หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงการทำงานของกระดูกในหนูที่ดื้อต่ออินซูลินจากการเหนี่ยวนำโดยการกินอาหารไขมันสูงและภาวะการขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรนนาน 12 สัปดาห์	
ผู้เขียน	นางสาว ภิญญดา รัตนโชติ	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ดร.พญ. ศรัณยภิญ โพธิกานนท์	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
	รศ.ดร.ทพญ.สิริพร ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ศ.ดร.นพ. นิพนธ์ ฉัตรทิพากร	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
	ผศ. ดร. พวงทิพย์ คุณานุสรณ์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

โรคเบาหวานประเภทที่ 2 จัดเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของระบบเมแทบอลิกของร่างกาย และมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าความอ้วนร่วมกับการดื้ออินซูลินจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นระยะเวลานาน ทำให้การทำงานของเซลล์สร้างกระดูกเสียไปจนนำไปสู่ภาวะกระดูกพรุนในกระดูกขากรรไกร การศึกษาก่อนหน้านี้ยังแสดงให้เห็นว่าการขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนทำให้เกิดโรคกระดูกพรุนได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม ผลของภาวะอ้วนร่วมกับการขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่อการทำงานของกระดูกยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อน ในการศึกษาครั้งนี้เราตั้งสมมติฐานว่า การขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเหนี่ยวนำให้เกิดความบกพร่องของการสื่อสัญญาณอินซูลินในเซลล์กระดูก ทำให้การรอดชีวิตของเซลล์กระดูกและความหนาแน่นของกระดูกลดลง และความอ้วนทำให้ภาวะดังกล่าวแย่ลงในหนูที่ขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนร่วมด้วย ในการศึกษานี้ใช้หนูขาวสายพันธุ์วิสต้าจำนวน 24 ตัว แบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ12 ตัว คือ กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออก (bilateral orchiectomy) และกลุ่มควบคุม (sham operation) หลังจากผ่าตัดหนูทั้งหมดจะได้รับการพักฟื้นเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นหนูแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรปกติ(พลังงานจากไขมันคิดเป็นร้อยละ 19.7 ของพลังงานทั้งหมด) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (พลังงานจากไขมันคิดเป็น ร้อยละ 59.3 ของพลังงานทั้งหมด) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ เมื่อสิ้นสุดสัปดาห์ที่ 12 เลือดของหนูแต่ละกลุ่มได้แก่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NDS) กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารสูตรปกติ (NDO) กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFS) กลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารไขมันสูง (HFO) จะถูกเก็บเพื่อวิเคราะห์ระดับน้ำตาล, อินซูลิน, คลอเรสเตอรอล, ฮอร์โมนเทสโทสเตอร์โรน, ตัวชี้วัดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และระดับ osteocalcin จากนั้นกระดูกขาท่อนล่างข้างขวาจะถูกเก็บเพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างของกระดูกโดยใช้เครื่องเอ็กซ์เรย์คอมพิวเตอร์ระดับไมโครเมตร (Microtomography or *micro-CT*) ส่วนกระดูกขาข้างซ้ายจะถูกนำไปย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้ เซลล์กระดูกซึ่งนำมาเพาะเลี้ยง เพื่อทำการประเมิน 1) ลักษณะทั่วไปของเซลล์กระดูกโดยการวัด alkaline phosphatase และทำ alizalin red staining 2) การแบ่งตัวของเซลล์กระดูก โดยใช้วิธี alamarBlue cell viability assay และโปรตีนที่บ่งชี้ถึงการเพิ่มจำนวนของเซลล์กระดูก (Cyclin D1) 3) การตายของเซลล์กระดูก โดยใช้วิธี TUNEL assay และ 4) การส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์กระดูกโดยวิธี western blot analysisโดยดูปริมาณการเติมฟอสเฟตที่อินซูลินรีเซพเตอร์และโปรตีน Akt ผลการทดลองพบว่าภาวะดื้ออินซูลินเกิดขึ้นเฉพาะหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเท่านั้น (HFS และ HFO) โดยวัดจากค่า HOMA index ที่สูงขึ้นคือ 26.6 ± 3.0, 25.2 ± 4.1 ตามลำดับ เทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NDS และ NDO) คือ 14.6 ± 1.7, 17.2 ± 3.2 ตามลำดับ ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารสูตรปกติ (NDO) หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFS) และหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารไขมันสูง (HFO) (0.07 ± 0.01, 0.46 ± 0.01 และ 0.15 ± 0.06 ng/dl, ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NDS) (0.75 ± 0.2 ng/dl) ความหนาแน่นของกระดูกในส่วน trabecular ลดลงในหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารสูตรปกติ (NDO) หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFS) และหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารไขมันสูง (HFO) (126.9 ± 11.1, 140.9 ± 15.3, 155.8 ± 10 mg/cm^3, ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารสูตรปกติ (NDS) (203.4 ± 14.4 mg/cm^3) เซลล์กระดูกในหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารสูตรปกติ (NDO) หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFS) และหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารไขมันสูง (HFO) มีการแบ่งตัวลดลงและ มีการแสดงออกของโปรตีน Cyclin D1 ที่ลดลงและมีการตายของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่ามีความบกพร่องของการสื่อสัญญาณอินซูลินของเซลล์กระดูกในหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออกและได้รับอาหารสูตรปกติ (NDO) หนู

กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFS) และหนูกลุ่มที่ได้รับการผ่าตัดเอาอัณฑะทั้งสองข้างออก และได้รับอาหารไขมันสูง (HFO) การลดลงของการเติมฟอสเฟตให้ตัวรับอินซูลิน (IR) และโปรตีนเอเคที (Akt) ในหนูสามกลุ่มนั้นไม่มีความแตกต่างกันภายในกลุ่ม การศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพียงอย่างเดียวหรือความอ้วนเพียงอย่างเดียวสามารถทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลินภายในเซลล์กระดูกและเหนี่ยวนำไปสู่การเกิดภาวะโรคกระดูกพรุน อย่างไรก็ตาม ความอ้วนไม่ได้ทำให้ภาวะดังกล่าวแย่ลงในหนูที่ขาดฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนร่วมด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title	Change in Bone Functions in Rats with Insulin Resistance Induced by High-fat Diet Consumption and Testosterone Deprivation for 12 Weeks	
Author	Ms. Pinyada Rattanachote	
Degree	Master of Science (Pharmacology)	
Advisory Committee	Dr.Saranyapin Potikanond, M.D.	Advisor
	Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn	Co-advisor
	Prof. Dr. Nipon Chattipakorn, M.D.	Co-advisor
	Asst. Prof. Dr. Puongtip Kunanusorn	Co-advisor

ABSTRACT

Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a chronic metabolic disorder associated with insulin resistant condition. We previously demonstrated that an obese-insulin resistant condition induced by long-term high-fat diet (HFD) consumption markedly impaired osteoblastic function leading to osteoporosis in the jaw bone. Previous studies also showed that testosterone deprivation lead to the development of osteoporosis. However, the effects of combined obesity and testosterone deprivation on bone funtion have not been investigated. In the present study, we hypothesized that testosterone deprivation impaired osteoblastic insulin signaling, decreased osteoblast survival, reduces bone density, and that obesity aggravated those deleterious effects in testosterone-deprived animals. Twenty four male rats were divided into sham-operated and orchiectomized groups (n=12/group). A week after the surgery, the rats in each group were divided into 2 subgroups and fed with either normal diet (ND; 19.7% energy from fat) or high fat diet (HFD;59.3% energy from fat) for 12 weeks. At the end of week 12, blood samples were collected from all rats [sham-operated ND rats (NDS), orchiectomized ND rats (NDO), sham-operated HFD rats (HFS) and orchiectomized HFD rats (HFO)] to determine the levels of glucose, insulin, cholesterol, testosterone, HOMA index and osteocalcin levels. The tibias were extracted to determine bone mass using

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

microcomputed tomography. Furthermore, osteoblasts were isolated from rat tibiae in each subgroup, and were used to determine (1) osteoblast characteristic using alkaline phosphatase and Alizarin red staining, (2) osteoblastic cell proliferation using alamarBlue cell viability assay and proliferation protein marker, Cyclin D1, (3) cellular apoptosis using TUNEL assay, and (4) osteoblastic insulin signaling by measuring insulin-mediated insulin receptor phosphorylation (IR-p) and Akt phosphorylation (Akt-p). We found that only HFS and HFO groups were developed peripheral insulin resistance as indicated by increased HOMA index (26.6 ± 3.0, 25.2 ± 4.1, respectively), compared to that of NDS and NDO groups, (14.6 ± 1.7, 17.2 ± 3.2, respectively). The testosterone levels of NDO, HFS and HFO groups were significantly decreased compared to that of NDS group (0.07 ± 0.01, 0.46 ± 0.01, 0.15 ± 0.06 and 0.75 ± 0.2 ng/dl, respectively). Similar to testosterone levels, the trabecular bone density was significantly decreased in NDO, HFS and HFO groups (126.9 ± 11.1, 140.9 ± 15.3, 155.8 ± 10 mg/cm^3, respectively), compared to that in the NDS group (203.4 ± 14.4 mg/cm^3). NDO, HFS and HFO osteoblasts also demonstrated the decreased cell proliferation, decreased Cyclin D1 expression and increased cell apoptosis. Moreover, the impairment of osteoblastic insulin signaling isolated from NDO, HFS and HFO groups was demonstrated as indicated by the decreased IR-p and Akt-p. No differences were found among NDO, HFS and HFO rats. These findings indicate that either testosterone deprivation or obesity could impair osteoblastic insulin signaling, leading to the development of osteoporosis. However, obesity does not aggravate those deleterious effects of the testosterone-deprived condition on bone.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved