

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของ
หลอดเลือดในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง

ผู้วิจัย

สังกัด

ดร. วชิราวดี มาลากุล

มหาวิทยาลัยนเรศวร

รศ. ดร. สุวรรณ ธีระวรพันธ์

มหาวิทยาลัยมหิดล

ดร.อรุษา เขาวนลิขิต

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการ
วิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Aim of the study: Hypercholesterolemia increases oxidative stress and impairs endothelium-dependent relaxation. In this study the effect of the short term (30 days) administration with the pummelo juice extract on the release of superoxide and vascular function in aortae from hypercholesterolemic rats was investigated.

Materials and Methods: Hypercholesterolemia induced by a high-cholesterol diet in rats. Vascular reactivity and superoxide generation were assessed in aortic rings using organ bath techniques and lucigenin-enhanced chemiluminescence, respectively.

Results: Aortic rings from normal rats were acutely exposed to pummelo juice extract there was significant reduction in the detection of superoxide anion. Eight weeks after the cholesterol diet-induced hypercholesterolemic rats the levels of total cholesterol (TC) and LDL were elevated compared to control rats and there was an increased aortic generation of superoxide anion. In aortic rings from hypercholesterolemic rats acetylcholine (ACh)-induced relaxation was impaired whereas endothelium-independent relaxation to sodium nitroprusside (SNP) was unaffected. The cholesterol diet-induced hypercholesterolemic rats were orally administered daily with pummelo juice extract (1 and 10 mg/kg/day) for 4 weeks. Chronic pummelo juice extract treatment decreased the levels of TC and LDL and reduced aortic superoxide generation in hypercholesterolemic rats. In addition the relaxation to ACh and aortic nitrite/nitrate were increased in pummelo extract treated-hypercholesterolemic rats.

Conclusion: These results suggest that chronic administration of pummelo juice extract reduces oxidative stress and preserves endothelium-dependent relaxation in aortae from hypercholesterolemic rats.

Key words: Pummelo, hypercholesterolemia, endothelium, superoxide, relaxation

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษา : ภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูงจะเพิ่มอนุมูลอิสระและทำให้การขยายตัวของหลอดเลือดที่ขึ้นกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดผิดปกติ งานวิจัยนี้จึงศึกษาผลระยะสั้น (30 วัน) ของการป้อนน้ำส้มโอผง ต่อการสร้าง superoxide และการทำงานของหลอดเลือดในหลอดเลือดแดงเออร์ตาจากหนูที่มีคอเลสเทอรอลสูง

วัสดุและวิธีการทดลอง : ภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูงจะถูกชักนำโดยให้อาหารที่มีคอเลสเทอรอลสูงในหนูแรท การทำงานของหลอดเลือดและการเกิด superoxide จะถูกประเมินในหลอดเลือดแดงเออร์ตาโดยใช้วิธี organ bath และ lucigenin-enhanced chemiluminescence ตามลำดับ

ผลการทดลอง : เมื่อใส่น้ำส้มโอผงในหลอดเลือดแดงเออร์ตาจากหนูปกติโดยตรง พบว่า มีการลดลงของ superoxide anion แปรสัปดาห์หลังจากที่หนูได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลสูง พบว่าระดับคอเลสเทอรอลและ LDL จะเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม และมีการเพิ่มขึ้นของ superoxide anion ในหลอดเลือดแดง สำหรับหลอดเลือดแดงจากหนูที่มีคอเลสเทอรอลสูง การขยายตัวของหลอดเลือดแดงโดยสาร acetylcholine (ACh) จะผิดปกติ ขณะที่ การขยายตัวของหลอดเลือดแดงแบบไม่ขึ้นกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด โดยสาร sodium nitroprusside (SNP) จะเป็นปกติ หนูที่มีคอเลสเทอรอลสูงที่ถูกชักนำด้วยอาหารคอเลสเทอรอล จะถูกป้อนด้วยน้ำส้มโอผงทุกวัน (1 และ 10 มก./กก./วัน) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าการป้อนด้วยน้ำส้มโอจะลดระดับคอเลสเทอรอล และ LDL และลดการเกิด superoxide anion ในหนูที่มีคอเลสเทอรอลสูง รวมทั้งการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร Ach และปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดจะเพิ่มขึ้นในหนูที่มีคอเลสเทอรอลสูงที่ได้รับน้ำส้มโอผง

สรุปผลการทดลอง: จากผลการทดลองนี้ สรุปได้ว่า การได้รับน้ำส้มโอผงจะลดอนุมูลอิสระและฟื้นฟูการขยายตัวของหลอดเลือดแดงแบบขึ้นกับเซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดของหลอดเลือดแดงของหนูที่มีคอเลสเทอรอลสูง

คำสำคัญ: ส้มโอ, ภาวะคอเลสเทอรอลสูง, เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือด, การคลายตัวของหลอดเลือด

สารบัญ

	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
สารบัญ	3-4
สารบัญตาราง	5-6
สารบัญภาพ	7-8
สรุปโครงการ (Executive Summary)	9-12
บทนำ	13-14
วัตถุประสงค์โครงการ	15
วิธีการทดลอง	16-22
ผลการทดลอง	
ตอนที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำส้มโอผง	23-25
ตอนที่ 2 ผลของการให้น้ำส้มโอผงแบบ <i>in vitro</i> ต่อการเกิด superoxide anion ใน หลอดเลือดแดงของหนูปกติ	26-28
ตอนที่ 3 ผลของการป้อนน้ำส้มโอผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูปกติและหนูที่มี คอเลสเตอรอลสูง	
3.1 ผลต่อน้ำหนักตัว, ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับไขมันในเลือด	29-38
3.2 ผลต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดง	39-40

3.3 ผลต่อ Cumulative concentration response curve ของสาร ACh และ สาร SNP	42-46
3.4 ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta	47-49
วิจารณ์ผลการทดลอง	50-52
เอกสารอ้างอิง	53-56
ภาคผนวก	
1. ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มต่างๆ	57-58
2. เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ	59-60

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก, pH, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix) ของตัวอย่างส้มโอพันธุ์ทองดี	24
2	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	24
3	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	24
4	ปริมาณ ascorbic acid ของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	25
5	ปริมาณ naringin ของน้ำส้มโอและน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	25
6	แสดงผลของน้ำส้มโอผง (P) ที่ความเข้มข้น 0.01 – 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตรและdiphenyleneiodonium (DPI) ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	26
7	แสดงค่า น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มต่างๆ	30

ตารางที่		หน้า
8	แสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ	31
9	แสดงค่า total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL, LDL ใน plasma และ atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มต่างๆ	32
10	แสดงค่า superoxide generation ของหนูกลุ่มต่างๆ	40
11	แสดงค่า pEC ₅₀ และ Rmax ต่อสาร ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ	43
12	แสดงค่า pEC ₅₀ และ Rmax ต่อสาร SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ	44
13	ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ	48

สารบัญรูปร่างภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงผลของน้ำส้มโอผง (P) ที่ความเข้มข้น 0.01 – 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตรและ diphenyleneiodonium (DPI) ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ	28
2	แสดงค่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	33
3	แสดงค่า total cholesterol (TC) ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	34
4	แสดงค่า triglyceride (TG) ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	35
5	แสดงค่า HDL ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	36
6	แสดงค่า LDL ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	37

ภาพที่		หน้า
7	แสดงค่า atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	38
8	แสดงการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	41
9	การเปลี่ยนแปลงของ Cumulative concentration response curve ของสาร ACh (10^{-10} - $10^{-4.5}$ M) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	45
10	การเปลี่ยนแปลงของ Cumulative concentration response curve ของสาร SNP (10^{-10} - $10^{-4.5}$ M) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	46
11	ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta ของ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S)	49

สัญญาเลขที่ RDG5420050

สรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำส้มคั้นต่อการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

หัวหน้าโครงการ 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) มีอัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้ 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

ส้มโอ เป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีการปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในด้านการส่งออกไม่แพ้ผลไม้ชนิดอื่น ๆ ส้มโอมี ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ Citrus grandis Osb. อยู่ในตระกูล Rutaceae มีรายงานวิจัยพบว่า ส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปานกลางและยังมีฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation แต่ยังไม่มียางานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และต้านอนุมูลอิสระของส้มโอในเซลล์หลอดเลือดโดยตรง และการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และการทำงานของหลอดเลือดในภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เพื่อเป็นแนวทางพัฒนางานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการบริโภคส้มโอเป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การลดการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระ ในหลอดเลือด
2. การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และค่าดัชนีการเกิดโรคหลอดเลือดแข็งในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
3. ปริมาณสาร nitric oxide ในหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
4. การทำงานของหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง

วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำส้มโอผง

เตรียมตัวอย่างน้ำส้มโอ โดยนำส้มโอพันธุ์ทองดีมาปอกเปลือก ชั่งน้ำหนักเนื้อ จากนั้นแบ่งเป็นชั้นตามกลีบของส้มโอ ลอกเยื่อหุ้มออก แล้วคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบแยกกากระดับอุตสาหกรรม หลังจากนั้น นำน้ำส้มโอที่ได้ แข็งไว้ที่อุณหภูมิ - 30 °C เพื่อใช้ในการแปรรูปโดยเติม diluents (maltodextrin DE10 (4%) + tricalcium phosphate (1%)) เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัด และนำไปอบแห้งด้วยเครื่อง Spray dry จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณ ascorbic acid ปริมาณ Naringin

ตอนที่ 2 ผลของการให้น้ำส้มโอผงแบบ *in vitro* ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ

หนูแรทปกติ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด หลังจากเติม น้ำส้มโอผงที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี lucigenin-enhanced chemiluminescence method

ตอนที่ 3 ผลของการป้อนน้ำส้มโอผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูปกติและหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1. สัตว์ทดลอง

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 2 เดือน สำหรับการทดสอบฤทธิ์ระยะยาวของน้ำส้มโอผง จะแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับอาหารปกติ และกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูง (H) ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลสูง จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

หลังจากนั้นกลุ่ม H ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

- 1.1 ไม่ได้รับน้ำส้มโอผงใดๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- 1.2 ป้อนน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่อวัน
- 1.3 ป้อนน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ต่อวัน
- 1.4 ป้อน diluents (maltodextrin DE10 (4%) + tricalcium phosphate (1%)) เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- 1.5 ป้อน simvastatin 120 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์

หมายเหตุ ทุกกลุ่ม (1.1-1.5) ยังคงได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงตลอดการทดลอง

3.2 ผลต่อระดับไขมันในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจากข้อ 3.1 จะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ ก่อนปั่นแยกซีรัมโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้วัดระดับน้ำตาลในเลือด, ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) โดยการวัดระดับน้ำตาลในเลือดจะวัดโดยเครื่อง Accu-Check monitor ส่วนการวัดระดับปริมาณ total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) โดยใช้ commercial test kit จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จากสูตรการคำนวณของ Friedewald equation และคำนวณหาค่า atherogenic index (AI) เพื่อประเมินโอกาสเกิดโรค atherosclerosis

3.3 ผลต่อทำงานของ NADPH oxidase และ การทำงานของหลอดเลือด และปริมาณสาร NO ในหลอดเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทุกกลุ่มจะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด โดยวิธี lucigenin-enhanced chemiluminescence method หรือทดสอบการทำงานของหลอดเลือด โดยวิธี organ bath technique ส่วนปริมาณของ nitric oxide โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ nitrite และ nitrate

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า การให้น้ำส้มโอผงโดยตรง สามารถลด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติโดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัด และการป้อนน้ำส้มโอผลเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ใหหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะลดปริมาณไขมันชนิดไม่ดี TC, LDL และ AI และลดการทำงานของ NADPH_{oxidase} ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดง และยังเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ขึ้นกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด รวมทั้งยังเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือด

สรุปผลการทดลอง

น้ำส้มโอผลอาจมีฤทธิ์ป้องกันความผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ และเพิ่มการทำงานของสาร NO ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2008, พบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มีอัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้นี้ 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 (1)

และทุกวันนี้ วงการแพทย์ยอมรับอย่างไม่มีข้อโต้แย้งแล้วว่า สาเหตุหนึ่งของโรคหัวใจและหลอดเลือดมีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสิ่งที่ทุกคนรับประทานเข้าไป การบริโภคอาหารที่มีปริมาณคอเลสเตอรอลสูง จนก่อให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น (2) โดยระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงส่งผลเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกาย รวมทั้งในระบบหลอดเลือด (3-4) โดยแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ superoxide anion ในเซลล์หลอดเลือดที่สำคัญ คือ เอมไซม์ NADPH_{oxidase} (5) สารอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide (NO) ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ยิ่งส่งผลทำลายเซลล์หลอดเลือด และลดการทำงานของสาร NO ส่งผลให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ในที่สุด (6-7) ซึ่งมีรายงานวิจัยที่ศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีระดับคอเลสเตอรอลในเลือดสูงจากการกินอาหารที่มีไขมันสูงจะมีการแสดงออกของ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือดหัวใจและมีการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide เพิ่มขึ้น (8,9) ดังนั้นถ้าสามารถลดระดับไขมันในเลือดและลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} จะช่วยลดภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดในผู้ป่วยที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง ซึ่งวิธีการทดสอบฤทธิ์ต่อการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือดโดยตรง จะให้ผลที่แม่นยำและน่าจะมีประโยชน์สูงในการพัฒนางานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

ส้มโอ เป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากการปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในด้านสารออกฤทธิ์ไม่แพ้ผลไม้ชนิดอื่น ๆ ส้มโอมี ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ Citrus grandis Osb. อยู่ในตระกูล Rutaceae มีรายงานวิจัยพบว่า ส้มโอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ปานกลาง (10,11) และยังมีฤทธิ์ต้านการเกิด lipid peroxidation (12) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยพบว่า ส้มโอนั้นอุดมไปด้วยสารพวก flavonoids (13) ซึ่งสารพวกนี้จะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งมีฤทธิ์ลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือด ในการสร้างอนุมูลอิสระ และยังเพิ่มการทำงานของสาร Nitric oxide (NO) ทำให้การคลายตัวของหลอดเลือดดีขึ้น (14) แม้ว่าจะมีรายงานวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส้มโอ แต่ยังไม่มียานวิจัยใดที่ทดสอบในเซลล์หลอดเลือดโดยตรง และระบุว่าสารประกอบส้มโอส่งผลการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด การลดไขมันในเลือด และการ

ทำงานของหลอดเลือดในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อการทำงานของเอนไซม์ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และการทำงานของหลอดเลือดในภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง เพื่อเป็นแนวทางพัฒนางานวิจัยในขั้นสูงต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการบริโภคส้มโอเป็นระยะเวลา 1 เดือนในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. การลดการทำงานของ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระ ในหลอดเลือด
2. การลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและค่าดัชนีการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง (atherogenic index) ในหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
3. ปริมาณสาร nitric oxide ในหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง
4. การทำงานของหลอดเลือดของหนูที่มีไขมันในเลือดสูง

หลังจากนั้นทำการการแปรรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dry) โดยนำตัวอย่างน้ำส้มโอผสม ใส่ในบีกเกอร์ ทำแห้งโดยเครื่อง Spray dryer (NIRO ATOMIZER, COPENHAGEN DENMARK) ตั้งอุณหภูมิเข้า 150 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่ง น้ำหนักน้ำส้มโอผงที่ได้จากถัวยรองรับผงของเครื่อง Spray dryer เพื่อคำนวณร้อยละผลผลิต บรรจุ น้ำส้มโอผงลงในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันอากาศ และความชื้น นำถุงซิปล็อคใส่ในถุงออลูมิเนียมเพื่อ ป้องกันแสง รวมทั้งใส่ซิลิกาเจลเพื่อช่วยดูดความชื้น เก็บตัวอย่างไว้ในที่แห้งและพ้นแสง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณฟีนอลิก ปริมาณฟลาโวนอยด์ ปริมาณ Ascorbic acid ปริมาณ Naringin ต่อไป

1.3. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

1.3.1. การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic)

น้ำส้มโอและผงน้ำส้มโอ (นำมาละลายน้ำในสัดส่วนที่เหมาะสม) ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้วิธี Folin – Ciocalteu โดยปิเปตสารสกัด น้ำกลั่น หรือสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 40, 80, 120, 160, 200 ppm 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร และ Folin – Ciocalteu 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex genie2 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ 0.6 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้า กันด้วยเครื่อง Vortex นำไปให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็น ทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 755 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV – Vis Spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Corporation, Japan) หลังจากนั้นนำค่าที่วัดได้ จากน้ำกลั่น และสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ มาทำเป็น Standard curve เพื่อใช้ เปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ของสารสกัด และคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดในรูปของ มิลลิกรัมของ Gallic acid สมมูลต่อกรัมของผงหรือมิลลิลิตรของน้ำส้มโอ (15)

1.3.2. การวิเคราะห์ปริมาณ Ascorbic acid

ปิเปต สารละลาย L-ascorbic acid มาตรฐานความเข้มข้น 10, 30, 50, 70, 100 ppm น้ำส้มโอ 1 มิลลิลิตร หรือซังผงส้มโอมาประมาณ 150 มิลลิกรัม เติม 1% metaphosphoric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไป Sonicate 10 นาที (Transsonic Digital, Elma) ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น Centrifuge (H-1200B, KOKUSAN ENSINKI, TOKYO, JAPAN) นำของเหลวใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2,6-dichloroindophenol ความเข้มข้น 8.6×10^{-5} โมลาร์ 9 มิลลิลิตร และ วัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 30 นาที ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณปริมาณ L- ascorbic acid และรายงานผลเป็นหน่วย ไมโครกรัมของ L-ascorbic acid ต่อ กรัมของผงหรือ มิลลิลิตรของน้ำส้มโอ (16)

1.3.3. การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ (Flavonoids)

ปิเปต น้ำส้มโอ ผงน้ำส้มโอที่นำมาละลายน้ำในสัดส่วนที่เหมาะสม หรือสารละลาย Catechin มาตรฐานความเข้มข้น 20, 40, 60, 100 ppm ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำ 2 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง และเติมน้ำสารละลาย NaNO_2 เข้มข้น 5% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้

6 นาที เติมน้ำสารละลาย $AlCl_3$ เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที หลังจากนั้นเติมน้ำสารละลาย NaOH เข้มข้น 4% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นทันทีจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะเห็นเป็นสีชมพูเข้ม นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นของในรูปของ มิลลิกรัมของ catechin สมมูลต่อ กรัมของผงหรือมิลลิลิตรของน้ำส้มโอ (17)

1.3.4. การวิเคราะห์ปริมาณ naringin โดยใช้เครื่อง HPLC

น้ำส้มโอผง (0.01mg/5ml) หรือตัวอย่างน้ำส้มโอไม่ต้องเจือจาง นำเข้าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ที่ใช้คือ Prodigy 5U ODS3 100R, 250 mm x 4.6 mm, 5 μ m Mobile Phase ประกอบด้วย A คือ 0.1% Acetic acid และ B คือ Acetonitrile, โดยสภาวะของการวิเคราะห์ ดังนี้ เวลา 0 นาที 10.0 %B, เวลา 3 นาที 10.0 %B, เวลา 30 นาที 45.0 %B, เวลา 33 นาที 45.0 %B, เวลา 38 นาที 10.0 %B อัตราการไหลอยู่ที่ 1ml/min เครื่องตรวจวัดสัญญาณคือ Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 260 280 และ 320 นาโนเมตร

1.4. วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

1.4.1 การวิเคราะห์ความเป็นกรด-ด่าง

นำน้ำส้มโอนำมาวัดหาความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH meter

1.4.2. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้

นำน้ำส้มโอนำมาวัดหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ด้วยเครื่อง Refractometer (ATAGO, N-2E, Japan)

1.4.3. การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาหาปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่องวัดความชื้นอินฟราเรด (IR) (Sartorius, YTC-01L, Germany)

1.4.5. การวิเคราะห์อัตราการละลาย

เพื่อวิเคราะห์ความสามารถในการละลายน้ำ (water solubility) ของน้ำส้มโอผง จึงนำผงมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนประมาณ 1 กรัม ละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 80 °C ปริมาตร 50 ml คนให้ผงละลายด้วยแท่งแก้ว เป็นเวลา 2-3 นาที หลังจากนั้นเทลงบนกระดาษกรองที่ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 คืน คำนวณ %การละลาย จากสูตร (น.น.กระดาษกรองหลังน้ำผ่าน - น.น.กระดาษกรองเริ่มต้น) x 100

ตอนที่ 2 ผลของการให้น้ำส้มโอแบบ *in vitro* ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ

2.1. การแยกหลอดเลือดแดง aorta

หนูแรพปกติ จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด หรือทดสอบการทำงานของหลอดเลือด

2.2. ศึกษา acute effect ของน้ำส้มโอผงในการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด

การเกิดอนุมูลอิสระ superoxide anion จะถูกวัดในหลอดเลือดแดง aorta โดยวิธี lucigenin-enhanced chemiluminescence method (14) ซึ่งวิธีนี้จะอาศัยหลักการให้สารตั้งต้น β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate เพื่อดูการทำงานของเอนไซม์ NADPH oxidase ในหลอดเลือดในการสร้างสารอนุมูลอิสระ superoxide anion

โดยนำชิ้นหลอดเลือดแดง aorta จากหนูแรทปกติ incubate ในสารละลาย Krebs-HEPES buffer ที่มีสาร diethylthiocarbamic acid (มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase) และมีสาร β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH ; เป็นสารตั้งต้นของ NADPH oxidase) จากนั้นเติม สาร diluents หรือน้ำส้มโอผงที่มีความเข้มข้น 0.01-10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือ สาร diphenylene iodonium (DPI ; มีฤทธิ์ยับยั้ง NADPH oxidase) แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้น เตรียมสารละลาย Krebs-HEPES buffer ที่ผสม lucigenin และ diluents หรือน้ำส้มโอผงที่มีความเข้มข้นต่างๆ หรือ DPI ใส่ใน 96-well Optiplate แล้ววัด background photon emission ด้วยเครื่อง luminometer จากนั้นนำหลอดเลือดแดง aorta ที่ incubate ด้วยสารละลายข้างต้นมาใส่ใน 96-well Optiplate แล้ววัดปริมาณ superoxide anion ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง luminometer หลังจากนั้น หลอดเลือดแดง aorta จะถูกนำเข้าตู้อบ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ superoxide anion ที่เกิดขึ้นจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ยของ relative light units ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อแห้ง 1 มิลลิกรัม

ตอนที่ 3 ผลของการป้อนน้ำส้มโอผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูปกติและหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

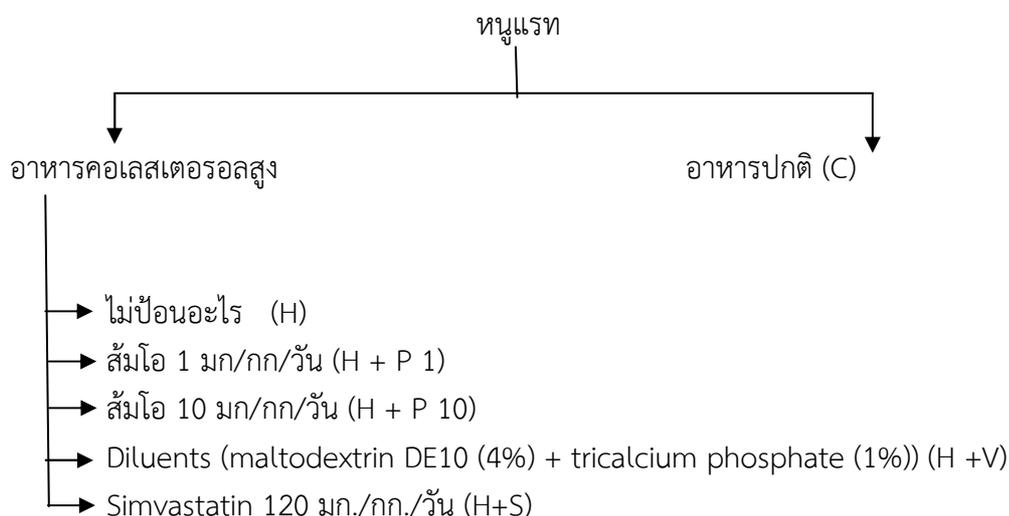
หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับอาหารปกติ และกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูง (H) ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะคอเลสเตอรอลสูง จะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง

หลังจากนั้นกลุ่ม H ซึ่งจะได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อยดังนี้

- 1.1 ไม่ได้รับน้ำส้มโอผงใดๆ เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- 1.2 ป้อนน้ำส้มโอผงที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- 1.3 ป้อนน้ำส้มโอผงที่มีความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์
- 1.4 ป้อน diluents (maltodextrin DE10 (4%) + tricalcium phosphate (1%)) เป็นเวลา 4 สัปดาห์

1.5 ป้อน simvastatin 120 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์

หมายเหตุ ทุกกลุ่ม (1.1 – 1.5) ยังคงได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูงตลอดการทดลอง



3.2. การแยกหลอดเลือดแดง aorta

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทั้งหนูแรทปกติ และหนูที่มีไขมันในเลือดสูง จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$ ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด หรือทดสอบการทำงานของหลอดเลือด

3.3. ศึกษา chronic effect ของน้ำส้มโอผงในการทำงานของ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$ ในการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือด

นำ ชิ้นหลอดเลือดแดง aorta จากสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม incubate ในสารละลาย Krebs-HEPES buffer ที่มีสาร diethylthiocarbamic acid (มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ superoxide dismutase) และมีสาร β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH ; เป็นสารตั้งต้นของ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$) จากนั้น นำสารละลาย Krebs-HEPES buffer ที่ผสม lucigenin และ diluents หรือ DPI ใส่ใน 96-well Optiplate แล้ววัด background photon emission ด้วยเครื่อง luminometer จากนั้นนำหลอดเลือดแดง aorta ที่ incubate ด้วยสารละลายข้างต้นมาใส่ใน 96-well Optiplate แล้ววัดปริมาณ superoxide anion ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง luminometer หลังจากนั้น หลอดเลือดแดง aorta จะถูกนำเข้าสู่ตู้อบ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณ superoxide anion ที่เกิดขึ้นจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ยของ relative light units ต่อน้ำหนักเนื้อเยื่อแห้ง 1 มิลลิกรัม

3.4. ฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ ก่อนปั่นแยกซีรัมโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อใช้วัดระดับน้ำตาลในเลือด, ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) โดยการวัดระดับน้ำตาลในเลือดจะวัดโดยเครื่อง Accu-Check monitor ส่วนการวัดระดับปริมาณ total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) โดยใช้ commercial test kit

จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จากสูตรการคำนวณของ Friedewald equation

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

และคำนวณหาค่า atherogenic index (AI) เพื่อประเมินโอกาสเกิดโรค atherosclerosis จากสูตร

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

3.5. ฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อการทำงานของหลอดเลือด

เพื่อศึกษาความสามารถในการหดตัวของหลอดเลือดแดง สาร PE ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะถูกหยดลง organ bath ที่มีเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูทุกกลุ่ม และเพื่อศึกษาความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดแดง เนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ จะถูกเหนี่ยวนำให้ตัวระดับปานกลางด้วยสาร PE (10^{-9} - 10^{-5} M) ก่อนที่หยด สาร ACh ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อประเมินสภาพของเซลล์ endothelium หรือ สาร SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อประเมินสภาพของเซลล์ smooth muscle

3.6. ฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อ nitric oxide

นำหลอดเลือด aorta ที่แยกหนูทุกกลุ่มมาปั่น (homogenize) ใน phosphate buffer (pH 7.4) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g เป็นเวลา 20 นาที และ supernatant ที่ได้จะถูกทำการตรวจวัดปริมาณของ nitric oxide โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ nitrite และ nitrate

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 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของน้ำส้มโอผง

1. สารสกัดน้ำส้มโอผง

ส้มโอประกอบด้วย เปลือก น้ำ และ กากส้มโอ โดยจะมีเปลือกส้มโอคิดเป็น 51.09 % , กากส้มโอคิดเป็น 8.28 % และน้ำส้มโอคิดเป็น 40.63 % และส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้วิเคราะห์มี pH เท่ากับ 4.81 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 11.6 °Brix เมื่อคิดเป็นร้อยละผลผลิตของน้ำส้มโอที่ได้จากเนื้อส้มโอ คิดเป็น 83.06 % (ดังตารางที่ 1) เมื่อนำส้มโอไปแปรรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dry) พบว่า น้ำส้มโอผงมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.68 % และมีปริมาณความชื้นสูงสุดคือ 4.43 ± 0.13 % และการที่ผงส้มโอสามารถดูดความชื้นได้อย่างรวดเร็วทำให้ต้องผสมสารดูดความชื้น maltodextrin DE10 (4%) และ tricalcium phosphate (1%) เพื่อให้ได้ผงที่มีความคงตัวสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าส้มโอและผงน้ำส้มโอ มีปริมาณ ฟีนอลิกทั้งหมด, ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด, ascorbic acid และ naringin ดังแสดงในตารางที่ 2-5

ตารางที่ 1 เเปอร์เซ็นต์น้ำหนัก, pH, ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix) ของตัวอย่างส้มโอพันธุ์ทองดี

เปอร์เซ็นต์เปลือก (%)	เปอร์เซ็นต์กาก (%)	เปอร์เซ็นต์น้ำ (%)	pH	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix)
51.09	8.29	40.63	4.81	11.6

ตารางที่ 2 ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมดของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
น้ำส้มโอคั้น	1481.25 \pm 10.42	-
น้ำส้มโอ (95%) ผสม maltodextrin DE10 (4%) และ tricalcium phosphate (1%)	1210.42 \pm 10.42	-
น้ำส้มโอผง	-	6479.94 \pm 14.26

ตารางที่ 3 ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
น้ำส้มโอคั้น	32.79 \pm 2.79	-
น้ำส้มโอ (95%) ผสม maltodextrin DE10 (4%) และ tricalcium phosphate(1%)	12.68 \pm 0.39	-
น้ำส้มโอผง	-	769.86 \pm 51.35

ตารางที่ 4 ปริมาณ ascorbic acid ของน้ำส้มโอ และน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณ ascorbic acid	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
น้ำส้มโอคั้น	28.49 ± 1.22	-
น้ำส้มโอ (95%) ผสม maltodextrin DE10 (4%) และ tricalcium phosphate(1%)	28.09 ± 0.61	-
น้ำส้มโอผง		2338.49 ± 70.08

ตารางที่ 5 ปริมาณ naringin ของน้ำส้มโอและน้ำส้มโอผง โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตัวอย่าง	ปริมาณ naringin	
	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g/g}$
น้ำส้มโอคั้น	193.59 ± 6.14	-
น้ำส้มโอผง	-	4434.67 ± 8.08

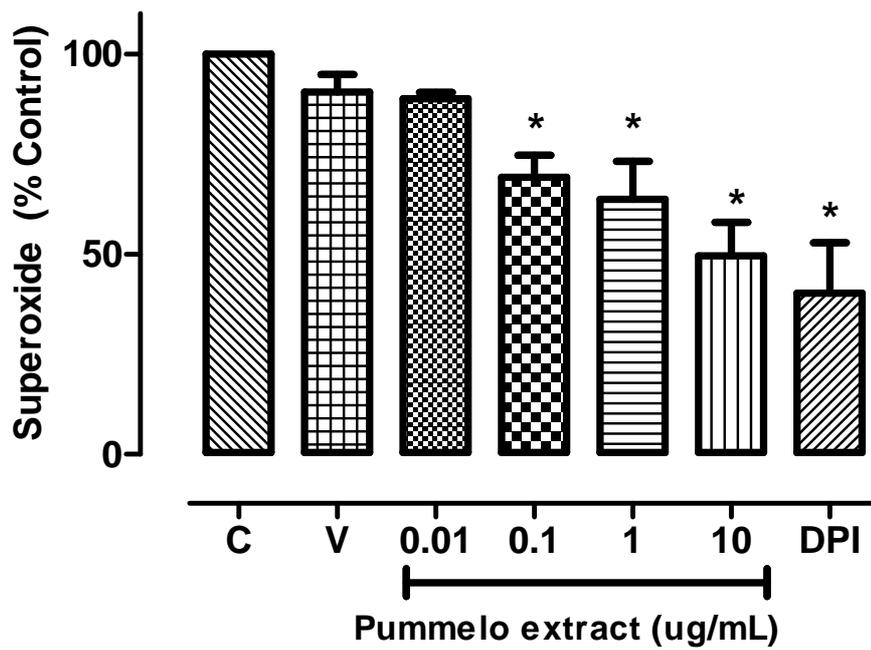
ตอนที่ 2 ผลของการให้น้ำส้มโอผงแบบ *in vitro* ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ

จากการทดลองพบว่า น้ำส้มโอผงสามารถลด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติโดยขึ้นกับความเข้มข้นของสารสกัดโดยขึ้นกับความเข้มข้นของสาร เช่นเดียวกับสาร DPI ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง NADPH_{oxidase} สามารถลดการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงในหนูปกติ ส่วนสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate ซึ่งเป็นสาร diluents ที่ผสมในน้ำส้มโอผงเพื่อให้เกิดการคงตัว พบว่าไม่มีผลต่อการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือดแดง ดังแสดงในตารางที่ 6 และภาพ 1 นอกจากนี้ยังพบว่าการให้น้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้นมากกว่า 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ผลลดการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดง ได้ใกล้เคียง ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ไม่ได้แสดงในตาราง)

ตารางที่ 6 แสดงผลของน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 0.01 – 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate และ DPI ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ

	Superoxide generation (%Control)
สาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate	90 ± 3
น้ำส้มโอผง 0.01 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	89 ± 2
น้ำส้มโอผง 0.1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	69 ± 6*
น้ำส้มโอผง 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	64 ± 8*
น้ำส้มโอผง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	50 ± 8*
DPI	40 ± 10*

*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C; ค่าแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 1 แสดงผลของน้ำส้มโอผง (P) ที่ความเข้มข้น 0.01 - 10 ไมโครกรัมต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มิลลิลิตร และ สาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate (V) และ diphenyleneiodonium (DPI) ต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ โดย ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

ตอนที่ 3 ผลของการบ่อน้ำส้มโอผงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูปกติและหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง

3.1 ผลระยะยาวต่อน้ำหนักตัว, ระดับน้ำตาลในเลือดและระดับไขมันในเลือด

ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจะมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่หนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงที่ได้รับสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate ซึ่งเป็นสาร diluents ที่ผสมในน้ำส้มโอผงเพื่อให้เกิดการคงตัว จะมีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียวตลอดการทดลอง และเมื่อหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงได้รับสารสกัดน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่า จะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึง สัปดาห์ที่ 8 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลจะคล้ายคลึงกับหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงที่ได้รับสาร simvastatin ซึ่งเป็นยาลดไขมันในเลือด จะมีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 6 ถึง สัปดาห์ที่ 8 เช่นกัน แสดงว่า การบ่อนสารสกัดน้ำส้มโอผงจะช่วยลดน้ำหนักตัวของหนูแรทที่มีคอเลสเตอรอลสูง แต่ผลในการลดน้ำหนักของสารสกัดน้ำส้มโอผง ในการทดลองนี้จะไม่ขึ้นกับความเข้มข้นของน้ำส้มโอผงที่ได้รับ (ตารางที่ 7 และ ภาพที่ 2) นอกจากนี้ หนูทุกกลุ่มจะมีระดับน้ำตาลในเลือด ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าการได้รับสารสกัดน้ำส้มโอผง ไม่มีผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง (ตารางที่ 8)

ค่า TC, TG , LDL และ atherogenic index ในหนูกลุ่มคอเลสเตอรอลสูงจะมากกว่าหนูกลุ่มควบคุม และการได้รับสารสกัดเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะมีผลลดระดับ TC, TG , LDL และ atherogenic index อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ค่า HDL ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มคอเลสเตอรอลสูงจะไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 9 และภาพที่ 3-7)

ตารางที่ 7 แสดงค่าน้ำหนักตัวของหนูแรทกลุ่มต่างๆ

เวลา (สัปดาห์)	น้ำหนักตัว (กรัม, ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)					
	C	H	H+V	H+P 1 mg/kg	H + P 10 mg/kg	H +S
0	227 \pm 2	214 \pm 4	219 \pm 2	218 \pm 4	219 \pm 6	218 \pm 3
1	259 \pm 4	256 \pm 5	268 \pm 3	241 \pm 5	239 \pm 3	259 \pm 8
2	290 \pm 8	305 \pm 5	308 \pm 4	289 \pm 6	290 \pm 3	307 \pm 8
3	311 \pm 6	352 \pm 5*	333 \pm 4*	338 \pm 6*	332 \pm 3*	339 \pm 10*
4	329 \pm 4	371 \pm 7*	360 \pm 2*	362 \pm 3*	366 \pm 2*	372 \pm 6*
5	355 \pm 6	392 \pm 5*	377 \pm 3*	378 \pm 4*	373 \pm 3*	366 \pm 16
6	364 \pm 5	423 \pm 6*	392 \pm 3*	388 \pm 5 ⁺	381 \pm 4 ⁺	363 \pm 12 ⁺
7	380 \pm 4	447 \pm 6*	421 \pm 5*	397 \pm 6 ⁺	386 \pm 3 ⁺	362 \pm 23 ⁺
8	401 \pm 3	463 \pm 7*	441 \pm 3*	417 \pm 6 ⁺	398 \pm 4 ⁺	356 \pm 24 ^{*+}

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

ค่าแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ; H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 8 แสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแรทกลุ่มต่างๆ

	Blood glucose (mg/dl)
C	78 ± 5
H	82 ± 8
H + V	86 ± 5
H + P 1 mg/kg	75 ± 6
H + P 10 mg/kg	72 ± 8
H + S	73 ± 5

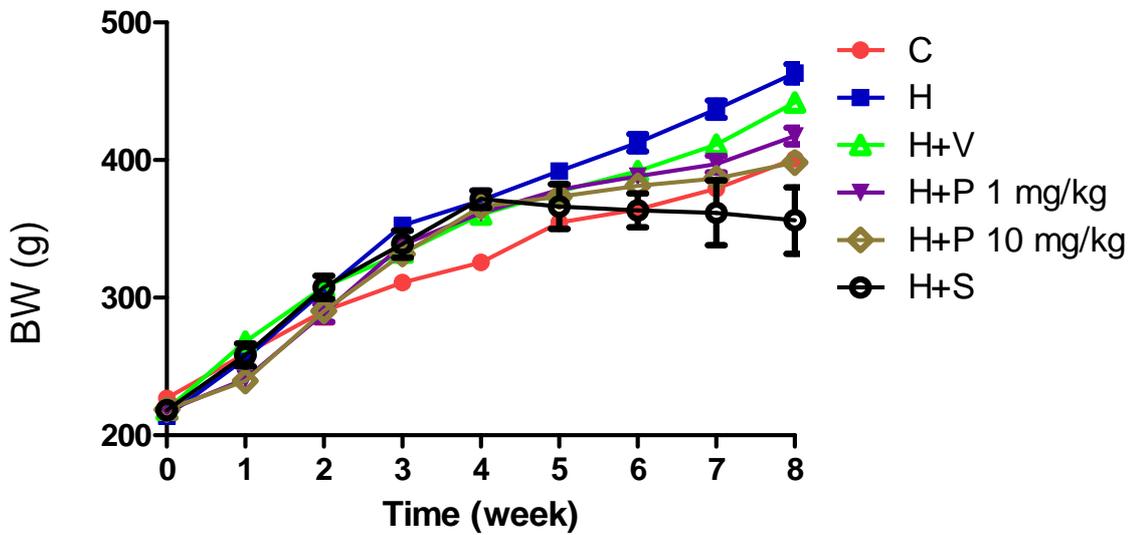
ค่าแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ; H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 9 แสดงค่า total cholesterol (TC), triglyceride (TG), HDL, LDL ใน plasma และ atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มต่างๆ

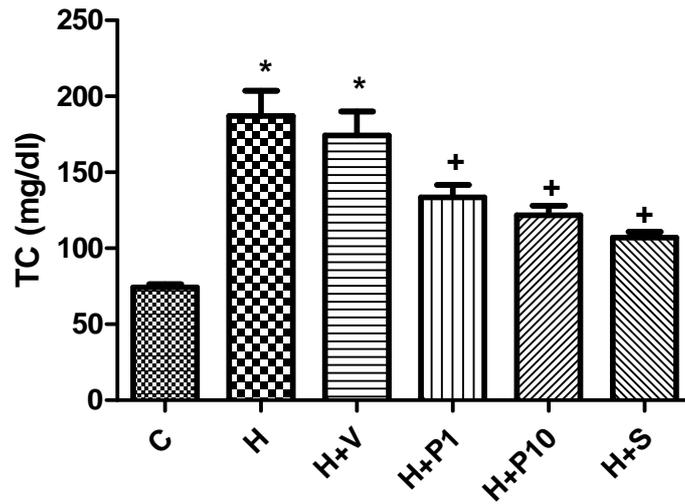
กลุ่ม	ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน				
	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	AI
C	74 \pm 2 ⁺	83 \pm 4 ⁺	39 \pm 1	21 \pm 2 ⁺	0.9 \pm 0.1 ⁺
H	187 \pm 16*	113 \pm 5*	36 \pm 1	122 \pm 18*	4.0 \pm 0.5*
H + V	174 \pm 16*	110 \pm 12*	34 \pm 2	115 \pm 19*	4.1 \pm 1*
H + P 1 mg/kg	134 \pm 8 ⁺	95 \pm 3 ⁺	32 \pm 2	82 \pm 6 ^{*+}	3.2 \pm 0.2 ⁺
H + P 10 mg/kg	122 \pm 6 ⁺	91 \pm 6 ⁺	35 \pm 2	68 \pm 4 ^{*+}	2.5 \pm 0.2 ^{*+}
H + S	107 \pm 4 ⁺	85 \pm 10 ⁺	33 \pm 2	57 \pm 4 ^{*+}	2.3 \pm 0.1 ^{*+}

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

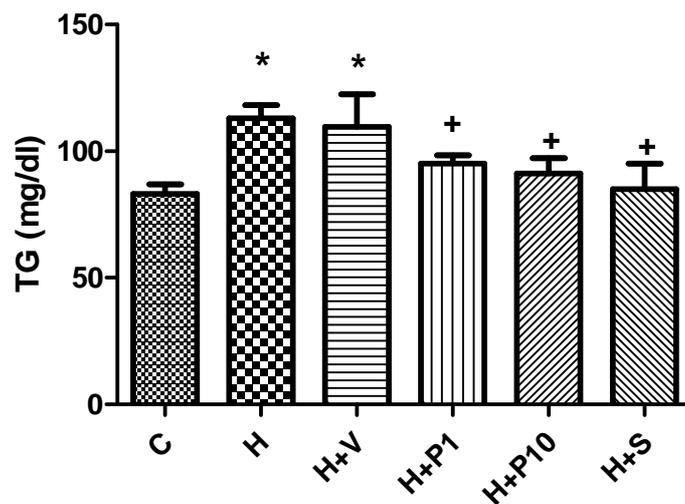
ค่าแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ; H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



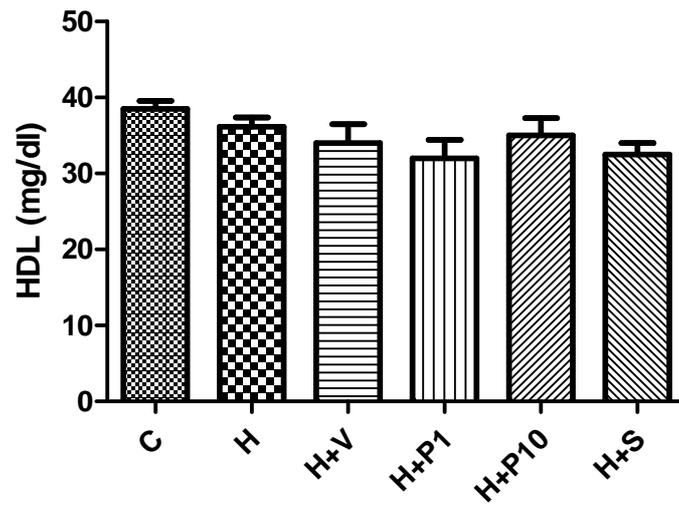
ภาพที่ 2 แสดงค่าน้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



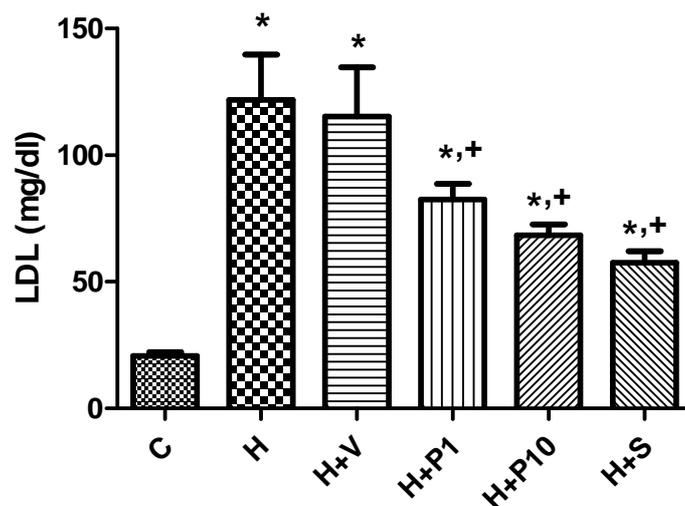
ภาพที่ 3 แสดงค่า total cholesterol (TC) ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, ⁺ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H



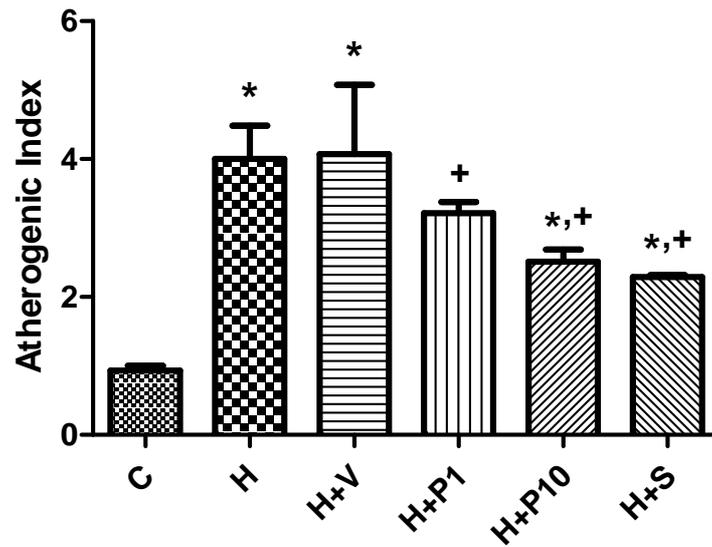
ภาพที่ 4 แสดงค่า triglyceride (TG) ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H



ภาพที่ 5 แสดงค่า HDL ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 6 แสดงค่า LDL ใน plasma ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H



ภาพที่ 7 แสดงค่า atherogenic index (AI) ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยแสดงค่าในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H

3.2. ผลต่อการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ และหนูกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูง

พบว่ากลุ่มที่ได้อาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียวจะมีปริมาณการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงประมาณ 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ป้อนอาหารปกติ การป้อนสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate ซึ่งเป็นสาร diluents ที่ผสมในน้ำส้มโอผง เพื่อให้เกิดการคงตัว ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่า ปริมาณการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว

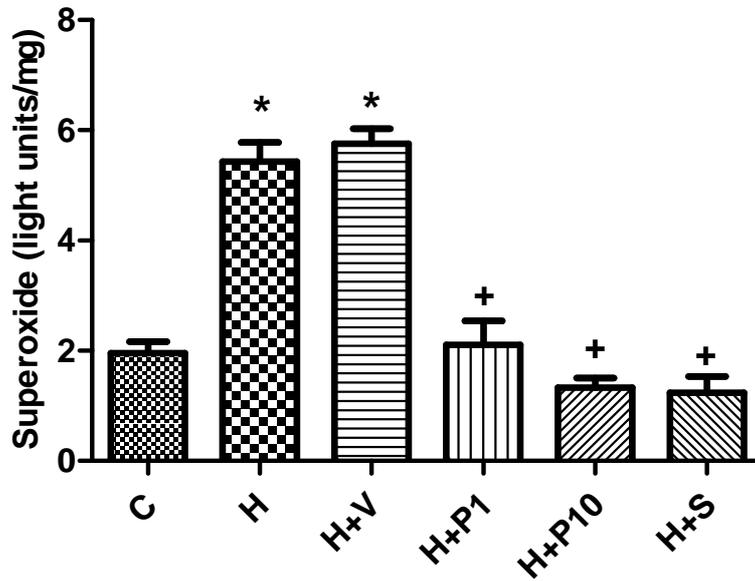
และเมื่อป้อนน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มก./กก. เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า จะลดการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจนใกล้เคียงกับกลุ่มที่ป้อนอาหารปกติขณะที่ การป้อนน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้น 10 มก./กก. จะลดการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงจนใกล้เคียงกับกลุ่มที่ป้อน simvastatin ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 8

ตารางที่ 10 แสดงค่า superoxide generation ของหนูกลุ่มต่างๆ

	Superoxide generation (RLU/mg tissue)
C	2.0 ± 0.2 [†]
H	5.4 ± 0.3*
H + V	5.7 ± 0.3*
H + P 1 mg/kg	2.1 ± 0.4 [†]
H + P 10 mg/kg	1.3 ± 0.2 [†]
H + S	1.2 ± 0.3 [†]

*P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, [†]P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม H

ค่าแสดงในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ; H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 8 แสดงการเกิด superoxide anion ในหลอดเลือดแดงของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C, + $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H

3.3. ผลต่อ Cumulative concentration response curve ของสาร ACh และสาร SNP

โดยปกติ สาร ACh จะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด โดยผ่านทางเซลล์ endothelium จากการทดลองพบว่า endothelium-dependent relaxation ต่อ ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลเพียงอย่างเดียว (H) จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ endothelium ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง การป้อนสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate ซึ่งเป็นสาร diluents ที่ผสมในน้ำส้มโอผงเพื่อให้เกิดการคงตัว ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่า การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh จะลดลง เหมือนกับกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว สำหรับการให้น้ำส้มโอผงความเข้มข้น 1 และ 10 มก/กก/วันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ได้รับ แสดงว่า น้ำส้มโอผงสามารถช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของ endothelium ในหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงได้ ดังแสดงในตารางที่ 11 และ ในภาพที่ 9

ส่วนสาร SNP จะออกฤทธิ์ที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยตรงในการขยายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพบว่า endothelium-independent relaxation ต่อ SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า การให้อาหารที่มีคอเลสเตอรอลสูง จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และเมื่อให้น้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้นต่างๆ หรือ สาร simvastatin เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูทั้งสองกลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 12 และ ในภาพที่ 10

ตารางที่ 11 แสดงค่า pEC₅₀ และ Rmax ต่อสาร ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ

กลุ่ม	Ach	
	pEC ₅₀	R _{max}
C	7.13 ± 0.04	93 ± 2
H	6.85 ± 0.10*	77 ± 2*
H + V	6.74 ± 0.11*	73 ± 4*
H + P 1 mg/kg	7.05 ± 0.06 ⁺	89 ± 4 ⁺
H + P 10 mg/kg	7.03 ± 0.10 ⁺	99 ± 1 ⁺
H + S	7.00 ± 0.15 ⁺	100 ± 0 ⁺

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

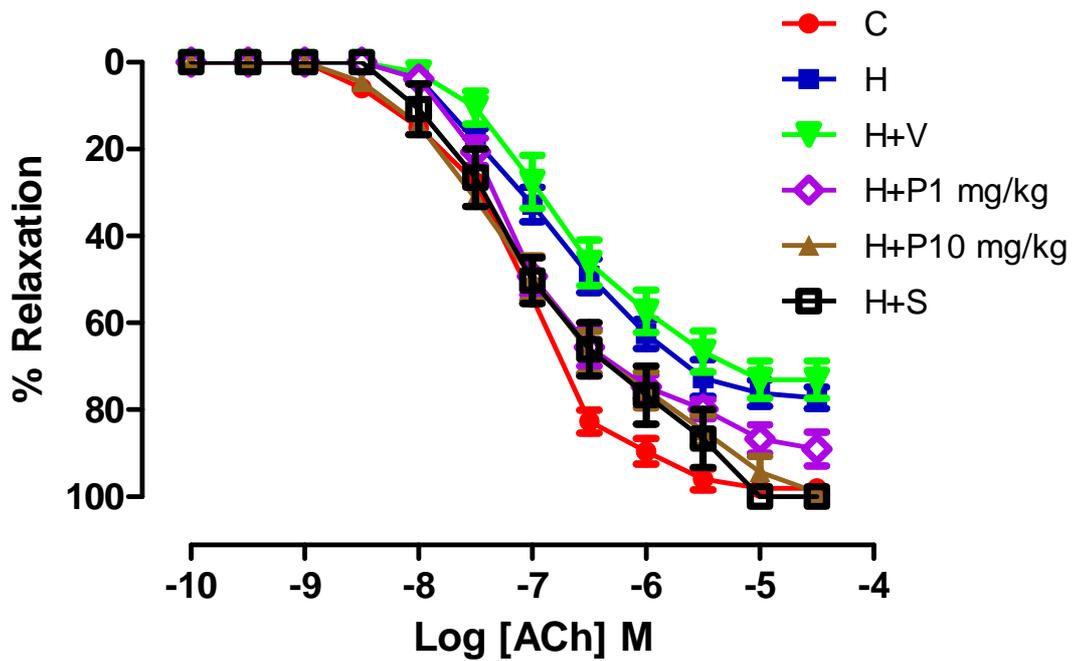
ค่าที่ได้คำนวณจาก กราฟในภาพที่ 9 ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg); H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์

ตารางที่ 12 แสดงค่า pEC₅₀ และ R_{max} ต่อสาร SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ

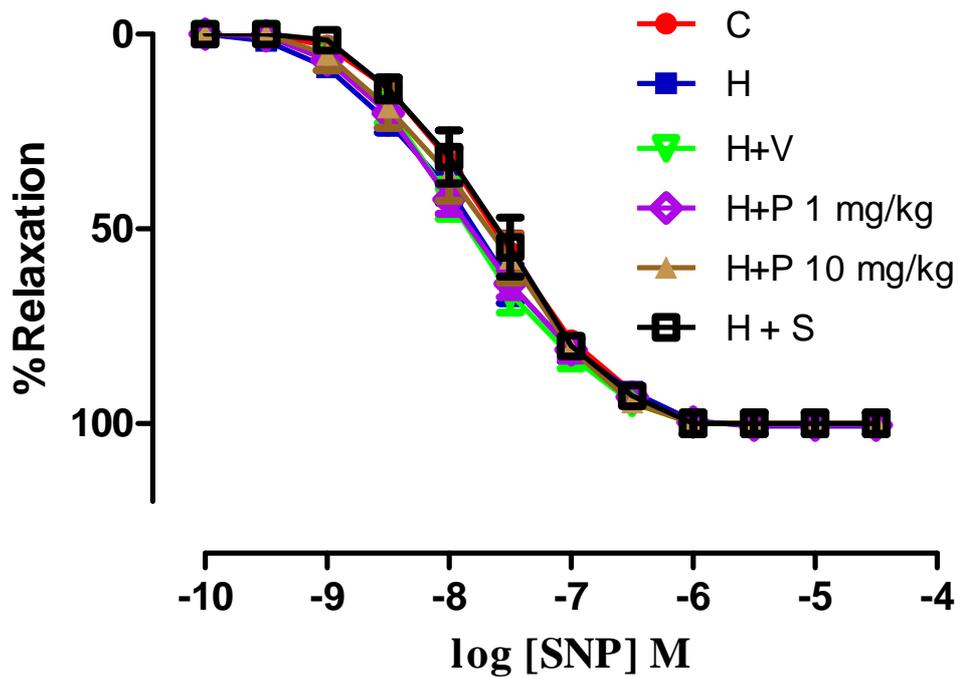
กลุ่ม	SNP	
	pEC ₅₀	R _{max}
C	7.63 ± 0.08	100 ± 1
H	7.77 ± 0.09	101 ± 1
H + diluents	7.84 ± 0.09	100 ± 2
H + P 1 mg/kg	7.81 ± 0.21	101 ± 1
H + P 10 mg/kg	7.71 ± 0.14	100 ± 2
H + S	7.63 ± 0.17	100 ± 3

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ค่าที่ได้คำนวณจาก กราฟในภาพที่ 10 ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg); H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 9 การเปลี่ยนแปลงของ Cumulative concentration response curve ของสาร ACh (10^{-10} - $10^{-4.5}$ M) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์ ซึ่งข้อมูลที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัวเมื่อเทียบกับ precontraction ด้วย PE (%Relaxation) โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของ Cumulative concentration response curve ของสาร สาร SNP (10^{-10} - $10^{-4.5}$ M) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10 mg/kg) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์ ซึ่งข้อมูลที่ได้คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัวเมื่อเทียบกับ precontraction ด้วย PE (%Relaxation) โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

3.4. ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta

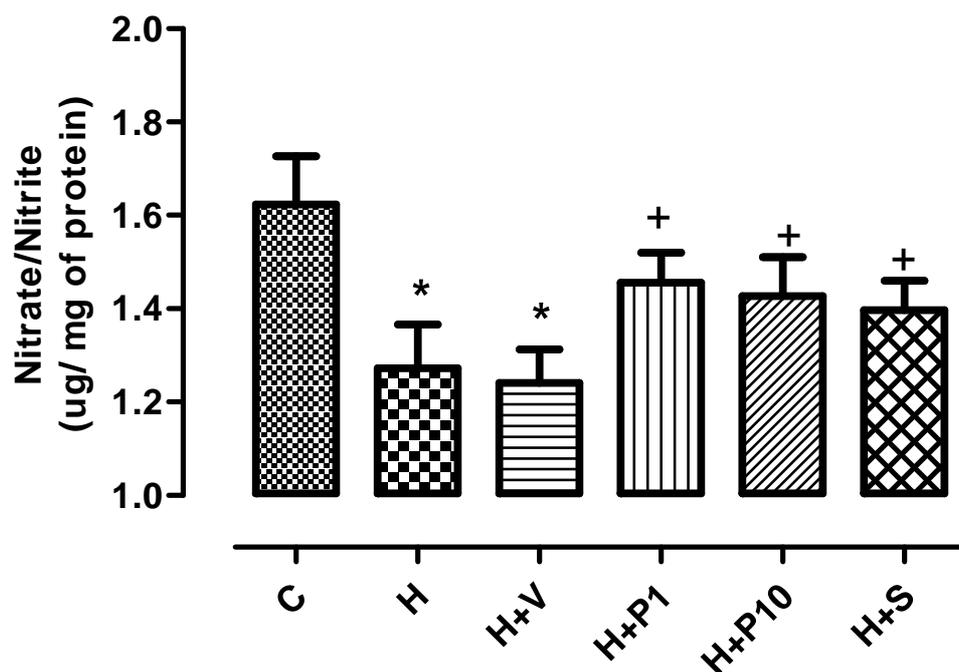
เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของสาร NO ซึ่งหลังจากเซลล์ endothelium ในการทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดนั้น จะประเมินจากปริมาณของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสาร nitric oxide คือ สาร nitrate และ nitrite ในการทดลอง พบว่า ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่ได้รับอาหารปกติมีค่าสูงกว่าหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง การป้อนสาร 4% maltodextrin DE10 และ 1% tricalcium phosphate ซึ่งเป็นสาร diluents ที่ผสมในน้ำส้มโอผงเพื่อให้เกิดการคงตัว ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูง พบว่า ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta จะมีค่าไม่แตกต่างจากหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูงเพียงอย่างเดียว และการป้อนน้ำส้มโอผล ที่ความเข้มข้น 1 และ 10 มก/กก/วันมีผลเพิ่มปริมาณ สาร nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง จนใกล้เคียงกับหนูที่ได้รับอาหารปกติ โดยไม่ขึ้นกับความเข้มข้นที่ได้รับ (ตารางที่ 13 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 13 ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ

	Nitrate/Nitrite ($\mu\text{g}/\text{mg}$ tissue)
C	1.62 ± 0.1
H	$1.27 \pm 0.1^*$
H + V	$1.24 \pm 0.1^*$
H + P 1 mg/kg	$1.46 \pm 0.1^+$
H + P 10 mg/kg	$1.42 \pm 0.1^+$
H + S	$1.40 \pm 0.1^+$

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

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; H คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอล ; H+V คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อน diluents ; H+ P 1 mg/kg คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1 mg/kg); H+ P 10 mg/kg คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม; H+S คือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเทอรอลร่วมกับป้อน simvastatin โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์



ภาพที่ 11 ปริมาณ nitrate และ nitrite ในหลอดเลือดแดง aorta ของ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอล (H) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลร่วมกับ ป้อน diluents (H+V) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 1) หรือ ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (H+ P 10) หรือ ป้อน simvastatin (H+S) โดยป้อนสารต่างๆเป็นระยะ 4 สัปดาห์ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C , $^+ P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม H

วิจารณ์ผลการทดลอง

มีรายงานวิจัยพบว่าส้มโอนั้นอุดมไปด้วยสารพวก flavonoids เช่น สาร naringin (13) ซึ่งสารพวกนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือดในการสร้างอนุมูลอิสระได้ (14, 18-21) โดยปกติแหล่งสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดมีมากมาย แต่เอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือด ถือว่าเป็นแหล่งที่สำคัญที่สุดในการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมากในหลอดเลือด (9,22) ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทดสอบฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงต่อการสร้าง อนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดแดง โดยเติมสาร NADPH ในหลอดเลือดแดง aorta ซึ่งสาร NADPH จะเป็นสารตั้งต้น ที่เอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในหลอดเลือด จะเปลี่ยนให้เป็น อนุมูลอิสระ superoxide anion พบว่าเมื่อให้น้ำส้มโอผงจะลดการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดแดงได้ ซึ่งผลที่ได้จะใกล้เคียงกับการให้สารมาตรฐาน DPI ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์ NADPH_{oxidase} แสดงว่า น้ำส้มโอผงมีฤทธิ์โดยตรงในการลดการทำงานของเอนไซม์ NADPH_{oxidase} ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดง

เป็นที่ทราบกันดีว่า การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ เป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ในภาวะที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเรื้อรัง โดยสารอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ส่งผลทำลายเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด จนเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง ตามมาได้ และมีงานวิจัย พบว่า สัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้มีภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูงนั้น จะมีการทำงานของ NADPH_{oxidase} และอนุมูลอิสระ superoxide anion เพิ่มขึ้นในหลอดเลือดแดง (23) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ ที่พบว่า การทำงานของ NADPH_{oxidase} ในหนูกลุ่มที่มีคอเลสเตอรอลสูงจะเพิ่มขึ้น ประมาณ 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเตอรอลจะเกิดภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง โดยมีระดับไขมัน TC และ LDL มากกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ประมาณ 1.5 และ 6 เท่า ตามลำดับ และ ยังมีปริมาณ AI ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ความเสี่ยงของการเกิดภาวะหลอดเลือดตีบ เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่า สำหรับการให้ simvastatin ขนาด 120 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 (24) มีรายงานวิจัย พบว่า การเพิ่มขึ้นของ LDL เป็นเวลานาน จะทำให้ LDL ถูก ออกซิไดส์ด้วยอนุมูลอิสระ จนกลายเป็น oxidized LDL ซึ่งสามารถเพิ่ม mRNA expression ของ NADPH_{oxidase} และเพิ่มการทำงานของ NADPH_{oxidase} (25, 26)

เมื่อทดสอบผลของการป้อนน้ำส้มโอผงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง พบว่า ระดับไขมันชนิดไม่ดี TC, LDL และ AI จะลดลง แต่ไม่มีผลกับระดับไขมันชนิดดี HDL

มีรายงานวิจัยพบว่า สาร naringin ที่มีมากในส้มโอ สามารถลดคอเลสเตอรอลในเลือดและในตับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (27-28) เนื่องจากมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3methylglutaryl coenzyme A reductase และ Acyl-coenzyme A (CoA):cholesterol acyltransferase (ACAT) ที่จำเป็นในการสร้างคอเลสเตอรอลในตับ (28) นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัย พบว่า สาร naringin มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยเพิ่มการแสดงออกของ mRNA ของสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด ในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง (29, 30) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ากลุ่มที่ได้รับ น้ำส้มโอผง จะมีการลดลงของปริมาณอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดแดง

ในงานวิจัยนี้ ยังพบว่าหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จะมีการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh น้อยกว่าหนูปกติ สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น (31, 32) ซึ่งแสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ endothelium และเมื่อวัดปริมาณ nitrite และ nitrate ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสาร nitric oxide มีค่าลดลงในหนูที่มีคอเลสเตอรอลในเลือดสูงเช่นกัน แสดงให้เห็นว่าภาวะคอเลสเตอรอลในเลือดสูง จะเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดแดง ซึ่งอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ที่หลั่งจากเซลล์ endothelium กลายเป็นสารอนุมูลอิสระ peroxynitrite ทำให้ปริมาณสาร nitric oxide ลดลง จึงส่งผลให้การคลายตัวของหลอดเลือดลดลงตามด้วย (6-7) นอกจากนี้ เมื่อทดสอบฤทธิ์ของสาร SNP ต่อ การขยายตัวของหลอดเลือด โดยปกติสาร SNP ซึ่งเป็น NO donor จะออกฤทธิ์ที่กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดโดยตรง พบว่า การตอบสนองต่อสาร SNP ในหนูทั้ง 2 กลุ่ม ไม่แตกต่างกัน แสดงว่าไม่มีความผิดปกติของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดแดง aorta

เมื่อป้อน simvastatin 4 สัปดาห์ พบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือดจะเพิ่มขึ้น และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดแดง aorta ใกล้เคียงกับหนูปกติ มีรายงานวิจัยพบว่า simvastatin นอกจากฤทธิ์ลดไขมันในเลือดแล้ว ยังสามารถ upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ทำให้เพิ่มปริมาณ nitric oxide ที่ผนังหลอดเลือด รวมทั้งฤทธิ์ antioxidation ลดการเกิด superoxide และการเกิด oxidation ของ LDL (33) ซึ่งผลของการป้อน simvastatin จะคล้ายคลึงกับ ผลของการป้อนน้ำส้มโอผงเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งจะพบว่าการคลายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือดจะเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มปกติ และมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดแดง aorta ใกล้เคียงกับหนูปกติ มีรายงานวิจัยพบว่า อาหารที่อุดมด้วยสารกลุ่ม flavonoids นั้น สามารถ upregulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) และเพิ่มการทำงานของ NOS activity (34-36) จึงเป็นไปได้ว่า น้ำส้มโอผลอาจมีฤทธิ์ป้องกันความผิดปกติของเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ และเพิ่มการทำงานของสาร NO ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

สรุปผลการทดลอง

การป้อนน้ำส้มโอผลเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ให้หนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะลดการทำงานของ $\text{NADPH}_{\text{oxidase}}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดง และยังเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ขึ้นกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด รวมทั้งยังเพิ่มขึ้นของปริมาณ nitrite และ nitrate ในหลอดเลือดแดง aorta ของหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงในเลือด จึงเป็นไปได้ว่า น้ำส้มโอผลอาจมีฤทธิ์ป้องกันความผิดปกติของเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ และเพิ่มการทำงานของสาร NO ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับอาหารคอเลสเตอรอลสูง

เอกสารอ้างอิง

1. World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/index.html>
2. Steinberg D. Hypercholesterolemia and inflammation in atherogenesis: two sides of the same coin. *Mol Nutr Food Res*. 2005;49:995-8.
3. 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.
4. Francois M, Kojda G. Effect of hypercholesterolemia and of oxidative stress on the nitric oxide-cGMP pathway. *Neurochem Int*. 2004;45:955-61
5. Brandes RP, Weissmann N., Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med*. 2010;49:687-706.
6. Pacher P, Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:136-41.
7. 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;87:1620-24.
8. 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*. 200 ;76:100-9
9. Selemidis S, Sobey CG, Wingler K, Schmidt HH, Drummond GR. NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacol Ther*. 2008;120:254-91
10. Tsai HL, Chang SK, Chang SJ. Antioxidant content and free radical scavenging ability of fresh red pummelo [*Citrus grandis* (L.) Osbeck] juice and freeze-dried products. *J Agric Food Chem*. 2007;55:2867-72.
11. Hung-Der Jang, Ku-Shang Chang, Tsan-Chang Chang, Chuan-Liang Hsu, Antioxidant potentials of buntan pumelo (*Citrus grandis* Osbeck) and its ethanolic and acetified fermentation products. *Food Chemistry*. 2010;118 :554-8

12. Chotpadiwetkul R. antioxidant effect of thai fruits in protection against lipoprotein oxidation and their fibrinolytic activity. International conference "Thai Fruits-Functional Fruits" thaifex-world of food asia, bangkok, july 1-2 2010.
13. Kongkachuichai R, Charoensiri R, Sungpuag P. Carotenoid, flavonoid profiles and dietary fiber contents of fruits commonly consumed in Thailand. *Int J Food Sci Nutr.* 2010 ;61:536-48.
14. Woodman OL, Malakul W. 3',4'-Dihydroxyflavonol prevents diabetes-induced endothelial dysfunction in rat aorta. *Life Sci.* 2009;3:54-9.
15. Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Viticult.* 1965;16:144-58.
16. Klein BP, Perry AK. Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science.* 1982;47: 941-5.
17. Guimarães R, Barros L, Barreira JCM, Sousa J, Carvalho AM, Ferreira FR. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol.* 2010;48:99-106.
18. Sánchez M, Galisteo M, Vera R, Villar IC, Zarzuelo A, Tamargo J, Pérez-Vizcaino F, Duarte J. Quercetin downregulates NADPH oxidase, increases eNOS activity and prevents endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 2006;24:75-84.
19. Ihm SH, Lee JO, Kim SJ, Seung KB, Schini-Kerth VB, Chang K, Oak MH. Catechin prevents endothelial dysfunction in the prediabetic stage of OLETF rats by reducing vascular NADPH oxidase activity and expression. *Atherosclerosis.* 2009;206:47-53.
20. Ma X, Li YF, Gao Q, Ye ZG, Lu XJ, Wang HP, Jiang HD, Bruce IC, Xia Q. Inhibition of superoxide anion-mediated impairment of endothelium by treatment with luteolin and apigenin in rat mesenteric artery. *Life Sci.* 2008;83:110-7.
21. Woodman OL, Chan ECh. Vascular and anti-oxidant actions of flavonols and flavones. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2004;31:786-90.
22. Lassegue B, Clempus RE. Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Reg Integr Comp Physiol.* 2003;285:R277-R292.

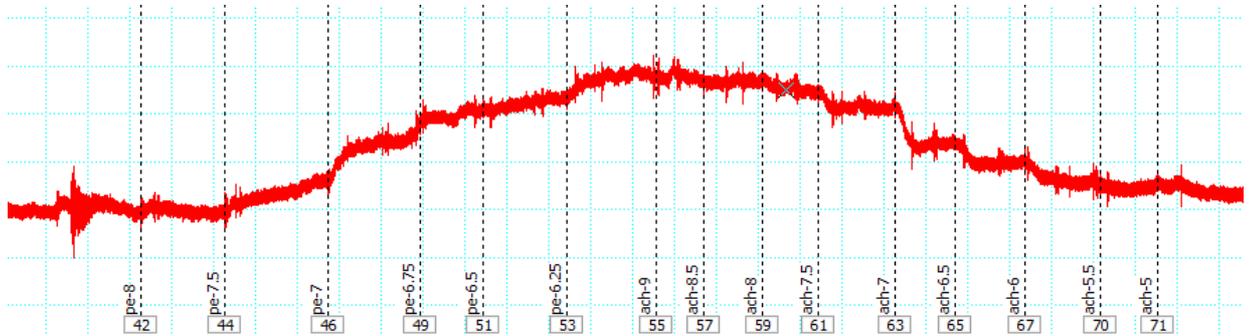
23. Malakul W, Thirawarapan SS, Suvitayavat W and Woodman OL. Type 1 diabetes and hypercholesterolaemia reveal the contribution of EDHF to endothelium-dependent relaxation of the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:192-200.
24. Ribeiro A, Mangeney M, Loriette C, Thomas G, Pepin D, Janvier 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.
25. Brandes RP, Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovasc Res.* 2005;65:16-27.
26. 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.
27. 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.
28. 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.
29. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Kim YH, Nam KT, Jeong TS, Park YB, Choi MS. Comparison of antioxidant effects of naringin and probucol in cholesterol-fed rabbits. *Clin Chim Acta.* 2002;317:181-90.
30. Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* 2001;69:2855-66.
31. 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.
32. 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.

33. 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.
34. 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.
35. Schmitt CA, Dirsch VM. Modulation of endothelial nitric oxide by plant-derived products. *Nitric Oxide*. 2009;21:77-91.
36. 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.

ภาคผนวก 1

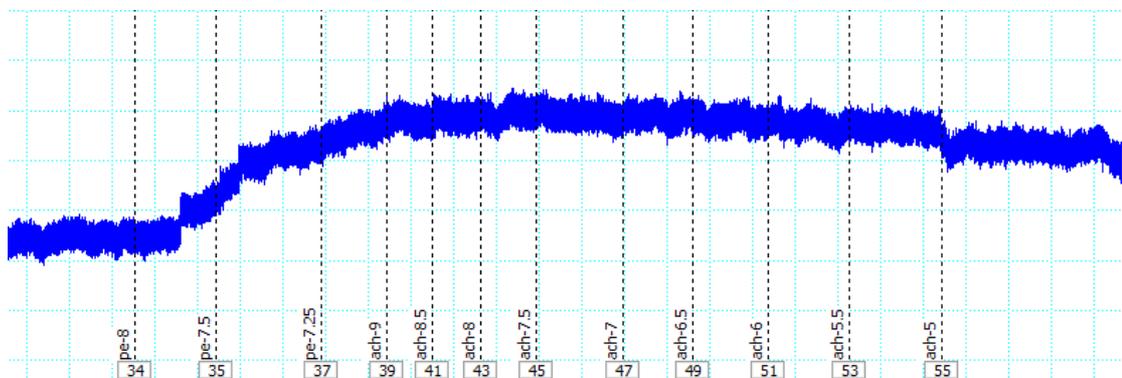
ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มต่างๆ

1.1 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูกลุ่มปกติ

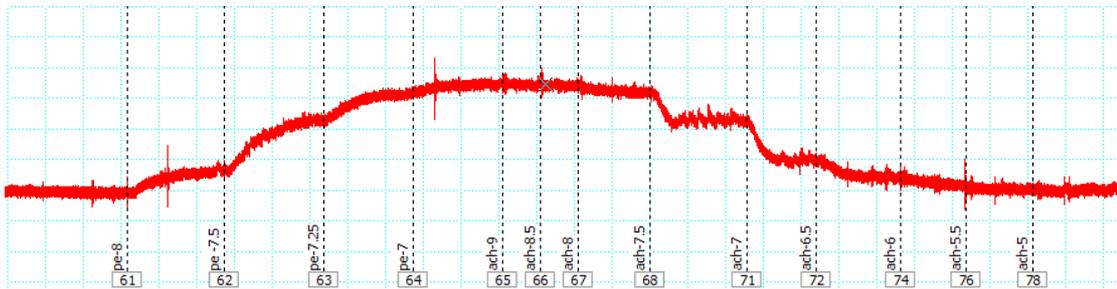


1.2 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในกลุ่มหนูที่มี

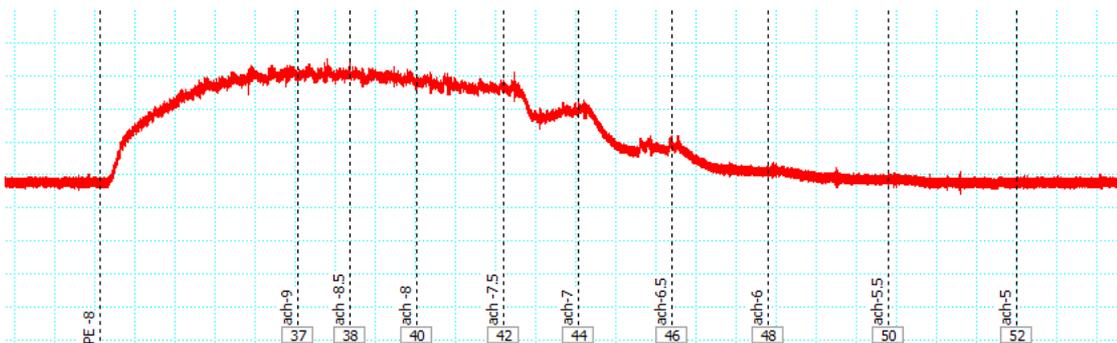
คอเลสเตอรอลสูง



1.3 ตัวอย่างภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร Ach ในกลุ่มหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงที่ได้รับส้มโอผง 1 มก./กก./วัน



1.4 ภาพ tracing แสดงการขยายตัวของหลอดเลือดต่อสาร Ach ในกลุ่มหนูที่มีคอเลสเตอรอลสูงที่ได้รับส้มโอผง 10 มก./กก./วัน



ภาคผนวก 2

เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
<p>1. เพื่อตรวจสอบผลของน้ำส้มโอผงแบบ acute administration ต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระ แบบ <i>in vitro</i></p>	<p>1.1 สกัดน้ำส้มโอผงและหาปริมาณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ วิตามินซี ปริมาณ Naringin</p>	<p>1.1.1 สกัดน้ำส้มโอผง โดยมีการใส่สาร diluents เพื่อเพิ่มความคงตัวของสารสกัด</p> <p>1.1.2 หาปริมาณปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด ปริมาณฟลาโวนอยด์ วิตามินซี ปริมาณ Naringin</p>	<p>1.1.1 ได้สารสกัดน้ำส้มโอผงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป</p> <p>1.1.2 ได้ข้อมูลของปริมาณสารต่างๆในน้ำส้มโอผง</p>
	<p>1.2 ทดสอบฤทธิ์โดยตรงของส้มโอผงต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ แบบ <i>in vitro</i></p>	<p>1.2 ทดสอบฤทธิ์โดยตรงของส้มโอผงต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ แบบ <i>in vitro</i></p>	<p>1.2 ทดสอบฤทธิ์โดยตรงของส้มโอผงต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดงของหนูปกติ แบบ <i>in vitro</i></p>
<p>2. เพื่อตรวจสอบผลของการได้รับน้ำส้มโอผงแบบ chronic administration ต่อการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระ</p>	<p>2.1 เตรียมสัตว์ทดลองโดยหนูแรทเป็นกลุ่ม control (C) และ กลุ่ม Hypercholesterolemia (H)</p> <p>2.2 หนูจากกลุ่ม H (ข้อ 2.1) จะถูกแบ่งย่อยเป็น 3 กลุ่ม เพื่อทดสอบฤทธิ์ของน้ำส้มโอผงที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ</p> <p>-H (ไม่ป้อนสารสกัดใดๆ)</p> <p>-H+ P1 (ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มก/กก/วัน)</p> <p>-H+ P10 (ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มก/กก/วัน)</p>	<p>2.1 เตรียมสัตว์ทดลองโดยให้อาหาร high cholesterol diet ในกลุ่ม Hypercholesterolemia (H) และให้อาหารปกติในกลุ่ม control (C) เป็นเวลา 4 สัปดาห์</p> <p>2.2 หลังจากนั้นแบ่งหนูกลุ่ม H เป็น 5 กลุ่มๆ ละ 6-8 ตัว ดังนี้</p> <p>-H (ไม่ป้อนสารสกัดใดๆ)</p> <p>-H+V(ป้อนสาร diluents)</p> <p>-H+ P1 (ป้อนน้ำส้มโอผง 1 มก/กก/วัน)</p> <p>-H+ P10 (ป้อนน้ำส้มโอผง 10 มก/กก/วัน)</p>	<p>2.1 ได้สัตว์ทดลองที่มีคอเลสเตอรอลสูงในกลุ่ม H</p>

		<p>-H+S (ป้อน statin 120 มก/กก/วัน)</p> <p>ซึ่งหนูแรทจากแต่ละกลุ่ม จะถูกป้อนสารต่างๆ ดังกล่าว เวลานาน 4 สัปดาห์</p> <p>และในระหว่างนี้ยังคงให้อาหารคอเลสเตอรอลสูงร่วมด้วยตลอดการทดลอง</p>	
		<p>2.3 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทำการผ่าตัดแยกหลอดเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ มาทดสอบการสร้าง superoxide anion ในหลอดเลือดโดยตรงโดยวิธี chemiluminescence</p>	<p>2.2 ได้ข้อมูลฤทธิ์การลดการทำงานของ NADPH oxidase ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดแดงของหนูกลุ่มต่างๆ</p>
<p>3. การตรวจวิเคราะห์หาระดับไขมันในเลือดและ atherogenic index</p>	<p>3.1 วิเคราะห์ระดับไขมันในเลือดและ atherogenic index</p>	<p>3.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง เจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า atherogenic index</p>	<p>3.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์การลดปริมาณของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และ atherogenic index ของหนูกลุ่มต่างๆ</p>
<p>4. การตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของสาร nitric oxide ในหลอดเลือด</p>	<p>4.1 วิเคราะห์ปริมาณของสาร nitric oxide ในหลอดเลือด</p>	<p>4.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสลับหนูเพื่อผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta จากนั้นนำมาปั่น (homogenize) และนำ supernatant ที่ได้มาวิเคราะห์หาปริมาณของสาร nitric oxide โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit</p>	<p>4.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มสาร nitric oxide ในหลอดเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ</p>

<p>5. ศึกษาฤทธิ์ของน้ำส้ม,โอ ผงต่อการทำงานของ หลอดเลือด</p>	<p>5.1 ศึกษาฤทธิ์ของน้ำส้ม โอผงต่อการทำงานของ หลอดเลือด</p>	<p>5.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลอง จะทำการสลับหนูเพื่อ ผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta มาทดสอบการ ตอบสนองของหลอดเลือด ต่อสาร Ach และ SNP</p>	<p>ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มการ ตอบสนองของหลอดเลือด ต่อสาร Ach โดยไม่มีผล เปลี่ยนแปลงการ ตอบสนองของหลอดเลือด ต่อสาร SNP ในหลอด เลือดของหนูกลุ่มต่างๆ</p>
---	---	---	---