บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง

<u>อภิปรายผลการทดลอง</u>

จุดมุ่งหมายในการรักษาภาวะกระดูกพรุนในสตรีวัยหมดประจำเดือน (postmenopausal osteoporosis) คือ การลดความเสี่ยงของการเกิดกระดูกหัก และเพิ่มมวลกระดูกให้ใกล้เคียงกับระดับปกติโดยที่มีความสมดุลของเซลล์สลายกระดูก(osteoclast)และเซลล์สร้างกระดูก (osteoblast) (Garnero et al, 1999) จากการศึกษาผลของว่านชักมดลูกที่มีต่อกระดูกในหนูขาวที่ถูกผ่าตัดรังไข่ออกหลังจากหนูขาวที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะกระดูกพรุนจากการขาดฮอร์โมนเอสโตเจน ได้รับว่านชักมดลูก ติดต่อกันเป็นเวลา 1 เดือน

ผล Vagina smear หลังจากการผ่าตัดรังไข่หนูขาว 3 สัปดาห์ โดยปกติในหนูขาวจะมีระยะการตกไข่มี 4 ระยะ คือ

1. Diestrous ระยะก่อนเป็นสัด เซลล์จะเป็น parabasal cell มีนิวเคลียส มี leucocyte เล็กน้อย
2. Estrous ระยะตกไข่ เซลล์จะเป็น keratin superficial cell มีลักษณะ large flake เซลล์เป็นเหลี่ยม ๆ ไม่มีนิวเคลียส
3. Metestrous ระยะหลังตกไข่ เซลล์จะเป็น parabasal cell เซลล์มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียส
4. Anestrous ระยะเตรียมก่อนเป็นสัด เมื่อย้อมสีจะติดสีเข้ม เกาะกลุ่มรวมกัน มี mucus มาก มีเซลล์ขยะ(debris) มาก

จากการทดลอง หนูขาวกลุ่มที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่ (sham+oil) พบว่ามี superficial cells (cornified cells) ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ ไม่มีนิวเคลียส รูปร่างแบน เป็นจำนวนมาก พบเม็ดเลือดขาวชนิด leukocytes บ้างเล็กน้อย มี vaginal plug มาก และพบ debris cells (noncornified cells) หรือเซลล์ขยะบ้างเล็กน้อย ส่วนหนูขาวที่ถูกตัดรังไข่ที่เหลือทั้ง 5 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม ovx+oil, ovx+estrogen. ovx+C100, ovx+C250 และ ovx+C500 ซึ่งถูกตัดรังไข่เป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนป้อนยาจะพบว่ามีชิ้นส่วนของเซลล์ขยะที่ตายแล้ว (debris cells) เป็นจำนวนมาก และพบเซลล์ที่มีนิวเคลียส (nucleated cells) ได้แก่ parabasal cells ซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลม และมีสัดส่วนของนิวเคลียสต่อไซโตพลาสมสูง นอกจากนี้ยังพบ intermediate cells ซึ่งเป็น parabasal cells ที่กำลังจะเปลี่ยนรูป จะมีลักษณะใหญ่กว่า และนิวเคลียสจะมีขนาดค่อนข้างเล็กกว่า parabasal cells ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีลักษณะกลมหรือรูปไข่ ขนาดเล็ก ภายในเซลล์มีนิวเคลียสเห็นได้ชัดเจน แสดงว่าการตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง (Ovariectomy) นานถึง 3 สัปดาห์ พอเพียงที่จะทำให้หนูเกิดภาวะขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนทำให้หนูไม่มีการตกไข่ ดังรูปที่ 9b

การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูในแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ และกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกขนาด 100 และ250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ในกลุ่มที่ตัดรังไข่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ แสดงว่าการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น โดยที่หนูที่ได้รับการตัดรังไข่ออกจะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น และมีการกินอาหารและน้ำมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ (Wronski et al, 1987) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอสโตรเจนมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัว โดยไปจับกับ estrogen receptor ชนิด α (ER α) ทำหน้าที่ควบคุมการเพิ่มขึ้นของ adipose tissue ทำให้ในหนูกลุ่มที่มี ER α จะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูทดลองที่ไม่มี ER α (ER α-knockout mice) เนื่องจากหนูที่ขาด ER α มี adipose tissue มากกว่าหนูในกลุ่มปกติ จึงทำให้มีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้นด้วย (Heine et al, 2000) การทดลองครั้งนี้สนับสนุนผลของเอสโตรเจนดังกล่าวแต่ว่านชักมดลูกไม่มีผลดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกสูงถึงขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลับมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มที่ตัดรังไข่ จึงมีความเป็นไปได้ว่าสารไฟโตเอสโตรเจนในว่านชักมดลูกไม่ได้มีผลที่ ER α ที่เกี่ยวข้องกับน้ำหนักตัว

ผลของว่านชักมดลูกต่อความหนาแน่นของกระดูก เมื่อให้สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอธานอลทุกวันจนครบ 1 เดือน เพื่อดูผลของว่านชักมดลูกต่อปริมาณแคลเซียมในกระดูกต้นขา พบว่า ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 100, 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ช่วยเพิ่มปริมาณแคลเซียมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เป็นที่ทราบกันดีว่าแคลเซียมเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของกระดูก มีบทบาทในการป้องกันและรักษาโรคกระดูกพรุน กระดูกจะมีการสลายและสร้างใหม่อยู่ตลอดเวลา โดยขึ้นกับความสมดุลของฮอร์โมนหลายตัว เช่น พาราธัยรอยด์ฮอร์โมน, แคลซิโทนินและฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนจะช่วยปรับสมดุลให้มีการสร้างกระดูกและยับยั้งการสลายกระดูกให้อยู่ในภาวะสมดุล โดยควบคุมการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและเซลล์สลายกระดูก (Garnero et al, 1999) และเพิ่มการดูดซึมของแคลเซียมจากทางเดินอาหาร(Picotto et al., 1996)การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในหนูกลุ่มที่ถูกตัดรังไข่ และได้รับเอสโตรเจนทดแทน จะมีปริมาณแคลเซียมในกระดูกเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าเอสโตรเจนมีผลเพิ่มมวลกระดูกได้โดยตรง และเอสโตรเจนสามารถกระตุ้นการสร้าง trabeculae bone ได้ (Recker et al. 1977) ผลสอดคล้องการศึกษาที่ผ่านมาของไฟโตเอสโตรเจนตัวอื่น ๆ เช่น genistein ขนาด 0.7 มก./วัน ให้นาน 1 เดือนในหนูที่ตัดรังไข่ เพิ่มการ uptake ของแคลเซียม กลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด น่าจะเป็นการกระตุ้นเมตาบอลิสมและเพิ่มการ uptake ของแร่ธาตุโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคลเซียม (Bahram et al. 1996) นอกจากนี้เอสโตรเจนมีผลโดยตรงกับลำไส้ในการกระตุ้นการดูดซึมแคลเซียม (Arjmandi et al., 1993) มีรายงานว่า 17-β estradiol เพิ่มการ uptake ของแคลเซียม (Ca influx) ในลำไส้ส่วน duodenal ในหลอดทดลอง (Picotto et al., 1996)

การขาดเอสโตรเจนมีผลทำให้น้ำหนักกระดูกลดลง และปริมาณแคลเซียมที่ลดลงอย่างมากเป็นดัชนีบ่งบอกถึงภาวะกระดูกพรุนที่เกิดขึ้นจากการขาดฮอร์โมน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าผลของว่านชักมดลูกที่ทำให้น้ำหนักกระดูกเพิ่มขึ้นมีความสอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นว่านชักมดลูกจึงมีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน โดยที่สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในกระดูกของหนูขาวที่ขาดเอสโตรเจนเนื่องจากการผ่าตัดรังไข่ได้ เช่นเดียวกับน้ำหนักกระดูกและน้ำหนักเถ้ากระดูกที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกขนาด 100, 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกันทุกกลุ่ม การที่แคลเซียมเป็นส่วนประกอบของกระดูก จึงทำให้เกิดการสะสมของแคลเซียมในกระดูกมากขึ้นเพื่อสร้างกระดูก เพิ่มปริมาณมวลกระดูก แล้วทำให้มีน้ำหนักของกระดูกเพิ่มขึ้นตามด้วย อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการลดลงของแคลเซียมถึง 5 เท่าเมื่อเทียบกับการลดลงของน้ำหนักกระดูกในหนูที่ขาดเอสโตรเจนกับหนูปกติแล้ว จะเห็นได้ว่าน้ำหนักกระดูกที่ลดลงไม่ได้แตกต่างกันจนเห็นได้ชัดเจนเท่ากับการลดลงของแคลเซียม แสดงว่าผลของเอสโตรเจนและว่านชักมดลูกมีความเกี่ยวข้องกับการรักษาปริมาณแคลเซียมภายในกระดูกมากกว่าแร่ธาตุตัวอื่น ๆ

ระดับ alkaline phosphatase (ALP) ของหนูในกลุ่ม sham จากในการศึกษาครั้งนี้ค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าปกติของหนูขาวทั่ว ๆ ไป ซึ่งอยู่ในค่า 16-96 IU (Carpenter, 2005) ทั้งนี้เพราะการศึกษาครั้งนี้ทำการเจาะเลือดจากหัวใจโดยตรง ทำให้เกิดการทำลายของเซลล์หัวใจจนมีผลทำให้มีการหลั่ง ALP มากกว่าปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ ที่ทำการเจาะเลือดแบบเดียวกัน ก็พบว่าระดับ ALP สูงกว่ากลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในหนูที่ถูกตัดรังไข่ออกและที่ได้รับสารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาด และกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนแสดงว่าว่านชักมดลูกสามารถเพิ่มการสร้างกระดูกได้คล้ายเอสโตรเจนเนื่องจาก ALP เป็น biomarker ที่ใช้สำหรับวัด osteoblastic activity (Peng et al., 1994) โดยผ่านทางกระบวนการพอกพูนแร่ธาตุในกระดูก (Mineralization) ในระยะแรกของกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นที่รอบ ๆ membrane bound vesicles ซึ่งสามารถพบได้ใน matrix ที่มาจาก hypertrophic chondrocytes ใน epiphyseal plate นอกจากนี้ vesicle นี้สร้างขึ้นจากเซลล์สร้างกระดูก ภายในvesicle นี้จะเต็มไปด้วย alkaline phosphatase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เชื่อว่าเกี่ยวข้องกับการพอกพูนแร่ธาตุ อาจเป็นส่วนหนึ่งของ membrane pump สำหรับแคลเซียมและฟอสเฟต พบว่าเอนไซม์ตัวนี้ถูกหลั่งออกจากเซลล์สร้างกระดูกเข้าไปยังของเหลวนอกเซลล์ ดังนั้นการวัดระดับของเอนไซม์นี้ ในกระแสเลือดจึงใช้เป็นดรรชนีวัดการหมุนเวียนของกระดูก (bone turnover rate) ซึ่งสามารถนำมาใช้ตรวจสอบได้ทางคลินิก (Dempster, 1995) โดยที่เมื่อมีการสร้างกระดูก ระดับ ALP จะสูงตามด้วย ในกลุ่มที่ตัดรังไข่จึงมีระดับ ALP ต่ำสอดคล้องกับงานวิจัยอื่นๆ ที่ศึกษาในรูปแบบเดียวกัน (Shirwaikar et al., 2003) จากผลการทดลองครั้งนี้กลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกทุกกลุ่มมีระดับ ALP สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนและกลุ่มที่ไม่ได้ผ่าตัดรังไข่ออก ถึงแม้ว่าจะมีรายงานว่ามีความสัมพันธ์กันในทางบวกของระดับ ALP

โดยรวมกับ ALP ที่มีอยู่เฉพาะในกระดูก (bone – specific isoenzyme of alkaline phosphatase) ในผู้ป่วยที่มีปัญหาเรื่องกระดูกพรุน (Romagnoli et al., 1998) อย่างไรก็ตาม ALP สามารถสร้างขึ้นได้จากอวัยวะอื่น ๆ ไม่ได้เฉพาะเจาะจงกับกระดูกเพียงอวัยวะเดียว ทั้งนี้ระดับ ALP ที่สูงขึ้นอาจมาจากการหลั่งออกมาจากไตและตับซึ่งเป็น ALP ไม่ทนต่อความร้อน (thermolabile)เช่นเดียวกับที่พบในกระดูก (Hung et al., 2001) เมื่อเกิดพยาธิสภาพของอวัยวะเหล่านี้ (กรัณฑรัตน์, 2544) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปว่าว่านชักมดลูกมีผลต่ออวัยวะดังกล่าวด้วยหรือไม่ และควรทำการตรวจวัดหาปริมาณ ALP ในกระดูก (BAP) จะทำให้ผลการวัดหาระดับ ALP แม่นยำและสอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมในกระดูกมากยิ่งขึ้น

ภาพจุลพยาธิวิทยาเป็นการยืนยันผลการปกป้องกระดูกของว่านชักมดลูก เป็นภาพบริเวณ shaft bone ของหนูขาวในทุกกลุ่ม โดยกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนสามารถรักษามวลกระดูกและ bone trabeculae ได้ ส่วนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ตัดรังไข่ มีเนื้อกระดูกและโครงสร้างกระดูกที่ดีที่สุด (Hao et al., 2005) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ตัดรังไข่ที่มีเนื้อกระดูกเป็นรูพรุน ในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 100, 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว มีเนื้อกระดูกใกล้เคียงกับกับกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจน แสดงว่าว่านชักมดลูกน่าจะมีผลปกป้องมวลกระดูกโดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์สร้างกระดูกและยับยั้งการทำงานของเซลล์สลายกระดูกได้เช่นเดียวกับเอสโตรเจน อย่างไรก็ตามในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาดสูงถึง 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลับพบว่าเนื้อกระดูกมีรูพรุนและมีการเสื่อมสลายของเนื้อกระดูกมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแคลเซียม และระดับ NO ในเลือดที่ต่ำกว่า ดังนั้นในขนาดที่สูงเกินไปอาจให้ผลที่ไม่ดีเท่าขนาดที่ต่ำกว่า

การขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนในสตรีวัยหมดประจำเดือน ทำให้การสลายกระดูกเพิ่มมากขึ้น โดยกลไกที่ยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลเกี่ยวข้องกระบวนการเกิด Nitric Oxide ภายในร่างกาย (Das, 2002) จากการที่พบว่าผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนที่ได้ใช้ nitroglycerin ซึ่งเป็น NO donor เพื่อรักษาเกี่ยวกับภาวะหัวใจขาดเลือดเป็นประจำ จะมีค่า BMD ของกระดูกสะโพกสูงกว่าผู้หญิงที่ไม่ได้ใช้ NO donor (Jamal et al.. 1998) แสดงว่า NO น่าจะมีผลเกี่ยวข้องกับเซลล์สร้างกระดูก โดยกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์สร้างกระดูก (Macpherson et al., 1995) ผลการทดลองครั้งนี้พบว่าระดับ NO ในเลือดของกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนและกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่สูงกว่ากลุ่มที่ตัดรังไข่อย่างมาก แสดงว่าฮอร์โมนเอสโตรเจนมีผลต่อการหลั่ง NO โดยที่กลไกอาจเกิดขึ้นจากการกระตุ้นให้มีการหลั่งโดยตรง (direct pathway) หรือกระตุ้นให้มีการหลั่งเอนไซม์ที่สร้าง NO (NOS) มากขึ้น (indirect pathway) ในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 100, 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่ามีระดับ NO ในเลือดใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ แต่ในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลับมีระดับ NO ในเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจน

แสดงว่าว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นขนาดที่สูงไป การมีระดับ NO ที่สูงหรือใกล้เคียงกับในภาวะร่างกายปกติ ก็จะสามารถป้องกันการเกิดภาวะกระดูกพรุนได้ ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Hao และคณะ (2005) ในหนูขาวที่ได้รับการผ่าตัดรังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง พบว่าในกลุ่มที่ได้รับ NO donor มีค่า BMD และ NO ในเลือดใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่ได้ตัดรังไข่ออกและกลุ่มที่ได้รับเอสโตรเจนทดแทน การที่หนูขาดฮอร์โมนเอสโตรเจนและได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวกลับมีระดับ NO ในเนื้อเยื่อกระดูกน้อยกว่าค่าปกติ ทำให้ผลการปกป้องกระดูกไม่ดีเท่ากับเอสโตรเจน และว่านชักมดลูกในขนาดที่ต่ำกว่า ระดับ NO ที่ต่ำกว่าปกติมีผลให้เกิดการเหนี่ยวนำให้เซลล์สลายกระดูกทำงานสลายกระดูกมากขึ้น และยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์สร้างกระดูก (Hao et al., 2005)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ระดับ NOในเลือดมีความสัมพันธ์กับระดับแคลเซียมของกระดูกและผลทางจุลพยาธิวิทยาที่สอดคล้องกันมากกว่าระดับ alkaline phosphatase การวัดระดับ NO ในเลือดจึงน่าจะเป็นดัชนีบ่งบอกถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับมวลกระดูกในสตรีวัยหมดประจำเดือนได้

<u>จากผลการทดลองสรุปได้ว่า</u>

1. ในหนูขาวที่ถูกผ่าตัดรังไข่ออก ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 100, 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในกระดูกต้นขาได้ใกล้เคียงกับการได้รับเอสโตรเจน แต่ในกลุ่มที่ได้รับว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวไม่สามารถเพิ่มปริมาณแคลเซียมในกระดูกต้นขาได้เท่ากับการได้รับเอสโตรเจนทดแทน

2. ว่านชักมดลูกที่สกัดด้วยเอธานอลในขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถเพิ่มระดับ ALP ได้ แต่ผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับปริมาณแคลเซียมในกระดูกและระดับ NO ในเลือด ดังนั้นควรตรวจโดยใช้วิธีการตรวจหา Bone Alkaline Phosphatase (BAP) เนื่องจาก BAP จะมีความเฉพาะเจาะจงกับ ALP ที่หลั่งออกจากกระดูกเท่านั้น

3. ระดับ NO ในเลือดของหนูขาวที่ตัดรังไข่ ลดต่ำกว่าปกติเป็นอย่างมาก การได้รับว่านชักมดลูกทำให้ระดับ NO ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นได้เช่นเดียวกับเอสโตรเจน ระดับ NO ที่สูงขึ้นในกลุ่มได้รับเอสโตรเจน และว่านชักมดลูกสอดคล้องกับน้ำหนักกระดูก ปริมาณแคลเซียมในกระดูกต้นขา และผลทางพยาธิวิทยา

4. ว่านชักมดลูกมีฤทธิ์แบบเอสโตรเจนในการปกป้องกระดูก แต่ขนาดของว่านชักมดลูกมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อผลดังกล่าว เนื่องจากขนาดที่สูงเกินไป อาจมีผลเสียมากกว่า การศึกษาพบว่าขนาด 100 และ 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ให้ผลไม่แตกต่างกัน แต่ในขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว กลับให้ผลน้อยกว่า ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาขนาดที่เหมาะสมต่อไปในมนุษย์