อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2561B030

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ผลของนารินจินต่อการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ subunits และอนุมูลอิสระในหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 05 ส.ค. 2564
เลขทะเบียน 1034811
เลขเรียกหนังสือ จ QA 665 .D5 ว1535 2561

ผู้วิจัย
ผศ.ดร. วชิราวดี มาลากุล

สังกัด
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยงบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2561

Abstract

High fructose consumption is associated with oxidative stress and vascular damage and leads to the development of atherosclerosis. Naringin exhibits cardiovascular protective and antioxidant properties. Therefore, the aim of this study was to assess the effect of naringin administration on vascular oxidative stress and vascular structural changes in high fructose-fed rats and to elucidate its underlying mechanism. Male Sprague-Dawley rats were given 10% fructose in drinking water for 12 weeks, whereas control rats were fed drinking water alone. Naringin (100 mg/kg) was orally administered to fructose fed rats during the last 4 weeks of the study. Following 12 weeks, blood samples were collected for measurement of serum lipid profile and inflammatory cytokines (tumour necrosis factor α (TNFα) and interleukin-6 (IL-6)). Protein expression of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase subunits and oxidative damage markers was also evaluated in aortae. Hematoxylin and eosin (H&E) staining was applied for aortic histopathological analysis. Fructose feeding induced increased levels of total cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein, TNFα, and IL-6 in serum. Fructose-fed rats also exhibited increased aortic medial wall thickness, NADPH oxidase subunits (p47phox, Nox2, and Nox4), and oxidative damage markers (3-nitrotyrosine (3-NT) and 4-hydroxynonenal (4-HNE)) expression in aortic tissues. These results demonstrate that naringin treatment improves vascular damage in fructose-fed, at least partially by decreasing oxidative stress via downregulation of NADPH oxidase.

Keywords : naringin, oxidative stress, inflammation, vascular damage, fructose

บทคัดย่อ

การบริโภคฟรุคโตสจะเกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชั่นและความเสียหายของหลอดเลือดและนำไปสู่การเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง สารนารินจินจะมีฤทธิ์ป้องกันระบบหัวใจและหลอดเลือดและมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารนารินจินต่อภาวะเครียดออกซิเดชั่นของหลอดเลือดและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดแในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส และหากลไกที่เกี่ยวข้อง หนูทดลองเพศผู้ จะได้รับน้ำตาลฟรุคโตส 10% ผสมในน้ำดื่มเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ขณะที่หนูกลุ่มควบคุมจะได้รับน้ำดื่มปกติ สารนารินจิน (100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) จะถูกป้อนให้หนูที่ได้รับฟรุคโตสในช่วง 4 สัปดาห์ท้ายของการทดลอง หลังจาก 12 สัปดาห์ เลือดจะถูกเก็บเพื่อวัดค่าไขมันในซีรั่ม และค่า inflammatory cytokines (tumour necrosis factor α (TNFα) และ interleukin-6 (IL-6)) การแสดงออกของหน่วยย่อยของโปรตีนnicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase และค่าบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชั่น ถูกวิเคราะห์ในหลอดเลือดแดง การย้อมสี Hematoxylin และ eosin (H&E) staining จะถูกนำมาใช้วิเคราะห์โครงสร้างของหลอดเลือด การให้ฟรุคโตสจะชักนำการเพิ่มขึ้นของระดับคอเลสเตอรอล, ไตรกลีเซอไรด์, low density lipoprotein, TNFα, และ IL-6 ในซีรั่ม หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะพบการเพิ่มขึ้นของความหนาของผนังหลอดเลือด การแสดงออกของหน่วยย่อยของ NADPH oxidase (p47phox, Nox2, และ Nox4), และค่าบ่งชี้ภาวะเครียดออกซิเดชั่น (3-nitrotyrosine (3-NT) และ 4-hydroxynonenal (4-HNE)) ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การให้สารนารินจิน ฟื้นฟูความเสียหายของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส โดยส่วนหนึ่งเป็นผลจากการลดภาวะเครียดออกซิเดชั่น โดยลดการแสดงออกของ NADPH oxidase.

คำสำคัญ : สารนารินจิน, ความเครียดออกซิเดชั่น, ภาวะอักเสบ, ภาวะเสียหายของหลอดเลือด, ฟรุคโตส

สารบัญ

	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
สารบัญ	3
สารบัญตาราง	4
สารบัญภาพ	5-6
สรุปโครงการ (Executive Summary)	7-10
บทนำ	11-14
วัตถุประสงค์โครงการ	14
วิธีการดำเนินการวิจัย	15-21
ผลการทดลอง	
1 ผลต่อน้ำหนักตัวและค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือด	22
2 ผลต่อระดับ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) ในซีรั่ม	23-24
3 ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน $NADPH_{oxidase}$ subunits (p47phox และ NOX4) และ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (4-HNE และ 3-NT) ในหลอดเลือด	25-29
4. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและความหนาของหลอดเลือด	30-34
วิจารณ์ผลการทดลอง	35-38
เอกสารอ้างอิง	39-44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขั้นตอนทำ paraffin section	20
2	ขั้นตอนการย้อมสี H&E	21
3	ผลต่อน้ำหนักตัวและค่าชีวเคมีต่างๆในเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ	22

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	หน่วยย่อยของ $NADPH_{oxidase}$ ในผนังหลอดเลือด	14
2	โครงสร้างของสารนารินจิน (4',5,7-trihydroxy flavanone 7-rhamnoglucoside)	14
3	การแบ่งกลุ่มหนูในการทดลอง	15
4	ระยะเวลาในการป้อนสารนารินจินในหนูกลุ่มต่างๆ	16
5	การแสดงระดับ Tumour necrosis factor (TNF)-α ในซีรั่มของหนูกลุ่มต่างๆ	24
6	การแสดงระดับ Interleukin-6 (IL-6) ในซีรั่มของหนูกลุ่มต่างๆ	24
7	แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress (4-HNE) และโปรตีน actin และ $NADPH_{oxidase}$ subunits (p47phox, NOX2 และ NOX4) ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ	26
8	แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีน 4-HNE ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มต่างๆ	27
9	แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มต่างๆ	27
10	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน $NADPH_{oxidase}$ subunits (p47phox, NOX2 และ NOX4) และ 4-HNE ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มต่างๆ	28
11	ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มต่างๆ	29
12	H&E staining (20X) ของชิ้นเนื้อหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มต่างๆ	31
13	แสดงอัตราส่วนของความหนาของหลอดเลือดชั้น media ต่อขนาด lumen ของหลอดเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ	32

14	การแสดงออกของ ∝-smooth muscle actin โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) (10x) ในหลอดเลือดเอออร์ตาของของหนูกลุ่มต่างๆ	33
15	ร้อยละพื้นที่การแสดงออกของ ∝-smooth muscle actin โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) ต่อพื้นที่ที่วัดทั้งหมด ของหลอดเลือดเอออร์ตาของของหนูกลุ่มต่างๆ	34

สรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ ผลของนารินจินต่อการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ subunits และอนุมูลอิสระในหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.วชิราวดี มาลากุล

หน่วยงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-964655 **โทรสาร** 055-964770 อีเมล์ wachirawadeem@hotmail.com

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบัน อุตสาหกรรมทางอาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เป็นที่นิยมของผู้บริโภคมาก ซึ่งอุตสาหกรรมเหล่านี้นิยมนำน้ำตาลฟรุคโตสมาเป็นส่วนประกอบของอาหารหรือเครื่องดื่ม เนื่องจากมีราคาที่ถูกและมีความหวานมากกว่าน้ำตาลกลูโคส ทำให้ประหยัดต้นทุนการผลิต มีรายงานวิจัยพบว่าการบริโภคอาหารหรือเครื่องดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตสในเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความผิดปกติทางเมทาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน ซึ่งจะก่อให้เกิดกลุ่มอาการของความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม (metabolic syndrome) ซึ่งกลุ่มอาการที่พบในโรคนี้ ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดสูง ความดันเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูนลิน ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือ ภาวะอ้วน ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยจะก่อให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือด มีการหลั่งสาร proinflammatory cytokines เพิ่มขึ้นและทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งจะทำให้เซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell) ที่บุผนังหลอดเลือดทำหน้าที่ผิดปกติ และ ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ในที่สุด (8-11) มีรายงานวิจัยพบว่าการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ ถือว่าเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งในภาวะที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงเป็นเวลานาน โดยการบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสสูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ(เช่น superoxide anion) ในหลอดเลือด โดยแหล่งของการสร้างสารอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอด

เลือดที่สำคัญคือ เอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของ เอมไซม์ $NADPH_{oxidases}$ จะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion และ/หรือ hydrogen peroxide ซึ่งสารอนุมูลอิสระนี้ นอกจากจะเป็นตัวก่อให้เกิดความเสียหายของหลอดเลือดแล้วยังสามารถทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide (NO) ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ peroxynitrite ยิ่งส่งผลทำลายเซลล์หลอดเลือด และลดการทำงานของสาร NO ส่งผลให้การทำงานของหลอดเลือดผิดปกติ ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis)ในที่สุด (18, 21) ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น ปัจจุบัน ยาที่ใช้รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด หรือแม้แต่รักษาความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม เช่นภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือภาวะไขมันในเลือดสูง มีราคาแพงและมักมีอาการข้างเคียง ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญในการศึกษาพืชผักผลไม้หรือสารสำคัญจากพืชผักผลไม้ในการยับยั้งความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยเฉพาะน้ำตาลและไขมัน ซึ่งอาจช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด

สารนารินจิน (naringin) สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) มีการศึกษาพบว่า สารนารินจิน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ป้องกันหัวใจและหลอดเลือด โดยลดระดับน้ำตาลและคลอเลสเตอรอลในเลือด เพิ่มการฟื้นฟูการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินและยังสามารถฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือด ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูล ยังไม่พบรายงานวิจัยที่ศึกษาผลของการบริโภคสารนารินจินต่อความผิดปกติของหลอดเลือดและการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง โดยศึกษาผลของสารนารินจินที่มีต่อการแสดงออกของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด การอักเสบของหลอดเลือด และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด ในหนูทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

วัตถุประสงค์

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการได้รับสารนารินจิน เป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ศึกษาฤทธิ์ต่อค่าบ่งชี้ภาวะการอักเสบ
2. ศึกษาฤทธิ์ต่อการแสดงออกของหน่วยย่อยของ $NADPH_{oxidase}$ในหลอดเลือด
3. ศึกษาฤทธิ์ต่อปริมาณอนุมูลอิสระในหลอดเลือด
4. ศึกษาฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด

วิธีการทดลอง

1.สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา:

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม จะถูกแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6-7 ตัว ดังนี้

ลำดับ	กลุ่มการทดสอบ
1	กลุ่มควบคุม (Control) จะได้รับน้ำดื่มปกติ เป็นเวลา 12 สัปดาห์
2	กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์
3	กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ ร่วมกับการป้อนสารนารินจิน 4 สัปดาห์ (เริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 9-12 ของการได้รับน้ำตาลฟรุคโตส (FN)

หลังจาก 12 สัปดาห์ จะวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆดังนี้

-ระดับของไขมันในเลือด

-ปริมาณ total cholesterol (TC) และ triglyceride (TG) ในเนื้อเยื่อตับ

-การเปลี่ยงแปลงโครงสร้างและการสะสมของไขมันในตับ โดยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin และย้อมด้วยเทคนิค Oil red O

-การเปลี่ยงแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดโดยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin และวัดการแสดงออกของ ∝-action

-การแสดงออกของตัวบ่งชี้การเกิดการอักเสบ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) ในซีรั่ม

-การแสดงออกของตัวชี้วัดการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดเลือด ได้แก่ 4-HNE, 3-NT, และNADPH $_{oxidase}$ subunits (p47phox และ NOX4) โดยเทคนิค western blot

ผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่า การให้น้ำดื่มผสมน้ำฟรุคโตสส่งผลเพิ่มการแสดงออกของหน่วยย่อย $NADPH_{oxidase}$ (p47phox, NOX2 และ NOX4) และโปรตีนที่แสดงออกถึงภาวะความเครียดออกซิเดชั่น (4-HNE และ 3-NT) และค่าบ่งชี้ภาวะอักเสบ (TNF-∝ และ IL-6) ในซีรั่ม รวมทั้งยังส่งผลเพิ่มความหนาของผนังหลอดเลือดในหนู ซึ่งค่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะลดลงเมื่อได้รับการป้อนสารนารินจิน

สรุปผลการทดลอง

การป้อนสารนารินจิน สามารถฟื้นฟูความผิดปกติของผนังหลอดเลือด โดยลดการแสดงออกของหน่วยย่อย $NADPH_{oxidase}$ และโปรตีนที่แสดงออกถึงภาวะความเครียดออกซิเดชั่น และลดค่าบ่งชี้ภาวะอักเสบ ในหนูที่รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

บทนำ

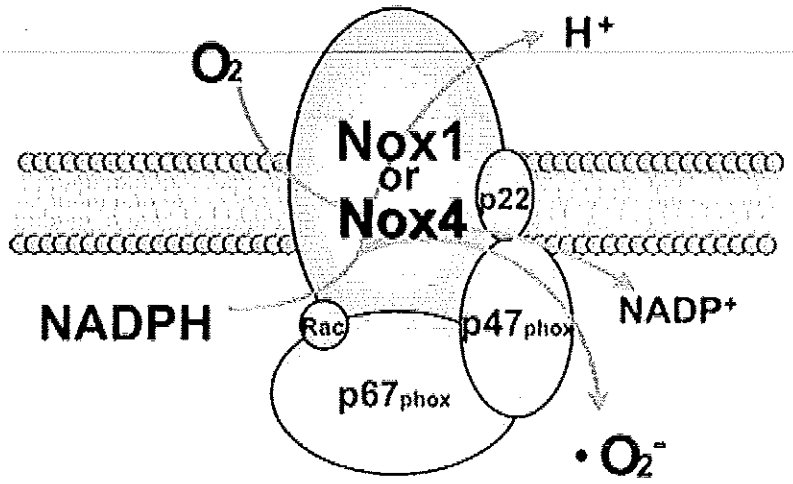
โรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) เป็นโรคที่อยู่ในกลุ่มโรคไม่ติดต่อ (noncommunicable diseases; NCDs) โดยมีสาเหตุส่วนใหญ่ มาจากการตีบแข็งของหลอดเลือด (atherosclerosis) จากรายงานของ The World Health Organization (WHO) พบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มี อัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ เฉลี่ยประมาณ 17.3 ล้านคนต่อปี หรือ 30% ของอัตราการตายของประชากรโลก โดยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) ประมาณ 7.3 ล้านคนจากการคาดการณ์ของ WHO อัตราป่วยด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือดจะมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี และอาจเพิ่มถึง 23.6 ล้านคน ภายในปี 2030(1) และจากข้อมูลของกระทรวงสาธารณสุขในปี 2557-2558 พบว่า อัตราการตายของประชาการไทยด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจ ประมาณ 27.8% ของประชากรไทย สาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ส่วนใหญ่เกิดจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) หรือภาวะไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) หรือภาวะอ้วน (2-4) ซึ่งอาการเหล่านี้ จัดอยู่ในกลุ่มอาการของความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม หรือ metabolic syndrome (5-7) โดยทุกวันนี้ วงการแพทย์ยอมรับอย่างไม่มีข้อโต้แย้งแล้วว่า กลุ่มอาการของความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมนี้ มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับอาหารและเครื่องดื่มที่ทุกคนรับประทาน (7)

ปัจจุบัน อุตสาหกรรมทางอาหารและเครื่องดื่มต่าง ๆ เป็นที่นิยมของผู้บริโภคมาก ซึ่งอุตสาหกรรมเหล่านี้นิยมนำน้ำตาลฟรุคโตสมาเป็นส่วนประกอบของอาหารหรือเครื่องดื่ม เนื่องจากมีราคาที่ถูกและมีความหวานมากกว่าน้ำตาลกลูโคส ทำให้ประหยัดต้นทุนการผลิต มีรายงานวิจัย พบว่าการบริโภคอาหารหรือเครื่องดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตสในเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความผิดปกติทางเมทาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน ซึ่งจะก่อให้เกิดกลุ่มอาการของความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม (metabolic syndrome) ซึ่งกลุ่มอาการที่พบในโรคนี้ ได้แก่ ภาวะไขมันในเลือดสูง ความดันเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูนลิน ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือ ภาวะอ้วน ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยเสี่ยงต่อโรคหัวใจและหลอดเลือด โดยจะก่อให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือด มีการหลั่งสาร proinflammatory cytokines เพิ่มขึ้นและทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ซึ่งจะทำให้เซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell)ที่บุผนังหลอดเลือดทำ

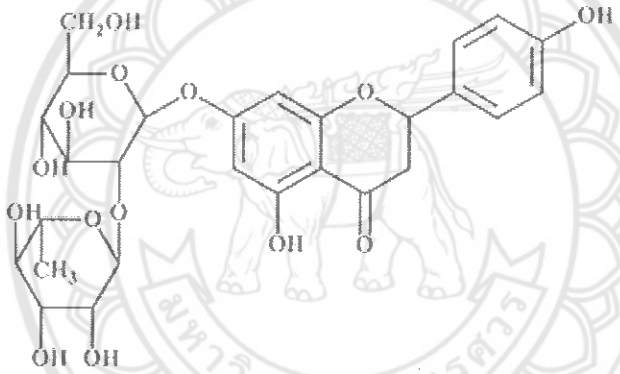
หน้าที่ผิดปกติ และ ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ในที่สุด (8-11) มีรายงานวิจัยที่ศึกษาการทำงานของหลอดเลือดในหนูทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง พบว่าหลอดเลือดของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง จะมีการขยายตัวของหลอดเลือดลดลงซึ่งเกิดจากความผิดปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด รวมทั้งยังมีตัวบ่งชี้ภาวะอักเสบ (inflammatory markers) เพิ่มขึ้น (11-13)

การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ ถือว่าเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งในภาวะที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงเป็นเวลานาน (14-15)โดยการบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสสูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ(เช่น superoxide anion) ในหลอดเลือด (11, 13, 16)โดยแหล่งของการสร้างสารอนุมูลอิสระ superoxide anion ในหลอดเลือดที่สำคัญคือ เอนไซม์ nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ แบ่งเป็น 7 หน่วยย่อย คือ NOX1-5 และ DUOX1-2 และหน่วยควบคุม (regulatory subunits) ที่พบบริเวณ cytoplasm ของเซลล์ (ได้แก่ p47 phox) (ภาพที่ 1) ซึ่งการกระตุ้นการทำงานของ เอมไซม์ $NADPH_{oxidases}$ จะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion และ/หรือ hydrogen peroxide (17) มีรายงานวิจัย พบ การแสดงออกของโปรตีนของ p47phox, p22phox และ NOX4 subunit รวมทั้งปริมาณอนุมูลอิสระ superoxide anion เพิ่มขึ้นในหลอดเลือด aorta ในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (13, 20) สารอนุมูลอิสระ superoxide anion ที่เกิดจากการทำงานของเอมไซม์ NOX นอกจากจะเป็นตัวก่อให้เกิดความเสียหายของหลอดเลือดแล้ว ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide (NO) ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระ peroxynitrite ยิ่งส่งผลทำลายเซลล์หลอดเลือด และลดการทำงานของสาร NO ส่งผลให้การทำงานของหลอดเลือดผิดปกติ ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis)ในที่สุด (18, 21) ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น มีรายงานวิจัย พบว่า น้ำตาลฟรุคโตส สามารถทำลายเยื่อบุผนังหลอดเลือดโดยผ่านทางกระตุ้นการทำงานของ NOX โดยตรง (22)

ปัจจุบัน ยาที่ใช้รักษาโรคหัวใจและหลอดเลือดหรือแม้แต่รักษาความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม เช่น ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงหรือภาวะไขมันในเลือดสูง มีราคาแพงและมักมีอาการข้างเคียง ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญในการศึกษาพืชผักผลไม้หรือสารสำคัญจากพืชผักผลไม้ในการยับยั้งความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมในร่างกาย โดยเฉพาะน้ำตาลและไขมัน ซึ่งอาจช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้นการพัฒนาพืชผักผลไม้ เพื่อใช้เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในผู้ป่วยกลุ่มนี้อาจช่วยทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้นและลดค่าใช้จ่ายสำหรับยากลุ่มนี้ที่มีราคาแพง ในปัจจุบันผลไม้หลายชนิดถูกใช้เป็นทั้งยาและอาหาร รวมทั้งผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) เช่น ส้มโอซึ่งเป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีการปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในด้านการส่งออกไม่แพ้ผลไม้ชนิดอื่น ๆ สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว คือ สารนารินจิน (naringin) (ภาพที่ 2) สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) (23) มีการศึกษาพบว่า สารนารินจิน มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ป้องกันหัวใจและหลอดเลือด โดยลดระดับน้ำตาลและคลอเลสเตอรอลในเลือด และเพิ่มการฟื้นฟูการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน (24-27)รวมทั้งยังมีงานวิจัยพบว่า สารนารินจิน สามารถฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือด และหัวใจห้องล่าง และลดความดันเลือดสู่ค่าปกติ ในหนูที่ได้รับไขมันและคาร์โบไฮเดรตสูง (28) และ สารนารินจินยังลดการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและคอเลสเตอรอลสูง (29) ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูล ยังไม่พบรายงานวิจัยที่ศึกษาผลของการบริโภคสารนารินจินต่อความผิดปกติของหลอดเลือดและการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือดในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาในสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง โดยศึกษาผลของสารนารินจินที่มีต่อการแสดงออกของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ในการสร้างอนุมูลอิสระในหลอดเลือด การอักเสบของหลอดเลือด และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด ในหนูทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง



ภาพที่ 1 แสดงหน่วยย่อยของ $NADPH_{oxidase}$ ในผนังหลอดเลือด (17)



ภาพที่ 2 แสดงโครงสร้างของสารนารินจิน (4',5,7-trihydroxy flavanone 7-rhamnoglucoside)

วัตถุประสงค์โครงการ

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการได้รับสารนารินจิน เป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ศึกษาฤทธิ์ต่อค่าบ่งชี้ภาวะการอักเสบ
2. ศึกษาฤทธิ์ต่อการแสดงออกของหน่วยย่อยของ $NADPH_{oxidase}$ในหลอดเลือด
3. ศึกษาฤทธิ์ต่อปริมาณอนุมูลอิสระในหลอดเลือด
4. ศึกษาฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือด

วิธีการดำเนินการวิจัย

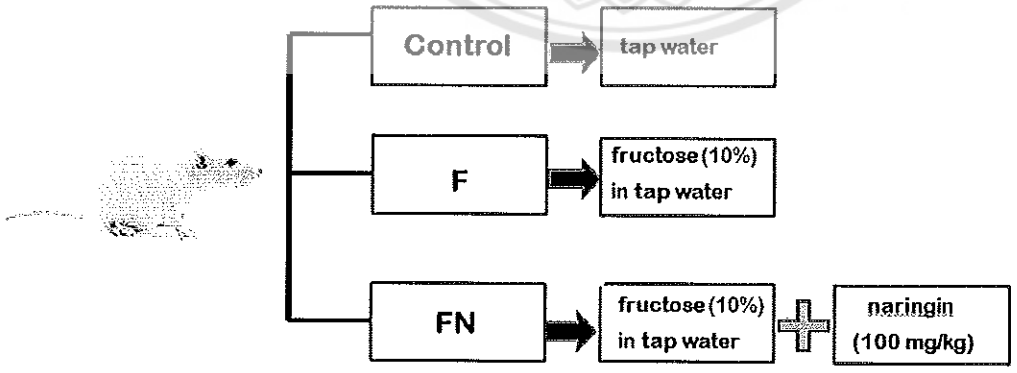
1) สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองสำหรับงานวิจัยนี้ คือ หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) ratsน้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 1 เดือนโดยจะสั่งซื้อจากบริษัท โนมูระ สยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด 208-214 ซอยสมเด็จพระเจ้าตากสิน 29 ถนนสมเด็จพระเจ้าตากสิน แขวง บุคคโล เขต ธนบุรี กรุงเทพมหานคร หนูทดลองจะถูกเลี้ยงในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ ที่ 25± 2 องศาเซลเซียส และจะได้รับอาหารเม็ดและน้ำอย่างสมบูรณ์ โดยหนูทดลองจะถูกพักที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองของ ม. นเรศวร เป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ หลังจากนั้นหนูทดลองจะถูกแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6-7 ตัว (ภาพที่ 3-4) ดังนี้

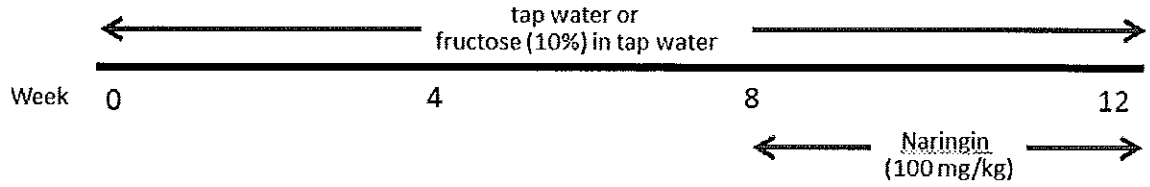
กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control) จะได้รับน้ำดื่มปกติ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงร่วมกับการป้อนสารนารินจิน (FN) โดยหนูกลุ่มนี้จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ร่วมกับการป้อนสารนารินจิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (เริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 9 -12 ของการได้รับน้ำดื่มผสมฟรุคโตส)



ภาพที่ 3 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูในการทดลอง



ภาพที่ 4 แสดงระยะเวลาในการป้อนสารนารินจินในหนูกลุ่มต่างๆ

2) การแยกหลอดเลือดแดง aorta

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทั้งหนูทุกกลุ่ม จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่เจาะเลือดจากหัวใจ เพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดและค่าบ่งชี้ภาวะการอักเสบ (inflammatory markers) หลังจากนั้นจะผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา เพื่อวิเคราะห์การแสดงออกของการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$(NOX) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชั่น รวมทั้งยังแบ่งส่วนของหลอดเลือดนำไปแช่ 10% buffered formalin solution เพื่อตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดและทำ Immunohistochemistry

3) ฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลกลูโคส ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) ในซีรั่มจะถูกวิเคราะห์ โดยใช้ commercial test kit จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration

4) การสกัดโปรตีนจากหลอดเลือด

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อหลอดเลือดแต่ละกลุ่มบดให้ละเอียด (Homogenates) ในสารละลาย Homogenization Buffer เมื่อทำการบดเนื้อเยื่อจนละเอียดแล้ว นำตัวอย่างไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บส่วนใส (Supernatant) เพื่อการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีนที่บ่งชี้ถึงภาวะเครียดออกซิเดชั่น โดยเทคนิค Western blot จากนั้น นำ Supernatant ที่ได้จากการสกัดชิ้นเนื้อจากอวัยวะต่างๆ ตรวจวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bicinchoninic acid (BCA) assay โดยใช้ Bovine serum albumin เป็น Standard protein

5) การตรวจวิเคราะห์ระดับ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) ด้วยวิธี ELISA

การตรวจวัดระดับ Inflammatory Cytokines ได้แก่ TNF-∝ และ IL-6 ทำโดยเทคนิค Enzyme Linked Immunosorbance Assay (ELISA) โดยเติม assay Diluent RD1Q ปริมาตร 100 µl ลงในแต่ละหลุมของ 94 well plate ที่เคลือบด้วย rat monoclonal antibody ต่อ inflammatory cytokines (TNF-∝ และ IL-6) จากนั้นเติม Standard Control หรือ Sample ซึ่งได้แก่ ซีรั่ม จากนั้น Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงเพื่อให้ rat monoclonal antibody จับกับ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วย Wash Buffer ปริมาตร 400 µl ต่อหลุม หลังจากนั้นเติม Conjugate 2nd Antibody ปริมาตร 200 µl ลงในแต่ละหลุม Incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เพื่อให้ Polyclonal Antibody ที่ติดฉลากด้วย Horseradish Peroxidase จับกับ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) เมื่อครบเวลาทำการล้างด้วย Wash Buffer ปริมาตร 400 µl ต่อหลุม หลังจากนั้นเติม Substrate Solution ปริมาตร 200 µl ลงในแต่ละหลุม incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที ในที่มืดเพื่อป้องกันการรบกวนการเกิดปฏิกิริยาจากแสง เมื่อครบเวลาทำการเติม Stop Solution ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุม เพื่อหยุดปฏิกิริยา นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 450 nm ด้วยเครื่อง Microtiter Plate Reader

6) ศึกษาผลต่อการแสดงออกของหน่วยย่อยของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$

การแสดงออกของหน่วยย่อยของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ได้แก่ NOX2, NOX4 และ p47phoxในหลอดเลือด จะถูกวิเคราะห์โดยวิธี Western blot โดยนำ supernatant มาแยกขนาดโปรตีนด้วย polyacrylamide electrophoretic gel (SDS-PAGE) หลังจากนั้น transfer ไปยัง polyvinylidine difluoride (PVDF) membrane แล้ว block ด้วย 5% bovine serum albumin (BSA) จากนั้นบ่มด้วย NOX2 (polyclonal anti NOX2 rabbit IgG 1:1000) หรือ NOX4 (polyclonal anti NOX4 rabbit IgG 1:1000) หรือ p47-phox (polyclonal anti-p47-phox rabbit IgG 1:1000) ที่ 4 °C overnight และบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti rabbit IgG conjugate) เป็นเวลา 60 นาที นำ membrane มาล้าง และตรวจสอบการแสดงออกของเอนไซม์ NOX2, NOX4 และ p47 phox ในหลอดเลือด โดยใช้ enhanced chemiluminescence (ECL)

7) ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดเลือด

ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดเลือด จะทำการศึกษาโดยเทคนิค Western blot เพื่อประเมินการแสดงออกของ 4-hydroxynonenal (4-HNE) เป็น marker ของ lipid peroxidationและ nitrotyrosine ซึ่งเป็น marker ของการเกิด peroxynitrite ในหลอดเลือดจะถูกมาวิเคราะห์โดยวิธี Western blot โดยนำ supernatant มาแยกขนาดโปรตีนด้วย polyacrylamide electrophoretic gel (SDS-PAGE) หลังจากนั้น transfer ไปยัง polyvinylidinedifluoride (PVDF) membrane แล้ว block ด้วย 5% bovine serum albumin (BSA) จากนั้นบ่มด้วย polyclonal anti NOX4 rabbit IgG หรือ polyclonal anti-nitrotyrosine rabbit IgG ที่ 4 °C overnight และบ่มด้วย horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti rabbit IgG conjugate) เป็นเวลา 60 นาที นำ membrane มาล้าง และ

ตรวจสอบการแสดงออกของ4-HNE และ nitrotyrosine ในหลอดเลือด โดยใช้ enhanced chemiluminescence (ECL)

8) การตรวจทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือด

-การศึกษาด้วยเทคนิคการย้อมสี Hematoxylin และสี Eosin

หลังจากแยกหลอดเลือด aorta ออกมา ให้นำไปล้างด้วย normal saline ซับให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปแช่ 4% Paraformaldehyde : 0.1 M phosphate buffer solution เป็นเวลา overnight เมื่อครบระยะเวลานำชิ้นเนื้อไป dehydrate ด้วย alcohol และล้าง alcohol ออกโดยใช้สาร xylene นำชิ้นเนื้อเยื่อไปทำบล็อกชิ้นเนื้อใน Paraffin หลังจากนั้น นำชิ้นเนื้อเยื่อที่ Embedded ลงใน Paraffin มาตัดออกเป็นเนื้อเยื่อแผ่นบางๆ (Paraffin section) ขนาด 3 ไมครอน ก่อนนำไปย้อมสี hematoxylin และ eosin เพื่อวิเคราะห์เพื่อดูโครงสร้างของตับ โดยสี Hematoxylin จะใช้เพื่อย้อมนิวเคลียส (สีน้ำเงิน) ขณะที่สี Eosin จะใช้เพื่อย้อมติดไซโตรพาสซึม (สีชมพูม่วง) แล้วจึงนำไปส่องภายใต้กล่องจุลทรรศน์เพื่อประเมินโครงสร้างของหลอดเลือดต่อไป และนำไปวัดความหนาของเนื้อเยื่อชั้น media โดยเทียบกับขนาด lumen ของหลอดเลือด

-การศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฮีสโตเค็มมิสตรี (Immunohistochemistry,IHC)

วัดการแสดงออกของโปรตีน ∝-actin ซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด โดยตัดเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ฝังในพาราฟินให้มีความหนา 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-∝- smooth muscle actin antibody (1:50) นำไปอบใน humidified chamber ที่

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย PBS 2 ครั้งๆละ 5 นาที จากนั้น เติม biotinylated secondary antibody และ streptavidin-HRP solution แล้ว นำไป developed ใน 0.03 % diaminobenzidine tetrahrochloride (DAB)/0.1% H_2O_2 solution (Vector Laboratories,Inc.) และ couterstaining ด้วย Mayer hematoxilin ตามด้วยกระบวนการ dehydration, mount เสร็จแล้วนำไปดูด้วย กล้องจุลทรรศน์ การแปลค่าที่เกิดขึ้น ถ้าติดสีน้ำตาลหมายถึงบริเวณที่ มีการแสดงออกของ ∝-actin ถ้าไม่มีสีแสดงว่า ไม่มีการแสดงออกของ ∝-actin ส่วนนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำเงิน

ตารางที่ 1 ขั้นตอนทำ paraffin section

Chamber	Solution	Time (min)
1	70% Ethanol	45
2	70% Ethanol	30
3	80% Ethanol	30
4	90% Ethanol	30
5	95% Ethanol	30
6	95% Ethanol	30
7	Absolute ethanol	45
8	Absolute ethanol	60
9	Xylene	45
10	Xylene	60
11	Soft paraffin (Xylene: Paraplast) (3:1)	60
12	Hard paraffin (Paraplast)	120

ตารางที่ 2 ขั้นตอนการย้อมสี H&E

Processes	Solution	Time (min)
Deparaffinization	Xylene	5
	Xylene	8
	Absolute ethanol	3
	Absolute ethanol	3
Rehydration	95% Ethanol	1
	70% Ethanol	3
	distilled water	2
H&E staining	Harris's hematoxylin	5
	Tap water	7
	1% Lithium carbonate	10
	Tap water	1
	70% Ethanol	3
	Eosin	3
Dehydration	80% Ethanol	1
	90% Ethanol	1
	95% Ethanol	3
	Absolute ethanol	3
	Absolute ethanol	3
Clearing	Xylene	5
	Xylene	5
Per mount	Mounting media	-

9). การรายงานผลและสถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม

ผลการทดลองรายงานในรูปแบบของค่าเฉลี่ย และความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (Mean ± Standard Error of Mean) การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดย One Way-Analysis of Variance (ANOVA) และใช้ Tukey post hoc. Analysis Test ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลอง โดยกำหนดค่านัยสำคัญที่ p- value น้อยกว่า 0.05 ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

1. ผลต่อน้ำหนักตัวและค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือด

พบว่า เมื่อให้น้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีการเพิ่มของ total cholesterol, triglycerides และ LDL-C ในเลือดเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม และเมื่อรป้อนสารนารินจิน 100 มก/กก/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจะลดค่าไขมันดังกล่าว (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลต่อน้ำหนักตัวและค่าชีวเคมีต่างๆในเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ

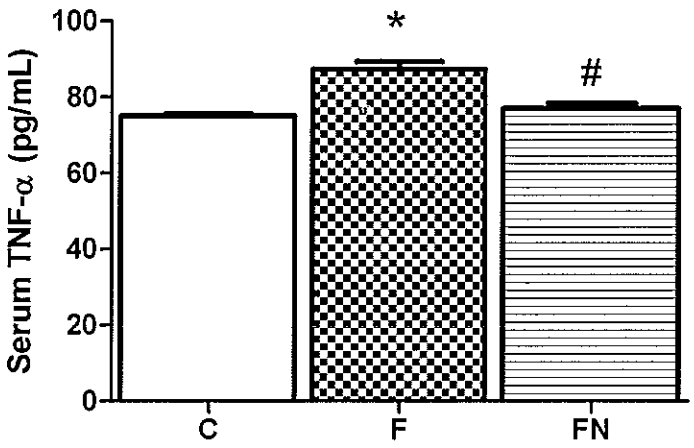
	C	F	FN
Initial body weight (g)	256 ± 3	250 ± 3	251 ± 2
Final body weight (g)	487 ± 7	535 ± 6	483 ± 6
Blood glucose (mg/dL)	99 ± 9	149 ± 13	114 ± 4
TC (mg/dL)	60 ± 7*	78 ± 5	63 ± 3*
TG (mg/dL)	61 ± 7*	82 ± 5	52 ± 4*
HDL-C (mg/dL)	30 ± 4	26 ± 2	27 ± 1
LDL-C (mg/dL)	24 ± 5*	37 ± 2	26 ± 3*

*P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F

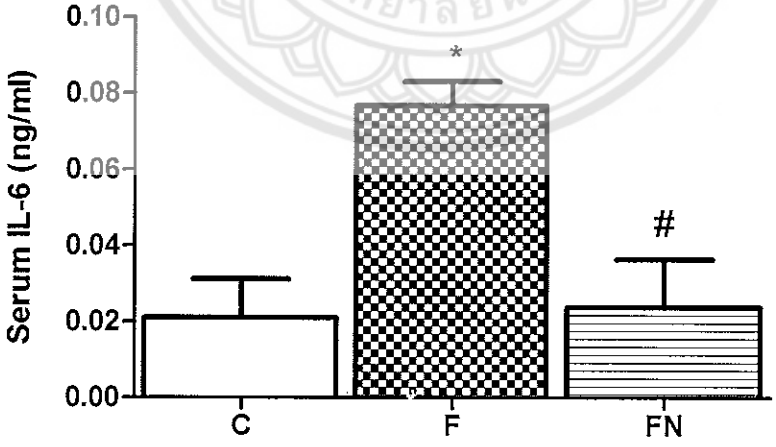
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย Control คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส; FNคือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส และได้รับสารนารินจิน 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

2. ผลของการได้รับสารนารินจินต่อระดับ Inflammatory Cytokines (TNF-∝ และ IL-6) ในซีรั่ม

จากภาพที่ 5 และ 6 พบว่าการให้น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตสจะเพิ่มระดับ TNF-∝ และ IL-6 ในซีรั่ม เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมซึ่งได้รับน้ำดื่มปกติ เมื่อป้อนสารนารินจินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าระดับ TNF-∝ และ IL-6 ในซีรั่ม จะมีค่าน้อยกว่าในกลุ่มที่ได้น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส แสดงว่า สารนารินจินมีผลลดระดับของ Inflammatory Cytokines ในซีรั่ม ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ภาวะการอักเสบได้



ภาพที่ 5 การแสดงระดับ Tumour necrosis factor (TNF)-α ในซีรั่มของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, #P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F



ภาพที่ 6 การแสดงระดับ Interleukin-6 (IL-6) ในซีรั่มของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN) โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, #P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F

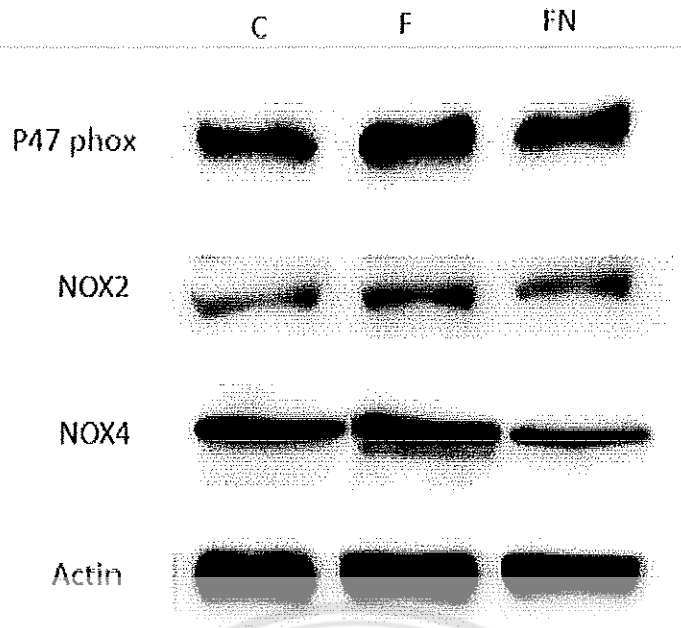
1034811

สำนักงานอธิการบดี
05 มิ.ย. 2564
วา
WA
615
.D5
อ1535
2561

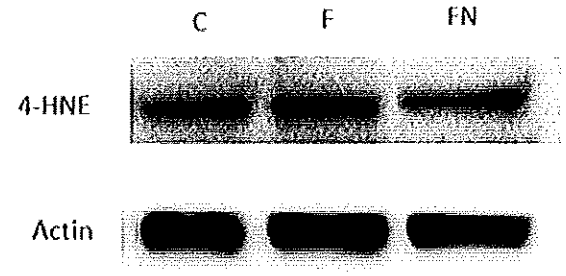
3. ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน NADPHoxidase subunits (p47phox, NOX 2 และ NOX4) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (4-HNE และ 3-NT) ในหลอดเลือด aorta

จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน p47phox, NOX 2 และ NOX4 ซึ่งเป็น subunits ของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน p47phox, NOX 2 และ NOX4 ในหลอดเลือด Aorta เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสาคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) หลังจากป้อนสารนารินจิน ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน p47phox, NOX 2 และ NOX4 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 7 และ 10

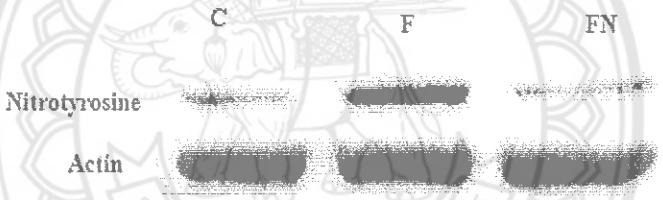
จากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน 4-HNE ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิด lipid peroxidation และโปรตีน 3-NT ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิด peroxynitrite ซึ่งทั้งสองเป็นตัวบ่งชี้ภาวะ oxidative stress พบว่าหลังจากป้อนสารนารินจิน ขนาด 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน 3-NT และ 4-HNE ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 8, 9, 10, และ 11 แสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นได้



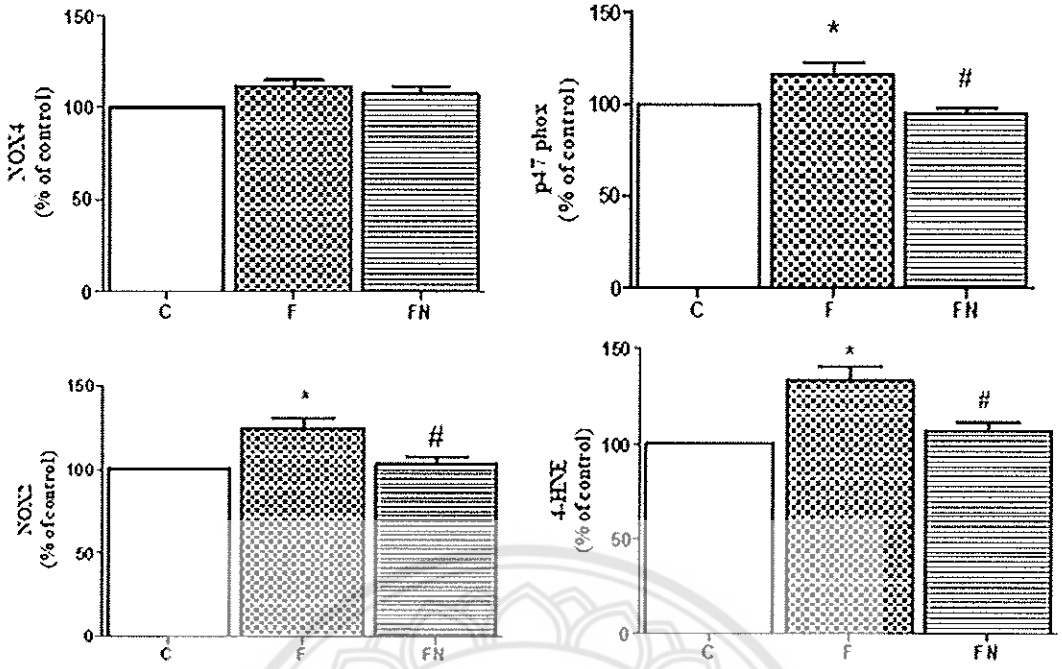
ภาพที่ 7 แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress (4-HNE) และ โปรตีน actin และ $NADPH_{oxidase}$ subunits (p47phox, NOX2 และ NOX4) ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)



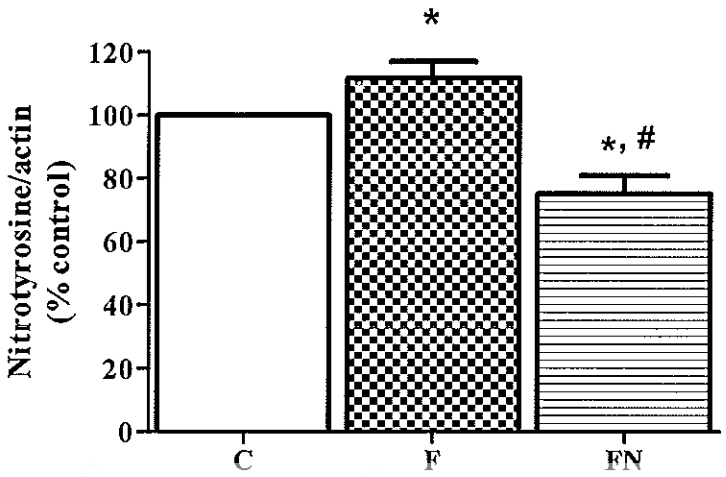
ภาพที่ 8 แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีน 4-HNE ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)



ภาพที่ 9 แสดงรูปการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine ในเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)



ภาพที่ 10 ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน NADPHoxidase subunits (p47phox, NOX2 และ NOX4) และ 4-HNE ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, #P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

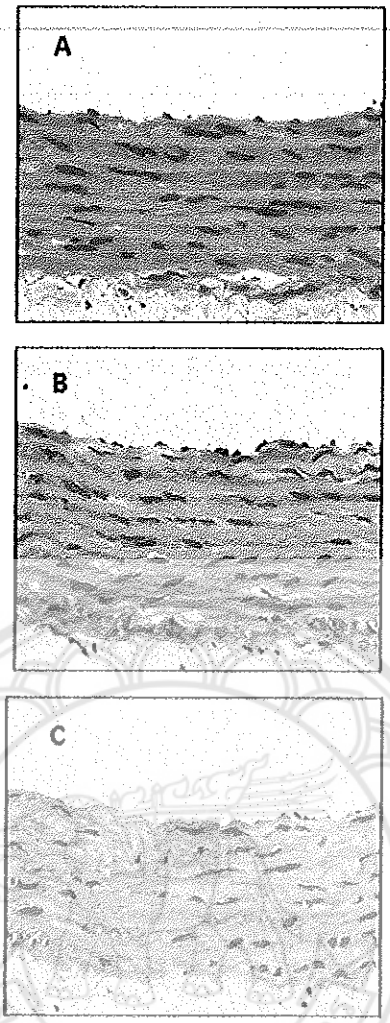


ภาพที่ 11 ร้อยละการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine ในหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ; *P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, #P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HC

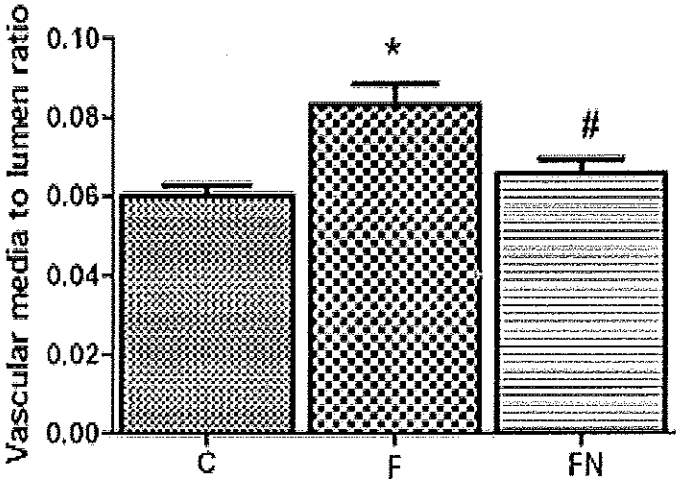
4. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดและความหนาของหลอดเลือด

จากภาพที่ 13 แสดงผลการย้อมสีหลอดเลือดแดง aorta โดย hematoxylin และ Eosin (H&E) (ภาพที่ 12) พบว่า โครงสร้างของหลอดเลือดในหนูกลุ่มควบคุมมีลักษณะปกติ โดยในชั้น tunica intima มีการเรียงตัวของเซลล์ endothelium เป็นชั้นเดียวปกติ สม่ำเสมอ ส่วนกล้ามเนื้อเรียบในชั้น tunica media เรียงตัวปกติ เมื่อให้น้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ หรือ เมื่อป้อนสารนารินจิน 100 มก/กก/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีผลต่อโครงสร้างของหลอดเลือดเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม

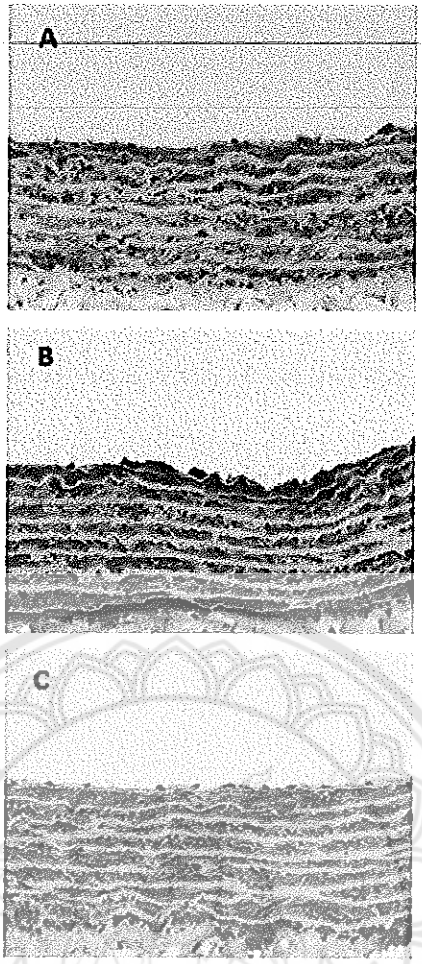
แต่จากการวัดความหนาของผนังหลอดเลือด (wall thickness) พบว่า กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงจะมีค่าความหนาของผนังหลอดเลือดชั้น media โดยเทียบกับขนาด lumen ของหลอดเลือด มากกว่ากลุ่มควบคุม และการป้อนสารนารินจิน สามารถลดความหนาของผนังหลอดเลือดชั้น media โดยเทียบกับขนาด lumen ของหลอดเลือด (ภาพที่ 13) เมื่อวัดปริมาณของ ∝-actin ซึ่งแสดงถึงปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือด พบว่า กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงจะมีปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดมากกว่ากลุ่มควบคุม และการป้อนสารนารินจิน สามารถลดปริมาณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบในผนังหลอดเลือดได้ (ภาพที่ 14 และ 15) จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การบริโภคสารนารินจินอาจช่วยลดความหนาของผนังหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสได้



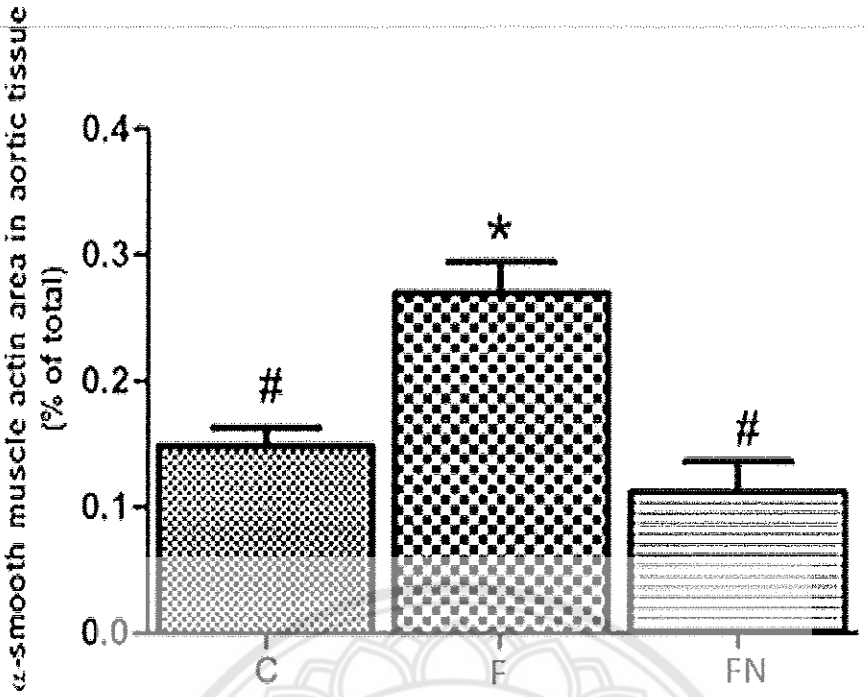
ภาพที่ 12 แสดง H&E staining (20X) ของชิ้นเนื้อหลอดเลือดเอออร์ตาของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ ได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)



ภาพที่ 13 แสดงอัตราส่วนของความหนาของหลอดเลือดชั้น media ต่อขนาด lumen **ของหลอดเลือดของ**หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control) และ กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ **ได้รับ** naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)โดยแสดงค่าในรูป ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 14 การแสดงออกของ ∝-smooth muscle actin โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) (10x) ในหลอดเลือดเอออร์ตาของของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (Control; ภาพ A) และ กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F; ภาพ B) และได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN; ภาพ C) โดยสีน้ำตาล แสดงถึง แสดงออกของ ∝-smooth muscle actin



ภาพที่ 15 ร้อยละพื้นที่การแสดงออกของ ∝-smooth muscle actin โดยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemistry) ต่อพื้นที่ที่วัดทั้งหมด ของหลอดเลือดเอออร์ตาของของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (C) และ กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) และได้รับ naringin 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (FN)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า การให้น้ำดื่มผสมน้ำฟรุคโตส ส่งผลเพิ่มการแสดงออกของหน่วยย่อย $NADPH_{oxidase}$ และโปรตีนที่แสดงออกถึงภาวะความเครียดออกซิเดชั่น และค่าบ่งชี้ภาวะอักเสบในซีรั่ม รวมทั้งยังส่งผลเพิ่มความหนาของผนังหลอดเลือดในหนู ซึ่งค่าการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้จะลดลงเมื่อได้รับการป้อนสารนารินจิน

เป็นที่ทราบกันดีว่า โรคหลอดเลือดตีบแข็ง (atherosclerosis) เป็นภาวะที่เกิดการตีบแคบของหลอดเลือดแดง ซึ่งกลไกการเกิดโรคนี้ เกิดจากความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด และการเกิดการอักเสบของผนังหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดการเพิ่มจำนวนและการสะสมของเซลล์ชนิดต่าง ๆ เช่น เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ไขมัน (lipid) ในผนังหลอดเลือด การสะสมของสารเหล่านี้ ทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติมากขึ้น จนส่งผลให้มีการผลิตสารที่มีคุณสมบัติทำให้หลอดเลือดขยายตัวลดลง และผนังหลอดเลือดหนาเพิ่มขึ้น รวมทั้งยังส่งผลทำให้ไขมัน low density lipoprotein (LDL) ที่อยู่ในกระแสเลือด เคลื่อนที่เข้ามาสะสมในผนังหลอดเลือด แล้วทำปฏิกิริยาออกซิเดชันกับสารอนุมูลอิสระ จนเปลี่ยนรูปไปเป็น oxidized LDL (oxLDL) ส่งผลให้ ผนังหลอดเลือดถูกทำลายและมีการอักเสบรุนแรงมากยิ่งขึ้น (30) ซึ่งโรค**หลอดเลือดตีบแข็ง (atherosclerosis)** มักมีสาเหตุมาจากความผิดปกติทางเมทาบอลิซึมของไขมันและกลูโคส เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือภาวะอ้วน (2-4) ซึ่งในการศึกษา หนูทดลองจะถูกชักนำให้เกิดความผิดปกติทางเมทาบอลิซึมของไขมันและกลูโคส โดยการให้ดื่มน้ำผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10 % เป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งปริมาณของน้ำตาลฟรุคโตสที่ใช้ในการศึกษานี้ จะมีปริมาณใกล้เคียงกับสัดส่วนของน้ำตาลฟรุคโตสที่ใช้ผสมเครื่องดื่มในท้องตลาด ซึ่งมีรายงานวิจัย พบว่า การได้รับน้ำผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10 % สามารถกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติทางเมทาบอลิซึมของไขมันและกลูโคส เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูลิน หรือภาวะอ้วน ในสัตว์ทดลอง (31-33) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้

เมื่อศึกษาผลของการได้รับสารนารินจินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของผนังหลอดเลือด พบว่า การให้น้ำตาลฟรุคโตสสูงจะทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

โดยพบการหนาของชั้น media ของผนังหลอดเลือดและมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และเมื่อป้อนสารนารินจิน พบว่า จะช่วยฟื้นฟูการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างของผนังหลอดเลือดดังกล่าวให้ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าสารนารินจินอาจช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

เป็นที่ทราบกันดีว่า อนุมูลอิสระเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) (5) โดยสารอนุมูลอิสระ superoxide anion จะทำปฏิกิริยากับสาร nitric oxide ในหลอดเลือด ทำให้เกิดสาร peroxynitrite ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ส่งผลทำลายเซลล์ endothelium ของหลอดเลือด จนเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง ตามมาได้ (33) มีรายงานวิจัย พบว่า เอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ในหลอดเลือด ถือว่าเป็นแหล่งสำคัญในการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion จำนวนมากในหลอดเลือด ซึ่ง $NADPH_{oxidase}$ ประกอบด้วย membrane-bound core catalytic subunits ได้แก่ NOX1-5, DUOX1 และ DUOX2 และ cytosolic/regulatory subunits ได้แก่ p47phox, p67phox และ RAC ซึ่ง NADPHoxidase จะถูกกระตุ้นเมื่อ cytosolic/regulatory subunits เช่น p47phox เคลื่อนตัวมารวมกับ membrane-bound core catalytic subunits เป็น complex ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide anion และ hydrogen peroxide มีรายงานวิจัย พบว่า NOX2 และ NOX4 จะพบมากที่เซลล์ endothelium และ กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (18) และในสภาวะพยาธิสภาพต่างๆ เช่นภาวะไขมันในเลือดสูง เบาหวาน มักมีการแสดงออกของ p47phox, NOX2 และ NOX4 ในหลอดเลือดเพิ่มขึ้น (35-36) นอกจากนี้ ยังมีการศึกษา พบว่า การเพิ่มขึ้นของ LDL เป็นเวลานาน จะทำให้ LDL ถูกออกซิไดส์ด้วยอนุมูลอิสระ จนกลายเป็น oxidized LDL ซึ่งสามารถเพิ่ม mRNA expression ของ $NADPH_{oxidase}$ และเพิ่มการทำงานของ $NADPH_{oxidase}$ ซึ่งจะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระทำลายหลอดเลือด (37)

ในการศึกษานี้ พบการแสดงออกของโปรตีนของ p47phox, NOX2 และ NOX4 เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับน้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส แสดงว่าการบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสสูงเป็นเวลา 3 เดือน สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ subunits ในหลอดเลือด เมื่อป้อนสารนารินจิน จะลดการแสดงออกของ p47

phox และ NOX2 ซึ่งเป็น subunit ของ NOX2 และการแสดงออกของ NOX4 ที่หลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง แสดงให้เห็นว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของ $NADPH_{oxidase}$ subunits ในผนังหลอดเลือด ซึ่งผลดังกล่าว อาจลดการเกิดอนุมูลอิสระในการทำลายผนังหลอดเลือด

จากการสืบค้นข้อมูลวิจัยที่พบว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (26, 38-39) ดังนั้น จึงศึกษาฤทธิ์ของการบริโภคสารนารินจินต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ oxidative stress ในหลอดเลือด โดยวิเคราะห์การแสดงออกของ 4-HNE และ 3-NT ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้การเกิดออกซิเดชั่นของไขมันและการเกิดสาร peroxynitrite ตามลำดับ พบว่าการแสดงออกของ 4-HNE และ 3-NT ในหลอดเลือดมีค่าเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับน้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส เมื่อป้อนสารนารินจิน จะลดการแสดงออกของ 4-HNE และ 3-NT ในหลอดเลือดของหนูที่ได้รับน้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส จึงเป็นไปได้ว่า สารนารินจินอาจมีฤทธิ์ฟื้นฟูความผิดปกติของหลอดเลือด โดยการลดการเกิดอนุมูลอิสระ ในหลอดเลือดแดงของหนูที่ได้รับน้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส

นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัย กล่าวว่า ความผิดปกติของหลอดเลือดที่จะนำไปสู่ภาวะหลอดเลือดแข็งนั้น จะมีภาวะของการอักเสบของผนังหลอดเลือด ทำให้มีการหลั่งสารที่บ่งชี้ภาวะการอักเสบ proinflammatory cytokine เช่น TNF-∝ และ IL-6 เพิ่มขึ้น โดยสาร TNF-∝ นั้น สามารถกระตุ้นการแสดงออกและการทำงานของหน่วยย่อยของเอนไซม์ $NADPH_{oxidase}$ ในเยื่อบุผนังหลอดเลือดและเวลลีกล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด ส่งผลเพิ่มการผลิตอนุมูลอิสระ รวมทั้งยังกระตุ้นการสร้าง proinflammatory cytokines ตัวอื่นๆเช่น IL-6 ซึ่งทั้ง TNF-∝ และ IL-6 จะมีบทบาทสำคัญที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อบุผนังหลอดเลือด และทำให้เกิดการ proliferation ของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ส่งผลให้หลอดเลือดหนาตัวขึ้น ซึ่งทั้งหมดนี้ถือว่าอาการเริ่มต้นของการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (40) ในการศึกษานี้ พบปริมาณ TNF-∝ และ IL-6 ในซีรั่มของหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำดื่มปกติ แสดงว่าการบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสสูงเป็นเวลา 3 เดือน สามารถกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ proinflammatory cytokines ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้ถึงภาวะอักเสบ เมื่อป้อนสารนารินจินสามารถลดปริมาณ

proinflammatory cytokines ทั้งสองได้แสดงให้เห็นว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย รวมทั้งผนังหลอดเลือด

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมด สรุปได้ว่าการป้อนสารนารินจิน สามารถฟื้นฟูความผิดปกติของผนังหลอดเลือด โดยลดการแสดงออกของหน่วยย่อย $NADPH_{oxidase}$ และโปรตีนที่แสดงออกถึงภาวะความเครียดออกซิเดชั่น และลดค่าบ่งชี้ภาวะอักเสบ ในหนูที่รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

เอกสารอ้างอิง

1. WHO. Noncommunicable diseases. Media centre of World Health Organization; 2017 update [June 2017]; Available from: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/en/
2. Lorber D. Importance of cardiovascular disease risk management in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy. 2014;7:169-83.
3. Zhang PY. Cardiovascular disease in diabetes. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2014 Aug;18(15):2205-14.
4. 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 Nov-Dec;33(6):1722-31
5. Shin JA, Lee JH, Lim SY, Ha HS, Kwon HS, Park YM, Lee WC, Kang MI, Yim HW, Yoon KH, Son HY. Metabolic syndrome as a predictor of type 2 diabetes, and its clinical interpretations and usefulness.J Diabetes Investig. 2013 Jul 8;4(4):334-43.
6. Kaur J.A comprehensive review on metabolic syndrome. Cardiol Res Pract. 2014;2014:943162
7. Samson SL, Garber AJ.Metabolic syndrome.Endocrinol Metab Clin North Am. 2014 Mar;43(1):1-23.
8. Bantle JP. Dietary fructose and metabolic syndrome and diabetes. J Nutr. 2009;139(6), 1263S-1268S.

9. Madero M, Perez-Pozo SE, Jalal D, Johnson RJ, Sánchez-Lozada LG. Dietary fructose and hypertension.Curr Hypertens Rep. 2011 Feb;13(1):29-35.

10. Linda T. Tran, Violet G. Yuen, John H. McNeill, The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of fructose-induced insulin resistance and hypertension. Mol Cell Biochem. 2009; 332: 145-59

11. Saygin M, Asci H, Cankara FN, Bayram D, Yesilot S, Candan IA, Alp HH. The impact of high fructose on cardiovascular system: Role of α-lipoic acid.Hum ExpToxicol. 2016 ;35(2):194-204

12. El-Bassossy H, Badawy D, Neamatallah T, Fahmy A.Ferulic acid, a natural polyphenol, alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent relaxation.ChemBiol Interact. 2016;254:191-7.

13. Akar F, Uludağ O, Aydın A, Aytekin YA, Elbeg S, Tuzcu M, Sahin K.High-fructose corn syrup causes vascular dysfunction associated with metabolic disturbance in rats: protective effect of resveratrol.Food ChemToxicol. 2012;50(6):2135-41.

14. Kolderup A, Svihus B.Fructose Metabolism and Relation to Atherosclerosis, Type 2 Diabetes, and Obesity.J NutrMetab. 2015;14:1-11

15. Gaby AR. Adverse effects of dietary fructose.Altern Med Rev. 2005;10(4):294-306.

16. Mahmoud AA, Elshazly SM. Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic syndrome in rats.PLoS One. 2014 Sep 9;9(9):1-8.

17. Dusting GJ, Selemidis S, Jiang F. Mechanisms for suppressing NADPH oxidase in the vascular wall. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005 Mar;100 Suppl 1:97-103.

18. Brandes RP, Weissmann N., Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. Free Radic Biol Med. 2010;49,687-706.

19. Brandes RP, Schröder K. Differential vascular functions of Nox family NADPH oxidases.CurrOpinLipidol. 2008;19(5):513-8.

20. Litterio MC, Vazquez Prieto MA, Adamo AM, Elesgaray R, Oteiza PI, Galleano M, Fraga CG. (-)-Epicatechin reduces blood pressure increase in high-fructose-fed rats: effects on thedeterminants of nitric oxide bioavailability.J NutrBiochem. 2015 ;26(7):745-51

21. Pacher P, Szabo C. Role of peroxynitrite in the pathogenesis of cardiovascular complications of diabetes. CurrOpinPharmacol. 2006;6:136-41.

22. Almenara CC, Mill JG, Vassallo DV, Baldo MP, Padilha AS.In vitro fructose exposure overactivates NADPH oxidase and causes oxidative stress in the isolated rat aorta.Toxicol In Vitro. 2015 ;29(8):2030-7

23. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S., Majo D.D., Giammanco M. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chem.2007;104:466–479

24. 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;23:1025–1034.

25. Rajadurai M., Prince PSM. Preventive effect of naringin on lipids, lipoproteins and lipid metabolic enzymes in isoproterenol-induced myocardial infarction in Wistar rats. J. Biochem. Mol. Toxicol. 2006;20:191–197.

26. Rajadurai M, Prince PSM. Preventive effect of naringin on lipid peroxides and antioxidants in isoproterenol-induced cardiotoxicity in Wistar rats: Biochemical and histopathological evidences. Toxicology. 2006;228:259–268.

27. Kannappan S, Anuradha CV. Naringenin enhances insulin-stimulated tyrosine phosphorylation and improves the cellular actions of insulin in a dietary model of metabolic syndrome. Eur. J.Nutr. 2010;49:101–109.

28. Alam MA, Kauter K, Brown L.Naringin Improves Diet-Induced Cardiovascular Dysfunction and Obesity in High Carbohydrate, High Fat Diet-Fed Rats. Nutrients. 2013; 5: 637-50.

29. Chanet A, Milenkovic D, Deval C, Potier M, Constans J, Mazur A, Bennetau-Pelissero C, Morand C, Bérard AM. Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice.J NutrBiochem. 2012 May;23(5):469-77.

30. Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. Int J Prev Med. 2014 Aug;5(8):927-46.

31. Ventura EE, Davis JN, Goran MI. Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. Obesity (Silver Spring, Md). 2011;19:868-74.

32. Toop CR, Gentili S. Fructose Beverage Consumption Induces a Metabolic Syndrome Phenotype in the Rat: A Systematic Review and Meta-Analysis. Nutrients. 2016;8.

33. Zhang DM, Jiao RQ, Kong LD. High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. Nutrients. 2017;9.

34. Rafael R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine. PNAS.2018;115: 5839-5848.

35. Xiao L, Liu L, Guo X, Zhang S, Wang J, Zhou F, Liu L, Tang Y, Yao P. Quercetin attenuates high fat diet-induced atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice: A critical role of NADPH oxidase. Food Chem Toxicol. 2017;105:22-33.

36. Karthik D, Viswanathan P, Anuradha CV. Administration of rosmarinic acid reduces cardiopathology and blood pressure through inhibition of p22phox NADPH oxidase in fructose-fed hypertensive rats. J Cardiovasc Pharmacol. 2011 Nov;58(5):514-21.

37. Ou HC, Chou WC, Hung CH, Chu PM, Hsieh PL, Chan SH, Tsai KL. Galectin-3 aggravates ox-LDL-induced endothelial dysfunction through LOX-1 mediated signaling pathway. Environ Toxicol. 2019;34(7):825-835.

38. Malakul W, Pengnet S, Kumchoom C, Tunsophon S. Naringin ameliorates endothelial dysfunction in fructose-fed rats. Exp Ther Med. 2018 Mar; 15(3): 3140–3146.

39. Pengnet S, Prommaouan S, Sumarithum P, Malakul W. Naringin Reverses High-Cholesterol Diet-Induced Vascular Dysfunction and Oxidative Stress in Rats via Regulating LOX-1 and NADPH Oxidase Subunit Expression. Biomed Res Int. 2019 Oct 24;2019:3708497. doi: 10.1155/2019/3708497. eCollection 2019.

40. Zhang H, Park Y, Wu J, Chen Xp, Lee S, Yang J, Dellsperger KC, Zhang C. Role of TNF-alpha in vascular dysfunction. Clin Sci (Lond). 2009 Feb;116(3):219-30. doi: 10.1042/CS20080196.

41. Zhang H, Zhang C. Vasoprotection by dietary supplements and exercise: role of TNFα signaling. Exp Diabetes Res. 2012;2012:972679. doi: 10.1155/2012/972679. Epub 2011 Nov 1.