid β -peptide ($A\beta$) ในรูปของ amyloid plaque และ neurofibrillary tangles ในปริมาณมาก (Selkoe, 2001) และการตายของเซลล์ประสาทโดยเฉพาะในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (West et al., 1994; Gomerz-Isala et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ประสาท cholinergic ของผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีการถูกทำลายมากขึ้น ทำให้มีการลดระดับของสารสื่อประสาท acetylcholine ในสมอง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง (Coyle et al., 1983; Perry et al., 1999) ในปัจจุบันนี้จึงได้มีแนวทางการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ โดยพยายามเสริมการทำงานด้าน cholinergic ในหลายๆ รูปแบบ กลยุทธ์ที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดคือ การใช้สารยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งช่วยลดการย่อย acetylcholine และเป็นการรักษาระดับของ acetylcholine ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ (Giacobini, 2003; Liston et al., 2004) ถึงแม้ว่าการใช้ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase เช่น donepezil, rivastigmine และ galantamine จะได้ผลอย่างมากในการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ แต่ก็มีผลข้างเคียงต่อระบบต่างๆ เช่นระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจ ระบบหายใจ และระบบกล้ามเนื้อ (Liston et al., 2004; Thompson et al., 2004) ดังนั้นจึงได้มีการพยายามค้นคว้าเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ที่ได้ผลดีแต่มีผลข้างเคียงน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสารสกัดธรรมชาติ เช่นสมุนไพรร

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุดซ้อน (*Tabernaemontana divaricata*) มีฤทธิ์ต้าน AChE ได้ดีในหลอดทดลอง โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ดีกว่า galanthamine ซึ่งเป็นสารต้าน AChE ที่รู้จักกันดี (Ingkaninan et al. 2003) การวิจัยยังได้ขยายผลไปถึงการยับยั้ง AChE ของสารสกัดจากรากพุดในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากรากพุดสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ในสมองของหนู rat ได้ดี (Chattipakorn et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุดยังช่วยป้องกันการสูญเสียความจำและการเรียนรู้ในหนูที่ถูกชักนำให้สูญเสียความจำโดยสาร amyloid β -peptide 25-23 ซึ่งจะมีลักษณะการสูญเสียความจำและการดำเนินของโรคคล้ายคลึงกับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (unpublished data) ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากพุด ในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการต้าน AChE ซึ่งอาจจะนำไปพัฒนาเป็นสารบำรุงสมองในอนาคต เพื่อป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์หรือบรรเทาอาการในผู้ป่วยอัลไซเมอร์

ในการพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ นั้น จำเป็นต้องศึกษาถึงผลข้างเคียงของสมุนไพรรเหล่านั้นก่อน จากการวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของการได้รับสารสกัดรากพุดต่อระบบอวัยวะต่างๆ ในสัตว์ทดลองเช่น ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหลอดเลือด และระบบไต (unpublished data) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า การศึกษาผลของสารสกัดจากราก

พุดต่อระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการบ่งบอกถึงความปลอดภัยหรือความเสี่ยงของการนำสมุนไพรดังกล่าวไปใช้ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับคนทั่วไปในการนำสมุนไพรจากพุดไปใช้ในเชิงของการป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์

8. วัตถุประสงค์ของโครงการ

- 8.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุดชันต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมีย
- 8.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุดชันต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ของหนูเพศผู้
- 8.3 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุดชันต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในหนูทั้งสองเพศ

เนื้อหางานวิจัย

1. ชื่อโครงการ

(ภาษาไทย): ผลของสารสกัดรากพุทซ้อนต่อระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมียและเพศผู้

(ภาษาอังกฤษ): Effect of *Tabernaemontana divaricata* root extract on mice reproductive system after long-term exposure

2. รหัสโครงการ MRG5180271

3. คณะผู้ดำเนินการวิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ (ภาษาไทย)	ดร. หทัยรัตน์ เครือไวยสุวรรณ
ชื่อ (ภาษาอังกฤษ)	Dr. Hathairat Kruevaisayawan
คุณวุฒิ	ปร.ด. (กายวิภาคศาสตร์)
ตำแหน่งวิชาการ	อาจารย์
สถานที่ทำงาน	ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ต. ท่าโพธิ์ อ. เมือง จ. พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์	055-964673
โทรสาร	055-964770
e-mail	hathairatk@hotmail.com

นักวิจัยที่ปรึกษา

ชื่อ (ภาษาไทย)	ศาสตราจารย์ประเสริฐ โศภณ
ชื่อ (ภาษาอังกฤษ)	Professor Prasert Sobhon
คุณวุฒิ	Ph.D. (Anatomy and Cell Biology)
ตำแหน่งวิชาการ	ศาสตราจารย์ 11
สถานที่ทำงาน	ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถ. พระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400
โทรศัพท์	02-2015406
โทรสาร	02-3547168
e-mail	scpso@mahidol.ac.th

4. สาขาที่ทำการวิจัย

สมุนไพรและชีววิทยาระบบสืบพันธุ์

5. ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) เป็นโรคความเสื่อมทางระบบประสาทที่พบมากในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุ โดยประมาณ 24 ล้านคนทั่วโลกที่เป็นโรคความจำเสื่อม ส่วนใหญ่ (ประมาณ 60%) เป็นอัลไซเมอร์ (Ferri et al., 2005) โดยผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 60 ปีขึ้นไปจะมีความเสี่ยงสูงขึ้น และจะมีอัตราเสี่ยงสูงขึ้นในช่วงอายุระหว่าง 75 – 84 ปี โรคนี้ในวันจะเป็นปัญหาเพิ่มขึ้น เนื่องจากประชากรผู้สูงอายุมีมากขึ้นในทุกประเทศรวมทั้งประเทศไทยด้วย นอกเหนือจากอายุแล้วยังเกี่ยวข้องกับเพศด้วยโดยเพศหญิงจะมีโอกาสเป็นอัลไซเมอร์มากกว่าเพศชาย (Jorm et al., 1987) ซึ่งไม่มีใครทราบสาเหตุ ลักษณะเด่นของพยาธิสภาพที่พบในสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ คือมีการสะสมของ amyloid β -peptide ($A\beta$) ในรูปของ amyloid plaque และ neurofibrillary tangles ในปริมาณมาก (Selkoe, 2001) และการตายของเซลล์ประสาทโดยเฉพาะในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (West et al., 1994; Gomez-Isla et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ประสาท cholinergic ของผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีการถูกทำลายมากขึ้น ทำให้มีการลดระดับของสารสื่อประสาท acetylcholine ในสมอง ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง (Coyle et al., 1983; Perry et al., 1999) ในปัจจุบันนี้จึงได้มีแนวทางการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ โดยพยายามเสริมการทำงานด้าน cholinergic ในหลายๆ รูปแบบ กลยุทธ์ที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดคือ การใช้สารยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ซึ่งช่วยลดการย่อย acetylcholine และเป็นการรักษาระดับของ acetylcholine ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ (Giacobini, 2003; Liston et al., 2004) ถึงแม้ว่าการใช้ยาที่ยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase เช่น donepezil, rivastigmine และ galantamine จะได้ผลอย่างมากในการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ แต่ก็มีผลข้างเคียงต่อระบบต่างๆ เช่นระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจ ระบบหายใจ และระบบกล้ามเนื้อ (Liston et al., 2004; Thompson et al., 2004) ดังนั้นจึงได้มีการพยายามค้นคว้าเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE ที่ได้ผลดีแต่มีผลข้างเคียงน้อย โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากสารสกัดธรรมชาติ เช่นสมุนไพร

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุทช้อน (*Tabernaemontana divaricata*) มีฤทธิ์ต้าน AChE ได้ดีในหลอดทดลอง โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ดีกว่า galanthamine ซึ่งเป็นสารต้าน AChE ที่รู้จักกันดี (Ingkaninan et al. 2003) การวิจัยยังได้ขยายผลไปถึงการยับยั้ง AChE ของสารสกัดจากรากพุทช้อนในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากรากพุทช้อนสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ในสมองของหนู rat ได้ดี (Chattipakorn et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า

สารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุทยังช่วยป้องกันการสูญเสียความจำและการเรียนรู้ในหนูที่ถูกชักนำให้สูญเสียความจำโดยสาร amyloid β -peptide 25-23 ซึ่งจะมีลักษณะการสูญเสียความจำและการดำเนินของโรคคล้ายคลึงกับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (unpublished data) ข้อมูลดังกล่าวแสดงถึงประสิทธิภาพของสารสกัดจากรากพุท ในการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการต้าน AChE ซึ่งอาจจะนำไปพัฒนาเป็นสารบำรุงสมองในอนาคต เพื่อป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์หรือบรรเทาอาการในผู้ป่วยอัลไซเมอร์

ในการพัฒนาสารสกัดจากสมุนไพรเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หรือรักษาโรคต่างๆ นั้น จำเป็นต้องศึกษาถึงผลข้างเคียงของสมุนไพรเหล่านั้นก่อน จากการวิจัยที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของการได้รับสารสกัดรากพุทต่อระบบอวัยวะต่างๆ ในสัตว์ทดลองเช่น ระบบประสาท ระบบกล้ามเนื้อ ระบบหลอดเลือด และระบบไต (unpublished data) แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาถึงผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นว่า การศึกษาผลของสารสกัดจากรากพุทต่อระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย จะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการบ่งบอกถึงความปลอดภัยหรือความเสี่ยงของการนำสมุนไพรดังกล่าวไปใช้ เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับคนทั่วไปในการนำสมุนไพรรากพุทไปใช้ในเชิงของการป้องกันการเกิดอัลไซเมอร์

6. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature review) และเอกสารอ้างอิง

พุทซ้อนหรือพุทจีบเป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในประเทศเขตร้อน ทั้งในทวีปอเมริกา แอฟริกา เอเชีย และออสเตรเลีย (Leeuwenberg, 1991) พุทจีบมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Tabernaemontana divaricata* (L.) R. Br. ex Roem et Schult. [*Ervatamia coronaria* (Jacq) Stapf., *E. divaricata* (L.) Burkill, *T. coronaria* (Jacq) Willd] เป็นพืชในวงศ์ Apocynaceae ในประเทศไทยพบได้ทั่วไปบริเวณภาคเหนือและภาคกลาง ลักษณะทั่วไป เป็นไม้พุ่ม สูง 1.5 – 3 เมตร ทุกส่วนมีน้ำยางสีขาว ใบเดี่ยว ออกตรงข้าม รูปใบหอก กว้าง 3 – 5 ซม. ยาว 8 – 12 ซม. ปลายและโคนแหลม ด้านบนสีเขียวแก่ ด้านล่างสีอ่อนกว่า ผิวใบเป็นมัน ดอกสีขาว กลิ่นหอมอ่อน ๆ ออกเป็นช่อตามซอกใบบริเวณปลายกิ่ง 2 – 3 ดอก กลีบดอกโคนเชื่อมกัน ยาว 1.5 – 2.5 ซม. ปลายแยกเป็น 5 – 10 อัน ผลเป็นฝัก ยาว 2.5 – 5 ซม. ปลายแหลมและโค้ง (สมสุข มัจฉาชีพ, 2541) ในทางการแพทย์พื้นบ้าน รากพุทซ้อนมีสรรพคุณแก้ท้องเสีย ขับพยาธิ แก้ปวดฟัน ระบายปวด ขับประจำเดือน ยาบารุง ใช้เป็นยาถ่าย และรักษาโรคตาเจ็บ (นันทวัน บุญยะประภัศร, 2542) นอกจากนี้ ในการแพทย์อายุรเวทของอินเดีย มีการใช้รากพุทซ้อนเพื่อขับประจำเดือน เสริมสมรรถภาพทางเพศ บำรุงสมอง ตับ และม้าม และช่วยบรรเทาอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง (van Beek et al., 1985) จากการศึกษาโดยวิธี Hippocratic screening พบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์จากส่วนต่างๆ ของพุท เช่น ราก ลำต้น ใบ และดอก มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลาย

อย่าง เช่นกดการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง, บรรเทาความเจ็บปวด (antinociceptive) และมีผลในการคลายกล้ามเนื้อ (Taesotikul et al., 1989)

จากผลการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า สารสกัดหยาบจากรากพุดประกอบด้วย alkaloids อย่างต่ำ 44 ชนิด (Rastogi, 1980; Sharma and Cordell, 1988; Van Der Heijden, 1989) และ non-alkaloid ได้แก่ triterpenoids (Rastogi, 1980; Sharma and Cordell, 1988; Van Der Heijden, 1989), steroids (Sharma and Cordell, 1988; Dagino, 1991), flavonoids (Henriques et al., 1996), phenyl propanoids (Henriques et al., 1996) และ phenolic acids (Henriques et al., 1996) นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุด (0.1 mg/ml) มีฤทธิ์ต้าน AChE ได้ดี (มากกว่า 90%) ในหลอดทดลอง (Ingkaninan et al. 2003) โดยพบว่า สารต้าน AChE ในรากพุดนั้น เป็นสารกลุ่ม bisindole alkaloids ได้แก่ 19, 20 dihydrotabernaemine และ 19, 20 dihydroervahanine A โดยสามารถยับยั้งเอนไซม์ AChE ได้ดีกว่า galanthamine ซึ่งเป็นสารต้าน AChE ที่รู้จักกันดีถึง 2 และ 8 เท่าตามลำดับ (Ingkaninan et al. 2006) ซึ่งเอนไซม์ AChE นี้ทำหน้าที่ hydrolyze โมเลกุลของ acetylcholine (ACh) ให้แตกออกเป็น choline และ acetic acid ที่ cholinergic synapse ดังนั้น ผลการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE จะส่งผลให้ ACh ที่ถูกหลั่งออกจากปลายประสาท cholinergic ออกฤทธิ์ยาวนานขึ้นที่บริเวณ synaptic cleft การวิจัยยังได้ขยายผลไปถึงการยับยั้ง AChE ของสารสกัดจากรากพุดในสัตว์ทดลอง ซึ่งพบว่าสารสกัดจากรากพุดสามารถยับยั้งการทำงานของ AChE ในสมองของหนู rat ได้ดี (Chattipakorn et al., 2007)

ส่วนผลการศึกษาด้านพิษวิทยาของสารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุดพบว่า การให้สารสกัดปริมาณ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู ทำให้มีผลต่อการทำงานของระบบประสาท parasympathetic เช่นทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilation) และมีผลกดการหายใจแต่เพียงเล็กน้อยในสัตว์ทดลอง (Taesotikul et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณของสารสกัดจากรากพุดที่ฉีดเข้าทางช่องท้องและมีผลทำให้หนูเสียชีวิต (lethal dose) คือ 2000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู โดยทำให้หนูตายได้ภายในเวลา 8 – 25 นาทีหลังฉีดสาร ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นได้แก่ กล้ามเนื้อคลายเป็นอัมพาต การหายใจผิดปกติ ตัวเขียว (cyanosis) ขาดออกซิเจน (asphyxia) มีอาการสั่น (tremor) ชัก (clonic convulsion) โคม่า และตายในที่สุด (Taesotikul et al., 1989)

จากการศึกษาถึงผลของการได้รับสารสกัดรากพุดต่อระบบไหลเวียนโลหิตในหนู rat พบว่า ค่า systolic and diastolic blood pressure และ mean arterial blood pressure มีค่าลดลง ในหนูที่

ได้รับสารสกัดทางหลอดเลือดดำเป็นปริมาณ 5, 10, 20 และ 25 mg/kg body weight โดยค่าที่ลดลงแปรผันตรงกับปริมาณสารที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดในปริมาณสูง (20 และ 25 mg/kg BW) ทำให้อัตราการเต้นของหัวใจลดลง ซึ่งคาดว่าผลที่เกิดขึ้นน่าจะเกิดจากการกระตุ้นผ่านทาง muscarinic cholinergic receptors มากกว่าเกิดจากการกระตุ้นการสร้างหรือหลั่ง nitric oxide (Yoysungnoen et al., In press) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของสารสกัดรากพุดต่อกกล้ามเนื้อลายในกบ พบว่า สารสกัดรากพุดสามารถเพิ่มความสามารถในการหดตัวของกล้ามเนื้อลาย โดยการกีดการทำงานของ acetylcholinesterase (AChE) ที่ neuromuscular junction (Khongsombat et al., unpublished data)

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's Disease) เป็นโรคความเสื่อมทางระบบประสาทที่พบบ่อยในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุ การตรวจชิ้นเนื้อของสมองในผู้ป่วยอัลไซเมอร์หลังเสียชีวิต มักพบการสะสมของ senile plaques และ neurofibrillary tangles ในปริมาณที่มากกว่าผู้สูงอายุที่ไม่เป็นโรคอัลไซเมอร์ และการตายของเซลล์ประสาทโดยเฉพาะในสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (West et al., 1994; Gomez-Isla et al., 1996) neurofibrillary tangles ที่พบมาจากความผิดปกติในกระบวนการ phosphorylation ของ tau protein ในเซลล์ประสาท ส่วนการเกิด senile plaques มักเกิดการรวมกลุ่มกันของ A β peptide และเชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการเกิด neurodegeneration และโรคอัลไซเมอร์ (Selkoe, 1994; Yan et al., 2004) และจากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์และสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้สูญเสียความจำด้วย amyloid β -peptide จะมีการสะสมของ A β protein ที่เป็นสาเหตุทำให้มีการตายของเซลล์และมีความสัมพันธ์กับการสูญเสียหน้าที่และการทำลายของเซลล์ประสาท cholinergic และการลดของ acetylcholine ในสมองเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิประสาทวิทยาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ (Atack et al., 1983; Perry, 1986) ความรู้นี้ได้ก่อให้เกิดแนวทางการรักษาในแง่ประคับประคอง (Palliative therapy) โดยพยายามเสริมการทำงานด้าน cholinergic ในหลายๆ รูปแบบ กลยุทธ์ที่ประสบความสำเร็จมากที่สุดก็คือ การใช้สารยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) (Enz et al., 1993; Growdon, 1992)

นอกจากการรักษาผู้ป่วยอัลไซเมอร์ด้วยสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง AChE แล้ว จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่า การใช้ฮอร์โมนเอสโตรเจนสามารถป้องกันหรือลดอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้หญิงได้ (Henderson et al., 1994; Yaffe et al., 1998; Morinaga et al., 2007) แต่การได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดเดียวเป็นระยะเวลานาน จะมีความเสี่ยงต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดมะเร็งชนิดต่างๆ ได้เพิ่มมากขึ้น เช่นมะเร็งเต้านม (Colditz et al., 1995; Weiss et al., 2002) มะเร็งรัง

ไซ (Riman et al., 2002) หรือมะเร็งเยื่อไขโพรงมดลูก (Ziel, 1982; Horn et al., 2005) ดังนั้นการนำสมุนไพรมาใช้ อาจเป็นทางเลือกหนึ่งนอกเหนือจากการใช้ฮอร์โมน ในการป้องกันอาการอัลไซเมอร์

จะเห็นได้ว่า จากการศึกษาที่ผ่านมา เป็นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดรากพุดในการยับยั้งการทำงานของ AChE ซึ่งมีผลต่อระบบประสาทและระบบกล้ามเนื้อ แต่เนื่องจากสารสกัดรากพุดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นสารสกัดหยาบ ซึ่งอาจจะมีฤทธิ์ด้านอื่นๆ อีก ที่ยังไม่เคยมีการศึกษา เช่น ฤทธิ์ต่อระบบสืบพันธุ์ จึงเป็นที่น่าสนใจที่ผู้วิจัยจะทำการศึกษาถึงผลของสารสกัดรากพุดต่อระบบสืบพันธุ์ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำสมุนไพรชนิดนี้ไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Fairbairn A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form, *Neuroscience Letters* 40 (1983); 199-204.
- Chattipakorn S, Pongpanparadorn A, Pratchayasakul W, Pongchaidacha A, Ingkaninan K, Chattipakorn N. *Tabernaemontana divaricata* extract inhibits neuronal acetylcholinesterase activity in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 110 (2007); 61-68.
- Colditz GA, Hankinson SE, Hunter DJ, Willett WC, Manson JE, Stampfer MJ, Hennekens C, Rosner B & Speizer FE. The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine* 332 (1995); 1589-1593.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219 (1983): 1184-1190.
- Dagino D. Capillary gas chromatographic analysis of indole alkaloids: investigation of the indole alkaloids present in *tabernaemontana divaricata* cell suspension culture. *Journal of Natural Products* 54 (1991); 1558-1563.
- Enz A, Amstutz R, Boddeke H, Gmelin G, Malonowski J. Brain selective inhibition of acetylcholinesterase: a novel approach to therapy for Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 98 (1993); 431-445.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al (2005). "Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study". *Lancet* 366 (9503): 2112-2117.

- Giacobini E. Cholinergic function and Alzheimer's disease. *International Journal of Geriatrics Psychiatry* 18 (2003), S1-S5.
- Gomez-Isala T, Price JL, McKeel DW. Jr., Morris JC, Growdon JH, Hyman BT Profound loss of layer II entorhinal cortex neurons occurs in very mild Alzheimer's disease. *J Neurosci.* 16 (1996): 4491-4500.
- Growdon JH. Treatment for Alzheimer's disease. *New Engl J Med* 327(1992); 1306-1308.
- Henderson VW, Paganini-Hill A, Emanuel CK, Dunn ME, Buckwalter JG. Estrogen replacement therapy in older women. Comparisons between Alzheimer's disease cases and nondemented control subjects. *Arch Neurol* 51 (1994): 896-900.
- Henriques AT, Melo AA, Moreno PR, Ene LL, Henriques JA, Schapoval EE. *Ervatamia coronaria*: chemical constituents and some pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology* 50 (1996); 19-25.
- Ingkaninan K, Temkitthawon P, Chuenchom K, Yuyaem T, Thongnoi W. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 89 (2003); 261-264.
- Ingkaninan K, Changwijit K, Suwanborirux K. Vobasinyl-iboga bisindole alkaloids, potent acetylcholinesterase inhibitors from *Tabernaemontana divaricata* root. *J Pharm Pharmacol* 58 (2006); 847-852.
- Jorm AF, Korten AE, Henderson AS. The prevalence of dementia: a quantitative integration of the literature. *Acta Psychiatr Scand* 76 (1987): 465-479.
- Leeuwenberg AJM. *Tabernaemontana*: The old world species. London; Royal Botanic Garden: Kew, 1991.
- Liston DR, Nielsen JA, Villalobos A, Chapin D, Jones SB, Hubbard ST, Shalaby IA, Ramirez A, Nason D, White WF. Pharmacology of selective acetylcholinesterase inhibitors: implications for use in Alzheimer's disease. *European Journal of Pharmacology* 486 (2004); 9-7.
- Morinaga A, Hirohata M, Ono K, Yamada M. Estrogen has anti-amyloidogenic effects on Alzheimer's β -amyloid fibrils in vitro. *Biochem Biophys Res Com* 359 (2007): 697-702.
- Perry EK. The cholinergic hypothesis--ten years on. *Br Med Bull* 42 (1986); 63-69.
- Perry E, Walker M, Grace J, Perry R. Acetylcholine in mind: a neurotransmitter correlate of consciousness? *Trends in Neurosciences* 22 (1999): 273-280.

- Rastogi K. New alkaloids from *Tabernaemontana divaricata*. *Phytochemistry* 19 (1980); 1209-1212.
- Riman T, Dickman PW, Nilsson S, Correia N, Nordlinder H, Magnusson CM, Weiderpass E, Persson IR. Hormone replacement therapy and the risk of invasive epithelial ovarian cancer in Swedish women. *J Natl Cancer Inst.* 94(2002); 497-504.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: a central role for amyloid, *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 53 (1994); 438-447.
- Selkoe DJ. Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* 81 (2001): 741-766.
- Sharma P, Cordell GA. Heyneanine hydroxyindolenine, a new indole alkaloid from *Ervatamia coronaria* var. *plena*. *Journal of Natural Products* 51 (1988); 528-531.
- Taesotikul T, Panthong A, Kanjanapothi D, Verpoorte R, Scheffer JJ. Hippocratic screening of ethanolic extracts from two *Tabernaemontana* species. *Journal of Ethnopharmacology* 27 (1989); 99-106.
- Thompson S, Lancot KL, Herrmann N. The benefits and risks associated with cholinesterase inhibitor therapy in Alzheimer's disease. *Expert Opinion on Drug Safety* 3 (2004); 425-440.
- van Beek TA, Verpoorte R, Kinh PQ. Pseudovobparicine, a new dimeric indole alkaloid from *Tabernaemontana divaricata*. *Planta Med* 3 (1985): 277-279.
- Van Der Heijden R. Indole alkaloids in cell and tissue cultures of *Tabernaemontana* species. *Pharmaceutisch Weekblad (Scientific Weekblad)* 11 (1989); 239-241.
- Weiss LK, Burkman RT, Cushing-Haugen KL, Voigt LF, Simon MS, Daling JR, Norman SA, Bernstein L, Ursin G, Marchbanks PA. Hormone replacement therapy regimens and breast cancer risk. *Obstetrics and Gynecology* 100 (2002); 1148-1158.
- West MJ, Coleman PD, Flood DG, Troncoso JC. Differences in the pattern of hippocampal neuronal loss in the normal ageing and Alzheimer's disease. *Lancet* 344 (1994): 769-772.
- Yaffe K, Sawaya G, Lieberburg I, Grady D. Estrogen therapy in postmenopausal women. Effects on cognitive function and dementia. *JAMA* 279 (1998): 688-695.
- Yan JJ, Kim DH, Moon YS, Jung JS, Ahn EM, Baek NI, Song DK. Protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of

Angelica gigas or decursinol in mice. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 28 (2004); 25-30.

Yoysungnoen P, Kantasa P, Ingkaninan K. Cardiovascular Effects of *Tabernaemontana divaricata* Root Extract in Anesthetized Rats. Thai Journal of Physiological Sciences 2008, In press.

Ziel HK. Estrogen's role in endometrial cancer. Obstet Gynecol 60 (1982); 509-15.

นันทวัน บุญยะประภัศร (2542) สมุนไพรไม้พื้นบ้าน (3) บริษัทประชาชนจำกัด กรุงเทพฯ.

สมสุข มัจฉาชีพ (2541) ไม้ดอกไม้ประดับ (2) สำนักพิมพ์แพรวพิทยา กรุงเทพฯ.

7. วัตถุประสงค์

- 7.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุทซ้อนต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหนูเพศเมีย
- 7.2 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุทซ้อนต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ของหนูเพศผู้
- 7.3 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากรากพุทซ้อนต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ในหนูทั้งสองเพศ

8. วิธีทดลอง

8.1 Animals

หนู ICR mice เพศผู้และเพศเมีย อายุ 4 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาามหาวิทยาลัยมหิดล จะถูกนำมาเลี้ยงภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ ที่ควบคุมแสง light-dark cycle เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 ± 1 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยหนูทุกตัวจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำอย่างบริบูรณ์ตลอดการทดลอง โดยระเบียบวิธีการวิจัยในโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้อยู่สัตว์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

8.2 Preparation of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE)

นำรากพุทซ้อนมาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ และอบแห้งที่อุณหภูมิ 55 °C นำมาบด และสกัดโดยการหมักสมุนไพรแห้งด้วย 95% ethanol จากนั้นระเหยให้แห้งภายใต้ความดันต่ำ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C จนกระทั่งนำมาใช้ โดยสารสกัดหยาบ (crude extract) จากรากพุทซ้อนที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ได้มาจากห้องปฏิบัติการของ รศ.ดร.กรรณก อิงคินันท์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัย

นเรศวร สารสกัดแอลกอฮอล์จากรากพุทธรักษาถูกนำมาละลายใน propylene glycol ในปริมาณต่างๆ กัน เพื่อนำไปป้อนให้สัตว์ทดลองทางปาก โดยตลอดการทดลองใช้สารสกัดที่เตรียมในคราวเดียวกัน

8.3 Experimental design

หนู ICR mice เพศผู้ ถูกแบ่งออกโดยการสุ่มเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control) ได้รับ propylene glycol (PG) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารสกัดที่ป้อน (0.15-0.2 ml ต่อวัน) ส่วนกลุ่มที่ 2-4 ได้รับสารสกัดรากพุทธรักษาที่ละลายใน PG โดยการป้อนทางปาก ในขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยจะใช้ตัวย่อเป็น TDE-0, TDE-125, TDE-250 และ TDE-500 ตามลำดับ ทำการชั่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ เมื่อให้สารเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์แล้ว หนูกลุ่มละ 5 ตัว ถูกนำมาศึกษา โดยทำให้สลบด้วยการฉีด pentobarbital (80 mg/kg) เข้าทางช่องท้อง หลังจากหนูสลบแล้ว ทำการเก็บเลือดจากหัวใจเพื่อนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมน testosterone จากนั้นทำการชำแหละอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ testes, epididymides และ seminal vesicle ออกมาชั่งน้ำหนักและนำไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพเพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค และตัดส่วนของ cauda epididymis ข้างหนึ่งออกมาเพื่อนำไปตรวจนับปริมาณอสุจิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิโดยวิธีดังกล่าวข้างล่าง สำหรับหนูที่เหลือให้ป้อนสารสกัดต่อไปอีก 4 สัปดาห์ รวมเป็นระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดทั้งหมด 8 สัปดาห์ จากนั้นนำมาศึกษาเช่นเดียวกับหนูที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลา 4 สัปดาห์

สำหรับหนูเพศเมียทุกตัว ก่อนการทดลองต้องถูกนำมาตรวจสอบ estrous cycle โดยวิธี vaginal smear โดยหนูที่นำมาใช้ในการทดลองต้องมีรอบระยะ estrous cycle ที่ปกติ คือประมาณ 4-5 วัน อย่างน้อย 3 cycles แบ่งหนูออกโดยการสุ่มเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 10 ตัวเช่นเดียวกับหนูเพศผู้ กลุ่มที่ 1 ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุม (control) ได้รับ propylene glycol (PG) ในปริมาตรเท่ากับปริมาตรของสารสกัดที่ป้อน (0.15-0.2 ml ต่อวัน) ส่วนกลุ่มที่ 2-4 ได้รับสารสกัดรากพุทธรักษาที่ละลายใน PG โดยการป้อนทางปาก ในขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน โดยจะใช้ตัวย่อเป็น TDE-0, TDE-125, TDE-250 และ TDE-500 ตามลำดับ ตรวจสอบระยะ estrous cycle ในหนูทุกตัว โดยการ ทำ vaginal smear ทุกวัน ตลอดช่วงการทดลอง ทำการชั่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ เมื่อให้สารเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์หรือประมาณ 7 cycles ทำการเก็บเลือดจากหัวใจหนูกลุ่มละ 5 ตัว เพื่อนำไปตรวจวัดระดับฮอร์โมน estrogen และ progesterone สำหรับหนูที่เหลือทำการป้อนสารสกัดต่อไปอีก 4 สัปดาห์ รวมเป็นระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดทั้งหมด 8 สัปดาห์ หรือประมาณ 14 cycles เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการสลบหนูด้วยการฉีด pentobarbital (80 mg/kg) เข้าทางช่องท้อง และเก็บเลือดจาก

หัวใจ จากนั้นทำการชำแหละอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ uterus, ovary, oviduct, vagina, และ breast tissue ออกมานำไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค โดยทำการชั่งน้ำหนักของ uterus และ ovary ก่อนนำไปแช่ในน้ำยาตรึงสภาพ

8.4 Vaginal smear checks

การตรวจเช็คระยะ estrous cycle ทำในช่วงเวลาประมาณ 8.00-10.00 น. ทุกวัน โดยใช้เทคนิค pipette smear โดยนำ pipette แก้วขนาดเล็ก ดูด normal saline ปริมาณเล็กน้อย แล้วสอดเข้าไปใน vagina ของหนู และค่อยๆ flush saline เข้าไปและดูดกลับประมาณ 1-2 ครั้ง จากนั้นนำ cell suspension ที่ได้ไปหยดลงบนสไลด์แก้วและปิดด้วย cover slip นำมาศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยจำแนกเซลล์ออกเป็น 3 ชนิดคือ leukocyte, nucleated cell และ cornified cell จากนั้นทำการจำแนกระยะ estrous cycle โดยดูจากชนิดของเซลล์ที่พบ โดยแบ่งออกเป็นระยะ proestrus, estrus, metestrus และ diestrus

8.5 Sperm analysis

หลังสิ้นสุดการทดลองในหนูเพศผู้ ทำการตัด epididymis ส่วนปลาย (caudal epididymis) ของหนูแต่ละตัวออกมาวางใน phosphate buffer saline (PBS) ปริมาณ 1 ml และหั่น epididymis ออกเป็นชิ้นเล็กๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 10 – 15 นาที จากนั้นทำการนับจำนวน sperm เปรียบเทียบในแต่ละกลุ่ม โดยใช้ Makler counting chamber โดยทำการนับทั้งหมด 3 ครั้ง และนำมาหาค่าเฉลี่ย ส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (% motility) ของตัวอสุจิ ทำโดยนับจำนวนอสุจิที่เคลื่อนไหวต่อจำนวนตัวอสุจิทั้งหมด และคำนวณออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยใช้สูตรดังนี้

$$\frac{\text{จำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนไหว} \times 100\%}{\text{จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่เคลื่อนไหวและไม่เคลื่อนไหว}}$$

8.6 Hormonal analysis

การตรวจระดับฮอร์โมนในเลือด ทำโดยเก็บเลือดจากหัวใจ (cardiac puncture) โดยใช้หนู 5 ตัวต่อกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มและในแต่ละระยะเวลา โดยทำการตรวจวัดที่ระยะเวลาต่างๆ กัน คือ 0, 4, และ 8 สัปดาห์ ในหนูเพศผู้ ส่วนในหนูเพศเมีย ทำการตรวจวัดระดับฮอร์โมนจากหนูที่อยู่ในระยะเดียวกัน คือระยะ proestrus และตรวจวัดที่ cycle ที่ 0, 7 และ 14

ภายหลังจากเก็บเลือดจากหัวใจแล้ว นำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงและ serum ออกจากกัน และเก็บ serum ไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปวัดระดับฮอร์โมน โดยจะทำการตรวจวัดระดับของ estradiol และ progesterone ในหนูเพศเมีย และระดับของ testosterone ในหนูเพศผู้ โดยใช้วิธี electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ด้วยเครื่อง Elecsys 2010 automated analyzer (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) ที่คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

8.7 Histological examination

หลังจากที่ตรึงสภาพชิ้นเนื้อในอวัยวะสืบพันธุ์ดังกล่าวข้างต้นแล้วในน้ำยาตรึงสภาพชิ้นเนื้อ (10% neutral buffer formalin) เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อมาผ่านการกำจัดน้ำออก (dehydration) ใน ethanol ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ และนำไปแช่ใน xylene ซึ่งทำหน้าที่เป็น clearing reagent จากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อไปฝังใน paraffin block นำชิ้นเนื้อมาตัดที่ความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร และย้อมด้วย hematoxylin และ eosin จากนั้นนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพโดยใช้กล้องถ่ายรูป Nikon digital camera DXM 1200 C ที่ติดอยู่กับกล้องจุลทรรศน์ Nikon microscope ECLIPSE 80i

8.8 Statistical analysis

ผลการทดลองที่ได้ทั้งหมดแสดงเป็นค่า mean $\pm$ SEM การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทำโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5 การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า mean ระหว่างกลุ่ม control กับกลุ่ม treatment ในแต่ละช่วงของการทดลอง ใช้ one-way analyses of variance (ANOVA) โดยใช้ post-hoc test แบบ Dunnett test. การเปรียบเทียบความแตกต่างของข้อมูลในหนูแต่ละกลุ่มระหว่างระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ของการทดลอง ทำโดยใช้ paired-sample t test โดยตั้งค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$

9. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

9.1 ผลของการได้รับสารสกัดรากพุดซ้อนในหนูเพศผู้

1) Body and organ weights

น้ำหนักตัวของหนูที่ได้รับสารสกัดรากพุดซ้อนทุกขนาด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละสัปดาห์ตลอดช่วงการทดลอง ดังแสดงใน Fig. 1

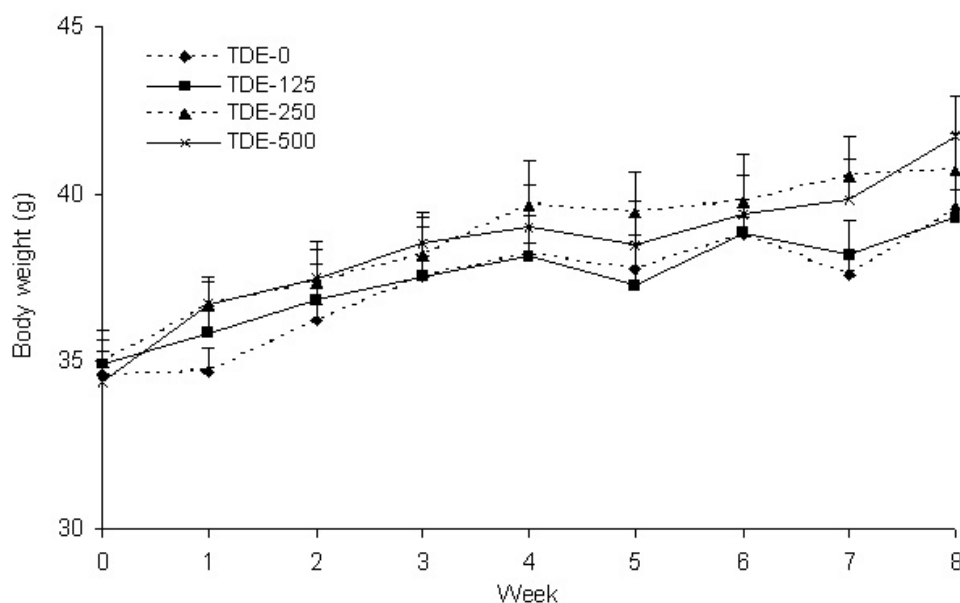


Fig. 1 Body weights of male mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). The data are expressed as the mean $\pm$ SEM.

แต่เมื่อเปรียบเทียบดูน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทั้ง 4 กลุ่มก่อนเริ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 34.58 ± 0.71 , 34.91 ± 1.04 , 34.95 ± 0.68 และ 34.34 ± 0.32 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (8 สัปดาห์) หนูมีน้ำหนักตัวเท่ากับ 39.54 ± 1.02 , 39.26 ± 0.84 , 40.69 ± 1.11 และ 41.74 ± 1.20 กรัมในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 0, 125, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นภายหลังสิ้นสุดการทดลองในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน มีค่ามากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Effect of the 0, 125, 250 and 500 mg/kg *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) on body weight gain after 8 week of treatment

Group	Body weight gain (g)
TDE-0	4.95 ± 0.52
TDE-125	4.35 ± 0.33
TDE-250	5.74 ± 0.48
TDE-500	7.40 ± 0.89 *

Each value is expressed as the mean ± SEM

* p < 0.05 as compared with TDE-0

ผลของสารสกัดรากพุดซ้อนต่อน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์เพศชาย ดังแสดงใน Table 2 พบว่าน้ำหนักของ testes เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนต่อน้ำหนักตัวหนู มีค่าลดลงเล็กน้อยในกลุ่มที่ได้สารสกัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกขนาด ในทั้ง 2 ระยะของการทดลอง และไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 ช่วงระยะเวลาที่ทดลอง ในขณะที่น้ำหนักของ epididymides มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ และในหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 ($p < 0.05$) และ 500 ($p < 0.01$) มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนัก epididymides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับสารเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับน้ำหนักของ seminal vesicle พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้สารสกัดทุกขนาดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทั้ง 2 ระยะของการทดลอง แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง 2 ช่วงระยะเวลาที่ทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 8 สัปดาห์ มีน้ำหนักของ seminal vesicle เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับสารเป็นเวลา 4 สัปดาห์

Table 2 Relative organ weights (organ weight/body weight) of male mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) at 4 and 8 week of treatment

Group	Testes weight (mg/g)		Epididymides weight (mg/g)		Seminal vesicle weight (mg/g)	
	At 4 wk	At 8 wk	At 4 wk	At 8 wk	At 4 wk	At 8 wk
	of treatment	of treatment	of treatment	of treatment	of treatment	of treatment
TDE-0	8.264 ± 0.189	7.735 ± 0.490	1.614 ± 0.111	1.485 ± 0.076	7.350 ± 0.746	9.357 ± 0.349
TDE-125	7.191 ± 0.364	7.026 ± 0.541	1.324 ± 0.071*	1.290 ± 0.053	7.553 ± 0.387	9.986 ± 0.552 [#]
TDE-250	7.983 ± 0.428	6.468 ± 0.653	1.361 ± 0.029	1.218 ± 0.055* [#]	7.617 ± 0.853	10.944 ± 0.705
TDE-500	7.853 ± 0.435	6.428 ± 0.673	1.405 ± 0.035	1.173 ± 0.048** [#]	8.111 ± 0.556	9.927 ± 0.436 [#]

Each value is expressed as the mean ± SEM of 5 animals

* p < 0.05, ** p < 0.01 as compared with TDE-0

[#] p < 0.05 as compared with 4 week treatment

2) Histology of testis, epididymis, and seminal vesicle

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ testis ในหนูทุกกลุ่มแสดงลักษณะทางโครงสร้างที่ปกติ (Fig. 2) คือประกอบไปด้วย seminiferous tubule ที่ถูกตัดตามขวางจำนวนมาก ภายในแต่ละ seminiferous tubule พบเซลล์สืบพันธุ์ในหลายๆ ระยะ ได้แก่ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa นอกจากนี้ยังพบ Sertoli cell แทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ และพบกลุ่มของ Leydig cell ในเนื้อเยื่อระหว่าง seminiferous tubule และไม่พบความแตกต่างกันของลักษณะทางโครงสร้างในหนูแต่ละกลุ่ม

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ epididymis ในหนูกลุ่มควบคุม (TDE-0) แสดงลักษณะทางโครงสร้างที่ปกติ คือเป็นท่อถูกตัดตามขวางจำนวนมาก ภายในท่อบุด้วย pseudostratified columnar epithelium ที่มี stereocilia ยื่นเข้าไปใน lumen ภายใน lumen ของท่อเต็มไปด้วยกลุ่มของ sperm จำนวนมาก โดย sperm มีความหนาแน่นเพิ่มมากขึ้นในระยะ 8 สัปดาห์ เมื่อเทียบกับระยะ 4 สัปดาห์ (Fig. 3a และ 3A) ส่วนลักษณะของ epididymis ในหนูกลุ่มทดลองทุกกลุ่มในช่วงระยะ 4 สัปดาห์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ ยกเว้นความหนาแน่นของ sperm ใน lumen พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน มีความหนาแน่นของ sperm มากที่สุด (Fig. 3c) สำหรับช่วงระยะเวลา 8 สัปดาห์ ไม่พบความแตกต่างทางโครงสร้างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (Fig. 3 A-D)

สำหรับ seminal vesicle ในหนูทุกกลุ่มแสดงลักษณะทางโครงสร้างที่ปกติเช่นกัน (Fig. 4) คือมีลักษณะเป็น mucosal fold ยื่นเข้าไปใน lumen บูดด้วย simple columnar epithelium ภายใน lumen เต็มไปด้วย secretion ติดสี eosinophilic เข้ม

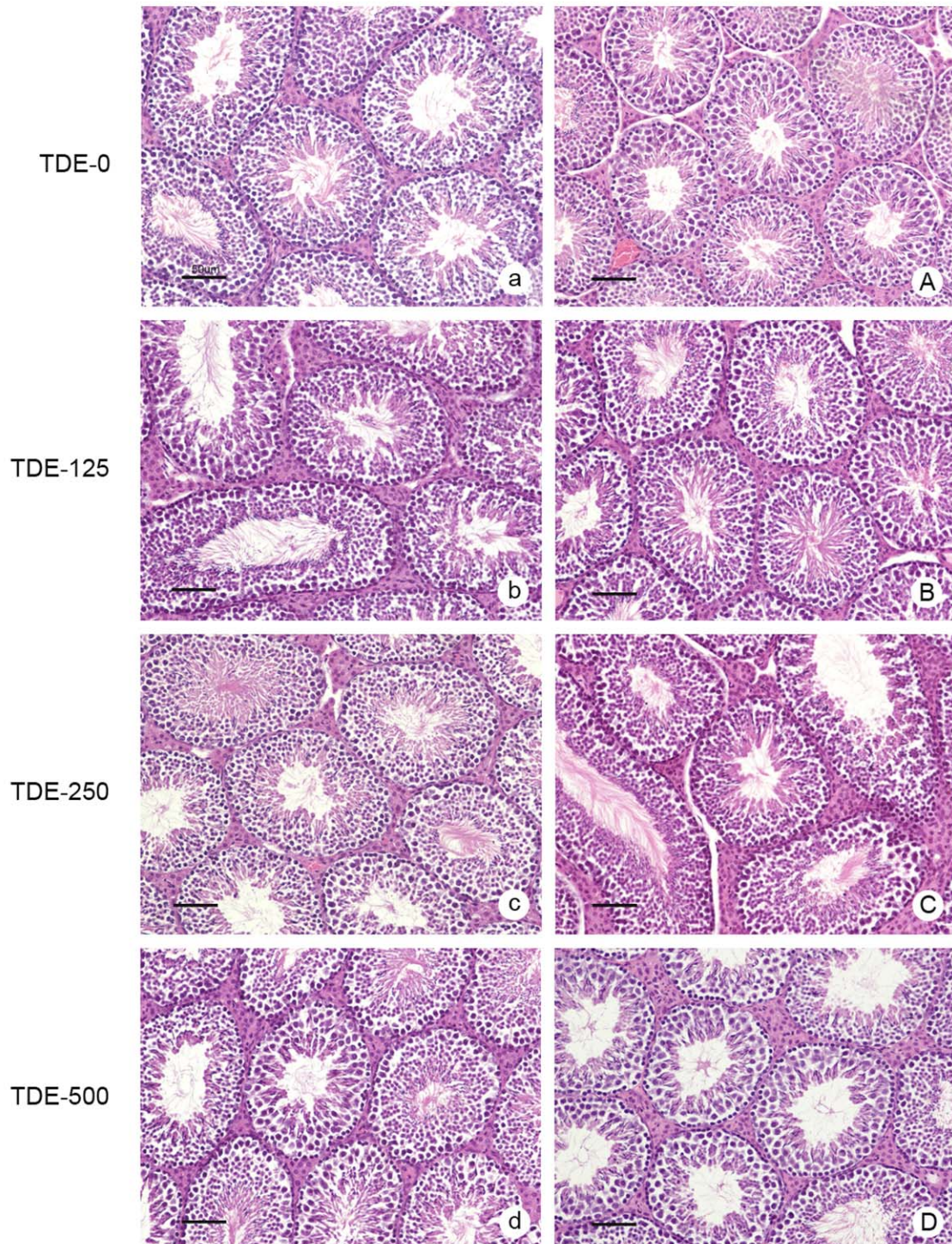


Fig. 2 Histological comparison of testis at the 4 week (a-d) and 8 week (A-D) of treatment period of mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). Scale bars = 50 μ m.

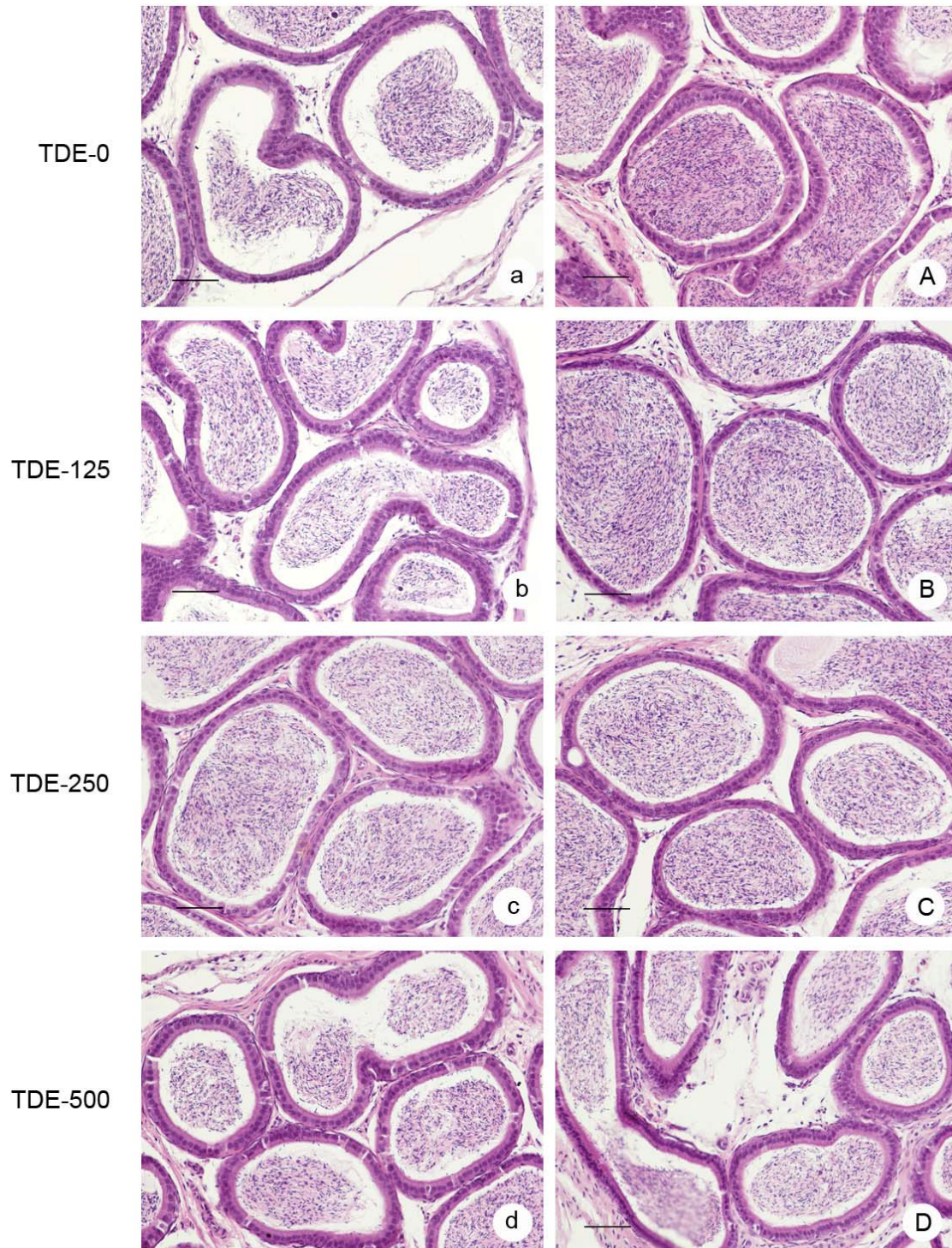


Fig. 3 Histological comparison of epididymis at the 4 week (a-d) and 8 week (A-D) of treatment period of mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). Scale bars = 50 μ m.

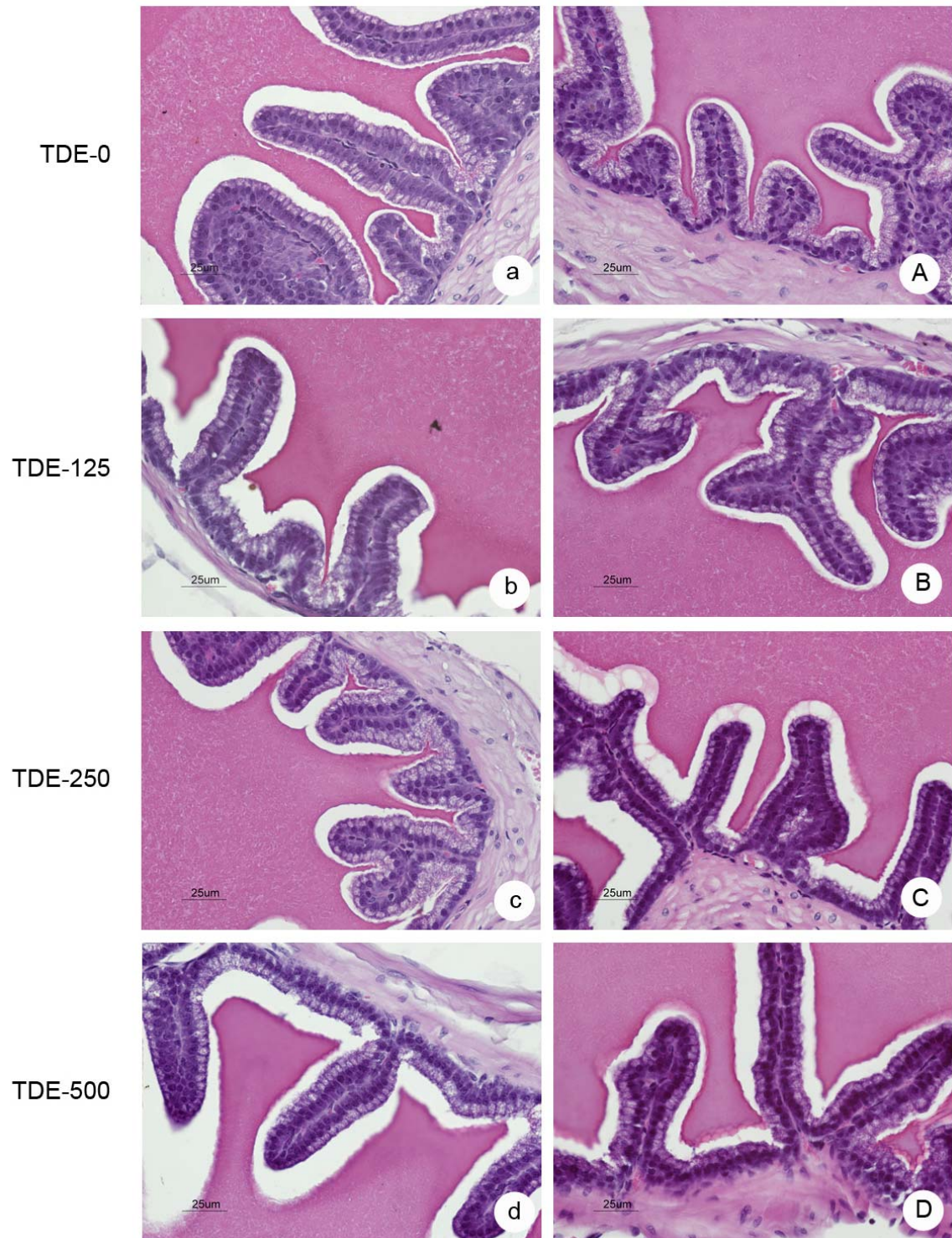


Fig. 4 Histological comparison of seminal vesicle at the 4 week (a-d) and 8 week (A-D) of treatment period of mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively).

3) Serum testosterone levels

ระดับฮอร์โมน testosterone ใน serum ของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมตลอดช่วงการทดลอง ดังแสดงใน Table 3

Table 3 Serum testosterone levels in male mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) at 4 and 8 week of treatment

	Testosterone levels (ng/ml)
At 0 week (basal levels)	1.44 $\pm$ 0.86
At 4 week of treatment	
TDE-0	0.73 $\pm$ 0.19
TDE-125	1.75 $\pm$ 0.81
TDE-250	1.06 $\pm$ 0.34
TDE-500	2.85 $\pm$ 1.23
At 8 week of treatment	
TDE-0	0.46 $\pm$ 0.22
TDE-125	22.29 $\pm$ 13.15
TDE-250	1.63 $\pm$ 1.36
TDE-500	4.59 $\pm$ 1.48

Each value is expressed as the mean $\pm$ SEM of five animals

จากผลการทดลองนี้แสดงว่าสารสกัดรากพุดซ้อนไม่มีผล androgenic effect และ anti-androgenic effect เนื่องจากไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน testosterone รวมทั้งไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก testis

4) Sperm concentration and motility

เมื่อสิ้นสุดระยะ 4 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน มีความเข้มข้นของตัวอสุจิเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$ และ $p < 0.01$ ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Fig. 5) โดยความเข้มข้นของตัวอสุจิในกลุ่มควบคุมเท่ากับ 26.72 ± 6.91 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน มีความเข้มข้นของตัวอสุจิเท่ากับ 48.34 ± 2.88 และ 59.38 ± 5.17 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อให้สารสกัดขนาด 500 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน พบว่าความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลง (40.14 ± 8.65 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร) และไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อสิ้นสุดระยะ 8 สัปดาห์ของการทดลอง พบว่าความเข้มข้นของตัวอสุจิในกลุ่มควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับระยะ 4 สัปดาห์ และในกลุ่มที่ได้รับสารสกัด พบว่าความเข้มข้นของตัวอสุจิมีแนวโน้มลดลงตามปริมาณสารที่เพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุม

การเพิ่มขึ้นของความเข้มข้นของตัวอสุจิในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์นี้ ไม่น่าเกิดจากผลของ androgenic activity ในสารสกัดเพราะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน testosterone แต่น่าจะเกิดจากผลเฉพาะที่ของ anti-oxidative activity ของสาร alkaloid ที่พบในสารสกัดหยาบรากพุดซ้อน โดยทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione หรือ superoxide dismutase เช่นเดียวกับรายงานของ Gupta และคณะ (2004)

ส่วนการศึกษามูลของสารสกัดรากพุดซ้อนต่อความสามารถในการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิพบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในช่วงระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ของการทดลอง (Fig. 5) และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในระยะ 8 สัปดาห์มีค่าลดลงกว่าในช่วงระยะ 4 สัปดาห์ของการทดลองในหนูทุกกลุ่ม โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่าง 2 ช่วงเวลาที่ทดลอง

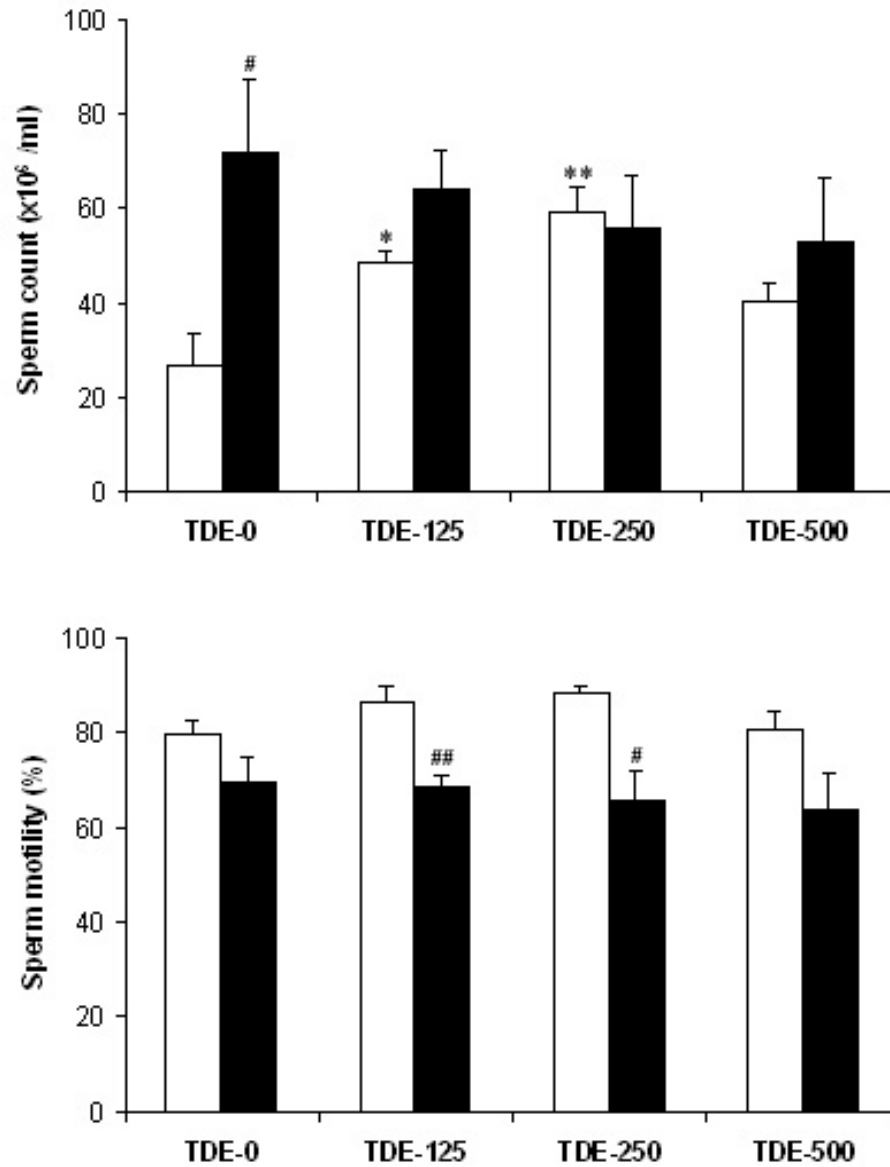


Fig. 5 Sperm concentration and motility of male mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) at 4 week (white column) and 8 week (black column) of treatment. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM of five animals. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ as compared with TDE-0, [#] $p < 0.05$, ^{##} $p < 0.01$ as compared with 4 week treatment.

9.2 ผลของการได้รับสารสกัดหยาบจากรากพุทธรักษาในหนูเพศเมีย

1) Body weight

น้ำหนักตัวของหนูที่ได้รับสารสกัดรากพุทธรักษาทุกขนาด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในแต่ละสัปดาห์ตลอดช่วงการทดลอง ดังแสดงใน Fig. 6

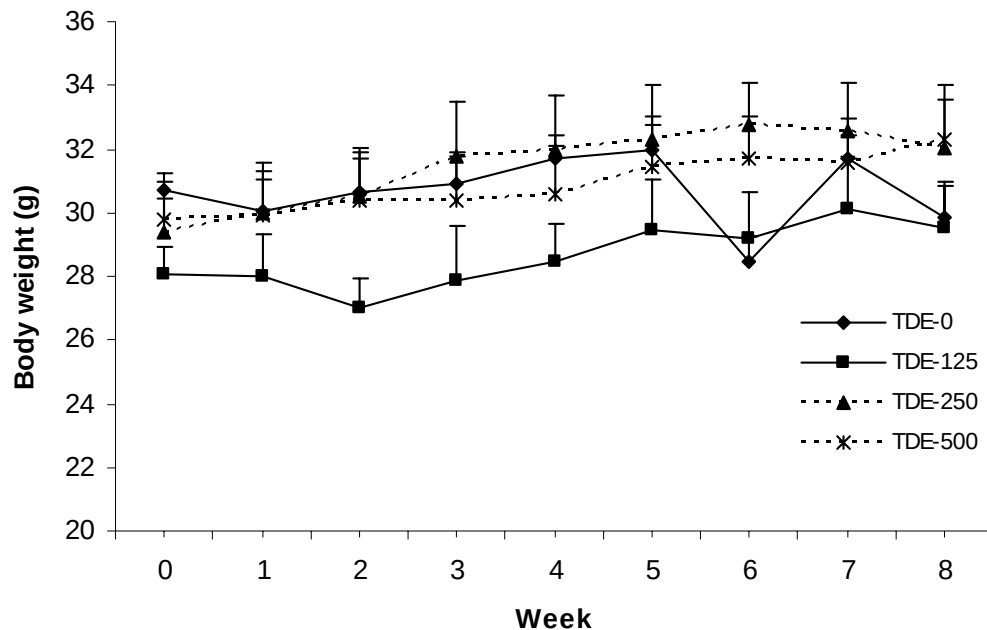


Fig. 6 Body weights of female mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0, 125, 250 and 500 mg/ kg BW/ day (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). The data are expressed as the mean $\pm$ SEM.

แต่เมื่อเปรียบเทียบดูน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) พบว่าน้ำหนักตัวของหนูทั้ง 4 กลุ่มก่อนเริ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 30.73 ± 0.54 , 28.06 ± 0.88 , 29.42 ± 1.04 และ 29.82 ± 1.16 กรัม ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (8 สัปดาห์) หนูมีน้ำหนักตัวเท่ากับ 29.86 ± 1.01 , 29.54 ± 1.45 , 32.04 ± 1.51 และ 32.31 ± 1.72 กรัมในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดปริมาณ 0, 125, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นภายหลังสิ้นสุดการทดลองในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน มีค่ามากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 4

Table 4 Effect of the 0, 125, 250 and 500 mg/kg *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) on body weight gain after treatment for 8 week

Group	Body weight gain (g)
TDE-0	-0.87 $\pm$ 0.69
TDE-125	1.48 $\pm$ 0.75
TDE-250	2.63 $\pm$ 0.70 *
TDE-500	2.50 $\pm$ 0.83 *

Each value is expressed as the mean $\pm$ SEM

* p < 0.05 as compared with TDE-0

2) Relative weights of reproductive organs

ผลของสารสกัดรากพุดซ้อนต่อน้ำหนักของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์เพศหญิง ได้แก่ มดลูก (uterus) และรังไข่ (ovary) เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าน้ำหนักของ uterus เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนต่อน้ำหนักตัวหนู มีค่าเพิ่มขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 และ 250 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน มีค่าลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย (Fig. 7) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำหนักของ uterus ในหนูที่ได้รับสารสกัดทุกขนาด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ส่วนน้ำหนักของ ovary เมื่อคิดเป็นอัตราส่วนต่อน้ำหนักตัวหนู มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 125 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน มีค่าลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย (Fig. 8) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำหนักของ ovary ในหนูที่ได้รับสารสกัดทุกขนาด ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

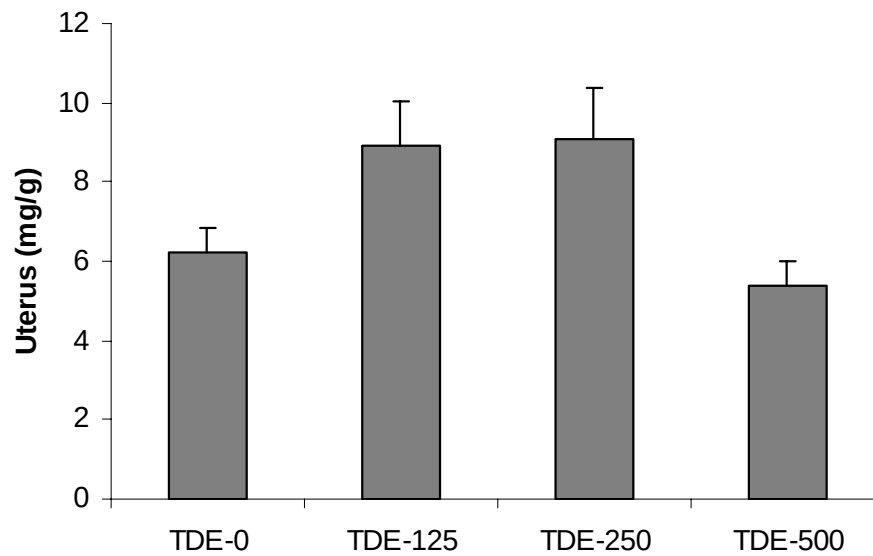


Fig. 7 Relative weights (organ weight/body weight) of uterus of female mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) after treatment for 8 week

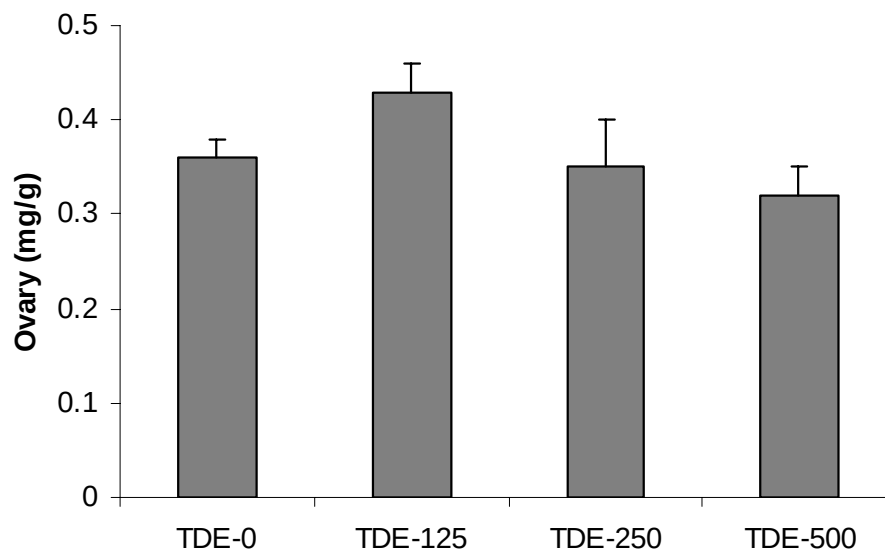


Fig. 8 Relative weights (organ weight/body weight) of ovary of female mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively) after treatment for 8 week

3) Estrous cycles

หนูส่วนใหญ่ในทุกกลุ่มมีรอบระยะ estrous cycle ปกติตลอดช่วงการทดลอง โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 4 – 6 วัน โดยแบ่งออกได้เป็นระยะ proestrus, estrus, metestrus และ diestrus และไม่พบความผิดปกติของเซลล์ชนิดต่างๆ ใน vagina มีหนูส่วนน้อยที่มีรอบระยะ estrous cycle นานกว่าปกติ คือประมาณ 7 – 8 วัน แต่มีความสม่ำเสมอของการเกิด cycle เป็นปกติ

4) Histology of reproductive organs and breast tissue

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ ovary ในหนูทุกกลุ่ม ไม่พบความผิดปกติทางโครงสร้าง (Fig. 9) โดยภายใน ovary ประกอบไปด้วย ovarian follicles ในระยะต่างๆ ได้แก่ primary, secondary และ Graafian follicles จำนวนมาก และไม่พบความแตกต่างระหว่างหนูแต่ละกลุ่ม

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ uterus เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า uterus ของหนูทุกกลุ่มแสดงลักษณะทางโครงสร้างที่ปกติ (รูปที่ 10) คือผนังของมดลูกประกอบด้วยชั้น 3 ชั้นคือ endometrium, myometrium และ perimetrium โดยชั้น endometrium บุด้วย simple columnar epithelium และพบ uterine gland จำนวนมาก ไม่พบความแตกต่างของจำนวน uterine gland, ความหนาของ endometrium และ myometrium ในหนูแต่ละกลุ่ม

ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ vagina ในหนูทุกกลุ่ม แสดงลักษณะของ epithelium ที่อยู่ในระยะ proestrus (รูปที่ 11) คือ เป็นชั้น stratified squamous epithelium ค่อนข้างบางและมีการหลุดลอกของ nucleated cell เข้ามาใน lumen พบชั้นของ keratin เกิดขึ้นที่ surface epithelium

สำหรับอวัยวะอื่นๆ เช่น ท่อนำไข่ (oviduct) และเนื้อเยื่อเต้านม (breast tissue) ก็ไม่พบความผิดปกติใดๆ ทางโครงสร้าง ทั้งในระดับมหากายวิภาค (gross anatomy) และจุลกายวิภาค (microscopic anatomy)

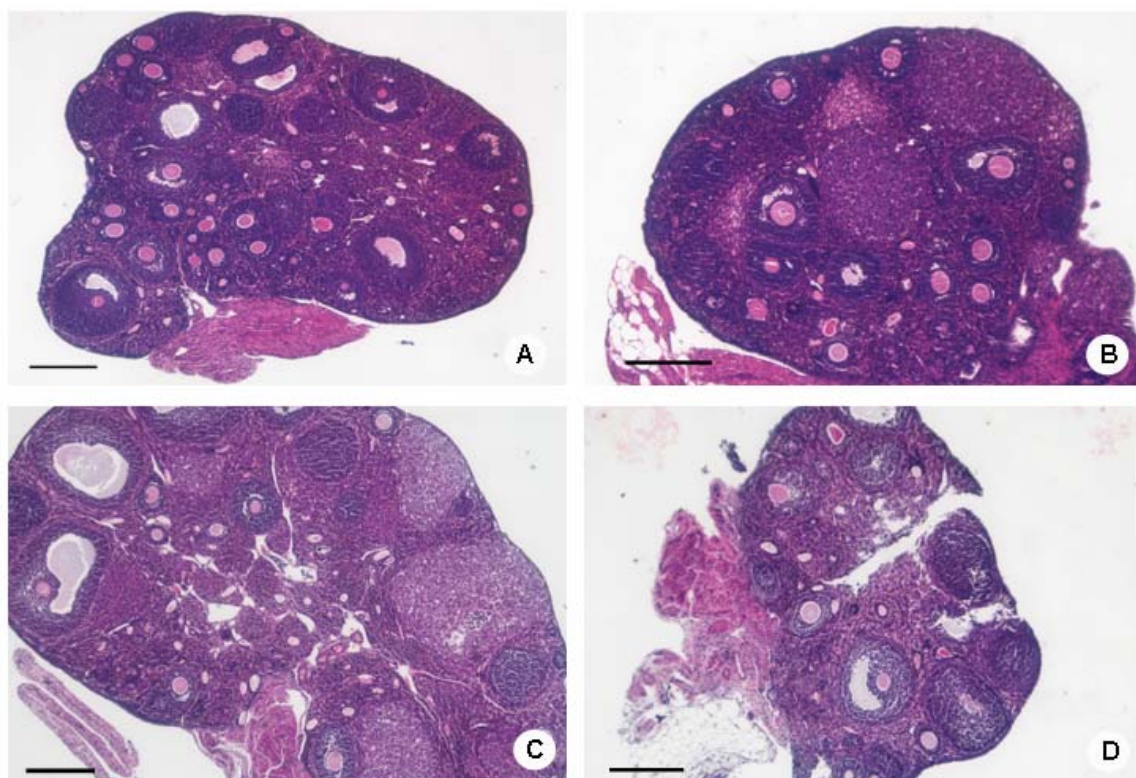


Fig. 9 Histological comparison of ovary at the end of treatment period for mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0 (A), 125 (B), 250 (C) and 500 (D) mg/ kg BW/ day. Scale bars = 200 μ m.

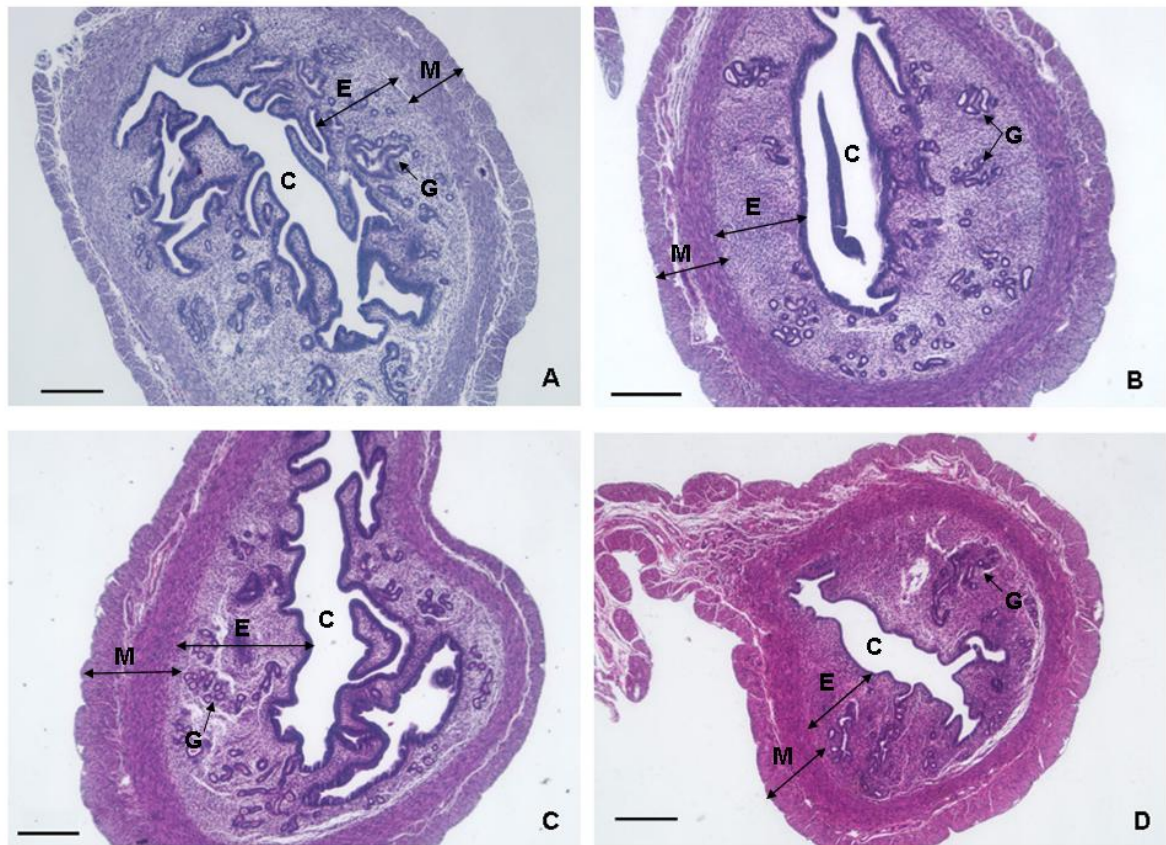


Fig. 10 Histological comparison of uterus at the end of treatment period for mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0 (A), 125 (B), 250 (C) and 500 (D) mg/ kg BW/ day. C = uterine cavity, E = endometrium, G = uterine gland, and M = myometrium. Scale bars = 200 μ m.

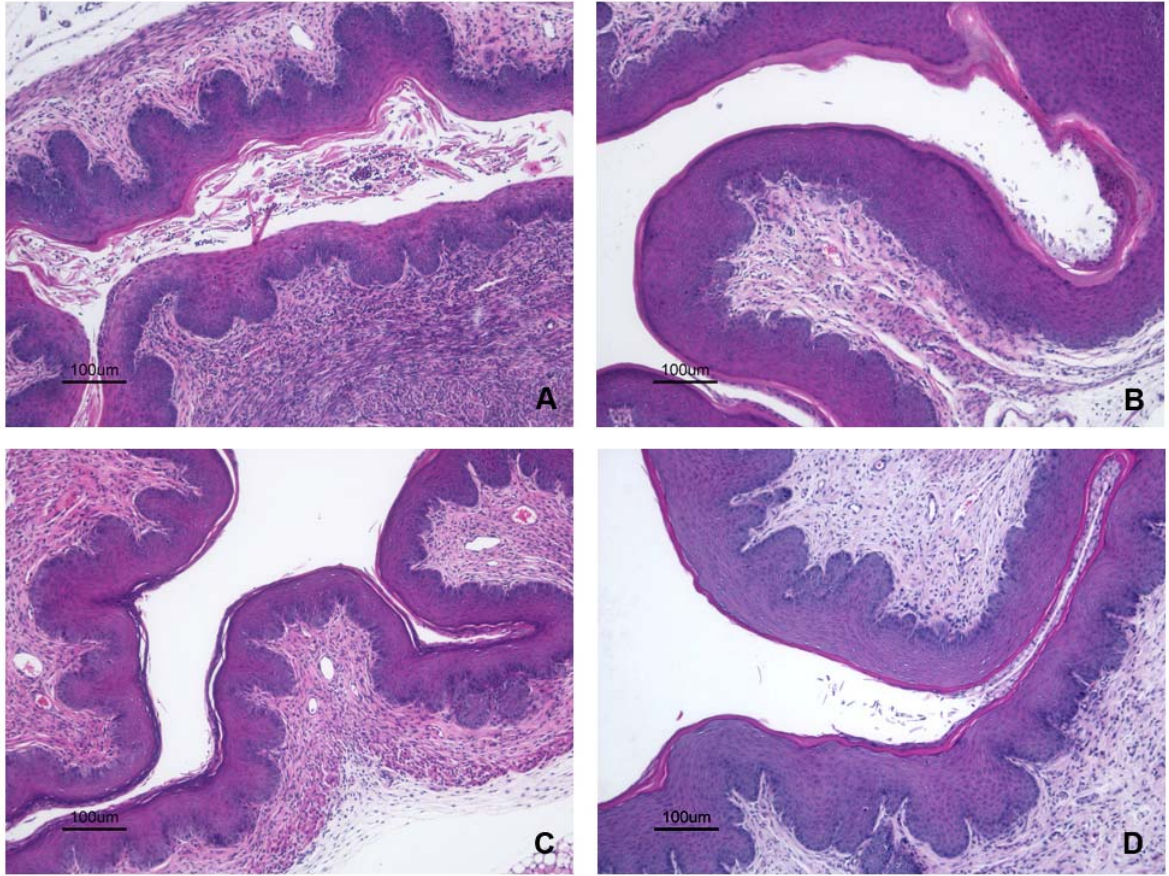


Fig. 11 Histological comparison of vagina at the end of treatment period for mice treated with *Tabernaemontana divaricata* extract at 0 (A), 125 (B), 250 (C) and 500 (D) mg/ kg BW/ day.

5) Levels of serum estradiol and progesterone

ระดับฮอร์โมน estradiol ใน serum ของหนูที่ได้รับสารสกัดทุกขนาดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มควบคุมตลอดช่วงการทดลอง คือตรวจวัดที่ cycle ที่ 7 และ 14 แต่เมื่อเปรียบเทียบระดับ serum estradiol ของหนูทุกกลุ่มที่ระยะ cycle ที่ 7 และ 14 กับ cycle 0 หรือก่อนเริ่มการทดลอง (basal level) พบว่าหนูในกลุ่มควบคุมมีระดับ serum estradiol ที่ cycle ที่ 14 มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทุกขนาด ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งในระยะ cycle ที่ 7 และ 14 (รูปที่ 12)

ส่วนระดับฮอร์โมน progesterone ใน serum ของหนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารสกัดไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมตลอดช่วงการทดลอง (รูปที่ 13)

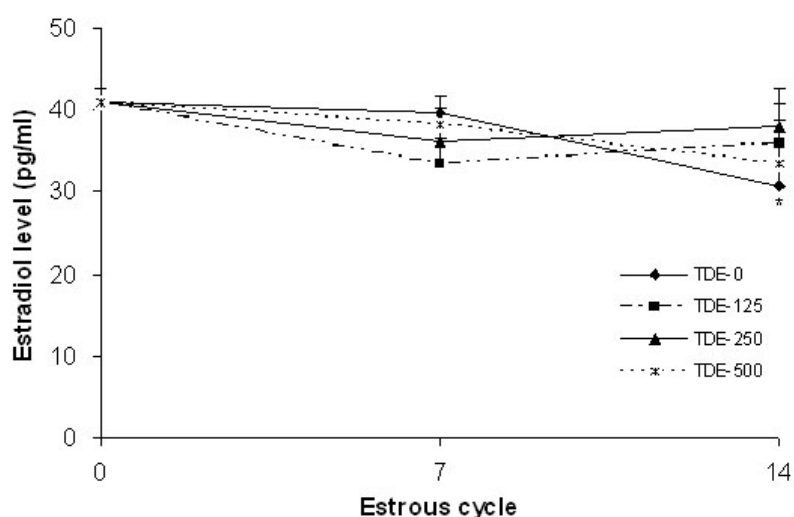


Fig. 12 Serum estradiol levels in female mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). The blood samples were collected on the proestrous phase of 0, 7, and 14 cycles. * $p < 0.05$ as compared with the basal level at 0 cycle. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM of 5 animals.

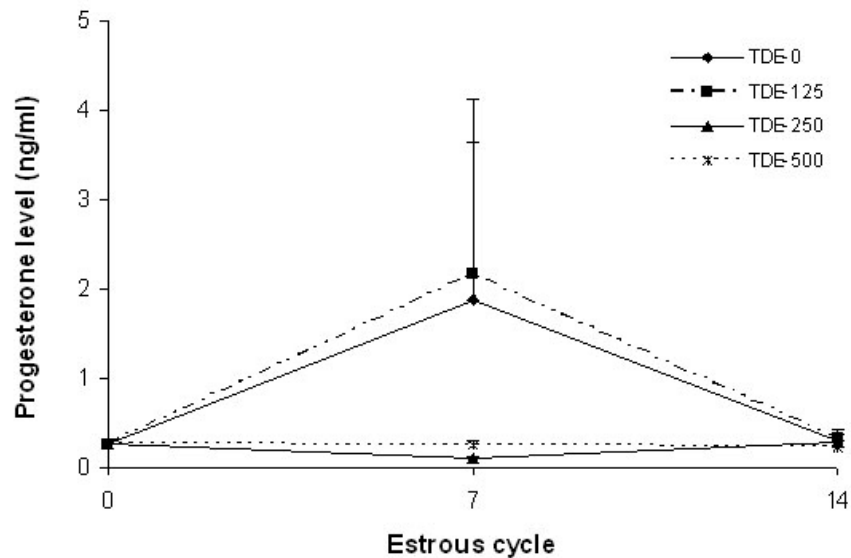


Fig. 13 Serum progesterone levels in female mice treated with 0, 125, 250 or 500 mg/kg BW/day of *Tabernaemontana divaricata* extract (TDE-0, TDE-125, TDE-250 and TDE-500, respectively). The blood samples were collected on the proestrous phase of 0, 7, and 14 cycles. The data are expressed as the mean $\pm$ SEM of 5 animals.

10. สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองที่ได้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับสารสกัดรากพุดซ้อนทางการกินในปริมาณ 125, 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลาต่อเนื่องกันนาน 8 สัปดาห์ ไม่มีผลข้างเคียงต่ออวัยวะในระบบสืบพันธุ์ทั้งในหนูเพศผู้และเพศเมีย รวมทั้งไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมนเพศในหนูทั้งสองเพศ ดังนั้นการนำสารสกัดหยาบจากรากพุดไปใช้บริโภคเพื่อป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ เช่นอัลไซเมอร์ ไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังอาจมีผลในการเพิ่มความเข้มข้นของตัวอสุจิเมื่อใช้ในปริมาณต่ำเช่น 125 หรือ 250 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์

Output ที่ได้จากโครงการวิจัย

1. ผลงานวิจัยที่คาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ชื่อผู้แต่ง: Kruevaisayawan, H., Amatyakul, P., Ingkaninan, K., Sobhon, P.

ชื่อเรื่อง: Effects of *Tabernaemontana divaricata* root extract on reproductive system of mice

ชื่อวารสาร: Journal of reproduction and development หรือ Fitoterapia

วัน เดือน ปี ที่จะเสนอตีพิมพ์: December 2010

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

2.1 เชิงพาณิชย์

ผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำมาใช้เป็นความรู้ในเบื้องต้น เพื่อนำไปศึกษาวิจัยเพิ่มเติมถึงผลกระทบของการใช้สารสกัดรากพุดซ้อนต่อระบบต่างๆ ในร่างกาย และนำมาซึ่งการพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อนำมาใช้ในการป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ เช่น อัลไซเมอร์

2.2 เชิงวิชาการ

ผลงานวิจัยและระเบียบวิธีทดลองในการวิจัย สามารถนำมาใช้ในการพัฒนาการเรียนการสอนทั้งในระดับปริญญาตรี และระดับบัณฑิตศึกษา

3. ผลงานวิจัยอื่นๆ

ชื่อผู้แต่ง: Kruevaisayawan, H., Amatyakul, P., Ingkaninan, K., Sobhon, P.

ชื่อเรื่อง: Oral administration of *Tabernaemontana divaricata* root extract enhanced sperm concentration in mice

รูปแบบการเสนอผลงาน: Poster presentation

สถานที่: การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 9 วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552

ณ. โรงแรมฮอลิเดย์อินน์ รีสอร์ท ริเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี