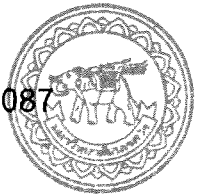


อธิบดีกรมการ

สัญญาเลขที่ R2562B087



สำนักหอสมุด



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสารสกัดลูกหม่อนเพื่อลดความเสี่ยง
ภาวะไขมันผิดปกติ หลอดเลือดแดงแข็งและหัวใจขาดเลือด

ชื่อหัวหน้าโครงการ: รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์

หน่วยงานที่สังกัด: ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
วันลงทะเบียน..... 4 ก.พ. 2565
เลขทะเบียน..... 1048498
เลขเรียกหนังสือ..... 0x
..... 495

.ท73

ก1656

9.563

เสร็จสิ้นโครงการวันที่ 14 กันยายน 2563

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อยที่ 1

- ชื่อภาษาไทย ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของหลอดเลือด ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of mulberry fruit extract on blood lipid profile and vascular function in mice fed with high fat and high sugar diet
- หัวหน้าโครงการ รศ.ดร.ภญ.กรองกาญจน์ ชูทิพย์

โครงการย่อยที่ 2

- ชื่อภาษาไทย ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้อง และการดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of mulberry fruit extract on blood glucose, visceral fat accumulation and the intestinal epithelial absorption in mice fed with high fat and high sugar diet
- หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์

โครงการย่อยที่ 3

- ชื่อภาษาไทย ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อลักษณะจุลกายวิภาคและการแสดงออกของ immediate early response 3 (IER-3) ในหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่และตับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of mulberry fruit extract on histology and expression of immediate early response 3 (IER3) in heart, aorta and liver of mice fed with high fat and high sugar diet
- หัวหน้าโครงการ ผศ.รัชณี ชนะสงค์

โครงการย่อยที่ 4

- ชื่อภาษาไทย ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในตับและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- ชื่อภาษาอังกฤษ Effect of mulberry fruit extract on lipid profile and lipid gene expression in liver of mice fed with high fat and high sugar diet
- หัวหน้าโครงการ ผศ.เอกรินทร์ ชุสิทธิ์

ระยะเวลาที่ทำวิจัย 1 ปี

บทสรุป (executive summary)

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบบหัวใจรวมหลอดเลือด (cardiovascular diseases: CVDs) ซึ่งเป็นโรคไม่ติดต่อแบบเรื้อรัง (chronic non-communicable disease: NCD) ที่พบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่องและมักต้องได้รับยาเพื่อรักษาตลอดชีวิต ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว ดังนั้นถ้าหากมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถลดความเสี่ยงการเกิดโรค CVDs และผ่านการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองด้วยโมเดลที่เหมาะสมก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง งานวิจัยนี้จึงทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกหม่อนอบแห้งในหนูไมค์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) จากการได้รับอาหารที่มีไขมันสูง เพื่อประเมินประสิทธิภาพของสารสกัดลูกหม่อนเมื่อให้ในขนาด 10, 100 และ 300 mg/kg ในการลดความเสี่ยงการเกิดโรคในระบบหัวใจรวมหลอดเลือดในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารไขมันสูง ติดต่อกันนาน 3 เดือน โดยศึกษาผลต่อตัวแปรต่อไปนี้

- ระดับไขมันในเลือดและในตับ ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL)
- Atherogenic index (AI)
- การคลายตัวของหลอดเลือดเอออร์ตา
- น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง
- ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด
- การดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อบุผนังลำไส้
- การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ของหัวใจ หลอดเลือด aorta และตับ
- การแสดงออกของ IER3 ในเนื้อเยื่อหัวใจ หลอดเลือด aorta และตับ ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

ผลการศึกษาพบว่าลูกหม่อนอบแห้ง โดยเฉพาะขนาด 10 mg/kg มีผลลดระดับ total cholesterol (TC), triglyceride (TG) และเพิ่ม HDL ในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว และยังมีแนวโน้มลด LDL และ atherogenic index อีกด้วย ตลอดจนมีแนวโน้มเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด มากไปกว่านั้นลูกหม่อนอบแห้งทุกขนาดยังมีผลลดการกินอาหารและลดน้ำหนักตัวได้ อีกทั้งมีผลลดระดับ TC และ LDL ในตับได้ดีที่สุด และสามารถลดระดับ TG ในตับได้บ้าง และที่สำคัญคือลูกหม่อนสามารถเพิ่มระดับ HDL ในตับได้ทั้ง 3 ขนาดคือ 10, 100 และ 300 mg/kg แต่ประสิทธิภาพในการลดระดับ TC, TG ในตับยังไม่เทียบเท่ากับยา atorvastatin ส่วนประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับ HDL ในตับนั้นดีกว่ายา atorvastatin

ระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองทุกกลุ่มตลอดระยะเวลา 3 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงมีค่ามากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ แต่ในเดือนที่สามพบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มนี้มีแนวโน้มลดลงแต่ยังคงสูงกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ ปริมาณไขมันที่สะสมในช่องท้องและน้ำหนักตับของหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม และลูกหม่อนอบแห้งช่วยลดปริมาณไขมันสะสมในช่องท้องได้ ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาสาร C3G ในสารละลายลูกหม่อน ผลไม่พบสารใด อาจเนื่องจากการเก็บตัวอย่างไว้นานเกินไปส่งผลให้สารสลายไปก่อนการตรวจวิเคราะห์

การย้อมเนื้อเยื่อด้วย Masson's trichrome, IER3 และ α SMA immunohistochemistry พบว่าผนังหลอดเลือด (aortic wall thickness; tunica intima และ media) กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง มีความ

หนาที่สุด และมีปริมาณสะสมของ collagen มากที่สุด และพบการแสดงออกลดลงของ IER3 รวมทั้ง α SMA ใน VSMC ร่วมด้วย มีการหนาตัวของผนังหัวใจ (cardiac wall thickness) ของ left ventricle ร่วมกับ hypertrophy cardiomyocytes พบ liver มีการสะสมของไขมันในตับ (lipid accumulation in liver) และมี % of fibrosis มาก และมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ IER3 การได้รับลูกลูหม่อนขนาด 10 mg/kg BW ทำให้ลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดเลือดดีกว่ากลุ่มที่ได้รับลูกลูหม่อนในขนาดอื่น ๆ ร่วมกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้ง IER3 และ α SMA ของ VSMC มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ในตับพบว่าลักษณะจุลกายวิภาคที่ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับลูกลูหม่อนขนาดอื่น ๆ แต่พบการแสดงออกที่ลดลงของ IER3 มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ร่วมด้วย ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ผลของลูกลูหม่อนอบแห้งมีฤทธิ์ anti-arteriosclerosis ในหลอดเลือด และ anti-steatosis ในตับ ที่เป็นผลจาก anti-inflammation

โดยภาพรวมผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าลูกลูหม่อนอบแห้งมีประสิทธิภาพในการป้องกันหลอดเลือดแดงแข็ง โดยการลดระดับไขมันในเลือดในตับ ป้องกันการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด หัวใจ และตับที่เกิดจากการได้รับอาหารไขมันสูง และมีศักยภาพในการต้านภาวะอ้วนได้ ดังนั้นลูกลูหม่อนอบแห้งจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เพื่อป้องกันโรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้



สารบัญ

	หน้า
บทสรุป (executive summary)	ii
รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 1	1
บทคัดย่อ	2
Abstract	3
บทที่ 1 บทนำ	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	9
บทที่ 4 ผลการทดลอง	15
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	25
บทที่ 6 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	32
รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 2	36
บทคัดย่อ	40
Abstract	41
บทที่ 1 บทนำ	42
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	43
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	45
บทที่ 4 ผลการทดลอง	49
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	58
บทที่ 6 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ	60
เอกสารอ้างอิง	61
ภาคผนวก	63
รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 3	67
บทคัดย่อ	68
Abstract	70
บทที่ 1 บทนำ	71
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	73
บทที่ 3 ผลการทดลอง	75
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	81
บทที่ 5 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ	89

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	90
ภาคผนวก	91
รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 4	95
บทคัดย่อ	96
Abstract	97
บทที่ 1 บทนำ	98
บทที่ 2 วิธีการทดลอง	100
บทที่ 3 ผลการทดลอง	103
บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	112
บทที่ 5 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ	115
เอกสารอ้างอิง	116
ภาคผนวก	118
ดัชนีชี้วัดความสำเร็จของโครงการวิจัย	121



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสารสกัดลูกหม่อนเพื่อลดความเสี่ยง
ภาวะไขมันผิดปกติ หลอดเลือดแดงแข็งและหัวใจขาดเลือด

โครงการย่อยที่ 1

ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของหลอดเลือด
ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์ (หัวหน้าโครงการ)

2. ผศ.ดร.เกริกเกียรติ จินดา

3. นางธัญวรัตน์ กาจสงคราม

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง
ประเทศไทย

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน (บูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ได้มมหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

สัญญาเลขที่ R2562B087

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 1:

ชื่อภาษาไทย	ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของหลอดเลือด ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effect of mulberry fruit extract on blood lipid profile and vascular function in mice fed with high fat and high sugar diet
หัวหน้าโครงการ	รศ.ดร.ภญ.กรรณกาญจน์ ชูทิพย์
ระยะเวลาที่ทำวิจัย	1 ปี

บทคัดย่อ

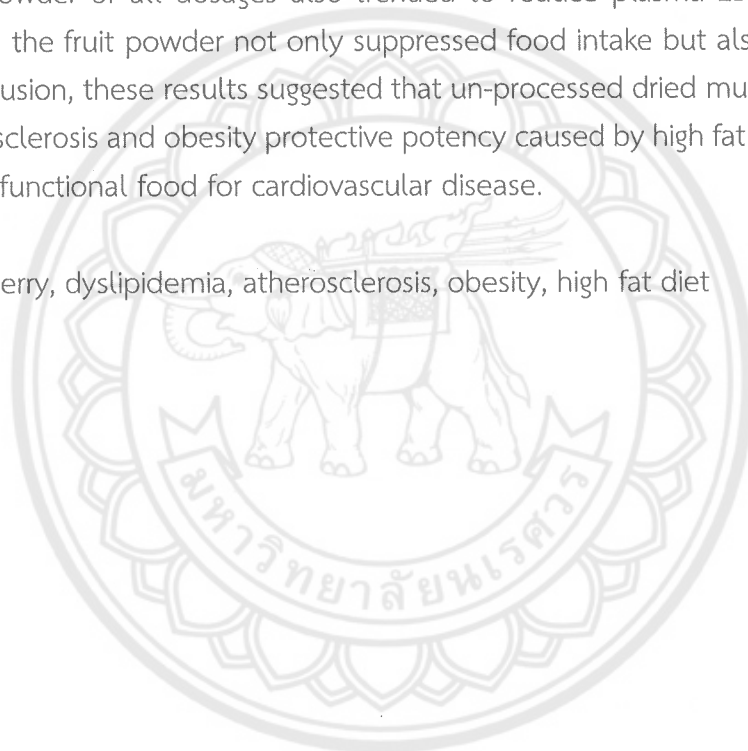
ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด เช่น โรคความดันโลหิตสูงและโรคหลอดเลือดแดงแข็ง ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ช่วยลดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติจึงเป็นหนึ่งในแนวทางการป้องกันโรคที่น่าสนใจ ลูกหม่อนเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่มีรายงานว่ามีส่วนในการลดไขมันในเลือดและฤทธิ์ป้องกันการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งตัว ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาประสิทธิภาพของลูกหม่อนอบแห้งที่ไม่ผ่านกระบวนการสกัดในการป้องกันการเกิดหลอดเลือดแดงแข็งตัวในหนูที่ถูกกระตุ้นให้มีไขมันในเลือดผิดปกติโดยการได้รับอาหารไขมันสูงรวมกับการได้รับลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10, 100 และ 300 mg/kg เป็นเวลาสามเดือน โดยตรวจวัดไขมันในเลือด ค่า atherogenic index ตลอดจนการกินอาหารและค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาพบว่าลูกหม่อนอบแห้ง โดยเฉพาะขนาด 10 mg/kg มีผลลดระดับ cholesterol, triglyceride และเพิ่ม HDL ในเลือดอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว และยังมีแนวโน้มลด LDL และ atherogenic index อีกด้วย ตลอดจนมีแนวโน้มเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด มากไปกว่านั้นลูกหม่อนอบแห้งทุกขนาดยังมีผลลดการกินอาหารและลดน้ำหนักตัวได้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าลูกหม่อนอบแห้งมีประสิทธิภาพในการป้องกันหลอดเลือดแดงแข็ง โดยการลดระดับไขมันในเลือด และมีศักยภาพในการต้านภาวะอ้วนได้ ดังนั้นลูกหม่อนอบแห้งจึงมีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ เพื่อป้องกันโรคทางระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้

คำสำคัญ: ลูกหม่อน ไขมันในเลือด หลอดเลือดแดงแข็ง โรคอ้วน อาหารไขมันสูง

Abstract

Dyslipidemia is one of the risk factors of cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis, thus consumption of food products that carry lipid-lowering property can prevent this abnormality. Mulberry is natural product that had been reported that it carried hypolipidemia and anti-atherosclerosis activities. This study, therefore, aimed to verify the atherosclerosis protective property as well as anti-obesity ability of un-processed dried mulberry fruit powder (10, 30, and 100 mg/kg) on high-fat diet-induced atherosclerotic mice for three months by measurement plasma lipid profile, food intake and bodyweight gain. The results showed that dried mulberry fruit powder particularly 100 mg/kg could significantly decrease plasma cholesterol, triglyceride and increase HDL compared to only high fat diet consumption. In addition, 10 mg/kg of fruit powder mildly stimulated vasorelaxation. Dried mulberry fruit powder of all dosages also tended to reduce plasma LDL and atherogenic index. Moreover, the fruit powder not only suppressed food intake but also bodyweight gain of mice. In conclusion, these results suggested that un-processed dried mulberry fruit powder provided atherosclerosis and obesity protective potency caused by high fat diet. This plant can serve as natural functional food for cardiovascular disease.

Keywords: mulberry, dyslipidemia, atherosclerosis, obesity, high fat diet



บทที่ 1 บทนำ

1.1 แนวคิดและที่มา

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบบหัวใจรวมหลอดเลือด (cardiovascular diseases: CVDs) เช่น โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง ซึ่งเป็นโรคไม่ติดต่อแบบเรื้อรัง (chronic non-communicable disease: NCD) ที่พบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่องและมักต้องได้รับยาเพื่อรักษาตลอดชีวิต ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และก่อให้เกิดภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาลและการดูแลผู้ป่วย จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคในกลุ่ม CVDs เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease/ stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 ประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคในกลุ่ม CVDs สูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) ภาวะไขมันในเลือดสูงทำให้เกิดอาการอักเสบของหลอดเลือด และทำให้หลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งถ้าเกิดขึ้นที่หลอดเลือดหัวใจในระยะยาวจะทำให้หลอดเลือดหัวใจตีบ จนนำไปสู่ภาวะหัวใจขาดเลือด (myocardial ischemia) ได้ หากไม่ได้รับการรักษาอย่างทันท่วงทีจะทำให้กล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) และทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตในที่สุด การหาสารสกัดหรือยาที่สามารถลดความเสี่ยงของการบาดเจ็บของหัวใจที่เกิดจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด จึงมีความสำคัญในการบรรเทาความรุนแรงของโรคได้

ดังนั้นถ้าหากมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหารที่สามารถลดความเสี่ยงการเกิดโรค CVD และผ่านการทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองด้วยโมเดลที่เหมาะสมก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง งานวิจัยนี้จึงศึกษาประสิทธิภาพของลูกหม่อนอบแห้งที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณแอนโทไซยานิน (total monomeric anthocyanin content) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, FRAP assay) การออกฤทธิ์ต้านสารอักเสบและฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ในเบื้องต้นมาแล้วโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่าลูกหม่อนอบแห้งมีระดับของ anthocyanin ที่สูงและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจทำวิจัยต่อยอดโดยนำลูกหม่อนอบแห้งไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ atherosclerosis จากการได้รับอาหารที่มีไขมันสูง เพื่อดูผลของลูกหม่อนอบแห้งในการลดระดับไขมันในเลือด รวมทั้งฤทธิ์ในการคลายตัวของหลอดเลือด ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคในกลุ่ม CVDs ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

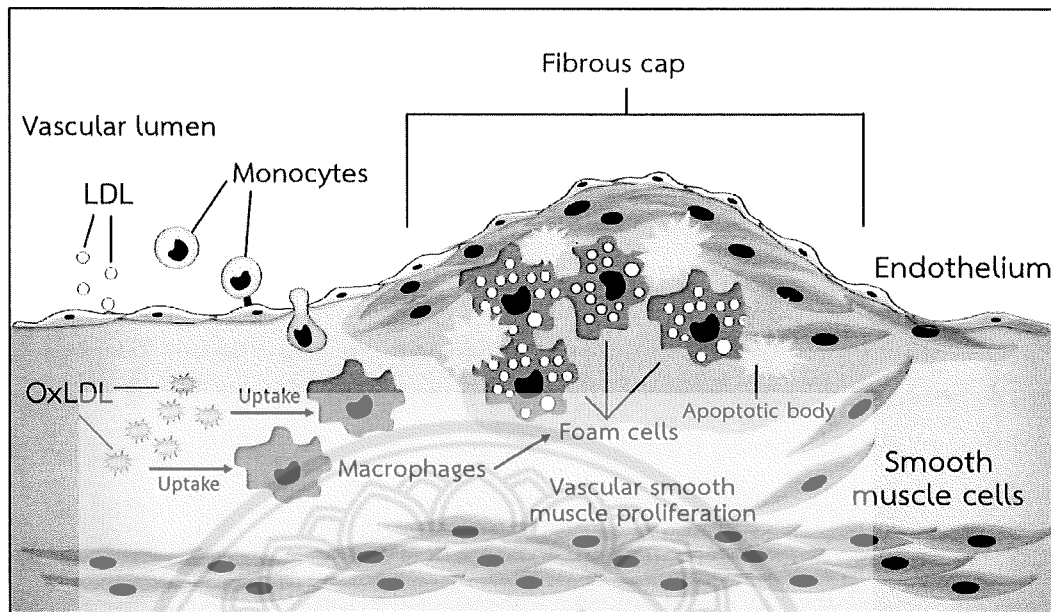
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดลูกหม่อนในการลดความเสี่ยงการเกิดโรคในระบบหัวใจรวมหลอดเลือดในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารไขมันสูง โดยศึกษาผลต่อตัวแปรต่อไปนี้

- ระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL)
- Atherogenic index (AI)
- การคลายตัวของหลอดเลือดเออร์ตา

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) และภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรกระบบหัวใจรวมหลอดเลือด (cardiovascular diseases: CVDs) เช่น ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง ซึ่งเป็นโรคไม่ติดต่อแบบเรื้อรัง (chronic non-communicable disease: NCD) ที่พบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่องและมักต้องได้รับยาเพื่อรักษาตลอดชีวิต ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และก่อให้เกิดภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาลและการดูแลผู้ป่วย จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคในกลุ่ม CVDs เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease/ stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 ประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคในกลุ่ม CVDs สูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)

ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง หรือ “Atherosclerosis” เป็นความผิดปกติที่หลอดเลือดแข็งและขาดความยืดหยุ่นจากการสะสมของไขมันในชั้นเยื่อบุของหลอดเลือด (endothelium) มักเกิดขึ้นกับหลอดเลือดแดงขนาดกลางและขนาดใหญ่ ระยะแรกของการเกิดโรค atherosclerosis ผู้ป่วยจะยังไม่แสดงอาการใด ๆ จนกว่าจะผ่านไปมากกว่า 10 ปี จึงแสดงอาการทางคลินิกเนื่องจากเกิดความเสียหายและมีการอุดตันของหลอดเลือด ทำให้อวัยวะต่าง ๆ ขาดเลือดไปเลี้ยง อาการแสดงจึงขึ้นอยู่กับบริเวณที่มีการอุดตันของหลอดเลือด เช่น ถ้าหลอดเลือดที่ขาดตันผู้ป่วยอาจมีอาการปวดน่องเมื่อเดินมาก ๆ ถ้าความผิดปกติเป็นหลอดเลือดในระบบทางเดินอาหารอาจมีอาการปวดท้องเมื่อรับประทานอาหาร หรือถ้าเป็นหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจจะมีอาการเจ็บแน่นหน้าอก ส่วนถ้าเป็นหลอดเลือดสมองจะมีอาการแสดงทางระบบประสาท หากโรคมีความรุนแรงมากจะส่งผลให้มีการตายของกล้ามเนื้อหรืออวัยวะที่หลอดเลือดนั้น ๆ ไปเลี้ยง สาเหตุและพยาธิสภาพของการเกิด atherosclerosis เกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการตามลำดับ (ภาพ 1) ดังนี้ (กรองกาญจน์ ชูทิพย์ 2560; Aluganti et. al., 2016; Cahill et. al., 2016; Paul and Hopkins 2013; Pircher 2016)



ภาพที่ 1 กลไกการเกิด atherosclerosis (กรองการณูจน์ ชูทิพย์ 2560)

หมายเหตุ: LDL = Low density lipoprotein, OxLDL = Oxidised LDL

1. หลอดเลือดได้รับบาดเจ็บจากเหตุต่าง ๆ อย่างเรื้อรัง เช่น ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) น้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ความดันโลหิตสูง (hypertension) สูบบุหรี่ ฯลฯ ส่งผลให้ endothelium เสียหายจนเกิดภาวะ endothelial dysfunction และตอบสนองโดยหลั่งสารที่ดึงดูดเม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ monocyte ให้เข้ามาเกาะและแทรกตัวเข้าไปในผนังหลอดเลือดจากนั้น monocyte จะถูกกระตุ้นให้กลายเป็น เซลล์ที่ active ชื่อว่า macrophage ซึ่งเป็นเซลล์ที่พร้อมจะจับกินสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะไขมันชนิด low density lipoprotein (LDL) ที่อยู่ในรูป oxidised LDL

2. การจับกิน oxidised LDL โดย macrophage ทำให้ macrophage เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น “foam cell” ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการสะสมของไขมัน (lipid droplet) อยู่จำนวนมากใน cytoplasm และมีผลกระตุ้นให้ macrophage หลั่งสารต่าง ๆ ที่ชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ (inflammatory cytokines) เมื่อจำนวน foam cell เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดลักษณะของชั้นไขมันที่หนาตัวขึ้นเรียกว่า “fatty streaks”

3. ต่อมาจะมีการหลั่งสารต่าง ๆ จากเซลล์ activated platelets, macrophages, endothelial cells, เซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด ส่งผลเพิ่มการแบ่งเซลล์ เพิ่มการเจริญเติบโตของเซลล์ และทำให้มีการเคลื่อนที่ของทั้ง endothelium และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบเข้าสู่ชั้นในของหลอดเลือด รวมทั้งมีการสะสมของ connective tissue อันเป็นเหตุให้โครงสร้างผนังหลอดเลือดเปลี่ยนแปลง กล่าวคือ ผนังหลอดเลือดมีความหนาแน่นเข้ามาในท่อของหลอดเลือด เรียกว่า “fibrous cap” ซึ่งต่อมาพัฒนาไปเป็น “plaque” ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นตามลำดับจนทำให้หลอดเลือดอุดตัน

4. เมื่อ plaque หนาตัวมากขึ้นเรื่อย ๆ จะแตกในที่สุด และทำให้มีการแข็งตัวของเลือด จึงเพิ่มการสะสมของก้อนเลือดที่แข็งตัว (thrombus), เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่าง ๆ, foam cells และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ รวมทั้งเศษซากของเซลล์ที่ตายแล้ว (apoptotic bodies) ทำให้ plaque ยิ่งมีขนาดใหญ่มากขึ้นและส่งผลให้หลอดเลือดตีบตันมากขึ้น จนปรากฏเป็นอาการแสดงทางคลินิกที่มีความรุนแรงมากขึ้น การแตกของ plaque ยังส่งผลให้เกิดลิ่มเลือด (emboli) ล่องลอยไปตามกระแสเลือดที่อาจไปอุดตันหลอดเลือดอื่น ๆ อันจะยังทำให้เกิดอันตรายมากขึ้นตามลำดับ

นอกจากจะพบการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในภาวะไขมันในเลือดสูงและ/น้ำตาลในเลือดสูงแล้ว ยังมีรายงานที่กล่าวถึงการเปลี่ยนแปลงของหัวใจ โดยพบว่าการเพิ่มของ low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) และการลดลงของ high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ในเลือด ส่งผลทำให้เกิด atherosclerosis ของ coronary artery ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งของการเกิด coronary heart disease และพบว่าภาวะ dyslipidemia โดยมีการเพิ่มขึ้นของ total triglyceride (TG), LDL, and very low density lipoprotein (VLDL) จากผลของอาหารไขมันสูง (high fat diet) มีผลต่อ morphological changes ของ cardiovascular system ได้แก่ left ventricular hypertrophy (LVH) และหัวใจมีการสูญเสียหน้าที่ ตามมาด้วยภาวะหัวใจล้มเหลวในที่สุด (Ballestri S. et al., 2014; Schaefer E. et al., 2002) นอกจากนี้ภาวะไขมันในเลือดสูง มักพบร่วมกับการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงและมักมีปริมาณไขมันสะสมเกินในร่างกายโดยเฉพาะบริเวณลำตัว หรือเรียกว่า “อ้วนลงพุง” การสะสมไขมันมากเกินไปในเซลล์ตับ (steatosis) หรือ non-alcoholic fatty liver disease (Xu X. et al., 2015) โดยสาเหตุส่วนใหญ่มักมาจากการบริโภคอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูง ภาวะผิดปกติเหล่านี้มักพบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมักต้องได้รับยาเพื่อการรักษาตลอดชีวิต จึงส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และเป็นภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาลและการดูแลผู้ป่วย

ในการรักษา atherosclerosis ส่วนมากนิยมใช้ยาเพื่อลดไขมันในเลือดเพื่อใช้ป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดแดงแข็ง แต่ถ้าผู้ป่วยมีอาการของ atherosclerosis ที่รุนแรงจนนำไปสู่ภาวะหัวใจขาดเลือดแล้ว การรักษาที่พอจะช่วยได้คือการถ่างขยายหลอดเลือดโดยการใส่ขดลวด (stent) หรือการผ่าตัดทางเบี่ยงต่อหลอดเลือดให้ใหม่ (bypass surgery) ร่วมกับการให้ยาที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ได้แก่ ยากลุ่ม nitrates การให้ยาที่มีฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ aspirin และการให้ยาที่ลดการทำงานของหัวใจ ได้แก่ beta-blocker, calcium channel blocker, angiotensin converting enzyme inhibitor และยาลดไขมัน เป็นต้น จะเห็นว่าการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น เป็นการรักษาที่ปลายเหตุและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก ดังนั้นถ้าหากมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรค CVDs ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

หนึ่งในผลไม้ไทยที่น่าสนใจคือ ลูกหม่อน หรือ mulberry fruit มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Morus alba* Linn. เป็นพืชในวงศ์ Moraceae (สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) ผลสุกของหม่อนมีสีม่วงแดงและอุดมไปด้วยสารกลุ่ม polyphenols หลายชนิด (Bhatt et. al., 2017; Huang et. al., 2017; Wang et. al., 2013) โดยเฉพาะ anthocyanins สารสกัดลูกหม่อนและ anthocyanin มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย เช่น ฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน (Huang et. al., 2017; Jiang et. al., 2013; Wang et. al., 2013; Yang et. al., 2010) ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด (Yang et. al., 2010) ฤทธิ์ต้านเบาหวาน (Wang et. al., 2013) ฤทธิ์ต้านอักเสบ (Lim et. al., 2013; Liu et. al., 2012) รวมทั้งฤทธิ์ในการป้องกันการเกิด

atherosclerosis (Jiang et al., 2017) และฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะขาดเลือด (Kang et al., 2006; Kang et al., 2006)

การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของลูกหม่อนที่ผ่านมามีทั้งในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการศึกษาโดยใช้สารสกัด แต่ยังมีการศึกษาประสิทธิภาพของลูกหม่อนที่ไม่ผ่านการบวนการแปรรูป การศึกษานี้จึงออกแบบการทดลองให้สัตว์ทดลองกินอาหารสูตรผสมที่มีทั้งไขมันสูงเพื่อชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง โดยให้กินต่อเนื่องนานถึง 3 เดือน เพื่อกระตุ้นให้มีไขมันในเลือดสูง และให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด คือ เกิด atherosclerosis ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือด ลูกหม่อนอบแห้งที่ใช้ในการศึกษาเป็นผงของลูกหม่อนที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณ anthocyanin (total monomeric anthocyanin content) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, FRAP assay) การทดสอบฤทธิ์ต้านสารสื่ออักเสบและฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในเบื้องต้นมาแล้วโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งพบว่าสารสกัดลูกหม่อนมีระดับของ anthocyanin ที่สูง และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ผู้วิจัยจึงวิจัยต่อยอดโดยนำลูกหม่อนอบแห้งที่มี anthocyanin สูง เตรียมโดยฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) มีการเตรียมโดยใช้วิธี freeze-dry ควบคุมคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณ anthocyanin โดย วิธี high performance liquid chromatography (HPLC) มาทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะ atherosclerosis จากการได้รับอาหารที่มีไขมัน เพื่อดูผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อการกินอาหาร น้ำหนักตัว และไขมันในเลือด ของสัตว์ทดลอง รวมทั้งฤทธิ์ในการคลายตัวของหลอดเลือด โดยการศึกษาที่มุ่งที่จะเห็นผลลดระดับ cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein cholesterol (LDL) การกินอาหาร และ น้ำหนักตัว แต่เพิ่ม high density lipoprotein cholesterol (HDL) ในเลือดของกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับลูกหม่อนอบแห้ง และเนื่องจากภาวะ dyslipidemia และ hyperglycemia ก่อให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือด อันทำให้เกิดภาวะ atherosclerosis ดังนั้นถ้าลูกหม่อนอบแห้งมีฤทธิ์ป้องกันภาวะ dyslipidemia และป้องกันภาวะ hyperglycemia ได้ จะทำให้หลอดเลือดเสียหายน้อยลง การทำงานของหลอดเลือดได้แก่ การคลายตัวของหลอดเลือด ย่อมดีขึ้นด้วยตามลำดับ การทำงานของหลอดเลือดที่ดีขึ้นจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ช่วยป้องกันการโรค CVDs ซึ่งข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคในกลุ่ม CVDs ต่อไป

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1. การเตรียมลูกหม่อนอบแห้ง

ลูกหม่อนอบแห้งเตรียมโดยฝายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยมีลักษณะเป็นผงแห้ง ควบคุมคุณภาพโดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร total anthocyanin, total phenolic ด้วยวิธี HPLC และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH assay

3.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนู mice สายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 8 สัปดาห์ เพศเมีย จากบริษัทโนมูระ สัตว์ทดลองจะถูกพักเป็นเวลา 7 วัน ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณแสงและความชื้นสัมพัทธ์ ตามที่ทางสถานสัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรกำหนด

สัตว์ทดลองจะถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติจากการกินอาหารไขมันสูง (ตาราง 2) ซึ่งเป็น การเลียนแบบพฤติกรรมกรกินของมนุษย์ปัจจุบันที่ทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพตามมา

3.2.1 อาหารสำหรับสัตว์ทดลอง

อาหารที่ให้สัตว์ทดลองแบ่งออกเป็น 2 ประเภท

1. อาหารสูตรปกติ (ภาพที่ 2) (T2918CSD, Teklad Irradiated Global 18% Protein Rodent Diet; Harlan Teklad Laboratory, Madison, Wisconsin, USA) ให้พลังงาน 3.1 Kcal/g ประกอบด้วย ไขมัน 6.2% และคาร์โบไฮเดรต 44.2% และโปรตีน 18.6%
2. อาหารสูตรไขมันสูง (ภาพที่ 3) (TD02028, Teklad Artherogenic Rodent Diet; Harlan Teklad Laboratory, Madison, Wisconsin, USA) ให้พลังงาน 4.5 Kcal/g ประกอบด้วย ไขมัน 21.2% คาร์โบไฮเดรต 46.9% และโปรตีน 17.3%

Harlan Laboratories

2018

Teklad Global 18% Protein Rodent Diet

Product Description- 2018 is a fixed formula, non-autoclavable diet manufactured with high quality ingredients and designed to support gestation, lactation, and growth of rodents. 2018 does not contain alfalfa, thus lowering the occurrence of natural phytoestrogens. Typical isoflavone concentrations (daidzein + genistein aglycone equivalents) range from 150 to 250 mg/kg. Exclusion of alfalfa reduces chlorophyll, improving optical imaging clarity. Absence of animal protein and fish meal minimizes the presence of nitrosamines. **Also available certified (2018C) and irradiated (2918). For autoclavable diet, refer to 2018S (Sterilizable) or 2018SX (Extruded & Sterilizable).**

Ingredients (in descending order of inclusion)- Ground wheat, ground corn, wheat middlings, dehulled soybean meal, corn gluten meal, soybean oil, calcium carbonate, dicalcium phosphate, brewers dried yeast, iodized salt, L-lysine, DL-methionine, choline chloride, kaolin, magnesium oxide, vitamin E acetate, monadione sodium bisulfite complex (source of vitamin K activity), manganese oxide, ferrous sulfate, zinc oxide, niacin, calcium pantothenate, copper sulfate, pyridoxine hydrochloride, riboflavin, thiamin mononitrate, vitamin A acetate, calcium iodate, vitamin B₁₂ supplement, folic acid, biotin, vitamin D₃ supplement, cobalt carbonate.

Macronutrients		
Crude Protein	%	18.6
Fat (ether extract) ^a	%	6.2
Carbohydrate (available) ^b	%	44.2
Crude Fiber	%	3.5
Neutral Detergent Fiber ^c	%	14.7
Ash	%	5.3
Energy Density ^d	kcal/g (kJ/g)	3.1 (13.0)
Calories from Protein	%	24
Calories from Fat	%	18
Calories from Carbohydrate	%	58
Minerals		
Calcium	%	1.0
Phosphorus	%	0.7
Non-Phytate Phosphorus	%	0.4
Sodium	%	0.2
Potassium	%	0.6
Chloride	%	0.4
Magnesium	%	0.2
Zinc	mg/kg	70
Manganese	mg/kg	100
Copper	mg/kg	15
Iodine	mg/kg	6
Iron	mg/kg	200
Selenium	mg/kg	0.23
Amino Acids		
Aspartic Acid	%	1.4
Glutamic Acid	%	3.4
Alanine	%	1.1
Glycine	%	0.8
Threonine	%	0.7
Proline	%	1.6
Serine	%	1.1
Leucine	%	1.8
Isoleucine	%	0.8
Valine	%	0.9
Phenylalanine	%	1.0
Tyrosine	%	0.6
Methionine	%	0.4
Cystine	%	0.3
Lysine	%	0.9
Histidine	%	0.4
Arginine	%	1.0
Tryptophan	%	0.2

Standard Product Form: Pellet

Vitamins		
Vitamin A ^{e, f}	IU/g	15.0
Vitamin D ₃ ^{e, g}	IU/g	1.5
Vitamin E	IU/kg	110
Vitamin K ₃ (menadione)	mg/kg	50
Vitamin B ₁ (thiamin)	mg/kg	17
Vitamin B ₂ (riboflavin)	mg/kg	15
Niacin (nicotinic acid)	mg/kg	70
Vitamin B ₆ (pyridoxine)	mg/kg	18
Pantothenic Acid	mg/kg	33
Vitamin B ₁₂ (cyanocobalamin)	mg/kg	0.08
Biotin	mg/kg	0.40
Folate	mg/kg	4
Choline	mg/kg	1200
Fatty Acids		
C16:0 Palmitic	%	0.7
C18:0 Stearic	%	0.2
C18:1n-9 Oleic	%	1.2
C18:2n-6 Linoleic	%	3.1
C18:3n-3 Linolenic	%	0.3
Total Saturated	%	0.9
Total Monounsaturated	%	1.3
Total Polyunsaturated	%	3.4
Other		
Cholesterol	mg/kg	--

^a Ether extract is used to measure fat in pelleted diets, while an acid hydrolysis method is required to recover fat in extruded diets. Compared to ether extract, the fat value for acid hydrolysis will be approximately 1% point higher.

^b Carbohydrate (available) is calculated by subtracting neutral detergent fiber from total carbohydrates.

^c Neutral detergent fiber is an estimate of insoluble fiber, including cellulose, hemicellulose, and lignin. Crude fiber methodology underestimates total fiber.

^d Energy density is a calculated estimate of metabolizable energy based on the Atwater factors, assigning 4 kcal/g to protein, 9 kcal/g to fat, and 4 kcal/g to available carbohydrate.

^e Indicates added amount but does not account for contribution from other ingredients.

^f 1 IU vitamin A = 0.3 µg retinol

^g 1 IU vitamin D = 25 ng cholecalciferol

For nutrients not listed, insufficient data is available to quantify.

Nutrient data represent the best information available, calculated from published values and direct analytical testing of raw materials and finished product. Nutrient values may vary due to the natural variations in the ingredients, analysis, and effects of processing.

Teklad Diets are designed and manufactured for research purposes only.

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and the Harlan name of Harlan Laboratories, Inc. © 2018 Harlan Laboratories, Inc.

harlan™
Helping you do research better



Teklad Diets, Madison WI | www.harlan.com | teklaudio@harlan.com | (800) 483-5523

RMS-0909-US-EN-02-DS-2018

ภาพที่ 2 อาหารสูตรธรรมดา (Normal diet)

Teklad Custom Research Diet Data Sheet

TD.02028 **Atherogenic Rodent Diet****Formula**

	g/Kg
Casein	195.0
DL-Methionine	3.0
Sucrose	325.46
Corn Starch	150.0
Anhydrous Milkfat	210.0
Cholesterol	12.5
Cholic Acid	5.0
Cellulose	50.0
Mineral Mix, AIN-76 (170915)	35.0
Calcium Carbonate	4.0
Vitamin Mix, Teklad (40060)	10.0
Ethoxyquin, antioxidant	0.04

Footnote

This is a modification of diet TD.88137 to increase added cholesterol to 1.25% (total in the diet is 1.3%) and add 0.5% cholic acid. TD.96121 is a version without cholic acid. For questions about this diet or modifications askanutritionist@harlan.com

Selected Nutrient Information¹

	% by weight	% kcal from
Protein	17.3	15.4
Carbohydrate	46.9	41.9
Fat	21.2	42.6
Kcal/g	4.5	

¹ Values are calculated from ingredient analysis or manufacturer data

Teklad Diets are designed & manufactured for research purposes only.

Speak With A Nutritionist

- (800) 483-5523 *option 4*
- askanutritionist@harlan.com

Harlan Laboratories, Inc.
PO Box 44220
Madison, WI 53744-4220



harlan[®]

www.harlan.com

Harlan, Harlan Laboratories, Helping you do research better, and the Harlan logo are trademarks and trade names of Harlan Laboratories, Inc. © 2008 Harlan Laboratories, Inc.

Key Features

- Purified Diet
- Modification of TD.88137
- Cholesterol
- Cholic Acid

Key Planning Information

- Products are made fresh to order
- Store product at 4°C or lower
- Use within 6 months (applicable to most diets)
- Box labeled with product name, manufacturing date, and lot number
- Replace diet at minimum once per week
More frequent replacement may be advised
- Lead time:
 - 2 weeks non-irradiated
 - 4 weeks irradiated

Product Specific Information

- 1/2 Pellet or Powder (crumbly)
- Minimum order 3 Kg
- Irradiation available upon request

Options (Fees Will Apply)

- Rush order (pending availability)
- Irradiation (see Product Specific Information)
- Vacuum packaging (1 and 2 Kg)

Contact Us

- Obtain Pricing · Check Order Status ·
- tekladinfo@harlan.com
- (800) 483-5523 *option 1*

International Inquiry (Outside USA or Canada)

- askanutritionist@harlan.com

Place Your Order (USA & Canada)

- Please Choose One ·
- <https://webapps.harlan.com/teklad-orders/>
- tekladinfo@harlan.com
- (800) 483-5523 *option 1*
- (608) 277-2066 *facsimile*

Helping you do research better

ภาพที่ 3 อาหารสูตรไขมันสูง (High fat diet)

ตาราง 1 สรุปลองค์ประกอบของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

Ingredients (% by weight)	Normal diet	High fat diet
Protein	18.6	17.3
Carbohydrate	44.2	48.5
Fat	6.2	21.2
Cholesterol	-	0.2
kcal/g	3.1	4.5

3.3 การชักนำให้หนูเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 8 ตัว (รวมทั้งสิ้น 48 ตัว) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Control (C) group: กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารสูตรปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 Atherosclerosis (HF) group: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 3 HF+Mul10 : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและได้รับการป้อนลูทหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW

กลุ่มที่ 4 HF+Mul100 : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและได้รับการป้อนลูทหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW

กลุ่มที่ 5 HF+Mul300 : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและได้รับการป้อนลูทหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW

กลุ่มที่ 6 HF+AVT5 : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและได้รับยา atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW

เมื่อพักสัตว์ทดลองที่ได้รับมาเป็นเวลา 7 วันแล้ว สัตว์ทดลองจึงได้รับอาหารและสารทดสอบตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยหนูกลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารสูตรปกติ ส่วนหนูกลุ่มที่ 2-5 ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งด้วยการให้กินอาหารไขมันสูง (อาหารสังเคราะห์สูตรพิเศษตามตาราง 1) และให้กินอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (ad libitum) ซึ่งเป็นการเลียนแบบพฤติกรรมการกินของมนุษย์ปัจจุบันที่ทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพตามมา โดยกลุ่มที่หนูกลุ่มที่ 3-5 ได้รับการป้อนลูทหม่อนอบแห้งความเข้มข้นต่าง ๆ และกลุ่มที่ 6 ได้รับยา atorvastatin ร่วมด้วย

ตลอดช่วงเวลากการทดสอบได้ชั่งน้ำหนักหนู และอาหารที่หนูกินทุกวันเพื่อติดตามการกินอาหารของหนู ตลอดจนสังเกตอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เป็นเกณฑ์ต้องให้ยุติการทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลา จึงทำการการุณยฆาตหนูแล้วเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อวัดระดับไขมันในเลือด ได้แก่ cholesterol, triglyceride, LDL, HDL และคำนวณ atherogenic index (AI) และเก็บหลอดเลือด aorta เพื่อศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด เก็บไขมันในช่องท้อง ตับ และหัวใจเพื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (ในโครงการย่อยอื่นๆ) ต่อไป

3.4 วิธีการวัดระดับไขมันในเลือด

ทำการตรวจวัดระดับไขมันในเลือดเมื่อสัตว์ทดลองได้รับสารทดสอบครบ 3 เดือน โดยการอดอาหารสัตว์ทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนสลบสัตว์ จากนั้นเก็บเลือดจากหัวใจใส่ในหลอดทดลองที่มี heparin

เคลือบ แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บชั้นพลาสมา (plasma) ด้านบนที่มีลักษณะใสใสในหลอดทดลองใหม่และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจค่าไขมันในเลือดต่าง ๆ ดังนี้

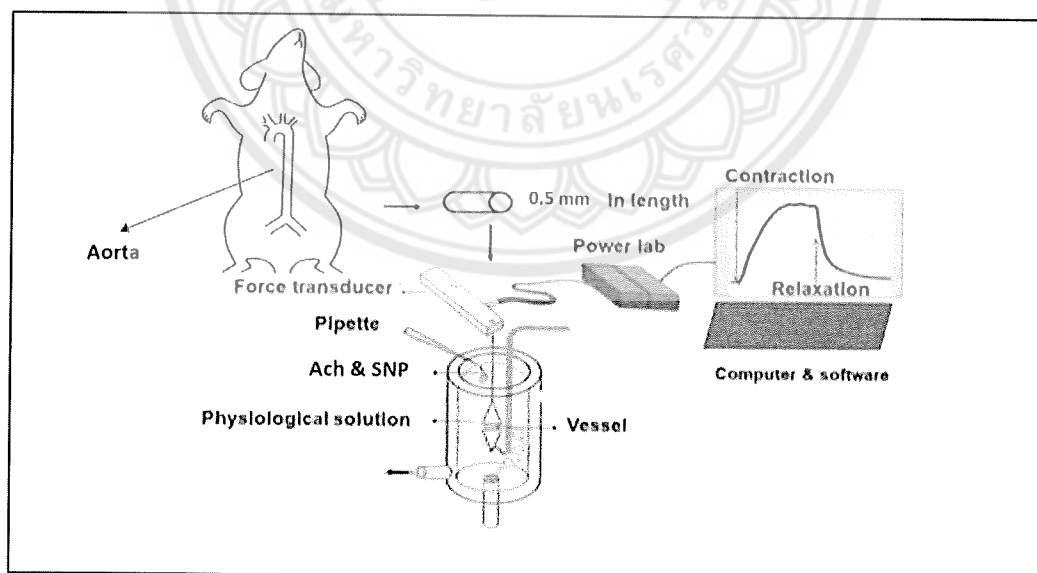
1) Cholesterol, triglyceride และ HDL วัดโดยใช้ Commercial kits, (HUMAN Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica) mbH, Wiesbaden, Germany

2) LDL คำนวณโดยใช้สูตร $LDL = \text{total cholesterol} - HDL - (\text{triglyceride}/5)$

3) Atherogenic index คำนวณโดยใช้สูตร $\text{Atherogenic index (AI)} = \text{Log (TG/HDL)}$

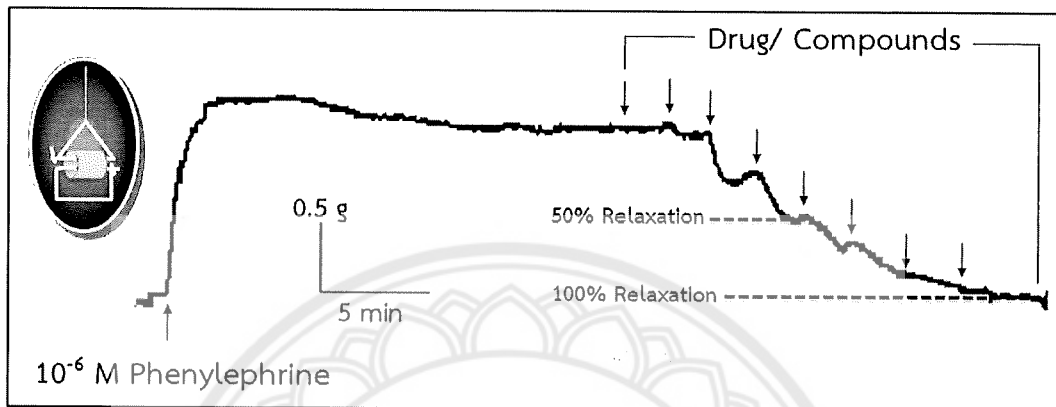
3.5 การตรวจวัดการคลายตัวของหลอดเลือดแดงเอออร์ตา

หลอดเลือด aorta ที่ถูกแยกออกมาจะถูกแช่ทันทีในสารละลาย KREBS เย็นที่มีส่วนประกอบ คือ NaCl 122 mM; KCl 5 mM; N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N-[2-ethane-sulfonic acid] (HEPES) 10 mM; KH_2PO_4 0.5 mM; NaH_2PO_4 0.5 mM; MgCl_2 1 mM; glucose 11 mM and CaCl_2 1.8 mM และปรับ pH = 7.4 ด้วย NaOH แล้วทำการเอาไขมันและเนื้อเยื่อรอบ ๆ หลอดเลือดออก และตัดแบ่งเป็นท่อนยาว 3 mm แล้วนำหลอดเลือดไปแขวนใน organ bath ที่มีสารละลาย KREBS ดังภาพที่ 4 ตลอดการทดลองจะควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 37 °C หลอดเลือดจะถูกแขวนด้วยแรงดึงที่ระดับ optimal tension (1 g) และทิ้งไว้ให้เข้าสู่สมดุลอย่างน้อยครึ่งชั่วโมงก่อนทำการทดลอง ทำการเปลี่ยนสารละลาย KREBS ทุกๆ 10-15 นาที โดยการคลายตัวของหลอดเลือดจะถูกวัดในรูปการเปลี่ยนแปลงของแรงดึงตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการหยดสาร acetylcholine ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน (10^{-9} - 10^{-4} M) ลงไปใน organ bath ที่มีหลอดเลือดแดงซึ่งถูกเหนี่ยวนำให้หดตัวก่อนด้วยสาร phenylephrine (PE) จากนั้นความดึงตัวของหลอดเลือดจะถูกแปลงสัญญาณโดยตัวแปลงสัญญาณความแรง (Force transducer) และบันทึกเป็นกราฟ โดยชุดอุปกรณ์แมคแลบคอมพิวเตอร์ (MacLab, ADInstrument, Sydney, Australia)



ภาพที่ 4 อุปกรณ์ organ bath สำหรับแขวนหลอดเลือด

หลอดเลือดที่ใช้ในการทดสอบมีทั้งชนิดที่มี endothelium (endothelium intact) และชนิดที่ไม่มี endothelium (endothelium denuded) โดยหลอดเลือดที่มี endothelium จะมีการคลายตัวมากกว่า 70% ต่อ Ach แต่หลอดเลือดที่ไม่มี endothelium จะมีการคลายตัวน้อยกว่า 70% ต่อ Ach จากนั้นจึงศึกษาฤทธิ์การคลายตัวของสารสกัดที่ความเข้มข้น 1-1,000 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 รูปแบบการศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด

บทที่ 4 ผลการทดลอง

4.1 ปริมาณ anthocyanin ลูกหม่อนอบแห้ง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

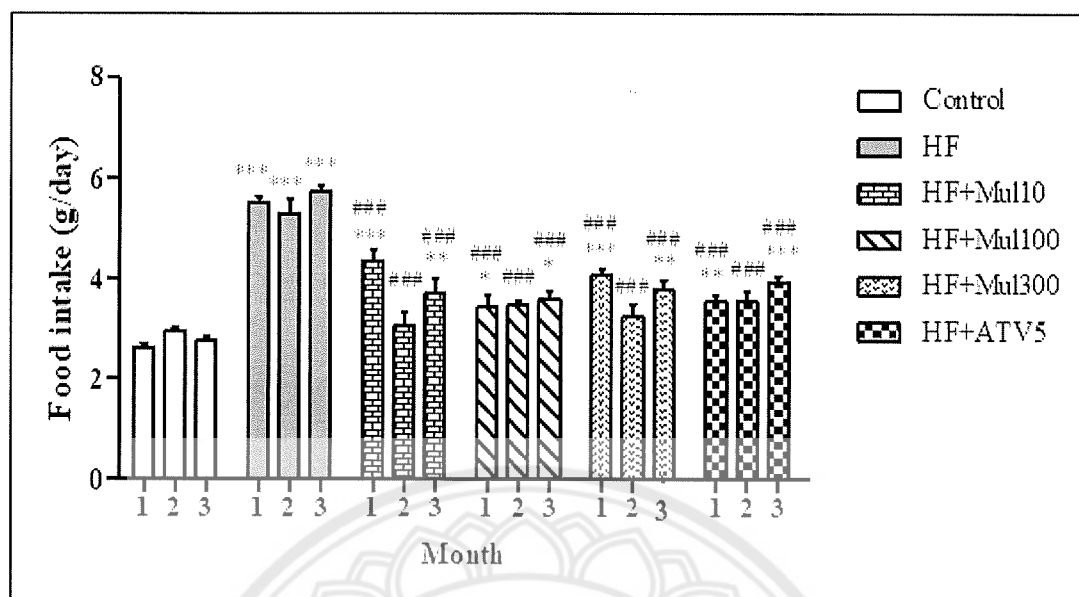
ปริมาณสารสำคัญกลุ่ม anthocyanin และกลุ่ม phenolic ตลอดจนประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของลูกหม่อนอบแห้ง แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสาร anthocyanin และ phenolic ในลูกหม่อนอบแห้ง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของลูกหม่อนอบแห้ง

ตัวอย่าง	Anthocyanin (mg/100 g)	Phenolic (mg/100 g)	DPPH (IC ₅₀) (mg/ml)
ลูกหม่อนอบแห้ง	1458.58	2078.59	0.25

4.2 ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อการกินอาหาร (food intake)

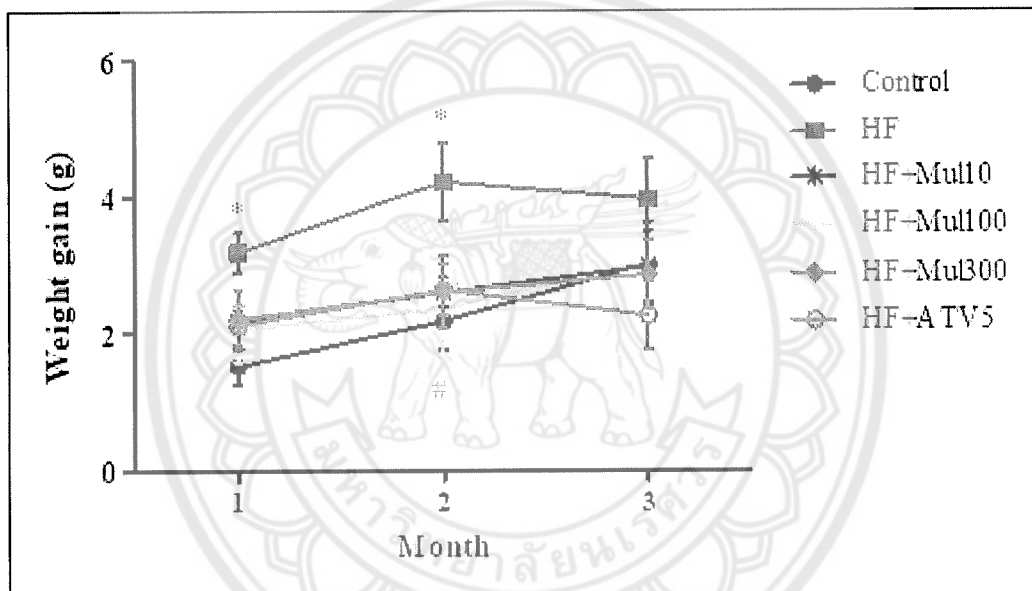
การศึกษาผลต่อการกินอาหารของหนูแต่ละกลุ่ม ในแต่ละเดือนพบว่า หนูกลุ่ม Control มีการกินอาหารในระดับที่คงที่ตลอดทั้งสามเดือน ในขณะที่หนูกลุ่ม HF ซึ่งได้รับอาหารไขมันสูง มีการกินอาหารที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในทุก ๆ เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10, 100 และ 300 mg/ kg BW มีการกินอาหารที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในทุก ๆ เดือน เมื่อเทียบกับกลุ่ม HF ในทางเดียวกันสำหรับหนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับยา atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW มีการกินอาหารที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม HF อย่างไรก็ตามกลุ่มที่ได้รับลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/ kg BW มีการกินอาหารที่ลดลงใกล้เคียงกับ Control มากที่สุด ในทุกๆเดือน (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 การกินอาหาร (Food intake) ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม (n=6) เป็นระยะเวลา 3 เดือน (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul10 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เทียบกับ control. ### $P < 0.001$ เทียบกับ HF

4.3 ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Weight gain)

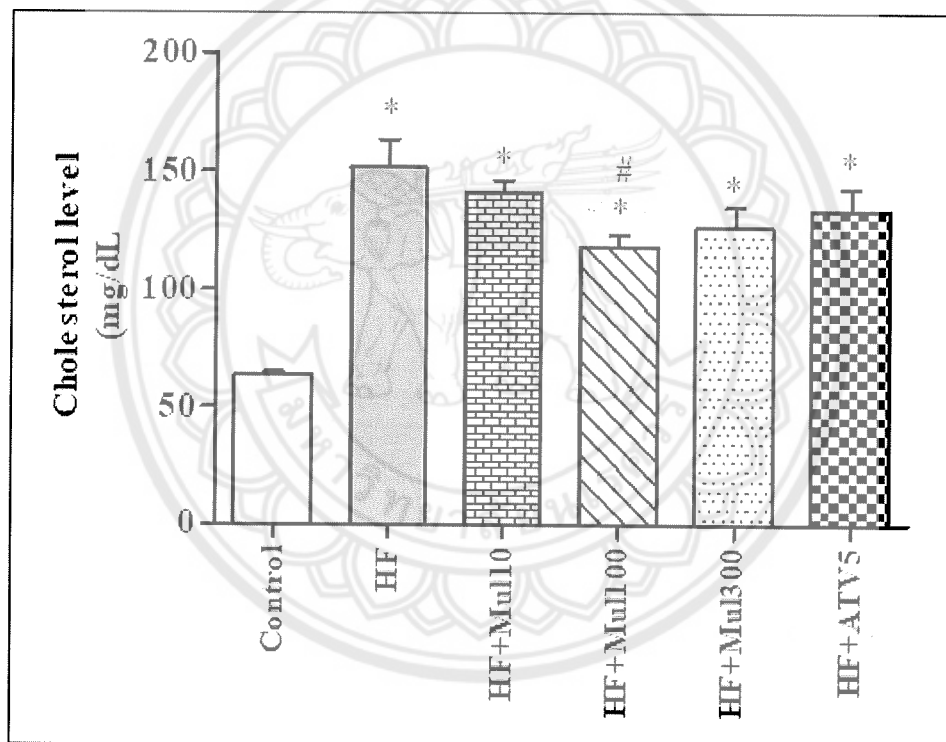
จากการศึกษา น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain) (ภาพที่ 7) พบว่าหนูทุกกลุ่มมีแนวโน้มของค่า weight gain ที่เพิ่มขึ้นตลอดทั้งสามเดือน ยกเว้นกลุ่ม HF และ HF+ATV5 ที่มีแนวโน้มค่า weight gain ลดลงในเดือนที่ 3 โดยเดือนที่ 1 ค่า weight gain ของกลุ่ม HF มีค่า มีค่าสูงที่สุด (3.19 ± 0.30 g) ซึ่งสูงกว่า Control (1.52 ± 0.26 g) อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนกลุ่ม HF+Mul10, HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีค่า weight gain ที่มีแนวโน้มลดลงกว่า HF สำหรับในเดือนที่ 2 ค่า weight gain ของกลุ่ม HF (4.22 ± 0.57 g) มีค่ามากกว่ากลุ่ม Control (2.18 ± 0.41 g) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับค่า weight gain ของหนูกลุ่ม HF+Mul10, HF+Mul100 และ HF+Mul300 มีแนวโน้มลดลงจาก HF ในขณะที่กลุ่ม HF+ATV5 มีค่า weight gain คือ 2.64 ± 0.38 g ซึ่งน้อยกว่า HF อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับเดือนที่ 3 ค่า weight gain ของหนูกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน แต่กลุ่ม HF ยังคงมีค่า weight gain สูงที่สุด ในขณะที่กลุ่ม HF+ATV5 มีค่า weight gain น้อยที่สุด และมีแนวโน้มลดลงจากเดือนที่ 2



ภาพที่ 7 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Weight gain) ของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม (n=6) เป็นระยะเวลา 3 เดือน (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่ไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. * $P < 0.05$ เทียบกับ Control. # $P < 0.05$ เทียบกับ HF.

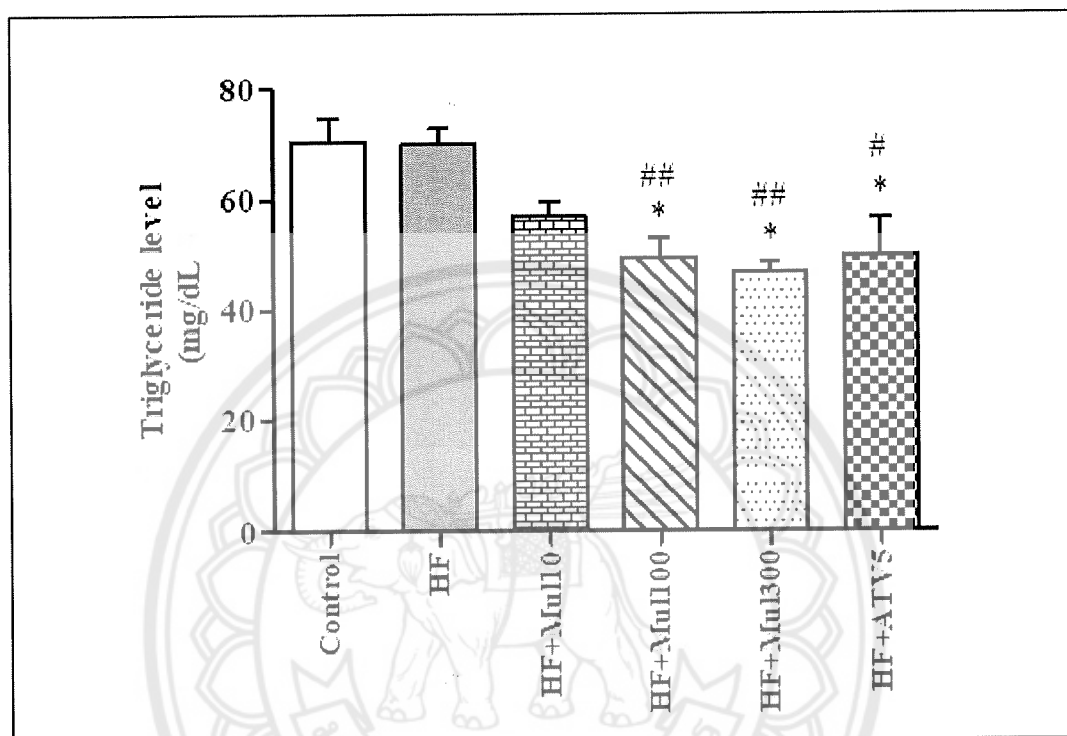
4.4 ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อระดับไขมันในเลือด

จากการศึกษาระดับไขมันในเลือด ซึ่งประกอบไปด้วย cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein (LDL) และ high density lipoprotein (HDL) หลังจากหนูได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าหนูทุกกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารไขมันสูงมีระดับของ cholesterol สูงกว่ากลุ่ม Control (63.83 ± 1.22 mg/dL) อย่างมีนัยสำคัญ โดยกลุ่ม HF มีระดับ cholesterol ในเลือดถึง 151.69 ± 10.17 mg/dL ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับลูกหม่อนอบแห้งหรือยา คือ HF+Mul10, HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีแนวโน้มที่ลดลงของระดับ cholesterol ในเลือด คือ 141.06 ± 4.67 , 118.48 ± 3.96 , 126.37 ± 7.41 และ 133.67 ± 7.83 mg/dL ตามลำดับ โดยกลุ่ม HF+Mul100 มีระดับ cholesterol ในเลือด ที่น้อยกว่ากลุ่ม HF อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 8)



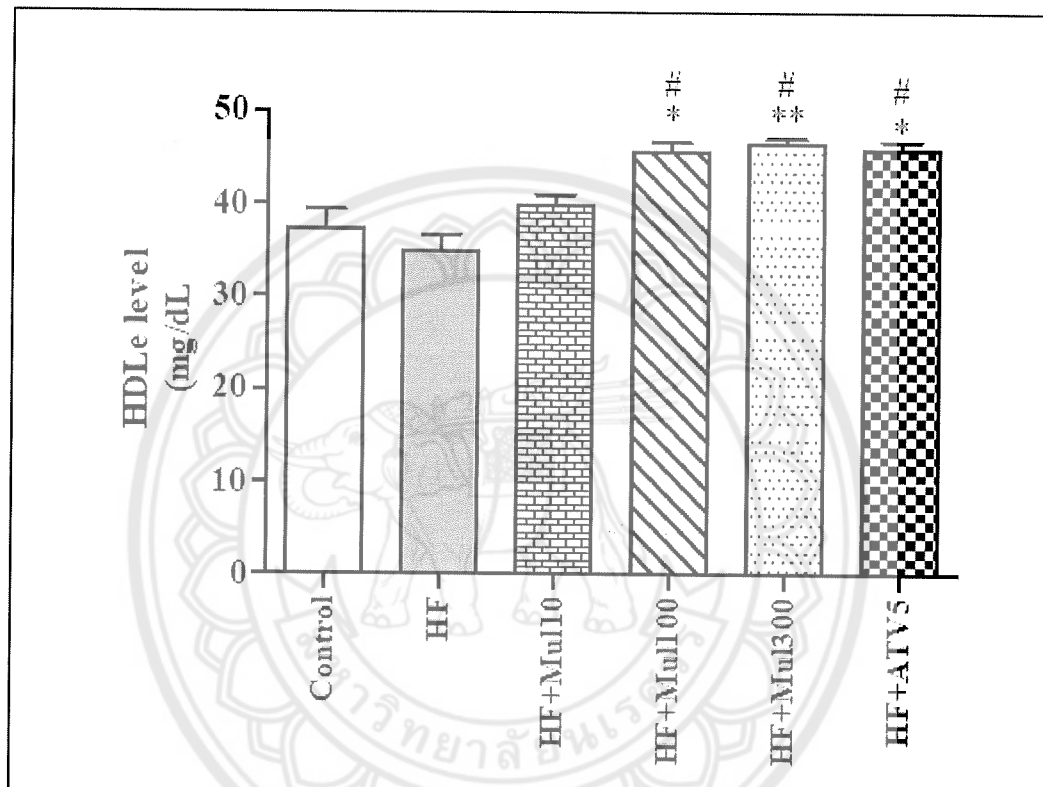
ภาพที่ 8 ระดับ cholesterol ในเลือดของสัตว์ทดลอง ในเดือนที่ 3 (n=6) (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่ไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul10 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. * $P < 0.001$ เทียบกับ Control. # $P < 0.05$ เทียบกับ HF

ระดับ triglyceride ในเลือดแสดงในภาพที่ 9 โดยพบว่าหนูทุกกลุ่ม คือ Control และ HF มีค่า triglyceride ที่ไม่แตกต่างกัน คือ 70.54 ± 4.07 และ 70.20 ± 2.71 mg/dL ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม HF+Mul10 มีแนวโน้มที่ลดลงของค่า triglyceride ในเลือด (55.07 ± 1.35 mg/dL) เมื่อเทียบกับ HF อย่างไรก็ตามกลุ่ม HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีค่า triglyceride ในเลือด คือ 48.18 ± 3.32 , 47.76 ± 2.30 และ 50.25 ± 7.52 mg/dL ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control และ HF



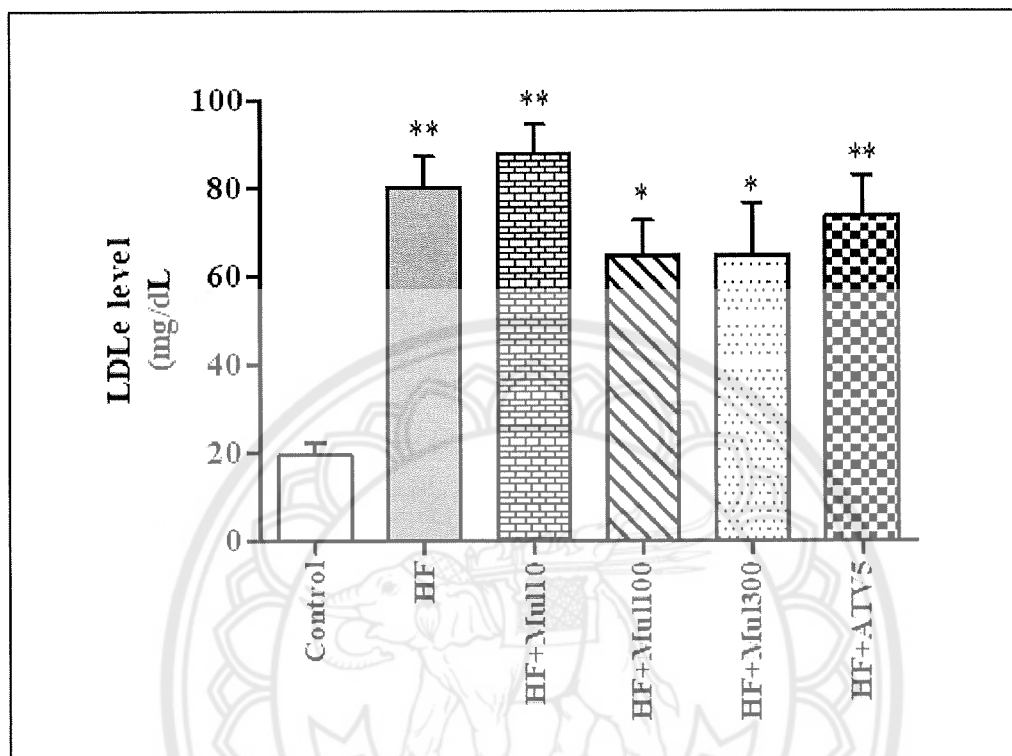
ภาพที่ 9 ระดับ triglyceride ในเลือดของสัตว์ทดลอง ในเลือดของสัตว์ทดลอง ในเดือนที่ 3 (n=6) (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่มีไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul10 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW * $P < 0.01$ เทียบกับ Control. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ เทียบกับ HF

ผลการศึกษาระดับ HDL ในเลือดของหนูที่ได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 10) พบว่าหนูกลุ่ม Control, HF และ HF+Mul10 มีค่า HDL ในเลือดที่ไม่แตกต่างกัน คือ 37.25 ± 2.06 , 34.86 ± 1.76 และ 39.87 ± 1.11 mg/dL ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่ม HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีค่า HDL ในเลือดคือ 45.51 ± 1.13 , 46.45 ± 0.60 และ 45.82 ± 0.96 mg/dL ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่ม Control และ HF อย่างมีนัยสำคัญ



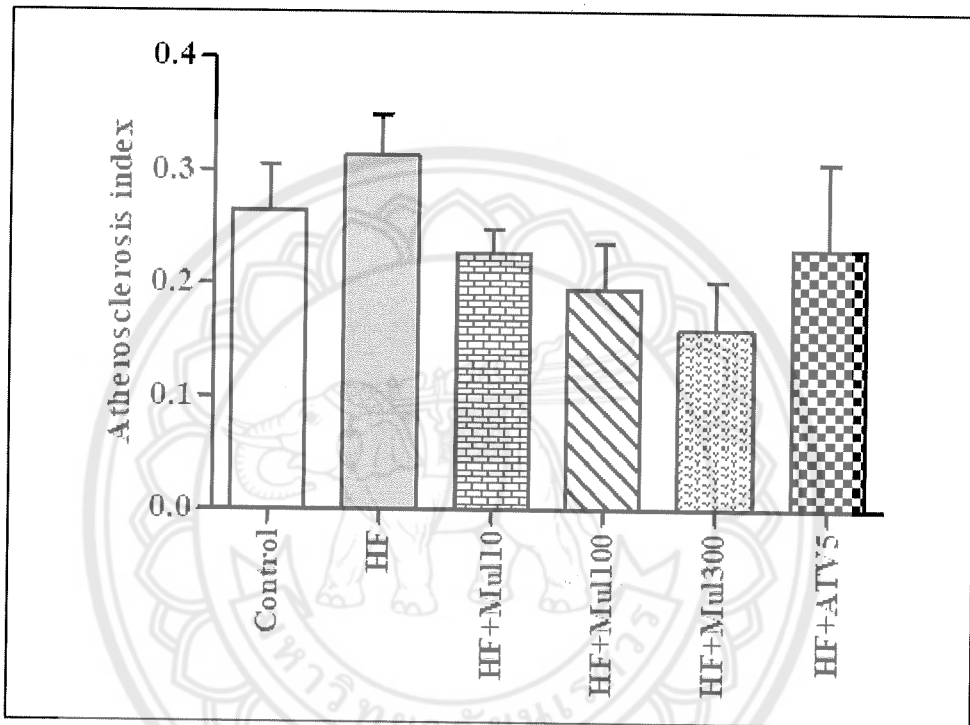
ภาพที่ 10 ระดับ high density lipoprotein (HDL) ในเลือดของสัตว์ทดลอง ในเดือนที่ 3 (n=6) (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่มีไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. * $P < 0.01$ เทียบกับ Control. # $P < 0.001$ เทียบกับ HF.

ผลการศึกษาระดับ LDL ในเลือดของหนูที่ได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 3 เดือน (ภาพที่ 11) พบว่ากลุ่ม Control มีค่า LDL ในเลือดเท่ากับ 19.44 ± 2.84 mg/dL ในขณะที่หนูกลุ่ม HF, HF+Mul10, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีค่า LDL ในเลือดสูงถึง 80.25 ± 6.97 , 87.76 ± 6.78 , 64.54 ± 8.10 , 64.55 ± 12.03 และ 73.90 ± 9.16 mg/dL ตามลำดับ ซึ่งมากกว่ากลุ่ม Control อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ค่า LDL สูงที่สุดกลุ่ม HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม HF



ภาพที่ 11 ระดับ low density lipoprotein (LDL) ในเลือดของสัตว์ทดลอง ในเดือนที่ 3 (n=5) (mean \pm S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่มีไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ เทียบกับ Control.

จากการคำนวณค่า atherogenic index (ภาพที่ 12) ซึ่งเป็นค่าดัชนีชี้วัดอัตราเสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยใช้สูตรดังนี้ $Atherogenic\ index\ (AI) = LDL/HDL$ พบว่าค่า AI ของหนูทุกกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ แต่ค่า AI ของหนูกลุ่ม HF (0.31 ± 0.04 mg/dL) มีค่าสูงที่สุด ในขณะที่กลุ่ม HF+Mul10, HF+Mul100, HF+Mul300 และ HF+ATV5 คือ 0.23 ± 0.02 , 0.20 ± 0.04 , 0.16 ± 0.04 และ 0.23 ± 0.08 ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับ HF

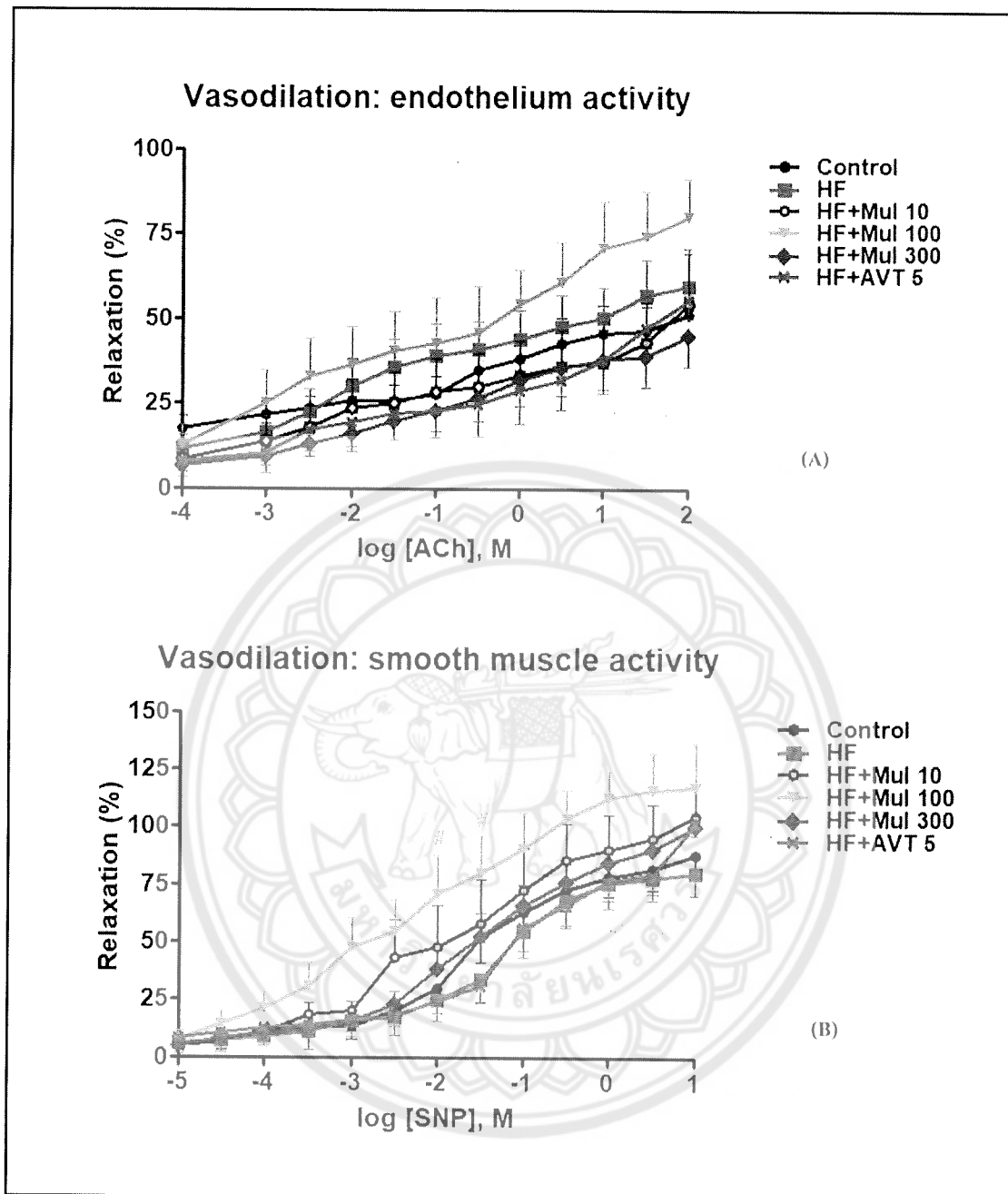


ภาพที่ 12 ค่า atherogenic index ของสัตว์ทดลอง ในเดือนที่ 3 (n=6) (mean ± S.E.M.) Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่มีไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul10 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW

4.5 ผลของลูทหม่อนอบแห้งต่อการคลายตัวของหลอดเลือด

จากผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่ม HF+Mul100 มีแนวโน้มในการคลายตัวของหลอดเลือดดีกว่าหนูกลุ่ม Control และกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งกลุ่มอื่น ๆ ดังแสดงในภาพที่ 13 จากกราฟจะเห็นว่าหลอดเลือด aorta ของหนูในกลุ่ม HF+Mul100 มีแนวโน้มการคลายตัวของหลอดเลือดโดยตอบสนองต่อ acetylcholine (Ach) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0001, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 และ 100 μM ตามลำดับ) ดีกว่าหนูกลุ่มอื่นๆ (รูปที่ 11A) ส่วนการคลายตัวของหลอดเลือด aorta ผ่านกลไกของกล้ามเนื้อเรียบซึ่งแสดงในรูปที่ 11B พบว่าหลอดเลือด aorta ของหนูในกลุ่ม HF+Mul100 มีแนวโน้มการคลายตัวโดยตอบสนองต่อ sodium nitropusside (SNP) ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.0001, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 และ 100 μM ตามลำดับตามลำดับ) ดีกว่าหนูกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งอย่างมีนัยสำคัญโดยเฉพาะที่ความเข้มข้นของ SNP เท่ากับ 0.01 และ 0.03 μM

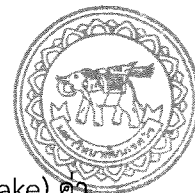




ภาพที่ 13 การคลายตัวของหลอดเลือดของสัตว์ทดลอง (n=6) (mean \pm S.E.M.) (A) หลอดเลือดที่มี endothelial cell (intact ring), (B) หลอดเลือดที่ไม่มี endothelial cell (denuded ring). Control คือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ HF คือกลุ่มที่ไขมันสูงเพียงอย่างเดียว HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW, HF+Mul100 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW, HF+Mul300 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW, HF+ATV5 คือกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงและยา atorvastatin 5 mg/kg BW. # $P < 0.05$ เทียบกับ HF

1048498

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ว กษ
4.45
ทศ
11855

สำนักหอสมุด

การศึกษานี้แสดงให้เห็นผลเชิงบวกของลูกหม่อนอบแห้งสามารถลดการกินอาหาร (food intake) คาน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (weight gain) ไขมันในเลือด cholesterol, triglyceride และ LDL และเพิ่ม HDL ในเลือด ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงได้ (HF) อีกทั้งลูกหม่อนอบแห้งยังมีผลในการขยายหลอดเลือดอีกด้วย 4 กพ. 2565

จากการทดลองหนูกลุ่ม HF มีการกินอาหาร ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น และไขมันในเลือด ซึ่งประกอบด้วย cholesterol และ LDL ที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารปกติ (Control) ซึ่งการผิดปกติเหล่านี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ผ่านมาก่อนหน้า (Lim et al., 2013; Mahmoud, 2013; Ann, Eo, & Lim, 2015; Lee et al., 2019). การให้ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10, 100 และ 300 mg/kg มีแนวโน้มในการลด weight gain ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงให้กับเข้าสู่ระดับปกติ ซึ่งผลการศึกษานี้มีความสอดคล้องกับฤทธิ์ต้านความอ้วน (anti-obesity) ของลูกหม่อนที่ได้มีการรายงานก่อนหน้านี้ (Lim et al., 2013; He et al., 2018; Li et al., 2019; Leyva-Jiménez et al., 2020). อย่างไรก็ตามผลของลูกหม่อนต่อน้ำหนักตัวยังมีความแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น บางการศึกษารายงานว่าสารสกัดจากใบหม่อนไม่มีผลต่อน้ำหนัก แต่สามารถลดภาวะอ้วนได้โดยการลดการสะสมของไขมัน ลดการสร้างไขมันที่ตับ ลด fibrosis และลดการเกิด oxidative stress ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (Ann, Eo, & Lim, 2015; Lee et al., 2019) ในขณะที่มีการศึกษาอื่นๆ รายงานผลการศึกษานี้ก็เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้ คือ พบว่าสารสกัดผลลูกหม่อน สารสกัดใบหม่อน จาก *M. alba* บางชนิด หรือสารสกัดผสม หรือผงของผลลูกหม่อนและใบหม่อน มีประสิทธิภาพในการลดน้ำหนักและยังมีผลดีอื่น ๆ ต่อสุขภาพอีกด้วย (Lim et al., 2013; Metwally, & Rashad, Mahmoud, 2019; Li et al., 2019; Leyva-Jiménez et al., 2020). ความแตกต่างของฤทธิ์ทางชีวภาพเหล่านี้่าจะมีผลมาจากชนิด (genotype) ที่แตกต่างกันของลูกหม่อน ตลอดจนวิธีการสกัดและส่วนของลูกหม่อนที่นำมาใช้ในการศึกษาคด้วย

กลไกการออกฤทธิ์ของลูกหม่อนอบแห้งในการลดน้ำหนักตัวอาจเนื่องมาจากผลขององค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ ที่พบในลูกหม่อน เช่น anthocyanins และ polysaccharides (Azzini, Giacometti, & Russo, 2017; Lee et al., 2017; He et al., 2018). Anthocyanin ออกฤทธิ์โดยปรับเปลี่ยน glucose, lipid and amino acid metabolic pathways ในหลากหลายอวัยวะ เช่น ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน ทำให้เพิ่มกระบวนการ fatty acid oxidation เพิ่ม insulin sensitivity และ glucose uptake อีกทั้งยังลดการเกิด oxidative stress ลดการอักเสบ ลด fatty acids ตลอดจนยับยั้งกระบวนการสร้าง cholesterol biosynthesis ซึ่งส่งผลให้น้ำหนักลดลง และลดการสะสมของไขมันในท้ายที่สุด (Azzini, Giacometti, & Russo, 2017). นอกจากนี้ phenolic และ polysaccharides ที่แยกได้จากลูกหม่อนยังสามารถกระตุ้นการสลายของไขมัน และยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ pre-adipocyte proliferation ซึ่งมีผลลดจำนวนเซลล์ไขมันและมวลไขมัน (Chen et al., 2017). Phenolic และ polysaccharides ยังมีคุณสมบัติป้องกันเบาหวานและป้องกันไขมันในเลือดสูงได้อีก^{35,38} นอกจากนี้การลดลงของน้ำหนักตัวในหนูกลุ่มที่ได้รับลูกหม่อนอบแห้งทั้งสามขนาด ยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการกินอาหารที่ลดลงของของหนูกลุ่มดังกล่าว ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าผลในการต้านภาวะอ้วนของลูกหม่อนอบแห้งยังเกี่ยวข้องกับการลดความอยากอาหารอีกด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ (Yimam et al., 2016; 2019).

ในการศึกษานี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว มีระดับไขมันในเลือดที่ผิดปกติ (dyslipidemia) โดยมีระดับ cholesterol และ LDL ที่สูงขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสัตว์ทดลองมีภาวะไขมันใน

เลือดสูง (hyperlipidemia) ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่า hyperlipidemia เป็นลักษณะหนึ่งของการเกิดหลอดเลือดแข็ง หรือ atherosclerosis (Libby et al, 2019; Nguyen et al, 2019).

ระยะเริ่มต้นของการเกิด atherosclerosis คือการเกิด LDL oxidation atherosclerosis (Libby et al, 2019; Nguyen et al, 2019). ดังนั้นการยับยั้งการเกิด LDL oxidation จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการป้องกันการเกิด atherosclerosis โดยผลการศึกษานี้พบว่าลูกหม่อนอบแห้งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidation) ดังนั้นลูกหม่อนอบแห้งอาจมีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเกิด LDL oxidation ได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่า anthocyanin ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีหนึ่งของลูกหม่อนที่มีฤทธิ์ anti-atherosclerosis เนื่องจากมีคุณสมบัติต้านออกซิเดชันและลดไขมัน (hypolipidemia) (Chen et al, 2005, Jiang et al, 2017; Liu et al, 2008). ซึ่งคุณสมบัติการป้องกันการเกิด atherosclerotic ของลูกหม่อนอบแห้ง ส่วนหนึ่งอาจมาจาก anthocyanin ที่มีอยู่ในผลลูกหม่อนอบแห้ง

มากไปกว่านั้นไม่เพียงแต่ LDL เท่านั้นที่เป็นปัจจัยในการเกิด atherosclerosis^{41,42} เพียงอย่างเดียว triglyceride ก็เป็นไขมันชนิดหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ที่สามารถส่งเสริมให้เกิด atherosclerosis (Talavero and Sccks, 2011; Peng et al, 2017). ในทางตรงกันข้าม ไขมันดีชนิด HDL มีคุณสมบัติในการต้าน atherosclerosis และปกป้องหัวใจ ผ่านการนำ cholesterol ออกจากเซลล์ ป้องกันการเกิดออกซิเดชัน และลดการอักเสบของหลอดเลือด (Hafiane and Genest, 2013). ซึ่งผลการศึกษาพบว่า ลูกหม่อนอบแห้งสามารถลด cholesterol และ triglyceride และยังมีแนวโน้มลด LDL ในเลือด นอกจากนี้ยังมีผลเพิ่ม HDL ในเลือดอีกด้วย ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สามารถป้องกันการเกิด atherosclerosis ได้ มากไปกว่านั้นผลการคำนวณค่า atherogenic index ยังพบว่าลูกหม่อนอบแห้งทำให้ค่า atherogenic index ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงลดลง ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นชัดว่าลูกหม่อนอบแห้งสามารถป้องกันการเกิด atherosclerosis ได้

ในการทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือด พบว่าหนูทุกกลุ่มมีการคลายตัวของหลอดเลือดที่ไม่แตกต่างกัน ทั้งหลอดเลือดที่มี endothelial cell และหลอดเลือดที่ไม่มี endothelial cell ซึ่งอนุมานได้ว่าแม้หนูจะถูกกระตุ้นให้มีไขมันสูงแต่การทำงานของหลอดเลือดยังไม่เสียหาย อย่างไรก็ตามหากใช้เวลาในการกระตุ้นให้นานขึ้นอาจทำให้การทำงานของหลอดเลือดเสียหายได้ แต่กระนั้นลูกหม่อนอบแห้งที่ขนาด 100 mg/kg มีแนวโน้มทำให้หลอดเลือดคลายตัวได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะเป็นผลดีที่จะช่วยให้การทำงานของหลอดเลือดดีขึ้นได้

การศึกษานี้ใช้ยา atorvastatin เป็น positive control โดย atorvastatin เป็นยาลดไขมัน ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase ซึ่งเป็น rate-limiting enzyme ในกระบวนการสร้าง cholesterol เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งจึงทำให้การสร้าง cholesterol ลดลง (Istvan, 2002; Ward, Watts, & Eckel, 2019). ซึ่งผลการศึกษาพบว่ายา atorvastatin มีผลลดระดับ cholesterol, triglyceride และ LDL และมีผลเพิ่ม HDL ในเลือด ตลอดจนมีผลลดความอยากอาหารและน้ำหนักตัวได้เช่นเดียวกับลูกหม่อนอบแห้ง แต่ลูกหม่อนอบแห้งมีแนวโน้มที่จะมีประสิทธิภาพที่ดีกว่ายา atorvastatin และอาจมีความปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากยาในกลุ่ม statin มีรายงานว่าก่อให้เกิดพิษต่อตับได้ (Ward, Watts, & Eckel, 2019).

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าลูกหม่อนอบแห้งมีประสิทธิภาพในการป้องกันการเกิด atherosclerosis ที่เกิดจากการได้รับอาหารไขมันสูงได้ โดยการลดระดับ cholesterol, triglyceride, LDL และเพิ่มระดับ HDL ในเลือด อีกทั้งยังมีผลด้านภาวะอ้วนโดยการลดความอยากอาหาร ซึ่งทำให้น้ำหนักตัวลดลงได้

บทที่ 6 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

การดำเนินโครงการวิจัยนี้ โดยภาพรวมเป็นไปตามที่วางแผนไว้ แต่อย่างไรก็ตามในช่วงแรกของการทดลอง หนูในกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือด atorvastatin มีการตาย จึงต้องปรับขนาดยาให้เหมาะสม ดังนั้นจึงต้องส่งหนูทดลองมาเพิ่มเพื่อให้จำนวนหนูทดลองในกลุ่มนี้เท่ากับหนูทดลองกลุ่มอื่น ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลครบถ้วนและสามารถคำนวณผลการศึกษาให้ได้ค่าทางสถิติที่แม่นยำและเชื่อถือได้ จึงจำเป็นต้องขยายระยะเวลาการชักนำให้หนูทดลองเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งออกไป ทำให้ระยะเวลาการทดลองมากกว่า 3 เดือน อีกทั้งยังส่งผลให้การตรวจวัดค่าระดับไขมันในเลือดและการคลายตัวของหลอดเลือดต้องล่าช้าออกไปด้วย แต่ก็สามารถดำเนินการวิจัยได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้ในที่สุด



เอกสารอ้างอิง

- กรองกาญจน์ ชูทิพย์. สรีรวิทยาระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดกับการประยุกต์ใช้ทางเภสัชวิทยา. พิมพ์ครั้งที่ 1. พิษณุโลก: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยนเรศวร; 2560.
- กระทรวงสาธารณสุข. รายงานที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจ [อินเทอร์เน็ต]. นนทบุรี; 2550 [เข้าถึงเมื่อ 23 กันยายน 2560]. เข้าถึงได้จาก:
<https://hdcservice.moph.go.th/hdc/main/search.php?search=%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%AB%E0%B8%B1%E0%B8%A7%E0%B9%83%E0%B8%88>.
- สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หม่อน [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพมหานคร; 2560 [เข้าถึงเมื่อ 23 กันยายน 2560]. เข้าถึงได้จาก:
http://medplant.mahidol.ac.th/pharm/botanic.asp?bc=0736&kw=%CB%C1%E8%CD%B9*
- Ann JY, Eo H, Lim Y. Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes & Nutrition*. 201; 10(46):1-13.
- Aluganti NC, Fernandez-Ruiz I, Selvarajan K, Jiang X, Sengupta B, Riad A, et al. Atherosclerosis- do we know enough already to prevent it? *Curr Opin Pharmacol*. 2016;27:92-102.
- Azzini E, Giacometti J, Russo, G. L. Antiobesity effects of anthocyanins in preclinical and clinical studies. *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2017;2017(2740364):1-11.
- Bhatt ID, Rawat S, Badhani A, Rawal RS. Nutraceutical potential of selected wild edible fruits of the Indian Himalayan region. *Food Chem*. 2017;215:84-91
- Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014;20(7):1724-45.
- Cahill PA, Redmond EM. Vascular endothelium - Gatekeeper of vessel health. *Atherosclerosis* 2016;248:97-109.
- Chen CC, Liu LK, Hsu JD, Huang HP, Yang MY, Wang CJ. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Food Chem*. 2005;91(4):601-7.
- Chen C, Huang Q, You LG, Fu X. Chemical property and impacts of different polysaccharide fractions from *Fructus Mori*. on lipolysis with digestion model in vitro. *Carbohydr Polym*. 2017;178(15):360-7.
- Hafiane A, Genest J. HDL, atherosclerosis, and emerging therapies. *Cholesterol*. 2013;2013:1-18.
- He X, Fangb J, Ruan Y, Wang X, Sun Y, Wu N, et al. *Food Chem*. 2018;245:899-910.
- Huang L, Zhou Y, Meng L, Wu D, He Y. Comparison of different CCD detectors and chemometrics for predicting total anthocyanin content and antioxidant activity of

- mulberry fruit using visible and near infrared hyperspectral imaging technique. *Food Chem.* 2017;224:1-10.
- Istvan ES. Structural mechanism for statin inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *Am Heart J.* 2002;44(6 Suppl): S27-32.
- Jiang DQ, Guo Y, Xu DH, Huang YS, Yuan K, Lv ZQ. Antioxidant and anti-fatigue effects of anthocyanins of mulberry juice purification (MJP) and mulberry marc purification (MMP) from different varieties mulberry fruit in China. *Food Chem Toxicol.* 2013;59:1-7.
- Jiang Y, Dai M, Nie WJ, Yang XR, Zeng XC. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017;200:228-35.
- Kang TH, Hur JY, Kim HB, Ryu JH, Kim SY. Neuroprotective effects of the cyanidin-3-o-beta-d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia. *Neurosci. Lett.* 2006;391(3):122-6.
- Kang TH, Oh HR, Jung SM, Ryu JH, Park MW, Park YK, et al. Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. *Biological & pharmaceutical bulletin.* 2006;29:270-4.
- Lee MR, Kim JE, Choi JY, Park JJ, Kim H, Song R, et al. Anti-obesity effect in high-fat-diet-induced obese C57BL/6 mice: study of a novel extract from mulberry (*Morus alba*) leaves fermented with *Cordyceps militaris*. *Exp. Ther. Med.* 2019;17(3):2185-93.
- Lee YM, Yoon Y, Yoon H, Park HM, Song S, Yeum KJ. Dietary anthocyanins against obesity and inflammation. *Nutrients.* 2017;9(1089):1-15.
- Leyva-Jiménez FJ, Ruiz-Malagón AJ, Molina-Tijeras JA, Diez-Echave P, Vezza T, Hidalgo-García L, et al. Comparative study of the antioxidant and anti-inflammatory effects of leaf extracts from four different *Morus alba* genotypes in high fat diet-induced Obesity in mice. *Antioxidants.* 2020;9(733):1-24.
- Li Q, Liu F, Liu J, Liao S, Zou Y. Mulberry leaf polyphenols and fiber induce synergistic antiobesity and display a modulation effect on gut microbiota and metabolites. *Nutrients.* 2019;11(1017): 1-19.
- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, et al. Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis., Primer.* 2019;5(56):1-18.
- Lim HH, Lee SO, Kim SY, Yang JS, Lim Y. Anti-inflammatory and anti-obesity effects of mulberry leaf and fruit extract on high fat diet-induced obesity. *Exp. Biol. Med.* 2013;238(10):1160-9.

- Lim HH, Yang SJ, Kim Y, Lee M, Lim Y. Combined treatment of mulberry leaf and fruit extract ameliorates obesity-related inflammation and oxidative stress in high fat diet-induced obese mice. *J Med Food*. 2013;16(8):673-80.
- Liu CJ, Lin JY. Anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of strawberry and mulberry fruit polysaccharides on lipopolysaccharide-stimulated macrophages through modulating pro-/anti-inflammatory cytokines secretion and Bcl-2/Bak protein ratio. *Food Chem Toxicol*. 2012;50(9):3032-9.
- Liu LK, Lee HJ, Shih YW, Chyau CC, Wang CJ. Mulberry anthocyanin extracts inhibit LDL oxidation and macrophage-derived foam cell formation induced by oxidative LDL. *J. Food Sci*. 2008;73(6):H113-21.
- Mahmoud MY. Natural antioxidants effect of mulberry fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) on lipids profile and oxidative stress in hypercholesterolemic rats. *Pakistan. J. Nutr*. 2013;12(7):665-72.
- Metwally FM, Rashad H, Mahmoud AA. *Morus alba* L. diminishes visceral adiposity, insulin resistance, behavioral alterations via regulation of gene expression of leptin, resistin and adiponectin in rats fed a high-cholesterol diet. *Physiol. Behav*. 2019;201:1-11.
- Nguyen MT, Fernando S, Schwarz N, Tan J, Bursill CA, Psaltis PJ. Inflammation as a therapeutic target in atherosclerosis. *J. Clin. Med*. 2019;8(1109):1-20.
- Paul N, Hopkins PN. Molecular biology of atherosclerosis. *Physiol. Rev*. 2013;93:1317-542.
- Peng J, Luo F, Ruan G, Peng R, Li X. Hypertriglyceridemia and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2017;16(233):1-13.
- Schaefer E. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. *Am. J. Clin. Nutr*. 2002;75(2):191-212.
- Talayero BG, Sacks FM. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr. Cardiol Rep*. 2011;13:544-52.
- Wang Y, Xiang L, Wang C, Tang C, He X. Antidiabetic and antioxidant effects and phytochemicals of mulberry fruit (*Morus alba* L.) polyphenol enhanced extract. *PLoS One*. 2013;8(7):e71144.
- Ward NC, Watts GF, Eckel RH. Statin toxicity: mechanistic insights and clinical implications. *Circ. Res*. 2019;124(2):328-50.
- Xu X, Lu L, Dong Q, Xiaolin Li, Zhang N, Xin Y, et al. Research advances in the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Lipids Health Dis*. 2015;14(158):1-8.
- Yang X, Yang L, Zheng H. Hypolipidemic and antioxidant effects of mulberry (*Morus alba* L.) fruit in hyperlipidaemia rats. *Food Chem. Toxicol*. 2010;48:2374-9.

Yimam M, Jiao P, Hong M, Brownell L, Lee YC, Hyun EJ, et al. Appetite suppression and antiobesity effect of a botanical composition composed of *Morus alba*, yerba mate, and magnolia officinalis. *J. Obes.* 2016;2016(4670818):1-12.

Yimam M, Jiao P, Hong M, Brownell L, Lee YC, Kim HJ. et al. *Morus alba*, a medicinal plant for appetite suppression and weight loss. *J. Med. Food.* 2019;22(7):741-51.



ภาคผนวก
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่
ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ



แผนการดำเนินงาน (สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ และแผนงานที่แสดงในลักษณะ Gantt Chart)

วัตถุประสงค์	กิจกรรม (ที่ระบุไว้ตามสัญญา)	กิจกรรมที่ดำเนินการจริง
<p>เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของลูกหม่อนอบแห้ง ต่อระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ atherogenic index (AI) ในหนูที่ถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ</p>	<p>ดำเนินการตามกลุ่มสัตว์ทดลองที่กำหนดไว้ โดยต้องชั่งน้ำหนักและเตรียมอาหารให้สัตว์ทดลองทุกวันตามกลุ่มต่อไปนี้</p> <p>กลุ่มที่ 1 Control (C) group: กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติ</p> <p>กลุ่มที่ 2 High fat (HF) group: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูง</p> <p>กลุ่มที่ 3 HF+Mu10: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 10 mg/kg ค่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 4 HF+Mu100: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 100 mg/kg ค่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 5 HF+Mu300: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 300 mg/kg ค่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 6 HF+ATV5: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับยา atorvastatin 5 mg/kg ค่อน้ำหนักตัว</p> <p>สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน</p> <p>หมายเหตุ: ต้องใช้เวลาดำเนินการมากกว่า 3 เดือนเพราะต้องวางแผนเหลือมวันเพื่อ treat สัตว์ทดลองแต่ละตัว เนื่องจากจะเก็บตัวอย่างหลอดเลือดและเลือดได้วันละ 2 ตัวเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง (เดือนที่ 1-8)</p>	<p>ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้</p> <p>เพิ่มเติมการตรวจวัดน้ำหนักตัวและการกินอาหาร</p>
	<p>เก็บตัวอย่างหลอดเลือดและตัวอย่างเลือด (เดือนที่ 5 - 9)</p>	<p>ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้</p>
	<p>วัดระดับไขมันในเลือดและวิเคราะห์ผล (เดือนที่ 9-10)</p>	<p>ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้</p>

ผลที่คาดว่าจะได้รับ (แบ่งเป็นราย 6 เดือน)

เดือนที่	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
6 เดือนที่ 1	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว ระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ atherogenic index (AI) และศึกษา การคลายตัวของหลอดเลือด	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว	ได้ค่าน้ำหนักตัว ของหนู ทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการกิน อาหาร	ได้ข้อมูลการกินอาหาร ในหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อ กลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อระดับไขมัน ในเลือดได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ atherogenic index (AI)	ได้ค่าระดับไขมันใน เลือดของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการคลายตัว ของหลอดเลือด	ได้ข้อมูลการคลายตัว ของหลอดเลือด ในหนู ทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน
6 เดือนที่ 2	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว	ได้ค่าน้ำหนักตัว ของหนู ทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน

ระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ atherogenic index (AI) และศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการกินอาหาร	ได้ข้อมูลการกินอาหาร ในหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน
	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ atherogenic index (AI)	ได้ค่าระดับไขมันในเลือดของหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน
	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการคลายตัวของหลอดเลือด	ได้ข้อมูลการคลายตัวของหลอดเลือด ในหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสารสกัดลูกหม่อนเพื่อลดความเสี่ยง
ภาวะไขมันผิดปกติ หลอดเลือดแดงแข็งและหัวใจขาดเลือด

โครงการย่อยที่ 2

ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้องและการดูด
ซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

คณะผู้วิจัย

- | | |
|--|--|
| 1. ผศ.ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์ (หัวหน้าโครงการ) | หน่วยงานที่สังกัด
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |
| 2. รศ.ดร.กรองกาญจน์ ชูทิพย์ | ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร |

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน (บูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 2:

ชื่อภาษาไทย	ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้อง และการดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อผนังลำไส้ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effect of mulberry fruit extract on blood glucose, visceral fat accumulation and the intestinal epithelial absorption in mice fed with high fat and high sugar diet
หัวหน้าโครงการ	ผศ.ดร.สุภาพร พันธุ์ธีรานุรักษ์
ระยะเวลาที่ทำวิจัย	1 ปี

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารละลายลูกหม่อนอบแห้งในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งจากการได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลา 3 เดือน โดยมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับน้ำหนักตัวและปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด และการดูดซึมสารผ่านเยื่อผนังลำไส้ หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็นกลุ่มควบคุมที่กินอาหารปกติที่ให้พลังงานทั้งสิ้น 3.11 กิโลแคลอรีต่อกรัม และหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่ให้พลังงานทั้งสิ้น 4.5 กิโลแคลอรีต่อกรัม ซึ่งมีสัดส่วนของคอเลสเตอรอลสูง หนูทดลองกลุ่มนี้ถูกแบ่งย่อยอีก 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับการป้อนสารต่างๆ ร่วมด้วย ได้แก่ สารละลายลูกหม่อนอบแห้งที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 300 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว และยาลดไขมัน (atorvastatin) 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว ในระหว่าง 3 เดือน มีการชั่งน้ำหนักตัวและวัดระดับกลูโคสในเลือด เมื่อครบกำหนดเวลาทำการการุณยฆาต เก็บไขมันในช่องท้องและตับ พร้อมทั้งแยกลำไส้ทั้งหมดออกมาเพื่อศึกษาการดูดซึมสารผ่านเยื่อผนังลำไส้ด้วยอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ด้วยการเก็บสารละลายลูกหม่อนอบแห้งทางด้านโพรงลำไส้และด้านเลือดไปตรวจวิเคราะห์หาสาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ผลพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลองทุกกลุ่มตลอดระยะเวลา 3 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ น้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงมีค่ามากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ แต่ในเดือนที่สามพบว่าน้ำหนักตัวของหนูทดลองกลุ่มนี้มีแนวโน้มลดลงแต่ยังคงสูงกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ ปริมาณไขมันที่สะสมในช่องท้องและน้ำหนักตับของหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสารละลายลูกหม่อนอบแห้งช่วยลดปริมาณไขมันสะสมในช่องท้องได้ ส่วนการตรวจวิเคราะห์หาสาร C3G ในสารละลายลูกหม่อน ผลไม่พบสารใด อาจเนื่องจากการเก็บตัวอย่างไว้นานเกินไปส่งผลให้สารสลายไปก่อนการตรวจวิเคราะห์

คำสำคัญ : ลูกหม่อนอบแห้ง อาหารไขมันสูง โมเดลหนูหลอดเลือดแข็ง น้ำตาลกลูโคสในเลือด น้ำหนักตัว การดูดซึมสารผ่านเยื่อผนังลำไส้

Abstract

This research aims to investigate the effect of dry mulberry solution in arthrosclerosis mice model induced with high fat diet for 3 months. The study focused on changes in body weight, abdominal fat, fasting blood glucose and the absorption through the intestinal epithelial cells of important substance in dry mulberry solution. Mice were divided into 2 groups; one was control group which consumed normal diet that give total energy of 3.11 kcal/g and another group was consumed high fat (HF) diet that rich in cholesterol and give total energy of 4.5 kcal/g. HF group was further divided into 5 subgroups; received HF only, received HF with 10, 100 and 300 mg/kg BW of dry mulberry solution, and HF with 5 mg/kg BW of atorvastatin. During induced period, mice were weighed and measured fasting blood glucose. At the end of 3 months, mice were euthanasia and then collected the abdominal fat, liver and intestine. All parts of the intestine were prepared to study the absorption of Cyaniding-3-glucoside (C3G) that found in dry mulberry solution by using the continuously perfused micro-Ussing chamber. The mucosal and serosal solution were collected to measured C3G by HPLC. The results showed that blood glucose level in all groups did not differ significantly. The body weight of all HF groups was higher than control group, however, that of HF only and HF and atorvastatin groups were tend to plateau at the end of experiment. The visceral fat and liver weight of all HF groups were higher than control groups. The visceral fat of HF and dry mulberry received groups were lower than that of HF group, suggesting that the dry mulberry solution could help to reduce the accumulation of visceral fat in mice that consumed high fat diet. Unfortunately, the analysis of C3G from the mucosal and serosal solutions did not find any substance, possibly due to the samples were kept too long period before measuring by HPLC which resulting in the decay of substance.

Keyword: dry mulberry, high fat diet, arthrosclerosis mice model, fasting blood glucose, body weight, intestinal epithelial absorption,

บทที่ 1 บทนำ

1.1. แนวคิดและที่มา

โรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด (cardiovascular diseases: CVDs) เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรโลก จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคในกลุ่ม CVDs เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และ โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease/ stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 ในประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคในกลุ่ม CVDs สูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) โดยภาวะความดันเลือดสูง ไขมันในเลือดสูง และน้ำตาลในเลือดสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่มักพบควบคู่กับการมีไขมันสะสมในร่างกายที่มากเกินไป และรวมเรียกว่าภาวะอ้วนลงพุง โดยสาเหตุส่วนใหญ่มักมาจากการบริโภคอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูง ภาวะผิดปกติเหล่านี้มักพบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้วผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมักต้องได้รับยาเพื่อการรักษาตลอดชีวิต ทำให้ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และก่อให้เกิดเป็นภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาล และการดูแลผู้ป่วย

ดังนั้นถ้ามีผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์จากผักผลไม้ไทยที่มีสีซึ่งมักมีส่วนประกอบของสารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดได้ ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งทั้งต่อตัวผู้ที่มีภาวะเสี่ยง/ผู้ป่วยเอง ทำให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น และยังช่วยลดภาระด้านการรักษาพยาบาลทั้งในระดับครอบครัว สังคม และระดับชาติได้

ผักผลไม้ไทยที่มีสี เช่น ลูกหม่อน มีส่วนประกอบสำคัญ ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นต้องการนำสารสกัดลูกหม่อนที่ได้ผ่านการทดสอบหาปริมาณแอนโทไซยานิน การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ การทดสอบฤทธิ์ต้านสารสื่ออักเสบและฤทธิ์ด้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองเบื้องต้นมาแล้ว มาศึกษาต่อยอดโดยสนใจนำสารสกัดลูกหม่อนไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งสาเหตุจากมีการสะสมของไขมันในหลอดเลือด (atherosclerosis) จากการได้รับอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูงเป็นระยะเวลานาน โดยมีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อดูผลของสารสกัดลูกหม่อนในการลดน้ำตาลในเลือด ลดปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง ลดน้ำหนักตัว นอกจากนี้ยังศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ ซึ่งเป็นข้อมูลสำคัญที่จำเป็นในการช่วยอธิบายฤทธิ์ของสารสกัดลูกหม่อนได้ ข้อมูลที่จะได้เหล่านี้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือดต่อไป

1.2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดลูกหม่อนในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งจากการได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง โดยมุ่งเน้นศึกษาในประเด็นต่างๆ ดังนี้

1. น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง
2. ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด
3. การดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อบุผนังลำไส้

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

โรคในระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด (cardiovascular diseases: CVDs) เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรโลก ทั้งนี้จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคในกลุ่ม CVDs เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และ โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease/stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 ในประเทศไทย มีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคในกลุ่ม CVDs สูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550) โดยภาวะความดันเลือดสูง ไขมันในเลือดสูง และน้ำตาลในเลือดสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่มักพบควบคู่กับการมีไขมันสะสมในร่างกายที่มากเกินไป CVDs เป็นโรคเรื้อรังที่พบในวัยกลางคนไปจนถึงผู้สูงอายุ เมื่อเกิดขึ้นแล้ว ผู้ป่วยต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมักต้องได้รับยาเพื่อการรักษาตลอดชีวิต ทำให้ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตในระยะยาว และก่อให้เกิดภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาล และการดูแลผู้ป่วย

สาเหตุสำคัญของโรคหัวใจขาดเลือด คือ หลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary heart disease, CHD) เนื่องมาจากการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือด ที่มักเกิดจากเซลล์บุผิวของหลอดเลือดเสื่อมสภาพ (endothelial dysfunction) จนนำไปสู่ภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งหมายถึง การที่หลอดเลือดแข็งและขาดความยืดหยุ่น จากการสะสมของไขมันในชั้นในสุดของหลอดเลือด (intima) โดยเฉพาะหลอดเลือดแดงขนาดกลางและขนาดใหญ่ ในระยะแรกผู้ป่วยจะยังไม่แสดงอาการใด ๆ จนกว่าจะผ่านไปเป็น 10 ปี จึงแสดงอาการทางคลินิกต่าง ๆ เนื่องจากเกิดความเสียหายของหลอดเลือด และมีการอุดตันทำให้หลอดเลือดไปเลี้ยงอวัยวะ ถ้าเป็นหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงหัวใจก็จะมีอาการเจ็บแน่นหน้าอก หากโรคมีความรุนแรงมาก จะส่งผลให้มีการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (myocardial infarction) และเกิดอาการหัวใจวาย (heart attack) และเสียชีวิตได้ในที่สุด Atherosclerosis เป็นโรคที่เกิดจากปัจจัยหลายประการ แต่ที่สำคัญ ได้แก่ การอักเสบที่เป็นผลสืบเนื่องมาจากการมีภาวะไขมันในเลือดสูงและนำไปสู่การเกิด endothelial dysfunction ซึ่งภาวะไขมันในเลือดสูงนี้มักพบร่วมกับการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงและมักมีปริมาณไขมันสะสมเกินในร่างกาย โดยเฉพาะบริเวณลำตัว หรือเรียกว่าอ้วนลงพุง ในการรักษา atherosclerosis ส่วนมากนิยมใช้ยาเพื่อลดไขมันในเลือดเพื่อใช้ป้องกันและรักษาโรคหลอดเลือดแดงแข็ง แต่ถ้าผู้ป่วยมีอาการของ atherosclerosis ที่รุนแรงจนนำไปสู่ภาวะหัวใจขาดเลือดแล้ว การรักษาที่พอจะช่วยให้คือการถ่างขยายหลอดเลือดโดยการใส่ขดลวด (stent) หรือการผ่าตัดทางเบี่ยงต่อหลอดเลือดให้ใหม่ (bypass surgery) ร่วมกับการให้ยาในกลุ่มที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ได้แก่ ยาในกลุ่ม nitrates การให้ยาที่มีฤทธิ์ป้องกันการแข็งตัวของเลือด ได้แก่ aspirin และการให้ยาในกลุ่มที่ลดการทำงานของหัวใจ ได้แก่ beta-blocker, calcium channel blocker, angiotensin converting enzyme inhibitor และยาลดไขมัน เป็นต้น จะเห็นว่าการรักษาด้วยวิธีดังกล่าวข้างต้น เป็นการรักษาที่ปลายเหตุและมีค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูงมาก ดังนั้นถ้าหากมีผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร ที่มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดโรค CHD ก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง

งานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาทดสอบผลของสารสกัดลูกหม่อนที่ได้ผ่านการทดสอบหาปริมาณแอนโทไซยานิน (total monomeric anthocyanin content) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, FRAP assay) การทดสอบฤทธิ์ต้านสารสื่ออักเสบและฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด ในเบื้องต้นมาแล้ว โดย

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย พบว่าสารสกัดลูกหม่อนมีระดับของ anthocyanin ที่สูงและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบได้ สาร anthocyanin สามารถต้านสารสื่ออักเสบ TNF- α ได้โดยมีค่า IC₅₀ คิดเป็น 4.59 $\mu\text{g/mL}$ มีรายงานวิจัยว่า TNF- α เป็นหนึ่งในสารสื่ออักเสบที่สัมพันธ์กับการเกิดโรค CHD และการยับยั้งการสร้างและ/หรือหลั่ง TNF- α ช่วยลดความเสี่ยงและความรุนแรงของการเกิด CHD ได้ ดังนั้นสารสกัดลูกหม่อนจึงมีศักยภาพน่าสนใจที่จะศึกษาต่อยодฤทธิ์ด้านอื่นๆ เช่น การช่วยลดน้ำหนักตัว การลดน้ำตาลในเลือด การลดปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง ซึ่งการลดความผิดปกติเหล่านี้เป็นการลดปัจจัยเสี่ยงในการก่อโรคร้ายแรงต่าง ๆ ในชั้นเบื้องต้นที่เป็นประโยชน์อย่างมาก นอกจากนี้ ข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพการดูดซึมสารสกัดผ่านเยื่อผนังลำไส้ยังเป็นข้อมูลสำคัญจำเป็นในการช่วยอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้ แต่ยังไม่มียข้อมูลด้านนี้มากนัก ผู้วิจัยจึงวางแผนทำวิจัยโดยจะนำสารสกัดลูกหม่อนไปทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะ atherosclerosis จากการได้รับอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูง โดยมีวัตถุประสงค์หลัก คือ เพื่อดูผลของสารสกัดลูกหม่อนในการลดน้ำตาลในเลือด ลดปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง ลดน้ำหนักตัว และศึกษาการดูดซึมสารสกัดผ่านเยื่อผนังลำไส้ด้วยชุดเครื่องมืออุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ชุดเครื่องมืออุปกรณ์นี้ถูกพัฒนามาจากอุปกรณ์ Ussing chamber แบบดั้งเดิมที่มีขนาดใหญ่และต้องใช้ขนาดเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ในการศึกษา โดยพัฒนาให้มีขนาดเล็กลงเพื่อให้สามารถใช้ศึกษาเนื้อเยื่อชิ้นเล็กได้ และปรับปรุงมาจากเทคนิคอูซซิง (Ussing chamber technique) ซึ่งเป็นระบบที่ถูกคิดค้นขึ้นโดย Hans H. Ussing และ Zerahn ในปี 1951 ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ศึกษาการขนส่งไอออนแบบอาศัยพลังงานผ่านเซลล์เยื่อ (epithelial cells) รวมทั้งเพื่อศึกษาคูณสมบัติทางไฟฟ้าของเซลล์เยื่อ ในระยะต่อมาได้มีการพัฒนาระบบให้เหมาะสมกับการศึกษาแต่ละประเภทมากขึ้น แต่ยังมีหลักการพื้นฐานเหมือนเดิม คือระบบจะประกอบด้วย chamber 2 ชั้น ที่แยกจากกัน และสามารถยึดลำไส้ไว้ตรงกลางระหว่าง chamber ได้ ดังนั้นสารละลายใน chamber จะถูกแบ่งออกเป็น 2 ด้านเพื่อจำลองให้ด้านหนึ่งเป็นด้านเลือด (serosal side) และอีกด้านหนึ่งเป็นด้านโพรงลำไส้ (mucosal side) ใน chamber ทั้งสองด้านนี้สามารถใส่สารที่ต้องการศึกษา เช่น ยา ฮอร์โมน หรือ สารอื่นๆ ที่ต้องการศึกษา เพื่อดูผลของสารเหล่านั้นต่อเยื่อผนังลำไส้ ในระบบนี้จะมี electrode 2 คู่ คู่หนึ่งคือ voltage electrodes ใช้สำหรับวัดการเปลี่ยนแปลงของศักย์ไฟฟ้าระหว่าง 2 ด้านของเยื่อผนังลำไส้ โดยต่อเข้ากับเครื่องมือ volt meter และอีกคู่คือ electrical electrodes ใช้สำหรับวัดกระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นระหว่าง 2 ด้านของเยื่อผนังลำไส้ โดยต่อกับเครื่องวัดกระแสไฟฟ้า (amperemeter) ซึ่งค่ากระแสไฟฟ้านี้เป็นค่าที่ใช้แทนการเคลื่อนที่ของไอออนผ่านเซลล์เยื่อผนังลำไส้ หรือสามารถใช้ electrical electrodes ต่อกับเครื่องสร้างกระแสไฟฟ้า (current generator) สำหรับผ่านกระแสไฟฟ้าที่กำหนดปริมาณเข้าไปในระบบ เพื่อคำนวณหาค่าความต้านทานของเยื่อผนังลำไส้ได้ตามหลักการของ Ohm's law ค่าทางไฟฟ้าต่างๆ เหล่านี้จะแสดงถึงคุณสมบัติของเยื่อผนังลำไส้ในขบวนการขนส่งสาร และไอออนต่างๆ ซึ่งสามารถแปลผลถึงการดูดซึม (absorption) และการคัดหลั่ง (secretion) สาร และไอออนต่างๆ ผ่านเยื่อผนังลำไส้ได้ ข้อมูลต่างๆ ที่ได้จากโครงการวิจัยนี้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคในกลุ่ม CVDs ต่อไป

บทที่ 3 วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารละลายลูกหม่อนอบแห้ง

ในเบื้องต้นโครงการวิจัยได้วางแผนที่จะใช้สารสกัดลูกหม่อนที่ถูกเตรียมโดยนักวิจัยฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ในลักษณะที่เป็นสารสกัดหยาบชั้นเหนียว (semi-solid) ที่มีการเตรียมสารสกัดโดยใช้สารละลายเอทานอล และควบคุมคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณ anthocyanin โดย HPLC แต่เมื่อได้วิเคราะห์องค์ประกอบของสารสกัดลูกหม่อนที่ได้ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลในปริมาณที่สูงมาก เมื่อเทียบกับที่พบในลูกหม่อนอบแห้ง จึงได้เปลี่ยนมาใช้เป็นลูกหม่อนอบแห้งที่บดละเอียดแทน

3.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนู mouse สายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 8 สัปดาห์ เพศเมีย สั่งซื้อจากบริษัท Nomura Siam International ประเทศไทย โดยหนูทั้งหมดถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณแสง และความชื้นสัมพัทธ์ ตามที่ทางสถานสัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรกำหนด

โครงการนี้ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลข NU-AE591026

หลังจากพักหนูกทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน ได้สุ่มแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 11 ตัว และแต่ละกลุ่มจะได้รับการป้อนสารต่าง ๆ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Control group : กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 Atherosclerosis group (HF) : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 3 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW

กลุ่มที่ 4 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW

กลุ่มที่ 5 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW

กลุ่มที่ 6 HF+ยา atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW

หมายเหตุ : โครงการวิจัยนี้ใช้สัตว์ทดลองร่วมกับโครงการย่อยที่ 1

หนูกทดลองทุกกลุ่มได้รับการป้อนสารต่างๆ ตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน และขณะเดียวกันหนูกทดลองกลุ่มควบคุมได้รับอาหารปกติ ส่วนหนูกทดลองกลุ่มที่ชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

ได้รับอาหารที่มีไขมันสูง ในระหว่าง 3 เดือนนี้ ได้ชั่งปริมาณอาหารที่หนูทดลองกินทุกวัน ชั่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ และวัดระดับน้ำตาลในเลือดเดือนละหนึ่งครั้ง เมื่อครบเวลา 3 เดือน ทำการการุณฆาตหนูทดลองเพื่อเก็บเลือด ไขมันในช่องท้อง ตับ หัวใจ และแยกลำไส้ทั้งหมดออกจากตัวหนูทดลองอย่างรวดเร็ว เพื่อนำไปศึกษาการดูดซึมสารสกัดผ่านเยื่อผนังลำไส้ด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ต่อไป

3.3 ภาพรวมขั้นตอนการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาศึกษาวิจัย

เมื่อพักหนูทดลองที่ได้รับมาเป็นเวลา 7 วันแล้ว หนูทดลองได้ถูกชั่งน้ำหนักตัวและวัดค่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดด้วยเครื่อง Accu-CHEX Performa เพื่อใช้เป็นค่าเริ่มต้นการทดลอง จากนั้นหนูกลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารสูตรปกติ (normal formula) ส่วนหนูกลุ่มที่ 2-6 ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งด้วยการให้กินอาหารไขมันสูง (high fat formula; HF) เป็นเวลา 3 เดือน โดยในระหว่างนี้ หนูทดลองได้รับการป้อนสารตามรายละเอียดของการแบ่งกลุ่ม วันละครั้ง ทุกวัน เป็นเวลา 3 เดือน

ในระหว่าง 3 เดือน ทำการชั่งน้ำหนักตัวของหนูทดลองสัปดาห์ละครั้ง และวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในเลือดเดือนละครั้ง นอกจากนั้นได้ทำการชั่งน้ำหนักอาหาร เพื่อดูปริมาณการกินอาหารด้วย

เมื่อครบกำหนด 3 เดือน หนูทดลองถูกชั่งน้ำหนัก และวัดค่าน้ำตาลกลูโคสในเลือดอีกครั้ง จากนั้นสลบหนูทดลองด้วยการฉีด pentobarbital 50 mg/kg BW ทางช่องท้อง เมื่อแน่ใจว่าหนูทดลองสลบลึกแล้ว ผ่าตัดเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเนื้อเยื่อไขมันในช่องท้องทั้งหมด และแยกลำไส้ทั้งหมดออกจากตัวหนูทดลองอย่างรวดเร็ว เพื่อนำไปศึกษาการดูดซึมสารสกัดลูกหมอนผ่านเยื่อผนังลำไส้ด้วยชุดเครื่องมืออุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ต่อไป และสุดท้ายจะทำการุณฆาต (Euthanasia) ด้วยการเปิดช่องอกและตัดขั้วหัวใจ เพื่อให้แน่ใจว่าหนูทดลองเสียชีวิต

ซากหนูทดลองถูกเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำไปทำลายตามขั้นตอนที่สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร กำหนด

3.4 การชักนำให้หนูทดลองเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง

เมื่อพักหนูทดลองที่ได้รับมาเป็นเวลา 7 วันแล้ว หนูกลุ่มที่ 1 ได้รับอาหารสูตรปกติซึ่งมีส่วนประกอบที่จำเป็นสำหรับหนู mice ได้แก่ โปรตีน (18.6% ต่อน้ำหนักรวม) ไขมัน (6.2% ต่อน้ำหนักรวม) คาร์โบไฮเดรต (44.2% ต่อน้ำหนักรวม) โดยปราศจาก cholesterol และให้พลังงานทั้งสิ้น 3.1 kcal/g ส่วนหนูกลุ่มที่ 2-6 ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งด้วยการให้กินอาหารไขมันและน้ำตาลสูง ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน (17.3% ต่อน้ำหนักรวม) คาร์โบไฮเดรต (46.9% ต่อน้ำหนักรวม) ไขมัน (21.2% ต่อน้ำหนักรวม) โดยมี cholesterol 12.5 g/kg คิดเป็น 0.2% ต่อน้ำหนักรวม และให้พลังงานทั้งสิ้น 4.5 kcal/g ซึ่งสูงกว่าอาหารสูตรปกติ หนูทดลองถูกเลี้ยงเป็นเวลา 3 เดือน โดยให้กินอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) แต่ชั่งปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน แล้วนำมาคำนวณค่าปริมาณอาหารที่กินต่อวันต่อตัว ในระหว่างนี้ได้ชั่งน้ำหนักตัวหนูทดลองสัปดาห์ละครั้ง และสังเกตอาการผิดปกติต่าง ๆ ที่เป็นเกณฑ์ต้องให้เลิกจากการทดลองร่วมด้วย

3.5 การเจาะเลือดจากทางหลอดเลือดเพื่อวัดระดับน้ำตาลกลูโคส

ก่อนวัดระดับน้ำตาลกลูโคส หนูทดลองถูกอดอาหารเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นจับหนูทดลองใส่ใน mouse restrainer และจุ่มหางในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้หลอดเลือดขยายตัวก่อนคลิบปลายหางเพียงเล็กน้อยด้วยกรรไกร จากนั้นหยดเลือดที่ไหลออกจาก lateral tail vein ปริมาณ 1-2 หยด ลงบนแผ่นวัดระดับน้ำตาลกลูโคสของเครื่อง Accu-CHEX Performa เพื่อวัดค่าน้ำตาลกลูโคส วัดซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำค่าที่ได้มาเฉลี่ย ทำการห้ามเลือดที่ปลายหางหนูทดลองด้วยการใช้สำลีกดบริเวณปลายหางให้แน่นจนกว่าเลือดหยุดไหล จึงนำไปพักในกรงเพื่อรอสังเกตอาการก่อนที่จะนำไปเก็บในกรงเลี้ยงต่อไป

3.6 การเก็บเนื้อเยื่อไขมันในช่องท้องและลำไส้

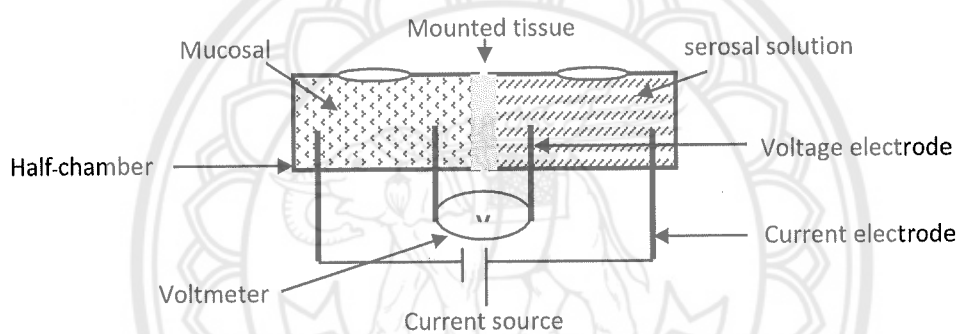
สลบหนูทดลองด้วยการฉีด pentobarbital 50 mg/kg BW ทางช่องท้อง และตรวจสอบว่าสลบลึกด้วยการเขี่ย pedal reflex (ใช้เล็บ หรือ forceps จิกที่ปลายเท้าของหนูทดลอง ถ้าไม่มีการชักขาหนี แสดงว่าสลบลึกแล้ว) เมื่อแน่ใจว่าหนูทดลองสลบลึกแล้ว ฝ่าเปิดช่องท้องเพื่อเก็บเนื้อเยื่อไขมันในช่องท้องทั้งหมด และนำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นแยกเก็บลำไส้ทั้งหมด ได้แก่ duodenum jejunum ileum และ colon ออกจากตัวหนูทดลองแล้วแช่ลงในสารละลาย Ringer's solution ที่แช่เย็นอย่างรวดเร็ว เพื่อนำไปศึกษาการดูดซึมสารสำคัญในลูกหม่อนอบแห้งผ่านเยื่อบุผนังลำไส้ด้วยชุดเครื่องมืออุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ต่อไป และสุดท้ายจะทำการุณฆาต (Euthanasia) ด้วยการเปิดช่องอกและตัดขั้วหัวใจ เพื่อให้แน่ใจว่าหนูทดลองเสียชีวิต

3.7 การศึกษาการดูดซึมสารสำคัญในลูกหม่อนอบแห้งด้วยชุดเครื่องมืออุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber

เมื่อแยกลำไส้ทั้งหมดออกจากตัวหนูทดลอง จุ่มแช่ทันทีในสารละลาย physiological solution (ประกอบด้วย NaCl, KH_2PO_4 , $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Glucose, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Ca-Gluconate ในความเข้มข้น 145, 0.4, 1.6, 5, 1 และ 1.3 mmol / liter ตามลำดับ ค่าออสโมลาริตีประมาณ 300 mOsm และค่า pH ที่ 7.4) หรือเรียกว่าสารละลาย Ringer ที่วางอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นล้างลำไส้ให้สะอาดด้วยการ flushing ด้วยสารละลาย Ringer ทำการตัดแบ่งส่วนต่างๆ ของลำไส้เล็กออกเป็น duodenum jejunum และ ileum และแบ่งส่วนต่างๆ ของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ในสารละลาย Ringer ที่แช่เย็น

การเตรียมชิ้นลำไส้เพื่อใช้ศึกษาด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ทำโดยนำลำไส้ส่วนที่ต้องการศึกษามาตัดเลาะเนื้อเยื่อพังผืด (myenteric fascia) และเส้นเลือด (blood vessel) รอบนอกผนังลำไส้ ออกอย่างนุ่มนวลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (stereo microscope) จากนั้นลอกชั้นกล้ามเนื้อออก (strip muscle layer) ให้เหลือเพียงแผ่นเยื่อบุผนังลำไส้ (mucosal layer) แล้วจึงตัดแผ่นเยื่อบุผนังลำไส้ตามขนาดที่ต้องการประมาณ 1×1 ซม.² เพื่อวางบนรูเปิด (exposure area 0.078 mm^2) ตรงกลางของ removable dice จากนั้นจึงนำ removable dice ไปสอดระหว่างกลางของ continuously perfused micro-Ussing chambers ที่มีขนาดปริมาตรข้างละ 1 ml สารละลาย Ringer จะไหลผ่าน chamber ที่มีเยื่อบุผนังลำไส้กั้นกลางตลอดเวลา และแบ่งสารละลายออกเป็นด้าน serosal side และ mucosal side เยื่อบุผนัง

ลำไส้จะถูก incubate นานประมาณ 15 –20 นาทีก่อนเริ่มการทดลอง ชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chambers นี้จะเชื่อมต่อกับ electrodes 2 ชุด คือ electrical electrodes ที่ต่อกับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า (current generator) สำหรับจ่ายกระแสไฟฟ้าแบบ pulsatile เพื่อใช้สำหรับหาค่าความต้านทานของเยื่อผนังลำไส้ ตามหลักของ Ohm's law ส่วน electrode อีกชุด คือ voltage electrodes จะต่อกับชุดอุปกรณ์ powerLab A/D converter (Chart program; A.D. Instruments, Castle Hill, Australia) ที่ต่อเข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์ PC เพื่อประมวลผลสำหรับวัดค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าของเยื่อผนังลำไส้ ซึ่งจะถูกบันทึกตลอดเวลาการทดลอง สารละลาย Ringer ที่ไหลผ่าน continuously perfused micro-Ussing chambers จะถูกควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบ water jacket ที่หล่อด้วยน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง circulating water bath และเนื่องจากชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber นี้ได้ออกแบบมาให้สารละลาย Ringer ไหลผ่านเยื่อผนังลำไส้ทั้งสองด้านตลอดเวลา ดังนั้นเซลล์เยื่อผนังลำไส้จะได้รับปริมาณออกซิเจนที่เพียงพอ แต่ทั้งนี้สามารถปรับให้สารละลาย Ringer หยุดไหลผ่านได้ และจะให้ 95 % CO₂ และ 5% O₂ แก่สารละลายแทนเพื่อให้เซลล์เยื่อผนังลำไส้ได้รับปริมาณออกซิเจนที่พอเพียงเช่นกัน



รูปภาพแสดง Theoretical model of Ussing chamber

การทดสอบการดูดซึมสารละลายลูกหมอนอบแห้งผ่านเยื่อผนังลำไส้ ทำโดยเมื่อเตรียมลำไส้ส่วนที่ใช้ศึกษาในชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber และ incubate ขึ้นลำไส้สั้นนั้นประมาณ 15 นาทีและสังเกตเห็นสัญญาณค่าศักย์ไฟฟ้าคงที่สม่ำเสมอ จากนั้นให้สารละลายลูกหมอนอบแห้งใน chamber ด้าน mucosal side ของผนังลำไส้ และเก็บสารละลายทางด้าน serosal side ของผนังลำไส้ที่เวลา 0, 15, 30, 45 และ 60 นาที เพื่อนำไปวัดหาปริมาณสารสำคัญของลูกหมอนอบแห้งด้วยวิธี HPLC ต่อไปทำการศึกษาลักษณะเดียวกันนี้สำหรับลำไส้ทุกชิ้นทั้ง duodenum, jejunum, ilium และ colon

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

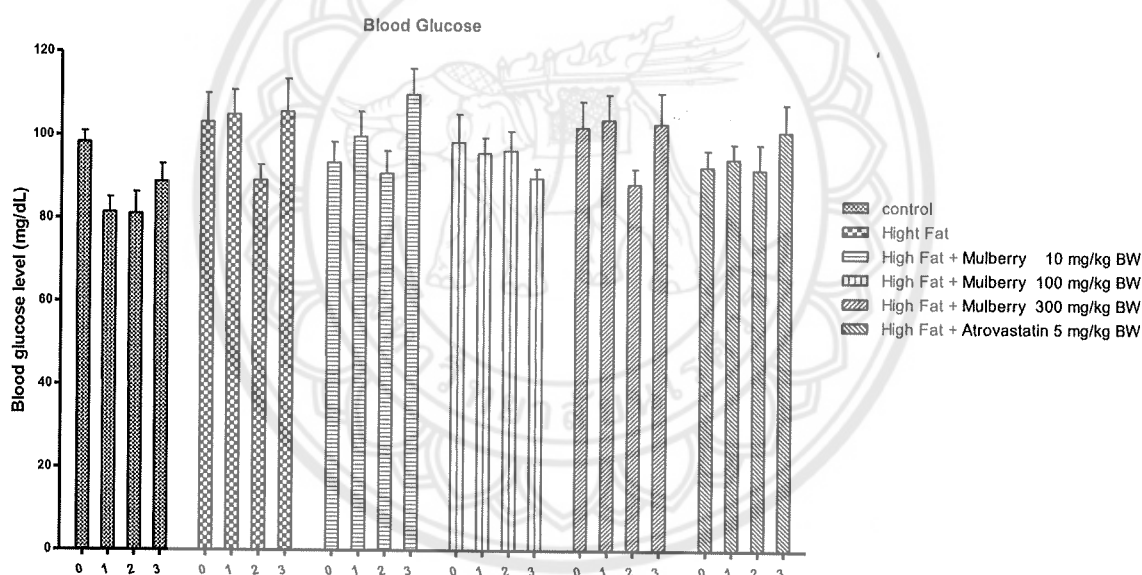
ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) และ ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจะทำโดย วิธี Student t-test และ หรือ ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวน กลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และ ค่า p value <0.05 ถือว่ามีความแตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4 ผลการทดลอง

1. ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อน้ำหนักตัวและระดับน้ำตาลในเลือด

จากการชั่งน้ำหนักตัวหนูทดลองในทุกสัปดาห์ พบว่าหนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นตามอายุ หนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัวสูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมในเดือนที่ 1 และ เดือนที่ 2 โดยกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียวมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มอื่น ในเดือนที่ 3 หนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว และกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงและยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin มีน้ำหนักตัวลดลงในขณะที่หนูกลุ่มอื่นๆ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น

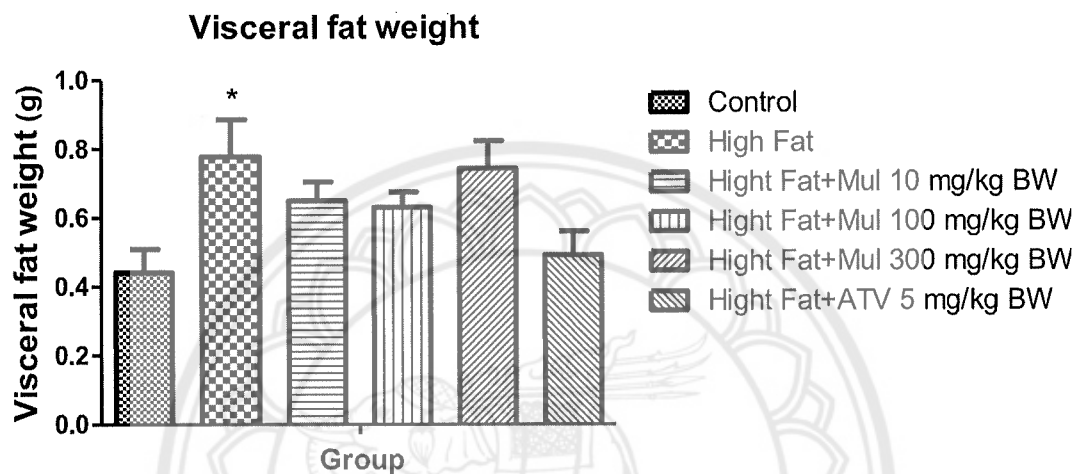
จากการวัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูแต่ละกลุ่ม พบว่าหลังจากหนูได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลาครบ 3 เดือน ค่าระดับน้ำตาลของหนูแต่ละกลุ่มในระยะเวลา 3 เดือนไม่แตกต่างจากช่วงเริ่มต้นการทดลอง (baseline) และไม่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. ของหนูไม่ค้กลุ่มละ 11 ตัว

2. ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อปริมาณไขมันในช่องท้อง

จากการเก็บปริมาณไขมันในช่องท้อง (visceral fat) ของหนูแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก พบว่าหลังจากหนูได้รับการป้อนสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลาครบ 3 เดือน ปริมาณไขมันในช่องท้องของหนูกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) มีปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 และ 300 mg/kg BW (HF+Mul 100 และ HF+Mul 300) และป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5) พบว่าปริมาณไขมันในช่องท้องลดลง (ภาพที่ 2)

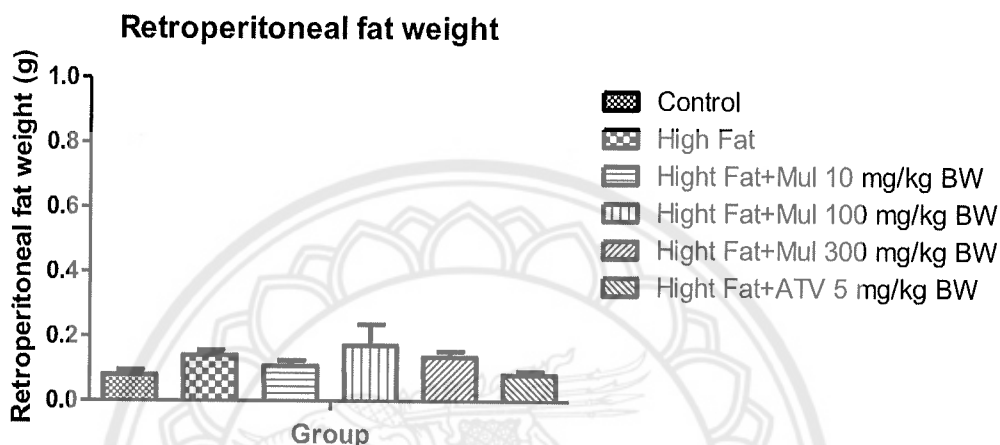


ภาพที่ 2 แสดงผลปริมาณไขมันในช่องท้องของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. ของหนูทดลองกลุ่มละ 11 ตัว

* มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

3. ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อปริมาณไขมันบริเวณด้านหลังช่องท้อง

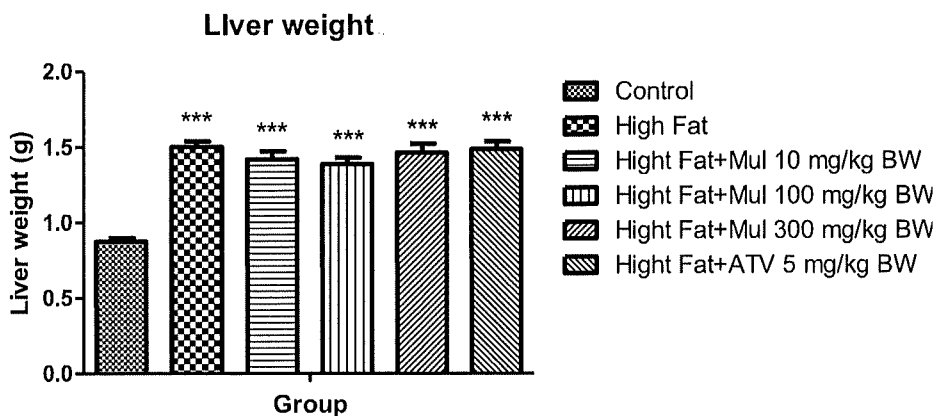
จากการเก็บปริมาณไขมันบริเวณด้านหลังช่องท้อง (retroperitoneal fat) ของหนูแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก พบว่าหลังจากหนูได้รับการป้อนสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลาครบ 3 เดือน ปริมาณไขมันไขมันบริเวณด้านหลังช่องท้อง ของหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงผลปริมาณไขมันบริเวณด้านหลังช่องท้องของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. ของหนูไม่ค้กลุ่มละ 11 ตัว

4. ผลของลูกหม่อนอบแห้งต่อน้ำหนักตับ

จากการเก็บตับ (liver) ของหนูแต่ละกลุ่มมาชั่งน้ำหนัก พบว่าหลังจากหนูได้รับการป้อนสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลาครบ 3 เดือน ปริมาณไขมันในช่องท้องของหนูกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) และได้รับการป้อนน้ำกลั่นหรือลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 หรือ 300 mg/kg BW รวมทั้งกลุ่มที่ป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW มีน้ำหนักของตับมากกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงผลน้ำหนักตับของหนูกลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (HF) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้องกันลูทหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้องกันลูทหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้องกันลูทหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300) กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้องกันยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5) ค่าที่แสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. ของหนูไม้ค้กลุ่มละ 11 ตัว

*** มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.001$

5. ผลของลูทหม่อนอบแห้งการศึกษาการดูดซึมสารผ่านผนังลำไส้ของหนูทดลอง

การศึกษาผลการดูดซึมสารสกัดลูทหม่อนผ่านผนังลำไส้ของหนูทดลองด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber นั้นได้เลือกศึกษาในหนูทดลองกลุ่มที่ไม่ได้รับการป้องกันสารสกัดลูทหม่อน ได้แก่ กลุ่มควบคุม (control group) ที่ได้รับอาหารปกติ และกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (Atherosclerosis group (HF)) ขั้นตอนการศึกษาได้นำลำไส้ส่วนต่าง ๆ ได้แก่ duodenum jejunum ileum colon จากหนูทดลอง มาซึ่งกึ่งกลางของ micro-Ussing chamber จากนั้นให้สารละลายไหลผ่านได้ทั้งสองด้านของผนังลำไส้ และ incubate นานประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเห็นสัญญาณค่าศักย์ไฟฟ้าที่คงที่ จากนั้นให้สารละลายลูทหม่อนอบแห้งความเข้มข้น 30 mg/100 ml ทางด้าน mucosa และดูดสารละลายทางด้าน serosa ตามระยะเวลาที่ 0, 5, 10, และ 30 นาที เพื่อนำไปวัดด้วยเครื่อง HPLC เพื่อตรวจวิเคราะห์ดูว่ามีสารละลายลูทหม่อนอบแห้งถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้หรือไม่ และดูดซึมมากน้อยเท่าไร ตามระยะเวลาที่กำหนด ในการส่งตัวอย่างไปตรวจวิเคราะห์ชุดแรกได้เลือกสารละลายตัวอย่างที่เก็บทางด้าน mucosa และ serosa จำนวนทั้งหมด 60 ตัวอย่าง โดยมีสารละลายลูทหม่อนอบแห้งที่เก็บจากด้าน mucosa จำนวน 6 ตัวอย่าง และสารละลายลูทหม่อนอบแห้งที่เก็บทางด้าน serosa ที่เวลา 5 นาที จำนวน 54 ตัวอย่าง จากกลุ่มควบคุม (N5 – N1) และกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว (A1-2, A7-11) ตามภาพที่ 5

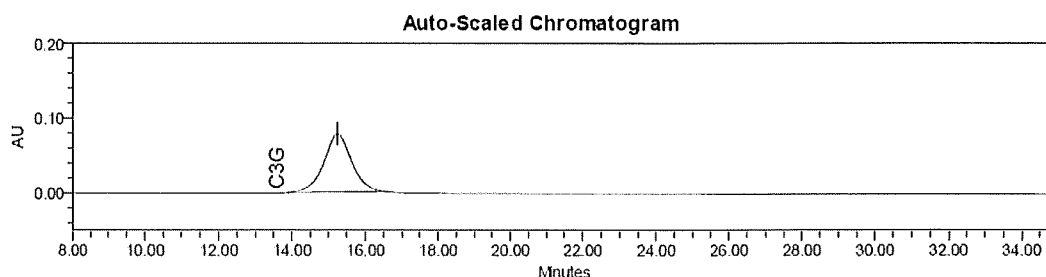
Sample Name	Date	D (Duodenum)	J (Jejunum)	I (Ilium)	C (Colon)
Serosal solution กลุ่ม N มี 28 ตัวอย่าง					
N5	10/6/62	N5, 5min, D	N5, 5min, J	N5, 5min, I	N5, 5min, C
N6	10/6/62	N6, 5 min, D	N6, 5 min, J	N6, 5 min, I	N6, 5 min, C
N7	11/6/62	N7, 5 min, D	N7, 5 min, J	N7, 5 min, I	N7, 5 min, C
N8	11/6/62	N8, 5 min, D	N8, 5 min, J	N8, 5 min, I	N8, 5 min, C
N9	19/6/62	N9, 5 min, D	N9, 5 min, J	N9, 5 min, I	N9, 5 min, C
N10	19/6/62	N10, 5 min, D	N10, 5 min, J	N10, 5 min, I	N10, 5 min, C
N11	28/6/62	N11, 5 min, D	N11, 5 min, J	N11, 5 min, I	N11, 5 min, C
Serosal solution กลุ่ม A มี 26 ตัวอย่าง					
A1	16/5/62	-	A1, 5 min, J	A1, 5 min, I	A1, 5 min, C
A2	16/5/62	-	A2, 5 min, J	A2, 5 min, I	A2, 5 min, C
A7	12/6/62	A7, 5 min, D	A7, 5 min, J	A7, 5 min, I	A7, 5 min, C
A8	12/6/62	A8, 5 min, D	A8, 5 min, J	A8, 5 min, I	A8, 5 min, C
A9	20/6/62	A9, 5 min, D	A9, 5 min, J	A9, 5 min, I	A9, 5 min, C
A10	20/6/62	A10, 5 min, D	A10, 5 min, J	A10, 5 min, I	A10, 5 min, C
A11	28/6/62	A11, 5 min, D	A11, 5 min, J	A11, 5 min, I	A11, 5 min, C

Mucosal side มี 6 ตัว

Sample Name	Date	1	2	3	4	5	6
June	-	10	15	16	19	20	28

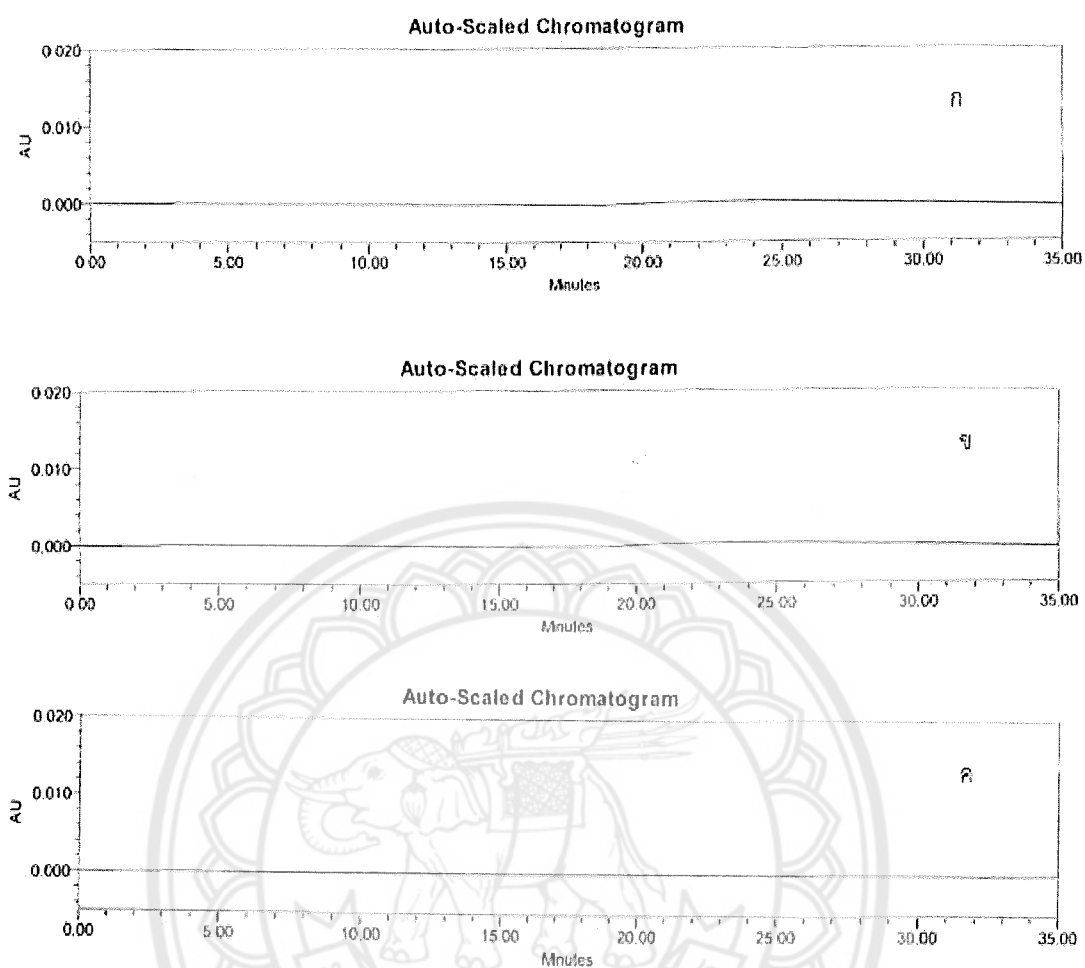
ภาพที่ 5 แสดงจำนวนและรหัสของตัวอย่างสารละลายลูกหมอนอบแห้งจำนวน 60 ตัวอย่างที่ส่งวิเคราะห์ด้วย HPLC ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

ผลการวิเคราะห์หาปริมาณสาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในสารละลายมาตรฐาน C3G ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลาย Ringer's solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร พบ peak ที่นาทีที่ 15 นาที ตามภาพที่ 6

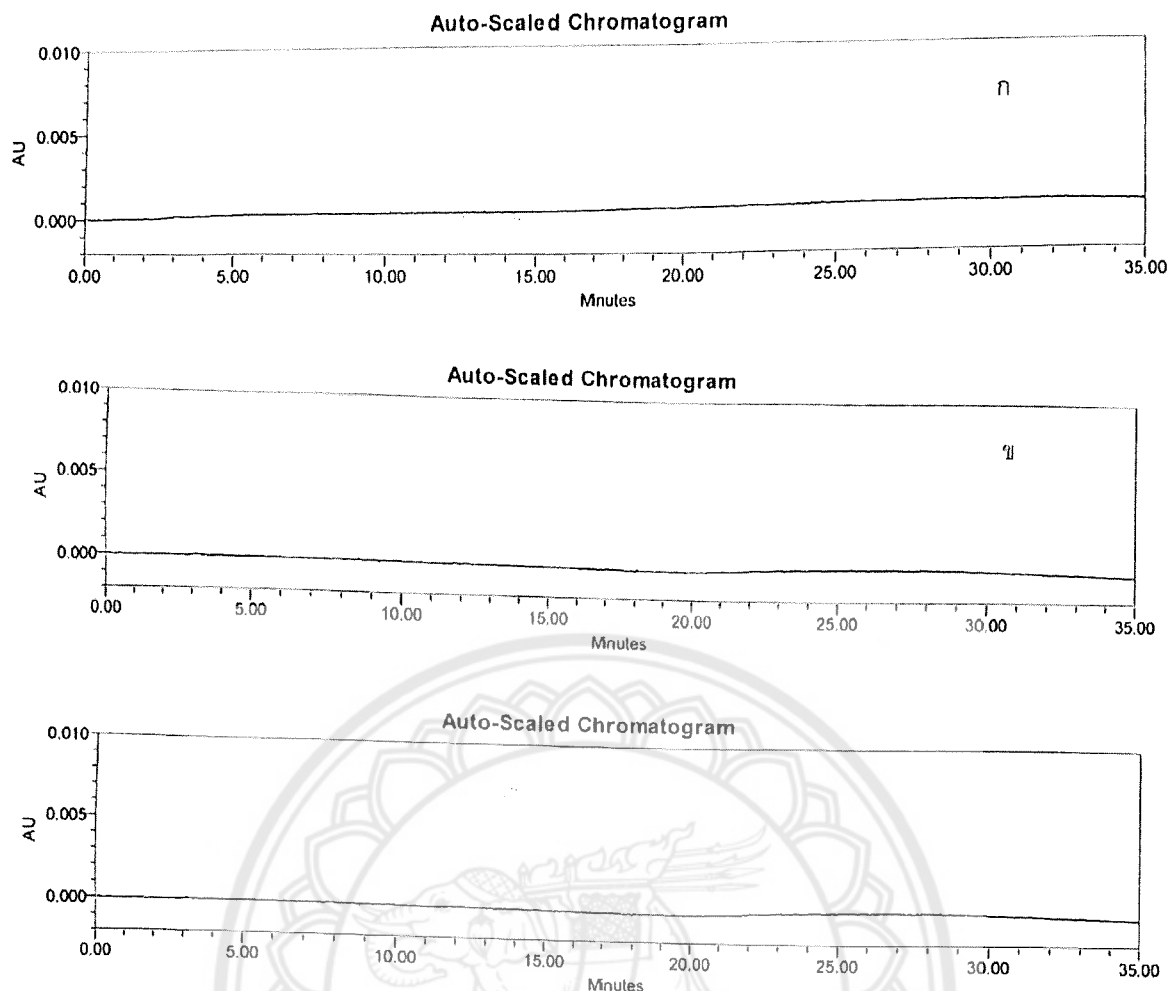


ภาพที่ 6 ภาพแสดงผลการตรวจวิเคราะห์หา Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในสารละลายมาตรฐาน C3G ความเข้มข้น 100 ppm ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ที่ละลายในสารละลาย Ringer's solution ปริมาตร 400 ไมโครลิตร

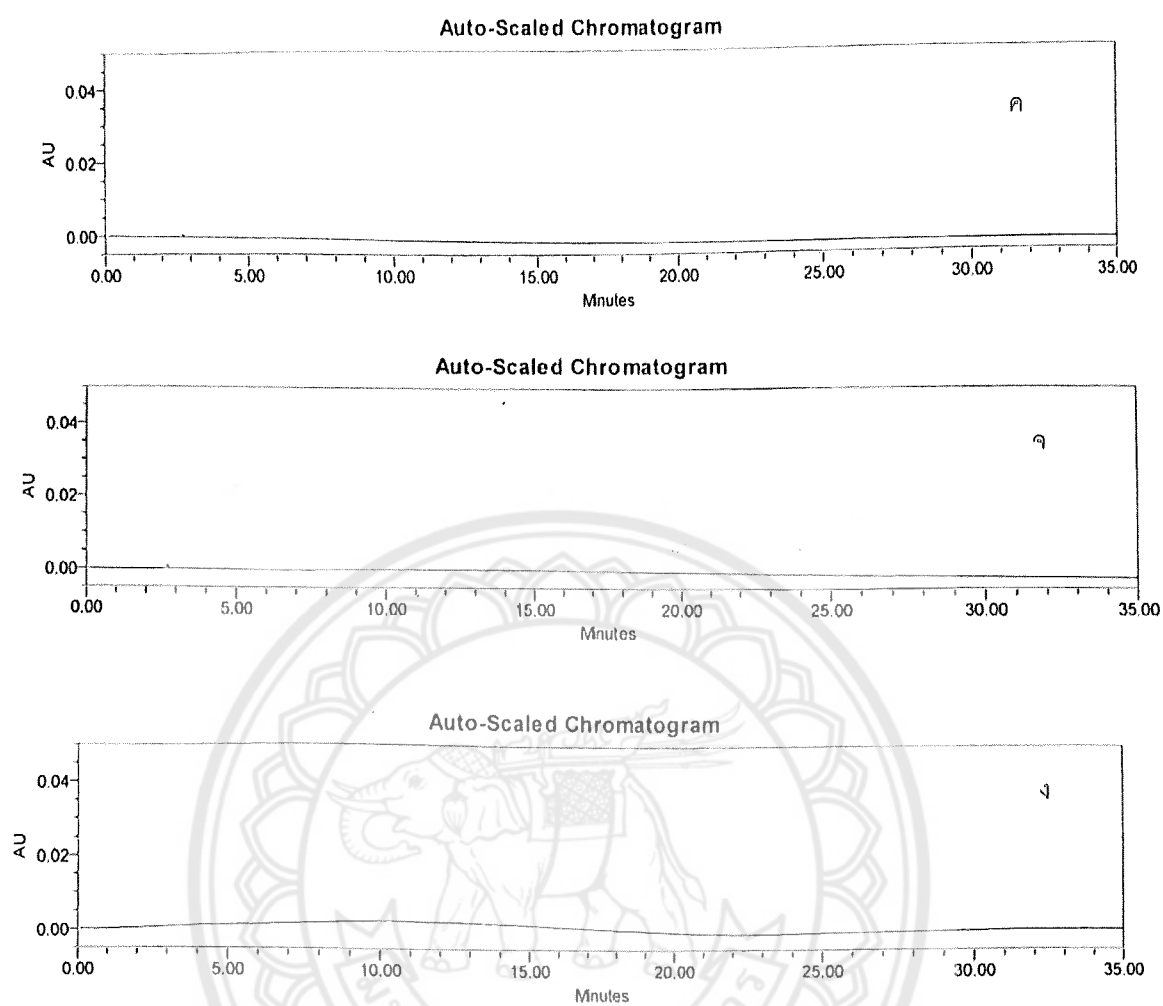
ผลการตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญในลูกหม่อนอบแห้ง คือ สาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในสารละลายลูกหม่อนอบแห้งนั้น ปรากฏว่าไม่พบสารใดใดเลยจากสารละลายลูกหม่อนอบแห้งที่เก็บจากทั้งด้าน mucosa และด้าน serosa ของผนังลำไส้ในทุกส่วน ดังแสดงในตัวอย่างภาพของสารละลายลูกหม่อนด้าน mucosa (ภาพที่ 7) และ สารละลายลูกหม่อนด้าน serosa (ภาพที่ 8 และ 9)



ภาพที่ 7 ภาพแสดงผลการตรวจวิเคราะห์หาสาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในตัวอย่างสารละลายที่เก็บจากด้าน mucosa ของผนังลำไส้ 3 ตัวอย่าง ที่เก็บในวันที่ 19 มิถุนายน (ก) วันที่ 20 มิถุนายน (ข) และวันที่ 15 มิถุนายน (ค)



ภาพที่ 8 ภาพแสดงผลการตรวจวิเคราะห์หาสาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในตัวอย่างสารละลายที่เก็บจากด้าน serosa ของผนังลำไส้ 3 ตัวอย่าง ของหนูกลุ่มที่กินอาหารปกติที่เก็บในวันที่ 10 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง N5, 5min, D (ก); วันที่ 19 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง N9, 5min, D (ข) และวันที่ 26 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง N11, 5min, D



ภาพที่ 9 ภาพแสดงผลการตรวจวิเคราะห์หาสาร Cyaniding-3-glucoside (C3G) ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ในตัวอย่างสารละลายที่เก็บจากด้าน serosa ของผนังลำไส้ 3 ตัวอย่าง ของหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูง (HF) ที่เก็บในวันที่ 12 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง A8, 5min, D (ค); วันที่ 20 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง A9, 5min, D (จ) และวันที่ 28 มิถุนายน รหัสตัวอย่าง A11, 5min, D (ง)

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การศึกษาผลของลูกหม่อนต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้อง และการดูดซึมสารสำคัญในลูกหม่อนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ส่วนต่าง ๆ ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงในโครงการวิจัยนี้ ใช้ลูกหม่อนอบแห้งที่ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) แล้วนำมาบดให้เป็นผงละเอียดและนำมาละลายน้ำเพื่อป้อนให้แก่หนูทดลองที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ด้วยการให้หนูทดลองกินอาหารที่ไขมันสูง [ส่วนประกอบของอาหารไขมันสูง มีดังนี้ โปรตีน (17.3% ต่อน้ำหนักรวม) คาร์โบไฮเดรต (46.9% ต่อน้ำหนักรวม) ไขมัน (21.2% ต่อน้ำหนักรวม) โดยมี cholesterol 12.5 g/kg คิดเป็น 0.2% ต่อน้ำหนักรวม และให้พลังงานทั้งสิ้น 4.5 kcal/g] เป็นระยะเวลา 3 เดือน จากผลการชั่งน้ำหนักตัวหนูทดลองพบว่าในเดือนแรกและเดือนที่สอง หนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว และกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงร่วมกับการได้รับสารละลายลูกหม่อนอบแห้งที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 300 mg/kg น้ำหนักตัว รวมทั้งหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงและได้รับยาลดไขมัน atorvastatin 5 mg/kg น้ำหนักตัว นั้นมีน้ำหนักตัวมากกว่ากลุ่มที่กินอาหารปกติ [ส่วนประกอบของอาหารปกติ มีดังนี้ โปรตีน (18.6% ต่อน้ำหนักรวม) ไขมัน (6.2% ต่อน้ำหนักรวม) คาร์โบไฮเดรต (44.2% ต่อน้ำหนักรวม) โดยปราศจาก cholesterol และให้พลังงานทั้งสิ้น 3.1 kcal/g] ส่วนในเดือนที่สามหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างเดียว และหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงและได้รับยาลดไขมัน atorvastatin 5 mg/kg น้ำหนักตัว มีแนวโน้มของน้ำหนักตัวลดลง ในขณะที่กลุ่มอื่น ๆ มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมปกติ แต่ทั้งนี้ น้ำหนักตัวของหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีค่ามากกว่ากลุ่มอื่น ส่วนผลของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในหนูทดลองทุกกลุ่มตลอดระยะเวลา 3 เดือน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการให้หนูทดลองกินอาหารไขมันสูงที่ประกอบด้วยปริมาณไขมันรวมและมี cholesterol ที่สูงกว่าอาหารปกติ โดยที่ปริมาณน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตไม่ได้สูงกว่าอาหารปกติมากนักนั้น ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของรายงานวิจัยอื่น ๆ ที่ชักนำให้หนูทดลองสายพันธุ์เดียวกัน (mice สายพันธุ์ C57BL) เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดด้วยการกินอาหารไขมันสูง

ผลการศึกษาปริมาณไขมันที่พบในช่องท้อง ซึ่งแบ่งไขมันออกเป็น 2 ส่วน ตามตำแหน่งที่พบ คือ ไขมันในช่องท้องทางด้านหน้าลำไส้ (visceral fat) และไขมันที่พบทางด้านหลัง (retroperitoneal fat) พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงมีปริมาณ visceral fat สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่กินอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และหนูกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงร่วมกับการป้อนสารละลายลูกหม่อนอบแห้ง หรือ ยา atorvastatin นั้นมีปริมาณ visceral fat ที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ยังมีแนวโน้มของปริมาณไขมันที่มากกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารละลายลูกหม่อนอบแห้งที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ คือ 10, 100 และ 300 mg/kg BW สามารถช่วยลดการสะสมของไขมันในช่องท้องได้ดีเทียบเท่ายาลดไขมัน atorvastatin 5 mg/kg BW ส่วนปริมาณไขมันในส่วน retroperitoneal fat นั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในหนูทดลองทุกกลุ่ม ผลการศึกษานี้สะท้อนให้เห็นว่า การให้หนูทดลองกินอาหารไขมันที่สูงในระยะเวลา 3 เดือนนั้น ยังไม่ส่งผลให้มีการสะสมของไขมันในช่องท้องด้านหลัง ไขมันที่พบในบริเวณนี้ส่วนใหญ่เป็นไขมันที่พบสะสมเหนือไตซึ่งโดยปกติจะพบน้อย แต่จะสามารถพบได้มากขึ้นได้ในกรณีที่มีปริมาณไขมันในร่างกายเกินปกติในปริมาณที่สูงมาก

ผลการศึกษาหน้าหนังกัดในหนูทดลอง พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูงทุกกลุ่มมีน้ำหนักของตับมากกว่าหนูทดลองที่กินอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการได้รับการป้อนสารละลายลูกหม่อนอบแห้ง หรือ ยา atorvastatin ไม่มีผลช่วยในเรื่องการลดน้ำหนักของตับแต่อย่างใด ผลการศึกษานี้มีความ

สอดคล้องกับผลการศึกษาปริมาณ visceral fat ที่พบว่าปริมาณสูงขึ้นในหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารไขมันสูง สะท้อนให้เห็นว่าปริมาณไขมันจากอาหารที่ได้รับมากเกินไป จะมีการสะสมที่ตับและบริเวณช่องท้อง การที่มีปริมาณไขมันสะสมในตับมากเกินไปจะส่งผลให้เซลล์ตับเกิดการอักเสบ ส่งผลให้เกิดภาวะตับแข็ง (cirrhosis) และอาจกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด การได้รับสารละลายลูกหม่อนอบแห้งสามารถช่วยลดปริมาณไขมันในช่องท้องได้แต่ไม่สามารถช่วยลดการสะสมของไขมันในตับได้

ผลการศึกษาคัดขีมหาสารละลายลูกหม่อนอบแห้งผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ด้วยชุดอุปกรณ์ micro-Ussing chamber นั้นเป็นการจำลองสถานการณ์ของการกินสารละลายลูกหม่อนอบแห้ง โดยการนำชิ้นส่วนของลำไส้ส่วนต่าง ๆ ทั้งลำไส้เล็กที่แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ duodenum jejunum และ ileum รวมทั้งลำไส้ใหญ่ ออกจากตัวหนูทดลอง และนำมาซึ่งในตำแหน่งกึ่งกลางของ micro-Ussing chamber และให้มีสารละลายลูกหม่อนอบแห้งไหลผ่านผนังลำไส้ด้าน mucosa ซึ่งเป็นการจำลองเสมือนว่าอาหารอยู่ในโพรงลำไส้ เมื่อมีการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่ร่างกาย สารนั้นจะข้ามผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ไปอีกด้านหนึ่งที่เรียกว่า ด้าน serosa ซึ่งจากชุดอุปกรณ์นี้สามารถเก็บตัวอย่างสารละลายทางด้าน serosa ได้ จากผลการศึกษาที่ได้เก็บตัวอย่างสารละลายลูกหม่อนอบแห้งทางด้าน serosa ที่ระยะเวลา 5 นาที จากหนูทดลองกลุ่มที่กินอาหารปกติและหนูทดลองที่กินอาหารไขมันสูง แล้วนำสารละลายลูกหม่อนที่เก็บได้นี้ส่งตรวจวิเคราะห์หาสารสำคัญที่พบมากในลูกหม่อน คือ สาร C3G (Cyaniding-3-glucoside) ด้วยเครื่อง HPLC (high performance liquid chromatography) นั้น ปรากฏว่าไม่พบสารใดเลย จากผลการศึกษานี้อาจเนื่องมาจากการที่ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC ได้ทันที เนื่องจากมีคิวการใช้นานยาวนานมาก ต้องเก็บตัวอย่างสารละลายลูกหม่อนไว้นานประมาณ 6-7 เดือน ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นสาเหตุของการตรวจไม่พบสารใดเลย และอีกประการหนึ่งอาจเกิดเนื่องจากว่าสาร C3G นี้ซึ่งเป็นสารสำคัญในกลุ่มแอนโทไซยานิน (anthocyanin) นั้นมีความเสถียรในสภาวะที่เป็นกรด ที่มีค่า pH ≤ 3 แต่สารละลาย Ringer's solution ที่ใช้ในละลายลูกหม่อนอบแห้งในการศึกษานี้มีค่า pH = 7.4 จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งในการเร่งความไม่เสถียรของสาร C3G ได้ แต่ทั้งนี้คาดว่าน่าจะเป็นผลมาจากการเก็บตัวอย่างสารละลายไว้นานเกินไป เพราะได้ทดสอบด้วยการเตรียมสารละลายลูกหม่อนในสารละลาย Ringer's solution ขึ้นใหม่ด้วยวิธีการเดียวกันกับที่เตรียมในการศึกษาวิจัย จากนั้นทำการวิเคราะห์หาสาร C3G ด้วยขั้นตอนที่เหมือนกัน ปรากฏว่าพบสาร C3G ในสารละลายลูกหม่อนที่ถูกเตรียมใหม่และตรวจวิเคราะห์ทันที

บทที่ 6 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

โครงการวิจัยนี้ได้วางแผนการศึกษาโดยวางแผนใช้สัตว์ทดลองร่วมกับโครงการย่อยที่ 1 และในช่วงต้นของการทดลอง หนูในกลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือด atorvastatin มีการตาย ทำให้ผู้วิจัยต้องปรับวิธีการและต้องส่งหนูทดลองมาเพิ่มเพื่อให้จำนวนหนูทดลองในกลุ่มนี้เท่ากับหนูทดลองกลุ่มอื่น ๆ เพื่อให้ได้ข้อมูลครบถ้วนและสามารถคำนวณผลการศึกษาให้ได้ค่าทางสถิติที่แม่นยำและเชื่อถือได้ ซึ่งส่งผลให้ระยะเวลาทั้งหมดของการชักนำให้หนูทดลองเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งได้ครบจำนวนที่วางแผนไว้ทุกกลุ่มนั้นใช้เวลาศึกษาทดลองมากกว่า 3 เดือน ส่งผลให้ระยะเวลาการศึกษาการดูดซึมสารละลายลูกหม่อนผ่านเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber เลื่อนขยายเวลาออกไปด้วย นอกจากนั้นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณสารสกัดลูกหม่อน คือ เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) นั้นมีจำกัด และมีนักวิจัยหลายท่านใช้ในการศึกษาวิจัยส่งผลให้ต้องมีการจัดคิวการเข้าใช้เครื่องมือ ซึ่งเวลาที่ได้คิวใช้เครื่องมือกับเวลาที่เก็บตัวอย่างสารละลายลูกหม่อนอบแห้งจากการศึกษาด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ที่ต้องทำการศึกษาทันทีเมื่อครบระยะเวลาการเลี้ยงสัตว์ทดลอง 3 เดือน ตามแผนการทดลองนั้น ไม่สอดคล้องกัน ทำให้ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ทันที ต้องเก็บตัวอย่างสารละลายลูกหม่อนอบแห้งไว้ที่ตู้แช่เย็นที่รักษาอุณหภูมิที่ -80°C เป็นเหตุทำให้สารสำคัญในลูกหม่อนสลายไป จึงตรวจไม่พบตามที่วางแผนไว้

งานวิจัยที่วางแผนเพิ่มเติมของโครงการวิจัยย่อยที่ 2 นี้ เป็นการศึกษาผลของสารละลายลูกหม่อนอบแห้งต่อลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของผนังลำไส้ในส่วนต่าง ๆ ของหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับการป้อนสารละลายลูกหม่อนอบแห้ง เทียบกับกลามควบคุมที่ได้รับอาหารปกติ เพื่อศึกษาผลของสารละลายลูกหม่อนอบแห้งว่ามีผลเปลี่ยนแปลงช่วยลดพยาธิสภาพที่อาจเกิดขึ้นและมักพบจากการกินไขมันสูงได้หรือไม่

เอกสารอ้างอิง

1. Nishina PM, Verstyft J, Paigen B. Synthetic low and high fat diets for the study of atherosclerosis in the mouse. *J Lipid Res.* 31: 859-869, 1990.
2. Nishina PM, Lowe S, Verstyft J, Naggert JK, Kuypers FA, Paigen B. Effects of dietary fats from animal and plant sources on diet-induced fatty streak lesions in C57BL/6J mice. *J Lipid Res.* 34: 1413-1422, 1993.
3. Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, Vidal JM, Vorstenbosch C. A Good Practice Guide to the Administration of Substances and Removal of Blood, Including Routes and Volumes. *J Appl Toxicol* 2001; 21: 15-23.
4. Dwivedi S., Srivastava S. and Dwivedi G. 2006. Smoking associated with malignancy, hypertension, chronic obstructive pulmonary disease and concurrent coronary artery disease: report of nine cases. *Indian J Chest Dis Allied Sci.* Vol. 48(3):213-6.
5. Esper R. J., Nordaby R. A., Vilariño J. O., Paragano A., Cacharrón, J. L. and Machado R. A. 2006. Endothelial dysfunction: a comprehensive appraisal. *Cardiovascular Diabetology.* 5:4 doi: 10.1186/1475-2840-5-4.
6. Félétou M. and Vanhoutte P. M. 2006. Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291:985-1002. doi:10.1152/ajpheart.00292.2006.
7. Khazaei M., Moien-afshari F. and Laher I. 2008. Vascular endothelial function in health and diseases. *Pathophysiology.* Vol. 15: 49-67.
8. Kleemann R., Zadelaar S. and Kooistra T. 2008. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovascular Research* (Vol. 79:360-376. doi:10.1093/cvr/cvn120.
9. Li X., Liu Y., Zhang H., Ren L., Li Q., Li N. 2011. Animal models for the atherosclerosis research: a review. *Protein Cell* Vol. 2(3): 189-201.
10. Mitra S., Deshmukh A., Sachdeva R., Lu J. and Mehta J. L. 2011. Oxidized Low-Density Lipoprotein and Atherosclerosis Implications in Antioxidant Therapy. *The American Journal of the Medical Sciences* 342:2.
11. Pereira I.A. and Borbáb E.F. 2008. The role of inflammation, humoral and cell mediated autoimmunity in the pathogenesis of atherosclerosis. *SWISS MED WKLY* 20 08;138(37-38):534-539.
12. Rhee M.Y., Na S.H., Kim Y.K., Lee M.M. and Kim H.Y. 2007. Acute effects of cigarette smoking on arterial stiffness and blood pressure in male smokers with hypertension. *Am. J. Hypertens.* 20(6):637-41.
13. Shao B. and Heinecke J.W. 2009. HDL, lipid peroxidation, and atherosclerosis. *Journal of Lipid Research* Volume 50. DOI 10.1194/jlr.E900001-JLR200.

14. WHO: Global burden disease 2004 report update
(http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/2004_report_update/en/index.html
)
15. Ferrari R. The role of TNF in cardiovascular disease. *Pharmacol Res.* 1999 ;40(2):97-105.
16. Sack M. Tumor necrosis factor-alpha in cardiovascular biology and the potential role for anti-tumor necrosis factor-alpha therapy in heart disease. *Pharmacol Ther.* 2002;94(1-2):123-35.
17. Kleinbongard P, Heusch G, Schutz R. TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther.* 2010;127(3):295-314.



ภาคผนวก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่
ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ



แผนการดำเนินงาน (สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ และแผนงานที่แสดงในลักษณะ Gantt Chart)

โครงการย่อยที่ 2 ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้องและการดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อผนังลำไส้ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

วัตถุประสงค์	กิจกรรม (ที่ระบุไว้ตามสัญญา)	กิจกรรมที่ดำเนินการจริง
<p>เพื่อศึกษาผลของลูกหม่อนอบแห้งในหนูที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งจากการได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง โดยมุ่งเน้นศึกษาในประเด็นต่างๆ ดังนี้</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันสะสมในช่องท้อง 2. ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด 3. การดูดซึมสารสกัดลูกหม่อนผ่านเยื่อผนังลำไส้ 	<ol style="list-style-type: none"> 1. สั่งซื้อวัสดุต่างๆ และสั่งทำชุดอุปกรณ์ต่อสายดินเพื่อตัดกรองสัญญาณไฟฟ้ารบกวนสำหรับใช้ประกอบกับชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber 2. สั่งซื้ออาหารสัตว์ทดลองและสั่งสารเคมี 3. สั่งซื้อสัตว์ทดลอง 4. ชักนำหนูให้อยู่ในภาวะ atherosclerosis และป้อนสารสกัดให้สัตว์ทดลอง 5. วัดและเก็บผลการทดลอง เช่น ปริมาณอาหารที่หนูทดลองกิน น้ำหนักตัว น้ำตาลในเลือด ปริมาณไขมันในช่องท้อง เป็นต้น 6. วิเคราะห์ผลการทดลองข้างต้น 7. ศึกษาการดูดซึมสารสกัดผ่านเยื่อผนังลำไส้ 8. วิเคราะห์ผลการดูดซึมสารสกัดผ่านเยื่อผนังลำไส้ด้วย HPLC 9. จัดทำรายงานสรุปผลการวิจัย 	<p>ดำเนินงานตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้ แต่ล่าช้ากว่ากำหนด</p>

ผลที่คาดว่าจะได้รับ (แบ่งเป็นราย 6 เดือน)

เดือนที่	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
6 เดือนที่ 1	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว ระดับ น้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่อง ท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat และศึกษาการดูด ซึมสารสำคัญที่พบมาก ในลูกหม่อนอบแห้งผ่าน เยื่อผนังลำไส้ ด้วยชุด อุปกรณ์ continuously perfused micro- Ussing chamber	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) โดยศึกษาน้ำหนักตัว และระดับน้ำตาล กลูโคสในเลือด	ได้ค่าน้ำหนักตัวและค่า ระดับน้ำตาลกลูโคสใน เลือดของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ใน แผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) โดยศึกษาปริมาณไขมัน ในช่องท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat	ได้ค่าปริมาณไขมันในช่อง ท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat ของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ใน แผน และได้ผลน้ำหนัก ของตับเพิ่มเติม
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการดูดซึมสารสำคัญ ที่พบมากในลูกหม่อน อบแห้งผ่านเยื่อผนัง ลำไส้ ด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro- Ussing chamber	ได้ตัวอย่างสารละลายลูก หม่อนอบแห้งที่เก็บจาก การศึกษาด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro- Ussing chamber ในหนูทุกกลุ่ม ในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด และนำไปส่งตรวจ วิเคราะห์สารสำคัญด้วย เครื่อง HPLC ที่ วว.	ได้ตัวอย่างสารละลายลูก หม่อนอบแห้งที่เก็บจาก การศึกษาด้วยชุด อุปกรณ์ continuously perfused micro- Ussing chamber แต่ไม่ สามารถส่งตรวจได้ทันที เนื่องจากเครื่องมือไม่ พร้อมให้ใช้งานได้เพราะ มีคิวรอการใช้อยู่ก่อน หน้าหลายคิว ทำให้เกิด ความล่าช้าของแผนงาน
6 เดือนที่ 2	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อน้ำหนักตัว ระดับ น้ำตาลกลูโคสในเลือด ปริมาณไขมันในช่อง ท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat และศึกษาการดูด ซึมสารสำคัญที่พบมาก	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม) โดยศึกษาน้ำหนักตัว และระดับน้ำตาล กลูโคสในเลือด	ได้ค่าน้ำหนักตัวและค่า ระดับน้ำตาลกลูโคสใน เลือดของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ใน แผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม)	ได้ค่าปริมาณไขมันในช่อง ท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat ของหนูทุกกลุ่มใน	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ใน แผน และได้ผลน้ำหนัก ของตับเพิ่มเติม

<p>ในลูกหมอนอบแห้งผ่านเยื่อพูนังลำไส้ ด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber</p>	<p>โดยศึกษาปริมาณไขมันในช่องท้อง ได้แก่ visceral fat and retroperitoneal fat</p>	<p>จำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด</p>	
	<p>ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยแบ่งสัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการดูดซึมสารสำคัญที่พบมากในลูกหมอนอบแห้งผ่านเยื่อพูนังลำไส้ ด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber</p>	<p>ได้ตัวอย่างสารละลายลูกหมอนอบแห้งที่เก็บจากการศึกษาด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber ในหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (5 ตัวต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด และนำไปส่งตรวจวิเคราะห์สารสำคัญด้วยเครื่อง HPLC ที่ วว.</p>	<p>ได้ตัวอย่างสารละลายลูกหมอนอบแห้งที่เก็บจากการศึกษาด้วยชุดอุปกรณ์ continuously perfused micro-Ussing chamber แต่ไม่สามารถส่งตรวจได้ทันทีเนื่องจากเครื่องมือไม่พร้อมให้ใช้งานได้เพราะมีคิวรอการใช้อยู่ก่อนหน้าหลายคิว ทำให้เกิดความล่าช้าของแผนงาน</p>
	<p>วิเคราะห์ผลทางสถิติ</p>	<p>ทำรายงานการทดลอง</p>	<p>จัดทำรายงานได้การทดลองล่าช้ากว่ากำหนด</p>



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสารสกัดลูกหม่อนเพื่อลดความเสี่ยง
ภาวะไขมันผิดปกติ หลอดเลือดแดงแข็งและหัวใจขาดเลือด

โครงการย่อยที่ 3

ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อลักษณะจุลกายวิภาคและการแสดงออกของ immediate early
response 3 (IER-3) ในหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่และตับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและ
น้ำตาลสูง

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.รัชนี ชนะสงค์ (หัวหน้าโครงการ)

2. ผศ.ดร.กรรณิการ์ อรรถปิ่นยวนิช

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย
นเรศวร

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัย
นเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน (บูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 3:

ชื่อภาษาไทย	ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อลักษณะจุลกายวิภาคและการแสดงออกของ immediate early response 3 (IER-3) ในหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่และตับ ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effect of mulberry fruit extract on histology and expression of immediate early response 3 (IER3) in heart, aorta and liver of mice fed with high fat and high sugar diet
หัวหน้าโครงการ	ผศ.รัชณี ชนะสงค์
ระยะเวลาที่ทำวิจัย	1 ปี

บทคัดย่อ

ภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) ทำให้เกิดพยาธิสภาพกับอวัยวะของระบบหัวใจและหลอดเลือด และมีเกิดการสะสมไขมันในตับ (steatosis) โดยกลไกการเกิดพยาธิสภาพสัมพันธ์กับ oxygen species ใน mitochondria (mROS) ทำให้เกิด inflammation ตามมา IER3 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองระดับเซลล์ที่มีความสำคัญ เช่น cell proliferation, migration, apoptosis และ ของ inflammation หม่อน (mulberry) ซึ่งมี anthocyanin เป็นสารสำคัญ และผงลูกหม่อนอบแห้งมีฤทธิ์ต้านหลอดเลือดแข็ง (anti-atherosclerotic effect) ทั้งนี้ฤทธิ์ของผงลูกหม่อนอบแห้งจะทำให้หลอดเลือด หัวใจ และตับ ในภาวะ hyperlipidemia ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิด atherosclerosis นั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคอย่างไรและกลไกการออกฤทธิ์ จะสัมพันธ์กับการแสดงออกของ IER3 อย่างไร จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของผงลูกหม่อนอบแห้งในหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hyperlipidemia ด้วยอาหารไขมันสูง (High fat diet; HF) ร่วมกับการป้อนผงลูกหม่อนอบแห้ง (Dry mulberry powder; DMP) เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยมีกลุ่มทดลองจำนวน 6 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว คือ กลุ่มควบคุม กลุ่ม HF กลุ่ม HF+Mul10 mg/kg BW กลุ่ม HF+Mul100 mg/kg BW กลุ่ม HF+Mul300 mg/kg BW และ HF+ATV5 (atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW) ศึกษาด้วยการย้อม Masson's trichrome, IER3 และ α SMA immunohistochemistry ผลการศึกษาพบว่าผนังหลอดเลือด (aortic wall thickness; tunica intima และ media) กลุ่ม HF มีความหนาที่สุด และมีปริมาณสะสมของ collagen มากที่สุด และพบการแสดงออกลดลงของ IER3 รวมทั้ง α SMA ใน VSMC ร่วมด้วย หัวใจของกลุ่ม HF มีการหนาตัวของผนัง (cardiac wall thickness) ของ left ventricle ร่วมกับ hypertrophy cardiomyocytes พบ liver ของกลุ่ม HF มีการสะสมของไขมันในตับ (lipid accumulation in liver) และมี % of fibrosis มากที่สุด นอกจากนั้นพบ liver กลุ่ม HF มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ IER3 เมื่อได้รับ DMP ในขนาดที่แตกต่างกัน พบว่า กลุ่ม HF+Mul10 mg/kg BW มีลักษณะจุลกายวิภาคของหลอดเลือดที่ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับ DMP ในขนาดอื่น ๆ ร่วมกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้ง IER3 และ α SMA ของ VSMC มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ในตับพบว่ากลุ่ม HF+Mul10 mg/kg

BW มีลักษณะจุลกายวิภาคที่ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับ DMP ในขนาดอื่น ๆ แต่พบการแสดงออกที่ลดลงของ IER3 มากกว่ากลุ่มอื่น ๆ ร่วมด้วย ในขณะที่ ตับพบการแสดงออกของ IER3 ที่ลดลงในกลุ่ม HF+Mul10 mg/kg BW และที่ได้รับในขนาดอื่น ๆ มีการแสดงออกที่ลดลงของ IER3 และมีลักษณะจุลกายวิภาคของ ตับที่ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับในขนาดอื่น ๆ เช่นกัน ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่ผงลูกหม่อนอบแห้งมีฤทธิ์ anti-arteriosclerosis ในหลอดเลือด และ anti-steatosis ในตับ ที่เป็นผลจาก anti-inflammation โดยอาจจะ มีกลไกการออกฤทธิ์ ที่ต้องอาศัยการทำงานของ IER3 ที่แตกต่างกันของหลอดเลือด และตับ แต่อย่างไรก็ตามเป็นการทำงานของ IER3 ในการออกฤทธิ์ anti- inflammation ของผงลูกหม่อนอบแห้ง ทั้งนี้การศึกษา signaling pathway ของ IER3 จึงมีความจำเป็น ต่อการเข้าใจการออกฤทธิ์ของลูกหม่อนต่อไป

คำสำคัญ: ลูกหม่อน ไขมันในเลือด หลอดเลือดแข็ง อาหารไขมันสูง



Abstract

Hyperlipidemia can wreak a havoc on the cardiovascular organs and induce steatosis. The pathological mechanism of hyperlipidemia is related to the reactive oxygen species in mitochondria (mROS) which causes inflammation. IER3 is a cellular protein that acts immediately early in response to stimuli and is involved in significant cellular responses such as cell proliferation, migration, apoptosis and inflammation. *Morus alba* (mulberry) which contains anthocyanin as its key bioactive component was found that the extract from the fruit has an anti-atherosclerotic effect. Whether the mulberry fruit extract would have the effects on arteries, heart, liver in condition of hyperlipidemia, a leading cause of atherosclerosis, by showing evidence in histological changes and whether its mechanism is related to the expression of IER3 protein is under investigated. C57BL/6 mice were induced hyperlipidemia by giving high fat diet (HF) for 3 months. Animals were divided into 6 groups, of n= 5 in each group, composing of the Control group, the High Fat diet (HF) group, the HF+Mul10 mg/kg BW group, the HF+Mul100 mg/kg BW group, the HF+Mul300 mg/kg BW group, and the positive control HF+ATV5 (atorvastatin 5 mg/kg BW) group. The aortic, heart, and liver sections of all animals were investigated with Masson's trichrome, IER3, and α SMA immunohistochemistry techniques. The study showed that the aortic wall thickness; namely the tunica intima and tunica media of the HF group was significantly thickened and showed the highest collagen deposition. This was accompanied with lower expressions of IER3 and α SMA in VSMC. The hearts of HF group showed increased cardiac wall thickness of left ventricle together with hypertrophy of cardiomyocytes. The livers of HF group showed liver lipid accumulation and contained highest percentage of fibrosis. In addition, the HF livers showed higher expression of IER3. In the groups receiving various doses of dried mulberry powder, the HF+Mul10 mg/kg BW group showed the best recovery of aortic histological pathology than the other groups which showed higher expression of IER3 and α SMA of VSMC. In the liver, the HF+Mul10 mg/kg BW group showed reduced expression of IER3 together with a better recovery of liver. As a result, "the anti-arteriosclerotic effect" and the anti-steatosis of dried mulberry powder were shown histologically in this study. The mechanism might involve differential action of IER3 at aorta and liver. However, the anti-arteriosclerotic effect and anti-steatosis effect could result from the anti-inflammation of the dried mulberry powder. Further study in the signaling pathway of IER3 is necessary and will reveal the role of IER3 in the action of active ingredient from mulberry.

Keywords: mulberry, IER3, dyslipidemia, high fat diet, atherosclerosis

บทที่ 1 บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

รายงานสถานการณ์โรคไม่ติดต่อ (Non-communicable diseases: NCDs) ฉบับที่ 2 “KICK OFF TO THE GOALS” ปี 2557 กล่าวว่ากลุ่มโรคไม่ติดต่อเป็นสาเหตุการตายของประชากร 38 ล้านคนทั่วโลกในแต่ละปี ทำให้เกิดการตายก่อนวัยอันควรโดยเฉพาะในกลุ่มประเทศที่มีรายได้ต่ำและปานกลางในโลก องค์การอนามัยโลกได้กำหนด 9 global NCD targets สำหรับติดตามความก้าวหน้าในการแก้ปัญหาในกลุ่มโรค NCDs ซึ่งประกอบด้วย 9 เป้าหมายหลัก และ 25 ตัวชี้วัด ที่จะต้องบรรลุใน พ.ศ. 2568 โรคหัวใจและหลอดเลือดเป็นหนึ่งใน 4 โรคหลักของกลุ่มโรค NCDs ที่องค์การอนามัยโลกให้ความสำคัญในการป้องกันและควบคุมอย่างเร่งด่วน ซึ่งมีปัจจัยที่ก่อโรคที่สำคัญ 4 ปัจจัย คือ 1) ภาวะไขมันในเลือดสูง (dyslipidemia) 2) ภาวะความดันโลหิตสูง (hypertension) 3) ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) 4) ภาวะน้ำหนักเกินและอ้วน (overweight and obesity) สถานการณ์โรคหัวใจและหลอดเลือดของประเทศไทย สำนักงานโรคไม่ติดต่อ ปี 2559 กรมควบคุมโรค กระทรวงสาธารณสุข ได้รายงานว่ามีผู้เสียชีวิตอายุ 30-70 ปี มีความน่าจะเป็นของการเสียชีวิตจากโรคหัวใจขาดเลือด 34 คน ใน 100,000 คน ภาวะความดันโลหิตสูง 32 คน ใน 100,000 คน และได้รายงานข้อมูลแนวโน้มความชุกของปัจจัยเสี่ยงและพฤติกรรมเสี่ยงโรคไม่ติดต่อระหว่าง พ.ศ. 2548 ถึง พ.ศ. 2558 พบว่าความชุกของภาวะน้ำหนักเกินและภาวะอ้วน มีความชุกเพิ่มสูงขึ้น ล่าสุดในปี 2558 พบว่าความชุกของภาวะน้ำหนักเกินเพิ่มขึ้น 30.5% และภาวะอ้วน 7.5 % เป็นผลมาจากคนไทยมีพฤติกรรมการชอบบริโภคอาหารที่มีไขมันสูงร่วมกับอาหารที่มีน้ำตาลสูง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดภาวะของไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis; AS) ซึ่งนำไปสู่การเป็นโรคหัวใจขาดเลือดได้ และทำให้คนไทยเสียชีวิต เป็นอันดับต้น ๆ และนอกจากนั้นยังเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะไขมันคั่งสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากสาเหตุการดื่มสุรา (Non-Alcoholic Fatty Liver Disease ; NAFLD) ทั้งนี้มีรายงานการศึกษาต่าง ๆ ที่พยายามอธิบายกลไกของพยาธิวิทยากำเนิด (pathogenesis) โดย IER3 หรือ IEX-1 เป็นโปรตีนหนึ่งที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองในระดับเซลล์ ได้แก่ cellular stress response, cell proliferation, migration, apoptosis และ inflammation และพบว่ามีความสัมพันธ์กับ pathogenesis ของการเกิด AS และ NAFLD

ปัจจุบันคนไทยได้หันมาใส่ใจกับการดูแลสุขภาพด้วยผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติได้แก่ พืชสมุนไพร หรือผักผลไม้ ที่มีองค์ประกอบสำคัญช่วยในการรักษาโรคต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้น สารแอนโทไซยานิน (anthocyanin) เป็นรงควัตถุ น้ำเงิน ม่วง และแดง ที่พบได้ในพืช ผัก ผลไม้หลายชนิดรวมทั้งลูกหม่อน สาร anthocyanins มีคุณสมบัติละลายน้ำได้จัดเป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic compound) ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาและชีววิทยาที่หลากหลาย เช่น เป็นสารช่วยต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดอาการอักเสบ (anti-inflammatory) นอกจากนี้ยังมีผลต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด โดยช่วยการขยายหลอดเลือด และ กระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ลดคอเลสเตอรอลในเลือดซึ่งช่วยป้องกันหรือลดการเกิด AS และ NAFLD ได้

หม่อน (*Morus alba*) เป็นพืชที่ปัจจุบันคนไทยนิยมปลูกเพื่อการบริโภคในครัวเรือน และวางจำหน่าย รวมทั้งมีการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ที่หลากหลาย ซึ่งคนไทยนิยมบริโภคกันมาก ด้วยมีสรรพคุณทางยาใน การรักษาโรคต่าง ๆ ทางการแพทย์โบราณของจีนถือว่าผลหม่อนเป็นยาบำรุงกำลัง บำรุงประสาท แก้อาการ นอนไม่หลับ แก้ไขข้ออักเสบ แก้ไอขับเสมหะ ลดการอักเสบลำคอ แก้อาการบวม น้ำ และแก้ปวดเมื่อย และใช้ในการรักษาโรคโลหิตจาง โรคเบาหวาน ชาตามแขนขา อาการท้องผูก เวียนศีรษะ บำรุง หัวใจ บำรุงโลหิต บำรุงไต บำรุงสายตา บำรุง เส้นผมให้ดกดำ ชักความร้อนออกจากร่างกาย และโรคความจำเสื่อม หรืออัลไซเมอร์ โรคไขข้ออักเสบ โรคโลหิตจาง จากการศึกษาวิเคราะห์สารสำคัญในผลหม่อนพบว่า anthocyanin เป็นหนึ่งในสารสำคัญ และได้มีการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อเป็นข้อมูลอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ ในการรักษาป้องกัน โรค หรือภาวะต่าง ๆ รวมทั้งภาวะ dyslipidemia อย่างไรก็ตามในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และชีววิทยาของ anthocyanin ในผลหม่อนต่อลักษณะโครงสร้างของหัวใจ หลอดเลือดแดงใหญ่ และตับยังคงต้องการข้อมูลการวิจัย สนับสนุนเพิ่มเติม รวมทั้งสัมพันธ์กับการแสดงออกของ IER3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพของ AS และ NAFLD ที่เกิดจากภาวะ dyslipidemia เพื่อเป็นข้อมูลเชิงวิชาการสำหรับนำไปพัฒนาสู่การป้องกัน และ รักษาภาวะ dyslipidemia ด้วยผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ ทำให้ลดการเกิด AS และ NAFLD นำไปสู่การลดอัตราการ เสียชีวิต ด้วยกลุ่มโรค NCDs ในคนไทย

2. วัตถุประสงค์

- 2.1 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของผลหม่อนอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ของหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
- 2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของผลหม่อนอบแห้งต่อการแสดงออกของ IER3 ในเนื้อเยื่อหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

บทที่ 2 วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมผงลูกหม่อนอบแห้ง

ลูกหม่อนอบแห้งเตรียมโดยฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยมีลักษณะเป็นผงแห้ง ควบคุมคุณภาพโดยการวิเคราะห์ปริมาณสาร total anthocyanin, total phenolic ด้วยวิธี HPLC และทำการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้วิธี DPPH assay

2.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือหนู mice สายพันธุ์ C57BL/6 อายุ 8 สัปดาห์ เพศเมีย จากบริษัทโนมูระ หนูทั้งหมดทุกตัวจะถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณแสงและความชื้นสัมพัทธ์ตามที่ทางสถานสัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรกำหนด

หลังจากพักสัตว์ทดลอง 7 วันแล้ว จะสุ่มแบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่ม ๆ ละ 11 ตัว (รวมทั้งสิ้น 66 ตัว) คือ

กลุ่มที่ 1 Control group : กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 2 Atherosclerosis group (HF) : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 3 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW (HF+Mul10): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 10 mg/kg BW

กลุ่มที่ 4 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW (HF+Mul100): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 100 mg/kg BW

กลุ่มที่ 5 HF+ลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW (HF+Mul300): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนลูกหม่อนอบแห้งขนาด 300 mg/kg BW

กลุ่มที่ 6 HF+ยา atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW (HF+ATV5): กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW

สัตว์ทดลองจะได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน ในระหว่างนี้จะชั่งปริมาณอาหารที่หนูกินทุกวัน ซึ่งน้ำหนักหนูทุกสัปดาห์ และวัดระดับน้ำตาลในเลือดเดือนละครั้ง จากนั้นจึงถูกทำให้ตายอย่างสงบและเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อนำไปวัดหาระดับไขมันในเลือด ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และคำนวณ atherogenic index (AI) เก็บไขมันในช่องท้อง heart aorta และ liver และเพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค ศึกษาการคลายตัวของหลอดเลือด aorta และศึกษาฤทธิ์ในการลดขนาดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจจากภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดแล้วมีเลือดกลับมาเลี้ยงซ้ำต่อไป

2.3 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของ heart aorta และ liver

ทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของ heart aorta และ liver ด้วยกระบวนการทำ tissue paraffin block ตามด้วยการทำ tissue section ที่ความหนาของ 3-5 ไมครอน และการย้อมด้วย Masson's trichrome staining สำหรับศึกษา morphology ของ aortic wall และ hepatic parenchyma นำ tissue sections ที่ผ่าน การย้อม ไปศึกษาคุณลักษณะ และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) และทำการ วิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image J รวบรวมผลการวิเคราะห์ภาพ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูล ในลำดับต่อไป

2.4 การศึกษาอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry) ของ IER3 ใน heart aorta และ liver

ทำการศึกษา immunohistochemistry ของ α smooth muscle actin ใน aorta และ IER3 ใน aorta และ liver ด้วย tissue paraffin block ตามด้วยการทำ tissue section ที่ความหนาของ 3-5 ไมครอน โดยศึกษา tissue expression ใน vascular smooth muscle cells (VSMCs) ของ aorta และ parenchyma ของ liver ที่มีการทำปฏิกิริยาระหว่าง antigen และ antibody โดยใช้ primary antibody คือ anti- α smooth muscle actin (anti- α SMA) และ anti-IER-1/IER3 antibody และ ใช้ secondary antibody เป็นระบบ Avidin-Biotin complex / horseradish peroxidase (AB complex / HRp) ตามด้วย DAB detection และ counterstained ด้วยการย้อม haematoxylin จากนั้นนำ tissue sections ที่ผ่านการย้อม ไปศึกษาต่อ และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) เพื่อทำการศึกษาปริมาณของ positive cells ด้วย โปรแกรม Image J และรวบรวมผลการวิเคราะห์ภาพ สำหรับการวิเคราะห์ข้อมูลในลำดับต่อไป

2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

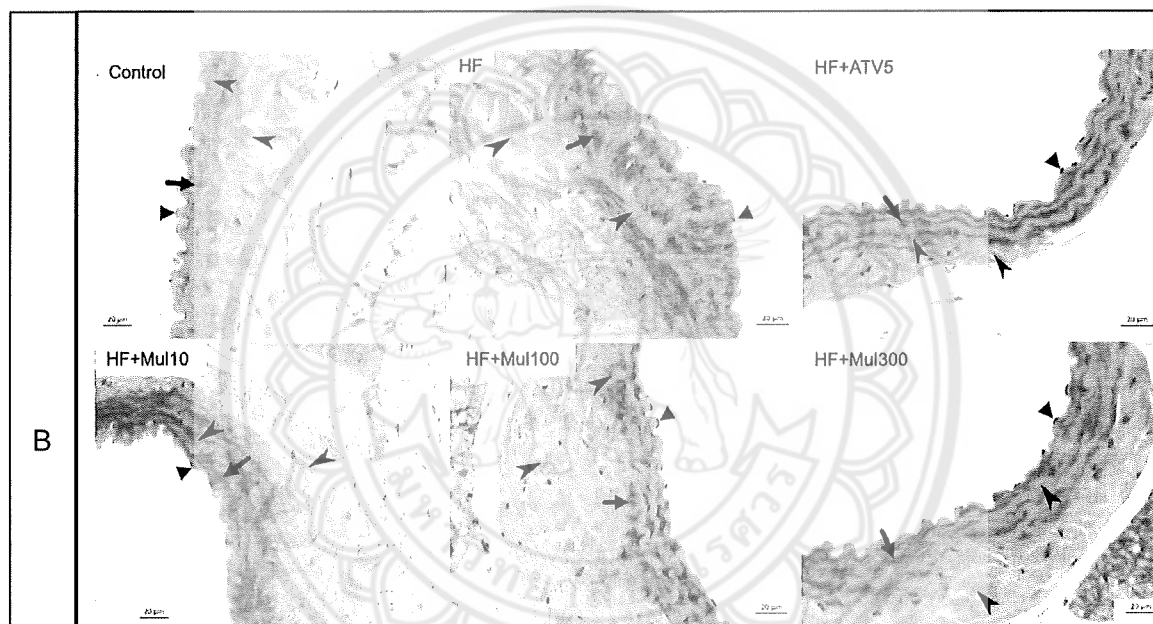
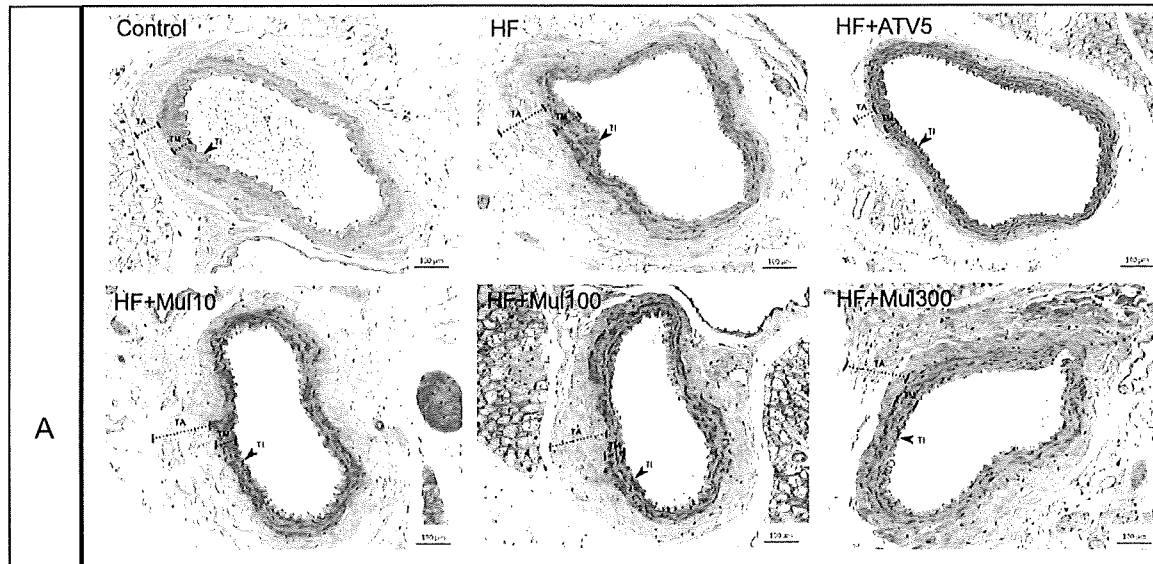
ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) และ ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่มที่ได้รับผงลูกหม่อนอบแห้งจะทำได้โดย วิธี ANOVA ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวน กลุ่มของข้อมูลที่ต้องการเปรียบเทียบความแตกต่าง และ ค่า p value <0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 3 ผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของ aorta, heart และ liver (รูปที่ 1, 2 และ 3)

1.1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ aorta ได้แก่ ความหนาของผนังหลอดเลือด (aortic thickness) (รูปที่ 1A) และการสะสมของ collagen fiber (collagen fiber accumulation) ในชั้น tunica media (รูปที่ 1B) โดยพบว่ากลุ่ม HF มี aortic thickness และ collagen fiber accumulation มากกว่ากลุ่ม control สำหรับกลุ่มที่ได้รับ Dried mulberry fruit powder (DMP) จะมี aortic thickness และ collagen fiber accumulation ที่ลดลงโดยเฉพาะในกลุ่ม HF+Mul10 ทั้งนี้ลักษณะจุลกายวิภาคดังกล่าวในกลุ่ม HF+ATV5 พบมีลักษณะที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับกลุ่ม control และนอกจากนั้นพบว่าในกลุ่ม HF มี disarrangement และ hypertrophy การเรียงตัวของ vascular smooth muscle cell (VSMC) ในชั้น tunica media ซึ่งลักษณะดังกล่าวพบลดลงในกลุ่มที่ได้รับ DMP

เมื่อทำ histomorphometry ของ aortic thickness และ collagen fiber accumulation aorta พบว่าทั้ง aortic thickness และ collagen fiber accumulation ของกลุ่ม HF มีความแตกต่างจากกลุ่ม control กลุ่มที่ได้รับ DMP และ HF+ATV5 อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) นอกจากนี้พบว่า กลุ่ม HF+Mul10 และ HF+ATV5 มี aortic thickness และ collagen fiber accumulation ไม่แตกต่างจาก กลุ่ม control (ตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ aorta โดยการย้อม Masson's trichrome

A. Aortic wall thickness; 10X magnification

B. Morphology of aortic wall (collagen fibers & VSMC); 40X magnification

TI : Tunica intima, TM : Tunica media, and TA :Tunica adventitia

▲ : Endothelial cells

▶ : Vascular smooth muscle cells (VSMC)

▲ : Collagen fibers

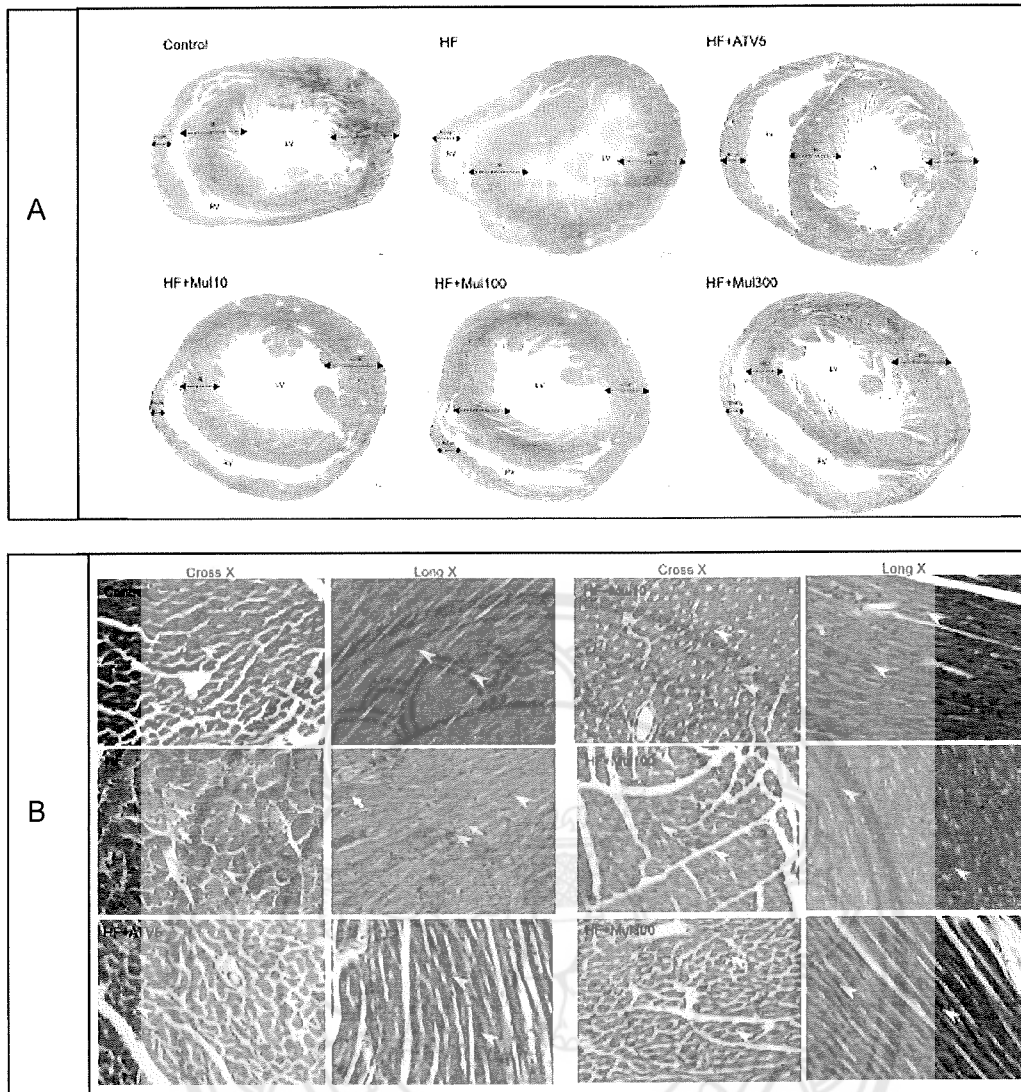
ตารางที่ 1 Histomorphometry ของ aortic thickness และ collagen fiber accumulation aorta (n=5)

Experimental Groups	Histological criteria	
	Aortic thickness (mean \pm SE; mm)	Percentage area of collagen (mean \pm SE; %)
Control	275.9017 \pm 7.8584	31.4692 \pm 1.2531
HF	385.5487 \pm 10.8907**	48.8828 \pm 1.2117**
HF+ATV5	281.6770 \pm 8.1084##	34.9018 \pm 1.6101##
HF+Mul10	291.2072 \pm 5.0201##	36.7886 \pm 1.0503##
HF+Mul100	314.3015 \pm 6.4002**,##	39.4664 \pm 1.6192**,##
HF+Mul300	337.5234 \pm 5.7201**,##	40.9437 \pm 1.3505**,##

** เปรียบเทียบกับ control ที่ $P < 0.01$

เปรียบเทียบกับ HF ที่ $P < 0.01$

1.2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ heart ได้แก่ ความหนาของผนังหัวใจ (cardiac wall thickness) (รูปที่ 2A) และลักษณะของ cardiomyocytes (รูปที่ 2B) พบว่ากลุ่ม HF มี cardiac wall thickness ของ LV หนามากที่สุด และกลุ่ม HF+ATV5 มีความหนาของ LV ลดลงใกล้เคียง control และ พบว่ากลุ่มที่ได้รับ DMP จะมี cardiac wall thickness ที่ค่อนข้างหนาน้อยกว่ากลุ่ม HF โดยกลุ่ม HF+Mul10 มี cardiac wall ของ LV ที่ค่อนข้างบางกว่ากลุ่ม HF+Mul100 และ HF+Mul300 นอกจากนั้นสังเกตพบมี hypertrophy cardiomyocytes และ collagen บริเวณรอบ ๆ หลอดเลือดของกลุ่ม HF เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มอื่น ๆ



รูปที่ 2 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ heart โดยการย้อม Masson's trichrome

A. Cardiac wall thickness; 4X magnification

B. Morphology of cardiomyocytes; 10X magnification

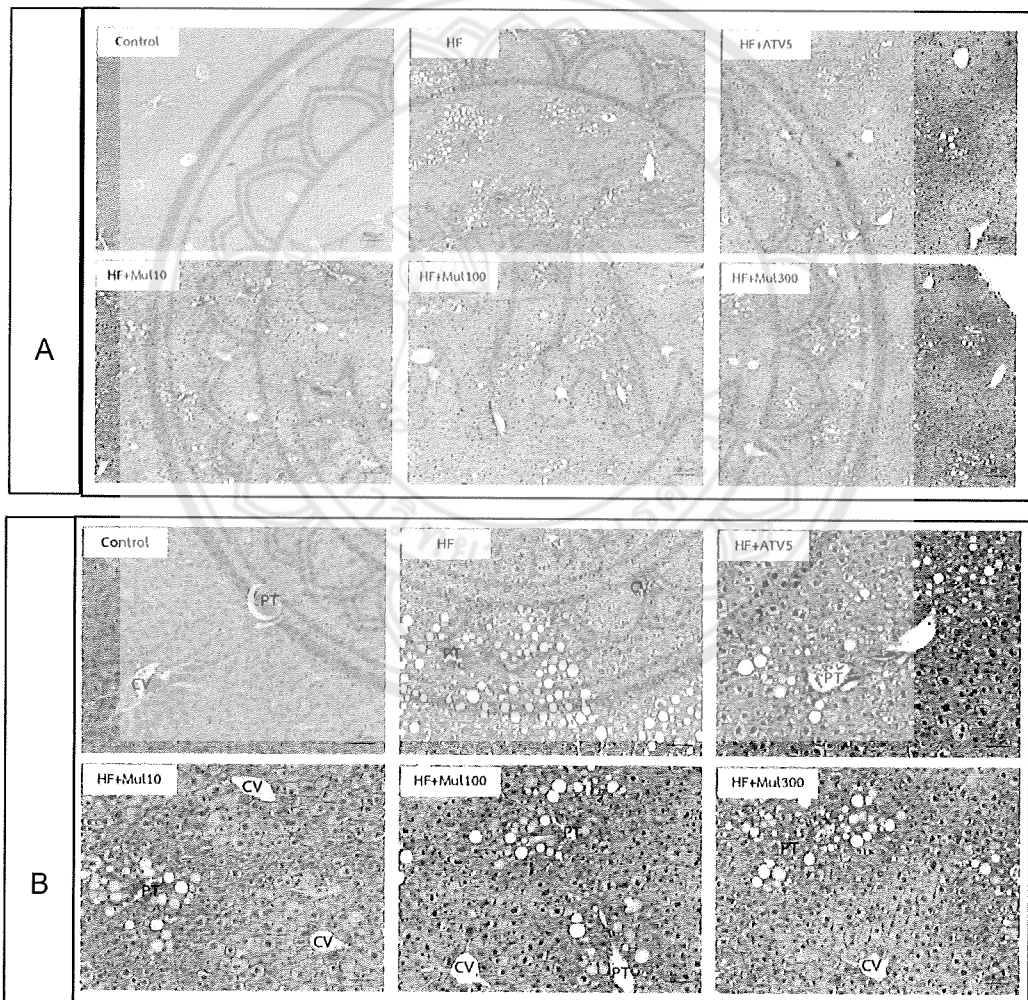
LV : Left ventricle, RV : Right ventricle, LCW : Left cardiac wall, RCW : Right cardiac wall, and

IS : Interventricular septum

◀ : Cardiomyocytes

← : Vacuole

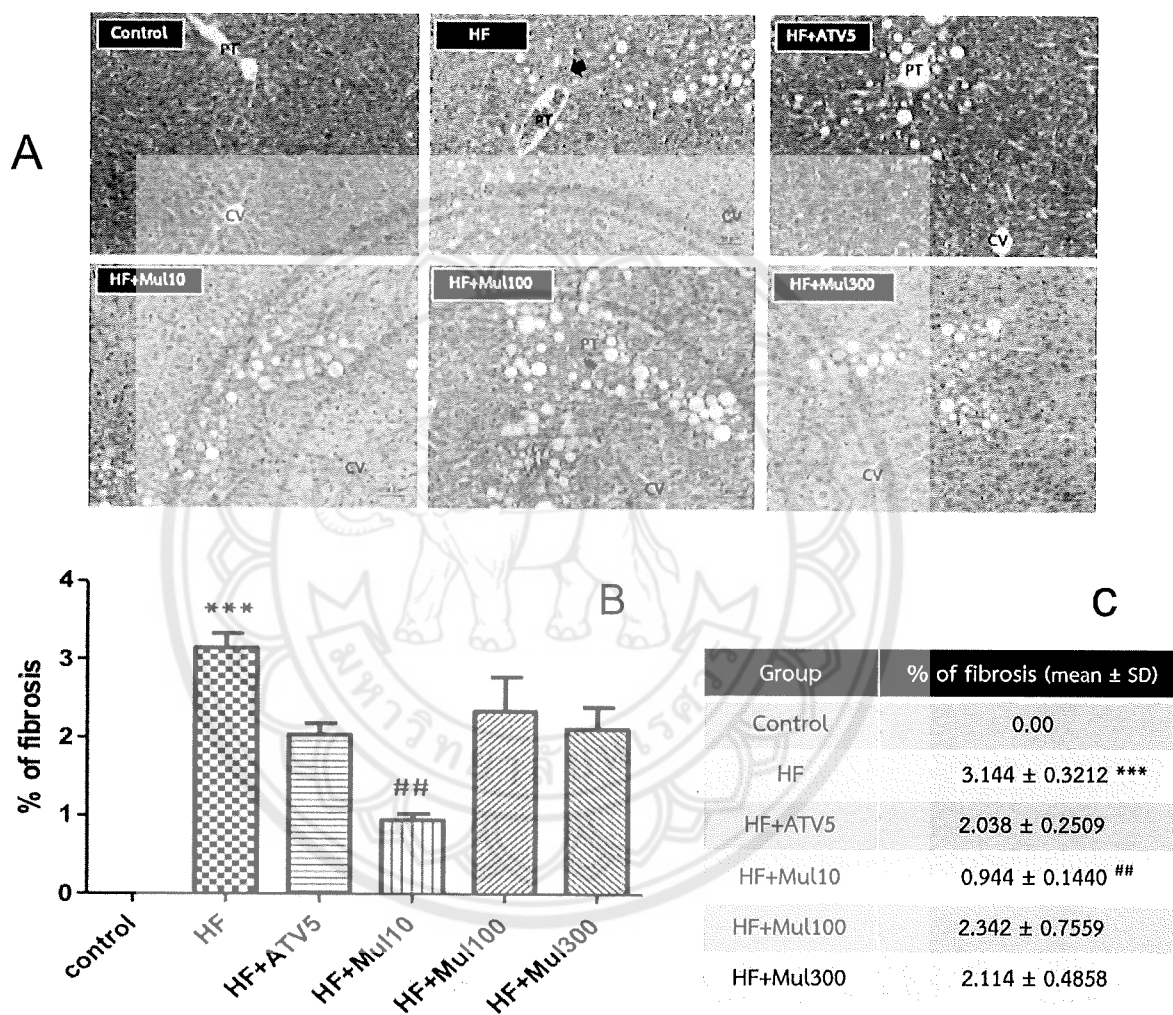
1.3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ liver ได้แก่ ลักษณะการกระจายตัว vesicle บริเวณ hepatic lobule ขนาดของ vesicle และลักษณะของ hepatocytes เมื่อทำการย้อมด้วย H&E พบว่ากลุ่ม HF มีการกระจายตัวของ vesicle ส่วนใหญ่ในบริเวณ zone 1 (ใกล้ PT) โดยเฉพาะ vesicle ที่มีขนาดใหญ่ (macrovesicle) มากกว่า กลุ่ม control ในขณะที่กลุ่ม HF+ATV5 และ HF+Mul10, HF+Mul100 และ HF+Mul300 ยังคงพบการกระจายตัวในบริเวณพบ zone 1 เช่นกัน แต่พบว่าปริมาณของ macrovesicle ที่ลดลง (รูปที่ 3A) นอกจากนี้ยังพบว่า hepatocytes ในบริเวณ zone 2 และ zone 3 ของกลุ่ม HF มี cytoplasmic vacuole ปรากฏให้เห็น ซึ่งจะไม่ปรากฏในกลุ่ม control และยังสามารถพบ cytoplasmic vacuole ในบริเวณ zone 2 และ zone 3 ของ กลุ่ม HF+ATV5 และกลุ่มที่ได้รับ DMP ทั้ง 3 ขนาดเช่นกัน (รูปที่ 3A)



รูปที่ 3 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ liver โดยการย้อม H&E

- A. Hepatic tissue ของหนูทั้ง 6 กลุ่ม; 4X magnification
- B. Hepatic tissue ของหนูทั้ง 6 กลุ่ม; 10X magnification
- CV : Central vein, and PT : Portal triad

ผลการศึกษาด้วยการย้อม Masson's trichrome พบว่ากลุ่ม HF มีการสะสมของ collagen fibers บริเวณ periportal เพิ่มมากขึ้น และยังพบที่ perisinusoid กระจายกันทั่ว hepatic tissue เมื่อเปรียบเทียบกับ control และพบการสะสมของ collagen fibers ในบริเวณดังกล่าวลดลงแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 4 A) เมื่อทำการวัดปริมาณของ collagen fibers พบว่ามีร้อยละการสะสมของ collagen fibers (% of fibrosis) บริเวณ periportal และ perisinusoid เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่ม HF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ($p < 0.001$) และ พบว่า % of fibrosis ลดลงในกลุ่มการทดลองอื่น ๆ แต่ทั้งนี้กลุ่ม HF+Mul10 มี % of fibrosis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF ($p < 0.01$) และยังมีค่าที่น้อยกว่ากลุ่ม HF+ATV5 (รูปที่ 4 B และ C)



รูปที่ 4 ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ liver โดยการย้อม Masson's trichrome

A. การสะสมของ collagen fibers (ติดสีน้ำเงิน) ใน hepatic tissue ของหนูทั้ง 6 กลุ่ม; 10X magnification

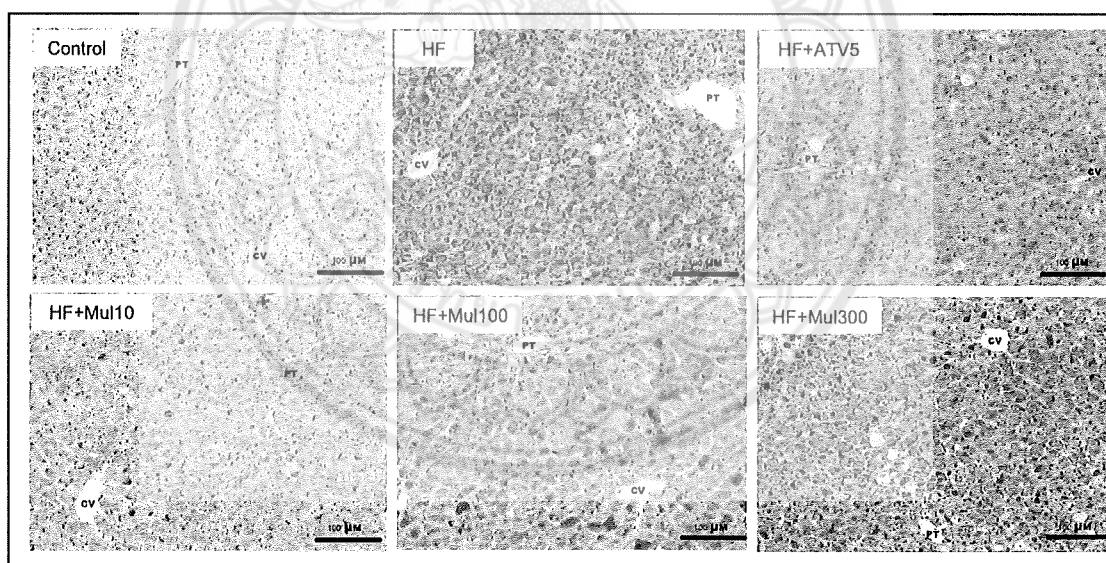
B และ C. กราฟ และตารางร้อยละการสะสมของ collagen fibers (% of fibrosis) ใน Hepatic tissue ของหนูทั้ง 6 กลุ่ม

➡ : Collagen fibers, CV : Central vein, and PT : Portal triad

*** $p < 0.001$ VS Control, ## $p < 0.01$ VS HF

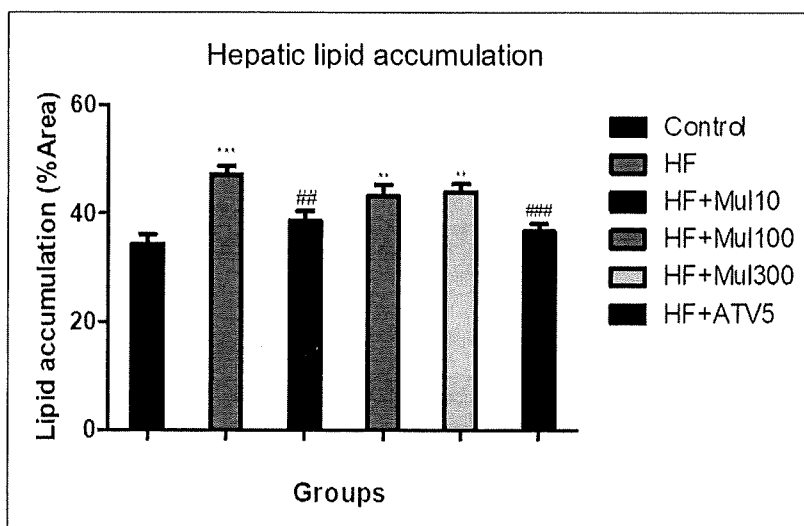
เมื่อทำการย้อม Oil Red O เพื่อศึกษาการสะสมของไขมันในตับ (lipid accumulation in liver) ดังแสดงในรูปที่ 5 พบว่าหนูทั้ง 6 กลุ่มมีลักษณะของ microvesicular lipid accumulation ปรากฏได้ในทุก ๆ zone ของ hepatic lobule โดยในกลุ่ม control มีปริมาณ microvesicular lipid accumulation จำนวนน้อยที่สุด นอกจากนั้นพบลักษณะ macrovesicular lipid accumulation ในกลุ่ม HF ปรากฏทุก ๆ zone ของ hepatic lobule โดยมีการสะสมใน zone ที่ 1 มากที่สุด และยังคงพบ macrovesicular lipid accumulation ได้ทั้งในกลุ่ม HF+ATV5, HF+Mul10, HF+Mul100 และ HF+Mul300 ในปริมาณที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามกลุ่ม HF+Mul300 พบว่ามีปริมาณ macrovesicular lipid accumulation ที่มากกว่ากลุ่ม HF+Mul10 และ HF+Mul100

และเมื่อทำการวิเคราะห์ร้อยละของพื้นที่ที่มีการสะสมไขมันในตับ (%Area of hepatic lipid accumulation) ดังแสดงในรูปที่ 6 พบว่าหนูในกลุ่ม HF (47.165 ± 6.508) มีร้อยละของพื้นที่ที่มีการสะสมไขมันในตับมากกว่ากลุ่ม control (34.387 ± 7.613) อย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$ และพบว่ากลุ่ม HF+ATV5, กลุ่ม HF+Mul10, HF+Mul100 และ HF+Mul300 มี %Area of hepatic lipid accumulation ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF แต่อย่างไรก็ตามเพียงกลุ่ม HF+ATV5 (36.339 ± 5.921) และกลุ่ม HF+Mul10 (38.588 ± 8.215) เท่านั้นที่แตกต่างกับกลุ่ม HF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 5 ลักษณะของ lipid accumulation in liver โดยการย้อม Oil red O ที่กำลังขยาย 10X

CV : Central vein, and PT : Portal triad



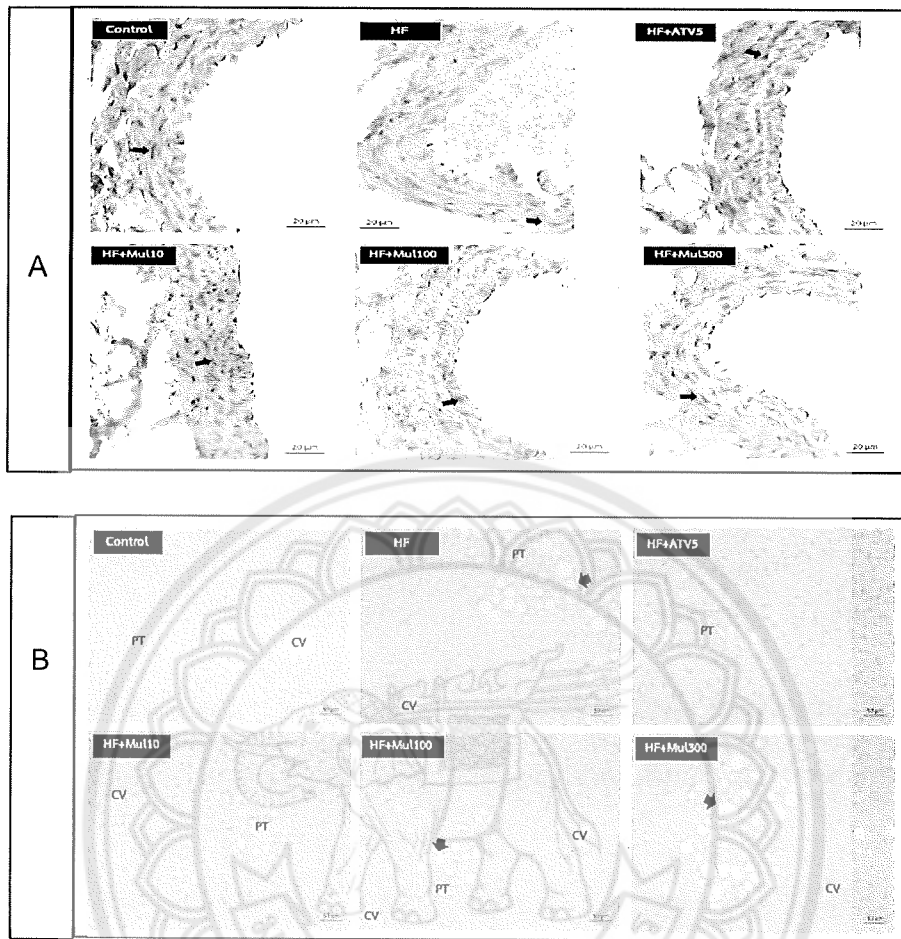
รูปที่ 6 กราฟร้อยละของพื้นที่ที่มีการสะสมไขมันในตับ (%Area of hepatic lipid accumulation)

, * เปรียบเทียบกับ control ที่ $P < 0.01$ และ 0.001

##, ### เปรียบเทียบกับ HF ที่ $P < 0.01$ และ 0.001

2. ผลการศึกษาลักษณะการแสดงออกของ immediate early response 3 (IER-3) ใน aorta, heart และ liver

ทำการศึกษาการแสดงออกของ IER-3 โดยการย้อม immunohistochemistry เพื่อดูการแสดงออกของ IER3 protein ของ vascular smooth muscle cells (VSMC) ในชั้น tunica media ของ aortic wall (รูปที่ 7A) พบว่ากลุ่ม HF มีปริมาณ immunoreactive cell of VSMC น้อยกว่ากลุ่ม control ในขณะที่กลุ่ม HF+ATV5, HF+Mul10, HF+Mul+100 และ HF+Mul300 ปรากฏ immunoreactive cells เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม HF โดยเฉพาะสังเกตพบในกลุ่ม HF+Mul10 นั้นมี immunoreactive cells เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม HF+Mul100 และ HF+Mul300 และเมื่อทำการศึกษา histomorphometry แสดงปริมาณร้อยละของ immunoreactive cells พบว่า กลุ่ม HF มีปริมาณ immunoreactive cells น้อยกว่ากลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) ในขณะที่กลุ่ม HF+ATV5, HF+Mul10, HF+Mul+100 และ HF+Mul300 ปรากฏ immunoreactive cells เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม HF โดยเฉพาะ HF+ATV5 มี immunoreactive cells เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับ DMP ทั้ง 3 กลุ่ม แต่ทั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่ากลุ่ม HF+Mul10 นั้นมีร้อยละ immunoreactive cells เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม HF อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) (ตารางที่ 2)



รูปที่ 7 ลักษณะการแสดงออกของ immediate early response 3 (IER-3) ใน aorta โดยการย้อม immunohistochemistry

A. Immunoreactive cell ในชั้น tunica media ของ aortic wall; 4X magnification

B. Immunoreactive cell ใน hepatic tissue; 10X magnification

◁ : Immunoreactive cell of VSMC

◀ : Immunoreactive cell of hepatic tissue

◄ : Macrovesicle

CV = central vein, PT = portal triad

ตารางที่ 2 Morphometric quantification ของ immediate early response 3 (IER-3) ใน aorta โดยการย้อม immunohistochemistry (n=5)

Experimental Groups	Percentage of IER-3 positive cells (mean \pm SE; %)
Control	69.4960 \pm 5.7528
HF	35.6000 \pm 2.2990 **
HF+ATV5	64.0300 \pm 2.1255 ##
HF+Mul10	61.1480 \pm 3.8196 ##
HF+Mul100	49.7180 \pm 3.4554 *
HF+Mul300	48.7300 \pm 5.8590 *

* เปรียบเทียบกับ control ที่ $P < 0.05$

** เปรียบเทียบกับ control ที่ $P < 0.01$

เปรียบเทียบกับ HF ที่ $P < 0.01$

นอกจากนี้ ผลการแสดงผลของ IER-3 แสดงให้เห็นถึงการเกิดพยาธิสภาพของ hepatic tissue ในกลุ่ม HF, HF+Mul100 และ HF+Mul300 เมื่อได้รับ DMP ในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่า HF และ HF+Mul300: พบการแสดงผลของ IER-3 ภายใน cytoplasm ของ hepatocytes ใน zone 2 และ 3 และบริเวณขอบของ macrovesicular cells ที่แทรกอยู่กับ hepatocytes ใน zone 1

HF+Mul100: พบการแสดงผลของ IER-3 ที่ขอบของ macrovesicular cells ที่แทรกอยู่กับ hepatocytes ใน zone 1 แต่ไม่พบใน cytoplasm ของ hepatocytes ใน zone 2 และ 3

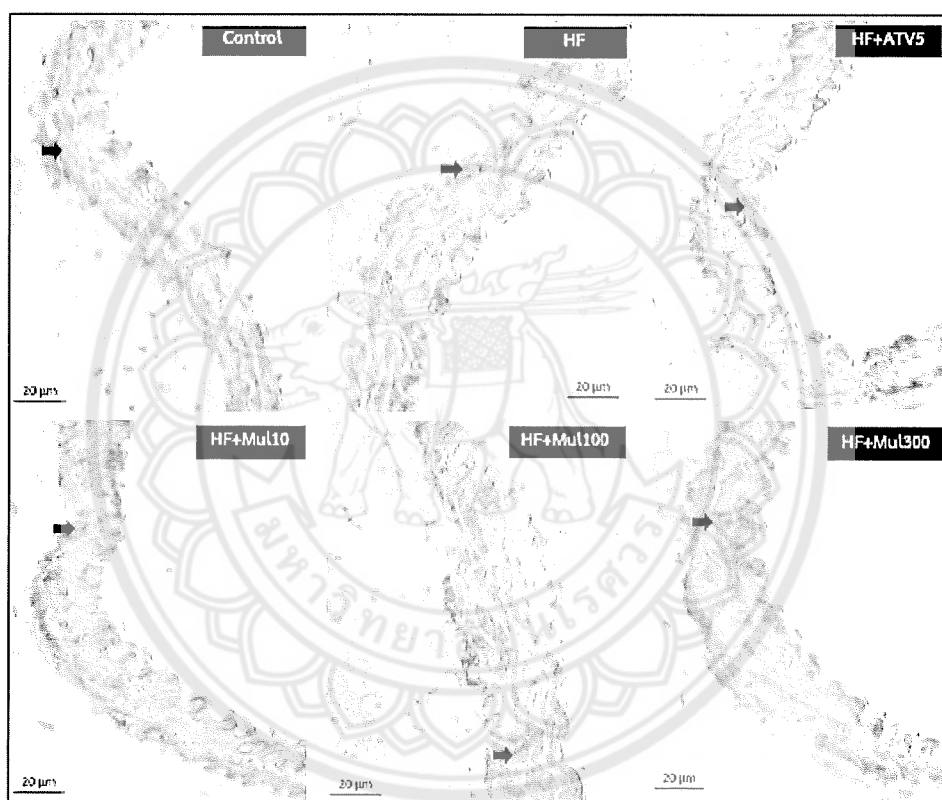
HF+ATV5 และ HF+Mul10: ไม่พบการแสดงผลของ IER-3 ทั้งใน zone 1, 2 และ 3

3. ผลการศึกษา immunohistochemistry ของ α smooth muscle actin (α SMA) ใน aorta

การแสดงผลของ α SMA ของ vascular smooth muscle cells (VSMC) ในชั้น tunica intima และ tunica media ของ aortic wall (รูปที่ 8) ในกลุ่ม HF ไม่พบ immunoreactive cells of α SMA ปรากฏในชั้น tunica intima แต่สังเกตเห็น disarrangement และมีขนาดที่ใหญ่ขึ้นของ VSMC ปรากฏในชั้น tunica media และ เมื่อพิจารณา immunoreactive VSMC of α SMA ชั้น tunica media พบว่ากลุ่ม HF มีปริมาณ immunoreactive cells น้อยกว่ากลุ่ม control มากที่สุด และพบว่ากลุ่มที่ได้รับ DMP ทั้ง 3 กลุ่ม มี immunoreactive VSMC เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม HF โดยเฉพาะ กลุ่ม HF+Mul10

แต่อย่างไรก็ตาม HF+Mul+100 และ HF+Mul300 ยังคงมี immunoreactive cells น้อยกว่ากลุ่ม control เช่นกัน (รูปที่ 8)

จากการศึกษา histomorphometry แสดงปริมาณร้อยละของ immunoreactive VSMC ในชั้น tunica media พบว่าร้อยละพื้นที่ที่มี immunoreactive VSMC ของกลุ่ม HF มีปริมาณน้อยกว่ากลุ่ม control แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) รวมทั้ง HF+Mul100 และ HF+Mul300 และไม่พบความแตกต่างทางสถิติของร้อยละพื้นที่ immunoreactive VSMC ที่เพิ่มขึ้นระหว่างกลุ่มที่ได้รับ DMP ทั้ง 3 กลุ่ม กับกลุ่ม HF (ตารางที่ 3)



รูปที่ 8 ลักษณะการแสดงออกของ ของ α smooth muscle actin (α SMA) ใน aorta โดยการย้อม immunohistochemistry (40X magnification)

➡ : α SMA positive cells

ตารางที่ 3 Morphometric quantification ของ α smooth muscle actin (α SMA) ใน aorta โดยการย้อม immunohistochemistry (n=5)

Experimental Groups	Percentage area of α SMA positive cell (mean \pm SE; %)
Control	39.3800 \pm 0.9620
HF	29.7260 \pm 0.6434 **
HF+ATV5	35.6940 \pm 1.8027
HF+Mul10	34.5960 \pm 1.6146
HF+Mul100	30.6600 \pm 1.1109 **
HF+Mul300	31.2720 \pm 2.1330 **

** เปรียบเทียบกับ control ที่ $P < 0.01$



บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 ผลของผงลูกหมอนอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค aorta heart และ liver ของหนู ที่เหนี่ยวนำให้เกิด hyperlipidemia ด้วย HFD

ลักษณะทางจุลกายวิภาคหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง นานประมาณ 12 สัปดาห์ เพื่อเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะไขมันสูง (hyperlipidemia) การศึกษาครั้งนี้ เมื่อหนูเกิดภาวะ hyperlipidemia เหนี่ยวนำการเกิด chronic inflammation ที่ส่งผลทำให้หลอดเลือดเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ทั้งนี้ ลักษณะทางจุลพยาธิ (histopathology) จะเกิดขึ้นที่ tunica intima ของ aortic wall เกิด Fatty Streak และ fibrous Plaques ตามมา ทั้งนี้มีการทำลาย internal elastic lamina ถูกทำลาย มีการอักเสบเกิดขึ้น มีการเพิ่มจำนวนและ การเคลื่อนตัว (proliferation and migration) ของ VMSCs มาในชั้น tunica intima ทำให้ที่ลักษณะหนาตัวขึ้น (neointima formation) [1, 2] ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว แต่พบการเปลี่ยนแปลงของผนังชั้น tunica media ของหลอดเลือดที่หนาเพิ่มขึ้น และมี disarrangement และ hypertrophy ของ VSMC และพบมี collagen fiber accumulation ทั้งนี้อาจจะเป็นการเปลี่ยนแปลงของ VSMC ในช่วง pre-clinical stages of atherosclerosis ที่ตอบสนองต่อ inflammatory chemokines ที่ endothelial cells ใน atheroprone regions ของ arterial wall หลั่งออกมา ทำให้เกิด proliferation และ migration ของ VSMCs ในชั้น tunica media ไปซ่อมแซมยังบริเวณ tunica intima ได้ ทั้งนี้ VSMC ยังสามารถสร้าง collagen type I และ collagen type III แล้วจึงนำไปสู่การเกิด neointima formation และ proatherogenic vascular remodelling [3] และนอกจากนั้นในชั้น tunica intima ไม่พบการแสดงออกของ α SMA ใน VSMC ของหนูกลุ่มที่ได้รับ HF ทำให้ที่ช่วยยืนยันระดับของการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดที่ศึกษาในครั้งนี้ และยังพบว่าเมื่อได้รับ DPM ขนาด 10 mg/kg มีการแสดงออกของ α SMA มากกว่าในขนาด 100 และ 300 mg/kg ทั้งนี้อาจจะผ่านกลไกที่สำคัญต่อการ proliferation ของ VSMC ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

การศึกษานี้พบการเปลี่ยนแปลงของหัวใจในกลุ่มที่ได้รับ HF โดยพบว่า cardiac wall thickness ของ LV หนามากที่สุด และ cardiomyocyte เกิด hypertrophy ของ cardiomyocytes ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจาก HFD ลดการแสดงออก SIRT3 expression ซึ่งเป็น mitochondrial protein ที่เกี่ยวข้องกับ metabolism ทำให้เพิ่ม ROS production ซึ่งทำให้เกิด cardiac hypertrophy และทำให้ cardiac dysfunction ในที่สุด [4]

นอกจากนี้ยังพบลักษณะ lipid accumulation ร่วมกับมี fibrosis ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มที่ได้รับ HF เกิด steatosis-stimulated fatty-acid oxidation ใน liver และ hepatic inflammation ซึ่งจัดเป็น early risk factor ทำให้เกิด atherosclerosis โดยทำลายหน้าที่ของ endothelial cell รวมทั้งทำส่งเสริมการเกิด VSMC hyperplasia [5] เมื่อให้หนูที่มีภาวะ hyperlipidemia ได้รับ DMP ในปริมาณที่ต่างกัน พบมีลักษณะทางจุลพยาธิที่ลดลง จึงอาจเป็นไปได้ที่ DMP น่าจะมีฤทธิ์ที่ช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ VSMC ในชั้น tunica media ไม่ทำให้เกิดการ neointima formation ช่วยลด cardiac wall thickness ของ LV รวมทั้งไม่เพิ่ม fibrosis และ lipid accumulation ของ hepatic tissue ซึ่งอาจจะมีความเป็นได้ที่ DMP อาจจะมีฤทธิ์ที่ช่วยป้องกันการลด ROS production ที่ทำให้เกิด inflammation ตามมา และอาจจะมีฤทธิ์ที่ช่วยให้เกิดการ proliferation

4.2 ฤทธิ์ของผงลูกหม่อนอบแห้งต่อการแสดงออกของ IER3 ใน aorta และ liver ของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิด hyperlipidemia ด้วย HFD

การแสดงออกของ IER3 จากการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาใน aorta และ liver ทั้งนี้เพราะผลการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hyperlipidemia พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางจุลกายวิภาคที่เห็นได้ชัดเจน ทั้งนี้การแสดงออกของ IER3 ซึ่งเป็น protein ที่ทำหน้าที่ในการควบคุม inflammation and ROS homeostasis ขณะ stress มีการแสดงออกที่แตกต่างกันในแต่ละเนื้อเยื่อ [6] โดยผลการศึกษาพบว่า VSMC ในหนูกลุ่มที่ได้รับ HF มีการแสดงออกที่ลดลงของโปรตีน IER 3 ในขณะที่กลุ่มควบคุมการมีแสดงออกที่มากกว่า ของ IER3 ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาเมื่อทำการ knockout IEX-1 gene ในหนูพบว่าทำให้เกิดการพร่องของ cAMP-signaling ที่ส่งผลต่อการเกิด mitochondrial reactive oxygen species (mROS) ที่ทำให้เกิด inflammation VSMC และ inhibits cAMP-dependent vascular relaxation ทำให้เกิด systemic hypertension ตามมา [7] IEX-1 ยังทำหน้าที่ survival action โดยลด ROS นอกจากนี้ยังมีบทบาทที่สำคัญในการควบคุม macrophage และ inflammatory process [8] และเมื่อพิจารณา การแสดงออกของกลุ่มที่ได้รับ DMP ทั้ง 3 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ IER3 ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะ ขนาด 10 mg/kg จึงมีความเป็นไปได้ที่ DMP อาจจะมีผลต่อการแสดงออกของ IER3 เพื่อลด mitochondrial reactive oxygen species (mROS) ที่ทำให้เกิด inflammation ทั้งนี้จะมีกลไกที่ผ่าน pathway ไตนั้นจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในการแสดงออกของ IER3 ใน hepatic tissue มีความแตกต่างจาก aorta ทั้งนี้ หนูที่ได้รับ HF พบมีการแสดงออกของ IER 3 ที่มากกว่า กลุ่ม control จากการศึกษาที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ในการแสดงออกของ IER3 ที่เป็น direct downstream transcriptional target of NF-KB และจะมีการแสดงออกมากในภาวะที่มี inflammation โดยพบว่า IEX- 1^{-/-} mice ช่วยลด hepatic inflammation และ hepatic steatosis [8] จากการศึกษาครั้งนี้พบการแสดงออกที่ลดลงของ IER3 เมื่อให้ DMP ในขนาดที่ต่างกัน เฉพาะขนาด 10 mg/kg จึงมีความเป็นไปได้ที่ผงลูกหม่อนอบแห้งอาจจะมีฤทธิ์ anti-inflammation ที่มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของ IER3

จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าภาวะ hyperlipidemia มีผลทำให้ mROS เพิ่มขึ้นซึ่งมีสัมพันธ์กับการแสดงออกของ IER3 ของ VSMC และ hepatocyte ที่ตอบสนองแตกต่างกันในการควบคุม inflammation and ROS homeostasis ซึ่งการศึกษาค้นคว้านี้ แสดงผลให้เห็นว่าผงลูกหม่อนอบแห้ง น่าจะมีฤทธิ์ anti - arteriosclerosis ในหลอดเลือด และ anti -steatosis เป็นผลจาก anti-inflammation ที่เกิดขึ้นใน aorta และ liver และอาจจะมีในหัวใจร่วมด้วย โดยเฉพาะฤทธิ์ในขนาดต่ำ ๆ (DMP ขนาด 10 mg/kg) สามารถทำให้ลดลักษณะทางจุลพยาธิทั้งใน aorta และ liver ได้โดยมีความเป็นไปได้ที่ต่ออาศัยการทำงานของ IER3 protein ซึ่งจะมกลไกที่ผ่านทาง signaling pathway ไตนั้นจำเป็นต้องทำการศึกษาเชิงลึกต่อไป

บทที่ 5 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

5.1 ข้อจำกัดในการทำวิจัย

1. การศึกษาครั้งนี้ มีการใช้ organ บาง organ สำหรับการศึกษามากกว่า 1 โครงการย่อย จึงทำให้ไม่เพียงพอ เช่น aorta ซึ่งจำเป็นจะต้องได้บริเวณของ aorta จากกลุ่มตัวอย่างที่เป็นบริเวณเดียวกันในการศึกษา histology

2. การทำงานวิจัยร่วมกับการทำงานตามพันธกิจด้านอื่น ๆ และไม่มีผู้ช่วยวิจัยที่จะเข้ามาช่วยทำงานร่วมกับเป็นปีที่มีการระบาดของ COVID 19 จึงไม่เอื้อต่อการทำงานให้แล้วเสร็จตามเวลา ได้ด้วยตนเอง

3. งบประมาณที่ได้รับการสนับสนุนไม่เพียงพอ เนื่องจากมีการปรับราคาสารเคมีในการศึกษา immunohistochemistry จึงทำให้ไม่สามารถทำการศึกษาได้ครบทุกอวัยวะตามที่กำหนดไว้ในโครงร่าง

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรจะทำการศึกษา ในสัตว์ทดลอง ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น หนู rat เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อให้หลายๆ โครงการ มี organ สำหรับทำการศึกษาร่วมกันอย่างเพียงพอ

2. ควรมีการศึกษา marker ที่เป็นสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาค เช่น mROS และ marker ของ signaling pathway ของ IER3 ที่เกี่ยวข้องกับ inflammation เช่น NF-KB pathway เพื่อทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกของการออกฤทธิ์ของผงลูกหมอนอบแห้งในเชิงลึกได้มากยิ่งขึ้น

3. ควรทำการศึกษาฤทธิ์ของส่วนประกอบที่สำคัญจากสารสกัดลูกหมอนโดยตรงเพื่อให้เข้าใจ

เอกสารอ้างอิง

1. Doran A.C., Meller N., McNamara C.A. Role of Smooth Muscle Cells in the Initiation and Early Progression of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28: 812-819.
2. Aziz M., Yadav KS. Pathogenesis of Atherosclerosis. *Med Clin Rev.* 2016; 3(22): 1-6.
3. Chistiakov D.A., Orekhov A.N., Bobryshev Y.V. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol.* 2015; 214: 33–50.
4. Zeng H., Vaka R.V., He X., Booz W G., Chen J.X. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss. *J. Cell. Mol. Med.* 2015; 19(8): 1847-1856.
5. Xu X., Lu L., Dong Q., Xiaolin Li, Zhang N., Xin Y., Xuan S. Research advances in the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease.* 2015; 14 (158): 1-8.
6. Artl A., Schäfer H. Role of the immediate early response 3 (IER3) gene in cellular stress response, inflammation and tumorigenesis. *European Journal of Cell Biology.* 2011; 90: 545-552.
7. Shahid M., Shen L., Seldin C D., Lu B., Ustyugova V.I., Chen X., Zapol M.W., Wu X.M. Impair cAMP-mediated signal in IEX-1-deficient vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2010; 56(4): 705–712.
8. Shahid M., Erin Hermes L., Chandra D., Tauseef M., Siddiqui M.R., Faridi M H., Wu X.M. Emerging Potential of Immediate Early Response Gene X-1 in Cardiovascular and Metabolic Diseases. *J Am Heart Assoc.* 2018; 7(21): 1-11.

ภาคผนวก

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่
ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ



แผนการดำเนินงาน (สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ และแผนงานที่แสดงในลักษณะ Gantt Chart)

วัตถุประสงค์	กิจกรรม (ที่ระบุไว้ตามสัญญา)	กิจกรรมที่ดำเนินการจริง
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของลูกหมอนอบแห้งต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ของหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) และการแสดงออกของ IER3 ในเนื้อเยื่อหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง	<p>ดำเนินการตามกลุ่มสัตว์ทดลองทดลองที่กำหนดไว้ โดยต้องชั่งน้ำหนักและเตรียมอาหารให้สัตว์ทดลองทุกวันตามกลุ่มต่อไปนี้</p> <p>กลุ่มที่ 1 Control (C) group: กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติ</p> <p>กลุ่มที่ 2 High fat (HF) group: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูง</p> <p>กลุ่มที่ 3 HF+Mu10: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหมอนอบแห้ง 10 mg/kg BW</p> <p>กลุ่มที่ 4 HF+Mu100: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหมอนอบแห้ง 100 mg/kg BW</p> <p>กลุ่มที่ 5 HF+Mu300: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหมอนอบแห้ง 300 mg/kg BW</p> <p>กลุ่มที่ 6 HF+ATV5: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับยา atorvastatin 5 mg/kg BW</p> <p>สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน</p> <p>หมายเหตุ: ต้องใช้เวลาดำเนินการมากกว่า 3 เดือนเพราะต้องวางแผนเหลื่อมวันเพื่อ treat สัตว์ทดลองแต่ละตัว เนื่องจากจะเก็บตัวอย่างหลอดเลือดและเลือดได้วันละ 2 ตัวเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง (เดือนที่ 1-8)</p>	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้ (ดำเนินการโดยโครงการย่อยที่ 1)
	เก็บตัวอย่างหลอดเลือด หัวใจ และตับ (เดือนที่ 5 - 9)	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้
	การวัดการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาค ของหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) (เดือนที่ 9-12)	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้
	การวัดการแสดงออกของ IER3 ของหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) (เดือนที่ 13-18)	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้ สำหรับการตรวจวัดใน aorta และตับ แต่ไม่สามารถตรวจวัดในหัวใจได้ เนื่องจากมีปริมาณเนื้อเยื่อไม่เพียงพอ

ผลที่คาดว่าจะได้รับ (แบ่งเป็นราย 6 เดือน)

เดือนที่	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
6 เดือนที่ 1	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ เปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางจุลกายวิภาค ของ หัวใจ (heart) หลอด เลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) และการแสดงออกของ IER3 ในเนื้อเยื่อหัวใจ (heart) หลอดเลือด แดงใหญ่ (aorta) และ ตับ (liver) ของหนูที่ ได้รับอาหารไขมันสูง	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ เปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางจุลกายวิภาคของ หลอดเลือดแดงใหญ่	ลักษณะการ เปลี่ยนแปลงทางจุลกาย วิภาคหลอดเลือดแดง ใหญ่ ของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ เปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางจุลกายวิภาคของ หัวใจ	ลักษณะการ เปลี่ยนแปลงทางจุลกาย วิภาคของหัวใจของหนู ทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ แต่ใช้ระยะเวลาล่าช้า กว่าที่วางแผนไว้
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ เปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางจุลกายวิภาคของ ตับ	ลักษณะการ เปลี่ยนแปลงทางจุลกาย วิภาคของของหนูทุก กลุ่มในจำนวน n ครั้ง แรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	การดำเนินงานล่าช้า กว่าที่กำหนด จึงยัง ไม่ได้ผลกระทดลอง
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ แสดงออกของ IER3 ใน aorta ตับ และ หัวใจ	ลักษณะการแสดงออก ของ IER3 ใน aorta ตับ และหัวใจของหนูทุก กลุ่มในจำนวน n ครั้ง แรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลอง ที่ใช้ทั้งหมด	การดำเนินงานล่าช้า กว่าที่กำหนด จึงยัง ไม่ได้ผลกระทดลอง

เดือนที่	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
6 เดือนที่ 2	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อการ	ลักษณะการ เปลี่ยนแปลงทางจุลกาย วิภาคหลอดเลือดแดง ใหญ่ ของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งหลัง (6	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน

<p>เปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) และการแสดงออกของ IER3 ในเนื้อเยื่อหัวใจ (heart) หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และตับ (liver) ของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง</p>	<p>เปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของหลอดเลือดแดงใหญ่</p>	<p>ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด</p>	
	<p>ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยแบ่งสัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของหัวใจ</p>	<p>ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของหัวใจของหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด</p>	<p>ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน</p>
	<p>ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยแบ่งสัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของตับ</p>	<p>ลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของของหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด</p>	<p>ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน</p>
	<p>ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลองทุกกลุ่ม โดยแบ่งสัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการแสดงออกของ IER3 ใน aorta ตับ และหัวใจ</p>	<p>ลักษณะการแสดงออกของ IER3 ใน aorta ตับ และหัวใจของหนูทุกกลุ่มในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด</p>	<p>ได้ผลตามที่กำหนดไว้ในแผน</p> <p>** ไม่ได้ทำในหัวใจเนื่องจากตัวอย่างเนื้อเยื่อไม่เพียงพอ</p>

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารสารสกัดลูกหม่อนเพื่อลดความเสี่ยง
ภาวะไขมันผิดปกติ หลอดเลือดแดงแข็งและหัวใจขาดเลือด

โครงการย่อยที่ 4

ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในตับและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ
ไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง

คณะผู้วิจัย

1. ผศ.เอกรินทร์ ชูสิทธิ์ (หัวหน้าโครงการ)
2. ผศ.รัชณี ชนะสงค์

หน่วยงานที่สังกัด

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะ
วิทยาศาสตร์การแพทย์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดย

งบประมาณแผ่นดิน (บูรณาการวิจัยและนวัตกรรม) ได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562

รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการย่อยที่ 4:

ชื่อภาษาไทย	ผลของสารสกัดลูกหม่อนต่อระดับไขมันในตับและการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
ชื่อภาษาอังกฤษ	Effects of dried mulberry powder on lipid profile and lipid gene expression in liver of mice fed with high fat and high sugar diet
หัวหน้าโครงการ	ผศ.เอกรินทร์ ชูสิทธิ์
ระยะเวลาที่ทำวิจัย	1 ปี

บทคัดย่อ

ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์การเสียชีวิตเป็นอันดับต้นๆ ของโลก และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มสูงขึ้นในทุกปี ซึ่งภาวะหลอดเลือดแดงแข็งสามารถรักษาได้โดยการรักษาในในกลุ่มสแตติน แต่ทว่ายาดังกล่าวยังมีผลข้างเคียงและส่งผลกระทบต่อร่างกาย การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของผงลูกหม่อน (*Morus alba* L.) อบแห้ง (dried mulberry powder) ต่อระดับไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง โดยหนูทดลองที่ใช้คือ หนูไมค์ C57BL/6 เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ ซึ่งแบ่งหนูออกเป็น กลุ่มหนูควบคุม กลุ่มหนูหลอดเลือดแดงแข็งที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะหลอดเลือดแดงแข็งโดยการให้อาหารที่ไขมันสูงเป็นเวลา 3 เดือน ซึ่งแบ่งออกเป็น กลุ่มย่อย 4 กลุ่มดังนี้ กลุ่มหนูหลอดเลือดแดงแข็งที่ได้รับสารสกัดลูกหม่อน 10 mg/kg กลุ่มหนูหลอดเลือดแดงแข็งที่ได้รับสารสกัดลูกหม่อน 100 mg/kg กลุ่มหนูหลอดเลือดแดงแข็งที่ได้รับสารสกัดลูกหม่อน 300 mg/kg และกลุ่มหนูหลอดเลือดแดงแข็งที่ได้รับยา Atorvastatin 5 mg/kg จากนั้นสกัดลิพิดจากตับตามวิธีของ Folch method และวิเคราะห์หาปริมาณ total cholesterol, triglyceride, HDL และ LDL โดยใช้ชุดทดสอบ liquicolor® (Standbio, USA) โดยอาศัยหลักการ enzymatic colorimetric method ผลที่วิเคราะห์ได้คือ สารสกัดลูกหม่อนที่ความเข้มข้น 10 mg/kg สามารถลดระดับ Total Cholesterol (TC) และ LDL ได้ดีที่สุด และสามารถลดระดับ Triglyceride (TG) ได้บ้าง และที่สำคัญคือสามารถเพิ่มระดับ HDL ได้ทั้ง 3 ความเข้มข้นคือ 10, 100 และ 300 mg/kg ซึ่งประสิทธิภาพในการลดระดับ TC, TG ยังไม่เทียบเท่ากับยา Atorvastatin แต่ประสิทธิภาพในการเพิ่มระดับ HDL นั้นดีกว่ายา Atorvastatin ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารสกัดลูกหม่อนสามารถลดระดับ Total cholesterol และ LDL ในตับได้

คำสำคัญ: หม่อน ลูกหม่อน ไขมันในตับ การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับ

Abstract

Atherosclerosis is disease that causes the highest incidence of death worldwide which tends to increase every year. Atherosclerosis can be treated by medication in the statin group; however, the drug has many side effects to the body. The objective of this study was to investigate the effect of dried mulberry powder (*Morus alba L.*) on liver lipid profile levels of mice fed with high fat (HF) diets. Mice (*Mus musculus*) strain C57BL/6, 8 weeks old, female, were used as a model in this study. They were divided into the control group (n = 5) and the group that were induced to arteriosclerosis by feeding with HF/HS diet for 3 months (n=20). The latter were divided into four subgroups: the atherosclerosis (n=5), the atherosclerosis group receiving 10 mg/kg mulberry extract (n=5), 100 mg/kg mulberry extract (n=5), 300 mg/kg mulberry extract (n=5), and the atherosclerosis group receiving 5 mg/kg atorvastatin (n=5). Lipids were extracted from liver by Folch method and were determined for the amounts of Total cholesterol (TC), Triglyceride (TG), HDL, and LDL using the liquicolor® test kit (Standbio, USA) by enzymatic-colorimetric method. The result showed that dried mulberry powder at concentrations of 10 mg/kg can reduce Total cholesterol (TC) level and LDL level effectively while lower Triglyceride level slightly. More interestingly, dried mulberry powder at 10, 100, and 300 mg/kg doses can increase liver HDL level effectively. The efficacy of mulberry for lowering liver TC and TG level was not equal to those of Atorvastatin; however, its efficacy for increasing liver HDL was better than that of Atorvastatin. In conclusion, dried mulberry powder at 10 mg/Kg can lower liver Total cholesterol and LDL.

Keywords *Morus alba*, mulberry fruit, liver lipid profile, lipid gene expression in liver

บทที่ 1 บทนำ

1. ที่มาและความสำคัญ

ภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญที่ทำให้เกิดโรคระบบหัวใจร่วมหลอดเลือด (cardiovascular diseases; CVDs) เช่น โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) โรคหัวใจขาดเลือด (ischemia) โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) ซึ่งเมื่อเกิดขึ้นแล้วเป็นภาระให้กับผู้ป่วยที่ต้องได้รับการดูแลอย่างต่อเนื่อง และมักต้องได้รับยาเพื่อรักษาตลอดชีวิต ส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และก่อให้เกิดภาระต่อสังคมทั้งด้านการรักษาพยาบาลและการดูแลผู้ป่วย¹ จากรายงานขององค์การอนามัยโลก (WHO) โรคในกลุ่ม CVDs เช่น โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และ โรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease/ stroke) เป็นสาเหตุการตายอันดับหนึ่งของประชากรโลกทั้งในเพศหญิงและเพศชาย และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 17.1 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2004 เป็น 23.4 ล้านคนในปี ค.ศ. 2030 โดยในประเทศไทยมีผู้ป่วยเสียชีวิตด้วยโรคในกลุ่ม CVDs สูงถึง 40,000 คนต่อปี หรือคิดเป็นชั่วโมงละ 5 คน (กระทรวงสาธารณสุข, 2550)²

ภาวะไขมันในเลือดสูงและ/น้ำตาลในเลือดสูง ยังสร้างปัญหาตามมาอีกหลายอย่าง อาทิ การอักเสบของหลอดเลือดซึ่งทำให้หลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) การสะสมไขมันมากเกินไปในเซลล์ตับ (steatosis) หรือ non-alcoholic fatty liver disease รวมทั้งโรค metabolic syndromes อื่น ๆ เช่น โรคอ้วน (obesity) และเบาหวาน (diabetes mellitus)³ การบริโภคอาหารที่เหมาะสมสามารถลด บรรเทา ป้องกันความผิดปกติ ทำให้ค่าระดับไขมันในเลือดอยู่ในระดับที่เหมาะสม คือ มีระดับ total cholesterol (TC), triglyceride (TG), และ low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) ต่ำ และมีระดับ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) สูง สารสกัดจากพืช (phytochemicals) ที่น่าสนใจอย่างยิ่งได้แก่ พืชในตระกูลเบอร์รี่ (berries) เช่น ลูกหม่อน เพราะมีสารกลุ่ม anthocyanins ที่ช่วยลดภาวะเครียดที่เกิดจากการออกซิเดชัน (oxidative stress) จึงช่วยป้องกันอนุมูลอิสระ (antioxidant protection)⁴ อันเป็นมูลเหตุของการเกิดโรคต่าง ๆ ที่เป็นปัญหาสำคัญของสุขภาพในปัจจุบัน

ในงานวิจัยนี้มีความสนใจในการศึกษาผลของสารสกัดลูกหม่อน ซึ่งเป็นสารสกัดที่ผ่านการทดสอบหาปริมาณแอนโทไซยานิน (total monomeric anthocyanin content) การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (DPPH, FRAP assay) การทดสอบฤทธิ์ต้านสารสื่ออักเสบ (anti-inflammatory cytokines) และฤทธิ์ต้านการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือด (anti-platelet aggregation) ในเบื้องต้นมาแล้ว จากผลการทดลองเบื้องต้นโดยสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) พบว่าสารสกัดลูกหม่อนมีระดับของแอนโทไซยานินที่สูงและมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation activity) คณะผู้วิจัยจึงวางแผนทำวิจัยต่อยอดโดยจะนำสารสกัดลูกหม่อนไปทดสอบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ atherosclerosis และ dyslipidemia จากการได้รับอาหารที่มีไขมัน (High fat diet; HF) เพื่อดูผลของสารสกัดในการลดระดับไขมันในตับและผลต่อการแสดงออกของ

ยีนที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในตับ ข้อมูลที่ได้จะมีประโยชน์ในการพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อป้องกันการเกิดโรคในกลุ่ม CVDs ต่อไป

2. วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดลูกหม่อนต่อ lipid profile ในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดลูกหม่อนต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับของหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลสูง



บทที่ 2 วิธีการทดลอง

2.1 การเตรียมสารสกัดลูกหม่อน

สารสกัดจากลูกหม่อนที่มี anthocyanin สูง เตรียมโดยฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยเป็นสารสกัดหยาบชั้นเหนียว (semi-solid) มีการเตรียมสารสกัดโดยใช้สารละลายเอทานอล ควบคุมคุณภาพโดยวิเคราะห์ปริมาณ anthocyanin โดย HPLC

2.2 สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนู C57BL/6 อายุ 8 สัปดาห์ เพศเมีย จากบริษัทโนมูระ หนูทั้งหมดทุกตัว จะถูกนำมาเลี้ยงอย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ณ สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร อยู่ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิ ปริมาณแสง และความชื้นสัมพัทธ์ ตามที่ทางสถานสัตว์ทดลองเพื่อ งานวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวรกำหนด โครงการนี้ ได้รับอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร หมายเลข NU-AE591026

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งเป็น 5 กลุ่มดังนี้

- กลุ่มที่ 1 control (C) group : กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น
- กลุ่มที่ 2 atherosclerosis (A) group : กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนน้ำกลั่น
- กลุ่มที่ 3 A+สารสกัดลูกหม่อนขนาด 10 mg/kg BW: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนสารสกัดลูกหม่อนขนาด 10 mg/kg BW
- กลุ่มที่ 4 A+สารสกัดลูกหม่อนขนาด 100 mg/kg BW: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนสารสกัดลูกหม่อนขนาด 100 mg/kg BW
- กลุ่มที่ 5 A+สารสกัดลูกหม่อนขนาด 300 mg/kg BW: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนสารสกัดลูกหม่อนขนาด 300 mg/kg BW
- กลุ่มที่ 6 A+ยา atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งและได้รับการป้อนยาลดไขมันในเลือดคือ atorvastatin ขนาด 5 mg/kg BW

สัตว์ทดลองจะได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน และถูกวัดระดับกลูโคสในเลือดทั้งก่อนและหลังสิ้นสุดระยะเวลาศึกษา จากนั้นจึงถูกทำให้ตายอย่างสงบและเก็บตัวอย่างตับเพื่อศึกษาค่าระดับไขมัน (lipid profile) และ gene expression ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในตับ

2.3 การสกัดลิพิดจากตับ

ทำการสกัดลิพิดจากตับตามวิธีของ Folch method โดยมีหลักการคร่าวๆคือ นำตับแช่แข็ง (10 mg) มาบดให้ละเอียดและย้ายมาใส่ test tube เติม 600 ul chloroform/methanol (2:1, v/v) และนำไปโม่ในจีไนซ์ที่ 65000 rpm 10 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างไปเซนตริฟิวจ์ที่ 14,000 rpm เป็นเวลา 10

นาที่ หลังจากที่เซนตริฟิวจ์แล้วดูดส่วน organic layer 300 ul มาใส่ใน tube ใหม่และ vacuum-dried เป็นเวลา 20 นาที ชั่งน้ำหนักลิพิดแห้งที่ได้และนำมาละลายใน 200 ul ของ 1X reaction buffer (5x reaction buffer: 0.5 M potassium phosphate, pH 7.4, 0.25 M NaCl, 25 mM cholic acid, 0.5% Triton X-100) สำหรับชุดทดสอบ liquicolor[®] (Standbio, USA) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณ triglyceride และ cholesterol, HDL-C และ LDL-C ในขั้นตอนต่อไป

2.4 การหาปริมาณ triglyceride, total cholesterol, HDL-C และ LDL-C ในตับ

ปริมาณ triglyceride (TG) ในตับจะถูกวัดโดยวิธี enzymatic-colorimetric โดยใช้ชุดทดสอบ TRIGLYCERIDES liquicolor[®] mono (Standbio, USA), ปริมาณ Total cholesterol (TC), HDL-C วัดโดยใช้ชุดทดสอบ CHOLESTEROL liquicolor[®] และ HDL CHOLESTEROL liquicolor[®] ตามลำดับ (Standbio, USA) ตาม protocol ที่อยู่ในคู่มือของบริษัท ปริมาณ LDL-C จะถูกคำนวณจากสูตร $LDL = TC - [(TG/5) + HDL]$

2.5 การสกัด total RNA การสังเคราะห์ cDNA และการวิเคราะห์ gene expression จากตับ

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ gene expression ที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของไขมันในตับ ตัดตับออกเป็นชิ้นขนาด 0.1-0.2 g และโฮโมจีไนซ์โดยใช้ BioMasher single use homogenizer (Omni International) สกัด total RNA จากตับโดยใช้ RNeasy Mini Kit (Qiagen) ใช้ Superscript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Life Technology) เพื่อ reverse transcribe $\frac{1}{3}$ ug total RNA ให้เป็น complementary DNA ทำ quantitative-real-time-PCR โดยใช้วิธีของ SYBR green ตาม protocol ของ SYBR[®] Green PCR Master Mix จากบริษัทผู้ผลิต (Applied Biosystems, Life Technology) ด้วยเครื่อง LightCycler96 (Roche) qPCR primers ออกแบบโดยใช้ Primer3.0 สั่งซื้อจาก Integrated DNA Technologies; IDT ได้แก่ ยีน 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), AMP-activated protein kinase (AMPK), lipoprotein receptor (LDL-R), carnitine palmitoyltransferase-1A (CPT-1A), peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ), CCAAT enhancer binding protein- α (C/EBP α), acyl-CoA oxidase (ACO1), acetyl-CoA carboxylase 1 (ACC1), fatty acid synthase (FAS), lipoprotein lipase (LPL), และ Immediate early response 3 (IER3) โดยมี β -actin primers เป็น housekeeping gene ใน 20 ul reaction มีการควบคุมคุณภาพของการทำ qPCR โดยมีการ validate qPCR efficiency ของ qPCR primers ทุกตัวก่อนใช้ มีการทำ standard curve ในทุกการทดลอง และตรวจสอบ peak ของ melting curve การวิเคราะห์ตัวอย่างทำเป็น triplicates การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนคำนวณโดยใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$

2.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวัดค่า lipid profile และ Ct value จากการทำ qPCR จากตัวอย่างหนูแต่ละตัวอย่าง จะทำเป็น triplicates แล้วจึงใช้ค่าเฉลี่ยสำหรับการวิเคราะห์เปรียบเทียบในแต่ละ treatment group ความน่าเชื่อถือของค่าเฉลี่ยแสดงโดยใช้ค่า mean \pm SEM การวิเคราะห์ทางสถิติกระทำโดยใช้ program RStudio (Boston, USA) การวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใช้วิธี one-way ANOVA ตามด้วย post hoc test ตามความเหมาะสม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะและจำนวน ค่า p value ≤ 0.05 ถือว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



บทที่ 3 ผลการทดลอง

3.1 การสกัดลิพิดจากตับ

Folch method เป็นวิธีการที่นิยมมากที่สุดในการสกัดลิพิดจากตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) วิธีนี้ใช้คลอโรฟอร์ม/เมทานอล (Chloroform/Methanol) เพื่อสกัดแยกสารที่ละลายในตัวทำละลายไม่มีขั้ว เช่น คลอโรฟอร์มและสารที่ละลายในตัวทำละลายมีขั้ว เช่น เมทานอลออกจากกัน จากนั้นนำเฉพาะส่วนคลอโรฟอร์มมาล้างด้วย 0.9% NaCl เพื่อกำจัดสารที่ไม่ใช่ลิพิดออก และนำลิพิดไประเหยเอาคลอโรฟอร์มออกด้วยลมไนโตรเจน (nitrogen purge) และ vacuum drier จึงได้ total lipid จากตับที่แห้งติดอยู่กับข้างหลอด จากนั้นจึง reconstitute ลิพิดที่สกัดได้โดยใช้สารละลาย 2% Triton X-100 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Total cholesterol, Triglyceride, HDL และ LDL

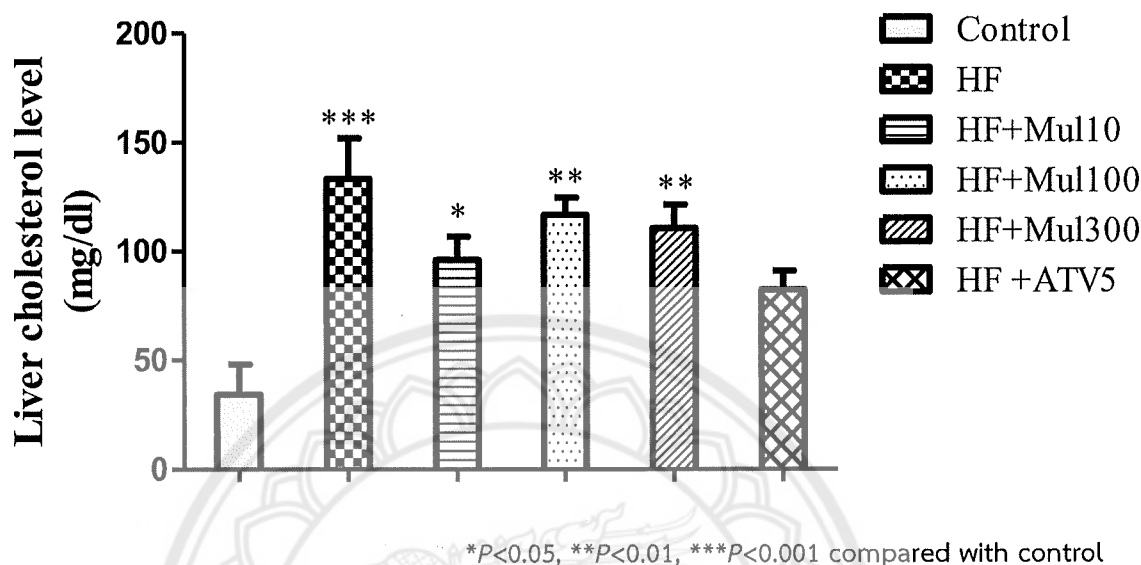
ลิพิดที่สกัดได้มีลักษณะดังต่อไปนี้

กลุ่มตัวอย่าง	ลักษณะที่พบ
ลิพิดจากหนูกลุ่ม Control	มีลักษณะเป็นไขมันสีขาวติดอยู่ที่ข้างหลอด
ลิพิดจากหนูกลุ่ม HF	มีลักษณะเป็นไขมันสีขาวปริมาณมากกว่ากลุ่ม Control ติดอยู่ที่ข้างหลอด
ลิพิดจากหนูกลุ่ม HF + Mul 10	คราบสีขาวมีปริมาณลดลงกว่ากลุ่ม HF
ลิพิดจากหนูกลุ่ม HF + Mul 100	คราบสีขาวมีปริมาณลดลง
ลิพิดจากหนูกลุ่ม HF + Mul 300	คราบสีขาวมีปริมาณลดลง
ลิพิดจากหนูกลุ่ม HF + ATV 5	คราบสีขาวมีปริมาณลดลง

ตารางที่ 1 ลักษณะของไขมันที่สกัดได้จากตับของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ

3.2 ปริมาณ Total cholesterol

ลิพิดที่ reconstitute อยู่ใน 2% Triton X-100 ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Total cholesterol โดยใช้ชุดทดสอบ CHOLESTEROL liquicolor[®] ตาม instruction ของผู้ผลิต ปริมาณ ลิพิดที่สกัดได้คิดเทียบต่อน้ำหนัก tissue 50 mg และได้ผลออกมาดังนี้

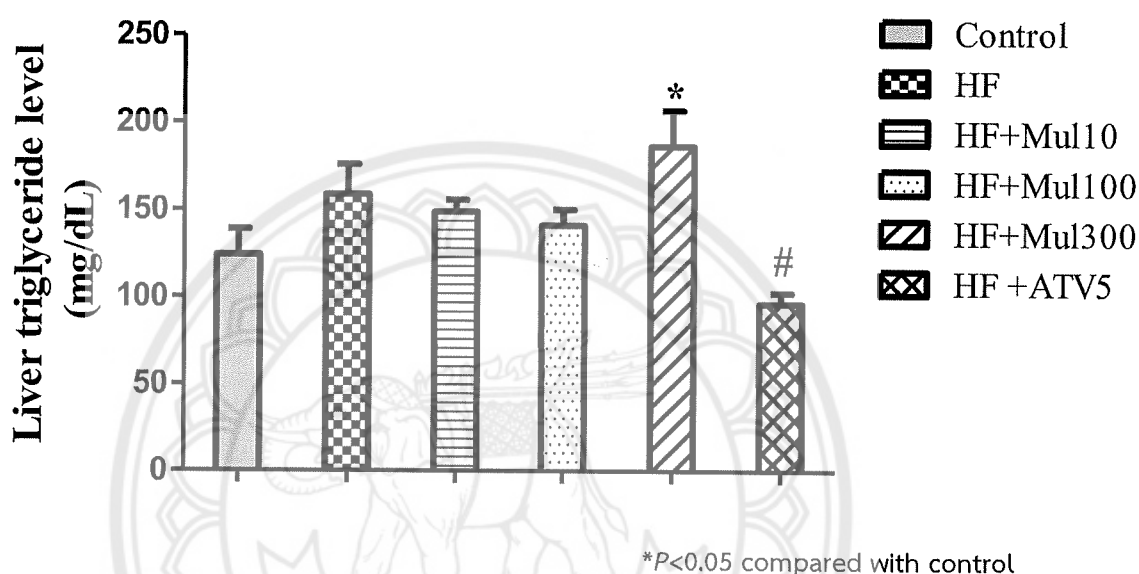


รูปที่ 1 ปริมาณ Liver Total Cholesterol (TC) ที่สกัดได้จากตับของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ

หนูในกลุ่ม Control (n = 6) เป็นหนูที่ได้รับอาหารปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น มีค่าระดับ Total cholesterol (TC) ในตับเท่ากับ 31.31 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg ในขณะที่ หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (n = 6) มีระดับ TC พุ่งสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.001$ เป็น 120.3 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg หรือเพิ่มขึ้น 3.84 เท่า (284%) ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 10 mg/kg body weight (n = 6) มีระดับ TC ลดลงมาเป็น 95.28 mg/dL หรือลดลงมาจากหนูกลุ่ม HF เป็นจำนวน 20.79% ส่วนหนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณเพิ่มขึ้นเป็น 100 และ 300 mg/kg body weight (n = 6 ทั้งสองกลุ่ม) มีระดับ TC ลดลงจากหนูในกลุ่ม HF คิดเป็น 8.14% และ 3.28%ตามลำดับ (110.5 และ 124.25 mg/dL) แต่ไม่มากเท่ากับหนูในกลุ่มที่ได้รับ dried mulberry powder 10 mg/kg ยา Atorvastatin เป็นยาที่ใช้ลดระดับ cholesterol ในเลือด ถูกใช้เป็น positive control สำหรับการทดลอง โดย dose ที่ใช้กับหนู mouse คือ 5 mg/Kg body weight พบว่า สามารถลดระดับ TC ลงมาได้เป็น 89.71 mg/dL (n = 6) หรือลดลงจากหนูในกลุ่ม HF คิดเป็น 25.42 % ดังนั้นหากเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ dried mulberry powder ที่ 10 mg/kg กับยา Atorvastatin พบว่า ประสิทธิภาพในการลดระดับ TC ในตับมีค่าเทียบเท่ากับ 20.79% และ 25.42% ตามลำดับ

3.3 ปริมาณ Triglyceride

ลิพิดที่ reconstitute อยู่ใน 2% Triton X-100 ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Total cholesterol โดยใช้ชุดทดสอบ TRIGLYCERIDES liquicolor[®] mono ตาม instruction ของผู้ผลิต ปริมาณลิพิดที่สกัดได้คิดเทียบต่อน้ำหนัก tissue 50 mg และได้ผลออกมาดังนี้

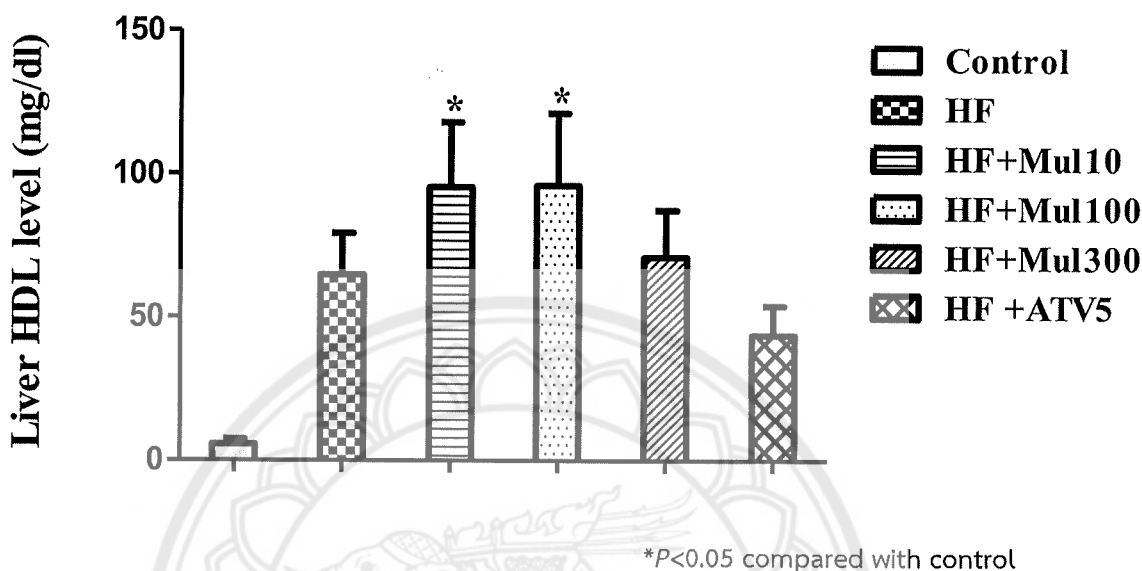


รูปที่ 2 ปริมาณ Liver Triglyceride (TG) ที่สกัดได้จากตับของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ

หนูในกลุ่ม Control (n = 6) ซึ่งได้รับอาหารปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น มีค่าระดับ Triglyceride (TG) เท่ากับ 113.16 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg ในขณะที่ หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (n = 6) มีระดับ TG เพิ่มขึ้นเป็น 149.4 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg หรือเพิ่มขึ้น 32% ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 10 mg/kg และ 100 mg/Kg body weight (n = 6 ทั้งสองกลุ่ม) มีระดับ TG ลดลงมาเป็น 143.55 mg/dL และ 143.58 mg/dL ตามลำดับ หรือลดลงมาจากหนูกลุ่ม HF เป็นจำนวน 4.07% และ 4.05% ตามลำดับ ส่วนหนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder 300 mg/kg body weight (n = 6) มีปริมาณ TG เพิ่มขึ้นเป็น 185 mg/dL สำหรับหนูที่ได้รับยา Atorvastatin 5 mg/Kg body weight ซึ่งใช้เป็น positive control มีระดับ TG ลดลงเป็น 94.27 mg/dL (n = 6) หรือลดลงจากหนูในกลุ่ม HF คิดเป็น 58.48 % ดังนั้นเมื่อดูจากผลการทดลอง dried mulberry powder ที่ 10 mg/kg และ 100 mg/kg สามารถลดระดับ TG ลงได้ 4.07% และ 4.05% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม HF และยา Atorvastatin สามารถลดระดับ TG ในตับลงได้ 58.48% จะสังเกตได้ว่า ปริมาณ triglyceride ของหนูในกลุ่ม High Fat (HF) มีค่าสูงกว่าหนูในกลุ่ม Control ไม่มากเท่ากับค่าของ Total Cholesterol

3.4 ปริมาณ HDL

ลิพิดที่ reconstitute อยู่ใน 2% Triton X-100 ถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณ Total cholesterol โดยใช้ชุดทดสอบ HDL CHOLESTEROL liquicolor[®] ตาม instruction ของผู้ผลิต ปริมาณที่สกัดได้คิดเทียบต่อน้ำหนัก tissue 50 mg และได้ผลออกมาดังนี้

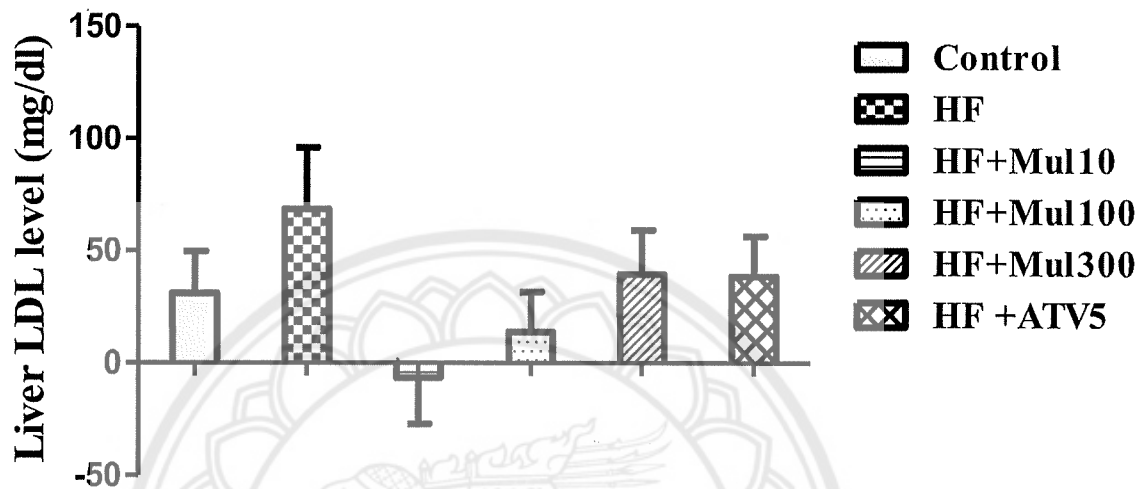


รูปที่ 3 ปริมาณ Liver HDL ที่สกัดได้จากตับของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ

หนูในกลุ่ม Control (n = 6) ซึ่งได้รับอาหารปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น มีค่าระดับ HDL เท่ากับ 10.12 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg ในขณะที่ หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (n = 6) มีระดับ TG เพิ่มขึ้นเป็น 47.93 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg หรือเพิ่มขึ้น 373.61% ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 10 mg/kg และ 100 mg/Kg body weight (n = 6 ทั้งสองกลุ่ม) มีระดับ HDL เพิ่มขึ้นไปอีกเป็น 67.48 mg/dL และ 68.66 mg/dL ตามลำดับ หรือเพิ่มขึ้นจากหนูกลุ่ม HF คิดเป็น 40.78% และ 43.25% ตามลำดับ หรือเพิ่มขึ้นจากหนูกลุ่ม Control คิดเป็น 566.79% และ 578.45% ตามลำดับ ส่วน หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder 300 mg/kg body weight (n = 6) มีปริมาณ HDL ลดลงจากหนูกลุ่มที่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 10 และ 100 mg/kg body weight เหลือ 54.68 mg/dL แต่เพิ่มขึ้นจากกลุ่ม Control คิดเป็น 440.31% สำหรับหนูที่ได้รับยา Atorvastatin 5 mg/Kg body weight ซึ่งเป็นกลุ่ม positive control มีระดับ HDL เพิ่มขึ้นเป็น 40.18 mg/dL (n =6) หรือเพิ่มขึ้นจากหนูในกลุ่ม Control คิดเป็น 297.03% ดังนั้นสรุปได้ว่า dried mulberry powder ที่ 10 และ 100 mg/kg สามารถเพิ่มระดับ HDL ขึ้นได้ 566.79% และ 578.45% ส่วน dried mulberry powder ที่ 300 mg/kg เพิ่มระดับ HDL ขึ้นได้ 440.31% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control ในขณะที่ยา Atorvastatin สามารถเพิ่มระดับ HDL ในตับขึ้นได้ 297.03%

3.5 ปริมาณ LDL

ปริมาณ LDL ในตัวอย่าง สามารถคำนวณได้จาก ปริมาณ LDL = TC - [(TG/5) + HDL] โดยที่ ปริมาณที่คำนวณได้คิดเทียบต่อน้ำหนัก tissue 50 mg และได้ผลออกมาดังนี้



รูปที่ 4 ปริมาณ Liver LDL ที่สกัดได้จากตับของหนูทดลองกลุ่มต่าง ๆ

หนูในกลุ่ม Control (n = 6) ซึ่งได้รับอาหารปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่น มีค่าระดับ LDL เท่ากับ 41.50 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg ในขณะที่ หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (n = 6) มีระดับ LDL เพิ่มขึ้นเป็น 73.15 mg/dL ต่อน้ำหนักตับ 50 mg หรือเพิ่มขึ้น 76.26% ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 10, 100 และ 300 mg/Kg body weight (n = 6 ทั้งสามกลุ่ม) ล้วนมีระดับ LDL ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม HF คิดเป็น 100%, 72.65% และ 28.48% ตามลำดับ หรือคิดเป็น 100%, 51.80% และ 8.43% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม Control แต่หนูกลุ่มที่ได้รับ dried mulberry powder ปริมาณ 300 mg/Kg body weight มีระดับ LDL ที่ไม่ต่างจากกลุ่ม Control และมีค่า LDL ใกล้เคียงกับหนูกลุ่มที่ได้รับยา Atorvastatin 5 mg/Kg body weight

ส่วนหนูที่ได้รับยา Atorvastatin 5 mg/Kg body weight มีระดับ LDL ลดลงมาเป็น 45 mg/dL (n = 6) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับหนูในกลุ่ม Control หรือลดลงมาจากหนูในกลุ่ม HF คิดเป็น 28% ดังนั้นสรุปได้ว่า dried mulberry powder ที่ 10, 100 และ 300 mg/kg สามารถลดระดับ LDL ลงได้ 100%, 72.65% และ 28.48% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่ม HF จนมีค่าเข้าใกล้กลุ่ม Control และกลุ่มที่ได้รับยา Atorvastatin

3.6 การสกัด total RNA การสังเคราะห์ cDNA และการวิเคราะห์ gene expression จากตับ

ผู้วิจัยได้ออกแบบ RT-PCR primers สำหรับวิเคราะห์การแสดงออกของยีนจำนวน 11 ยีน โดยอ้างอิงจากงานวิจัยอื่นๆ จากนั้นจึงนำไป Primer Blast กับจีโนมของ *Mus musculus* บนฐานข้อมูลของ NCBI พบว่า 100% matched และได้ดำเนินการสังเคราะห์ RT-PCR primers ดังแสดงในตารางที่ 2 แต่อย่างไรก็ได้ยุติการวิจัยไว้แต่เพียงเท่านี้ ไม่ได้ดำเนินการวิจัยต่อ

ตารางที่ 2 Primer sequences used for RT-PCR

ลำดับที่	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length	NCBI Reference Sequence
1	HMG-CoA reductase (1)	CAGGATGCAGCACAGA ATGT	CTTTCATGCTCCTT GAACA	190	NM_008255.2
	<i>Mus musculus</i> 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (Hmgcr), transcript variant 1, mRNA				
	HMG-CoA reductase (2)	GTTCTTCCGTGCTG TGTTCTGGA	CTGATATCTTTAGTGC AGAGTGTGGCAC	461	NM_008255.2
	<i>Mus musculus</i> 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase (Hmgcr), transcript variant 1, mRNA				
2	FAS (1)	TGATGTGGAACACAG CAAGG	GGCTGTGGTGACTCTT AGTGATAA	120	NM_007988.3
	<i>Mus musculus</i> fatty acid synthase (Fasn), mRNA				
	FAS (2)	AGAGATCCCGAGACG CTTCT	GCCTGGTAGGCATTCT GTAGT	158	NM_007988.3
	<i>Mus musculus</i> fatty acid synthase (Fasn), mRNA				

ลำดับที่	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length	NCBI Reference Sequence
3	SREBP-1c(1)	GCCGGCGCCATGGACG AGCTGGCC	CAGGAAGGCTTCC AGAGAGGAGGC	264	NM_011480.4
	<i>Mus musculus</i> sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1), transcript variant 1, mRNA				
	SREBP-1c(2)	AGGCCATCGACTACAT CCG	TCCATAGACACAT CTGTGCCTC	148	NM_011480.4
<i>Mus musculus</i> sterol regulatory element binding transcription factor 1 (Srebf1), transcript variant 1, mRNA					
4	LPL(1)	CAGAGTTTGACCGCCT TCC	AATTTGCTTTCGA TGTCTGAGAA	77	NM_008509.2
	<i>Mus musculus</i> lipoprotein lipase (Lpl), mRNA				
	LPL(2)	CCAATGGAGGCACCTTT CCA	CCACGTCTCCGAG TCCTCTCT	81	NM_008509.2
<i>Mus musculus</i> lipoprotein lipase (Lpl), mRNA					
5	PPAR α (1)	TCGGCGAACTATTCGG CTG	GCACTTGTGAAAA CGGCAGT	106	NM_011144.6
	<i>Mus musculus</i> peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara), transcript variant 1, mRNA				
	PPAR α (2)	ACTACGGAGTTCACGC ATGTG	TTGTCGTACACCA GCTTCAGC	76	NM_011144.6
<i>Mus musculus</i> peroxisome proliferator activated receptor alpha (Ppara), transcript variant 1, mRNA					

	Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product length	NCBI Reference Sequence
6	LDL-R(1)	CTCCTGCATTCACGGT AGCC	CCCACTGTGACAC TTGAACTTG	124	NM_010700.3
		<i>Mus musculus</i> low density lipoprotein receptor (Ldlr), transcript variant 1, mRNA			
	LDL-R(2)	ACCTGCCGACCTGATG AATTC	GCAGTCATGTTCA CGGTCACA	81	NM_010700.3
		<i>Mus musculus</i> low density lipoprotein receptor (Ldlr), transcript variant 1, mRNA			
7	CPT-1A(1)	CTATGCGCTACTCGCT GAAGG	GGCTTTCGACCCG AGAAGA	124	NM_013495.2
		<i>Mus musculus</i> carnitine palmitoyltransferase 1a, liver (Cpt1a), mRNA			
	CPT-1A(2)	CTCAAGATGGCAGAGG CTCA	GGGGAAC ACACCAGTGATGA	174	NM_013495.2
		<i>Mus musculus</i> carnitine palmitoyltransferase 1a, liver (Cpt1a), mRNA			
8	ACC(1)	GTCCCCAGGGATGAAC CAATA	GCCATGCTCAACC AAAGTAGC	132	NM_133360.2
		<i>Mus musculus</i> acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca), mRNA			
	ACC(2)	AATGAACGTGCAATCC GATTTG	ACTCCACATTTGC GTAATTGTTG	136	NM_133360.2
		<i>Mus musculus</i> acetyl-Coenzyme A carboxylase alpha (Acaca), mRNA			
9	C/EBP α (1)	GTTAGCCATGTGGTAG GAGACA	CCCAGCCGTTAGT GAAGAGT	353	NM_00128751 4.1
		<i>Mus musculus</i> CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (Cebpa), transcript variant 1, mRNA			

	C/EBP α (2)	AAACAACGCAACGTGG AGAC	TGTCCAGTTCACG GCTCAG	100	NM_00128751 4.1
		<i>Mus musculus</i> CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha (Cebpa), transcript variant 1, mRNA			
10	ACO1(1)	CAGGAAGAGCAAGGAA GTGG	CCTTTCTGGCTGA TCCCATA	189	NM_015729.3
		<i>Mus musculus</i> acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl (Acox1), transcript variant 1, mRNA			
	ACO1(2)	CAGCAAAAGCCACAAA GACG	AGTTCAGAGAGT TCCACAC	279	NM_015729.3
		<i>Mus musculus</i> acyl-Coenzyme A oxidase 1, palmitoyl (Acox1), transcript variant 1, mRNA			
11	IER3(1)	ACTCCCAGCTTGGGGA TTAG	TACTAGGCGACCC CAGACAG	211	NM_133662.2
		<i>Mus musculus</i> immediate early response 3 (Ier3), mRNA			
	IER3(2)	TCTGGTCCCGAAATTT TCAC	ACACACCCTCTTC AGCCATC	226	NM_133662.2
		<i>Mus musculus</i> immediate early response 3 (Ier3), mRNA			

บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 การสกัดลิพิดจากตับ

Folch method เป็นวิธีการที่ classical มากที่สุดและเป็นที่ยอมรับมากที่สุดในการสกัดลิพิดจากตัวอย่างทางชีวภาพ (biological samples) ในการทดลองพบว่า เมื่อ homogenize ตัวอย่างตับปริมาณ 50 mg ในคลอโรฟอร์ม/เมทานอล (2:1 v/v) ตัวอย่างตับเกิดการแข็งตัวและสามารถถูกบดละเอียดโดย homogenizer ได้ยากขึ้น เมื่อผู้วิจัยทดลองเปลี่ยนมาใช้ tapered tissue grinding pestles พบว่า pestles ส่วนหนึ่งได้ละลายในคลอโรฟอร์ม จึงได้เปลี่ยนกลับมาใช้ homogenizer ซึ่งทำให้การทำให้เซลล์แตกนี้ต้องใช้เวลาานาน หากมีวิธีการที่ทำให้เซลล์แตกอย่างรวดเร็ว ใน 1.5 ml microfuge tubes โดยที่ lipoproteins ในตับมีโอกาสสัมผัสกับเอนไซม์ที่เกิดจากการแตกเซลล์ได้น้อย จะทำให้การวัดปริมาณ lipoproteins ที่เป็น lipid profiles ในเนื้อเยื่อตับมีความแม่นยำมากขึ้น

4.2 ปริมาณ Total cholesterol

จากรูปที่ 1 จะเห็นว่าระดับของ Total cholesterol ในตับของหนูกลุ่ม HF มีค่าสูงขึ้นกว่าหนูในกลุ่ม Control อย่างมากถึง 284% ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ว่า model ของการเหนี่ยวนำให้หนูเกิดสภาวะอ้วนและไขมันสูงโดยให้อาหารไขมันไขมันสูงเป็นผลสำเร็จ ผลการทดลองนี้ก็ยังสอดคล้องกันกับระดับ lipid profile (Total Cholesterol, Triglyceride, HDL, LDL) ในเลือดและ ลักษณะทาง histology ที่เกิดกับผนังหลอดเลือดภายหลังที่มีการตรวจสอบลักษณะทาง histology ของ liver paraffin sections (ข้อมูลไม่ได้นำมาแสดง เป็นงานวิจัยของโครงการผู้วิจัยร่วม) ทำให้มั่นใจได้ว่า สัตว์ทดลองได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะอ้วนและไขมันในเลือดสูงเป็นผลสำเร็จ เมื่อทรีทด้วยผงลูกหม่อนอบแห้ง (dried mulberry powder) ปริมาณ 10 mg/Kg น้ำหนักตัวร่วมไปกับการให้อาหารไขมันสูงพบว่า สามารถลดระดับ Total Cholesterol ลงมาจนได้ใกล้เคียงกับหนูที่ทรีทด้วยยา Atorvastatin 5 mg/Kg น้ำหนักตัว ทำให้ทราบว่า dose ที่ใช้ในการทรีทคือ 10 mg/Kg น้ำหนักตัวน่าจะมีความเหมาะสมที่สุด ทว่า dose ที่ 100 และ 300 10 mg/Kg ไม่ก่อให้เกิดการลดลงของปริมาณ Total cholesterol ในตับแบบ dose-dependent manner สาเหตุน่าจะมาจากพฤติกรรมกรกินอาหารของหนู ที่มีส่วนทำให้ปริมาณ cholesterol สูงขึ้น และมีผลทำให้ค่า triglyceride เพิ่มขึ้น, HDL ต่ำลง และ LDL เพิ่มขึ้น

4.3 ปริมาณ triglyceride

จะเห็นว่า ผงลูกหม่อนอบแห้ง ไม่ค่อยแสดงคุณสมบัติในการลดระดับ triglyceride แต่มีคุณสมบัติในการลด total cholesterol และ LDL มากกว่า โดยที่ผงลูกหม่อนอบแห้งที่ dose 13, 100 และ 300 mg/Kg น้ำหนักตัวมีความสามารถในการลดระดับ triglyceride ในตับได้ไม่ต่างกัน ยกเว้น ที่ 300 mg/Kg ที่มีค่าสูงลอยต่างจากกลุ่มอื่น ๆ จากรูปที่ 2 ทำให้ทราบว่าผงลูกหม่อนอบแห้ง มีผลในการลดระดับ triglyceride ได้บ้าง แต่ไม่ significant และในหนูทดลอง model นี้ ไม่ได้สร้างภาวะ

hypertriglyceride ในระดับ ระดับ hypertriglyceride ในหนูกลุ่ม HF จึงมีค่าสูงกว่าในกลุ่ม Control ไม่มาก

4.4 ปริมาณ HDL

เมื่อทรีทด้วยผงลูกหม่อนอบแห้ง พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับอาหาร HF จะมีระดับ HDL เพิ่มขึ้นทุกกลุ่ม ยกเว้นในกลุ่มสุดท้ายที่ได้รับ dose 300 mg/Kg ซึ่งมีผลการทดลองที่สวนทางในทุกด้าน ที่น่าสนใจคือ ระดับของ HDL ในหนูกลุ่ม Control ที่ได้รับอาหารปกติและได้รับการป้อนน้ำกลั่นกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหาร HF และได้รับผงลูกหม่อนอบแห้งมีค่าแตกต่างกันอย่างมาก ซึ่งหมายถึงผงลูกหม่อนอบแห้งมีคุณสมบัติในการเพิ่มระดับ HDL ที่น่าจะนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้ ส่วนเหตุผลที่ว่าทำไม หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้ได้รับอาหาร HF กลับมีระดับ HDL ที่สูงขึ้น น่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของเอนไซม์ Cholesteryl ester transfer protein (CETP) ซึ่งทำหน้าที่แลกเปลี่ยน cholesteryl ester ที่มีอยู่มากใน VLDL, IDL, และ LDL มายัง HDL จึงมีผลทำให้ระดับ HDL สูงขึ้น ที่น่าสนใจคือ ระดับ HDL ในหนูกลุ่ม HF ที่ได้รับผงลูกหม่อนอบแห้งยังมากกว่าหนูในกลุ่ม HF ที่ได้รับยา Atorvastatin ทำให้ผงลูกหม่อนอบแห้งมีความน่าสนใจในการนำไปพัฒนาต่อเป็นผลิตภัณฑ์ อาจกล่าวได้ว่าผงลูกหม่อนอบแห้งสามารถเพิ่มระดับ HDL ได้มากกว่าการใช้ยา Atorvastatin 5 mg/Kg น้ำหนักตัว ซึ่งผลในการเพิ่มระดับ HDL นี้พบในฝักเพียงไม่กี่ชนิดและผลไม้ที่มีสีม่วงโดย ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่า นอกจากคุณสมบัติในการลด total cholesterol และ LDL แล้ว ผงลูกหม่อนอบแห้งมีคุณสมบัติในการเพิ่ม HDL ที่ชัดเจน

4.5 ปริมาณ LDL

หนูในกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีระดับ LDL เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนกว่าหนูกลุ่ม Control ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงแต่ได้รับ dried mulberry powder ทั้งสามปริมาณคือ 10, 100 และ 300 mg/Kg น้ำหนักตัว ล้วนมีระดับ LDL ที่ลดลงชัดเจน อันเป็นคุณสมบัติเด่นอันหนึ่งของผลลูกหม่อนอบแห้งในครั้งนี นอกเหนือจากคุณสมบัติในการลด total cholesterol และคุณสมบัติในการเพิ่ม HDL หนูในกลุ่ม HF ที่ได้รับผงลูกหม่อนอบแห้งปริมาณ 10 mg/Kg น้ำหนักตัวมีค่า LDL ที่ติดลบ เนื่องจากในสูตรการคำนวณ ปริมาณ LDL = TC - [(TG/5) + HDL] ซึ่งหากสัตว์ทดลองมีค่า triglyceride สูงกว่า total cholesterol จะทำให้ค่าติดลบ จากแนวโน้มของกราฟในรูปที่ 4 จะเห็นได้ว่า ผงลูกหม่อนอบแห้ง มีคุณสมบัติในการลด LDL ทั้งสามปริมาณ ซึ่งผลในการลด LDL นี้มีผลเทียบเท่ากับการใช้ยา Atorvastatin ที่ 5 mg/Kg น้ำหนักตัว ทำให้คุณสมบัติในการลด LDL ของผลลูกหม่อนอบแห้งเป็นที่น่าสนใจ

จากผลการทดลองที่ได้ทำให้สรุปได้ว่า ผงมัลเบอร์รี่อบแห้ง (dried mulberry powder) ที่ความเข้มข้น 10 mg/ Kg Body weight มีประสิทธิภาพมากที่สุดในการลดปริมาณ lipid profile ในตับ โดยมีประสิทธิภาพในการลด cholesterol และ LDL มากที่สุด กว่าลดระดับ triglyceride คุณสมบัติที่น่าสนใจอีกอย่างหนึ่งคือ ช่วยเพิ่มระดับ HDL ซึ่งพบว่ามีในฝักและผลไม้สีม่วงเพียงไม่กี่ชนิด ทำให้ผลหม่อนมีความน่าสนใจในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ ในการลด cholesterol และ LDL เหมาะ

กับผู้ที่อยู่ในภาวะ dyslipidemia มีปัญหา cholesterol และ LDL สูงแต่ระดับ triglyceride ไม่สูง หรือ ต้องการลด LDL ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของโรค atherosclerosis ในการลดระดับ cholesterol ทางผู้วิจัย เห็นว่าหากทำการศึกษาในเชิงลึกให้มากขึ้น จะทำให้สามารถยืนยันคุณสมบัติในการลด total cholesterol, LDL และเพิ่ม HDL เพื่อให้เกิดความมั่นใจในการรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์ได้



บทที่ 5 ข้อจำกัดและข้อเสนอแนะ

5.1 ข้อจำกัดในการทำวิจัย

เวลาในการทำวิจัย เป็นปัญหาหลักของการทำวิจัยในครั้งนี้ เนื่องจากมีภาระงานสอนที่เพิ่มขึ้น และต้องเตรียมวิดีโอประกอบการสอนและการเอกสารในการบริหารจัดการรายวิชาที่เพิ่มขึ้นอย่างมาก หลังจากประเทศไทยถูกกระทบจากสถานการณ์ของเชื้อ COVID-19 ตั้งแต่เดือน มีนาคม 2563- กันยายน 2563

5.2 ข้อเสนอแนะ

จะสามารถทำให้การเบิกจ่ายเงินวิจัยทำได้เร็วกว่า 6 เดือนหรือไม่



เอกสารอ้างอิง

1. Reis JF, Monteiro WV, de Souza Gomes R, do Carmo MM, da Costa GV, Ribera PC, Monteiro MC. Action mechanism and cardiovascular effect of anthocyanins: a systematic review of animal and human studies. *Journal of Translational Medicine*. 2016; 14(1): 315.
2. กระทรวงสาธารณสุข. รายงานที่เกี่ยวข้องกับโรคหัวใจ.
<https://hdcservice.moph.go.th/hdc/main/search.php?search=%E0%B9%82%E0%B8%A3%E0%B8%84%E0%B8%AB%E0%B8%B1%E0%B8%A7%E0%B9%83%E0%B8%88>.
(สืบค้นด้วยคำสำคัญ “โรคหัวใจ” เมื่อ 23 กันยายน 2560)
3. Xu X., Lu L., Dong Q., Xiaolin Li, Zhang N., Xin Y., Xuan S. Research advances in the relationship between nonalcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Lipids in Health and Disease*. 2015; 14: 158.
4. Basu A, Rhone M, Lyons TJ. Berries: emerging impact on cardiovascular health. *Nutrition Reviews*. 2010; 68(3): 168-77.
5. Azzini E., Giacometti J., Russo G.L. Antiobesity effects of anthocyanins in preclinical and clinical studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017 ; [https://www.hindawi.com/journals/omcl/2017/2740364/]
6. Fang J. Some anthocyanin could be be efficiently absorbed across the gastrointestinal mucosa: extensive presystemic metabolism reduces at apparent bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014; 62: 3904-3911.
7. Ballestri S, Lonardo A, Bonapace S, Byrne CD, Loria P, Targher G. Risk of cardiovascular, cardiac and arrhythmic complications in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2014; 20(7): 1724-45.
8. Huang H, Jiang X, Xiao Z, Yu L, Pham Q, Sun J, Chen P, Yokoyama W, Yu LL, Luo YS, Wang TT. Red Cabbage Microgreens Lower Circulating Low-Density Lipoprotein (LDL), Liver Cholesterol, and Inflammatory Cytokines in Mice Fed a High-Fat Diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2016; 64(48): 9161-9171.
9. Wu T., Qi X., Liu Y. et al. Dietary supplementation with purified mulberry (*Morus australis* Poir) anthocyanins suppresses body weight gain in high-fat diet fed C57BL/6 mice. *Food Chemistry*. 2013; 141: 482-487.
10. Liu LK, Chou FP, Chen YC, Chyau CC, Ho HH, Wang CJ. Effects of mulberry (*Morus alba* L.) extracts on lipid homeostasis in vitro and in vivo. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2009; 26;57(16): 7605-11.

11. Song H., Lai J., Tang Q., Zheng X. Mulberry ethanol extract attenuates hepatic steatosis and insulin resistant in high - fat diet – fed mice. *Nutrition Research*. 2016; 36: 710-718.
12. Chen G, Wang H, Zhang X, Yang ST. Nutraceuticals and functional foods in the management of hyperlipidemia. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2014; 54(9): 1180-201.



ภาคผนวก
ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และกิจกรรมที่
ดำเนินการมาและผลที่ได้รับตลอดโครงการ



แผนการดำเนินงาน (สอดคล้องกับวัตถุประสงค์ และแผนงานที่แสดงในลักษณะ Gantt Chart)

วัตถุประสงค์	กิจกรรม (ที่ระบุไว้ตามสัญญา)	กิจกรรมที่ดำเนินการจริง
เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของลูกหม่อนอบแห้ง ต่อระดับไขมันในตับ ได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับหนูที่ถูกชักนำให้มีภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ	<p>ดำเนินการตามกลุ่มสัตว์ทดลองทดลองที่กำหนดไว้ โดยต้องชั่งน้ำหนักและเตรียมอาหารให้สัตว์ทดลองทุกวันตามกลุ่มต่อไปนี้</p> <p>กลุ่มที่ 1 Control (C) group: กลุ่มควบคุม ได้รับอาหารหนูปกติ</p> <p>กลุ่มที่ 2 High fat (HF) group: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูง</p> <p>กลุ่มที่ 3 HF+Mul10: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 10 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 4 HF+Mul100: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 100 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 5 HF+Mul300: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับลูกหม่อนอบแห้ง 300 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว</p> <p>กลุ่มที่ 6 HF+ATV5: กลุ่มที่ถูกชักนำให้เกิดไขมันในเลือดผิดปกติโดยได้รับอาหารไขมันสูงและได้รับยา atorvastatin 5 mg/kg ต่อน้ำหนักตัว</p> <p>สัตว์ทดลองแต่ละตัวจะได้รับสารและอาหารตามรายละเอียดข้างต้นเป็นระยะเวลา 3 เดือน</p> <p>หมายเหตุ: ต้องใช้เวลาดำเนินการมากกว่า 3 เดือนเพราะต้องวางแผนเหลือมวันเพื่อ treat สัตว์ทดลองแต่ละตัว เนื่องจากจะเก็บตัวอย่างหลอดเลือดและเลือดได้วันละ 2 ตัวเมื่อเสร็จสิ้นการทดลอง(เดือนที่ 1-8)</p>	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้ (ดำเนินการโดยโครงการย่อยที่ 1)
	เก็บตัวอย่างตับ (เดือนที่ 5 - 9)	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้
	วัดระดับไขมันตับ (เดือนที่ 9-10)	ดำเนินการตามวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้
	ตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมันในตับ (เดือนที่ 11-12)	ไม่สามารถดำเนินการได้ตามวัตถุประสงค์

ผลที่คาดว่าจะได้รับ (แบ่งเป็นราย 6 เดือน)

เดือนที่	กิจกรรมหลัก	กิจกรรมรอง	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับ
6 เดือนที่ 1	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อระดับไขมันใน ตับได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ การแสดงออก ของยีนยีนที่เกี่ยวข้อง กับไขมันในตับหนูที่ถูก ชักนำให้มีภาวะไขมัน ในเลือดผิดปกติ	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) ระดับไขมันในตับได้แก่ total cholesterol, triglycerides, LDL, HDL	ได้ค่าระดับไขมันในตับ ของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งแรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของ จำนวนสัตว์ทดลองที่ ใช้ทั้งหมด	ได้ค่าระดับ cholesterol และ triglyceride เท่านั้น
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการแสดงออกของยีน ยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมัน ในตับ	ได้ข้อมูลแสดงออก ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ไขมันในตับ ในหนูทุก กลุ่มในจำนวน n ครั้ง แรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวนสัตว์ ทดลองที่ใช้ทั้งหมด	ไม่สามารถปฏิบัติตาม แผนที่วางไว้ได้
6 เดือนที่ 2	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อ กลุ่ม) ต่อระดับไขมันใน ตับได้แก่ total cholesterol, triglycerides, low density lipoprotein (LDL), high density lipoprotein (HDL) และ การแสดงออก ของยีนยีนที่เกี่ยวข้อง กับไขมันในตับหนูที่ถูก ชักนำให้มีภาวะไขมัน ในเลือดผิดปกติ	ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัวต่อกลุ่ม) ระดับไขมันในตับได้แก่ total cholesterol, triglycerideLDL, HDL	ได้ค่าระดับไขมันในตับ ของหนูทุกกลุ่มใน จำนวน n ครั้งหลัง (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของ จำนวนสัตว์ทดลองที่ ใช้ทั้งหมด	ได้ผลตามที่กำหนดไว้ ในแผน และตรวจวัด ไขมันในเลือดของหนู ในครั้งแรกสำเร็จ
		ศึกษากลุ่มสัตว์ทดลอง ทุกกลุ่ม โดยแบ่ง สัตว์ทดลองในจำนวน n ครั้งแรก (6 ตัวต่อกลุ่ม) ต่อการแสดงออกของยีน ยีนที่เกี่ยวข้องกับไขมัน ในตับ	ได้ข้อมูลแสดงออก ของยีนที่เกี่ยวข้องกับ ไขมันในตับ ในหนูทุก กลุ่มในจำนวน n ครั้ง แรก (6 ตัว ต่อกลุ่ม) ของจำนวน สัตว์ทดลองที่ใช้ ทั้งหมด	ไม่สามารถปฏิบัติตาม แผนที่วางไว้ได้

ดัชนีชี้วัดความสำเร็จของงานวิจัย

การเผยแพร่ผลงานทางวิชาการ

1. ชื่อผลงาน: Anti-obesity of dried mulberry fruit powder in mice fed with high fat diet
รูปแบบผลงาน: บทความวิชาการ (publication paper)
วารสารที่ตีพิมพ์: Naresuan University Journal: Science and Technology 2021;29(2):43-53
ฐานข้อมูล: TCI1
2. ชื่อผลงาน: Dried mulberry fruit ameliorates cardiovascular and liver histopathological changes in high-fat diet-induced hyperlipidemic mice
รูปแบบผลงาน: บทความวิชาการ (publication paper)
วารสารที่ตีพิมพ์: Journal of Traditional and Complementary Medicine (submitted August 5, 2020)
ฐานข้อมูล: Scopus, ISI, PubMed, Scimago (Q1)

การผลิตนิตยสารระดับบัณฑิตศึกษาและพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่

โครงการนี้มีนิสิตและนักวิจัยรุ่นใหม่ที่มีส่วนร่วมในโครงการวิจัยดังนี้

1. นิสิตระดับปริญญาโท จำนวน 3 คน
2. นิสิตระดับปริญญาเอก จำนวน 1 คน
3. นักวิจัยหลังปริญญาเอก จำนวน 2 คน



Anti-Obesity of Dried Mulberry Fruit Powder in Mice Fed with High-Fat Diet

Usana Chaturong¹, Suriya Chaiwong¹, Watcharakorn Deetud¹, Kittiwoot To-on¹,
Supaporn Puntheeranurak², Ekarin Chuleekorn³, Rachanee Chanasong¹, Tanwarat Kajsongkran⁴,
Veerada Raksanoh¹, Kroekkiat Chinda¹, Phenphechaya Nadee¹ and Krongkarn Chootip^{1*}

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Science and Center of Excellence for Innovation in Chemistry, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Anatomy, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

⁴Expert Center of Innovative Herbal Products, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Pathum Thani 12130, Thailand

* Corresponding author. E-Mail address: krongkarn@su.ac.th, krongkarn@gmail.com

Received: 31 August 2020; Revised: 8 September 2020; Accepted: 14 September 2020

Abstract

Obesity is a global health problem often caused by a high-fat diet (HF). Certain natural products can prevent this, including mulberry fruit (*Morus alba* L.), which has been reported to be able to reduce the body weight (BW) and contain several health benefits. However, most studies have mainly looked at the effect of plant extracts, not a natural unprocessed mulberry fruit. Therefore, the present study seeks to investigate the effect of dried mulberry fruit powder (DMP) on BW, food intake, visceral fat accumulation and liver weight and lipid in mice fed with HF. C57BL/6J mice were divided into 5 groups and fed with different diets for 3 months; i) normal diet (control), ii) HF, iii) HF+10 mg/kg DMP (HF-DMP10), iv) HF+100 mg/kg DMP (HF+DMP100) and HF+5mg/kg atorvastatin (HF-ATV5). BW, food intake, visceral fat accumulation and liver lipid including total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were evaluated. HF consumption significantly increased BW, food intake, visceral fat accumulation, liver weight and liver TC and TG ($P < 0.001$ vs control). DMP (10 and 100 mg/kg) and atorvastatin effectively reduced BW and food intake ($P < 0.001-0.01$ vs HF) and prevented visceral fat accumulation in HF-fed mice. The liver weight was found significant lower in DMP group ($P < 0.001$ vs HF), but not in ATV5 group. Liver TC was reduced by treatment with DMP, both high and low dose, and atorvastatin ($P < 0.001$ vs HF), while the reduction of TG was observed only in the mice treated with the high dose of DMP or atorvastatin ($P < 0.001$ vs HF). In conclusion DMP, a natural unprocessed dried mulberry fruit product, possessed anti-obesity by reducing food intake and body weight. DMP also improved liver lipid profile, thus it can be developed as a food supplement for weight control and prevention against liver lipid accumulation due to HF consumption.

Keywords: *Morus alba*, Mulberry Fruit, Obesity, Food Intake, High Fat Diet

Introduction

The World Health Organization (WHO) defined obesity as an abnormal or excessive fat accumulation that may impair health. Adult with a body mass index (BMI) of 30 kg/m² or higher is generally considered obese (World Health Organization (WHO), 2020). The WHO also reported that the worldwide prevalence of obesity has dramatically increased and has nearly tripled since 1975. This pandemic has become a global health burden because obesity is a major risk factor for several chronic diseases, including cardiovascular diseases, diabetes, and some types of cancers (Manna & Jain, 2016; Meldrum, Morris, & Gambone, 2017; Parto & Lavie, 2017; Elagizi et al., 2018; Saliba & Maffett, 2019). It is also associated with poorer health outcomes and reduced quality of life. Although obesity is a complex disorder related to multi-factorial interactions of genetic, socioeconomic, cultural influences, consumption patterns, urban development, and lifestyle habits, it is preventable (Apovitz, 2016; Gadde et al., 2018).



Obesity fundamentally results from an energy imbalance between calories consumed and calories expended, hence an increased intake of energy-dense foods (such as high fat and high sugar) and/or a decrease in physical activity can lead to obesity (Apovian, 2016; Meldrum, Morris, & Gamboa, 2017). Maintaining healthy lifestyle by limiting energy intake from total fats and sugars, increasing consumption of fruits and vegetables, and engaging in regular physical activity can essentially prevent obesity (Maana & Jain, 2015; Apovian, 2016; Meldrum et al., 2017; Gadde et al., 2018). However, long-term lifestyle modification is challenging and frustrating for obese patients (Thomas et al., 2014). Pharmacological intervention, therefore, could be another option to tackle obesity. This includes various drugs targeting weight loss by increasing energy expenditure, suppressing appetite, interfering lipid metabolism, modifying intestinal microbiota composition or inhibiting pancreatic lipase to reduce lipid absorption in the intestine, nevertheless, their potential side effects could be harmful and intolerant (Krentz, Fujioka, & Himpesch, 2016; Gadde et al., 2018; Patel & Stanford, 2016). In view of this problem, there has been growing interest in the development of food supplements, and functional ingredients from natural sources with less adverse effects, for preventing and reducing obesity (Fu et al., 2016; Sun, Wu, & Chau, 2016; Karri et al., 2010; Rodríguez-Pérez, Segura-Carretero, & Contreras, 2019; Wharton et al., 2020). Among these are mulberry fruits and leaves, which have been reported to contain anti-obesity properties, and possess several health benefits (Lim et al., 2013; Sun, Wu, & Chau, 2016; Yuan & Zhao, 2017; Zhang et al., 2018; Mahmoudi, 2019).

Mulberry (*Morus alba* L.), belonging to genus *Morus* in the Moraceae family, has been widely planted in several regions including Europe, America, Africa and Asia (Yuan & Zhao, 2017; Zhang et al., 2018). A number of biological activities of this plant have been reported such as anti-oxidation (Yang, Yang, & Zheng, 2010; Arfan et al., 2012; Leyva-Jiménez et al., 2020), anti-diabetes (Jiao et al., 2017; Min et al., 2020), anti-dyslipidemia (Yang, Yang, & Zheng, 2010; Lee et al., 2020), as well as anti-obesity (Lim et al., 2013; Mahmoudi, 2019). Regarding anti-obesity properties, it has been reported that mulberry leaf extract ameliorated obesity by reducing fat accumulation, hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress, but had no effect on body weight in HF-fed mice (Ana, Eo, & Lim, 2015; Lee et al., 2019), while combined treatment of mulberry leaf and fruit extract reduced body weight and obesity-related inflammation, and oxidative stress in HF-induced obese mice (Lim et al., 2013). In line with these findings, several studies clearly support the beneficial effect of mulberry on obesity (Józefczuk et al., 2017; He et al., 2018; Mahmoudi, 2019; Metwally, Rashad, & Mahmoud, 2019; Leyva-Jiménez et al., 2020).

Although the anti-obesity properties of mulberry have been previously demonstrated, most investigators have mainly tested the plant extract. The extraction methods used might vary from one study to another, hence resulting in the different final bioactive components of the extract. In addition, mulberry can grow in a wide range of climates and soil types, and different habitats can affect the chemical composition and nutritional status of the plants, leading to the differences in pharmacological actions of different genotypes of *M. alba* (Soag et al., 2009; Yuan & Zhao, 2017; Leyva-Jiménez et al., 2020). The fresh or unprocessed mulberry fruit may partly have more advantage over the extract, in that it contains the original nutrient composition, and avoids any contamination from the solvent used in the extraction process. This study aims to evaluate the effect of mulberry fruit grown in Thailand on HF-fed mice. The dried mulberry fruit powder (DMP) was used in our study in order to test its anti-obesity efficacy, and to test the health benefits of the natural unprocessed form of mulberry fruit, which can be easily and safely consumed as a food supplement. The body weight, food intake, visceral fat



accumulation and liver weight and lipid levels, including total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) were evaluated.

Methods and Materials

Mulberry Fruit Sample Preparation

DMP was provided by the Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand. Mature mulberry (*M. alba* L.) fruits were collected from Nakhon Pathom province, Thailand. The fresh mulberry fruits were dried using a freeze dryer and ground with a roller grinding machine to obtain DMP. The obtained sample was kept at -20° C, and protected from light, until use. The quality control of DMP was carried out by monitoring the total anthocyanin content in DMP, using the pH differential method (Chaovanalikit & Wrolstad, 2004). The DMP sample contained total anthocyanin of 1.46 g/100 g dry weight.

Animal and Experimental Protocol

C57BL/6J female mice (18–20 g) were purchased from the Nomura Siam International Co. Ltd., Bangkok, Thailand. The animal experimental protocol was ethically approved by Naresuan University Animal Care and Use Committee (NUACUC, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand; ethic protocol number NU-AE 610727) for the care and use of animals for scientific purposes. All animals were acclimatized for 1 week in plastic cages at $22 \pm 1^{\circ}$ C with a 12–12 hour light–dark cycle and allowed access to food and water *ad libitum* at the Centre for Animal Research, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand. Before the experiment, they were randomly divided into 5 groups, each were fed with a different diet for 3 months; i) control (normal diet), ii) high fat diet (HF), iii) HF+10 mg/kg DMP (HF+DMP10), iv) HF+100 mg/kg DMP (HF-DMP100), and v) HF+5 mg/kg atorvastatin (Lipitor, Pfizer pharmaceuticals LLC, Freiburg, Germany) (HF-ATV5). Composition of normal and HF diet, obtained from Harlan Teklad Laboratory, Madison, Wisconsin, USA, was shown in Table 1. HF+DMP10, HF-DMP100 and HF+ATV5 groups were daily fed with HF and concomitantly orally administered 10, 100 mg/kg DMP and 5 mg/kg atorvastatin, respectively, via the intragastric route. Water was used instead in control and HF groups. The body weight of all animals and food intake was monitored throughout the experimental period. At the end of the experiment, following overnight fasting (12–14 hour), mice were sacrificed by exsanguination after deep anaesthetization with intraperitoneal injection of 50–70 mg/kg sodium thiopental, then abdominal visceral fat and liver were collected for corresponding experiments.

Table 1 The composition of diets used in the experiment

Ingredient (% by weight)	Diets	
	Normal (TD018CSD)	High fat (TD0202S)
Protein	18.6	17.3
Carbohydrate	44.2	48.6
Fat	6.2	21.2
Cholesterol	-	0.2
Energy (kcal/gram)	3.1	4.5

Animal diets were obtained from Harlan Teklad Laboratory, Madison, Wisconsin, USA.



Visceral Fat Accumulation Measurement

Visceral fat was collected by separating it from the abdominal cavity and then weighed. The quantity of visceral fat was expressed as percentage of body weight (g/100 g BW).

Liver Lipid Profile Analysis

Liver was collected and then subjected to lipid profile analysis by the following procedure. One gram of liver was homogenized in chloroform and methanol at the ratio of 2:1, then the sample was centrifuged at 4°C, 500 rpm for 10 min. The supernatant was collected and mixed with 0.9% NaCl, followed by centrifugation at 4°C, 500 rpm for 10 min. Then the supernatant was collected again and undergone nitrogen purge in order to remove all the solvent. The semi-solid lipid remnants were solubilized with 2% Triton X and levels of TC, and TG were measured using an enzymatic colorimetric test according to manufacturer protocols (Human diagnostic company, Wiesbaden, Germany).

Statistical Analysis

All data were expressed as mean standard error of mean (SEM) of *n* animals. The statistical significance between groups was evaluated using student t-test and/or ANOVA followed by the Tukey-Kramer post hoc test. Values of *P* < 0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of DMP on Body Weight and Food Intake

The body weight and food intake of mice were daily monitored and evaluated monthly as shown in Table 2 and 3, respectively. In the HF group, the body weight was significantly higher than in the control group throughout the experimental period (*P* < 0.001 vs control, Table 2). On the other hand, the DMP-fed groups, both 10 and 100 mg/kg, presented a lower body weight than the HF group (Table 2), and these values were clearly restored back to normal. Efficacy of low and high dose of DMP in reducing body weight was generally similar, except for month 1, where the high dose appeared to be more effective than the low dose. Treatment with atorvastatin at the dose of 5 mg/kg also reduced body weight, but the significant effect was observed at month 3 of the experiment (*P* < 0.001 vs HF).

Table 2 Effect of DMP on body weight of mice

Month	Body weight (g)				
	Control	HF	HF+DMP10	HF+DMP100	HF+ATV5
0	20.24 ± 0.64	20.25 ± 0.33	20.40 ± 0.20	20.26 ± 0.26	20.44 ± 0.26
1	20.65 ± 0.14	23.64 ± 0.47 ^{***}	22.46 ± 0.01 [*]	21.46 ± 0.31 ^{**}	22.33 ± 0.21 [*]
2	21.60 ± 0.22	24.75 ± 0.22 ^{***}	21.77 ± 0.20 ^{**}	22.03 ± 0.61 ^{**}	23.03 ± 0.33
3	22.24 ± 0.30	24.64 ± 0.27 ^{***}	22.62 ± 0.20 ^{**}	23.25 ± 0.06 [*]	22.35 ± 0.28 ^{***}

^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.001 vs Control in the same month

^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01, ^{***}*P* < 0.001 vs HF in the same month

Control, normal diet; HF, high-fat diet; HF+DMP10, high-fat diet+10 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+DMP100, high-fat diet+100 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+ATV5, high-fat diet+5 mg/kg atorvastatin. Values are presented as mean ± SEM (*n* = 5).



Besides increased body weight, the HF group also showed an increase (~ 1.7 – 2 fold) in food intake ($P < 0.001$ vs control, Table 3), which was significantly reduced by treatment with either DMP or atorvastatin ($P < 0.001$ vs HF). At month 1, high dose of DMP and atorvastatin were more effective than low dose of DMP in decreasing food intake.

Table 3 Effect of DMP on food intake of mice

Month	Food intake (g/day)				
	Control	HF	HF+DMP10	HF+DMP100	HF+ATV5
1	2.66 ± 0.06	5.31 ± 0.03 ^{**}	4.30 ± 0.26 ^{**†}	3.03 ± 0.18 ^{**††}	3.38 ± 0.17 ^{**†}
2	2.92 ± 0.06	5.11 ± 0.10 ^{**}	2.06 ± 0.23 [†]	3.38 ± 0.09 [†]	3.45 ± 0.16 [†]
3	2.77 ± 0.07	5.24 ± 0.22 ^{**}	3.56 ± 0.22 ^{††}	3.42 ± 0.13 [†]	3.64 ± 0.13 ^{**†}

[†] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.001$ vs Control in the same month

[†] $P < 0.001$ vs HF in the same month

^{††} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.001$ vs HF-DMP10 in the same month

Control, normal diet; HF, high-fat diet; HF+DMP10, high-fat diet+10 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+DMP100, high-fat diet+100 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+ATV5, high-fat diet+5 mg/kg atorvastatin. Values are presented as mean ± SEM ($n = 5$).

Effect of DMP on Visceral Fat Accumulation and Liver Weight

HF consumption dramatically increased visceral fat accumulation by ~ 1.8 fold ($P < 0.001$ vs control, Table 4), which was significantly reduced upon the treatment with high dose of DMP (100 mg/kg, $P < 0.01$ vs HF) or atorvastatin ($P < 0.05$ vs HF). Similarly, liver weight was also remarkably increased in HF group ($P < 0.001$ vs control). DMP, both high and low dose, but not atorvastatin, effectively reduced liver weight ($P < 0.01$ vs HF).

Table 4 Effect of DMP on visceral fat and liver weight of mice

Parameter	Organ weight (g/100 g body weight)				
	Control	HF	HF+DMP10	HF+DMP100	HF+ATV5
Visceral fat	1.70 ± 0.12	3.23 ± 0.13 ^{**}	2.64 ± 0.17 [†]	2.56 ± 0.10 ^{**††}	2.54 ± 0.16 ^{**†}
Liver	4.23 ± 0.16	6.49 ± 0.10 ^{**}	5.81 ± 0.14 ^{**††}	5.67 ± 0.12 ^{**††}	6.16 ± 0.06 ^{**}

[†] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.001$ vs Control

[†] $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs HF

Control, normal diet; HF, high-fat diet; HF+DMP10, high-fat diet+10 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+DMP100, high-fat diet+100 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+ATV5, high-fat diet+5 mg/kg atorvastatin. Values are presented as mean ± SEM ($n = 5$).

Effect of DMP on Liver Lipid Profile

Both liver TC and TG were significantly increased in HF group ($P < 0.001$ vs control, Table 5). The liver TC was reduced by treatment with DMP, both low and high dose, and atorvastatin ($P < 0.001$ vs HF). The reduction of TG was observed only in the mice treated with high dose of DMP ($P < 0.001$ vs HF), and this was more pronounced in atorvastatin group ($P < 0.001$ vs HF, DMP10 and DMP100).

**Table 5** Effect of DMP on liver lipid profile of mice

Parameter	Liver Lipid Profile (mg/50 mg tissue)				
	Control	HF	HF+DMP10	HF+DMP100	HF+ATV5
TC	22.61± 0.70	117.46± 4.04 ^{***}	93.01± 2.37 ^{***,†}	87.17± 3.16 ^{***,†}	80.81± 1.07 ^{***,†}
TG	100.50± 2.45	153.26± 4.13 ^{***}	142.22± 2.11 ^{***,†}	127.14± 3.61 ^{***,†}	80.20± 0.64 ^{***}

[†]P < 0.05, ^{**}P < 0.01 ^{***}P < 0.001 vs Control

[†]P < 0.001 vs HF

[†]P < 0.001 vs HF+ATV5

Control, normal diet; HF, high-fat diet; HF+DMP10, high-fat diet+10 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+DMP100, high-fat diet+100 mg/kg dried mulberry fruit powder; HF+ATV5, high-fat diet+5 mg/kg atorvastatin. Values are presented as mean± SEM (n = 5).

Discussion

The present study demonstrates that dried mulberry fruit powder (DMP) reduces body weight, food intake and visceral fat accumulation in HF-fed mice. It also decreases liver weight and improves liver lipid profile.

In our study, HF-fed mice were characterized by significant increases in body weight, food intake, visceral fat accumulation, liver weight and liver lipid levels including TC and TG compared with the control. These abnormalities were often observed by several other studies using a similar experimental animal model (Lira et al., 2013; Mahmoud, 2013; Aaa, Eo, & Lim, 2015; Lee et al., 2019). Administration of DMP (10 and 100 mg/kg) successfully restored body weight of HF-fed mice back to normal, which is consistent with the anti-obesity properties of mulberry reported in most previous studies (Lira et al., 2013; He et al., 2018; Li et al., 2019; Leyva-Jiménez et al., 2020). Nevertheless, there is a variation in the effect of mulberry on body weight, for example, some investigators reported that mulberry leaf extract had no effect on body weight, but could ameliorate obesity by reducing fat accumulation, hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in HF-fed mice (Aaa, Eo, & Lim, 2015; Lee et al., 2019), while others, similar to our finding, showed that mulberry fruit extract, mulberry leaf extract from some *M. alba* genotypes or the combination of fruit and leaf extract or powder could effectively reduce body weight and also provided other health benefits (Lira et al., 2013; Metwally, Rashad, & Mahmoud, 2019; Li et al., 2019; Leyva-Jiménez et al., 2020). This discrepancy could be due to the differences in genotype of *M. alba*, extraction process, and parts of the plant used in the studies.

The underlying mechanisms of action of DMP-induced weight loss are likely due to the combined effects of several phytochemicals found in *M. alba*, such as anthocyanins and polysaccharides (Azzini, Giacometti, & Russo, 2017; Lee et al., 2017; He et al., 2018). Anthocyanins, a subfamily of flavonoids, act by modulating glucose, lipid and amino acid metabolic pathways in various targets such as liver, skeletal muscle, adipose tissues and pancreas, leading to the increase in fatty acid oxidation, the improvement of insulin sensitivity and glucose uptake, the reduction of oxidative stress, inflammation, and fatty acids, and the inhibition of cholesterol biosynthesis, resulting in a decrease in body weight and fat accumulation (Azzini, Giacometti, & Russo, 2017). Not only the phenolic compounds, but the polysaccharides isolated from mulberry fruits, also have been shown to stimulate lipolysis and inhibit pre-adipocyte proliferation, thus reducing fat cell numbers and adipose mass (Choi et al., 2016; Chen et al., 2017). This agrees with our result showing that DMP, with a dose-dependent effect, decreased visceral fat accumulation and body weight in HF-fed mice. In addition, the reduced body



weight is well correlated with diminished food intake in DMP treated mice, suggesting that the DMP anti-obesity mechanism may also involve appetite suppression, as previously reported (Yimam et al., 2016; 2019)

Our DMP showed beneficial action in preventing the liver enlargement induced by HF. This effect is associated with the reduction of liver TC and TG by DMP treatment. As mentioned earlier, DMP mechanism of action is likely due to its active ingredients, such as anthocyanins, which have been shown to modulate several metabolic pathways of various organ targets including liver. At the cellular level, anthocyanin has been shown to activate AMP-activated protein kinase (AMPK), which phosphorylates the sterol response element-binding protein-1c (SREBP1c), resulting in inhibition of de novo lipogenesis (Gao et al., 2012). Anthocyanin also stimulated peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR α), the major lipid oxidation regulator in liver, causing the increase in fatty acid oxidation, hence reducing hepatic lipid concentration (Jia et al., 2013).

The present study used atorvastatin as a positive control. It is a lipid-lowering drug, acting via the inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting enzyme in cholesterol synthesis, resulting in the effective suppression of cholesterol production (Istvan, 2002; Ward, Watts, & Eckel, 2019). Similar to our test product, DMP, atorvastatin also showed positive effects on HF-fed mice including the reduction of body weight, food intake, visceral fat accumulation and liver TC and TG. However, unlike DMP, atorvastatin was unable to restore the increased liver weight caused by HF consumption. This may imply a hepatotoxicity in atorvastatin, as it has been reported that statins could induce hepatocellular injury, although the mechanisms are still unclear (Ward, Watts, & Eckel, 2019). This is of interest since it suggests that DMP is apparently safe and could help prevent the liver abnormality caused by HF consumption.

Conclusion and Suggestions

Taken together, our results indicate that DMP carries anti-obesity properties and has a beneficial effect in the prevention of liver lipid accumulation. This is among the few studies that have tested the biological activity of natural unprocessed mulberry fruit, which could potentially be cost-effectively and safely developed as a dietary supplement in local markets. There is, however, a need to further characterize the nutrients and chemical composition of DMP, as well as to evaluate the protective effect of DMP on chronic diseases associated with obesity such as cardiovascular diseases, dyslipidemia and diabetes. Full range of liver lipid profile including TC, TG, LDL and HDL as well as liver histology should also be evaluated. Clinical trials designed to investigate the safety and health benefits of DMP are also required.

Acknowledgments

This research was funded by National research council of Thailand (Grant number: RA2562B087) and Agricultural research development agency (Public organization) of Thailand (Grant number: CRP6205031380). We also would like to thank the Center of Excellence for Innovation in Chemistry (PERCH-CIC) and the International Research Network (IRN61W0005) on research facility support.



References

- Ann, J.-Y., Eo, H., & Lim, Y. (2015). Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) Ameliorate Obesity-Induced Hepatic Lipogenesis, Fibrosis, and Oxidative Stress in High-Fat Diet-Fed Mice. *Genes & Nutrition*, 10(6), 1-13. DOI: 10.1007/s12263-015-0495-x
- Apovian, C. M. (2016). Obesity: Definition, Comorbidities, Causes, and Burden. *The American Journal of Managed Care*, 22(7), S176-S185.
- Arfan, M., Khan, R., Rybarczyk, A., & Amarowicz, R. (2012). Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 2472-2480. DOI: 10.3390/ijms13022472
- Azziai, E., Giacometti, J., & Russo, G. L. (2017). Antiobesity Effects of Anthocyanins in Preclinical and Clinical Studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2017/2740364>
- Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004). Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69(1), FCT67-FCT72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x>
- Chen, C., Huang, Q., You, L.-G., & Fu, X. (2017). Chemical Property and Impacts of Different Polysaccharide Fractions from Fructus Mori, on Lipolysis with Digestion Model in Vitro. *Carbohydrate Polymers*, 178, 360-367. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.09.016>
- Choi, J. W., Synytsya, A., Capek, P., Bleha, R., Pohl, R., & Park, Y. I. (2016). Structural Analysis and Anti-Obesity Effect of a Pectic Polysaccharide Isolated from Korean Mulberry Fruit Oddi (*Morus alba* L.). *Carbohydrate Polymers*, 146, 187-196. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.043
- Elagizi, A., Kachur, S., Lavis, C. J., Carbone, S., Pandey, A., Ortega, F. B., & Milani, R. V. (2018). An Overview and Update on Obesity and the Obesity Paradox in Cardiovascular Diseases. *Progress in Cardiovascular Diseases*, 61(2), 142-150. DOI: 10.1016/j.pcad.2018.07.003
- Fu, C., Jiang, Y., Guo, J., & Su, Z. (2016). Natural Products with Anti-Obesity Effects and Different Mechanisms of Action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(51), 9571-9585. DOI: 10.1021/acs.jafc.6b04465
- Gadda, K. M., Martin, C. K., Berthoud, H.-R., & Heymsfield, S. B. (2018). Obesity: Pathophysiology and Management. *Journal of the American College of Cardiology*, 71(1), 69-84. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2017.11.011>
- Guo, H., Lin, G., Zhong, R., Wang, Y., Wang, D., & Xia, M. (2012). Cyanidin-3-O-β-Glucoside Regulates Fatty Acid Metabolism via an AMP-Activated Protein Kinase-Dependent Signaling Pathway in Human HepG2 Cells. *Lipids in Health and Disease*, 11, 1-13. DOI: 10.1186/1476-281X-11-10
- He, X., Fang, J., Ruan, Y., Wang, X., Sun, Y., Wu, N., ... Huang, L. (2018). Structures, Bioactivities and Future Prospective of Polysaccharides from *Morus alba* (White Mulberry): A Review. *Food Chemistry*, 245, 899-910. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.084>
- Iervan, E. S. (2002). Structural Mechanism for Statin Inhibition of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase. *American Heart Journal*, 144(6), 327-332. <https://doi.org/10.1067/mhj.2002.130300>



- Jia, Y., Kim, J.-Y., Jun, H.-J., Kim, S.-J., Lee, J.-H., Hoang, M. H., ...Lee, S.-J. (2013). Cyanidin is an Agonistic Ligand for Peroxisome Proliferator- Activated Receptor- Alpha Reducing Hepatic Lipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(4), 698-708. <https://doi.org/10.1016/j.bbailip.2012.11.012>
- Jiao, Y., Wang, X., Jiang, X., Kong, F., Wang, S., & Yan, C. (2017). Antidiabetic Effects of *Morus alba* fruit Polysaccharides on High-Fat Diet and Streptozotocin-Induced Type 2 Diabetes in Rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 119-127. DOI: 10.1016/j.jep.2017.02.003
- Jó zsefcsk, J., Milkowska, K., Clapa, A., Stawińska- Witoszyńska, B., Nowak, J. K., Bajerska, J., ... Walkowiak, J. (2017). Mulberry Leaf Extract Decreases Digestion and Absorption of Starch in Healthy Subjects-A Randomized, Placebo-Controlled, Crossover Study. *Advances in Medical Sciences*, 62(2), 302-306. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2017.03.002>
- Karri, S., Sharma, S., Hatware, K., & Patil, K. (2019). Natural Anti-Obesity Agents and their Therapeutic Role in Management of Obesity: A Future Trend Perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 224-238. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.11.076
- Krentz, A. J., Fujioka, K. & Hompesch, M. (2016). Evolution of Pharmacological Obesity Treatments: Focus on Adverse Side-Effect Profiles. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 18(6), 558-570. <https://doi.org/10.1111/dom.12657>
- Lee, M. R., Kim, J. E., Choi, J. Y., Park, J. J., Kim, H. R., Song, B. R., ... Hwang, D. Y. (2019). Anti-Obesity Effect in High-Fat-Diet-Induced Obese C57BL/6 Mice: Study of a Novel Extract from Mulberry (*Morus alba*) Leaves Fermented with *Cordyceps Militaris*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 17(3), 2185-2193. DOI: 10.3892/etm.2019.7191
- Lee, S., Lee, M.-S., Chang, E., Lee, Y., Lee, J., Kim, J., ...Kim, Y. (2020). Mulberry Fruit Extract Promotes Serum HDL- Cholesterol Levels and Suppresses Hepatic MicroRNA- 33 Expression in Rats Fed High Cholesterol/Cholic Acid Diet. *Nutrients*, 12(5), 1-14. DOI: 10.3390/nu12051499
- Lee, Y.-M., Yoon, Y., Yoon, H., Park, H.-M., Song, S., & Yeu, K.-J. (2017). Dietary Anthocyanins Against Obesity and Inflammation. *Nutrients*, 9, 1-15. DOI: 10.3390/nu9101089
- Leyva-Jiménez, F. J., Ruiz-Malagón, A. J., Molina-Tijeras, J. A., Díez-Echave, P., Vezza, T., Hidalgo-Carrión, L., ...Gálvez, J. (2020). Comparative Study of the Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Leaf Extracts from Four Different *Morus alba* Genotypes in High Fat Diet-Induced Obesity in Mice. *Antioxidants*, 9(8), 1-24. DOI: 10.3390/antiox9080733
- Li, Q., Liu, F., Liu, J., Liao, S. & Zou, Y. (2019). Mulberry Leaf Polyphenols and Fiber Induce Synergistic Antiobesity and Display a Modulation Effect on Gut Microbiota and Metabolites. *Nutrients*, 11(5), 1-19. <https://doi.org/10.3390/nu11051017>
- Lim, H. H., Lee, S. O., Kim, S. Y., Yang, S. J., & Lim, Y. (2013). Anti-Inflammatory and Antiobesity Effects of Mulberry Leaf and Fruit Extract on High Fat Diet-Induced Obesity. *Experimental Biology and Medicine*, 238(10), 1160-1169. DOI: 10.1177/1535370213498988
- Mahmoubi, M. (2019). *Morus alba* (Mulberry), A Natural Potent Compound in Management of Obesity. *Pharmacological Research*, 146, 104341. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104341>



- Mahmoud, M. Y. (2013). Natural Antioxidants Effect of Mulberry Fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) on Lipids Profile and Oxidative Stress in Hypercholesterolemic Rats. *Pakistan Journal of Nutrition*, 12(7), 665-672. DOI: 10.3923/pjn.2013.665.672
- Manna, P., & Jain, S. K. (2015). Obesity, Oxidative Stress, Adipose Tissue Dysfunction, and the Associated Health Risks: Causes and Therapeutic Strategies. *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, 13(10), 423-444. DOI: 10.1089/met.2015.0095
- Meldrum, D. R., Morris, M. A., & Garbone, J. C. (2017). Obesity Pandemic: Causes, Consequences, and Solutions—but Do We have the Will? *Views and Reviews*, 107(4), 833-839. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2017.02.104
- Merwally, F. M., Rashad, H., & Mahmoud, A. A. (2019). *Morus alba* L. Diminishes Visceral Adiposity, Insulin Resistance, Behavioral Alterations via Regulation of Gene Expression of Leptin, Resistin and Adiponectin in Rats Fed a High-Cholesterol Diet. *Physiology & Behavior*, 201, 1-11. DOI: 10.1016/j.physbeh.2018.12.010
- Min, A. Y., Yoo, J.-M., Sok, D.-E., & Kim, M.-R. (2020). Mulberry Fruit Prevents Diabetes and Diabetic Dementia by Regulation of Blood Glucose through Upregulation of Antioxidative Activities and CREB/BDNF Pathway in Alloxan-induced Diabetic Mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2020/1298691>
- Parto, P., & Lavie, C. J. (2017). Obesity and Cardiovascular Diseases. *Current Problems in Cardiology*, 42(11), 376-394. DOI: 10.1016/j.cpcardiol.2017.04.004
- Patel, D. K., & Stanford, F. C. (2018). Safety and Tolerability of New-Generation Anti-Obesity Medications: A Narrative Review. *Postgraduate Medicine*, 130(2), 173-182. DOI: 10.1080/00326481.2018.1435129
- Rodríguez-Pérez, C., Segura-Carretero, A., & Contreras, M. D. M. (2019). Phenolic Compounds as Natural and Multifunctional Anti-Obesity Agents: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59(8), 1212-1229. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1399859>
- Saliba, L. J., & Maffett, S. (2019). Hypertensive, Heart Disease and Obesity: A Review. *Heart Failure Clinics*, 15(4), 509-517. <https://doi.org/10.1016/j.hfc.2019.06.003>
- Song, W., Wang, H.-J., Bucheli, P., Zhang, P.-F., Wei, D.-Z., & Lu, Y.-H. (2009). Phytochemical Profiles of Different Mulberry (*Morus* sp.) Species from China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9133-9140. <https://doi.org/10.1021/jf9022228>
- Sun, N.-N., Wu, T.-Y., & Chau, C.-F. (2016). Natural Dietary and Herbal Products in Anti-Obesity Treatment. *Molecules*, 21, 1-15. DOI: 10.3390/molecules21101351
- Thomas, J. G., Bond, D. S., Phelan, S., Hill, J. O., & Wing, R. R. (2014). Weight-Loss Maintenance for 10 Years in the National Weight Control Registry. *American Journal of Preventive Medicine*, 46(1), 17-23. <https://doi.org/10.1016/j.amepre.2013.08.019>
- Ward, N. C., Watts, G. F., & Eckel, R. H. (2019). Statin Toxicity: Mechanistic Insights and Clinical Implications. *Circulation Research*, 124(2), 328-350. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312782



- Wharton, S., Bolder, R., Jeffery, A., & Christensen, R. A. G. (2020). The Safety and Effectiveness of Commonly-Marketed Natural Supplements for Weight Loss in Populations with Obesity: A Critical Review of the Literature from 2006 to 2016. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(10), 1614-1630. DOI: 10.1080/10408398.2019.1584873
- World Health Organization (WHO). (2020). *Obesity and Overweight*. Retrieved from <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>
- Yang, X., Yang, L., & Zheng, H. (2010). Hypolipidemic and Antioxidant Effects of Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit in Hyperlipidaemia Rats. *Food and Chemical Toxicology*, 48(8-9), 2374-2379. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.074>
- Yimam, M., Jiao, P., Hong, M., Brownell, L., Lee, Y.-C., Hyun, E.-J., Kim, H.-J., Kim, T.-W., Nam, J.-B., Kim, M.-R., & Jia, Q. (2016). Appetite Suppression and Antiobesity Effect of a Botanical Composition Composed of *Morus Alba*, Yerba Mate, and *Magnolia Officinalis*. *Journal of Obesity*, 2016, 1-12. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4670818>
- Yimam, M., Jiao, P., Hong, M., Brownell, L., Lee, Y.-C., Kim, H.-J., Nam, J.-B., Kim, M.-R., & Jia, Q. (2019). *Morus alba*, A Medicinal Plant for Appetite Suppression and Weight Loss. *Journal of Medicinal Food*, 22(7), 741-751. DOI: 10.1089/jmf.2017.0142
- Yuan, Q., & Zhao, L. (2017). The Mulberry (*Morus alba* L.) Fruit-A Review of Characteristic Components and Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65, 10383-10394. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b03614>
- Zhang, H., Ma, Z. F., Luo, X. & Li X. (2018). Effects of Mulberry Fruit (*Morus alba* L.) Consumption on Health Outcomes: A Mini-Review. *Antioxidants*, 7(5), 1-13. DOI: 10.3390/antiox7050069