



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ต่อการเกิด
อนุมูลอิสระและการทำงานของหลอดเลือด
ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

โดย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วชิราวดี มาลากุล และคณะ

วันที่ 3 สิงหาคม 2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ฤทธิ์ของชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ต่อการเกิด
อนุมูลอิสระและการทำงานของหลอดเลือด
ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

ผู้วิจัย

สังกัด

ผศ.ดร.วชิราวดี มาลากุล

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร.นิธิรัตน์ เนินเพิ่มพิสุทธิ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ดร.ทัตดาว ภาษีผล

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ดร.วันทณี หาญช้าง

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Hypercholesterolemia increases cardiovascular risk. NADPH_{oxidase}(NOX)-derived superoxide plays an important role in the development of vascular dysfunction in hypercholesterolemia. Recent studies suggest that increased consumption of fruits is related to a reduced risk of cardiovascular diseases. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of fruit extract of *Syzygium samarangense* on vascular function and expression of NOX mRNA in hypercholesterolemic rat aortae. Hypercholesterolemic rats were induced by feeding a high cholesterol diet (HCD) for 8 weeks. *S. samarangense* (50 and 100 mg/kg body weight) was administered orally to HCD fed rats for 4 weeks (from 5th week to 8th week of HCD treatment). Eight weeks after diet treatment blood samples were collected for measurement of serum lipid profiles, total nitrite/nitrate, malondialdehyde (MDA), protein carbonyls, superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase, and catalase. In addition, the aorta was isolated for histological analysis and measurement of vascular function. Aortic NOX mRNA expression was determined by real-time PCR. *S. samarangense* treatment reduced the levels of low density lipoprotein cholesterol, total cholesterol, total nitrate/nitrite, MDA and protein carbonyls, but increased SOD activity in serum of the hypercholesterolemic rats. In aortic rings from hypercholesterolemic rats endothelium-dependent relaxation to acetylcholine (ACh) was impaired whereas endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside was unaffected. Treatment with *S. samarangense* restored the ACh induced relaxation in hypercholesterolemic rat aortae. Aortic structural changes were observed in hypercholesterolemic rats but treatment with *S. samarangense* improved those changes. In addition *S. samarangense* decreased HCD-induced expression of NOX2 and NOX4 mRNA in aortic tissues. In conclusion, these results indicate that chronic *S. samarangense* treatment restores hypercholesterolemia-induced endothelial dysfunction possibly by decreasing oxidative stress and the gene expression of aortic NOX.

Keywords: *S. samarangense*, hypercholesterolemic, endothelium, NADPH_{oxidase}

บทคัดย่อ

ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงจะเพิ่มอัตราเสี่ยงโรคหัวใจและหลอดเลือด อนุมูลอิสระ superoxide ที่สร้างจาก NADPH oxidase (NOX) มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดความผิดปกติของการทำงานของหลอดเลือดในภาวะคอเลสเตอรอลสูง รายงานวิจัยล่าสุด พบว่า การเพิ่มการบริโภคผลไม้ สัมพันธ์กับการลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากผลชมพูทับทิมจันทร์ ต่อการทำงานของหลอดเลือด และการแสดงออกของ NOX mRNA ในหลอดเลือดแดงของหนูคอเลสเตอรอลสูง หนูคอเลสเตอรอลสูงจะถูกเหนี่ยวนำโดยการให้อาหารที่มี คอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ส่วนชมพูผง (50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว) จะให้โดยการป้อนหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (เริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5-สัปดาห์ที่ 8) หลังจาก 8 สัปดาห์ของการให้อาหาร ตัวอย่างเลือดถูกเก็บเพื่อวัดระดับไขมัน ปริมาณ nitrite/nitrate ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ปริมาณ protein carbonyls ปริมาณ superoxide dismutase (SOD), ปริมาณ glutathione reductase, และ ปริมาณ catalase. รวมทั้ง หลอดเลือดแดงจะถูกแยกเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างและทดสอบการทำงานของหลอดเลือด ส่วนการแสดงออกของ NOX mRNA ในหลอดเลือดวิเคราะห์โดย real-time PCR ผลการทดลองพบว่า ชมพูผงลดระดับ total cholesterol และ low density lipoprotein-cholesterol และ ปริมาณ nitrite/nitrate และ MDA และปริมาณ protein carbonyl แต่เพิ่ม ปริมาณ SOD ในซีรัม ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง ส่วนหลอดเลือดของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง การขยายตัวของหลอดเลือดแบบขึ้นกับเยื่อผนังหลอดเลือดโดยสาร acetylcholine (ACh) จะถูกทำลาย ขณะที่การขยายตัวของหลอดเลือดแบบไม่ขึ้นกับเยื่อผนังหลอดเลือดโดยสาร sodium nitroprusside ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อได้รับชมพูผง พบว่าจะช่วยฟื้นฟูการตอบสนองต่อ ACh ในหลอดเลือดของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง ส่วนโครงสร้างของหลอดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลงในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง และการให้ชมพูผงจะช่วยฟื้นฟูการเปลี่ยนแปลงนี้ รวมทั้ง ชมพูผงยังลดการแสดงออกของ NOX2 และ NOX4 ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดที่ถูกกระตุ้นโดยอาหารคอเลสเตอรอลสูง สรุปผลการศึกษา ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า การให้ชมพูทับทิมจันทร์ระยะยาวจะฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือดจากภาวะคอเลสเตอรอลสูง โดยอาจเป็นผลจากการลดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของยีน NOX ในหลอดเลือด

คำสำคัญ: ชมพูทับทิมจันทร์ ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เยื่อผนังหลอดเลือด NADPH oxidase

สารบัญ

| | หน้า |
|---|-------|
| Abstract | 1 |
| บทคัดย่อ | 2 |
| สารบัญ | 3-4 |
| สารบัญตาราง | 5-6 |
| สารบัญภาพ | 7-9 |
| สรุปโครงการ (Executive Summary) | 10-13 |
| บทนำ | 14-15 |
| วัตถุประสงค์โครงการ | 16 |
| วิธีการทดลอง | 17-24 |
| ผลการทดลอง | |
| ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) และ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู | 25-27 |
| ตอนที่ 2 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผงชมพู แบบ <i>in vitro</i> | 28-29 |
| ตอนที่ 3 ผลของการป้อนชมพูผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง | |
| 3.1 ผลต่อน้ำหนักตัว, ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับไขมันในเลือด | 30-35 |
| 3.2 . ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง | 36-42 |

| | |
|--|-------|
| 3.3 ผลต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด | 43-48 |
| 3.4 ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม | 49-50 |
| 3.5 ผลต่อการแสดงออกของ p47phox และ NOX4 ในหลอดเลือดแดง aorta | 51-52 |
| 3.6 ผลต่อการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 ในหลอดเลือด aorta | 53-55 |
| 3.7 ผลต่อความเป็นพิษหรือผลไม่พึงประสงค์ | 58 |
| อภิปรายผลการทดลอง | 59-62 |
| เอกสารอ้างอิง | 63-67 |
| ภาคผนวก | |
| 1. ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มต่างๆ | 68-69 |
| 2. เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ | 70-73 |
| 3. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์ | 74 |

สารบัญตาราง

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|--|------|
| 1 | Primer sequences สำหรับ real time RT-PCR assay | 23 |
| 2 | องค์ประกอบทางเคมีของผงชมพู | 26 |
| 3 | ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู | 26 |
| 4 | ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของผงชมพู | 28 |
| 5 | ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของผงชมพูทับทิมจันทร์ | 28 |
| 6 | ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของผงชมพู | 29 |
| 7 | ค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทกลุ่มต่างๆ | 32 |
| 8 | ค่า total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL, LDL ใน ซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ | 32 |
| 9 | ค่า atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มต่างๆ | 35 |
| 10 | ค่า MDA และ protein carbonyl ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ | 36 |
| 11 | ค่า SOD, catalase และ glutathione reductase ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ | 39 |
| 12 | ค่า pEC ₅₀ และ Rmax ต่อสาร ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ | 46 |
| 13 | ค่า pEC ₅₀ และ Rmax ต่อสาร SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ | 46 |

| ตารางที่ | | หน้า |
|----------|---|------|
| 14 | ค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมและในหลอดเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ | 49 |
| 15 | ค่า Renal function test ในหนูกลุ่มต่างๆ | 57 |
| 16 | ค่า Liver function test ในหนูกลุ่มต่างๆ | 57 |

สารบัญรูปภาพ

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 1 | กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับคำนวณหาปริมาณฟีนอลรวม | 18 |
| 2 | กราฟมาตรฐานของ Ferrous sulphate | 20 |
| 3 | ค่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 31 |
| 4 | ค่า total cholesterol (TC) ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 33 |
| 5 | ค่า LDL ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 33 |
| 6 | ค่า HDL ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 34 |
| 7 | ค่า triglyceride (TG) ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 34 |
| 8 | ค่า atherogenic index (AI) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 35 |

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 9 | ปริมาณ MDA ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 37 |
| 10 | ปริมาณ Protein Carbonyls ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 38 |
| 11 | ปริมาณ SOD ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 40 |
| 12 | ปริมาณ Catalase ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 41 |
| 13 | ปริมาณ glutathione reductase (GR) ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 42 |
| 14 | ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดดำของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) และ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA100) | 44 |
| 15 | การตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร ACh ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 47 |

| ภาพที่ | | หน้า |
|--------|---|------|
| 16 | การตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร SNP ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 48 |
| 17 | ปริมาณ Nitrate/Nitrite ในซีรัมและในหลอดเลือด aorta ของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 50 |
| 18 | การแสดงออกของ p47phox โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา ในหลอดเลือดเออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 51 |
| 19 | การแสดงออกของ NOX4โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) ในหลอดเลือดเออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 52 |
| 20 | การแสดงออกของยีน NOX2 ในหลอดเลือด aorta | 54 |
| 21 | การแสดงออกของยีน NOX4 ในหลอดเลือด aorta | 55 |
| 22 | ปริมาณ AST และ ALTในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) | 58 |

สัญญาเลขที่ RDG 5820008

สรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ของชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.วชิราวดี มาลากุล

หน่วยงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-964655 **โทรสาร** 055-964770 **อีเมล** wAChirawadeem@hotmail.com

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2008, พบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มี อัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ มีประมาณ 17.3 ล้านคน ในปี 2008 หรือ 30% ของอัตราการตายของประชากรโลก โดยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) ประมาณ 7.3 ล้านคนจากการคาดการณ์ของ The World Health Organization อัตราป่วยด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด จะมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี และอาจเพิ่มถึง 23.6 ล้านคน ในปี 2030 และทุกวันนี้ วงการแพทย์ยอมรับอย่างไม่มีข้อโต้แย้งแล้วว่า สาเหตุหนึ่งของโรคหัวใจ มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสิ่งที่ทุกคนรับประทานเข้าไป การบริโภคอาหารที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลสูง ถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น โดยระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงส่งผลเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกาย รวมทั้งในหลอดเลือด

ชมพู (Java apple, wax apple, หรือ rose apple) เป็นผลไม้ เขตร้อน (tropical fruit) ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีรสชาติดี ชมพูมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M.Perry var. *samarangense* หรือ *Eugenia javanica* L. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ พันธุ์ที่ที่คนนิยมบริโภค ได้แก่ พันธุ์ทับทิมจันทร์ ชมพูเพชรบุรี ชมพูมะเหมี่ยว ชมพูแก้มแหม่ม และชมพูนาก เป็นต้น มีรายงานวิจัยพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลของผลชมพูและในน้ำชมพู นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่า ชมพูนั้นอุดมไปด้วยสารพวก flavonoids ซึ่งสารพวกนี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์ลดการทำงานของเอนไซม์ NOX ในหลอดเลือดในการสร้างอนุมูลอิสระ แม้ว่าจะมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชมพู แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่ทดสอบผลของการบริโภคชมพูต่อระดับไขมัน และอนุมูลอิสระในเลือด และการแสดงออกของเอนไซม์ NOX ในหลอดเลือด รวมทั้งการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของชมพูแห่งต่อการแสดงออกของเอนไซม์ NOX ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด รวมทั้งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ประชาชนในและต่างประเทศได้ตระหนักถึงคุณค่าของผลไม้ไทยในด้านเสริมสุขภาพ และหันมาบริโภคผลไม้ไทยมากขึ้น และยังเป็นแนวทางพัฒนางานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการบริโภคชมพูผงเป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การลดระดับไขมันในเลือด ภาวะอ้วน และค่าดัชนีการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
2. การลดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอนไซม์ NADPH_{oxidases} (NOX) ในหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
3. ปริมาณสาร nitric oxide ในหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
4. โครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
5. ความเป็นพิษต่อไตและตับ

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) และ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของ ผงชมพู

เตรียมตัวอย่างชมพูผง โดยนำชมพูพันธุ์ทับทิมจันทน์ (*Syzygium samarangense*) มาทำแห้งแบบ ระเบิด (lyophilisation) ด้วยเครื่อง freeze dryer ก่อนนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี และ ปริมาณ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู (ปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณแอนโธไซยานินรวม)

ตอนที่ 2 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผงชมพู แบบ *in vitro*

นำชมพูผงทดสอบความสามารถต้านอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH radical scavenging, Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay และ ABTS assay

ตอนที่ 3 ผลของการป้อนชมพูผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1. สัตว์ทดลอง

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับอาหารปกติ และกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูง (HC) ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะ คอเลสเตอรอลสูง จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

หลังจากนั้นกลุ่ม HC ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะถูกแบ่งออกเป็น กลุ่มย่อยดังนี้

- 1.1 ไม่ได้รับชมพูผงแห้งใดๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (HC)
- 1.2 ป้อนชมพูผงแห้งที่ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (RA50)
- 1.3 ป้อนชมพูผงแห้งที่ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (RA100)
- 1.4 ป้อนยาลดไขมันมาตรฐาน simvastatin 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Sim)

หมายเหตุ ทุกกลุ่ม (1.1-1.4) ยังคงได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงตลอดการทดลอง

3.2 ผลต่อระดับไขมันในเลือด และค่า atherogenic index (AI)

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจากข้อ 3.1 จะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ ก่อนปั่นแยกซีรัม โดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้วัดระดับน้ำตาลในเลือด, ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จากสูตรการคำนวณของ Friedewald equation และคำนวณหาค่า atherogenic index (AI) เพื่อประเมินโอกาสเกิดโรค atherosclerosis

3.3 ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอมไซม์ NOX ในหลอดเลือด

3.3.1 ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซีรัมของหนูแต่ละกลุ่ม จะถูกนำมาวัดระดับปริมาณ MDA, protein carbonyl, SOD, GR และ catalase ซึ่งวิเคราะห์โดย Commercial assay kit

3.3.2 ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของเอมไซม์ที่ก่อให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรส (Oxidative stress) NOX ในหลอดเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำหลอดเลือด thoracic aorta ของหนูแต่ละกลุ่ม มาวิเคราะห์การแสดงออกของ NOX-4 และ p47 phox ซึ่งเป็น subunit ของ NOX-2 ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC) และวิเคราะห์การแสดงออกของยีนของ NOX-4 และ NOX 2 ด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction

3.4 ผลต่อโครงสร้าง และ การทำงานของหลอดเลือด และปริมาณสาร NO ในหลอดเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หลอดเลือดแดง thoracic aorta จะถูกแยกเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของผนังหลอดเลือด โดยการย้อม hematoxylin-eosin stain และทดสอบวัดการทำงานของหลอดเลือด โดยวิธี organ bath technique ส่วนปริมาณของ nitric oxide ในซีรัมและในหลอดเลือด โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ nitrite และ nitrate

3.5 ศึกษาความเป็นพิษหรือผลไม่พึงประสงค์

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซีรัมของหนูแต่ละกลุ่ม จะถูกนำมาวัดค่า SGOT และ SGPT เพื่อประเมินการทำงานของตับและวัดค่า BUN และ Cr เพื่อประเมินการทำงานของไต

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า ชมพู่มงจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และเมื่อการป้อนชมพู่มงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้หนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะลดปริมาณไขมันชนิดไม่ดี TC, LDL และ AI และลดอนุมูลอิสระ และยังลดการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 รวมทั้งยังเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ขึ้นกับเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม รวมทั้งยังฟื้นฟูโครงสร้างที่ผิดปกติของหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง นอกจากนี้ชมพู่มงยังเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เมื่อทดสอบความเป็นพิษต่อตับและไต พบว่าการบริโภคชมพู่มงเป็นระยะเวลา 4

สัปดาห์ไม่มีผลต่อการทำงานของไตและยังช่วยลดความเป็นพิษต่อตับที่เกิดจากการได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

สรุปผลการทดลอง

ชมพู่ผงอาจมีฤทธิ์ฟื้นฟูความผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือดในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ เพิ่มการทำงานของสาร NO และลดการแสดงออกของ NOX ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

จากรายงานของ The World Health Organization ในปี 2008, พบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มี อัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้ มีประมาณ 17.3 ล้านคน ในปี 2008 หรือ 30% ของอัตราการตายของประชากรโลก โดยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) ประมาณ 7.3 ล้านคน จากการคาดการณ์ของ The World Health Organization อัตราผู้ป่วยด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด จะมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี และอาจเพิ่มถึง 23.6 ล้านคน ในปี 2030 (1)

ทุกวันนี้ วงการแพทย์ยอมรับอย่างไม่มีข้อโต้แย้งแล้วว่า สาเหตุหนึ่งของโรคหัวใจและหลอดเลือดมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสิ่งที่ทุกคนรับประทานเข้าไป การบริโภคอาหารที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลสูง จะเพิ่มปริมาณ LDL-cholesterol ซึ่งจะเคลื่อนที่เข้าสู่ผนังหลอดเลือด ก่อนที่จะถูกออกซิเดชัน โดยสารอนุมูลอิสระในผนังหลอดเลือด กลายเป็น oxidized LDL ซึ่งจะถูกเก็บกินโดย macrophage กลายเป็น foam cell สะสมในผนังหลอดเลือด การสะสมของ foam cell จะก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในที่สุด ซึ่งการสะสมของ foam cell ในผนังหลอดเลือด ถือว่าเป็นอาการเริ่มต้นของกระบวนการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) การเกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็งนี้ อาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น (2-3) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ ถือว่าเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ในภาวะที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเรื้อรัง (4-5) โดยแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ superoxide anion ในเซลล์หลอดเลือดที่สำคัญ คือ เอ็มไซม์ NADPH_{oxidase} (6) นอกจาก สารอนุมูลอิสระ superoxide anion จะเป็นตัวก่อให้เกิดการสะสมของไขมันที่ผนังหลอดเลือด ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide (NO) ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ส่งผลทำลายเซลล์หลอดเลือด รวมทั้งการลดลงของสาร NO จะทำให้ความสามารถในการขยายหลอดเลือดลดลง จึงก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง ตามมาได้ (6-8) มีรายงานวิจัย พบว่า สัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงนั้น จะมีการทำงานของ NADPH_{oxidase} (NOX) และอนุมูลอิสระ superoxide anion เพิ่มขึ้นในหลอดเลือดแดง (9-10) รวมทั้งยังมีงานวิจัยที่ศึกษาการทำงานของหลอดเลือด พบว่าหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จะมีการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร Acetylcholine (ACh) น้อยกว่าหนูปกติ (11-13) ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของ เซลล์บุผนังหลอดเลือด และยังมีมีการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร sodium nitroprusside น้อยกว่าหนูปกติ ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (13) และมีการศึกษาโครงสร้างของผนังหลอดเลือด พบการเกิด atherosclerotic lesion ที่ผนังหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง (14-15) ดังนั้นถ้าสามารถลดระดับไขมันในเลือดและลดการทำงานของเอ็มไซม์ NOX หรือลดการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดเลือด จะช่วยลดภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดในผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด หรือแม้แต่รักษาภาวะไขมันในเลือดสูง มีราคาแพงและมักมีอาการข้างเคียง ดังนั้น การเลือกรับประทานอาหารที่ส่งเสริมสุขภาพ อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรคดังกล่าว เป็นที่ทราบกันดี ประเทศไทย เป็นประเทศที่มีจุดเด่นทางด้านเกษตรกรรม ซึ่งอุดมด้วยพืชผักผลไม้หลากหลาย ที่เป็นแหล่งของวิตามินและแร่ธาตุ และสารอื่นๆที่จำเป็นและมีประโยชน์

แก่ร่างกาย แต่ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันถึงสรรพคุณและประโยชน์ของผักผลไม้เหล่านี้ยังมีไม่มากนัก ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญในการศึกษาผลของการบริโภคผลไม้ในการยับยั้งความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดและความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด ในสภาวะที่บริโภคอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง ซึ่งอาจช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นการพัฒนาผลไม้ เพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้ป่วยกลุ่มนี้ อาจช่วยทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้น และลดค่าใช้จ่ายสำหรับยากกลุ่มนี้ที่มีราคาแพง

ชมพู่ (Java apple, wax apple, หรือ rose apple)) เป็นผลไม้ เขตร้อน (tropical fruit) ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีรสชาติดี คือหวานอมเปรี้ยว หรือมีรสหวานอ่อนๆ ไม่หวานจนเกินไป เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ชมพู่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Syzygium samarangense* (Blume) Merr. & L.M.Perry var. *samarangense* หรือ *Eugenia javanica* L. อยู่ในวงศ์ Myrtaceae ในประเทศไทยมีหลายพันธุ์ พันธุ์ที่คนนิยมบริโภค ได้แก่ พันธุ์ทับทิมจันทร์ ชมพู่เพชรบุรี ชมพู่มะเหมี่ยว ชมพู่แก้มแหม่ม และชมพู่ซาก เป็นต้น มีรายงานวิจัยพบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเอทานอลของผลชมพู่ และในน้ำชมพู่ (16-18) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่า ชมพู่ที่อุดมไปด้วยสารพวก flavonoids (18-20) ซึ่งสารพวกนี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์ลดการทำงานของเอนไซม์ NOX ในหลอดเลือดในการสร้างอนุมูลอิสระ และยังเพิ่มการทำงานของสาร NO ทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดดีขึ้น (21) แม้ว่าจะมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของชมพู่ แต่ยังไม่มีการวิจัยใดที่ทดสอบผลของการบริโภคชมพู่ต่อระดับไขมัน และอนุมูลอิสระในเลือด และการแสดงออกของเอนไซม์ NOX ในหลอดเลือด รวมทั้งการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของชมพู่แห้งต่อการแสดงออกของเอนไซม์ NOX ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด รวมทั้งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานให้ประชาชนในและต่างประเทศได้ตระหนักถึงคุณค่าของผลไม้ไทยในด้านเสริมสุขภาพ และหันมาบริโภคผลไม้ไทยมากขึ้น และยังเป็นแนวทางพัฒนางานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการบริโภคผงเป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ระดับไขมันในเลือด ภาวะอ้วน และค่าดัชนีการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
2. การเกิดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอนไซม์ NOX ในหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
3. ปริมาณสาร nitric oxide ในหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
4. โครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
5. ความเป็นพิษต่อไตและตับ

วิธีการทดลอง

วัตถุดิบและสัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลอง

1 วัตถุดิบ

ชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ (*Syzygium samarangense*) ซื้อจากตลาดสด จังหวัดมหาสารคาม ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2558 เลือกผลชมพูสีแดงเข้มในระยะแก่ ขนาด XL (ประมาณ 6-8 ผล/กก.) ที่มีลักษณะสมบูรณ์ ไม่มีรอยบุบที่ผล และมีน้ำหนักใกล้เคียงกัน เก็บรักษาโดยแช่เย็นที่อุณหภูมิ $10 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ในห้องปฏิบัติการคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จังหวัดมหาสารคาม จากนั้นหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาด 0.5×0.5 cm แล้วนำทำแห้งแบบระเหิด (lyophilisation) ด้วยเครื่อง freeze dryer ภายใต้อุณหภูมิ 0.50 Pa และอุณหภูมิ -45°C บดให้เป็นผง เก็บในขวดสีชาที่ปิดสนิท ที่อุณหภูมิ $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ก่อนนำไปวิเคราะห์ต่อไป

2. สัตว์ทดลอง

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 2 เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาเลยา มหาวิทยาลัยมหิดล การทดลองจะเริ่มต้นหลังจากได้รับสัตว์ทดลองมาพักที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองของ ม. นเรศวร เป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาจาก คณะกรรมการดูแลและกำกับการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) และ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู

1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ของผงชมพู

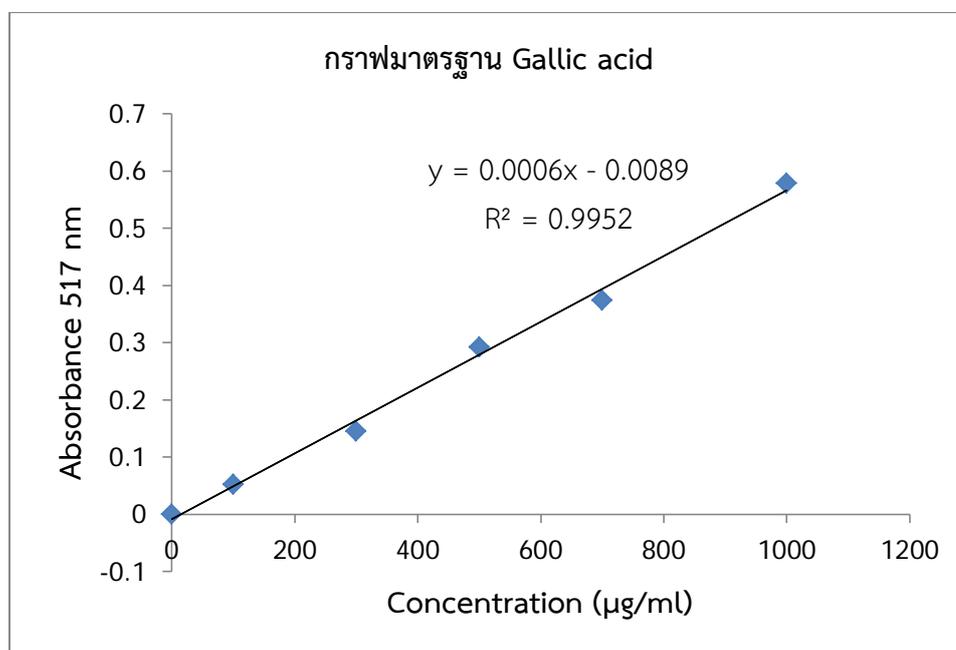
ผงชมพูที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดนำมาวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี (3 ซ้ำ) ดังนี้

- 1.1.1 ปริมาณความชื้น (moisture content) โดยใช้ตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ $102 \pm 2^{\circ}\text{C}$ (22)
- 1.1.2 ปริมาณเถ้า (Ash content) โดยวิธีการเผาแห้ง (Dry ashing) ที่อุณหภูมิ 550°C (22)
- 1.1.3 ปริมาณโปรตีน (Protein content) โดยวิธีของเจลดาลท์ (Kjeldahl method) (22)
- 1.1.4 ปริมาณไขมัน (Crude fat content) โดยวิธีซอกท์เลท (Soxhlet method) (22)
- 1.1.5 ปริมาณใยอาหารหยาบ (Crude fiber content) โดยวิธี Crude fiber method, (22)
- 1.1.6 ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (available carbohydrate) คำนวณจาก 100% ลบด้วยปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน และใยอาหารหยาบ
- 1.1.7 ปริมาณใยอาหาร (Total dietary fiber) โดยใช้ชุดทดสอบของ Megazyme International Ireland ตาม AOAC method (22)

2 การศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู

2.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม (Total phenolic compound)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ใช้ Folin-ciocalteu colorimetric method ดัดแปลงจาก Slinkard and Singleton (23) และ Simirgiotis et al. (24) โดยนำผงชมพูผงมาละลายในสารละลายเอทานอล 80% ที่ทำให้เกิดการสกัดบน magnetic stirrer นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 15 นาที ปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (3 ซ้ำ) ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติม Folin-ciocalteu phenol reagent จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ 3 นาที เติมสารละลาย Sodium carbonate anhydrous ความเข้มข้น 10% จำนวน 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้อีก 60 นาที และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานกรดแกลลิกความเข้มข้น 100, 300, 500, 700 และ 1000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร นำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานกรดแกลลิกไปสร้างกราฟมาตรฐานและสร้างสมการ linear regression คำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างจากกราฟมาตรฐานกรดแกลลิก รายงานค่าในรูปแบบ mg gallic acid /100 g sample



ภาพที่ 1 กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับคำนวณหาปริมาณฟีนอลรวม

2.2 ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม (Total flavonoid)

การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ใช้ Aluminium chloride colorimetric assay ดัดแปลงจาก Simirgiotis et al. (22) ละลายตัวอย่างผงของชมพู ในสารละลายเอทานอล 80% ที่ทำให้เกิดการสกัดบน magnetic stirrer นาน 20 นาที นำไปเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 3000 rpm นาน 10 นาที ปรับปริมาตรให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม (3 ซ้ำ) ปิเปตสารสกัดตัวอย่าง 0.3 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายเอทานอล 80% จำนวน 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติม 10% อะลูมิเนียมไตรคลอไรด์ ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) ปริมาตร 0.10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติม 5% โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) จำนวน 0.10

มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่น 2.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 40 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร เทียบกับสารมาตรฐานควอร์เซติน (quercetin)

2.3 ปริมาณแอนโทไซยานินรวม (Total anthocyanin content)

การวิเคราะห์ปริมาณแอนโทไซยานินรวม โดยใช้วิธี pH-differential spectrophotometer ดัดแปลงจาก Augusta et al. (25) และ Ranganna (26) สกัดแอนโทไซยานินออกจากชมพูผงโดยใช้ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 0.1% ในเมทานอล ทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำไปสกัดในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 30 นาที โดยเขย่าเป็นคราวๆ นำมากรองผ่านกระดาษกรอง นำของเหลวที่ได้ไปปรับปริมาตรให้เหมาะสม ก่อนปิเปตสารสกัดไปทำปฏิกิริยากับสารละลาย pH 1.0 buffer ของ 0.025 M KCl และ สารละลาย pH 4.5 buffer ของ 0.4 M CH₃COONa วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 510 nm และ 700 nm รายงานปริมาณของแอนโทไซยานินทั้งหมดในหน่วยมิลลิกรัมไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ต่อตัวอย่าง 100 กรัม

ตอนที่ 2 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชมพู แบบ *in vitro*

2.1 การทดสอบด้วยวิธี DPPH radical scavenging

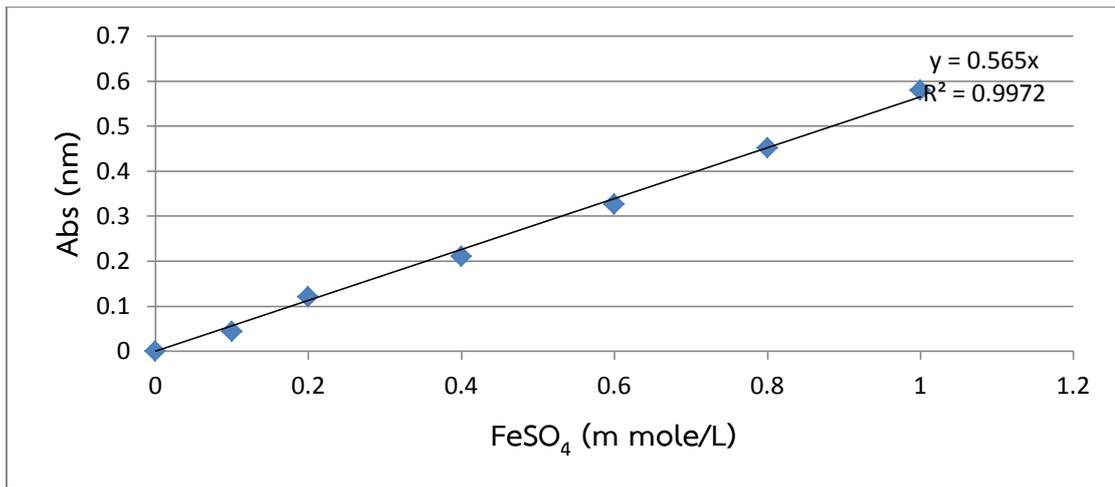
การทดสอบดัดแปลงจากวิธีการของ Titov (27) นำชมพูผงมาละลายในสารละลายเอทานอล 80% ให้มีความเข้มข้นต่างๆ ที่ทำให้เกิดการสกັดบน magnetic stirrer นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 15 นาที ถ้าตัวอย่างยังขุ่นอยู่ก็นำตัวอย่างมากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 ปิเปตสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง นำสิ่งที่สกัดที่ได้มาทำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl ใน Absolute ethanol 4.5 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมเข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 นาโนเมตร เทียบกับตัวอย่างควบคุม คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) โดยแทนค่าลงในสูตร

$$\%inhibition = [OD.control - OD.sample] / OD.control \times 100$$

รวมทั้งรายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในหน่วยความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น หรือค่า IC₅₀

2.2 การทดสอบด้วยวิธี Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay

ความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) ดัดแปลงจาก Benzie & Strain (28) นำชมพูผงมาละลายในสารละลายเอทานอล 80% ที่ทำให้เกิดการสกັดบน magnetic stirrer นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 15 นาที ถ้าตัวอย่างยังขุ่นอยู่ก็นำตัวอย่างมากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4) การวิเคราะห์เริ่มจากนำ FRAP reagent (ประกอบด้วย 10 mM acetate buffer ที่ pH 3.0, 10 mM 2,4,6-tripyridyl-1,3,5-triazine (TPTZ) และ 20 mM ferric chloride hexahydrate ในอัตราส่วน 25:2.5:2.5) จำนวน 3.6 mL มาผสมกับน้ำ 360 μ L ตามด้วยสารละลายตัวอย่าง 120 μ L บ่มทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 4 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 593 นาโนเมตร โดยใช้ FRAP reagent เป็นแบลนด์ นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐาน FeSO₄ • 7H₂O เพื่อหาความสามารถในการออกฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รายงานค่าเป็น mM FeSO₄ ต่อตัวอย่าง 1 g



ภาพที่ 2 กราฟมาตรฐานของ Ferrous sulphate

2.3 การทดสอบด้วยวิธี ABTS ดัดแปลงจาก Re et al. (29)

เตรียมตัวอย่างโดยนำผงชมพูผงมาละลายในสารละลายเอทานอล 80% ให้มีความเข้มข้นเหมาะสม ทำให้เกิดการสกัดบน magnetic stirrer นาน 20 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 rpm นาน 15 นาที ถ้าตัวอย่างยังขุ่นอยู่ก็นำตัวอย่างมากรอง ด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4) เตรียมอนุมูล ABTS โดยนำสารละลาย ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) เข้มข้น 7 mM ผสมกับสารละลาย potassium persulphate (K₂S₂O₈) เข้มข้น 2.45 mM เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง 12-16 ชั่วโมง เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ค่าการดูดกลืนแสง 0.7±0.02 ที่ความยาวคลื่น 734 nm

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS วิเคราะห์โดยผสมสารละลาย ABTS เจือจาง 4 มิลลิลิตรเข้ากับสารสกัดตัวอย่าง 40 ไมโครลิตร ที่ไว้นาน 6 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร เทียบกับตัวอย่างควบคุม คำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (%inhibition) โดยแทนค่าลงในสูตร

$$\%inhibition = [OD.control - OD.sample] / OD.control \times 100$$

นอกจากนี้รายงานความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในหน่วยความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่สามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้ 50% จากปริมาณอนุมูลอิสระเริ่มต้น หรือค่า IC₅₀

ตอนที่ 3 ผลของการป้อนชมพูผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

3.1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับอาหารปกติ และกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูง (HC) ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลสูง จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

หลังจากนั้นกลุ่ม HC ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย (n = 10) ดังนี้

1.1 ไม่ได้รับผงชมพูแห่งใดๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (HC)

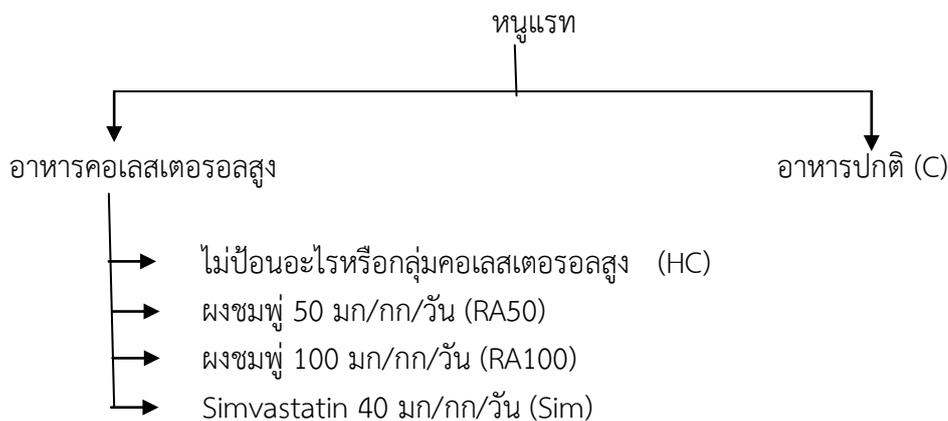
1.2 ป้อนผงชมพูที่ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (RA50)

1.3 ป้อนผงชมพูที่ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (RA100)

1.4 ป้อนยาลดไขมันมาตรฐาน simvastatin 40 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Sim)

หมายเหตุ

- ทุกกลุ่ม (1.1 – 1.4) ยังคงได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงตลอดการทดลอง
- ผงชมพูแห้งจะละลายใน distill water ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ก่อนป้อนสัตว์ทดลอง โดยจะเตรียมใหม่ทุกวัน



3.2. การแยกหลอดเลือด thoracic aorta

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทุกกลุ่ม จะถูกทำให้สลบด้วย pentobarbital sodium 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของหลอดเลือด โครงสร้างของหลอดเลือด และการแสดงออกของ NOX

3.3 ฤทธิ์ต่อภาวะอ้วน ระดับของไขมันในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือดและ atherogenic index (AI)

ทุกสัปดาห์ หนูทุกกลุ่มจะถูกชั่งน้ำหนัก เพื่อประเมินภาวะอ้วน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทุกกลุ่ม จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะเจาะเลือดที่หัวใจ เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) ในซีรัม โดยใช้ commercial test kit

จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จากสูตรการคำนวณของ Friedewald equation

$$LDL = TC - HDL - TG/5$$

และคำนวณหาค่า atherogenic index (AI) เพื่อประเมินโอกาสเกิดโรค atherosclerosis จากสูตร

$$AI = (TC - HDL)/HDL$$

3.4 ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอมไซม์ NOX ในหลอดเลือด

3.4.1 ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ ก่อนปั่นแยกซีรัมโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้วัดระดับปริมาณ MDA, protein carbonyl, SOD, GR และ catalase ซึ่งวิเคราะห์โดย commercial assay kit

3.4.2 ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของเอมไซม์ที่ก่อให้เกิดภาวะออกซิเดทีฟสเตรส (Oxidative stress) NOX ในหลอดเลือด

3.4.2.1 การศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมีสตรี้ (Immunohistochemistry, IHC)

วัดการแสดงออกของ NOX4 และ p47 phox ซึ่งเป็น subunit ของ NOX2 โดยตัดเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ผึ่งในพาราฟินให้มีความหนา 3 ไมครอน ก่อนนำไปผ่าน กระบวนการละลายพาราฟิน (deparaffinization) และกำจัด endogenous peroxidase ด้วย 0.3% H₂O₂ in methanol เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นแช่สไลด์ใน 10 mM citrate buffer (pH 6) ที่ 95-100 C เป็นเวลา 20 นาที เพื่อทำ antigen retrieval แล้วล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้นหยด 10% normal goat serum ใน PBS pH 7.4 เพื่อเป็นการ ยับยั้ง nonspecific site ซึ่งจะทำให้ back ground ลดลง จากนั้นหยด Polyclonal anti-NOX-4 antibody (1:50) หรือ anti p47phox antibody (1:50) นำไปอบใน humidified chamber ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้น เติม biotinylated secondary antibody แล้ว นำไป developed ใน 0.03 % diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) และ counterstaining ด้วย hematoxilin ตามด้วยกระบวนการ dehydration, mount เสร็จแล้วนำไปดูด้วย กล้องจุลทรรศน์ การแปลค่าที่เกิดขึ้น ถ้าติดสีน้ำตาลหมายถึงบริเวณที่ มีการแสดงออกของ NOX-4 หรือ p47 phox ถ้าไม่มีสีแสดงว่า ไม่มีการแสดงออกของ NOX-4 หรือ p47 phox ส่วนนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำเงิน

3.4.2.2 การศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RT-qPCR (Reverse Transcription quantitative real-time Polymerase Chain Reaction)

ศึกษาการแสดงออกของ NOX-2 และ NOX-4 ในหลอดเลือดแดงด้วยเทคนิค RT-qPCR โดยแยกหลอดเลือดแดง Thoracic Aorta ไปแช่ใน cold RNAlater® solution (Ambion™) เพื่อ inactivated RNase ในขั้นตอนการกำจัด connective และ fat tissue ออก นำหลอดเลือดมาล้างด้วยสารละลาย Cold Phosphate Buffer Saline (AMRESCO®) เพื่อล้างเลือดและ RNAlater ออก ก่อนทำการสกัดแยก mRNA ด้วย TRIzol solution (Invitrogen) และ Aurum™ Total RNA Mini Kit (BIO-RAD) นำ mRNA 100 ng ที่สกัดได้เพื่อเป็นแม่แบบในการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) ด้วยชุดน้ำยา iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BIO-RAD) จากนั้นใช้ cDNA ที่สังเคราะห์ได้เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 ด้วยเทคนิค RT-qPCR ด้วยเครื่อง Thermal cycling (BIO-RAD) และชุดน้ำยา iQ™ SYBR® Green Supermix และ Specific Primers ต่อยีน NOX2 และ NOX4 และใช้ Beta-actin เป็น Internal Control รายละเอียดของ Primers สำหรับ Sprague-Dawley Rat (Run BLAST GenBank taxid: 10116) ดังแสดงในตารางที่ 1 และวิเคราะห์อัตราการแสดงออกสัมพัทธ์ (Relative expression ratio) โดยใช้หลักการ dCT Behandlung-dCT Kontrolle

ตารางที่ 1 Primer sequences สำหรับ real time RT-PCR assay.

| Gene | Primer Name | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') |
|--|----------------|--------------------------|-------------------------|
| <u>Superoxide -generating Enzymes</u> | | | |
| NADPH oxidase 2 | NOX2 | CCCTTTGGTACAGCCAGTGAAGAT | CAATCCCAGTCCCCTAACATCA |
| NADPH oxidase 4 | NOX4 | GGATCACAGAAGGTCCTAGCAG | GCAGCTACATGCACACCTGAGAA |
| <u>Control Gene</u> | | | |
| Beta-actin | β -actin | AGGCCAACCGTGAAAAGATG | ACCAGAGGCATACAGGGACAA |

3.5 ฤทธิ์ต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด

3.5.1 การตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือด

หลังจากแยกหลอดเลือดออกมา ให้นำไปล้างด้วย normal saline ซับให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปแช่ overnight ใน 10% buffered formalin solution เมื่อครบระยะเวลา นำชิ้นเนื้อไป ทำบล็อกชิ้นเนื้อใน paraffin นำเอาชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านการ embedded ลงใน paraffin บล็อกเรียบร้อยแล้ว มาตัดออกเป็น เนื้อเยื่อแผ่นบางๆ (paraffin section) หลังจากนั้นนำไปย้อม hematoxylin-eosin stain เพื่อวิเคราะห์หา การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังหลอดเลือด

3.5.2 ฤทธิ์ต่อการทำงานของหลอดเลือด

เพื่อศึกษาความสามารถในการหดตัวของหลอดเลือดแดง สาร PE ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะถูกหยดลง organ bath ที่มีเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูทุกกลุ่ม และเพื่อ ศึกษาความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดแดง เนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ จะถูกเหนี่ยวนำให้ตัวระดับปานกลางด้วยสาร phenylephrine (10^{-9} - 10^{-5} M) ก่อนที่หยด สาร acthylcholine (ACh) ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อ ประเมินสภาพของเซลล์บุผนังหลอดเลือด หรือ สาร sodium nitroprusside (SNP) ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อประเมินสภาพของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด

3.5.3 ฤทธิ์ต่อปริมาณ nitric oxide

นำซีรัมหรือ aortic homogenate จากหนูทุกกลุ่ม มาวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide โดย วิเคราะห์จากปริมาณผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ total nitrite และ nitrate โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit

3.6. ศึกษาความเป็นพิษหรือผลไม่พึงประสงค์

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทุกกลุ่ม จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะเจาะเลือดที่ หัวใจ เพื่อวัดค่าน้ำตาลในเลือด โดยเครื่องวัดน้ำตาล Accu chek และการวัดค่า SGOT และ SGPT เพื่อ ประเมินการทำงานของตับและวัดค่า BUN และ Cr เพื่อประเมินการทำงานของไต

4. วิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองนี้ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป mean \pm SEM ค่าการคลายตัวของหลอดเลือดแดง จะวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การตอบสนองเมื่อเทียบกับค่าหดตัวสูงสุดที่กระตุ้นด้วย PE ซึ่งแสดงค่าในรูปของความไวของการตอบสนองของสาร (Sensitivity; pEC₅₀) กับ ค่าการคลายตัวสูงสุด (Rmax) โดยค่า pEC₅₀ จะคำนวณจากกราฟการตอบสนองของหลอดเลือดแดงต่อสาร ACh หรือ SNP โดยแสดงค่าในรูป negative log molar concentration ของสาร ACh หรือ SNP ที่ให้ผลขยายหลอดเลือดที่ 50% ของการคลายตัวสูงสุด (-log EC₅₀) ซึ่งค่านี้จะถูกคำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 5 ส่วนค่า Rmax คือการคลายตัวสูงสุดของหลอดเลือด ที่เกิดจากการให้ ACh หรือ SNP ซึ่งวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัวเมื่อเทียบกับค่าหดตัวสูงสุดที่กระตุ้นด้วย PE

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P<0.05

ผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) และ ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู

1.1 ผลการศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ของผงชมพู

ชมพูทับทิมจันทร์ เป็นผลไม้ที่เป็นที่ต้องการของตลาดชนิดหนึ่ง มีลักษณะเด่น คือ ผลใหญ่ เนื้อแน่น มีลักษณะคล้ายระฆังคว่ำ มีผิวมันสีแดงสด ไม่มีเมล็ด และมีรสชาติหวาน ในงานวิจัยนี้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (proximate composition) ได้แก่ ปริมาณความชื้น เถ้า ไขมัน โปรตีน โยอาหาร และคาร์โบไฮเดรตของชมพูทับทิมจันทร์ที่ผ่านการทำแห้งแบบระเหิดที่อุณหภูมิ -45°C และบดเป็นผง ได้ผลแสดงดังตารางที่ 1

ผงชมพูทับทิมจันทร์ มีปริมาณความชื้นโดยเฉลี่ย $16.00\pm 0.38\%$ w/w ซึ่งลดลงจากปริมาณความชื้นของชมพูสด ที่มีรายงานก่อนหน้าว่ามีค่ามากกว่า 80% ขึ้นไปในชมพู Milk apple (*Syzygium malaccense*), Malay apple [*Syzygium malaccense* (L.) Merr. and Perry] และ Water apple (*Syzygium aqueum*) ตามรายงานงานวิจัยของ Lim and Rabeta (30) และมีค่าอยู่ระหว่าง 90.07-92.58% w/w ในชมพู *Syzygium malaccense* สายพันธุ์ Semarang Rose และ Kristal Taiwan ตามงานวิจัยของ Rosnah et al. (31) และ Oyinlade (32) ปริมาณความชื้นที่ลดลงนี้ทำให้ผงชมพูมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้สารอาหารต่างๆ มีความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นด้วย (Singh, 2001) โดยพบว่า ผงชมพูมีปริมาณไขมัน โปรตีน และเถ้า 2.79 ± 0.24 , 3.85 ± 0.14 และ $2.32\pm 0.18\%$ w/w ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งเพิ่มขึ้นจากชมพูสดที่มีการรายงานค่าไขมันไว้ 0.24-0.37% w/w โปรตีนระหว่าง 0.12-1.21% w/w และเถ้าระหว่าง 0.33-0.85% w/w ในงานวิจัยของ Lim and Rabeta (30) หรือตามงานวิจัยของ Oyinlade (32) ที่รายงานค่าไขมัน โปรตีนและเถ้าเฉลี่ยของชมพู *Syzygium malaccense* ไร่ที่ $0.20\pm 0.02\%$ w/w, $0.55\pm 0.02\%$ w/w และ $0.30\pm 0.02\%$ w/w ตามลำดับ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบปริมาณไขมัน โปรตีนและเถ้าของชมพู *Syzygium malaccense* สายพันธุ์ Semarang Rose และ Kristal Taiwan ที่ผ่านการทำแห้งโดยการอบแห้งที่ 63°C นาน 48 ชั่วโมง ในงานวิจัยของ Rosnah et al. (31) และรายงานค่าไว้ 0.07-0.12% w/w, 4.00-5.61% w/w และ 2.77-3.41% w/w ตามลำดับ จะเห็นได้ว่ามีปริมาณโปรตีนและเถ้าที่ใกล้เคียงกัน

สำหรับองค์ประกอบหลักในผงชมพูทับทิมจันทร์ พบว่า เป็นสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาณ $75.04\pm 0.13\%$ w/w ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นหลังการทำแห้งชมพูสดที่มีการรายงานค่าไว้ระหว่าง 6.74-12.68% w/w (30, 32) แบ่งเป็นโยอาหารหยาบที่มีปริมาณเฉลี่ย $5.19\pm 0.04\%$ w/w (จากโยอาหารทั้งหมด $8.86\pm 0.02\%$ w/w) เพิ่มขึ้นจากชมพูสดที่มีการรายงานค่าโยอาหารหยาบไว้ที่ 0.86 -1.81% w/w (30, 32) ซึ่งปริมาณโยอาหารที่วิเคราะห์ได้มีความใกล้เคียงกับชมพู *Syzygium malaccense* สายพันธุ์ Semarang Rose และ Kristal Taiwan ที่ผ่านการอบแห้งที่ 63°C นาน 48 ชั่วโมง ตามงานวิจัยของ Rosnah et al. (31) ซึ่งรายงานค่าไว้ระหว่าง 3.92-5.61% w/w ส่วนคาร์โบไฮเดรตกลุ่มที่เหลือมีความเป็นไปได้ว่าเป็นกลุ่มของน้ำตาล ซึ่งตามรายงานของ Rosnah et al. (31) พบน้ำตาลชนิดหลักในชมพูพันธุ์ Semarang Rose และ Kristal Taiwan เป็นน้ำตาลฟรักโทสในปริมาณ 4.77-9.25% w/w รองลงไปเป็นน้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่มีปริมาณ 3.53-8.37% w/w และ 0.19- 1.51% w/w ตามลำดับ

ตาราง 2 องค์ประกอบทางเคมีของผงชมพู

| องค์ประกอบ | ปริมาณ* (% w/w) |
|--|-----------------|
| ความชื้น | 16.00±0.38 |
| ไขมัน (Crude fat) | 2.79±0.24 |
| โปรตีน (Crude protein) | 3.85±0.14 |
| เถ้า (ash) | 2.32±0.18 |
| คาร์โบไฮเดรต (Available Carbohydrates) | 75.04±0.13 |
| ใยอาหารหยาบ (Crude fibre) | 5.19±0.04 |
| ใยอาหารทั้งหมด (Total dietary fibre) | 8.86±0.02 |

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำ 3 ซ้ำ

1.2 ผลการศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณฟีนอลิกรวม ปริมาณฟลาโวนอยด์รวมและปริมาณแอนโทไซยานินรวมในผงชมพูที่บดหยาบที่ผ่านการทำให้แห้งแบบระเหิด ซึ่งสารออกฤทธิ์เหล่านี้ จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่มีรายงานว่าช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจอุดตัน รวมทั้งลดความเสี่ยงในการเกิดโรคมะเร็งได้ (33).

ในการวิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกรวม ด้วยวิธี Folin–Ciocalteu พบว่ามีค่าเฉลี่ย 872.69±73.18 มิลลิกรัมแกลลิก/100 กรัม ข้อมูลนี้ใกล้เคียงกับชมพู *S. jambos* และ *S. malaccense* ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบระเหิดในงานวิจัยของ Reynertson *et al.* (33) ที่รายงานปริมาณสารฟีนอลิกทั้งหมด 8.69 และ 8.58 มิลลิกรัมแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม แต่ยังมีปริมาณน้อยกว่าชมพู *S. samarangense* และ *S. samarangense* var. *Taiwan pink* ที่รายงานค่าสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดระหว่าง 18.0-23.8 มิลลิกรัมแกลลิกต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ในขณะที่ Simirgiotis *et al.* (34) พบสารฟีนอลิกทั้งหมดในเนื้อของชมพู *S. samarangense* Merr. & Perry (Blume) ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบระเหิดในปริมาณ 460±0.0 มิลลิกรัมแกลลิก/100 กรัม ซึ่งมีค่าน้อยกว่าผลงานวิจัยในตารางที่ 3

ตาราง 3 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผงชมพู

| สารออกฤทธิ์ | ปริมาณ* |
|--|--------------|
| Total phenolics (mg GAE/100 g) | 872.69±73.18 |
| Total flavonoid (mg QE /100 g) | 148.21±24.12 |
| Total anthocyanin (mg cyaniding-3-glucoside/100 g) | 11.66±2.26 |

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำ 3 ซ้ำ

จากตารางที่ 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์รวม ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric assay พบปริมาณเฉลี่ย 148.21±24.12 มิลลิกรัมเคอร์ซีติน/100 กรัม ซึ่งตามรายงานของ Reynertson *et al.* (33) ชนิดสารฟลาโวนอยด์ที่พบในชมพูแตกต่างกันตามสายพันธุ์ โดยพบ Ellagic acid, Quercetin และ Quercitrin ในชมพู *S. jambos* และพบ Ellagic acid, Quercetin และ Rutin ใน *S. malaccense* ส่วนชมพู *S. samarangense* พบ Ellagic acid, Quercetin และ Quercitrin และชมพู *S. samarangense* var. *Taiwan pink* พบ Quercetin Quercitrin และ Rutin ซึ่งฟลาโวนอยด์เหล่านี้แต่ละ

ชนิดพบมากกว่า 0.01 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม แต่ไม่เกิน 0.09 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแห้ง 1 กรัม ในขณะที่ Simirgiotis et al. (34) รายงานปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในเนื้อของชมพู *Syzygium samarangense* Merr. & Perry (Blume) ที่ผ่านการทำให้แห้งแบบระเหิดจำนวน 290.40 ± 0.0 มิลลิกรัมเคอร์ซีติน/100 กรัม ซึ่งมีค่ามากกว่าผลวิจัยที่ได้ในตารางที่ 3

เมื่อพิจารณาปริมาณแอนโธไซยานินรวมที่วิเคราะห์โดย pH-differential method พบว่า ผงชมพูมีแอนโธไซยานินเฉลี่ย 11.66 ± 2.26 mg cyaniding-3-glucoside/100 g ในขณะที่งานวิจัยของ Reynertson et al. (2008) รายงานค่าแอนโธไซยานินทั้งหมดในชมพู *S. samarangense* และ *S. samarangense* var. *Taiwan pink* ไว้ที่ 0.07 และ 1.35 mg cyaniding-3-glucoside/ g dry weight ส่วนชมพู *S. malaccense* ตรวจพบแอนโธไซยานินในปริมาณเล็กน้อย (ต่ำกว่า 0.01 mg/g) และตรวจไม่พบในชมพู *S. jambos*

นอกจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพข้างต้นแล้ว Oyinlade (32) รายงานว่าชมพู Malay apple (*S. malaccense* (L.) ยังมีวิตามินซี ซึ่งมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบอยู่ในปริมาณที่สูงกว่าผลหว่า (*Syzygium cumini*) และผลแอปเปิ้ล (*Malus sylvestris*) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยมีความเข้มข้น 4.57 mg/ 100 g อีกทั้งยังมีสารพฤกษเคมีที่เป็นกลุ่มของสารประกอบแทนนิน อัลคาลอยด์และซาโปนินด้วย

ตอนที่ 2 การศึกษาความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของผงชมพู แบบ *in vitro*

จากการวิเคราะห์ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของผงชมพูทับทิมจันทร์ โดยวิธี DPPH radical-scavenging, ABTS radical-scavenging และ Ferric reducing antioxidant power ได้ผลแสดงในตารางที่ 3-5

เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของผงชมพูที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ตารางที่ 3) พบว่า เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% inhibition) เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น กล่าวคือ เพิ่มขึ้นจาก 26.79% ที่ความเข้มข้น 1.16 mg/mL เป็น 87.56% ที่ความเข้มข้น 4.10 mg/mL และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารมาตรฐานวิตามินซีต่อ 100 กรัม พบว่า ผงชมพูที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH• เทียบเท่ากับ 13.39±1.87 มิลลิกรัมของสารมาตรฐานวิตามินซีต่อ 100 กรัมตัวอย่าง (mg vitamin C equivalent /100 g sample)

ตาราง 4 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ของผงชมพู

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % inhibition* |
|---------------------|---------------|
| 1.16 | 26.79±0.15 |
| 2.32 | 53.59±2.71 |
| 3.55 | 73.92±2.66 |
| 4.10 | 87.56±0.34 |

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำ 3 ซ้ำ

สำหรับผลการวิเคราะห์กิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของผงชมพูที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 5 ซึ่งเป็นไปในลักษณะเดียวกับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ DPPH คือ เปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น จาก 14.73% ที่ความเข้มข้น 0.58 mg/mL เป็น 75.10% ที่ความเข้มข้น 3.09 mg/mL และเมื่อเปรียบเทียบกับความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•⁺ ของสารมาตรฐานวิตามินซีต่อ 100 กรัม พบว่า ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS•⁺ เทียบเท่ากับ 2.00±0.29 มิลลิกรัมของสารมาตรฐานวิตามินซีต่อ 100 กรัมตัวอย่าง

ตาราง 5 ฤทธิ์การยับยั้งอนุมูลอิสระ ABTS ของผงชมพูทับทิมจันทร์

| ความเข้มข้น (mg/mL) | % inhibition* |
|---------------------|---------------|
| 0.58 | 14.73±2.99 |
| 0.90 | 23.36±0.75 |
| 3.09 | 75.10±1.15 |

หมายเหตุ: *ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการทำ 3 ซ้ำ

นอกจากการวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอนุมูลอิสระ (% Inhibition) ยังมีกรรายงานเป็น ค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารต้านออกซิเดชันที่ทำให้ความเข้มข้นของอนุมูลอิสระ DPPH หรือ ABTS ลดลง 50% ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 สารสกัดเมทานอลของผง

ชมพู่มีค่า DPPH IC₅₀ และ ABTS IC₅₀ เท่ากับ 2.33 และ 2.06 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารมาตรฐานกรดแอสคอร์บิก (วิตามินซี) มีค่าฤทธิ์ยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ลดลง 50% เท่ากับ 2.70 และ 1.65 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) สำหรับการวัดสมบัติการต้านออกซิเดชันอีกวิธีหนึ่งที่วิเคราะห์ คือ วิธี FRAP ซึ่งเป็นการวัดความสามารถรวมในการรีดิวซ์ สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอริก (Fe³⁺ - tripyridyltriazine) ให้ได้สารประกอบเชิงซ้อนของเหล็กเฟอร์รัส Fe²⁺ - TPTZ พบว่า ผงชมพูทับทิมจันทร์มีความสามารถในการรีดิวซ์ (Reducing power) เท่ากับ 0.90±0.05 mM FeSO₄ ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

ตาราง 6 ความสามารถในการยับยั้งอนุมูลอิสระของผงชมพู

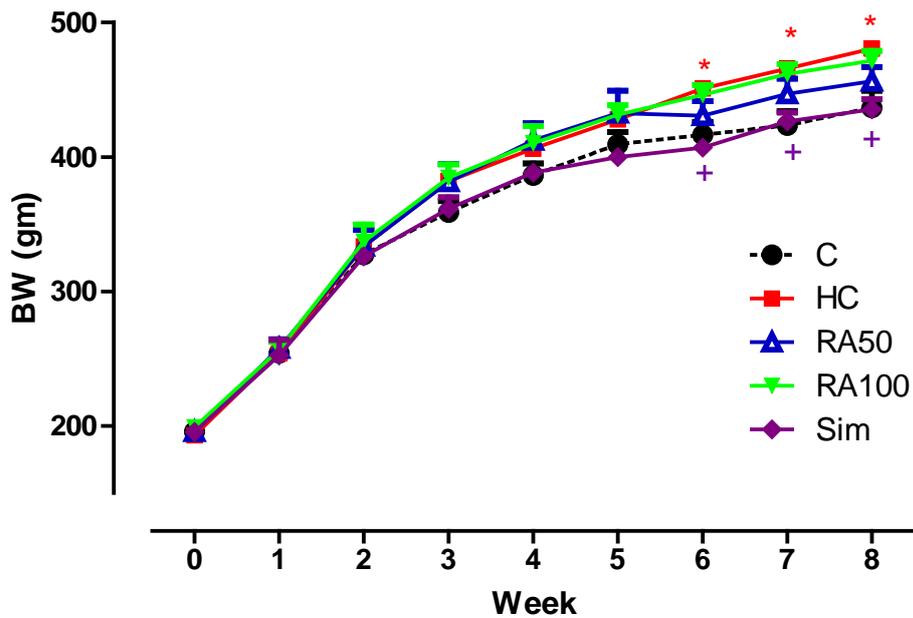
| สมบัติต้านอนุมูลอิสระ | ค่าที่ได้ |
|---------------------------------------|-----------|
| DPPH IC ₅₀ (mg/mL) | 2.33 |
| ABTS IC ₅₀ (mg/mL) | 2.06 |
| FRAP Power (mM FeSO ₄ /g) | 0.90±0.05 |

ตอนที่ 3 ผลของการป้อนนมผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

3.1 ผลต่อน้ำหนักตัว, ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับไขมันในเลือด

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงได้รับนมผงที่ความเข้มข้น 50 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า น้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว ตลอด 8 สัปดาห์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่หนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงได้รับสาร simvastatin ซึ่งเป็นยาลดไขมันในเลือด จะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึงสัปดาห์ที่ 8 แสดงว่า การป้อนนมผงไม่มีผลลดน้ำหนักตัวของหนูแรทที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (ภาพที่ 3) นอกจากนี้ หนูทุกกลุ่มจะมีระดับน้ำตาลในเลือด ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการได้รับนมผงไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง (ตารางที่ 7)

ค่า TC, triglyceride , LDL และ atherogenic index ในหนูกลุ่มคอเลสเตอรอลสูงจะมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม ขณะที่ค่า HDL ในหนูกลุ่มคอเลสเตอรอลสูงจะน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุม และการได้รับนมผงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะมีผลลดระดับ TC, LDL และ atherogenic index อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยไม่มีผลต่อค่า triglyceride และ HDL ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง (ตารางที่ 8 และภาพที่ 4-7) ส่วนค่าดัชนีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดตีบ ในหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจะมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม และเมื่อป้อนนมผง หรือสาร simvastatin จะลดค่าดัชนีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดตีบ ดังแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 8



ภาพที่ 3 แสดงค่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิอนซมฟุง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิอนซมฟุง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิอน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ตารางที่ 7 แสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทกลุ่มต่างๆ

| | Blood glucose (mg/dl) |
|-------|-----------------------|
| C | 108 ± 5 |
| HC | 128 ± 8 |
| RA50 | 110 ± 5 |
| RA100 | 115 ± 6 |
| Sim | 112 ± 8 |

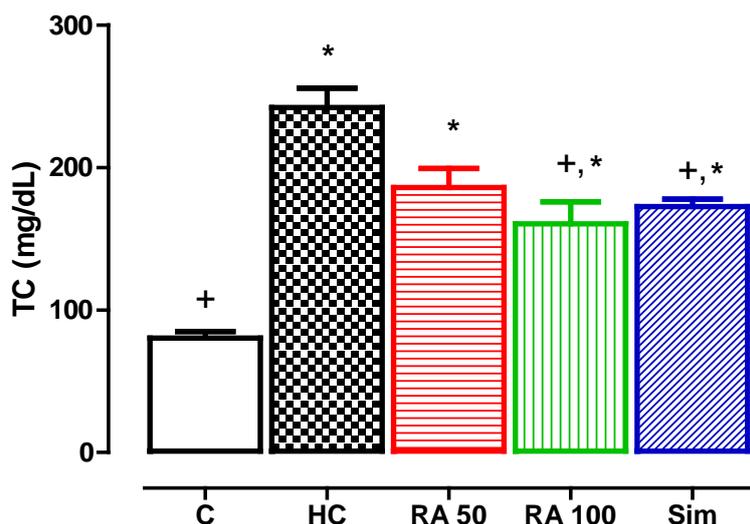
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 8 แสดงค่า total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL, LDL ใน ซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

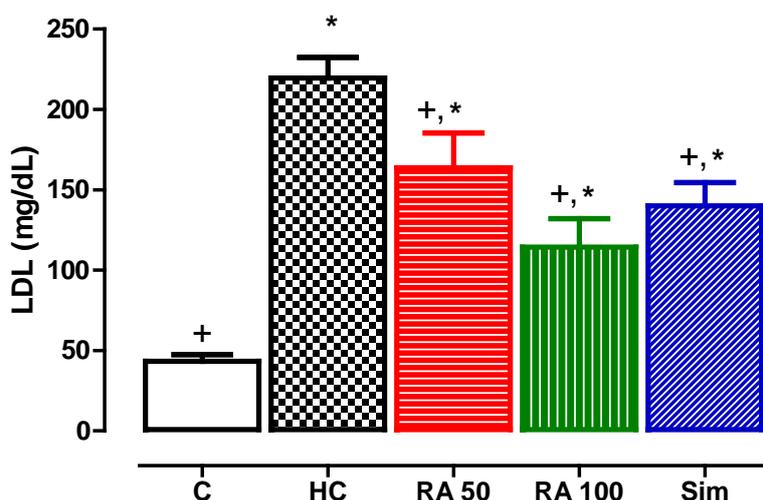
| กลุ่ม | ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | | |
|-------|----------------------------------|---------------------|---------------------|-------------------------|
| | TC (mg/dl) | TG (mg/dl) | HDL (mg/dl) | LDL (mg/dl) |
| C | 80 ± 5 ⁺ | 55 ± 6 ⁺ | 44 ± 4 ⁺ | 43 ± 4 ⁺ |
| HC | 242 ± 13* | 86 ± 4* | 27 ± 2* | 219 ± 12* |
| RA50 | 185 ± 13* | 72 ± 4 | 28 ± 3 | 163 ± 21* ⁺ |
| RA100 | 160 ± 15* ⁺ | 71 ± 8 | 32 ± 4 | 114 ± 17* ⁺ |
| Sim | 172 ± 5* ⁺ | 78 ± 4 | 27 ± 1 | 140 ± 14 * ⁺ |

*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

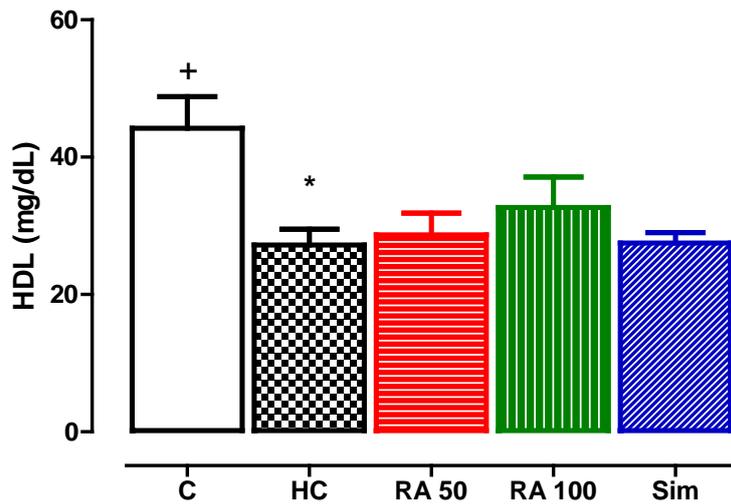
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบ่อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



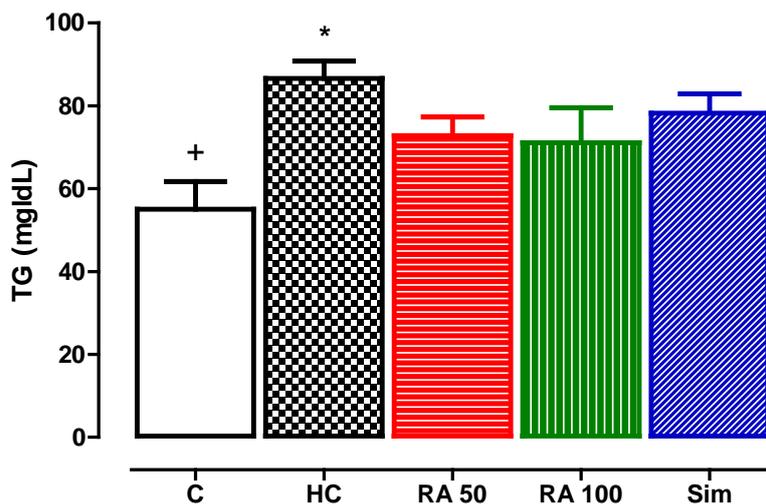
ภาพที่ 4 แสดงค่า total cholesterol (TC) ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



ภาพที่ 5 แสดงค่า LDL ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



ภาพที่ 6 แสดงค่า HDL ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซมฟุง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิออนซมฟุง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิออน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, $^+P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



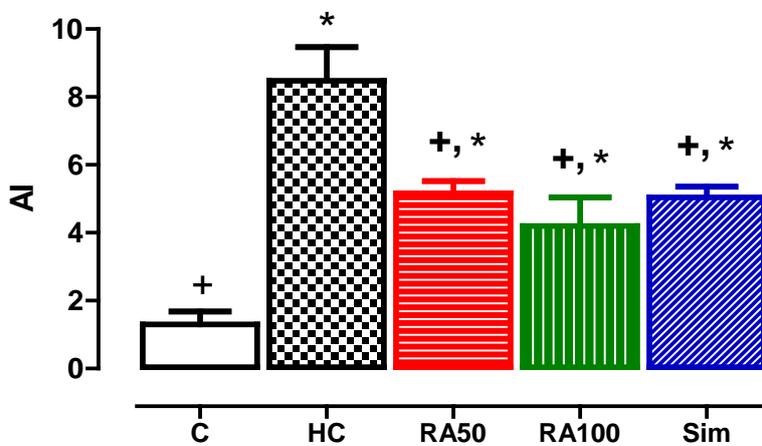
ภาพที่ 7 แสดงค่า triglyceride (TG) ในซีรัมในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซมฟุง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิออนซมฟุง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิออน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, $^+P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ตารางที่ 9 แสดงค่า atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | Atherogenic index (AI) |
|--------------|-------------------------|
| C | 1.3 ± 0.3 ⁺ |
| HC | 8.5 ± 0.9* |
| RA 50 mg/kg | 5.1 ± 0.3* ⁺ |
| RA 100 mg/kg | 4.2 ± 0.8* ⁺ |
| Sim | 5.1 ± 0.3* ⁺ |

*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซิมฟูง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซิมฟูง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออน simvastatin โดยบิออนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 8 แสดงค่า atherogenic index (AI) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซิมฟูง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิออนซิมฟูง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิออน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

3.2. ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

จากตารางที่ 10 และภาพที่ 9 แสดงค่า MDA ในซีรัม ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้การเกิดภาวะออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) พบว่า หนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจะมีปริมาณ MDA ในซีรัมมากกว่าหนูที่ได้รับอาหารปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อป้อนชมพู่ง (50 หรือ 100 มก/กก) หรือ simvastatin เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดปริมาณ MDA ในซีรัม จากตารางที่ 10 และภาพที่ 10 แสดงค่า protein carbonyls ในซีรัม ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้การเกิดภาวะออกซิเดชันของโปรตีน (protein oxidation) พบว่า ปริมาณ protein carbonyls ในหนูที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูง มีค่ามากกว่า หนูกลุ่มควบคุม และค่านี้จะลดลง เมื่อป้อนชมพู่ง (100 มก/กก) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากผลการทดลองข้างต้น แสดงว่า การบริโภคชมพู่ง อาจช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันและโปรตีนในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

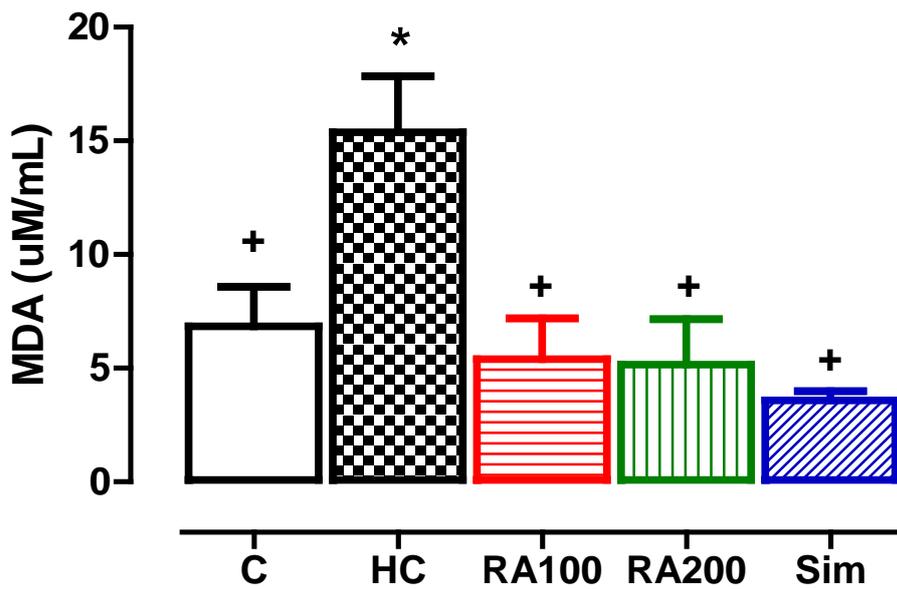
จากตารางที่ 11 และภาพที่ 11-13 แสดงค่า enzyme ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD, catalase และ glutathione reductase ในซีรัม พบว่า ค่า SOD ในหนูที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูง มีค่ามากกว่า หนูกลุ่มควบคุม ขณะที่ค่า catalase และ glutathione reductase ในหนูที่มีภาวะคอเลสเตอรอลสูง ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เมื่อป้อนชมพู่ง (50 หรือ 100 มก/กก) หรือ simvastatin เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดปริมาณ SOD ในซีรัม ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดยไม่มีผลต่อค่า catalase และ glutathione reductase

ตารางที่ 10 แสดงค่า MDA และ protein carbonyl ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

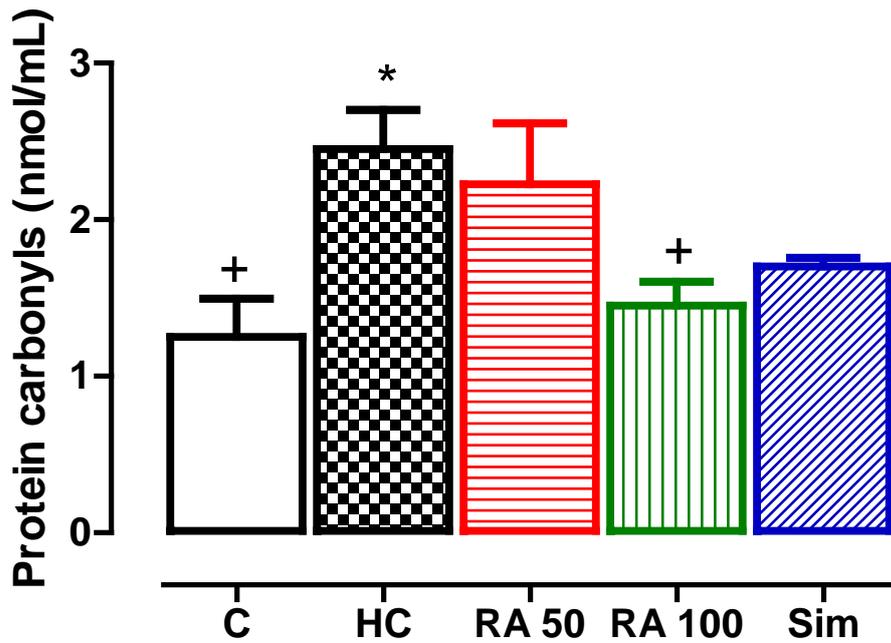
| กลุ่ม | ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | |
|--------------|--------------------------------------|--|
| | MDA ($\mu\text{mol/mL}$) | Protein carbonyls (nmol/mL) |
| C | $6.9 \pm 1^+$ | $1.3 \pm 0.3^+$ |
| HC | $15.4 \pm 2^*$ | $2.5 \pm 0.3^*$ |
| RA 50 mg/kg | $5.4 \pm 1^+$ | 2.2 ± 0.4 |
| RA 100 mg/kg | $5.1 \pm 1^+$ | $1.5 \pm 0.2^+$ |
| Sim | $3.6 \pm 0.4^+$ | 1.7 ± 0.1 |

* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , $^+ P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 9 แสดงปริมาณ MDA ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิโอฟอสฟอรัส 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิโอฟอสฟอรัส 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิโอฟอสฟอรัส simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



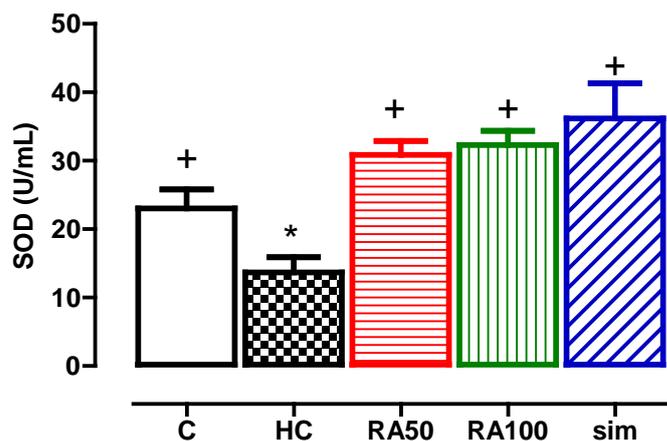
ภาพที่ 10 แสดงปริมาณ Protein Carbonyls ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ตารางที่ 11 แสดงค่า SOD, catalase และ glutathione reductase ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

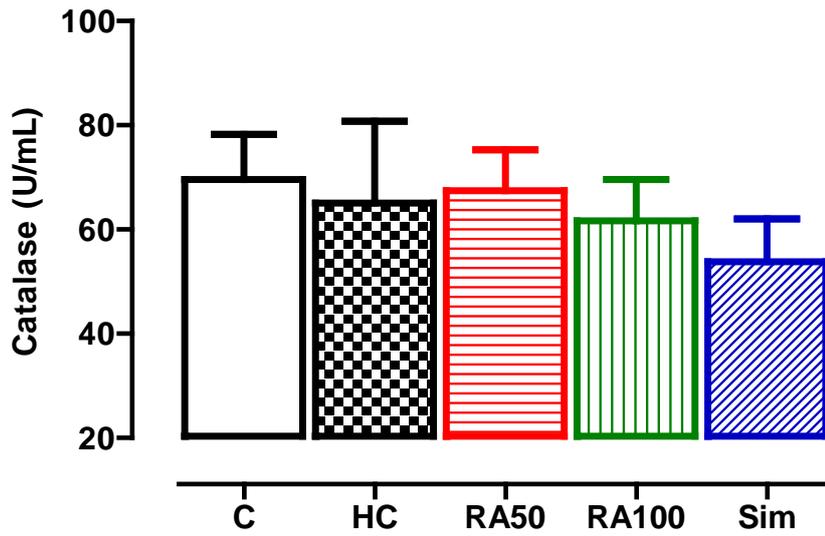
| กลุ่ม | ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน | | |
|--------------|--------------------------------------|--------------------|------------------------------------|
| | SOD (U/mL) | Catalase (U/mL) | Glutathione reductase (U/mL) |
| C | 23 \pm 2 [†] | 69 \pm 8 | 9.4 \pm 1.9 |
| HC | 13 \pm 2* | 65 \pm 15 | 6.4 \pm 1.8 |
| RA 50 mg/kg | 31 \pm 2 [†] | 67 \pm 7 | 10.1 \pm 1.1 |
| RA 100 mg/kg | 32 \pm 2 [†] | 61 \pm 7 | 11.2 \pm 1.3 |
| Sim | 36 \pm 5 [†] | 54 \pm 8 | 9.1 \pm 0.6 |

*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , [†]P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

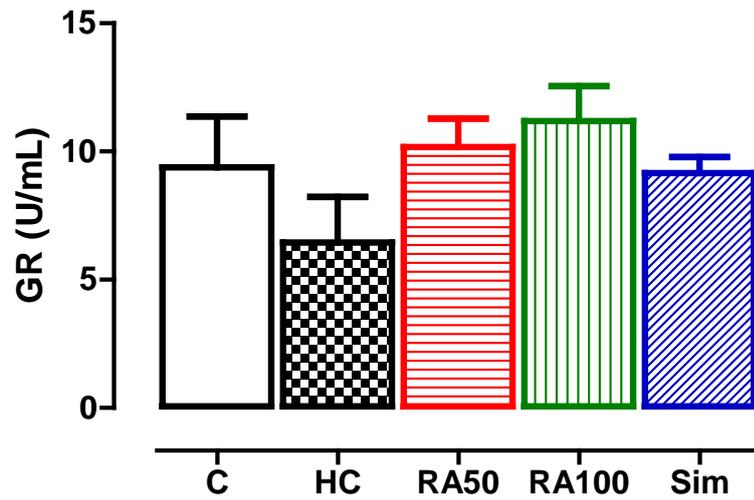
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 11 แสดงปริมาณ SOD ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



ภาพที่ 12 แสดงปริมาณ Catalase ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

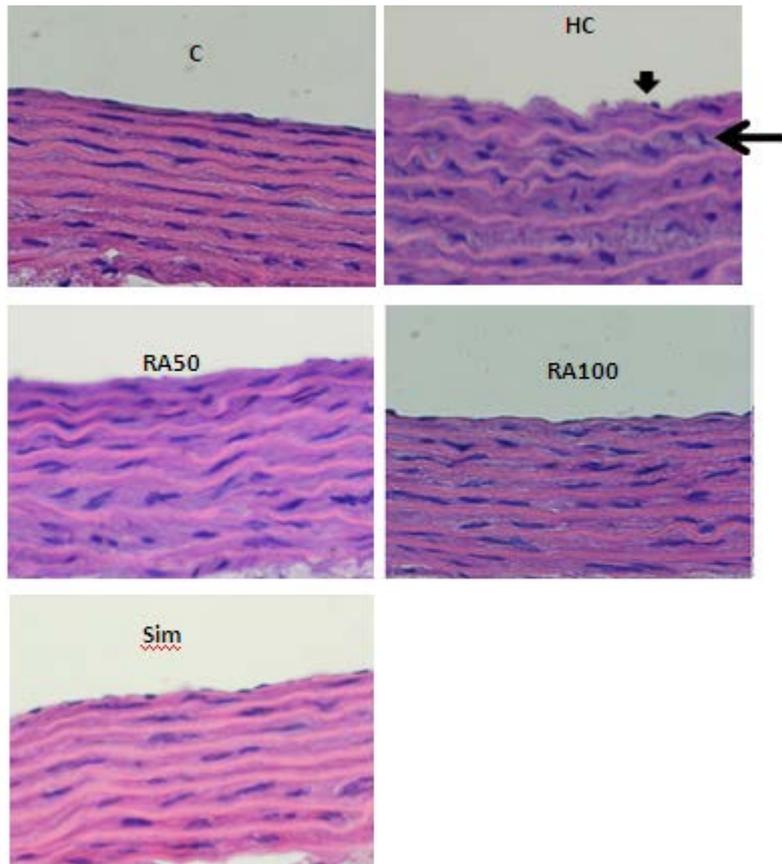


ภาพที่ 13 แสดงปริมาณ glutathione reductase (GR) ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบน

3.3 ผลต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด

3.3.1 ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด

จากภาพที่ 14 แสดงผลการย้อมสีหลอดเลือดแดง aorta โดย hematoxylin และ Eosin (H&E) พบว่า โครงสร้างของหลอดเลือดในหนูกลุ่มควบคุม มีลักษณะปกติ โดยในชั้น tunica intima มีการเรียงตัวของเซลล์ endothelium เป็นชั้นเดียวปกติ และกล้ามเนื้อเรียบในชั้น tunica media เรียงตัวปกติ ขณะที่หนูกลุ่มคอเลสเตอรอลสูง จะมีการหลุดลอกของ เซลล์ endothelium และกล้ามเนื้อเรียบในชั้น tunica media เรียงตัวผิดปกติ มีการ migration ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ เมื่อให้ชมพูผง 50 และ 100 มก/กก หรือ simvastatin จะส่งผลฟื้นฟูโครงสร้างของหลอดเลือดให้กลับมาใกล้เคียงปกติ



ภาพที่ 14 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดหัวใจของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) และ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA100)

3.3.2 ผลต่อการทำงานของหลอดเลือด

โดยประเมินจากการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh และสาร SNP โดยปกติ สาร ACh จะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด โดยผ่านทางเซลล์ endothelium จากการทดลองพบว่า endothelium-dependent relaxation ต่อ ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลเพียงอย่างเดียว (HC) จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ endothelium ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เมื่อให้ชมพูผงความเข้มข้น 50 และ 100 มก/กก/วันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ได้รับ แสดงว่า ชมพูผงสามารถช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของ endothelium ในหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงได้ ดังแสดงในตารางที่ 12 และ ในภาพที่ 15

ส่วนสาร SNP จะออกฤทธิ์ที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยตรงในการขยายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพบว่า endothelium-independent relaxation ต่อ SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า การให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และเมื่อให้ชมพูผงที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือสาร simvastatin เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 13 และ ในภาพที่ 16

ตารางที่ 12 แสดงค่า pEC₅₀ และ Rmax ต่อสาร ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | ACh | |
|-------|-------------------|----------------------------|
| | pEC ₅₀ | Rmax |
| C | -7.162 ± 0.105 | 98.04 ± 0.735 |
| HC | -6.752 ± 0.092 | 62.48 ± 9.109 * |
| RA50 | -7.173 ± 0.116 | 93.30 ± 1.745 ⁺ |
| RA100 | -6.895 ± 0.158 | 94.60 ± 2.797 ⁺ |
| Sim | -7.146 ± 0.2558 | 95.78 ± 4.225 ⁺ |

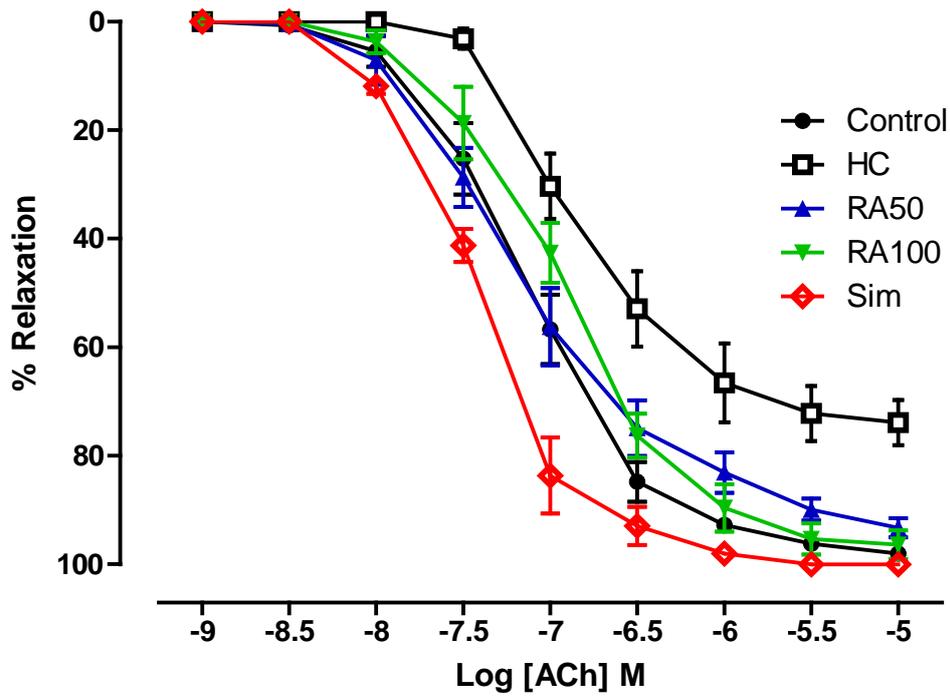
*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ค่าที่ได้คำนวณจาก กราฟในภาพที่ 15 ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

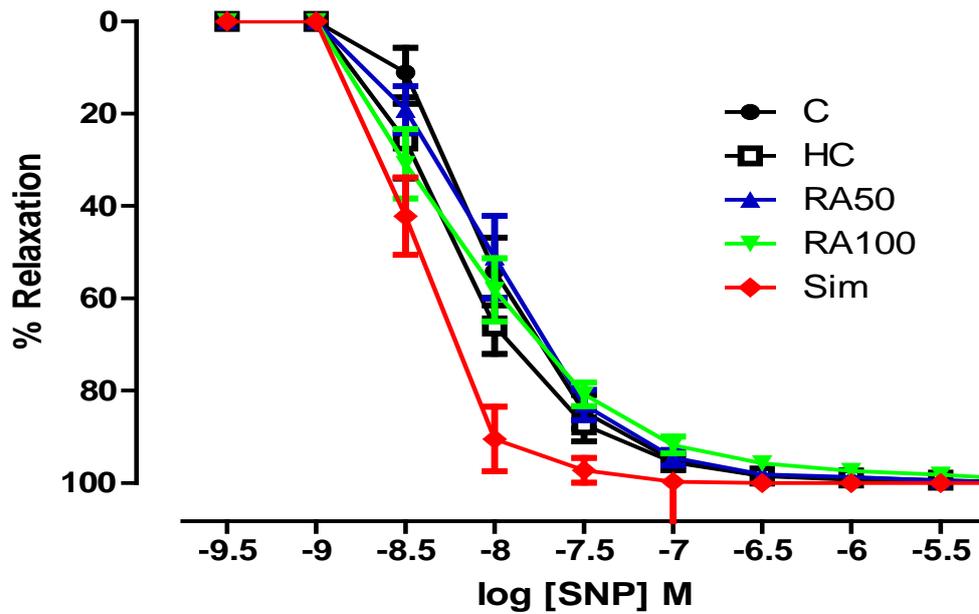
ตารางที่ 13 แสดงค่า pEC₅₀ และ Rmax ต่อสาร SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | SNP | |
|-------|-------------------|---------------|
| | pEC ₅₀ | Rmax |
| C | -8.189 ± 0.096 | 99.39 ± 0.471 |
| HC | -8.562 ± 0.159 | 100 ± 0 |
| RA50 | -8.210 ± 0.119 | 100 ± 0 |
| RA100 | -8.486 ± 0.196 | 99.38 ± 0.369 |
| Sim | -8.778 ± 0.297 | 100 ± 0.00 |

ค่าที่ได้คำนวณจาก กราฟในภาพที่ 16 ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 15 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร ACh ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดที่ถูก pre-contraction ด้วย PE ซึ่งอยู่ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือด \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 16 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร SNP ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดที่ถูก pre-contraction ด้วย PE ซึ่งอยู่ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือด \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

3.4. ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัมและในหลอดเลือดแดง aorta

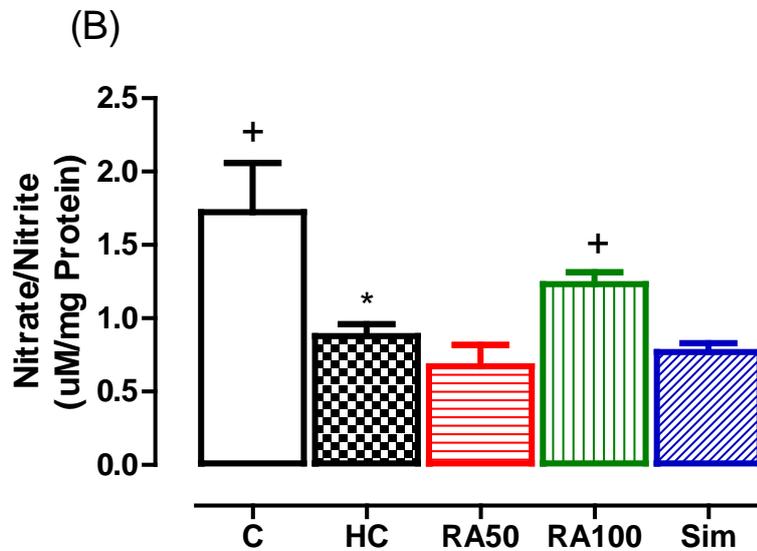
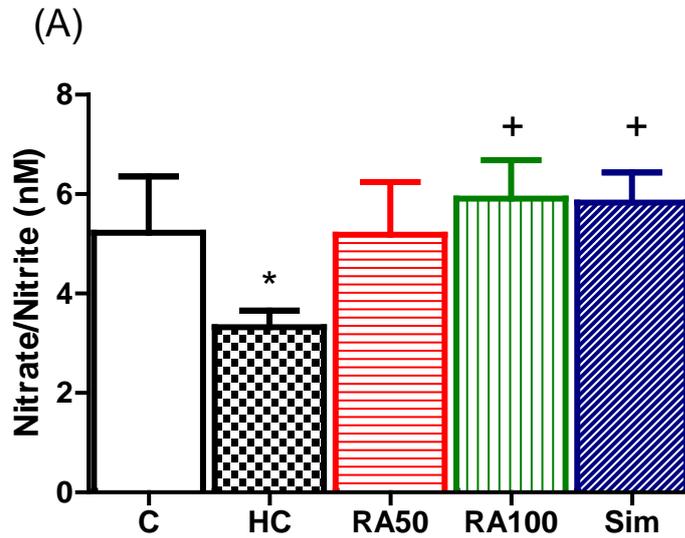
เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของสาร NO ซึ่งหลังจากเซลล์ endothelium ในการทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดนั้น จะประเมินจากปริมาณของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสาร nitric oxide คือ สาร nitrate และ nitrite ในการทดลอง พบว่า ปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม และในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลสูง มีค่าน้อยกว่าหนูที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การป้อนชมพูม (100 มก/กก) ให้หนูที่มีคอเลสเทอรอลสูง พบว่า ปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม และในหลอดเลือด มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลสูงเพียงอย่างเดียว (ตารางที่ 14 และภาพที่ 17)

ตารางที่ 14 แสดงค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | Serum nitrate/nitrite (nM) | Aortic nitrate/nitrite (μ M/mg protein) |
|--------------|----------------------------|--|
| C | 5.2 \pm 1.1 | 1.7 \pm 0.3 |
| HC | 3.3 \pm 0.3* | 0.8 \pm 0.1* |
| RA 50 mg/kg | 5.1 \pm 1.1 | 0.6 \pm 0.1 |
| RA 100 mg/kg | 5.9 \pm 0.8 ⁺ | 1.2 \pm 0.1 ⁺ |
| Sim | 5.8 \pm 0.6 ⁺ | 0.8 \pm 0.1 |

*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

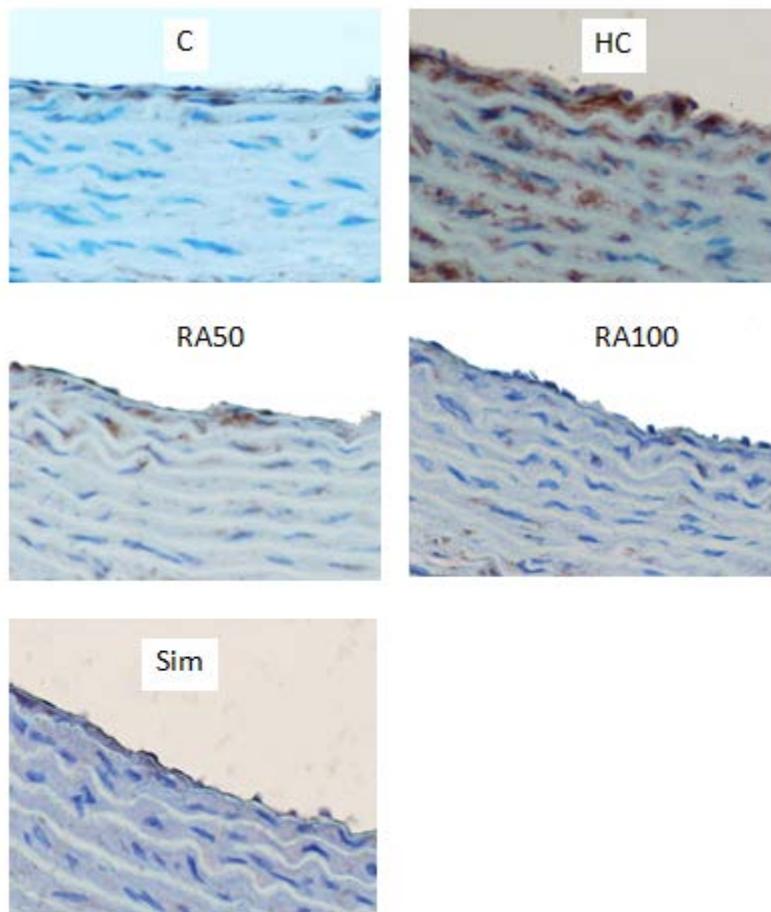
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนชมพูม 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนชมพูม 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



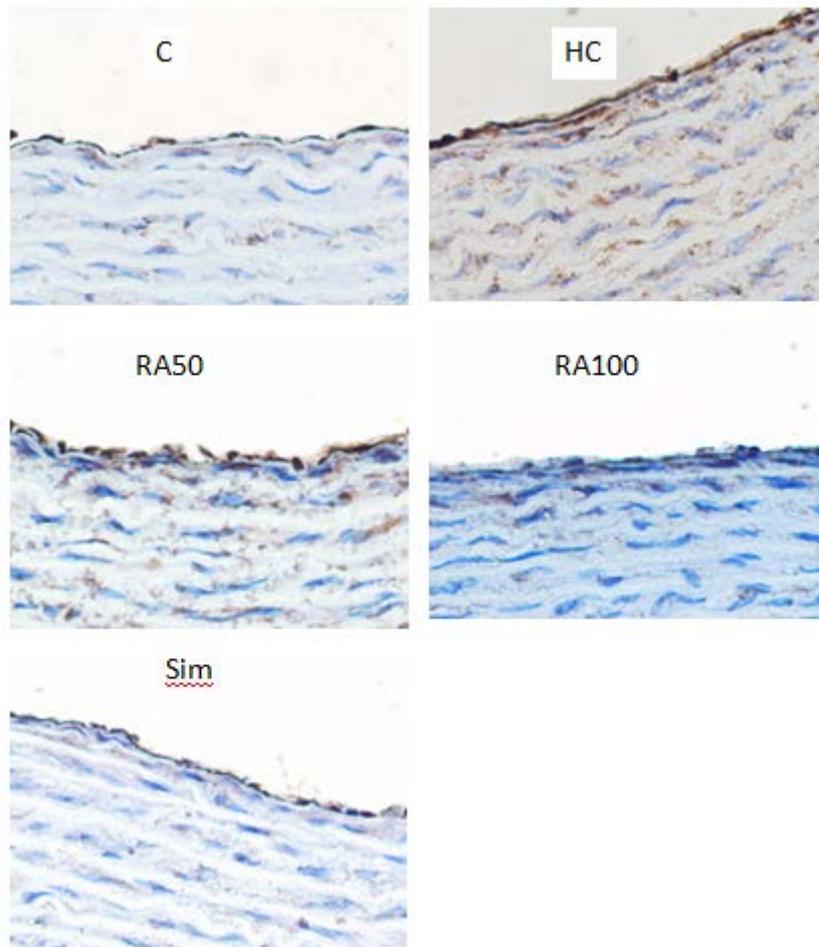
ภาพที่ 17 แสดงปริมาณ Nitrate/Nitrite ในซีรัม (A) และในหลอดเลือดแดง aorta (B) ของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ม 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ ป้อนชมพู่ม 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

3.5 ผลต่อการแสดงออกของ p47phox และ NOX4 ในหลอดเลือดแดง aorta

จากภาพที่ 18 และ 19 แสดงผลของการศึกษาด้วยเทคนิค Immunohistochemistry (IHC) พบว่าการแสดงออกของ p47phox ซึ่งเป็น subunits ของ NOX2 และการแสดงออกของ NOX4 จะมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในชั้น tunica intima และ tunica media ของหลอดเลือด aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อให้ไขมันพุง 50 และ 100 มก/กก หรือ สาร simvastatin จะลดการแสดงออกของ p47phox และ NOX4 ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง



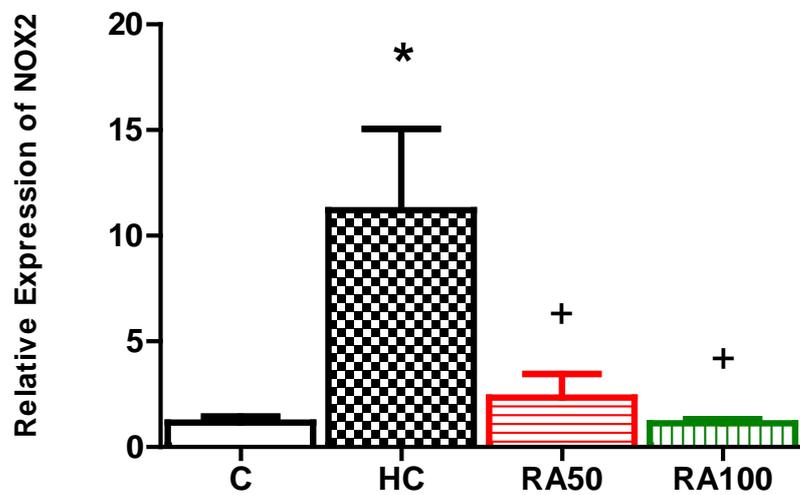
ภาพที่ 18 การแสดงออกของ p47 Phox โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับไขมันพุง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับไขมันพุง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยสีน้ำตาลแสดงถึงการแสดงออกของ p47 Phox ขณะสีน้ำเงินแสดงถึงนิวเคลียสของเซลล์



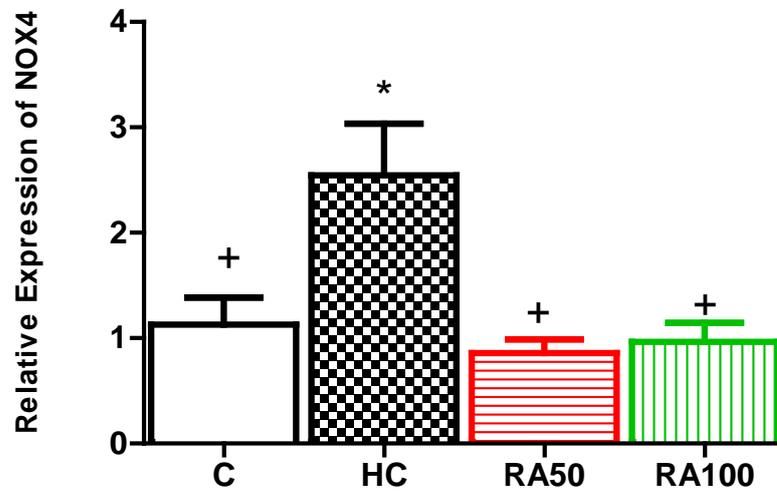
ภาพที่ 19 การแสดงออกของ NOX4 โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับชมพู่ผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับชมพู่ผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) หรือ ป้อน simvastatin (Sim) โดยสีน้ำตาลแสดงถึงการแสดงออกของ NOX4 ขณะสีน้ำเงินแสดงถึงนิวเคลียสของเซลล์

3.6 ผลต่อการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 ในหลอดเลือด aorta

การศึกษาการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 ในหนูที่เหนี่ยวนำให้มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงพบว่า มีการแสดงออกของยีน NOX2 และ NOX4 ในหลอดเลือด Thoracic Aorta เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) หลังจากทำการป้อนสารสกัดจากชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ในหนูที่ทำการเหนี่ยวนำให้มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ขนาด 50 และ 100 mg/kg-BW เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดจากชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ในขนาด 50 และ 100 mg/kg-BW มีการแสดงออกของ NOX2 และ NOX4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 20 และภาพที่ 21



ภาพที่ 20 การแสดงออกของยีน NOX2 ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือด ที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม(RA100) โดยแสดงค่าในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC



ภาพที่ 21 การแสดงออกของยีน NOX4 ในหลอดเลือดเออร์ตาของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดสูง (HC), กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับชมพูผง 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA50) หรือ กลุ่มคอเลสเตอรอลในเลือดที่ได้รับชมพูผง 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (RA100) โดยแสดงค่าในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, $^+ P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

3.7 ผลต่อความเป็นพิษหรือผลไม่พึงประสงค์

เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อการทำงานของไต จะวิเคราะห์จากค่า BUN และ Cr พบว่า การให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงจะไม่มีผลต่อค่า BUN และ Cr และเมื่อป้อนนมพุง 1 เดือน จะไม่มีผลต่อค่า BUN และ Creatinine เช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 15

ส่วนการประเมินความเป็นพิษต่อการทำงานของไต วิเคราะห์จากค่า AST (SGOT) และ ALT (SGPT) พบว่าการให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงจะมีผลเพิ่ม AST และ ALT และเมื่อป้อนนมพุง 1 เดือน จะมีผลลดค่า AST (SGOT) และ ALT (SGPT) ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงดังแสดงในตารางที่ 16 และ ภาพที่ 22

ตารางที่ 15 แสดงค่า Renal function test ในหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | Renal function test | |
|--------------|---------------------|------------|
| | BUN (mg/dl) | Cr (mg/dl) |
| C | 21 ± 2 | 0.5 ± 0.02 |
| HC | 22 ± 1 | 0.4 ± 0.03 |
| RA 50 mg/kg | 24 ± 1 | 0.5 ± 0.04 |
| RA 100 mg/kg | 21 ± 1 | 0.5 ± 0.03 |
| Sim | 23 ± 1 | 0.5 ± 0.05 |

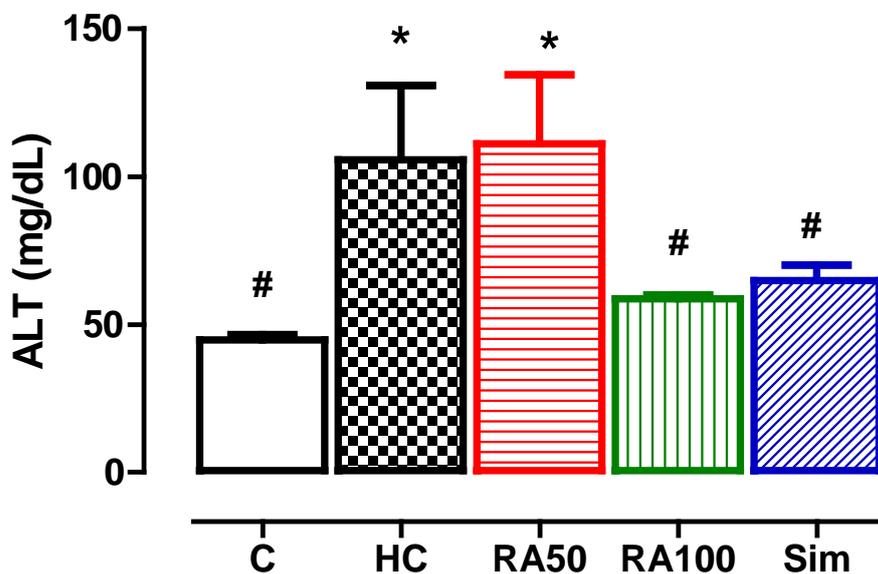
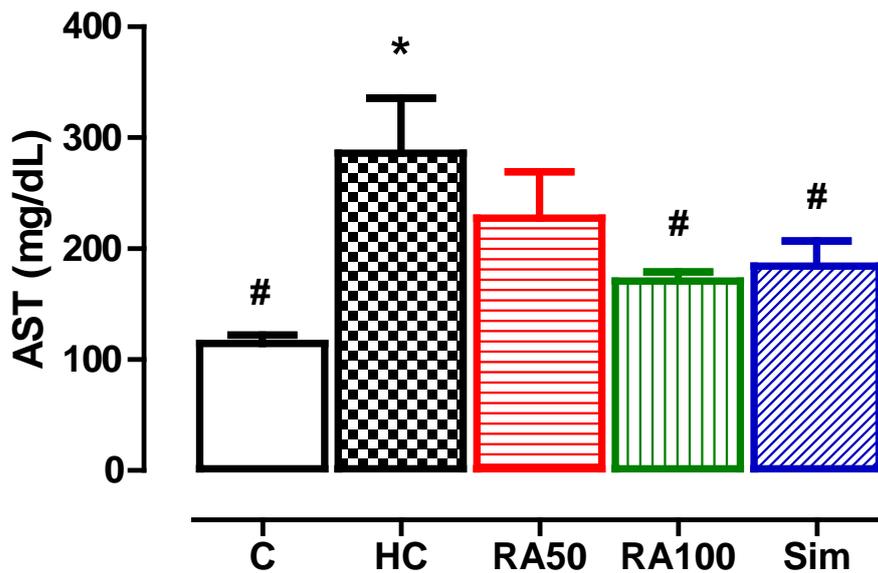
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 16 แสดงค่า Liver function test ในหนูกลุ่มต่างๆ

| กลุ่ม | Liver function test | |
|--------------|-----------------------|---------------------|
| | AST (mg/dl) | ALT (mg/dl) |
| C | 115 ± 7 ⁺ | 45 ± 2 ⁺ |
| HC | 289 ± 50* | 106 ± 25* |
| RA 50 mg/kg | 228 ± 41* | 111 ± 23* |
| RA 100 mg/kg | 171 ± 8 ⁺ | 59 ± 1 ⁺ |
| Sim | 184 ± 22 ⁺ | 65 ± 5 ⁺ |

*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , ⁺P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; HC คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; RA 50 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; RA 100 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนชมพู่ง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; Sim คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 22 แสดงปริมาณ AST และ ALT ในซีรัมของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (HC) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับบิออนซิมฟุง 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 50) หรือ บิออนซิมฟุง 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (RA 100) หรือ บิออน simvastatin (Sim) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, ⁺ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

อภิปรายผล

จากการศึกษานี้ พบว่า เมื่อนำชมพูพันธุ์ทับทิมจันทร์ 1 กิโลกรัม สามารถบดเป็นผงได้ชมพูผง 120 มิลลิกรัม ด้วยวิธีทำให้แห้งแบบระเหิด (lyophilisation) และเมื่อนำมาทดสอบ แบบหลอดทดลอง พบว่า ชมพูผงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยในการศึกษานี้ได้ทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ แบบขึ้นกับคุณสมบัติการเป็น hydrogen donor ซึ่งให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อิเล็กตรอนที่ไม่ได้จับคู่ (unpaired electron) ในโมเลกุลของอนุมูล DPPH หรือ ABTS ซึ่งผลที่ได้จะคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้าที่ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในชมพูสายพันธุ์ต่างๆ (30, 33, 34)

จากสมมติฐานว่าผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอาจช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือดในภาวะที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ดังนั้นจึงนำชมพูผงทดสอบฤทธิ์ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลจะเกิดภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง โดยมีระดับไขมัน TC และ LDL มากกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ประมาณ 3 และ 5 เท่า ตามลำดับ และ ยังมีปริมาณ AI ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดตีบ เพิ่มขึ้นประมาณ 6.5 เท่า สำหรับการให้ simvastatin ขนาด 40 มก/กก/วัน ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอล เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดระดับของ TC, LDL และ AI ได้ เนื่องจาก simvastatin เป็นกลุ่มยาลดระดับไขมันในเลือดที่นิยมใช้ในทางการแพทย์ ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCoA reductase inhibitor) ที่จำเป็นในการสร้างคอเลสเตอรอลในตับ (38) เมื่อทดสอบผลของการป้อนชมพูผงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง พบว่า ระดับไขมันชนิดไม่ดี TC, LDL และ AI จะลดลง แต่ไม่มีผลกับระดับไขมันชนิดดี HDL มีรายงานวิจัยพบว่า สาร flavonoids ที่มักพบในผลไม้ต่างๆ รวมทั้งชมพู สามารถลดคอเลสเตอรอลในเลือดและในตับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (40-42) เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase ที่จำเป็นในการสร้างคอเลสเตอรอลในตับ (41-42) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ ว่าฤทธิ์ในการลดไขมันในเลือดอาจมาจากสาร flavonoids ที่อุดมในชมพู

เป็นที่ทราบกันดีว่า อนุมูลอิสระเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในภาวะที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเรื้อรัง โดยสารอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ส่งผลทำลายเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด จนเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง ตามมาได้ (6-8) มีรายงานวิจัย พบว่า เอนไซม์ NADPH_{oxidase} (NOX) ในหลอดเลือด (35) ถือว่าเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion จำนวนมากในหลอดเลือด (9,22) ซึ่ง NOX จะแบ่งย่อยเป็น NOX1-5, DUOX1 และ DUOX2 โดย NOX2 และ NOX4 จะพบมากที่เซลล์ endothelium และ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด มีรายงานวิจัย พบว่า ในสภาวะพยาธิสภาพต่างๆ มักมีการแสดงออกของ NOX ในหลอดเลือดเพิ่มขึ้น (36-37) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษา พบว่า การเพิ่มขึ้นของ LDL เป็นเวลานาน จะทำให้ LDL ถูก ออกซิไดส์ด้วยอนุมูลอิสระ จนกลายเป็น oxidized LDL ซึ่งสามารถเพิ่ม mRNA expression ของ NOX และเพิ่มการทำงานของ NOX ซึ่งจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระทำลายหลอดเลือด (35,39)

ในการศึกษานี้ พบการแสดงออกของยีนของ NOX2 และ NOX4 เพิ่มขึ้นในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง ซึ่งค่านี้จะลดลงเมื่อได้รับชมพู่มง เมื่อศึกษาโดยการย้อม immunohistochemistry ในหลอดเลือด พบการแสดงออกของ p47 phox ซึ่งเป็น subunit ของ NOX2 และการแสดงออกของ NOX4 ที่บริเวณเซลล์ endothelium และ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด เพิ่มขึ้นในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง แสดงว่าภาวะคอเลสเตอรอลสูงจะกระตุ้นการแสดงออกของ NOX ในหลอดเลือด เมื่อป้อนชมพู่มงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดการแสดงออกของ p47 phox ซึ่งเป็น subunit ของ NOX2 และการแสดงออกของ NOX4 ที่บริเวณเซลล์ endothelium และ กล้ามเนื้อเรียบในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงแสดงให้เห็นว่า ชมพู่มงมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ NOX ในผนังหลอดเลือด ซึ่งผลดังกล่าวอาจลดอนุมูลอิสระในการทำลายผนังหลอดเลือด

ดังนั้นเมื่อวิเคราะห์ปริมาณ MDA และ protein carbonyls ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้การเกิดออกซิเดชันของไขมันและโปรตีนตามลำดับ พบว่าทั้ง MDA และ protein carbonyls มีค่าเพิ่มขึ้นในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง นอกจากนี้ เอมไซม์ที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ SOD ยังมีค่าลดลง ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง แสดงว่า การได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง จะก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งคล้ายคลึงกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ (5,43) เมื่อให้ชมพู่มง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดค่า MDA และ protein carbonyls และยังเพิ่มระดับของ SOD จากการศึกษาก่อนหน้านี้ แบบ in vitro พบว่าชมพู่มงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (30,33) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ แบบ in vitro ที่พบว่าชมพู่มงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ต้านอนุมูลของชมพู่มงช่วยลดภาวะ oxidative stress ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ว่าสารอนุมูลอิสระ superoxide anion สามารถทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ส่งผลทำลายเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด (6-8) ดังนั้นในงานวิจัยจึงทดสอบการทำงานของหลอดเลือด รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณของสาร nitric oxide ในซีรัม ในงานวิจัยนี้ พบว่าหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จะมีการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh น้อยกว่าหนูปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (44, 45) ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ endothelium และเมื่อวัดปริมาณ nitrite และ nitrate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสาร nitric oxide มีค่าลดลงในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่า ภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จะเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดแดง ซึ่งอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ที่หลั่งจากเซลล์ endothelium กลายเป็นสารอนุมูลอิสระ peroxynitrite ทำให้ปริมาณสาร nitric oxide ลดลง จึงส่งผลให้การคลายตัวของหลอดเลือดลดลงตามด้วย (6-8) นอกจากนี้ ยังพบความผิดปกติของโครงสร้างของหลอดเลือดในหนูคอเลสเตอรอล โดยมีการหลุดของเซลล์ endothelium และการเรียงตัวที่ผิดปกติของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด แต่เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร SNP ต่อ การขยายตัวของหลอดเลือด โดยปกติสาร SNP ซึ่งเป็น NO donor จะออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยตรง พบว่า การตอบสนองต่อสาร SNP ในหนูทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน แสดงว่า ยังไม่มีความผิดปกติของการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดง aorta เมื่อป้อน simvastatin 4 สัปดาห์ พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือดจะเพิ่มขึ้น และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดแดง

aorta ไกล่เคียงกับหนูปกติ รวมทั้งยังฟื้นฟูโครงสร้างของหลอดเลือดให้ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม มีรายงานวิจัยพบว่า simvastatin นอกจากฤทธิ์ลดไขมันในเลือดแล้ว ยังสามารถ upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ทำให้เพิ่มปริมาณ nitric oxide ที่ผนังหลอดเลือด รวมทั้งฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิด superoxide และการเกิด oxidation ของ LDL (46) ซึ่งผลของการป้อน simvastatin จะคล้ายคลึงกับ ผลของการป้อนชมพู่งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ที่พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือดจะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติ และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในซีรัมใกล้เคียงกับหนูปกติ รวมทั้งยังฟื้นฟูโครงสร้างของหลอดเลือดให้ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม มีรายงานวิจัยพบว่า อาหารที่อุดมด้วยสารกลุ่ม flavonoids นั้น สามารถ upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) และเพิ่มการทำงานของ NOS activity (47-49) จึงเป็นไปได้ว่า ชมพู่งผลอาจมีฤทธิ์ป้องกันความผิดปกติของเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ และเพิ่มการทำงานของสาร NO ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

นอกจากนี้ เมื่อศึกษาผลข้างเคียงจากการบริโภคมชมพู่ง พบว่า การบริโภคมชมพู่งไม่มีผลต่อค่า BUN และ Cr แสดงว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของไต แต่เมื่อศึกษาการทำงานของตับ โดยการวัดค่า SGOT และ SGPT ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ถึงความผิดปกติของตับ พบว่า อาหารคอเลสเตอรอลสูงจะเพิ่ม SGOT และ SGPT ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น (50) เมื่อป้อนชมพู่งจะลดค่า SGOT และ SGPT ใน หนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง แสดงว่า ชมพู่งช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของตับในภาวะที่มีคอเลสเตอรอลสูง

สรุปผลการทดลอง

การบริโภคชมพูผงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือดของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง โดยอาจเป็นผลจากการลดอนุมูลอิสระ การเพิ่มปริมาณสาร NO และการลดการแสดงออกของ NOX ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Cardiovascular diseases (CVDs). Media centre of World Health Organization; 2013 update [1 August 2014]; Available from:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>
2. Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. *Mol Nutr Food Res.* 2005 ;49(11):995-8.
3. de Winter CF, Bastiaanse LP, Hilgenkamp TI, Evenhuis HM, Echteld MA. Cardiovascular risk factors (diabetes, hypertension, hypercholesterolemia and metabolic syndrome) in older people with intellectual disability: results of the HA-ID study. *Res Dev Disabil.* 2012 ;33(6):1722-31
4. Kotani K, Koibuchi H, Miyamoto M, Yamada T, Taniguchi N. Relationship between reactive oxygen metabolites and carotid intima-media thickness in subjects with hypercholesterolemia. *Med Princ Pract.* 2010;19:496-8.
5. Francois M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem Int.* 2004;45:955-61
6. Brandes RP, Weissmann N., Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2010;49,687-706.
7. PACher P, Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol.* 2006;6:136-41.
8. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 1620-1624.
9. Csont T, Bereczki E, Bencsik P, Fodor G, Görbe A, Zvara A, Csonka C, Puskás LG, Sántha M, Ferdinandy P. Hypercholesterolemia increases myocardial oxidative and nitrosative stress thereby leading to cardiac dysfunction in apoB-100 transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 2007 ;76(1):100-9
10. Selemidis S, Sobey CG, Winkler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther.* 2008;120(3):254-91
11. Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, Akbari NA, Azarmie Y, Fakhrjoo A, Andalib S, Maleki-Dizaji N. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol.* 2009;126:525-32.
12. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009 ;296:H1281-8.

13. Malakul W, Thirawarapan S, Suvitayavat W, Woodman OL. Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of endothelium-derived hyperpolarizing factor to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008;35(2):192-200.
14. Meissner M, Wolters H, de Boer RA, Havinga R, Boverhof R, Bloks VW, Kuipers F, Groen AK. Bile acid sequestration normalizes plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. No additional effect of physical activity. *Atherosclerosis*. 2013 ;228(1):117-23
15. Chen X, Rateri DL, Howatt DA, Balakrishnan A, Moorleggen JJ, Morris AJ, Charnigo R, Cassis LA, Daugherty A. Amlodipine reduces AngII-induced aortic aneurysms and atherosclerosis in hypercholesterolemic mice. *PLoS One*. 2013;8(11):1-9.
16. Soubir T. Antioxidant activities of some local bangladeshi fruits (*Artocarpus heterophyllus*, *Annona squamosa*, *Terminalia bellirica*, *Syzygium samarangense*, *Averrhoa carambola* and *Olea europaea*). *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2007;23(2):257-61.
17. Sulaiman SF, Ooi KL. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of 40 tropical juices from Malaysia and identification of phenolics from the bioactive fruit juices of *Barringtonia racemosa* and *Phyllanthus acidus*. *J Agric Food Chem*. 2014;62(39):9576-85
18. Vasanthi S, Mahalingam S, Jagathala Y, Sangilimuthu A, Venkatachalapathi S, Kanniappan GV. *In vitro* antioxidant activity of *Syzygium samarangense* Merr. et Perry fruit extract. *Journal of Pharmacy Research*. 2012; 5 (6):3426-30.
19. Consolacion Y, Ragasa, Francisco C, Franco Jr., Dennis D, Raga and Chien-Chang Shen. Chemical constituents of *Syzygium samarangense* Der *Pharma Chemica*, 2014, 6(3):256-60.
20. Edema MO and Alaga TO. Comparative evaluation of bioactive compounds in *Hibiscus sabdariffa* and *Syzygium samarangense* juice extracts. *Afr Crop Sci J*. 2012;20:179 -187.
21. Woodman OL and Malakul W. 3',4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *Life Sci*. 2009;3:54-9.
22. AOAC. Official Methods of Analysis, 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA. 2000.
23. Slinkard, K., Singleton V L. Total phenol analysis: Automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Vitic*. 1997;28:49-55.
24. Simirgiotis MJ, Adachi S, To S, Yang H, Reynertson K A, Basile MJ, Gil RR, Weinstein IB, Kennelly EJ. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chem*. 2008;107: 813-19.

25. Augusta IM, Nascimento KO, Couto MAPG and Borges SV. Antioxidant activity and total anthocyanin content from the peel of red and green rose apple (*Syzygium malaccensis*). VII congreso ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas, 26-29 August, Madrid, Spain. 2013.
26. Ranganna S. Plant pigments. In S. Ranganna (Ed.), Handbook of analysis and quality control for fruit and vegetable products. New Delhi: Tata-McGraw-Hill Publishing Company Limited. 1986: 83-104.
27. Titov S. Antioxidant activities of some local bangladeshi fruits (*Artocarpus heterophyllus*, *Annona squamosa*, *Terminalia bellirica*, *Syzygium samarangense*, *Averrhoa carambola* and *Olea europa*). *Chinese Journal of Biotechnology*. 2007;23(2): 257-61.
28. Benzie IFF, Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal Biochem*. 1996;239:70-6.
29. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26: 1231-7.
30. Lim ASL and Rabeta MS, 2013. Proximate analysis, mineral content and antioxidant capacity of milk apple, malay apple and water apple. *International Food Research Journal*. 2013,20: 673-79.
31. Rosnah S, Wong WK, Noraziah M and Osman H. Chemical composition changes of two water apple (*Syzygium samarangense*). *International Food Research Journal*. 2012;19(1): 167-74.
32. Oyinlade OC. Phytochemical and physicochemical analysis of three different types of apples. *International Journal of Scientific Research and Reviews*. 2014;3(1): 67-78.
33. Reynertson KA, Yang H, Jiang B, Basile MJ and Kennelly EJ. Quantitative analysis of antiradical phenolic constituents from fourteen edible Myrtaceae fruits. *Food Chemistry*. 2008;109: 883-90.
34. Simirgiotis MJ, Adachi S, To S, Yang H, Reynertson KA, Basile MJ, Gil RR, Weinstein IB and Kennelly EJ. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of a *Syzygium samarangense* (Wax Jambu). *Food Chemistry*. 2008;107(2): 813-19
35. Brandes RP and Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res*. 2005;65(1):16-27.
36. Drummond GR, Selemidis S, Griendling KK, Sobey CG. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(6):453-71.
37. Drummond GR, Sobey CG. Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease? *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(9):452-63

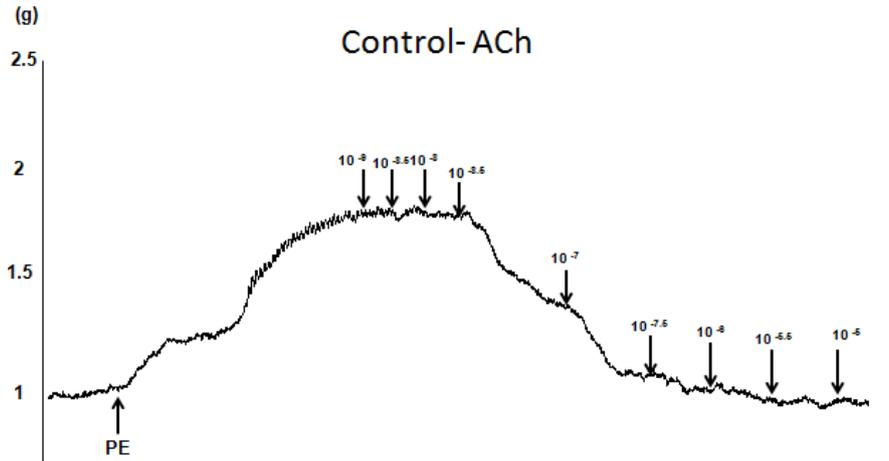
38. Ribeiro A, Mangeney M, Loriette C, Thomas G, Pepin D, Janvier B, Chambaz J, Bereziat G. Effect of simvastatin on the synthesis and secretion of lipoproteins in relation to the metabolism of cholesterol in cultured hepatocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1086:279-86.
39. O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM, DiMattina AJ, Stone RI, Holland JA. Endothelial NADPH oxidase: mechanism of activation by low-density lipoprotein. *Endothelium*. 2003;10:291-7.
40. Jeon SM, Park YB, Choi MS. Antihypercholesterolemic property of naringin alters plasma and tissue lipids, cholesterol-regulating enzymes, fecal sterol and tissue morphology in rabbits. *Clin Nutr*. 2004;23:1025-34.
41. Kim SY, Kim HJ, Lee MK, Jeon SM, Do GM, Kwon EY, Cho YY, Kim DJ, Jeong KS, Park YB, Ha TY, Choi MS. Naringin time-dependently lowers hepatic cholesterol biosynthesis and plasma cholesterol in rats fed high-fat and high-cholesterol diet. *J Med Food*. 2006;9:582-6.
42. Anila L and Vijayalakshmi NR. Flavonoids from *Emblica officinalis* and *Mangifera indica*-effectiveness for dyslipidemia. *J Ethnopharmacol*. 2002;79(1):81-7
43. Ragheb A, Elbarbry F, Prasad K, Mohamed A, Ahmed MS and Shoker A. Attenuation of the development of hypercholesterolemic atherosclerosis by thymoquinone. *Int J Angiol*. 2008;17(4):186-92.
44. Garjani A, Fathiazad F, Zakheri A, Akbari NA, Azarmie Y, Fakhrjoo A, Andalib S, Maleki-Dizaji N. The effect of total extract of *Securigera securidaca* L. seeds on serum lipid profiles, antioxidant status, and vascular function in hypercholesterolemic rats. *J Ethnopharmacol*. 2009;126:525-32.
45. Stokes KY, Dugas TR, Tang Y, Garg H, Guidry E, Bryan NS. Dietary nitrite prevents hypercholesterolemic microvascular inflammation and reverses endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009 ;296:H1281-8
46. Giroux LM, Davignon J, Naruszewicz M. Simvastatin inhibits the oxidation of low-density lipoproteins by activated human monocyte-derived macrophages. *Biochem Biophys Acta*. 1993; 1165: 335-8.
47. Benito S, Lopez D, Sáiz MP, Buxaderas S, Sánchez J, Puig-Parellada P, Mitjavila MT. A flavonoid-rich diet increases nitric oxide production in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 2002;135:910-6.
48. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*. 2009;21:77-91.

49. Li H, Xia N, Brausch I, Yao Y, Förstermann U. Flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) up-regulate endothelial-type nitric-oxide synthase gene expression in human endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;310:926-32.
50. Samout N, Bouzenna H, Ettaya A, Elfeki A, and Hfaiedh N. Antihypercholesterolemic effect of *Cleome arabica* L. on high cholesterol diet induced damage in rats. *EXCLI J.* 2015;14:791-800.

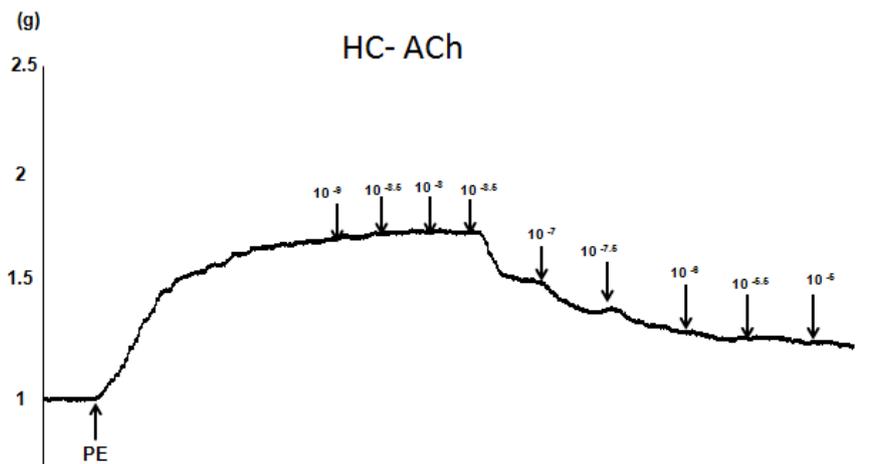
ภาคผนวก 1

ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มต่างๆ

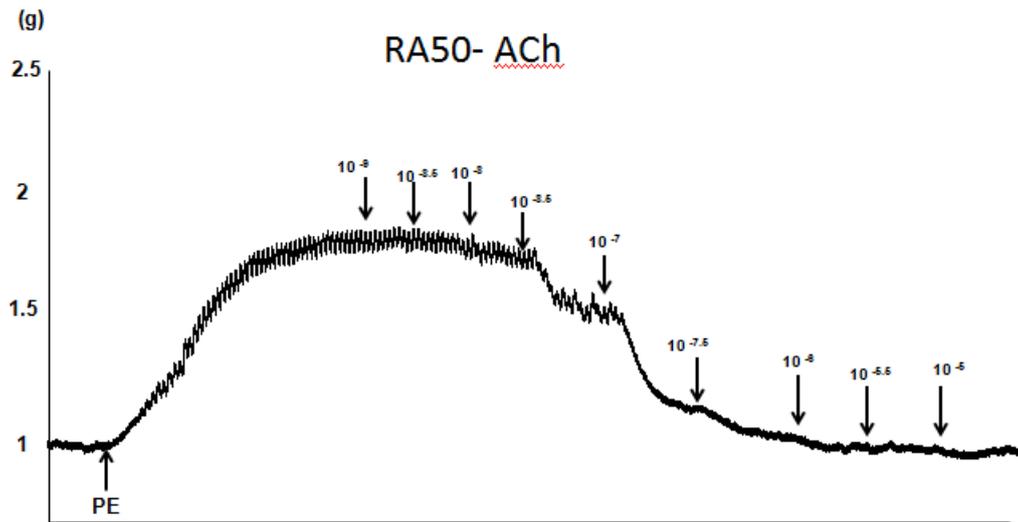
1.1 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูกลุ่มปกติ



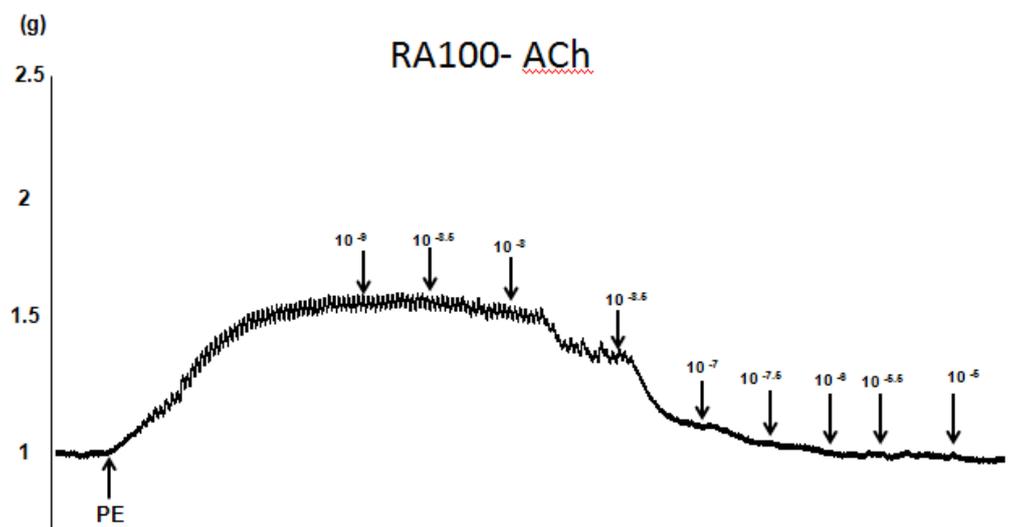
1.2 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง



1.3 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง ที่ได้รับชมพูผง 50 มก./กก./วัน



1.4 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง ที่ได้รับชมพูผง 100 มก./กก./วัน



ภาคผนวก 2

เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ

| วัตถุประสงค์ | กิจกรรมที่วางแผนไว้ | กิจกรรมที่ดำเนินการ | ผลที่ได้รับ |
|--|--|---|---|
| 1.เพื่อให้ได้ทราบองค์ประกอบทางเคมี ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชมพูผง | 1.1 สกัดชมพูผงและศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณใยอาหาร ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด | 1.1.1 สกัดชมพูผง 1.1.2 ศึกษาองค์ประกอบทางเคมี (Proximate analysis) ได้แก่ ปริมาณโปรตีน ปริมาณเถ้า ปริมาณความชื้น ปริมาณไขมัน ปริมาณใยอาหาร ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด | 1.1.1 ได้สารสกัดชมพูผงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป 1.1.2 ได้ข้อมูลของปริมาณสารต่างๆในชมพูผง |
| | 1.2 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณแอนโธไซยานินรวม | 1.2 ศึกษาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลรวม ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์รวม ปริมาณแอนโธไซยานินรวม | 1.2 ได้ข้อมูลของปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในชมพูผง |
| | 1.3 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging วิธี Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay วิธี ABTS | 1.3 วิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี DPPH radical scavenging วิธี Ferric reducing antioxidant potential (FRAP) assay วิธี ABTS | 1.3 ได้ข้อมูลของความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของชมพูผง |

| วัตถุประสงค์ | กิจกรรมที่วางแผนไว้ | กิจกรรมที่ดำเนินการ | ผลที่ได้รับ |
|--|---|---|---|
| 2. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการได้รับไขมันต่อภาวะอ้วน ระดับของไขมันในเลือด และ atherogenic index (AI) | <p>2.1 เตรียมสัตว์ทดลองโดยหนูแรทเป็นกลุ่ม control (C) และ กลุ่ม Hypercholesterolemia (HC)</p> <p>2.2 หนูจากกลุ่ม HC (ข้อ 2.1) จะถูกแบ่งย่อยเป็น 4 กลุ่ม เพื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ</p> <ul style="list-style-type: none"> -HC (ไม่ป้อนสารสกัดใดๆ) -HC+ RA50 (ป้อนไขมันผง 50 มก/กก/วัน) -HC+ RA100 (ป้อนไขมันผง 100 มก/กก/วัน) -HC+ Sim (ป้อน simvastatin 40 มก/กก/วัน) | <p>2.1 เตรียมสัตว์ทดลองโดยให้อาหาร high cholesterol diet ในกลุ่ม Hypercholesterolemia (HC) และให้อาหารปกติในกลุ่ม control (C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์</p> <p>2.2 หลังจากนั้นแบ่งหนูกลุ่ม HC เป็น 4 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว ดังนี้</p> <ul style="list-style-type: none"> - HC (ไม่ป้อนสารสกัดใดๆ) -HC+ RA50 (ป้อนไขมันผง 50 มก/กก/วัน) -HC+ RA100 (ป้อนไขมันผง 100 มก/กก/วัน) -HC+ Sim (ป้อน simvastatin 40 มก/กก/วัน) <p>ซึ่งหนูแรทจากแต่ละกลุ่มจะถูกป้อนสารต่างๆ ดังกล่าว เวลานาน 4 สัปดาห์ และในระหว่างนี้ยังคงให้อาหารคอเลสเตอรอลสูงร่วมด้วยตลอดการทดลอง</p> | 2.1 ได้สัตว์ทดลองที่มีคอเลสเตอรอลสูงในกลุ่ม HC |
| | 2.1 วิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดและ atherogenic index | 2.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า atherogenic index | 2.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ในการลดระดับของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และ atherogenic index ของหนูกลุ่มต่างๆ |

| วัตถุประสงค์ | กิจกรรมที่วางแผนไว้ | กิจกรรมที่ดำเนินการ | ผลที่ได้รับ |
|--|---|--|--|
| 3. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการได้รับชมพู่มงต่อการเกิดอนุมูลอิสระและการแสดงออกของเอนไซม์ NADPH oxidases ในหลอดเลือด | 3.1 วิเคราะห์การเกิดอนุมูลอิสระ | 3.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะเจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ MDA, protein carbonyls, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase | 3.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อปริมาณ MDA, protein carbonyls, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase ของหนูกลุ่มต่างๆ |
| | 3.2 วิเคราะห์ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของ เอนไซม์ NADPH oxidases (NOX) mRNA ในหลอดเลือด ด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction | 3.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสลับหนูเพื่อผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta จากนั้นนำมาปั่น (homogenize) และนำ supernatant ที่ได้มา วิเคราะห์การแสดงออกของ NOX2 และ NOX4 mRNA ด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction 3.2 นำหลอดเลือดแดง aorta วิเคราะห์แสดงออกของ p47phox (NOX2 subunit) และ NOX4 ด้วยวิธี immunohistochemistry | 3.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อการแสดงออกของ NOX2 และ NOX 4 mRNA ใน aorta 3.2 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อการแสดงออกของ p47phox (NOX2 subunit) และ NOX 4 mRNA ใน aorta ด้วยวิธี immunohistochemistry |
| 4. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลของการได้รับสารสกัดชมพู่มงแบบ chronic administration ต่อโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด | 4.1 ตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ โดยย้อม hematoxylin-eosin stain | 4.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสลับหนูเพื่อผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta จากนั้นนำมาปั่น (homogenize) และนำ supernatant ที่ได้มา วิเคราะห์หาปริมาณของสาร nitric oxide โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit | |

| วัตถุประสงค์ | กิจกรรมที่วางแผนไว้ | กิจกรรมที่ดำเนินการ | ผลที่ได้รับ |
|--|---|---|--|
| | 4.2 ศึกษาฤทธิ์ของชมพูผงต่อการทำงานของหลอดเลือด | 4.2 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสลับหนูเพื่อผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta มาทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh และ SNP | 4.2 ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร SNP ในหลอดเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ |
| | 4.3 วิเคราะห์ปริมาณของสาร nitric oxide | 4.3 วิเคราะห์หาปริมาณของ สาร nitric oxide ในซีรัมและในหลอดเลือด โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit | 4.3 ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มสาร nitric oxide ในของหนูกลุ่มต่างๆ |
| 5.เพื่อให้ได้ข้อมูลความเป็นพิษหรือผลไม่พึงประสงค์เนื่องจากการได้รับสารสกัดชมพูผง | 5.1 ศึกษาฤทธิ์ของชมพูผงต่อค่า liver function test | 5.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ SGOT และ SGPT ในซีรัม | 5.1 ได้ข้อมูลผลต่อปริมาณของ SGOT และ SGPT ในซีรัม |
| | 5.2 ศึกษาฤทธิ์ของชมพูผงต่อค่า renal function test | 5.2 วิเคราะห์หาปริมาณของ BUN และ Cr ในซีรัม | 5.2 ได้ข้อมูลผลต่อปริมาณของ BUN และ Cr ในซีรัม |

ภาคผนวก 3

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

1. Poster presentation: Effects of *Syzygium samarangense* on vascular function and NADPH oxidase subunit p47(phox) expression in hypercholesterolemic rats . การประชุมทางวิชาการระดับชาติ“นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 12” ระหว่างวันที่ 21-22 กรกฎาคม ๒๕๕๙ ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก