รหัสโครงการ SUT-104-50-24-43

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากทับทิมต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลองเพศเมีย

(Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) Extracts on Female Rat Reproductive System)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT-104-50-24-43

รายงานการวิจัย

ผลของสารสกัดจากทับทิมต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลองเพศเมีย

(Effects of Pomegranate (*Punica granatum*) Extracts on Female Rat Reproductive System)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.สพญ.ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

รศ.ดร.กรกช อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผศ.น.สพ.ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2550

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2554

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะวิจัย estrogenic effect ของสารสกัดทับทิมในหนูทดลอง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อีกชิ้นหนึ่งที่จะยืนยันถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์จากทับทิม เมื่อประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้านอื่นๆ จะทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการที่จะผลิตสารสกัดจากทับทิมในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ หรือ ยาแผนปัจจุบันได้ต่อไปในอนาคต การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550

รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.ศจีรา คุปพิทยานันท์

พฤศจิกายน 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

เป็นที่ทราบกันดีว่าทับทิม (Pomegranate, *Punica granatum* L., Punicaceae) มีเอสโตรเจน (estradiol, estrone และ estriol) เป็นองค์ประกอบและแสดงฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนในหนูถีบจักร ยิ่งไปกว่านั้นในเมล็ดทับทิมยังเป็นแหล่งของไฟโตเอสโตรเจน วัตถุประสงค์ของการวิจัยมีดังนี้ 1) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากทับทิมต่อระดับซีรั่มเอสโตรเจน ระบบสืบพันธุ์ (น้ำหนักมดลูก เซลล์ของช่องคลอด และการพัฒนาของเต้านม) ระดับไขมัน (ไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ ไลโปโปรตีนความหนาแน่นสูง และไตรกลีเซอร์ไรด์) 2) เพื่อทดสอบผลของสารสกัดในการต่อต้านการฝังตัวของตัวอ่อน โดยใช้หนูทดลอง 8 กลุ่ม (กลุ่มละ 6-10 ตัว) ดังนี้ หนูปกติควบคุม (10% v/v Tween 80) หนูตัดรังไข่ควบคุม (10% v/v Tween 80) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจน 2 ขนาดในปริมาณที่แตกต่างกัน (0.17 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิม 2 ขนาดในปริมาณที่แตกต่างกัน (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ทำการทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือน สารสกัดจากทั้งเมล็ดและเปลือกทับทิม ทำให้มดลูกมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น เหนี่ยวนำให้เยื่อบุช่องคลอดหนาขึ้น และทำให้ผนังเยื่อบุมดลูกแบ่งตัว ส่วนในเต้านมนั้นพบว่าสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิม สามารถเพิ่มจำนวนท่อของเต้านม ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิมต่อระดับ ไขมันในเลือดได้ เพราะว่าข้อมูลที่ได้ให้ผลตรงข้ามกับทฤษฎีที่เคยระบุไว้ นอกจากนี้ยังพบว่า สารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิม มีฤทธิ์ต้านการฝังตัวของตัวอ่อน

คำสำคัญ: ทับทิม, หนูตัดรังไข่, เอสโตรเจน, มดลูก, ช่องคลอด, เต้านม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Pomegranate (*Punica granatum* L., Punicacease) is known to contain estrogens (estradiol, estrone, and estriol) and show estrogenic activities in mice. In addition, pomegranate seed is a rich source of phytoestrogens. The aims of the study were therefore; 1) to investigate the effects of the pomegranate extract on serum estrogen level, reproductive actions, (uterine weight, vaginal cytology, mammary gland development), lipid profile (low-density lipoprotein, high-density lipoprotein, and triglycerides), 2) to test the effects of the pomegranate extract on anti-implantation. Rats were divided into eight groups (n = 6-10); sham operated rats received vehicle (10% v/v Tween 80), ovariectomized rats received vehicle (10% v/v Tween 80), ovariectomized rats received 17β-estradiol at the different doses (0.17 or 0.7 mg/kg B.W.), and ovariectomized rats received Methanolic extracts of the pomegranate seed or peel at the different doses (100 and 1000 mg/kg B.W.). These rats were administrated daily for 2 months. In ovariectomized rats, the pomegranate seed and peel extracts produced an increase in uterine wet weight and induced cornification of the vagina and proliferation of the uterine endometrium. Increases in intralobular ducts were found in the mammary glands of pomegranate seed and peel extracts administrated rats. In this study, the effects pomegranate seed and peel extracts on lipid profile were difficult to explain because the data suggest the opposite theory. In addition, the pomegranate seed and peel extracts exerted anti-implantation activity.

Key words: *Punica granatum* L., ovariectomized rat, estrogen, uterus, vagina, mammary gland

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญรูป	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมสารสกัดทับทิม	4
การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมในสัตว์ทดลอง	6
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดทับทิม	11
ผลการศึกษาทธิ์ของสารสกัดทับทิมในการคุมกำเนิด	14
ผลของสารสกัดทับทิมต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง	14
ผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด	22
บทที่ 4 บทสรุป	
วิจารณ์ผลการทดลอง	25
สรุปผลการทดลอง	27
ข้อเสนอแนะ	28
บรรณานุกรม	29
ภาคผนวก	32
ประวัติผู้วิจัย	33

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญรูป

รูปที่	เรื่อง	หน้า
1	สารสกัดที่ได้จากส่วนของเปลือกและเมล็ดทับทิม	4
2	เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากทับทิม	5
3	เครื่อง Reflotron ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด	10
4	เนื้อเยื่อมดลูกตัดขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า	16
5	ลักษณะเนื้อเยื่อเต้านมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	17
6	เซลล์ช่องคลอดที่ถูกย้อมด้วยเมทิลีนบลูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า	19
7	กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมแบบผ่านยีน	27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่	เรื่อง	หน้า
1	ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเมล็ดทับทิม	11
2	ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเปลือกทับทิม	13
3	ผลของการป้อนสารสกัดทับทิมต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในหนูท้อง 10 วัน	14
4	ผลของสารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมต่อน้ำหนักมดลูกในหนูตัดรังไข่	15
5	ผลของสารสกัดทับทิมต่อเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอดหนูตัดรังไข่	20
6	ฤทธิ์การเป็น estrogenic ของสารสกัดทับทิม	21
7	ผลของสารสกัดทับทิมต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (E_2) และ LH	22
8	ผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับของคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนู	24

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในช่วงสิบปีที่ผ่านมานักวิทยาศาสตร์ได้ให้ความสนใจในการวิจัยเกี่ยวกับ phytoestrogen เป็นอย่างมากในการที่จะนำมารักษาโรคหรือความผิดปกติที่เกิดจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรี เช่น การรักษาอาการที่เกิดขึ้นในช่วงวัยหมดระดู ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงโรคกระดูกพรุนและมะเร็งเป็นที่ทราบกันดีว่า phytoestrogen นั้นเป็นสารอินทรีย์ซึ่งสร้างขึ้นโดยพืช แต่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับเอสโตรเจน พืชที่พบว่าสามารถสร้าง phytoestrogen ได้นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภทดังนี้คือ 1) พืชชนิดที่เป็นฝัก (legume) เช่น ถั่วเหลือง ถั่วเขียว ถั่วลันเตา ถั่วลิสง ทองหลาง กระถิน 2) พืชชนิดที่เป็นเมล็ด (Cereal) เช่น ข้าว เมล็ดของต้น flax และ 3) พืชจำพวกหญ้า (Grasses) นอกจากนี้มีรายงานการพบ phytoestrogen ในพืชชนิดอื่นๆ อีกหลายชนิดรวมทั้งทับทิม (*Punica granatum*) ซึ่งพบในส่วนของเปลือกของผลและเมล็ด

ในประเทศไทย กล่าวได้ว่าคนไทยได้มีการนำ phytoestrogen ซึ่งพบได้ในพืชพื้นบ้านของไทยหลายชนิดมาใช้กันอย่างกว้างขวางตั้งแต่อดีตมาแล้ว ในปัจจุบันเนื่องด้วย “กระแสสมุนไพร” คนไทยก็ได้ให้ความสนใจมากยิ่งขึ้น ในการที่จะนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาใช้ประโยชน์เพื่อป้องกันโรค บำรุงสุขภาพ และเสริมความงาม ผลิตภัณฑ์จากทับทิมก็เป็นอีกชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนั้น ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวภาพของทับทิมยังมีไม่เพียงพอ สรรพคุณต่างๆ เป็นเพียงการอ้างจากผลของการบริโภคและการใช้ประโยชน์โดยภูมิปัญญาพื้นบ้านเป็นหลัก แม้จะมีรายงานว่าทับทิมมีสารสำคัญกลุ่ม phytoestrogen แต่คุณสมบัติทางชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น การออกฤทธิ์ รวมทั้งความปลอดภัยในการนำมาบริโภคยังไม่มีหลักฐานยืนยัน ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะวิจัย estrogenic effect ของสารสกัดทับทิมในหนูทดลอง ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ จะเป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์อีกชิ้นหนึ่งที่จะยืนยันถึงคุณสมบัติทางชีวภาพของผลิตภัณฑ์จากทับทิม เมื่อประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้านอื่นๆ จะทำให้สามารถใช้เป็นแนวทางในการที่จะผลิตสารสกัดจากทับทิมในรูปของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ หรือ ยาแผนปัจจุบันได้ต่อไปในอนาคต

ผลงานวิจัยที่มีมาก่อน

ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) เป็นพืชวงศ์ *Punicaceae* พบในประเทศแถบเมดิเตอเรเนียน ตะวันออกกลาง เอเชียใต้ และหลายประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย ลักษณะของทับทิมเป็นไม้พุ่ม สูงไม่เกิน 3 เมตร ปลายกิ่งอ่อนห้อยลู่ลง ปลายกิ่งเล็กมักกลายเป็นหนามแหลม ใบของทับทิมเป็นใบเดี่ยว ออกเป็นคู่ตรงข้ามกัน รูปหอกกลับ เนื้อใบเนียน ดอกทับทิม

มีสีแดง ออกเป็นดอกเดี่ยวๆ หรือรวมเป็นกระจุกประมาณ 5 ดอก ผลทับทิมนั้นมีลักษณะกลมโต ผิวนอกแข็งเป็นมัน ผลแก่จะแตกอ้าออกให้เห็นเมล็ดที่มีเนื้อเยื่อใสๆ สีขาวอมชมพูอยู่ภายใน (นันทวันและ อรนุช, 2541)

สารที่พบในทับทิมมีหลายชนิด ที่พบในเปลือกของผลและน้ำมันจากเมล็ด ได้แก่ สารในกลุ่ม polyphenol เช่น quercetin และ kaempferol (Chauhan และ Chauhan, 2001) สารกลุ่ม flavonoid glycosid (El-Toumy และ Rauwald, 2002) สาร ellagic acid และ ellagic tannin (Polyrazoglu และคณะ, 2002) และ organic acid (Heftmann และคณะ, 1966) ที่สำคัญพบสารกลุ่มสเตียรอยด์ คือ estrone (Dean และคณะ, 1988), estradiol (Abd El Wahab และคณะ, 1998) และ testosterone (Lau และคณะ, 2003) นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอื่นๆ เช่น lauric acid, manitol, pelargonin, piperideine, punicacortein (A, B, C, D), punicalin, steric acid, strictinin, tannin, tellimagrandin I, tricosanoic acid และ unicalin xanthoxylin เป็นต้น (นันทวัน และ อรนุช, 2541)

ทับทิมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายประการ เช่น ลดน้ำตาลในเลือด ลดความดันโลหิตสูง ยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา ยีสต์ ขับพยาธิ ขับปัสสาวะ ป้องกันฟันผุ และมีฤทธิ์ในการคุมกำเนิด (นันทวัน และ อรนุช, 2541) วิธีการใช้ทับทิมในตำรับโบราณนั้นใช้โดยนำเมล็ดทับทิมมารับประทาน หรือนำมาตากแห้งป่นเป็นผงจากนั้นตวง 1-2 ช้อนชา ชงกับน้ำร้อนดื่ม เช้า-เย็น ก่อนอาหาร (นันทวันและ อรนุช, 2541)

นอกจากนี้มีรายงานความเป็นพิษของทับทิม โดยพบว่าสารสกัดส่วนที่มี gallotannin จากเปลือกของผลทับทิม ความเข้มข้น 0.5% เป็นพิษต่อตับ (Anon, 1978) สาร tannic acid จากเปลือกผลป้อนกระต่าย ขนาด 1 กรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 40 วัน ทำให้เกิดอาการเป็นพิษ สารสกัดจากผิวทับทิมด้วยน้ำ ขนาด 0.4 มิลลิกรัมต่อวัน ทำให้นกกระจอกตัวผู้ตายได้ (Singh และคณะ, 1980)

ในปี ค.ศ. 1978 มีการทำการทดลองสารสกัดจากเมล็ดทับทิมพบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Carraz และคณะ, 1978; Comai และคณะ, 1978; Kazmi และคณะ, 1974) หากนำสารสกัดจากเมล็ดทับทิมในสารละลายแอลกอฮอล์ในความเข้มข้น 300 และ 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมให้หนูที่เป็นเบาหวานกิน เมื่อเปรียบเทียบผลการลดน้ำตาลกับยาแผนปัจจุบัน chlorpropamide ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าสามารถลดน้ำตาลในเลือด 47 และ 52 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 12 ชั่วโมง (Das และคณะ, 2001)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากทับทิมต่อระบบสืบพันธุ์ในหนูทดลองเพศเมีย

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตของการวิจัยกำหนดไว้ดังนี้

1.1 ศึกษาสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากเปลือกของผลและเมล็ดทับทิม

1.2 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมในการคุมกำเนิด

1.3 ศึกษาผลของสารสกัดทับทิมต่อเนื้อเยื่อมด ลูกเต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

1.4 ศึกษาผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

1.1 ได้ข้อมูลที่เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป และสามารถนำไปประกอบการนำสารสกัดจากทับทิมไปใช้ในมนุษย์ หรือสัตว์ชนิดอื่นๆ

1.2 ส่งเสริมให้เกษตรกรมีรายได้ในการปลูกทับทิม

1.3 ลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาหรือฮอร์โมน

1.4 เป็นประโยชน์ต่อ ผู้บริโภค การแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยและสถานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับงานวิจัยสมุนไพรทั้งด้านการแพทย์และการผลิตสัตว์เศรษฐกิจ หน่วยงานเอกชนที่ผลิตและวิจัยเกี่ยวกับทับทิมเพื่อการเกษตรและเพื่อการค้า เช่น บริษัทผู้ผลิตและจำหน่ายยาและผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ

1.5 เป็นการคงไว้ซึ่งภูมิปัญญาท้องถิ่น

1.6 ได้ผลิตบัณฑิตจำนวน 1 คน

1.7 ได้ตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติ 1 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารสกัดทับทิม

ทับทิมที่ใช้ในการทดลองเป็นทับทิมไทย ที่ปลูกในเขตพื้นที่จังหวัดนครราชสีมา และเก็บเกี่ยวผลผลิตในช่วงเดือนเมษายน ถึง พฤษภาคม ทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหอพรรณไม้ กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช (Herbarium No.080252)

(A) ผลทับทิมไทย

(B) สารสกัดเมล็ดทับทิม

(C) สารสกัดเปลือกทับทิม

ภาพที่ 1 สารสกัดที่ได้จากส่วนของเปลือกและเมล็ดทับทิม

การเตรียมสารสกัดทับทิมทำได้โดย แยกเปลือกและเมล็ดออกจากกัน นำส่วนเปลือกทับทิมไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด หั่นเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปอบแห้งด้วยตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ส่วนเมล็ดนำไปคั้นน้ำและดึงเยื่อที่หุ้มเมล็ดออกให้หมดเสียก่อน ก่อนนำไปอบให้แห้งเช่นเดียวกับเปลือก เมื่อเปลือกและเมล็ดทับทิมแห้งสนิทดีแล้ว นำไปบดให้เป็นผงละเอียด แล้วจึงสกัดด้วยเมทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนระหว่างผงเปลือกหรือเมล็ดทับทิม 250 กรัม ต่อ เมทานอล 1 ลิตร โดยใช้เครื่อง Soxhlet Extractor ระเหยแอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง Rotary Evaporator และ lyophilizer ตามลำดับ เก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารสกัดเมล็ดทับทิมละลายได้ดีใน Tween-80 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และสารสกัดเปลือกทับทิมละลายได้ดีในน้ำกลั่น

A

B

ภาพที่ 2 เครื่องมือที่ใช้ในการสกัดสารจากทับทิม (A) เครื่อง Soxhlet Extractor (B) เครื่อง lyophilizer

ตรวจหาสารสำคัญโดยวิธีGas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) โดย GC-MS เป็นเครื่องมือที่ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนของเครื่อง GC (Gas chromatography) ซึ่งเป็นส่วนที่ทำหน้าที่ในการแยกองค์ประกอบของสารที่มีอยู่ในตัวอย่างให้ออกมาทีละองค์ประกอบก่อนที่จะเข้าสู่ detector (Hewlett-Packard 5973) และอีกส่วนคือ เครื่อง MS (Mass spectrometry) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็น detector ในการตรวจสอบดูว่าองค์ประกอบต่างๆ ที่ผ่านออกมาจากเครื่อง GC นั้น มีเลขมวล (mass number) เป็นเท่าไร เพื่อที่จะได้สามารถทำนายได้ว่าสารที่เราสนใจอยู่นั้นประกอบด้วยองค์ประกอบชนิดใดบ้าง และมีปริมาณเท่าไร (Hewlett Packard 6890)

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมในสัตว์ทดลอง

การเตรียมตัวอย่างสัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมีย สายพันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม เลี้ยงสัตว์ที่อาคารสัตว์ทดลอง ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี วิธีการเลี้ยงเป็นไปตามข้อกำหนดที่ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติระบุ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง การทดลองที่ 1 ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการคุมกำเนิด การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารสกัดต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านมและเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนและระดับไขมันในเลือด วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การตัดรังไข่

บรรจุหนูแรทลงในภาชนะแก้วที่มี ether ชุบสำลี (ether chamber) จนหนูสลบดีผ่าตัดรังไข่โดยวิธีปราศจากเชื้อ (aseptic technique) โดยการจับหนูนอนคว่ำเตรียมผิวหนังบริเวณแนวกลางหลัง ต่ำกว่ากึ่งกลางลงมาเล็กน้อย กรีดผิวหนังแนวกลางพอดี ดึงผิวหนังไปทางด้านขวา และผ่าตัดกล้ามเนื้อขนานไปกับกระดูกสันหลัง โดยให้ห่างจากแนวกลางตัวประมาณ 0.5 นิ้ว เมื่อพบรังไข่ ผูกขั้วของรังไข่ไว้แล้วตัดรังไข่ออก ทำเช่นเดียวกันกับรังไข่ข้างซ้าย แล้วเย็บปิดรอยผ่าที่กล้ามเนื้อและผิวหนัง ดูแลและติดตามผลการทดลองทุกวันว่าได้อาหารและน้ำพอหรือมีการติดเชื้อหรือไม่ เป็นเวลา 14 วัน

การสเมียร์ช่องคลอด

หยดน้ำเกลือ 1 หยดบนแผ่นสไลด์ จับหนูบริเวณด้านหลังขากรรไกรให้แน่นและจับบริเวณด้านหลังลำตัวหนูด้วยฝ่ามือ นำไม้ที่พัน สำลีจุ่มลงในน้ำเกลือ 0.9 เปอร์เซ็นต์และสอดเข้าช่องคลอดหนูประมาณ 5-8 เซนติเมตร ขูดเบาๆ รอบ ช่องคลอด 2-3 รอบ หลังจากนั้นกดไม้ที่สเมียร์ช่องคลอด

ลงในหยดน้ำเกลือบนแผ่นสไลด์ สเมียร์ให้ทั่ว แผ่นสไลด์อย่างสม่ำเสมอปล่อยให้ฟิล์มเยื่อบุช่องคลอดแห้ง จุ่มสไลด์ลงในเมธานอล เพื่อเป็นการรักษาเยื่อบุช่องคลอดโดยจุ่มขึ้นลง 3-4 ครั้ง จุ่มขึ้นลงในอีโอซิน ประมาณ 3-4 ครั้ง ให้น้ำยาทั่วสไลด์ จุ่มล้างในน้ำกลั่น จุ่มขึ้นลงในเมธัยลีนบลู ประมาณ 15 วินาที จุ่มล้างในน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง ก่อนนำไปดูเซลล์ชนิดต่างๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดลองที่ 1: ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการคุมกำเนิด

ทำการสเมียร์ช่องคลอดหนูทุกวันเพื่อตรวจหาหนูที่อยู่ในระยะ estrus ซึ่งหนูจะอยู่ในระยะนี้เป็นเวลา 4 วัน ศึกษาการยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนตามวิธีของ Khanna และ Chaudhary (1968) เมื่อพบว่าหนูอยู่ในระยะ Proestrus จึงเริ่มทำการผสมพันธุ์โดยจับหนูตัวเมียไปใส่ในกรงตัวผู้ ให้ตัวผู้ 1 ตัวต่อตัวเมีย 1 ตัว (monogamous) ให้อยู่ด้วยกันเป็นเวลา 24 ชม. ในตอนเช้าเมื่อครบรอบของการผสมให้สเมียร์ช่องคลอดอีกครั้งเพื่อตรวจหาเชื้ออสุจิ หากพบเชื้ออสุจิในช่องคลอดให้จดบันทึกไว้และนับว่าวันนั้นคือวันที่ 1 ของการตั้งท้อง และให้แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 6 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 หนูท้อง ป้อนน้ำ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 2 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 3 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 4 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 5 หนูท้อง ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ป้อนสารสกัดทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน เมื่อถึงวันที่ 10 ของการตั้งท้องให้ทำการเมตตาฆาตด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นผ่าตัดหน้าท้องนำส่วนของปีกมดลูกทั้ง 2 ข้างออกมาเพื่อจดบันทึกผลการทดลอง สิ่งที่ควรสังเกตคือ จำนวนการฝังตัวและพัฒนาการของตัวอ่อน นำผลการทดลองที่จดบันทึกได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนตามวิธีของ Williamson (1996)

$$\% \text{ การยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อน} = \frac{(\text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม} - \text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มทดลอง})}{\text{จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± S.E.M. วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วย Student's *t*-test ($P<0.05$) (Gupta, 1978)

การทดลองที่ 2: ศึกษาผลของสารสกัดต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรัง

ไข่ทั้ง 2 ข้าง

แบ่งหนูตัดรังไข่ออกเป็น 8 กลุ่มๆละ 6-9 ตัว ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 หนูปกติ ป้อน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 2 หนูตัดรังไข่ ป้อน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- กลุ่มที่ 3 หนูตัดรังไข่ ฉีดสารละลาย 17β-estradiol ปริมาตร 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 4 หนูตัดรังไข่ ฉีดสารละลาย 17β-estradiol ปริมาตร 0.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 5 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลายใน 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 6 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิมทำละลาย 10% (v/v) Tween 80 ปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 7 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว
- กลุ่มที่ 8 หนูตัดรังไข่ ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิมทำละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

หลังผ่าตัด 2 สัปดาห์ จึงเริ่มทำการฉีดและป้อนสารตามกลุ่มต่างๆเป็นเวลา 60 วัน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำให้หนูตายอย่างสงบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ชั่งน้ำหนักตัวและจดบันทึก เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจโดยวิธีเปิด จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่

1. มดลูก เมื่อผ่าออกมาแล้วให้ทำการชั่งน้ำหนักและจดบันทึก

$$\text{น้ำหนักมดลูกสัมพัทธ์} = (\text{น้ำหนักมดลูกเปียก}/\text{น้ำหนักตัว}) \times 100$$

2. เต้านม (mammary gland)

นำอวัยวะที่ได้นี้ไปแช่ในสารละลายฟอร์มาลีน 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้เน่าเปื่อย

จากนั้นนำมดลูกมาตัดตามขวาง (cross-section) และเต้านมตัดส่วนที่แทรกตัวอยู่ในกล้ามเนื้อท้อง ตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปฝังในพาราฟิน จากนั้นตัดพาราฟินให้มีความหนา 3 ไมโครเมตร ย้อมสีเนื้อเยื่อด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) ตรวจดูลักษณะ ขนาดและการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3. การเก็บตัวอย่างเซลล์ช่องคลอด ทำทุกสัปดาห์เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± S.E.M. วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วย ANOVA และ two-paired Student's *t*-test ($P<0.05$)

การทดลองที่ 3: ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ใช้ตัวอย่างเลือดที่ได้จากการทดลองที่ 2 เพื่อเป็นการลดจำนวนการใช้สัตว์ทดลอง (Reduction) ตามหลัก 3R

การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนในเลือด

ตรวจวิเคราะห์หาความเข้มข้นของฮอร์โมน LH และ 17β-estradiol ด้วยวิธีการ ELISA micro well kit

การตรวจวิเคราะห์ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณคอเลสเตอรอลทั้งหมด (TC) คอเลสเตอรอลชนิดดี (HDL) คอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ด้วยเครื่อง Reflotron (Roch Dianostics GmbH)

ภาพที่ 3 เครื่อง Reflotron ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลทางสถิติจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± S.E.M. วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's *t*-test ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดทับทิม

สารประกอบที่พบในเมล็ดและเปลือกทับทิม โดยวิธี GC-MS ดังแสดงในตารางที่ 1 และ 2 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเมล็ดทับทิม

ลำดับที่	ชื่อสาร	ปริมาณที่พบ (%)	เวลา (min)
1	Beta-Tocopherol	18.30	30.16
2	Tricyclo	15.72	18.23
3	β-Sitosterol	14.93	40.55
4	9,12-Octadecadienoic acid	11.04	17.01
5	9,12-Octadecadienoic acid	5.40	22.41
6	Octadec-9-enoic acid	5.05	17.05
7	Palmitinic acid	3.84	15.30
8	Unknown	3.15	10.37
9	Taraxasterol	2.19	44.06
10	2,6,10,14,18,22-Tetracosahexaene	2.16	24.53
11	Cyclohexene,5-methyl-3-(1-methylethenyl)	2.04	18.33
12	Fucosterol	1.82	41.23
13	6-Butyl-1,4-cycloheptadiene	1.68	24.67
14	Nonanoic acid	1.683	24.67

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ลำดับที่	ชื่อสาร	ปริมาณที่พบ (%)	เวลา (min)
15	Octadecanoic acid (CAS)	1.47	17.18
16	Hexadecanoic acid	1.353	20.21
17	Methylcholesterol	1.351	35.96
18	Alpha-Fenchene	1.14	18.55
19	β-Thujaplicinol	0.952	13.06
20	Eicosanoic acid	0.791	18.87
21	2-Furancarboxaldehyde	0.74	6.78
22	Isoflavone	0.671	27.06
23	Unknown	0.579	22.70
24	3-Fluoroanisole	0.475	4.84
25	Unknown	0.347	19.67
26	9,12-Octadecadienoic acid	0.254	16.52
27	4H-pyran-4-one	0.23	5.68
28	8-Octadecenoic acid	0.213	7.94
29	Phenol,2-methoxy-4-vinyl	0.21	16.57
30	Unknown	0.26	15.65

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2 ผลวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีในสารสกัดเปลือกทับทิม

ลำดับที่	ชื่อสาร	ปริมาณที่พบ (%)	เวลา (min)
1	2-Furancarboxaldehyde	61.031	6.87
2	β-Sitosterol	7.207	40.13
3	4H-Pyran-4-one	5.117	5.69
4	4-Methyleneproline	3.378	8.76
5	1,6-Anhydro-beta-D-glucopyransoe	3.342	10.21
6	1,3-Benzenetriol-5-methyl	3.163	4.80
7	1,2,3-Benzenetriol	2.906	8.87
8	Unknown	2.825	3.16
9	9-Octadecenoic	2.176	16.91
10	2-Furancarboxaldehyde	1.969	3.51
11	Hexadecanoic acid	1.484	15.21
12	Methy 2-furoate	1.457	4.90
13	Unknown	1.374	8.82
14	Cis-linoleic acid	1.028	16.87
15	4H-Pyran-4-one	0.855	3.66
16	Barbituric acid	0.690	7.78

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเคมีข้างต้น ทำให้ทราบว่าทับทิมมีสารสำคัญกลุ่ม phytoestrogen ได้แก่ β-Sitosterol ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในเมล็ด (14.930 เปอร์เซ็นต์) และเปลือก (7.207 เปอร์เซ็นต์)

ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมในการคุมกำเนิด

จากตารางที่ 3 พบว่า เปอร์เซ็นต์การฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูกหนูอายุการตั้งท้อง 10 วัน กลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 10.83 ±0.7 เปอร์เซ็นต์ กลุ่ม 2, 3, 4, และ 5 มีค่าเท่ากับ 10.17 ± 0.4, 10.17 ± 0.5, 9.83 ± 0.5 และ 9.67 ± 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ **แสดงให้เห็นว่าสารสกัดทับทิมสามารถยับยั้งการฝังตัวของตัวอ่อนได้ คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 6.09, 6.09, 9.23 และ 10.71** เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่ม 2, 3, 4, และ 5 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 3 ผลของการป้อนสารสกัดทับทิมต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในหนูท้อง 10 วัน

กลุ่ม	จำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน mean ± S.E.M.	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการฝังตัว
ควบคุม	10.83 ± 0.7	Nil
สารสกัดเมล็ดทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)	10.17 ± 0.4	6.09
สารสกัดเมล็ดทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)	9.83 ± 0.5	9.23
สารสกัดเปลือกทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)	10.17 ± 0.5	6.09
สารสกัดเปลือกทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)	9.67 ± 1.4	10.71

ผลของสารสกัดทับทิมต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

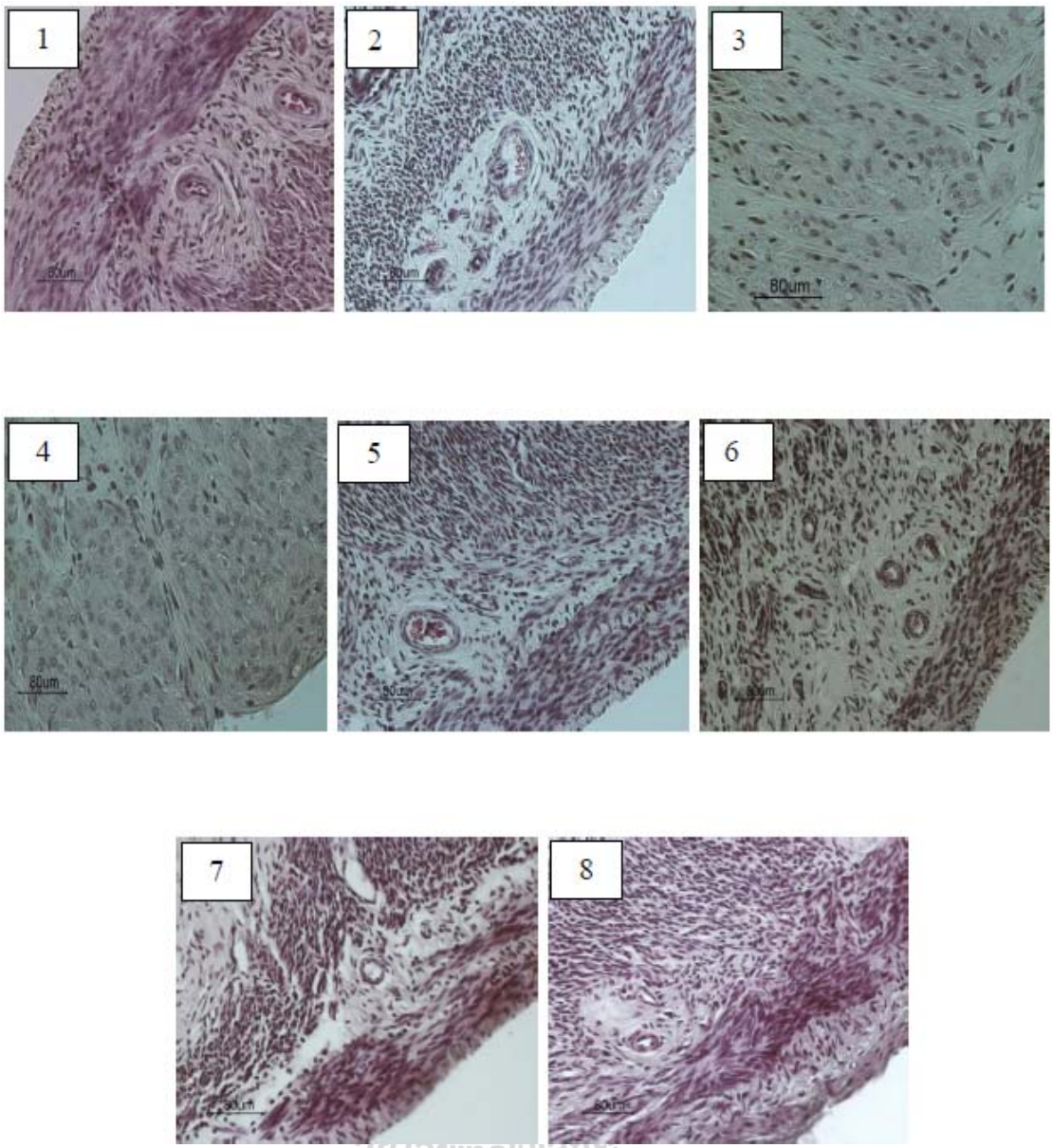
จากการทดลองพบว่ามดลูกหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมมีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ป้อนสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิม น้ำหนักของมดลูกจะเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังคงน้อยกว่าการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกในกลุ่มหนูที่ฉีด 17β-estradiol ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลของสารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมต่อน้ำหนักมดลูกในหนูตัดรังไข่

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยน้ำหนักมดลูกเปียก (มิลลิกรัม)	น้ำหนักตัว (กรัม)
Sham operated	138.94 ± 8.61	251.25 ± 6.10
หนูตัดรังไข่ควบคุม	25.23 ± 1.12[a]	329.00 ± 6.04[a]
ฉีด 17β-estradiol 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	294.70 ± 21.95[ab]	245.71 ± 8.95
ฉีด 17β-estradiol 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	532.94 ± 120.01[ab]	242.00 ± 2.00
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	78.32 ± 7.26[ab]	298.88 ± 4.48[ab]
น้ำหนักตัว	70.64 ± 2.32[ab]	261.50 ± 7.60
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม	50.88 ± 3.62[ab]	275.00 ± 6.19[ab]

[a] $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ [b] $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม

ลักษณะเยื่อบุผิวมดลูกของหนูตัดรังไข่ (ภาพที่ 4 (2))ชั้น epithelium cells มีภาวะที่เจริญไม่สมบูรณ์ ในชั้น endometrium ประกอบด้วยเซลล์สี่เหลี่ยมลูกบาศก์ที่ไม่สามารถทำงานได้ ในส่วนของเนื้อเยื่อเกี่ยวกับมีการจัดเรียงที่ไม่เป็นระเบียบ มดลูกจะมีลักษณะการเจริญขึ้นทั้งขนาดของเซลล์และจำนวนของเซลล์ ในหนูกลุ่มที่ได้รับ 17-estradiol ทั้ง 2 ความเข้มข้น (ภาพที่ 4 (3 และ 4)) สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มน้ำหนักมดลูกและต่อมมดลูก (uterine glands) (ภาพที่ 4 (5, 6, 7 และ 8)) นอกจากนี้ยังพบการเจริญขึ้นของเซลล์เยื่อบุมดลูกอีกด้วย ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเปลือกและเมล็ดของทับทิมพบว่าเซลล์เยื่อบุมดลูกมีการเจริญเพิ่มขึ้นแต่ไม่พบความผิดปกติแต่อย่างใด

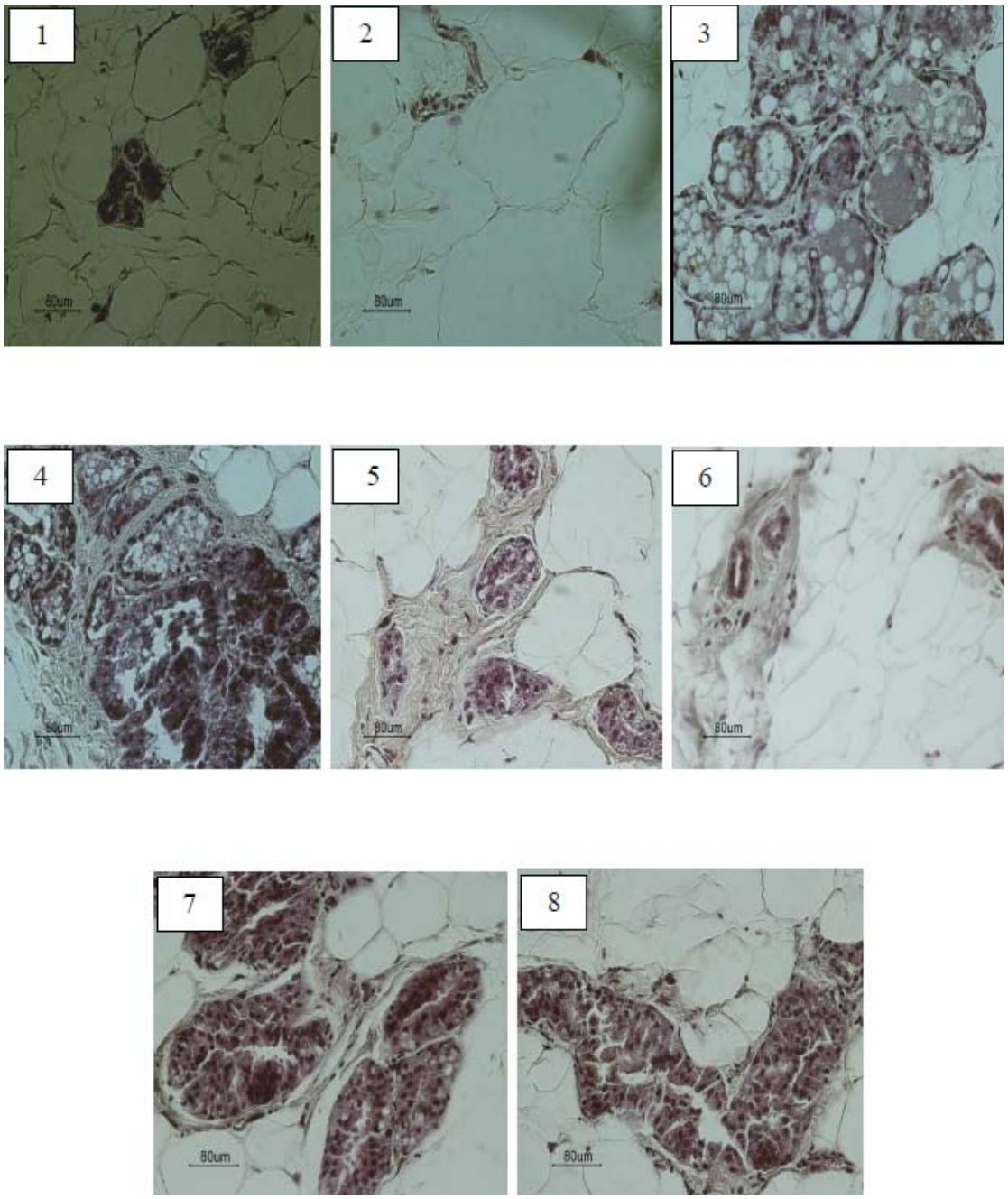


ภาพที่ 4 เนื้อเยื่อมดลูกตัดขวางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

1 = กลุ่มหนู Sham operated; 2 = กลุ่มหนูตัดรังไข่; 3 =ฉีด 17β-estradiol (0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 4 = ฉีด 17β-estradiol (0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 5 = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 6 = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 7 = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 8 = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)

ในหนูตัดรังไข่ (ภาพที่ 5 (2)) พบว่าโครงสร้างของชั้น epithelium มีความผิดปกติ เช่น ชั้นของแผ่นไขมันมีลักษณะอัดแน่นและไม่มีการสร้างท่อ (tubular ducts) เมื่อเปรียบเทียบในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน 17-estradiol (0.17 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ที่พบการเจริญของชั้นไขมันและระบบท่อต่างๆ นั้นเป็นปกติ และมีการสร้างสารคัดหลั่งด้วยในกลุ่มนี้ ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดทับทิมพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของท่อนำน้ำนมในเซลล์เต้านม (tubular

ducts of the mammary glands) ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเปลือกทับทิมมีการก่อตัวของผนังเซลล์การเจริญขึ้นของระบบท่อที่เพิ่มมากขึ้น แต่ไม่พบการสร้างสารคัดหลั่งเมื่อเปรียบกับกลุ่มที่ได้รับสารมาตรฐาน



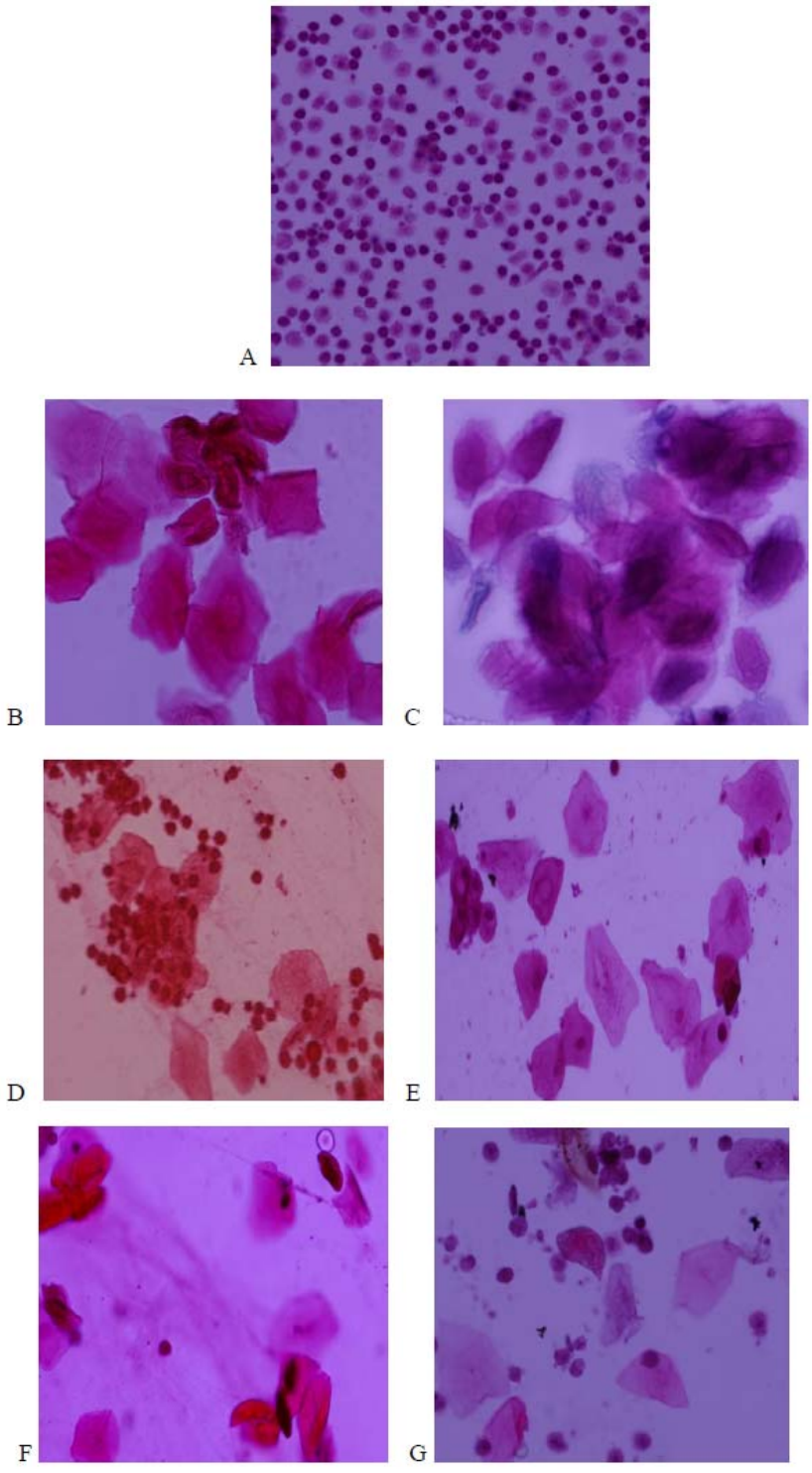
ภาพที่ 5 ลักษณะเนื้อเยื่อเต้านมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

1 = กลุ่มหนู Sham operated; 2 = กลุ่มหนูตัดรังไข่; 3 =ฉีด 17β-estradiol (0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 4 = ฉีด 17β-estradiol (0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 5 = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 6 = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 7 = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); 8 = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)

การประเมินผลความมีฤทธิ์เป็น estrogenic ของสารสกัดทับทิมจากส่วนของเมล็ดและเปลือก ได้ทำโดยการคิดเปอร์เซ็นต์ของเซลล์เกล็ดปลาที่พบในช่องคลอด การสเมียร์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมไม่พบเซลล์เกล็ดปลา พบเพียงเซลล์เม็ดเลือดขาวเท่านั้น (leukocytes) (ภาพที่ 6A) เปอร์เซ็นต์ของหนูที่พบเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอด แสดงในตารางที่ 5 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดทับทิมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีจำนวนเซลล์เกล็ดปลาน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ 17β-estradiol ที่ความเข้มข้น 0.17 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ทั้งสารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่างกัน (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) สามารถเหนี่ยวนำให้ช่องคลอดเปิดและมีสภาวะเหมาะสมต่อการเป็นสัด จำนวนเซลล์เกล็ดปลาที่พบในช่องคลอดมีจำนวนมากขึ้น (+ ถึง + +) และมากกว่ากลุ่มควบคุม (0 ถึง +) แต่ยังน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ 17β-estradiol ที่ความเข้มข้น 0.17 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว (+ + +) ดังแสดงในตารางที่ 6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 6 เซลล์ช่องคลอดที่ถูกย้อมด้วยเมทิลีนบลูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20 เท่า A=กลุ่มหนูตัดรังไข่; B =ฉีด 17β-estradiol (0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); C = ฉีด 17β-estradiol (0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); D = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); E = ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); F = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว); G = ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม (1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว)

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัดทับทิมต่อเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอดหนูตัดรังไข่

กลุ่ม	จำนวน (ตัว)	การทดลอง	% หนูที่พบเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอด					
			สัปดาห์ 2	สัปดาห์ 3	สัปดาห์ 4	สัปดาห์ 5	สัปดาห์ 6	สัปดาห์ 7
2	5	หนูตัดรังไข่ 10% v/v Tween 80	0	0	0	0	0	0
3	5	ฉีด 17β-estradiol 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	100%	100%	100%	100%	100%	100%
4	5	ฉีด 17β-estradiol 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	100%	100%	100%	100%	100%	100%
5	5	ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	80%	40%	40%	40%	40%	20%
6	5	ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	100%	80%	80%	80%	80%	60%
7	5	ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	40%	20%	20%	40%	20%	20%
8	5	ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	80%	80%	40%	40%	40%	20%

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 6 ฤทธิ์การเป็น Estrogenic ของสารสกัดทับทิม

กลุ่ม	จำนวน (ตัว)	การทดลอง	เซลล์เกล็ดปลา
2	5	หนูตัดรังไข่ 10% v/v Tween 80	Vagina not open
3	5	ฉีด 17β-estradiol 0.17 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ + +
4	5	ฉีด 17β-estradiol 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ + +
5	5	ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ ถึง + +
6	5	ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ ถึง + +
7	5	ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ ถึง + +
8	5	ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว	+ ถึง + +

0 = ไม่ปรากฏเซลล์ใดๆ, + = พบ nucleated epithelial cells, ++ = นิวเคลียส และ เซลล์เกล็ดปลา, +++ = เซลล์เกล็ดปลาเท่านั้น

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ระดับฮอร์โมนในเลือด

จากการศึกษาพบว่าเมื่อฉีด 17β-estradiol (0.17 และ 0.70 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ให้แก่หนูตัดรังไข่จะทำให้ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในซีรั่มของหนูเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (245 ± 69.07 และ 262.31 ± 72.57 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated และหนูตัดรังไข่ในกลุ่มควบคุม (73.62 ± 13.58 และ 59.88 ± 10.42 พิโครกรัมต่อมิลลิลิตร) สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมปริมาตร 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์เพิ่มปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนในหนู Sham operated ($P<0.05$) นอกจากนี้สารสกัดดังกล่าวยังมีฤทธิ์ไปเพิ่มปริมาณฮอร์โมน LH ในซีรั่มอีกด้วย แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลของสารสกัดทับทิมต่อปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (E_2) และ LH

กลุ่ม	เอสโตรเจน (pg/ml)	Luteinizing hormone (LH) (mIU/ml)
Sham operated	73.62 ± 13.58	0.07 ± 0.00
หนูตัดรังไข่ควบคุม	59.88 ± 10.42	0.69 ± 0.33[a]
ฉีด 17β-estradiol 0.17 มก./กก. น้ำหนักตัว	245.45 ± 69.07[a]	0.07 ± 0.00
ฉีด 17β-estradiol 0.7 มก./กก. น้ำหนักตัว	262.31 ± 72.57[a]	0.07 ± 0.00
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 100 มก./กก. น้ำหนักตัว	61.65 ± 7.45	0.84 ± 0.87[a]
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว	117.28 ± 50.33[a]	1.58 ± 1.69[a]
ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 100 มก./กก. น้ำหนักตัว	88.05 ± 9.94	0.28 ± 0.25[a]
ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว	136.48 ± 41.87[a]	0.44 ± 0.35[a]

[a] $P< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ [b] $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม

ระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

ผลการศึกษาพบว่าระดับคอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) ในเลือดของหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกับระดับคอเลสเตอรอลรวมในหนู Sham operated แต่เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ที่ได้รับการฉีด 17β-estradiol (0.17 แล 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าระดับคอเลสเตอรอลในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำผลการตรวจระดับคอเลสเตอรอลของหนู Sham operated กับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมไปเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับสารสกัดเมล็ด (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) และเปลือกทับทิม (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าไม่แตกต่างกัน

ผลการศึกษาทางคลินิกแสดงให้เห็นว่าเอสโตรเจนมีฤทธิ์ไปลดปริมาณคอเลสเตอรอลรวม โดยที่ปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (Low Density Lipoprotein) จะลดลงแต่ปริมาณคอเลสเตอรอลชนิดดี (High Density Lipoprotein) จะเพิ่มขึ้น (Selzman, 1997) จากตารางที่ 8 จะเห็นว่าระดับ คอเลสเตอรอลชนิดดีในเลือดหนูตัดรังไข่เพิ่มขึ้นและเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในหนูตัดรังไข่ที่ถูกฉีดด้วย 17β-estradiol (0.17 แล 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากทับทิมพบว่าประมาณคอเลสเตอรอลชนิดดีเพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated และหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาระดับของคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดีในเลือดพบว่า ในเลือดหนูตัดรังไข่ระดับคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated นำผลการตรวจดังกล่าวของหนู Sham operated และหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17β-estradiol (0.17 และ 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าระดับ คอเลสเตอรอลชนิดไม่ดีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน แต่ในกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากทับทิม (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าระดับของคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดีจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated

นอกจากระดับของคอเลสเตอรอลแล้วคณะผู้วิจัยยังได้ศึกษาถึงระดับของไตรกลีเซอไรด์ (Triglyceride) ในเลือดหนูอีกด้วย พบว่าระดับไตรกลีเซอไรด์ของหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated แต่ในกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ได้รับการฉีด 17β-estradiol (0.17 แล 0.7 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าระดับไตรกลีเซอไรด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนู Sham operated และหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม ส่วนในกลุ่มหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิม (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) พบว่าปริมาณไตรกลีเซอไรด์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม

ตารางที่ 8 ผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับของคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนู

กลุ่ม	ชนิดของไขมัน (mg/dL)			
	คอเลสเตอรอลรวม	คอเรสเตอรอลดี	คอเลสเตอรอลไม่ดี	ไตรกลีเซอไรด์
Sham operated	92 ± 8.09	66.17 ± 5.89	9.33 ± 0.95	127.67 ± 8.90
หนูตัดรังไข่ควบคุม	96.83 ± 3.47	67.67 ± 2.21	12.17 ± 0.61[a]	144.00 ± 17.08[a]
ฉีด 17β-estradiol 0.17 มก./กก. น้ำหนักตัว	136.50 ± 3.83[ab]	98.50 ± 2.87[ab]	12.00 ± 0.73[a]	116.33 ± 19.12
ฉีด 17β-estradiol 0.7 มก./กก. น้ำหนักตัว	140.33 ± 6.86[ab]	100.83 ± 5.43[ab]	15.00 ± 0.96[ab]	93.83 ± 10.78[ab]
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 100 มก./กก. น้ำหนักตัว	105.69 ± 7.74	73.67 ± 4.57	9.17 ± 0.79	100.50 ± 7.35[ab]
ป้อนสารสกัดเมล็ดทับทิม 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว	118.17 ± 3.58[ab]	85.50 ± 2.66[ab]	8.50 ± 0.24	99.00 ± 6.52[ab]
ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 100 มก./กก. น้ำหนักตัว	103.00 ± 4.52	75.33 ± 3.63	9.00 ± 0.93	111.67 ± 12.98
ป้อนสารสกัดเปลือกทับทิม 1000 มก./กก. น้ำหนักตัว	96.33 ± 8.74	67.33 ± 2.41	7.33 ± 0.71	105.3 ± 15.57

ผลการทดลองแสดงในรูปของค่าเฉลี่ย ± S.E.M; n=6, [a] $P< 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูปกติ, [b] $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่กลุ่มควบคุม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาสารสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากเมล็ดและเปลือกทับทิม 2) ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดในการคุมกำเนิด 3) ศึกษาผลของสารสกัดต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูทดลองเพศเมียที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง 4) ศึกษาผลของสารสกัดต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ผลสรุปมีรายละเอียดเป็นดังนี้

สารสำคัญที่พบในสารสกัดจากทับทิม

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบสารเคมีในเมล็ดและเปลือกทับทิมด้วยวิธี GC/MS พบว่าในเมล็ดทับทิมมีสารเคมีทั้งหมด 30 ชนิด แบ่งออกเป็นสารชนิดที่สามารถระบุชื่อได้ 26 ชนิด และสารที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ 4 ชนิด ในเปลือกทับทิมมีสารเคมีทั้งหมด 16 ชนิด แบ่งออกเป็นสารที่สามารถระบุชื่อได้ 14 ชนิด และสารที่ไม่สามารถระบุชื่อได้ 2 ชนิด ทั้งในส่วนเมล็ดและเปลือกทับทิมมีสารสำคัญไฟโตเอสโตรเจน (Phytoestrogen) ได้แก่ β-Sitosterol โดยในเมล็ดทับทิมจะมีสาร β-Sitosterol คิดเป็น 14.93 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าในเปลือกทับทิมที่มีสาร β-Sitosterol เพียง 7.02 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมในการคุมกำเนิด

ตามรายงานระบุว่าผลิตภัณฑ์อาทิเช่น เมล็ด น้ำ และเปลือกจากทับทิม ไม่เพียงป้องกันการแท้งได้ (Ramirez และคณะ, 1988) สามารถคุมกำเนิดได้ด้วย (Gujral และคณะ, 1960; Jochle, 1971; Zhan, 1995) สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (100 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) มีผลในการป้องกันการฝังตัวของตัวอ่อนต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การศึกษาผลของสารสกัดทับทิมต่อเนื้อเยื่อมดลูก เต้านม และเซลล์ช่องคลอดในหนูที่ตัดรังไข่ทั้ง 2 ข้าง

ทับทิมมีฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนอย่างอ่อน และเป็นที่น่าสนใจว่ามีผลต่ออาการวัยหมดประจำเดือน หนูตัดรังไข่ถูกใช้เป็นรูปแบบในการศึกษาเอสโตรเจนอย่างแพร่หลาย สามารถใช้แทนผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้เพราะมีลักษณะหลายอย่างคล้ายคลึงกัน (Guillermo, 2007) จากการวิเคราะห์ผลทางเนื้อเยื่อวิทยาแสดงให้เห็นว่า สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมมีผลไปเพิ่มน้ำหนักและความหนาโพรงมดลูก สารสกัดเมล็ดทับทิมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์

เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มทั้งขนาดเซลล์และจำนวนของเซลล์เยื่อบุผิว (Hyperplastic epithelium) ที่ช่องคลอด และความหนาของเยื่อบุโพรงมดลูก เมื่อเทียบกับหนูตัดรังไข่

อย่างไรก็ตามสารสกัดจากเมล็ดและเปลือกทับทิมความเข้มข้น 1,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของท่อ interlobular duct แต่ไม่พบการสร้างสารคัดหลั่งระดับของ LH ถูกยับยั้งด้วย E2 (ทั้ง 2 ขนาด) แต่สารสกัดจากทับทิมไม่มีผลต่อระดับ LH

สารสกัดเมล็ดทับทิมยับยั้งการทำงานของ estrogenic ในหนู mice (Junko, 2004) สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมที่ความเข้มข้นต่างกัน (100 และ 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) สามารถเหนี่ยวนำ ให้ช่องคลอดเปิดและมีสภาวะที่เหมาะสมแก่การเป็นสัด เปอร์เซนต์การพบเซลล์เกล็ดปลาเพิ่มมากขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดทับทิมความเข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

การศึกษาผลของสารสกัดทับทิมต่อระดับฮอร์โมนและระดับคอเลสเตอรอลในเลือด

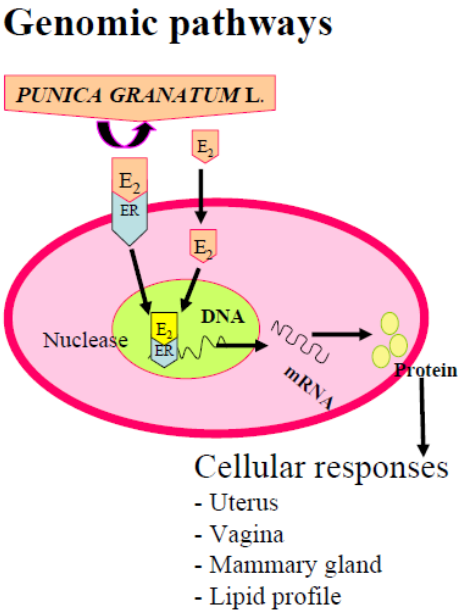
การเปลี่ยนแปลงเมตาบิลิซึมของลิพิด (lipid metabolism) มักจะเห็นหลังวัยหมดประจำเดือนและมีลักษณะโดยเพิ่มคอเลสเตอรอลชนิดไม่ดีและไตรกลีเซอไรด์ ลดคอเลสเตอรอลชนิดดี (Speroff, Rowan, Symons, Genant และ Wilbron, 1996) ผลการเสริมเอสโตรเจนในหนูแรทต่อระดับของไขมันในระบบหมุนเวียนโลหิตได้มีการศึกษากันมายาวนาน (Lundeen, Carver, McKean และ Winneker, 1997). พบว่าทั้งในมนุษย์และในสัตว์ฟันแทะระดับเอสโตรเจนจะลดลงเมื่อระดับของตัวรับ LDL ที่ตับเพิ่มขึ้น เป็นผลให้เกิดการเคลื่อนย้าย cholesterol ออกจากระบบหมุนเวียนโลหิต (Goss, Qi, Hu และ Cheung, 2007). จากภาวะดังกล่าวเป็นผลให้ระดับ LDL ลดลงในมนุษย์ แต่ในหนูกลับพบว่าทั้ง HDL และ LDL นั้นลดลง เป็นเพราะ HDL ในหนูมี apoprotein E ซึ่ง apoprotein E ไม่พบในมนุษย์และคุณสมบัติของ apoprotein E ใน HDL สามารถจับกับตัวรับของ LDL ในตับได้ดีเช่นเดียวกัน ดังนั้นเมื่อมีการให้เอสโตรเจนในหนูระดับของทั้ง HDL และ LDL จะลดลง (Windler และคณะ, 1980). การศึกษาทางสรีรวิทยาของกระบวนการเมทาบอลิซึมของไขมันในหนูอาจจะมีข้อจำกัดดังกล่าวข้างต้น อย่างไรก็ตามเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่าการใช้หนูเพื่อเป็นรูปแบบการศึกษาถึงสารที่มีคุณสมบัติการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนต่อระดับของคลอเลสเตอรอลทั้งหมด และ LDL นั้นมีความเหมาะสมและยอมรับได้ (Rachon, Vortherms, Seidlova-Wuttke และ wuttke, 2008).

สารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมต่อระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ยากที่จะอธิบาย เพราะผลการทดลองที่ได้ตรงข้ามกับทฤษฎี การทดแทนฮอร์โมนเอสโตรเจนด้วยสารสกัดทับทิมไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับไขมัน

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปรูปแบบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดและเปลือกทับทิมได้ว่า เป็นการออกฤทธิ์แบบผ่านยีน

การออกฤทธิ์แบบผ่านยีน (genomic pathway) หมายถึง การให้สารชนิดใดชนิดหนึ่งเข้าไปในสิ่งมีชีวิตแล้ว ส่งผลให้สิ่งมีชีวิตนั้นสามารถแสดงกลไกการตอบสนองได้ในระดับยีน โดยส่วนใหญ่การออกฤทธิ์ในระดับนี้ร่างกายจะใช้เวลานานในการตอบสนอง สำหรับตัวชี้วัดของการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนคือ ระดับของโปรตีน ซึ่งร่างกายจะตอบสนองต่อโปรตีนเหล่านี้ในลักษณะหรือรูปแบบที่แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและกลไกการออกฤทธิ์ของโปรตีนนั้นๆ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดจากทับทิมแสดงการออกฤทธิ์แบบผ่านยีนมีดังนี้: 1) การเพิ่มขึ้นของน้ำหนักมดลูกทั้งในการศึกษาจากภาคตัดขวาง (uterine cross section) 2) การเพิ่มขึ้นของเซลล์เกล็ดปลาในช่องคลอด (vaginal cornification) 3) การพัฒนาที่เพิ่มขึ้นของกระเปาะน้ำนม (alveolar) และท่อนำน้ำนม (tubule) ในเต้านม (mammary gland) 4) ระดับของคลอเลสตอรอลทั้งหมด (total cholesterol) และคลอเลสเตอรอลชนิดไม่ดี (LDL cholesterol) ที่ลดลง และ 5) การต้านการฝังตัวของตัวอ่อน (anti-blastocyst implantation) ดังแสดงในภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดทับทิมแบบผ่านยีน

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากทับทิมมีผลการออกฤทธิ์ที่คล้ายกับเอสโตรเจนและไม่มีผลข้างเคียง จึงเป็นไปได้ว่าพืชสมุนไพรชนิดนี้จะเป็นพืชที่มีคุณประโยชน์ต่อสตรีวัยหมดระดูหรือสตรีที่มีปัญหาเรื่องความผิดปกติของระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้

ข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ทับทิมที่เจริญเติบโตในประเทศไทยมีผลการเป็นเอสโตรเจน อย่างไรก็ตามการทดลองนี้ศึกษาในสัตว์ทดลองเท่านั้น ในอนาคตหากนำมาศึกษาในมนุษย์จะมีประโยชน์และเป็นที่น่าสนใจอย่างมาก

บรรณานุกรม

1. นันทวัน บุญยะประภัศร, อรนุช โชคชัยเจริญพร. สมุนไพรพื้นบ้าน เล่ม 2. กรุงเทพมหานคร: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศูนย์พันธุวิศวกรรม และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ, บริษัท ประชาชน จำกัด, 2541
2. Abd El Wahab SM, El Fiki NM, Mostafa F, Hassan AEB. Characterization of certain steroid hormones in Punica granatum L.seeds. Bulletin of the Faculty Pharmacy (Cairo University) 1998 ; 36 : 11-15.
3. Anon. Studies on the toxic effects of certain burn escharotic herbs. Chung-Hua I Husch Tsa Chih (New Ser) 1978 ; 4 : 388
4. Carraz GLM, Willemot J, Demenge P. Penta-o-galloy-β-glucose useful as hypoglycemic agent. Fr Demande 2, 380, 299, 1978: 11pp.
5. Chauhan D, Chauhan JS. Flavonoid diglycoside from Punica granatum. Pharmaceutical Biology 2001 ; 39 (2) : 155-7.
6. Comai K, Triscari JB, Sullivan AC. Differences between lean and obes Zucker rats : the effect of poorly absorbed dietary lipid on energy intake and body weight again. J Nutr 1978 ; 108 (5) : 856-35.
7. Daz AK, Mandas SC, Banerjee SK, Sinha S, Saha Bf, Pal M. Studies on the hypoglycaemic activity of Pinica granatum seed in streptozotocin induced diabetic rats. Phytother Rers 2001 Nov ; 15 (7) : 628-9.
8. Dean PDG, Exlby D, Goodwin TM. Steroid oestrogens in plants:re-estimation of oestrone in pomegranate seeds. Phytochemistry 1971 ; 10 : 2215-6.
9. El-Toumy SA, Rauwald HW. Two ellagitannins from Punica granatum heartwood. Phytochemistry 2002; 61 : 971-4.
10. Goss, P. E., Qi, S., Hu, H. and Cheung, A. M. (2007). The effects of atamestane and toremifene alone and in combination compared with letrozole on bone, serum lipid and the uterus in an ovariectomized rat model. **Breast Cancer Research and Treatment**. 103: 293-302.
11. Guillermo, R., Julie, C., Dana, S. W., Hubertus, J., and Wolfgang, W. (2007). Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. Environmental Health Perspectives. 115: 62-68.

12. Gujral, M. L., Varma, D. R., and Sareen, K. N. (1960). Oral contraceptives. Part1. Preliminary observations on the antifertility effect of some indigenous drug. Indian Journal of Medical Research. 48: 46-51.
13. Gupta, S. (1978). Sampling and test of significance. IN : Gupta S, editor. Statistical Methods. New Delhi: Sultan Chand and Sons. 58-76.
14. Heftmann E, Ko ST, Bennett RD. Response of steroids to sulfuric acid in thin-layer chromatography. Phytochemistry 1966 ; 5 : 1337-9.
15. Jochle, W. (1971). Biology and pathology of reproduction in Greek mythology. Contraception. 4: 13.
16. Junko, M.O., Yoko, O. H., Hideyuki, Y., and Hiroyuki, Y. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. Journal of Ethnopharmacology. 92: 93-101.
17. Kazmi H, Aslan M, Khan Zu, Buremy MI. A report on the trial of a Unani prescription for diabetes. Rawal Med 1974 ; 3 (2) : 67.
18. Khanna, U., and Chaudhary, R. R. (1968). Antifertility screening of plants. Part I. Investigation of *Butea monosperma* (Lam) Kutze. Indian Journal of Medical Research. 56: 1575-1579.
19. Lau AJ, Holmes MJ, Woo SO. Analysis of adulterants in a traditional herbal medicinal product using liquid chromatography -mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 2003 ; 31 : 401-6.
20. Lundeen, S. G., Carver, J. M., McKean, M. L. and Winneker, R. C. (1997). Characterization of the ovariectomized rat model levels. **Endocrinology**. 138: 1552-1558.
21. Rachon, D., Vortherms, T., Seidlova-Wuttke, D. and Wuttke, W. (2008). Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Maturitas. 60: 209-215.
22. Polyrazoglu E, Gokmen V, Aruk N. Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (Punica granatum L.) grown in Turkey. Journal of Food Composition and Analysis 2002; 15 : 567-75.
23. Ramirez, V. R., et al. (1998). Vegetales empleados en medicina tradicional Norperuana. Banco Agrario del Peru and University of Trujillo, Trujilla, Peru.

24. Selzman, C.H., et al. (1997). Chronic estrogen replacement inhibits aortic intimal hyperplacia in dependent of serum lipids. Cardiac Surgery. 12: 228-34.
25. Singh SP, Lal MB. Toxic effect of Punica granatum fruit skin on the horse sparrow (Passer domestieus Linn.) J Sci Res Plants Med 1980 ; 1 (3-4) : 15-7.
26. Speroff, L., Rowan, J., symmons, J., genant, H. and Wilborn, W. (1996). The comparative effect on bone density, endometrium, and lipid of continuous hormones as replacement therapy (CHART study). A randomized controlled trial. The Journal of The American Medical Association. 276: 1397-1403.
27. Williamson, E. M., Okpako, D.T., and Evan, F. G. (1996). Selection preparation and pharmacological evaluation of plant material. Pharmacological Methods in Phytotherapy Research. 1: 191-212.
28. Windler, E. E., Kovanen, P. T., Chao, Y. S., Brown, M. S., Havel, R. J. and Goldstein, J. L. (1980). The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. The Jouranl of Biological Chemistry. 255: 1046-1047.
29. Zhan, B. (1995). Multifunctional vaginal suppository for contraception. Chinese Patent CN. 1: 103-789.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

สารเคมีที่ใช้เตรียมสารละลาย Physiological Saline Solution

ส่วนประกอบ

	mM		**1 L**
NaCl	154	9	g/L
KCl	5.6	0.42	g/L
$Mg.SO_4.7H_2O$	0.12	0.29	g/L
HEPES	10.9	2.6	g/L
Glucose	8	2.44	g/L
$CaCl_2$	2	2	g/L

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

นางศจีรา คุปพิทยานันท์ ตำแหน่งอาจารย์ เกิดวันเสาร์ที่ 7 มีนาคม พุทธศักราช 2513 ที่อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิตเกียรตินิยม จากมหาวิทยาลัยขอนแก่นในปีพุทธศักราช 2537 จากนั้นได้รับทุนจากบริติสเคาน์ซิลและรัฐบาลไทยให้ไปศึกษาต่อระดับมหาบัณฑิตและดุษฎีบัณฑิตในสาขาสรีรวิทยา ที่มหาวิทยาลัยลิเวอร์พูล ประเทศอังกฤษ สำเร็จการศึกษาในปีพุทธศักราช 2546 ขณะกำลังศึกษา ณ สถานศึกษาดังกล่าวได้รับทุนนักสรีรวิทยารุ่นเยาว์ (Young Physiologist) จากมหาวิทยาลัยฯ เพื่อนำเสนอผลงานวิจัย ปีละ 1,000 ปอนด์ตลอดระยะเวลาการศึกษา ปัจจุบันปฏิบัติงานที่ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา รหัสไปรษณีย์ 30000 มีประสบการณ์ในการวิจัยและผลงานทางวิชาการทางด้านสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ที่ได้รับการตีพิมพ์ในช่วงปี 2543-2554 ผลงานฉบับเต็มในวารสารนานาชาติจำนวน 16 เรื่อง วารสารไทยจำนวน 3 เรื่อง และบทคัดย่อในวารสารระดับชาติ 5 เรื่องและวารสารระดับนานาชาติจำนวน 14 เรื่อง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี