ผลของอีควอลต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และเมแทบอลิซึมของไขมันในตับในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้

Effect of Equol on Growth of Reproductive and Accessory Reproductive Organs and Hepatic Lipid Metabolism in Adult Male Rats

มัลลิกา สระศรี[1], ประยุกต์ ศรีวิไล[2], พนิดา เล้าชาญวุฒิ[3*]

Mallika Srasri[1], Prayook Srivilai[2], Panida Loutchanwoot[3*]

Received: 15 June 2014; Accepted: 30 September 2014

บทคัดย่อ

อีควอลเป็นสารเมแทบอไลท์หลักของดาอิดเซอินซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนชนิดหลักที่พบปริมาณมากในถั่วเหลืองและสามารถออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน จากงานวิจัยล่าสุดพบว่าอีควอลยังสามารถออกฤทธิ์ต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความเป็นพิษของอีควอลต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจน และเมแทบอลิซึมของไขมันในตับในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ โดยแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มหลัก กลุ่มละ 12 ตัวและให้สารทดสอบโดยการป้อนทางปากเข้าสู่กระเพาะอาหารโดยตรงเป็นเวลา 5 วัน กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำมันมะกอกซึ่งเป็นสารตัวพา (1 มล./ตัว/วัน) กลุ่มที่ 2 ได้รับอีควอล (0.25 2.5 30 100 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน) กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (0.6 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน) และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับฟลูตาไมด์ซึ่งเป็นสารต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน (100 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน) เมื่อสิ้นสุดการวิจัย การุณยฆาตหนูทดลอง ชั่งน้ำหนักสดของอัณฑะ เซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส วาสเดเฟอเรนส์ ตับ และไต นำซีรั่มมาตรวจวัดระดับไขมันโดยใช้เทคนิค Enzymatic colorimetric assay ผลการวิจัยพบว่าการให้หนูได้รับอีควอลไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกายและการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว หนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลที่ขนาด 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน มีน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออลและฟลูตาไมด์ หนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลที่ขนาด 100 และ 250 มก./กก.น้ำหนักตัว/วันมีระดับคอเลสเตอรอลรวม คอเลสเตอรอลชนิดไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำและสูงในซีรั่มลดลง และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลระดับสูงสุดเท่านั้นที่มีระดับไตรกลีเซอไรด์และอัตราส่วนระหว่างคอเลสเตอรวลรวมต่อคอเลสเตอรอลชนิดไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนฟลูตาไมด์ให้ผลตรงกันข้าม ดังนั้นอีควอลน่าจะออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือต้านฮอร์โมนแอนโดรเจนต่อการเจริญเติบโตของเซมินัล เวสิเคิล แต่น่าจะออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อเมแทบอลิซึมของไขมันในตับในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้

คำสำคัญ: ไอโซฟลาโวนในถั่วเหลือง อัณฑะ ต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส เซมินัล เวสิเคิล ไขมัน

Abstract

Equol is the major metabolite of daidzein, the major isoflavone found abundantly in soybeans. It is well known that equol exerts estrogenic effects. Recent studies have found that equol may also exert anti-androgeic action. This research was conducted to evaluate the biological mechanisms of action and toxicity of equol on growth of reproductive

---

[1] *นิสิตปริญญาโท, [2,3]ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ตำบลขามเรียง อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150*

[1] *Master degree student, [2,3]Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Khamriang Sub-district, Kantharawichai District, Mahasarakham Province 44150, Thailand*

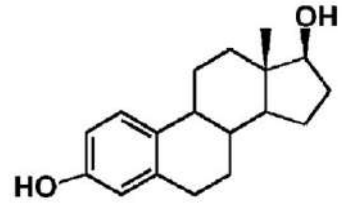
* *Corresponding Author: Panida Loutchanwoot , Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Mahasarakham Province 44150, Thailand. E-mail address: panida.l@msu.ac.th Alternate E-mail address: oupanida@hotmail.com*

and androgen-dependent accessory reproductive organs, and hepatic lipid metabolic parameters in adult male rats. Male rats were divided by randomization into four major groups (*n* = 12/group) and treated orally *via* gavage with test compounds for 5 consecutive days, i.e., In group 1, the vehicle control-group received olive oil (1 ml/rat/day); In group 2, the treatment groups received equol at various concentrations of 0.25, 2.5, 30, 100 and 250 mg/kg body weight (BW)/day; In group 3, the positive estrogenic control group received estradiol valerate at the effective dose of 0.6 mg/kg BW/day, and In group 4, the positive anti-androgenic control group received flutamide at the reference dose of 100 mg/kg BW/day. At the end of treatment interval, animals were sacrificed, and testes, seminal vesicles, prostates, epididymides, vasa deferentia, livers and kidneys were immediately weighed. Serum levels of lipid metabolic parameters were measured by enzymatic colorimetric assay. The results showed that sub-acute administration of equol to male rats did not affect body weight change and no treatment-related toxicity was observed. Relative weights of seminal vesicles were significantly decreased in the rats treated with 250 mg/kg BW/day, as well as estradiol- and flutamide-treated rats. Serum levels of total cholesterol, high- and low-density lipoprotein cholesterols were significantly decreased in rats given 100 and 250 mg equol/kg BW/day treatments, but plasma levels of triglycerides and the ratio of total cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol were significantly reduced only in the rats treated with equol at the highest dose, whereas those in the flutamide-treated group the opposite effects were observed. Taken together, our data revealed for the first time that in adult male rats equol may exert estrogenic- and/or antiandrogenic action on growth of seminal vesicles. However, with estrogenic action being the most likely explanation for the effect of equol on hepatic lipid metabolism.

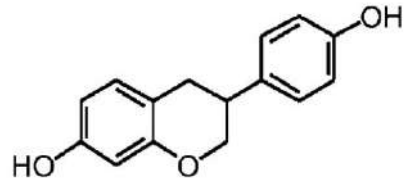
Keywords: soy isoflavone, testis, seminal vesicles, prostate, epididymis, serum lipids

บทนำ

อีควอล (equol; EQ) เป็นสารเมแทบอไลท์ชนิดหลักที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งได้จากการทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ภายในลำไส้ในการย่อยดาอิดเซอิน (daidzein)[1,2] ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวน (isoflavone) ชนิดหลักที่พบปริมาณมากในถั่วเหลือง อีควอลมีโครงสร้างโมเลกุลคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยเฉพาะชนิด 17 บีตา-เอสตราไดออล (17β-estradiol; E2)[3,4] (Figure 1) และสามารถเข้าจับกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen receptor; ER) ได้ทั้งชนิดบีตา (ERβ) และอัลฟา (ERα)[5,6,7,8] โดยสามารถจับกับ ERβ ได้ดีกว่า ERα แต่มีประสิทธิภาพในการจับน้อยกว่าฮอร์โมนเอสตราไดออล[7] และจากการศึกษาในสภาวะร่างกาย (*in vivo*) พบว่าอีควอลสามารถออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนได้อย่างอ่อน โดยมีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของมดลูกซึ่งเป็นอวัยวะหลักที่ตอบสนองต่อฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจนทั้งในหนูแรทและหนูเมาส์ที่ตัดรังไข่[9,10]



17β-Estradiol



Equol

Figure 1 The structural similarities of equol and 17β-estradiol. Both structures posses the phenolic and hydroxyl moieties and the distances between two groups in each compound are similar.[7]

แต่สิ่งที่น่าสนใจ คือ ปัจจุบันพบว่า อีควอลสามารถออกฤทธิ์ต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน โดยเข้าจับอย่างจำเพาะเจาะจงกับฮอร์โมนไดไฮโดรเทสโทสเทอโรน (5α-dihydrotestosterone; DHT)[11] และตัวรับฮอร์โมนแอนโดรเจน (androgen receptor; AR)[5] จากการศึกษาในสภาวะนอกร่างกาย พบว่า อีควอลสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ของเซลล์สายพันธุ์มะเร็งต่อมลูกหมาก (lymph-node carcinoma of the prostate cell; LNCap cell)[12] และเซลล์สายพันธุ์มะเร็งเยื่อบุต่อมลูกหมากของ มนุษย์ (benign human prostatic epithelial cell)[13,14] และยังลดระดับสารบ่งชี้มะเร็งต่อมลูกหมาก (prostate-specific antigen) ที่สร้างมาจากเซลล์ LNCap ภายใต้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมน DHT[12] นอกจากนี้จากการศึกษาในสภาวะร่างกายพบว่าอีควอลมีผลทำให้น้ำหนักของต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส[11,12] และเซมินัล เวสิเคิล[15,16] ของหนูแรกลดลง ซึ่งอวัยวะเหล่านี้เป็นอวัยวะที่ตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างจำเพาะ (androgen-dependent organ)

จากกลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าอีควอลสามารถออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน[11,12] และคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน[15,16] ประกอบกับการประเมินฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของอีควอลในสภาวะร่างกายยังมีอยู่น้อยมาก และงานวิจัยที่ผ่านมาไม่มีการใช้กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและต้านฤทธิ์ฮอร์โมน แอนโดรเจนประกอบควบคู่กัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษและประเมินฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไปได้ของอีควอลต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจน และเมแทบอลิซึมของไขมันในตับในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ โดยใช้ฟลูตาไมด์ (flutamide; FLUT) เป็นสารอ้างอิงที่ออกฤทธิ์ต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างแท้จริง และนิยมนำมาใช้ ในการรักษามะเร็งต่อมลูกหมากของมนุษย์[17,18] และฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (estradiol valerate; E2-V) เป็นสารอ้างอิงที่ออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบในการแพทย์ทางเลือกเพื่อนำเอาอีควอลไปใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคหรืออาการความผิดปกติที่เกิดจากฮอร์โมนแอนโดรเจนและพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในเพศชาย

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

อีควอล (3,4-dihydro-3-(4-hydroxyphenyl)-2H-1-benzopyran-7-ol; $C_{15}H_{14}O_3$; CAS-number 531-95-3) บริษัท Changzhou Dahua Imp. & Exp. Group ประเทศจีน

เอสตราไดออล วาลีเรท (1,3,5(10)-estratriene-3,17β-diol 17-pentanote; $C_{23}H_{32}O_3$; CAS-number 979-32-8) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี

ฟลูตาไมด์ (2-methyl-N-[4'-nitro-3'-(trifluoro-methyl) phenyl] propanamide; $C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$; CAS-number 13311-84-7) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี

น้ำมันมะกอกบริสุทธิ์ (extra virgin olive oil) บริษัท SOS Cuetara ประเทศสเปน

สัตว์ทดลองที่ใช้และการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

หนูแรท (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Sprague-Dawley ชนิด outbred เพศผู้ อายุ 3 เดือน (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม) มาเลี้ยงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ก่อนเริ่มการทดลองเพื่อให้ร่างกายของหนูปรับสภาพ โดยเลี้ยงภายใต้สภาวะห้องเลี้ยงหนูทดลองตามมาตรฐานสากล (ช่วงเวลาการได้รับแสงสว่างในแต่ละวัน 12 ชั่วโมง อุณหภูมิห้อง 23-25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50-55 เปอร์เซ็นต์ อัตราการระบายอากาศภายในห้อง 15 ครั้งต่อชั่วโมง) โดยให้หนูได้รับอาหาร ชนิดพิเศษที่ปราศจากถั่วเหลืองเจือปน (บริษัท Ssniff Spezialdiäten GmbH ประเทศเยอรมนี) และน้ำกลั่นแบบให้กินเต็มที่ตามความต้องการของร่างกาย (ad libitum) ในทุกขั้นตอนของการวิจัยกับหนูทดลองได้ทำตามระเบียบวิธีวิจัยมาตรฐานสากลที่เป็นที่ยอมรับขององค์กรนานาชาติ [Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) Guidelines for the Testing of Chemicals และ The Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) protocols screening the anti-androgenic compounds] โดยได้รับการพิจารณาและให้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยมหาสารคามและอนุมัติในแง่จริยธรรมให้ดำเนินการศึกษาวิจัย (เลขที่ 0019/2554)

การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองและวิธีการให้สารทดสอบ

นำหนูทดลองทุกตัวมาชั่งน้ำหนักและจัดกลุ่มโดยการสุ่มให้ทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยแบ่งหนูทดลองออกเป็น 4 กลุ่มหลัก กลุ่มละ 12 ตัว ดังนี้ คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา (control) ได้แก่ น้ำมันมะกอก กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองที่ได้รับสารทดสอบ ได้แก่ อีควอลที่ขนาดการให้ต่อครั้งต่อวันต่างๆ กัน ได้แก่ 0.25 (EQ 0.25) 2.5 (EQ 2.5) 30 (EQ 30) 100 (EQ 100) และ 250 (EQ 250) มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน (มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน) (mg/kg BW/day) กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน (positive estrogenic control group) โดยได้รับฮอร์โมน

เอสตราไดออล วาลีเรท (E2-V) ขนาด 0.6 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน (positive antiandrogenic control group) โดยได้รับฟลูตาไมด์ (FLUT) ขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน โดยหนูทุกกลุ่มได้รับสารโดยการป้อนทางปากเข้าสู่กระเพาะอาหารโดยตรง (orogastric administration) วันละ 1 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Loutchanwoot และคณะ (2013; 2014)[15,16] ยกเว้นหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 และ 2.5 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันได้รับสารทดสอบโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) วันละ 0.5 มิลลิลิตร ตามวิธีการของ Lund และคณะ (2004)[11] เป็นระยะเวลาติดต่อกัน 5 วัน บันทึกน้ำหนักตัวหนูและน้ำหนักอาหาร และตรวจดูอาการความผิดปกติต่างๆ ทางคลินิกทุกวันตลอดระยะเวลาการทดสอบ

การฆ่าสัตว์ทดลองและเก็บอวัยวะเป้าหมาย

6 ชั่วโมงภายหลังจากการให้สารทดสอบในวันสุดท้าย การุณยฆาตหนูทดลองโดยทำให้สลบ ด้วยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ตัดคอ เก็บเลือดจากลำตัว ผ่าเปิดท้องและตัดเก็บอัณฑะ เซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส วาส เดเฟอเรนส์ ตับและไต โดยตัดแยกเนื้อเยื่อไขมันออกให้หมด และนำไปชั่งน้ำหนักสดภายหลังการตัดแยกทันที โดยใช้เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (บริษัท Sartorius ประเทศเยอรมนี)

การวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับ เมแทบอลิซึมของไขมันในซีรั่ม

นำตัวอย่างเลือดจากส่วนลำตัวมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกซีรั่มด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว รอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำซีรั่มมาวิเคราะห์ระดับไขมันโดยเทคนิค Enzymatic colorimetic assay ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติทางเคมีคลีนิก รุ่น Urit-8030 (ประเทศจีน) ใช้ชุดน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Class-1 laboratories & research จำกัด (ประเทศไทย)

ปัจจัยตรวจสอบ

น้ำหนักตัวเริ่มต้นและน้ำหนักตัวสุดท้ายของหนูเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

อัตราการกินอาหาร (กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ เซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมากทั้งส่วนบนร่วมข้าง (dorsolateral) และส่วนล่าง (ventral) อีพิดิไดมิส วาส เดเฟอเรนส์ ตับ และไต

ค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในซีรั่ม ได้แก่ คอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol; TC) ไตรกลีเซอไรด์ (triglycerides; TG) คอเลสเตอรอลชนิดไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นสูง (high-density lipoprotein cholesterol; HDL-C) และคอเลสเตอรอลชนิดไลโพโปรตีนที่มีความหนาแน่นต่ำ (low-density lipoprotein cholesterol; LDL-C) อัตราส่วนระหว่าง TC ต่อ HDL-C (TC/HDL-C) และอัตราส่วนระหว่าง LDL-C ต่อ HDL-C (LDL-C/HDL-C)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าของข้อมูลที่ได้อยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลที่ได้จากทุกกลุ่มทดลอง ทำโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี One-way ANOVA และทำการทดสอบหลังการวิเคราะห์โดยวิธีการเปรียบเทียบพหุคูณโดยใช้วิธี Dunnett's post test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism (version 5.0) (บริษัท GraphPad Software ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถ้าค่า *P* น้อยกว่า 0.05 และ 0.01 แสดงว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ผลการศึกษา

น้ำหนักตัวและอัตราการกินอาหาร

จากผลการวิจัยพบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวเริ่มต้นและน้ำหนักตัวสุดท้ายของหนูทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) โดยมีน้ำหนักตัวเริ่มต้นเฉลี่ยเท่ากับ 426.29 ± 10.10 กรัม และน้ำหนักตัวสุดท้ายเฉลี่ยเท่ากับ 421.39 ± 10.70 กรัม (Table 1) และหนูในแต่ละกลุ่มทดลองมีน้ำหนักตัวสุดท้ายเฉลี่ยไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table 1)

เมื่อพิจารณาอัตราการกินอาหารโดยเฉลี่ย (กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน) ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีอัตราการกินอาหารโดยเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 78.81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่า อัตราการกินอาหารโดยเฉลี่ยของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 (p<0.01) 2.5 (p<0.01) 30 (p<0.05) และ 100 (p<0.05) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน แตกต่างจาก หนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 2.5 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน มีอัตราการกินอาหารโดยเฉลี่ยแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

Table 1 Mean initial and final body weights and average daily food intake of adult male rats treated orally *via* gavage with equol, estradiol and flutamide for 5 consecutive days.

Treatment	Dosage (mg/kg BW/day)	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/kg BW/day)
Control	1 ml/rat/day	426.1 ± 10.1	429.2 ± 10.7	0.151 ± 0.005
EQ-0.25	0.25	429.7 ± 11.3	428.2 ± 11.4	0.200 ± 0.020$^{\#\#}$
EQ-2.5	2.5	425.0 ± 11.1	424.4 ± 10.1	0.195 ± 0.010$^{+\#\#}$
EQ-30	30	424.3 ± 12.7	421.0 ± 12.9	0.169 ± 0.011$^{\#}$
EQ-100	100	424.5 ± 12.7	420.2 ± 13.3	0.164 ± 0.006$^{\#}$
EQ-250	250	425.2 ± 14.5	417.2 ± 14.5	0.152 ± 0.005
E2-V	0.6	430.4 ± 8.0	419.9 ± 8.4	0.150 ± 0.016
FLUT	100	425.1 ± 14.5	411.0 ± 14.2	0.119 ± 0.013*

Data represent means ± S.E.M. (n=12/group); *p<0.05 *versus* Control; ^{+}p<0.05 *versus* E2-V; $^{\#}p$<0.05 *versus* FLUT; $^{\#\#}p$<0.01 *versus* FLUT

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ (relative wet weight) ของอวัยวะเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มหนูที่ได้รับฮอร์โมน เอสตราไดออล วาลีเรท และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิล

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 76.90 70.30 และ 37.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลของหนูที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 2.5 30 และ 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนล่าง

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมาก ส่วนล่างของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับ สารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนล่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ) (Table 2) โดยมีค่าลดต่ำลง คิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 75.00 และ 53.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับและเมื่อเปรียบเทียบกับหนู

Table 2 Relative wet weights of reproductive and accessory organs, liver, and kidney of adult male rats treated *via* orogastric gavage with equol, estradiol and flutamide for 5 consecutive days.

Treatment	Dosage (mg/kg BW/day)	Testes	Ventral prostate	Dorsolateral prostate	Epididymides	Seminal vesicles	Vas deferentia	Liver	Kidney
Control	1 ml/rat/day	0.883 ± 0.014	0.096 ± 0.010	0.109 ± 0.008	0.257 ± 0.006	0.303 ± 0.013	0.040 ± 0.003	3.206 ± 0.046	0.700 ± 0.008
EQ 0.25	0.25	0.872 ± 0.023	0.092 ± 0.008$^{\#\#}$	0.101 ± 0.002$^{*\#\#}$	0.246 ± 0.008$^{\#\#}$	0.302 ± 0.005$^{++\#\#}$	0.039 ± 0.001$^{\#\#}$	3.599 ± 0.055$^{\#\#}$	0.704 ± 0.014$^{\#}$
EQ 2.5	2.5	0.869 ± 0.012	0.083 ± 0.005$^{\#\#}$	0.094 ± 0.006$^{\#\#}$	0.250 ± 0.005$^{\#\#}$	0.289 ± 0.018$^{++\#\#}$	0.037 ± 0.001$^{\#\#}$	3.537 ± 0.084$^{\#\#}$	0.711 ± 0.017
EQ 30	30	0.867 ± 0.027	0.092 ± 0.006$^{\#\#}$	0.095 ± 0.006$^{\#\#}$	0.258 ± 0.010$^{\#\#}$	0.292 ± 0.011$^{++\#\#}$	0.040 ± 0.001$^{\#\#}$	3.573 ± 0.076$^{**\#\#}$	0.721 ± 0.008
EQ 100	100	0.876 ± 0.014	0.082 ± 0.008$^{\#}$	0.099 ± 0.005$^{\#\#}$	0.258 ± 0.008$^{\#\#}$	0.276 ± 0.012$^{++\#\#}$	0.040 ± 0.001$^{\#\#}$	3.618 ± 0.072$^{**\#\#}$	0.739 ± 0.016*
EQ 250	250	0.844 ± 0.013	0.076 ± 0.009$^{\#}$	0.090 ± 0.006$^{\#}$	0.242 ± 0.004$^{\#\#}$	0.233 ± 0.013$^{**\#\#}$	0.038 ± 0.002$^{\#\#}$	4.241 ± 0.083^{**++}	0.754 ± 0.019*
E2-V	0.6	0.875 ± 0.009	0.072 ± 0.006$^{\#}$	0.085 ± 0.006*	0.249 ± 0.005$^{\#\#}$	0.213 ± 0.014$^{**\#\#}$	0.035 ± 0.001	3.498 ± 0.081$^{*\#\#}$	0.737 ± 0.017
FLUT	100	0.867 ± 0.016	0.051 ± 0.005**	0.070 ± 0.005**	0.190 ± 0.006**	0.113 ± 0.005**	0.033 ± 0.001*	4.472 ± 0.106**	0.757 ± 0.016*

Data represent means ± S.E.M. (n=12/group); $^{*}p<0.05$ *versus* Control; $^{**}p<0.01$ *versus* Control; $^{+}p<0.05$ *versus* E2-V; $^{++}p<0.01$ *versus* E2-V; $^{\#}p<0.05$ *versus* FLUT; $^{\#\#}p<0.01$ *versus* FLUT

กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนล่างของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 (p<0.01) 2.5 (p<0.01) 30 (p<0.01) 100 (p<0.05) และ 250 (p<0.05) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนล่างของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 30 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออลวาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้าง

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วน บนร่วมข้างของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05 และ p<0.01 ตามลำดับ) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 77.98 และ 64.22 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 (p<0.01) 2.5 (p<0.01) 30 (p<0.01) 100 (p<0.01) และ 250 (p<0.05) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอีพิดิไดมิส

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอีพิดิไดมิสของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอีพิดิไดมิสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 73.93 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ย

ของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอีพิดิไดมิสของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) แต่ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p>0.05) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 82.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 30 และ 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับ

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 30 (p<0.01) 100 (p<0.01) และ 250 (p<0.01) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน หนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.05) และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์ (p<0.01) โดยมีค่าเพิ่มสูงขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 111.45 112.85 132.28 109.11 และ 139.49 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 2.5 30 และ 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) (Table 2)

น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไต

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไตของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 105.57 107.71 และ 108.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของ ไตแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไตของหนูที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table 2)

การเปลี่ยนแปลงค่าทางชีวเคมีที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในซีรั่ม

ระดับ TC ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของระดับ TC ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ TC มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 (p<0.05) และ 250 (p<0.01) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.01) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 66.67 58.62 และ 61.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม หนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของระดับ TC เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 148.43 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ TC ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) และค่าเฉลี่ยของระดับ TC ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 (p<0.05) 2.5 (p<0.01) และ 30 (p<0.05) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 3)

ระดับ LDL-C ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของระดับ LDL-C ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ LDL-C มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 (p<0.05) และ 250 (p<0.01) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.01) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 62.16 56.97 และ 58.00 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม หนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของระดับ LDL-C เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 136.58 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ LDL-C ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) แต่ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p>0.05) (Table 3)

ระดับ HDL-C ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของระดับ HDL-C ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ HDL-C ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.05) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 65.81 60.62 และ 61.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในทางตรงกันข้าม หนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีค่าเฉลี่ยของระดับ HDL-C เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเพิ่มขึ้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 135.75 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับของหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ HDL-C ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 30 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของระดับ HDL-C แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมน เอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.05) (Table 3)

Table 3 Serum levels of total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) triglycerides (TG) and the ratios of TC/HDL-C and LDL-C/HDL-C in adult male rats treated orally *via* gavage with equol, estradiol and flutamide for 5 consecutive days.

Treatment	Dosage (mg/kg BW/day)	TC (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	TG (mg/dl)	TC/HDL-C ratio	LDL-C/HDL-C ratio
Control	1 ml/rat/day	130.50 ± 14.36	80.17 ± 10.63	32.17 ± 4.40	244.00 ± 32.75	4.13 ± 0.12	2.50 ± 0.07
EQ 0.25	0.25	115.00 ± 4.41$^{+\#\#}$	63.17 ± 2.44$^{\#\#}$	26.50 ± 0.56$^{\#\#}$	164.50 ± 23.90	4.44 ± 0.03^{++}	2.44 ± 0.02^{++}
EQ 2.5	2.5	120.00 ± 4.92$^{++\#\#}$	67.17 ± 2.51$^{\#\#}$	26.50 ± 0.92$^{\#\#}$	189.17 ± 6.49	4.53 ± 0.08^{++}	2.56 ± 0.01^{++}
EQ 30	30	112.70 ± 13.57$^{+\#\#}$	63.80 ± 8.58$^{\#\#}$	29.67 ± 4.19$^{+\#\#}$	211.30 ± 15.99	3.85 ± 0.16$^{\#}$	2.41 ± 0.09^{+}
EQ 100	100	87.00 ± 7.00$^{\#\#}$	49.83 ± 5.49$^{\#\#}$	21.17 ± 0.87$^{\#\#}$	161.00 ± 18.93	3.78 ± 0.18$^{\#}$	2.22 ± 0.08*
EQ 250	250	76.50 ± 4.55**$^{\#\#}$	45.67 ± 3.38**$^{\#\#}$	19.50 ± 1.46$^{\#\#}$	152.50 ± 11.57*	3.75 ± 0.11$^{\#\#}$	2.18 ± 0.11*
E2-V	0.6	79.83 ± 7.26**$^{\#\#}$	46.50 ± 3.87**$^{\#\#}$	19.67 ± 1.41$^{\#\#}$	217.30 ± 29.91	3.72 ± 0.08$^{\#\#}$	2.16 ± 0.04**$^{\#\#}$
FLUT	100	193.70 ± 4.60**	109.50 ± 7.52*	43.67 ± 1.63*	213.17 ± 40.80	4.46 ± 0.15	2.50 ± 0.10

Data represent means ± S.E.M. (n=12/group); ^{+}p<0.05 *versus* Control; **p<0.01 *versus* Control; ^{+}p<0.05 *versus* E2-V; ^{++}p<0.01 *versus* E2-V; $^{\#}p$<0.05 *versus* FLUT; $^{\#\#}p$<0.01 *versus* FLUT

ระดับ TG ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของระดับ TG ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของระดับ TG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 62.50 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมน เอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของระดับ TG ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากหนูที่ได้รับฟลูตาไมด์และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) (Table 3)

อัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 90.80 และ 90.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 30 (p<0.05) 100 (p<0.05) และ 250 (p<0.01) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันแตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 และ 2.5 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) (Table 3)

อัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C ในซีรั่ม

จากการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C ของหนูทุกกลุ่มกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพา พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 (p<0.05) และ 250 (p<0.05) มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท (p<0.01) โดยมีค่าลดต่ำลงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตัวพาเท่ากับ 88.80 87.20 และ 86.40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและหนูกลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจน พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C ของหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) และหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 0.25 2.5 และ 30 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีค่าเฉลี่ยของอัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01 p<0.01 และ p<0.05 ตามลำดับ) (Table 3)

วิจารณ์และสรุปผล

อีควอลเป็นสารเมแทบอไลท์หลักของดาอิดเซอิน ซึ่งเป็นไอโซฟลาโวนชนิดหลักที่พบปริมาณมากในถั่วเหลือง[1,2] โดยมีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับฮอร์โมนเอสตราไดออลชนิด 17 บีตา และสามารถเข้าจับกับตัวรับของฮอร์โมนเอสโตรเจน[4,7,8] จึงทำให้อีควอลสามารถออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนได้อย่างอ่อนทั้งสภาวะนอกร่างกาย[6,8,19,20] และสภาวะในร่างกาย[9,10] นอกจากนี้อีควอลยังสามารถจับกับ AR[5] และแย่งจับกับฮอร์โมน DHT ทำให้ฮอร์โมน DHT ไม่สามารถจับกับ AR และให้ผลทางสรีรวิทยาได้[11,12] จึงทำให้ในปัจจุบันมีแนวโน้มในการนำอีควอลไปใช้ในการแพทย์ทางเลือกมากขึ้นเพื่อรักษาโรคหรืออาการความผิดปกติอันเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเพศ แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่สามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แน่ชัดของอีควอลในสัตว์เพศผู้ เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวยังขาดการใช้กลุ่มควบคุมที่ให้ผลบวกคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนประกอบควบคู่กัน

งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นพิษและกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไปได้ของอีควอลต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนและเมแทบอลิซึมของไขมันในตับในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ โดยใช้สารอ้างอิงที่ให้ผลบวกเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนและสารต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนประกอบควบคู่กัน โดยประเมินจากน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ เซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส วาส เดเฟอเรนส์ และระดับไขมันในซีรั่ม และทดสอบความเป็นพิษต่อร่างกายโดยประเมินจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว อัตราการกินอาหาร น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับและไต

จากการให้หนูได้รับอีควอลที่ขนาดการให้ต่อครั้งต่อวันต่างๆ กัน เป็นระยะเวลา 5 วัน ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อร่างกาย เนื่องจากค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวสุดท้ายและอัตรา

การกินอาหารไม่เปลี่ยนแปลง และไม่มีการตายหรืออาการความผิดปกติทางคลินิกเกิดขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการให้หนูแรทเพศเมียที่ตัดรังไข่ได้รับอีควอลโดยผสมไปในอาหารที่ปราศจากถั่วเหลืองขนาด 400 มก.ต่อกก.น้ำหนักอาหาร เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการกินอาหารและน้ำหนักตัว[21] ในทางตรงกันข้าม หนูกลุ่มที่ได้รับฟลูตาไมด์มีอัตราการกินอาหารโดยเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Toyoda และคณะ (2000) ซึ่งพบว่าการให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฟลูตาไมด์โดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 4 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 28 วัน ทำให้อัตราการกินอาหารลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[22] เช่นเดียวกันกับการให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฟลูตาไมด์โดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 10 วัน มีผลลดอัตราการกินอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[23] ทั้งนี้เนื่องจากการออกฤทธิ์ต้านฮอร์โมนแอนโดรเจนของฟลูตาไมด์ส่งผลทำให้ความอยากอาหาร (orexigenic activity) ลดลง[24]

จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไปได้ของอีควอลต่อการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์และอวัยวะเกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนในหนูแรทเพศผู้ พบว่าอีควอลขนาดสูงสุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีผลทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ ต่อมลูกหมาก ส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่างและอีพิดิไดมิสลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Loutchanwoot และคณะ (2013; 2014) ซึ่งพบว่าการให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันโดยป้อนเข้าทางปาก เป็นระยะเวลา 5 วันติดต่อกัน ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ ต่อมลูกหมากส่วนล่างและอีพิดิไดมิส[15,16] แต่อีควอลขนาด 0.25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันไม่มีผลลดน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมากส่วนล่างและอีพิดิไดมิส ซึ่งผลที่ได้จากงานวิจัยนี้แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Lund และคณะ (2004)[11] ที่พบว่าการให้หนูแรทเพศผู้ได้รับอีควอลโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่ขนาด 0.25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นเวลาระยะ 4 วัน ทำให้น้ำหนักสดสุทธิของต่อมลูกหมากส่วนล่างและอีพิดิไดมิสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของชนิดของอาหารที่ใช้เลี้ยงหนูทดลอง โดยในการวิจัยครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงหนูชนิดพิเศษที่ปราศจากถั่วเหลืองเจือปน ดังนั้นผลการศึกษาที่ได้จึงเป็นผลที่เกิดขึ้นจากฤทธิ์ของอีควอลอย่างแท้จริงมิใช่เป็นผลที่เกี่ยวเนื่องกับการออกฤทธิ์ของไอโซฟลาโวนส์ชนิดอื่นที่พบในถั่วเหลืองและปนเปื้อนอยู่ในอาหารเลี้ยงหนู ได้แก่ เจนิสเทอิน (genistein) และดาอิดเซอิน นอกจากนี้งานวิจัยของ Lund และคณะ (2004)[11] ไม่มีการใช้หนูกลุ่มควบคุมทั้งที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนประกอบควบคู่กัน จึงทำให้ไม่สามารถสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของอีควอลที่แน่ชัดได้

สารอ้างอิงที่ให้ผลบวกต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คือ ฟลูตาไมด์ขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างแรง โดยมีผลทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของต่อมลูกหมาก ส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่าง เซมินัล เวสิเคิล วาส เดเฟอเรนส์ และอีพิดิไดมิสลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีผลต่อน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนนี้ที่มีการใช้ฟลูตาไมด์ที่ขนาดเดียวกันมีผลทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอวัยวะดังกล่าวในหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ[15,16,25,26,27] ทั้งนี้เนื่องจากฟลูตาไมด์เป็นสารต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างแท้จริง โดยเข้าจับกับตัวรับของฮอร์โมนแอนโดรเจนทำให้เกิดการยับยั้งการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนส่งผลลดการเจริญเติบโตของอวัยวะที่มีการตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างแรง ได้แก่ เซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมาก และอีพิดิไดมิส[16,17,18,22,25,27] โดยอัณฑะเป็นอวัยวะที่มีการเจริญเติบโตตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างอ่อน[28,29,30] ในขณะเดียวกัน การให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทขนาด 0.6 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิลและต่อมลูกหมากทั้งส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีผลต่อน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะ อีพิดิไดมิสและวาส เดเฟอเรนส์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ของ Andrews และคณะ (2002)[31] และ Yamasaki และคณะ (2002)[32] ซึ่งพบว่าการให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับฮอร์โมนเอธินิลเอสตราไดออล (ethinylestradiol) โดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 0.2 มก.ต่อกก.น้ำหนักต่อวัน เป็นระยะเวลา 28 วัน ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิล ต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอัณฑะและอีพิดิไดมิสลดลง เช่นเดียวกันกับการให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทขนาด 0.1 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน โดยฉีดเข้าใต้ผิวหนัง เป็นระยะเวลา 10 วัน[33] และฮอร์โมนเอสตราไดออลขนาด 0.05 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน โดยฉีด

เข้าช่องท้อง เป็นระยะเวลา 15 วัน[34] ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของเซมินัล เวสิเคิล และต่อมลูกหมากส่วนล่างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นผลจากการที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้เกิดการควบคุมย้อนกลับแบบยับยั้ง (negative feedback) ไปที่สมองส่วนไฮโพธาลามัสและต่อมพิทูอิทารี ทำให้ลดการสร้างและหลั่งของโกนาโดทรอพิน รีลิสซิ่งฮอร์โมน (gonadotropin releasing hormone) และลูเทียไนซิง ฮอร์โมน (luteinizing hormone) ตามลำดับ มีผลทำให้ขบวนการชีวสังเคราะห์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนภายในอัณฑะและระดับฮอร์โมนแอนโดรเจนในซีรั่มลดลง จึงทำให้การเจริญเติบโตของอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์และตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนแอนโดรเจนอย่างแรง ได้แก่ เซมินัล เวสิเคิลและต่อมลูกหมากลดลง[33,34,35]

วาส เดเฟอเรนส์เป็นอวัยวะที่มีบทบาทเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility)[36] การหดตัวของวาส เดเฟอเรนส์มีส่วนในการช่วยลำเลียงเซลล์อสุจิผ่านท่อหลั่งน้ำอสุจิ (ejaculatory duct) ไปยังท่อปัสสาวะ (urethra) ในขบวนการหลั่งน้ำอสุจิ[37] งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่ศึกษาผลของอีควอลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ โดยพบว่าอีควอลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่พบว่าการให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับอีควอลโดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 5 วัน ไม่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของหนูแรทเพศผู้ เนื่องจากหนูแรทเพศผู้ที่ได้รับอีควอลมีรูปร่าง ขนาด และการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิปกติและสามารถเข้าคู่ผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศเมีย ทำให้หนูแรทเพศเมียมีอัตราการตั้งครรภ์ ระยะการตั้งครรภ์ และให้กำเนิดลูกหนูที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์ โดยมีจำนวนและอัตราส่วนทางเพศของลูกหนูเป็นปกติ [16] โดยผลของอีควอลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์คล้ายกับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฮอร์โมนเอสตราไดออลโดยฉีดเข้าใต้ผิวหนังที่ขนาด 0.1 และ 10 ไมโครกรัมต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน[38] ทำให้หนูแรทเพศผู้มีจำนวนของเซลล์อสุจิปกติ และสามารถเข้าคู่ผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศเมีย และทำให้หนูแรทเพศเมียสามารถให้กำเนิดลูกหนูที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์ โดยมีจำนวนและอัตราส่วนทางเพศของลูกหนูปกติ ในทางตรงกันข้ามฟลูตาไมด์ที่ขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีผลลดน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่มีการให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับฟลูตาไมด์ที่ขนาดเดียวกันไม่ทำให้เกิดการเข้าคู่ผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศเมียและไม่ทำให้หนูแรทเพศเมียตั้งครรภ์ได้ [16] เช่นเดียวกันกับการให้หนูแรทเพศผู้ อายุ 21 วัน ได้รับฟลูตาไมด์โดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 25 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 24 วัน ทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของวาส เดเฟอเรนส์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสัมพันธ์กับการลดลงของความสามารถในการสืบพันธุ์และคุณภาพของเซลล์อสุจิ[39]

ดังนั้นอีควอลที่ขนาดสูงสุดที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้สามารถออกฤทธิ์ทางชีวภาพเป็นไปได้ทั้งคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนต่อการเจริญเติบโตของเซมินัล เวสิเคิล ถึงแม้ว่าอีควอลไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของอัณฑะ ต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่าง อีพิดิไดมิส และวาส เดเฟอเรนส์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อีควอลมีแนวโน้มต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของอวัยวะดังกล่าวคล้ายกับผลของฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรทจึงสามารถคาดคะเนได้ว่าอีควอลอาจออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นไปได้ต่อการเจริญเติบโตของอัณฑะ ต่อมลูกหมากส่วนบนร่วมข้างและส่วนล่าง อีพิดิไดมิส และวาส เดเฟอเรนส์คล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่าต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน

จากผลการตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของอีควอลต่อเมแทบอลิซึมของไขมันในตับ โดยวัดระดับไขมันได้แก่ TC HDL-C LDL-C และ TG ในซีรั่ม โดยใช้เทคนิค Enzymatic colorimetic assay พบว่าอีควอลขนาด 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีผลลดระดับ TC HDL-C และ LDL-C ในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับ TG ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันเท่านั้น ซึ่งผลงานวิจัยที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Rachon และคณะ (2007)[21] ซึ่งพบว่าการให้หนูแรทเพศเมียตัวเต็มวัยที่ตัดรังไข่ได้รับอีควอลโดยผสมลงไปในอาหารที่ปราศจากถั่วเหลืองขนาด 400 มก.ต่อกก.น้ำหนักอาหาร เป็นระยะเวลา 7 สัปดาห์ ทำให้ระดับ TC HDL-C LDL-C และ TG ในซีรั่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับการฉีดอีควอลขนาด 100 ไมโครกรัมเข้าไปในไข่ของไก่กระทงที่อายุการบ่ม 7 วัน และตรวจวัดระดับไขมันภายหลังจากการฟักตัวที่อายุ 49 วัน พบว่าระดับ TC และ TG ในซีรั่มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[41] โดยผลของอีควอลต่อการลดระดับไขมันในซีรั่มคล้ายกับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่ให้หนูแรทและหนูเม้าส์ที่ตัดรังไข่ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือสารออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้ระดับ TC HDL-C LDL-C และ TG ลดลง[21,40,41,42,43] ในทางตรงกันข้าม

ฟลูตาไมด์ขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีผลเพิ่มระดับ TC HDL-C และ LDL-C ในซีรั่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ให้หนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับฟลูตาไมด์ที่ขนาดเดียวกันกับที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ เป็นระยะเวลา 15 วัน[44] และ 28 วัน[26] ทำให้ระดับ TC ในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกันกับการให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฟลูตาไมด์โดยป้อนเข้าทางปากที่ขนาด 30 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 60 วัน ทำให้ระดับ TC และ LDL-C ในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[43] สอดคล้องกับการให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งต่อมลูกหมากได้รับไบคาลูตาไมด์ (bicalutamide) ซึ่งเป็นยาต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนขนาด 50 มก.ต่อวัน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ทำให้ระดับ TC HDL-C และ LDL-C ในซีรั่มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[45]

อัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C และ LDL-C/HDL-C เป็นอัตราส่วนที่บ่งบอกถึงความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ ถ้ามีอัตราส่วนดังกล่าวสูงอาจมีความเสี่ยงสูงในการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ[46,47,48] ผลการวิจัยครั้งนี้ พบว่าอีควอลขนาด 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน มีผลลดทั้งอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C และ LDL-C/HDL-C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งคล้ายกับฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท โดยอีควอลขนาด 100 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวันมีผลลดอัตราส่วนระหว่าง LDL-C/HDL-C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้ามฟลูตาไมด์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของทั้งสองอัตราส่วนดังกล่าว งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นว่า อีควอลมีรูปแบบกลไกการออกฤทธิ์ต่อเมแทบอลิซึมของไขมันในตับคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนมากกว่าต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจน และจากการที่อีควอลสามารถลดอัตราส่วนระหว่าง TC/HDL-C และ LDL-C/HDL-C ได้ จึงมีความเป็นไปได้สูงว่า อีควอลอาจลดความเสี่ยงต่ออุบัติการณ์ของการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ อันเนื่องมาจากการสะสมของไขมันในหลอดเลือด

เมแทบอลิซึมของไขมันมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ ทั้งนี้เป็นเพราะตับเป็นอวัยวะที่สำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันและระดับไขมันในซีรั่ม[49,50] ซึ่งผลจากการวิจัยครั้งนี้ พบว่าอีควอลขนาด 30 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน ฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลีเรท และฟลูตาไมด์มีผลเพิ่มน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการให้หนูแรทเพศผู้ได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนสังเคราะห์หรือฟลูตาไมด์มีผลทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของตับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ[25,26,32] ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดในตับที่เกี่ยวข้องกับขบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน[26,28,32] และสารที่ได้รับจากภายนอกร่างกายหรือซีโนไบโอติก (xenobiotics) [27,44]

อีควอลถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยผ่านขบวนการกรองและกำจัดออกที่ไต[4] ผลการวิจัยครั้งนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีควอลขนาด 100 และ 250 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัวต่อวัน และฟลูตาไมด์มีน้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไตเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าอีควอลและฟลูตาไมด์มีผลทำให้น้ำหนักสดสัมพัทธ์ของไตเพิ่มขึ้นคล้ายกัน แต่กลไกการออกฤทธิ์ของอีควอลและฟลูตาไมด์ต่อการทำงานของไตอาจแตกต่างกัน โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาทั้งสภาวะในร่างกายและสภาวะนอกร่างกายของหนูแรทเพศผู้ พบว่าอีควอลมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการทำงานของระบบโซเดียมอิออน (Na^+)-โพแทสเซียม อิออน (K^+)-คลอไรด์อิออน (Cl^-) โคทรานส์พอร์ต (Na^+- K^+-$2Cl^-$ cotransport system) ที่เกิดขึ้นที่ส่วนขาขึ้นของห่วงเฮนเล ส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มการขับออกของน้ำ (diuresis) Na^+ (natriuresis) และ K^+ (kaliuresis) ออกจากท่อไต[51,52] และเพิ่มขบวนการกรองที่โกลเมอรูลัส (glomerular filtration)[51] ในทางตรงกันข้าม ฟลูตาไมด์มีคุณสมบัติเพิ่มระดับฮอร์โมนแอลโดสเตอโรน (aldosterone) ในซีรั่มของหนูแรทเพศผู้ ส่งผลทำให้เกิดการเพิ่มการดูดกลับของน้ำและ Na^+ โดยท่อไต[53]

ผลการวิจัยครั้งนี้สรุปได้ว่าการได้รับอีควอลที่ขนาดการให้ต่อครั้งที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้ไม่มีความเป็นพิษต่อร่างกาย อีควอลสามารถออกฤทธิ์เป็นได้ทั้งคล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนและ/หรือต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนต่อการลดขนาดของเซมินัล เวสิเคิล อีควอลออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อขนาดของต่อมลูกหมาก อีพิดิไดมิส และวาสเดเฟอเรนส์ และเมแทบอลิซึมของไขมันในตับ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการตรวจสอบกลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพและทางเภสัชวิทยาของอีควอลเพิ่มเติมในระดับการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมการทำงานโดยฮอร์โมนเพศและเกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการทำงานของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์ของหนูแรทตัวเต็มวัยเพศผู้ ได้แก่ ยีน ERα ยีน ERβ และยีน AR ในระดับ mRNA transcript และ protein transcript โดยใช้เทคนิค quantitative real-time RT-PCR และ immunocytochemistry ตามลำดับ เพื่อยืนยันให้แน่ชัดว่าอีควอลออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนหรือต้านฤทธิ์ฮอร์โมนแอนโดรเจนและออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของตัวรับของฮอร์โมนเพศชนิดใดเป็นหลัก เพื่อเสริมสร้างความมั่นใจและความปลอดภัยให้แก่แพทย์และผู้ป่วยในแง่ของการตัดสินใจ

ในการนำเอาอีควอลไปใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ทางเลือก เพื่อรักษาและป้องกันอาการความผิดปกติและโรคต่างๆ รวมทั้งมะเร็งที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากฮอร์โมนเพศ และโรคที่เกี่ยวข้องกับหลอดเลือดหัวใจ และเพื่อพัฒนาอีควอลเป็นผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพในเพศชายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2558 (สัญญาเลขที่ 5805014/2558) และงบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2557 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (สัญญาเลขที่ 5704002/2557)

เอกสารอ้างอิง

1. Setchell KD, Brown NM, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Zimmer-Nechemias L, Heubi JE. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. Am J Clin Nutr 2002;76(2):447-453.
2. Yuan JP, Wang JH, Liu X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora-implications for health. Mol Nutr Food Res 2007;51 (7):765-781.
3. Axelson M, Kirk DN, Farrant TR, Coole TG, Lawsont AM, Setchell KD. The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl) chroman] in human urine. Biochem J 1982;201(2): 353-357.
4. Setchell KD, Clerici C. Equol: History, Chemistry, and Formation. J Nutr 2010;140(7):1355S-1362S.
5. Bovee TF, Schoonen WG, Hamers AR, Bento MJ, Peijnenburg AA. Screening of synthetic and plant-derived compounds for (anti)estrogenic and (anti)androgenic activities. Anal Bioanal Chem 2008;390(4):1111-1119.
6. Liu H, Du J, Hu C, Qia H, Wang X, Wang S, Delayed activation of extracellular-signal-regulated kinase 1/2 is involved in genistein-and equol-induced cell proliferation and estrogen-receptor-α-mediated transcription in MCF-7 breast cancer cells. J Nutr Biochem 2010;21(5):390-396.
7. Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA. Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavone: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. Bioorg Med Chem 2004;12(6):1559-1567.
8. Sathyamoorthy N, Wang TT. Differential effects of dietary phyto-oestrogens daidzein and equol on human breast cancer MCF-7 cells. Eur J Cancer 1997;33(14):2384-2389.
9. Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Menche A, Wuttke W. Uterotropic effects of dietary equol administration in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Climacteric 2007;10(5):416-426.
10. Selvaraj V, Zakroczymski MA, Naaz A, Mukai M. Estrogenicity of the isoflavone metabolite equol on reproductive and non-reproductive organs in mice. Biol Reprod 2004;71(3):966-972.
11. Lund TD, Munson JD, Haldy EM, Setchell KD, Lephart ED, Handa JR. Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. Biol Reprod 2004; 70(4):1188-1195.
12. Lund TD, Blake C, Bu L, Hamaker AN, Lephart ED. Equol an isoflavonoid: potential for improved prostate health, *in vitro* and *in vivo* evidence. Reprod Biol Endocrinol 2011;9(4):1-9.
13. Hedlund TE, Johannes WU, Miller GJ. Soy isoflavonoid equol modulates the growth of benign and malignant prostatic epithelial cells *in vitro*. Prostate 2003;54(1):68-78.
14. Hedlund TE, Bokhoven A, Johannes WU, Nordeen SK, Ogden LG. Prostatic fluid concentrations of isoflavonoids in soy consumers are sufficient to inhibit growth of benign and malignant prostatic epithelial cells *in vitro*. Prostate 2006;66(5):557-566.
15. Loutchanwoot P, Srivilai P, Jarry H. Effects of the natural endocrine disruptor equol on the pituitary function in adult male rats. Toxicology 2013;304: 69-75.

16. Loutchanwoot P, Srivilai P, Jarry H. Lack of anti-androgenic effects of equol on reproductive neuroendocrine function in the adult rat. Horm Behav 2014;65:22-31.
17. Labrie F. Mechanism of action and pure antiandrogenic properties of flutamide. Cancer 1993;72(12 Suppl):3816-3827.
18. Neumann F, Töpert M. Pharmacology of antiandrogens. J Steroid Biochem 1986;25(5B):885-895.
19. Ju YH, Fultz J, Allred KF, Doerge DR, Helferich WG. Effects of dietary daidzein and its metabolite, equol, at physiological concentrations on the growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in ovariectomized athymic mice. Carcinogenesis 2006;27(4):856-863.
20. Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L, Metzler M. Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of daidzein in cultured human Ishikawa cells. Toxicol Lett 2005;158(1):72-86.
21. Rachon D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W. Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. Menopause 2007;14(5):925-932.
22. Toyoda K, Shibutani M, Tamura T, Koujitani T, Uneyama C, Hirose M. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals. Arch Toxicol 2000;74(3):127-132.
23. Kim SS, Lee RD, Lim KL, Kwack SJ, Rhee GS, Seok JH, Lee GS, An BS, Jeung EB, Park KL. Potential estrogenic and antiandrogenic effects of permethrin in rats. J Reprod Dev 2005;51(2):201-210.
24. Kalra SP, Dube MG, Pu S, Xu B, Horvath TL, Kalra PS. Interacting appetite-regulating pathways in the hypothalamic regulation of body weight. Endocr Rev 1999;20(1):68-100.
25. Andrews P, Freyberger A, Hartmann E, Eiben R, Loof I, Schmidt U, Temerowski M, Becka M. Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline no. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide. Arch Toxicol 2001;75(2):65-73.
26. Kunimatsu T, Yamada T, Miyata K, Yabushita S, Seki T, Okuno Y, Matsuo M. Evaluation for reliability and feasibility of the draft protocol for the enhanced rat 28-day subacute study (OECD Guideline 407) using androgen antagonist flutamide. Toxicology 2004;200(1):77-89.
27. O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS. Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. Toxicol Sci 2002;69(1): 92-108.
28. Turner TT, Jones CE, Howards SS, Ewing LL, Zegeye B, Gunsalus GL. On the androgen microenvironment of maturing spermatozoa. Endocrinology 1984;115:1925-1932.
29. Van der Molen HJ, Grootegoed JA, de Greef-Bijleveld MJ, Rommerts FFG, van der Vusse GJ. Distribution of steroids, steroid production and steroid metabolizing enzymes in rat testis. In:French FS, Hansson V, Ritzen EM, Nayfeh SN, eds. Hormonal Regulation of Spermatogenesis. New York: Plenum Publishing Corp; 1975:3-23.
30. Van Roijen JH, OOMS MP, Weber RFA, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Vreeburg JTM. Comparision of the response of rat testis and accessory sex organs to treatment with testosterone and the synthetic androgen methyltrienolone (R1881). J Androl 1997;18:51-61.
31. Andrews P, Freyberger A, Hartmann E, Eiben R, Loof I, Schmidt U, Temerowski M, Folkerts A, Stahl B, Kayser M, Sensitive detection of the endocrine effects of the estrogen analogue ethinylestradiol using a modified enhanced subacute rat study protocol (OECD Test Guideline no. 407). Arch Toxicol 2002;76(4):194-202.
32. Yamasaki K, Sawaki M, Noda S, Imatanaka N, Takatsuki M. Subacute oral toxicity study of ethynylestradiol and bisphenol A, based on the draft protocol for the "Enhanced OECD Test Guideline no. 407". Arch Toxicol 2002;76(2):65-74.

33. Aleem M, Padwal V, Choudhari J, Balasinor N, Parte P, Gill-Sharma MK. Estradiol affects androgen-binding protein
34. expression and fertilizing ability of spermatozoa in adult male rats. Mol Cell Endocrinol 2006;253(1-2): 1-13.
35. O'Connor JC, Frame SR, Biegel LB, Cook JC, Davis LG. Sensitivity of a Tier I screening battery compared to an *in utero* exposure for detecting the estrogen receptor agonist 17 beta-estradiol. Toxicol Sci 1998;44(2):169-184.
36. Noguchi K, Nishimura R, Takai S, Arita J, Higuchi T, Kawakami M. Negative feedback effects of chlormadinone acetate and ethynylestradiol on gonadotropin secretion in patients with prostatic cancer and male rats. Endocrinol Jpn 1980;27(3):285-290.
37. Rodriguez A, Bustos-Obregon E. Histophysiological and morphometric studies of the post-natal development of rat vas deferens. Andrologia 1993;25(1):29-37.
38 Quintas EM, Noel F. Mechanisms of adaptive super-sensitivity in vas deferens. Auton Neurosci 2009;146 (1-2):38-46
39. Gill-Sharma MK. Souza SD. Padwal V. Balasinor Aleem M, Parte. Antifertility effects of estradiol in adult male rats. J Endocrinol Invest 2001;24:598-607.
40. Perobelli JE, Alves TR, Toledo FC, Fernandez CDB, Anselmo-Franci JA, Klinefelter GR, Kempinas WDG. Impairment on sperm quality and fertility of adult rats after antiandrogen exposure during prepuberty. Re-prod Toxicol 2012;33(3):308-315.
41. Ohtomo T, Uehara M, Penalvo JL, Adlercreutz H, Katsumata S, Suzuki K, Takeda K, Masuyama R, Ishimi Y. Comparative activities of daidzein metabolites, equol and *O*-desmethylangolensin, on bone mineral density and lipid metabolism in ovariectomized mice and in osteoclast cell cultures. Eur J Nutr 2008;47(5):273-279.
42. Ni YD, Wei XJ, Zhang CX, Zhong Y, Lu LZ, Gross-mann R, Zhao RQ. The effect of equol injection *in ovo* on lipid metabolism and hepatic lipogenic gene expression in broilers. Animal 2012;6(9):1444-1450.
43. Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. Endocrinology 1997;138(4):1552-1558.
44. Lateef A, Khan AQ, Tahir M, Khan R, Rehman MU, Ali F, Hamiza OO, Sarwat S. Androgen deprivation by flutamide modulates uPAR, MMP-9 expressions, lipid profile, and oxidative stress: amelioration by daidzein. Mol Cell Biochem 2013;374:49–59.
45. Mannaa F, Ahmed HH, Estefan SF, Sharaf HA, Eskander EF. *Saccharomyces cerevisiae* intervention for relieving flutamide-induced hepatotoxicity in male rats. Pharmazie 2005;60:689-695.
46. Smith MR, Lee H, Nathan DM. Insulin sensitivity during combined androgen blockade for prostate cancer. J Clin Endocrinol Metab 2006;91(4):1305-1308.
47. NIH Consensus Development Panel on Triglyceride, High-density Lipoprotein, and Coronary Heart Disease. NIH consensus development panel on triglyceride, high-density lipoprotein, and coronary heart disease. JAMA 1993;269:505-510.
48. Assmann G, Cullen P, Schulte H. The Munster Heart Study (PROCAM). Results of follow up at 8 years. Eur Heart J 1998;19(suppl):A2-A11.
49. Lemieux I, Lamarch B, Couillard C, Pascot A, Cantin B, Nergeron J, Dagenais GR, Despres J. Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/ HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men. Arch Intern Med 2001;161: 2685-2692.
50. Spady DK, Cuthbert JA, Willard MN, Meidell RS. Overexpression of cholesterol 7-hydroxylase (CYP7A) in mice lacking the low density lipoprotein (LDL) receptor gene. J Biol Chem 2003;273:126–132.
51. Sato K, Ohuchi A, Sook SH, Toyomizu M, Akiba Y. Changes in mRNA expression of 3-hydroxy-3-meth-ylglutaryl coenzyme A reductase and cholesterol 7 alpha-hydroxylase in chickens. Biochim Biophys Acta 2003;1630:96–102.

52. Gimenez I, Lou M, Vargas F, Alvarez-Guerra M, Mayoral JA, Martinez RM, Garay RP, Alda JO. Renal and vascular actions of equol in the rat. J Hypertens 1997;15:1303–1308.
53. Martinez RM, Gimenez I, Lou JM, Mayoral JA, Alda JO. Soy isoflavonoids exhibit in vitro biological acti vites of loop diuretics. Am J Clin Nutr 1998;68(suppl): 1354s-1357s.
54. Hofmann P, Michaelis M, Götz F, Bartel C, Kienitz T, Quinkler M. Flutamide increases aldosterone levels in gonadectomized male but not female wistar rats. Am J Hypertens 2012;25(6):697-703.