บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศเมียพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 100-150 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อปรับสภาพร่างกาย โดยควบคุมให้มีอุณหภูมิ 25 $\pm$ 1°C, โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงสแตนเลส ขนาด 16 นิ้ว X 10 นิ้ว X 6 นิ้ว พร้อมด้วยวัสดุรองนอน ให้อาหารสำเร็จรูป CP082 mice feed และน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง ดูแลสัตว์ทดลองตามระเบียบของสภาวิจัยแห่งชาติ ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. สมุนไพรและแหล่งที่มา

สารสกัดเอธานอลจากว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa* Roxb.) ว่านชักมดลูกได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. พ.ต.ท. หญิง สมทรง ลาวัณย์ประเสริ ซึ่งสกัดที่ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยวิธีสกัดสารจะนำเหง้าของว่านชักมดลูกมาฝานบางๆ และปั่นจนได้ผงหยาบๆ ตากให้แห้งแล้วนำไปบดจนเป็นผงละเอียด นำผงว่านชักมดลูกที่ได้ไปแช่ในเอธานอลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจะกรองอย่างหยาบด้วยผ้าขาวบางและกรองอย่างละเอียดด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สกัดด้วยเอธานอล แล้วนำไปสกัดเอธานอลออกด้วยเครื่อง Rotavapor สารสกัดว่านชักมดลูกด้วยเอธานอลจากที่ได้มีลักษณะเป็นของเหลวเหนียวหนืด สีน้ำตาลดำ มีกลิ่นฉุน นำมาใส่ขวดสีชา ปิดฝาให้สนิท เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปตรวจหาปริมาณสารประกอบด้วยวิธี HPLC chromatography จะได้สาร 1,7 diphenyl-4,6-heptadiene-3-ol โดยมี retention time ที่ 13.8 (อ้างอิงจากวนิดา สุขน้อย. 2547)

3. สารเคมี

- Ascorbic acid	Sigma, USA.
- Acetylcholine hydrochloride (Ach)	Sigma, USA.
- calcium chloride dehydrate	Merck, Germany.

- D(+) – glucose monohydrate	Merck, Germany.
- Estradiol valerate (Progynon)	Schering, Germany.
- Heparin sulfate	Sigma, USA.
- Magnesium sulfate heptahydrate	Merck, Germany.
- Methanol	Merck, Germany.
- Noradrenaline (NA)	Sigma, USA.
- Pentobarbital sodium (Nembutal)	Sanofi sante, Germany.
- Sodium chloride	Sigma, USA.
- Potassium chloride	Merck, Germany.
- Potassium dihydrogen phosphate	Merck, Germany.
- Sodium chloride	Merck, Germany.
- Sodium hydrogen carbonate	Merck, Germany.
- Sodium nitroprusside	Sigma, USA.
- Zolitil	Sigma, USA.

การเตรียมน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Krebs-Henseleit buffer solution)

ส่วนประกอบของน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อมีดังนี้ NaCl 119 mM, KCl 4.7 mM, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgSO_4$ 1 mM, $NaHCO_3$ 25 mM, KH_2PO_4 1.2 mM และ Glucose 11.1 mM โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.4 และมีก๊าซ Carbogen (95%O_2+ 5%CO_2) ไหลผ่านตลอดเวลา

4. เครื่องมือ

- ชุด Isolated organ bath แบบ double walled Harvard type ประกอบด้วยหลอดแก้ว 2 ชั้น ชั้นในบรรจุสารละลายที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเนื้อเยื่อ (Krebs-Henseleit solution) ที่มีความจุ 25 ml และมีช่องเปิดให้แก๊ส carbogen (95%O_2+ 5%CO_2) ผ่านเข้าได้ ชั้นนอกมีน้ำไหลเวียนซึ่งส่งมาจาก water bath โดยมี Thermoregulator ควบคุมอุณหภูมิของหลอดแก้วชั้นในให้คงที่ 37 °C ตลอดทำการทดลอง
- Helotherm water bath พร้อม water pump
- เครื่องมือวัดการหดตัวของเนื้อเยื่อ (isometric force tranducer) ของบริษัท AD Instruments
- เครื่องแปลงสัญญาณไฟฟ้า ของบริษัท PowerLab
- เครื่องขยายสัญญาณไฟฟ้า ของบริษัท PowerLab

- ถังบรรจุก๊าซ carbogen (95%O_2+ 5%CO_2) ของบริษัท Thailand Industrial Gas (TIG)
- เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ของบริษัท Beckman Instruments
- Buchi Rotavapor R-200
- เครื่องปั่น centrifuge
- Autopipette 100 และ 1000 ไมโครลิตร
- Vortex mixer
- ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก
- สำลีพันปลายไม้ขนาดเล็ก สำสีก้อน และผ้าพันแผล

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การตัดรังไข่ (ovariectomy)

แบ่งหนูขาวทั้งหมดออกเป็น 6 กลุ่มโดยวิธีสุ่มตัวอย่าง กลุ่มละ 8 ตัว โดยกลุ่มที่ 2-6 จะถูกทำการผ่าตัดเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง โดยวิธีตัดรังไข่มีดังนี้ คือ ทำให้สัตว์ทดลองหมดความรู้สึกโดยการฉีด Zoletil® ขนาด 20-40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเข้าช่องท้อง โกนขนและทำความสะอาดผิวหนังบริเวณท้องทั้ง 2 ข้าง จากนั้นผ่าตัดเปิดชั้นหนังและกล้ามเนื้อบริเวณสีข้าง ใช้ปากคีบ ๆ รังไข่ขึ้นมา ทำการผูกรังไข่ทั้งสองข้างด้วยไหมเย็บแผลชนิดละลายได้ แล้วตัดรังไข่ทั้งสองข้างออก จากนั้นผ่าตัดเย็บชั้นกล้ามเนื้อแล้วชั้นผิวหนังด้วยไหมละลายเบอร์ 4/0 ทำความสำอาดแผลด้วย 0.9% sodium chloride และใส่ betadine ที่แผลภายนอก จากนั้นรอให้สัตว์ฟื้นแล้วนำไปพักฟื้นที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ห้อง 0815 ตึก 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามปกติเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนให้สารทดสอบ ดูแลหลังการผ่าตัดอย่างดีจนกว่าแผลจะหายเป็นปกติและไม่มีการติดเชื้อแทรกซ้อน

2. การให้สารทดสอบ (treatment)

<u>*กลุ่มที่ 1*</u> : หนูขาวที่ไม่ได้ถูกตัดรังไข่ออก ได้รับน้ำมันข้าวโพดทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (Sham + oil)

<u>*กลุ่มที่ 2*</u> : หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับน้ำมันข้าวโพดทุกวันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + oil)

<u>*กลุ่มที่ 3*</u> : หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับ estradiol valerate ขนาด 300 ไมโครกรัมต่อ กิโลกรัมน้ำหนักตัวทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + estrogen)

<u>*กลุ่มที่ 4*</u> : หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่ออกและได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + C100)

<u>*กลุ่มที่ 5*</u> : หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 250 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัมน้ำหนักตัวทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX + C250)

กลุ่มที่ 6 : หนูขาวที่ถูกตัดรังไข่และได้รับสารสกัดจากว่านชักมดลูกขนาด 500 มิลลิกรัมต่อ กิโลกรัม น้ำหนักตัวทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (OVX+C500)

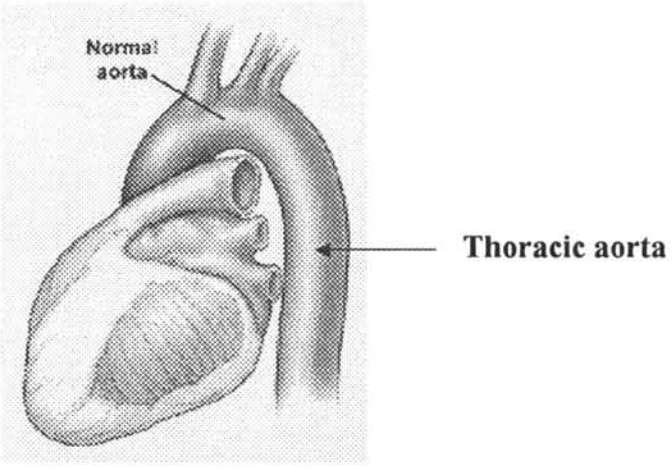
สารสกัดว่านชักมดลูกทั้ง 3 ขนาด เตรียมโดยใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นตัวทำละลายและป้อนทางปากผ่านท่อป้อนอาหาร (feeding tube) ส่วนเอสตราไดออล วาเลอเรต เตรียมโดยใช้น้ำมันข้าวโพดเป็นตัวทำละลายเช่นกันและฉีดเข้าบริเวณใต้ผิวหนัง (subcutaneous administration) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันข้าวโพด จะได้รับโดยการฉีดเข้าบริเวณใต้ผิวหนังเช่นกัน

1. การทดสอบระยะตกไข่ โดยวิธี vaginal smear

ใช้สำลีพันปลายไม้ขนาดเล็กชุบ 0.9% sodium chloride สอดเข้าไปในช่องคลอดของหนูขาวอย่างเบามือ ค่อยๆหมุนตามเข็มนาฬิกา จากนั้นนำมาป้ายกับกระจกslide แล้วแช่ slide ใน methanol เป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที รอจน slide แห้งก่อนนำไปย้อมสี giemsa เป็นเวลา 25 นาที รอให้แห้งอีกครั้งแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การเตรียมหลอดเลือดแดงใหญ่ของหนูขาว

เมื่อเสร็จสิ้นการให้สารทดสอบเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ทำการเหนี่ยวนำให้หนูขาวหมดสติโดยฉีด zoletil® ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้าช่องท้องของหนูขาว เมื่อหนูสลบทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องและช่องอก ยกอวัยวะภายในขึ้นให้หมด แล้วตัดหลอดเลือดแดงใหญ่ (thoracic aorta) ที่อยู่ติดกับกระดูกสันหลัง (ดังรูปที่ 3.1) ออกมาแช่ใน Petri dish ที่มีน้ำยาหล่อเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Krebs-Henseleit solution) pH 7.4 และมีก๊าซ carbogen (95%O_2+ 5%CO_2) ไหลผ่านตลอดเวลา จากนั้นตัดแยกเอาไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกให้หมด แล้วใช้ pasteur pipette ดูดน้ำยาล้างด้านในหลอดเลือดให้สะอาด แล้วตัดหลอดเลือดให้เป็นวงแหวนโดยมีความกว้างประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ตะขอแสตนเลสเกี่ยวหลอดเลือดทั้ง 2 ด้าน แล้วนำหลอดเลือดที่ได้ไปแขวนกับใน organ bath ที่มีสารละลาย Krebs-Henseleit solution ปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยมีการให้ก๊าซคาร์โบ-เจนตลอดเวลา พร้อมกับควบคุมอุณหภูมิภายใน organ bath ให้คงที่ 37 °C ตลอดทำการทดลอง โดยปลายข้างหนึ่งจะยึดติดกับเครื่องแปลงสัญญาณ (isometric force transducer) ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดแท่งพลาสติกที่ยึดติดกับ organ bath (ดังรูปที่3.2) เมื่อเตรียมหลอดเลือดตามวิธีดังกล่าวข้างต้นแล้ว ดึงกล้ามเนื้อให้มีความตึงตัว (resting tension) 1 กรัม แล้ว incubate(แช่) ทิ้งไว้ประมาณ 45 – 60 นาที โดยเปลี่ยนน้ำยาหล่อเลี้ยงทุกๆ 15 นาที จนกระทั่งมีแรงตึงคงที่แล้วจึงเริ่มทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 3.1 แสดงThoracic aorta ที่ถูกแยกจากกายของหนูขาวเพศเมีย

4. การทดสอบการทำงานของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่แยกจากกายของหนูขาว

ก่อนที่จะทดสอบการทำงานของหลอดเลือดนั้นจะทำการทดสอบว่ายังมี endothelium อยู่หรือไม่ด้วยการใส่ noradrepinephrine (NE) ขนาด 10^{-6}M เมื่อหลอดเลือดเกิดการหดตัวในสภาวะคงที่แล้ว จะใส่สาร Acetylcholine ขนาด 10^{-6}M ถ้าการคลายตัวของหลอดเลือดที่เกิดขึ้นถึง 70 % ของการหดตัวที่เกิดจาก norepinephrine แล้ว แสดงว่าหลอดเลือดนั้นยังมี endothelium อยู่ ซึ่งสามารถใช้ทำการทดลองการทำงานของหลอดเลือดต่อไปได้

การหดและคลายตัวของหลอดเลือดจะวัดได้จากการเปลี่ยนแปลงของแรงตึงที่เกิดขึ้นที่ Isometric transducer จากนั้นค่าจะถูกบันทึกเข้าสู่โปรแกรม chart 4 for window (AD Instruments)

4.1) ทดสอบการหดตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย Norepinephrine

หลังจากทำการทดสอบการมี endothelium แล้ว ทำการล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit buffer 2 ครั้งจนกระทั้งแรงตึงของหลอดเลือดกลับมาสู่สภาวะเดิมก่อนใส่สาร หลังจากนั้นใส่ norepinephrine แบบสะสม โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ $1x10^{-9}$, $1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$, $1x10^{-6}$,และ $1x10^{-5}$ M ตามลำดับ ลงไปใน organ bath ที่มี Krebs-Henseleit buffer 25 มิลลิลิตร เพื่อเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัว หลังจากทำการทดสอบการหดตัวเสร็จสิ้น ทำการล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit buffer เป็นเวลา 30 นาที โดยจะเปลี่ยนสารละลายทุก 10 นาที แล้วปรับให้หลอดเลือดมีแรงตึง 1 กรัม เท่าเดิมก่อนที่จะทำการทดลองขั้นต่อไป

ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของหลอดเลือดนั้น จะคำนวณเป็นร้อยละของการหดตัวของหลอดเลือดเมื่อได้รับ norepinephrine ความเข้มข้นต่างๆเมื่อเทียบกับการหดตัวของหลอดเลือดก่อนได้รับ norepinephrine

4.2) ทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่อาศัยเยื่อบุผนังหลอดเลือดโดยเหนี่ยวนำด้วย acetylcholine

การทดสอบการทำงานที่ปกติของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) นั้นมักจะทดสอบโดยการเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดคลายตัวด้วย acetylcholine

ทำการทดสอบโดยใส่ norepinephrine ขนาด $1x10^{-7}$ M เพื่อเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัวเสียก่อน เมื่อการหดตัวคงที่แล้วจะใส่ acetylcholine (ACh) แบบสะสม ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ $1x10^{-9}$, $1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$, $1x10^{-6}$, $1x10^{-5}$ และ $1x10^{-4}$ M ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาห่างกันนาน 5 นาทีในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ concentration-response curve จากนั้นทำการล้างหลอดเลือดด้วย Krebs-Henseleit buffer จนกระทั่งแรงตึงของหลอดเลือดกลับสู่สภาวะปกติ

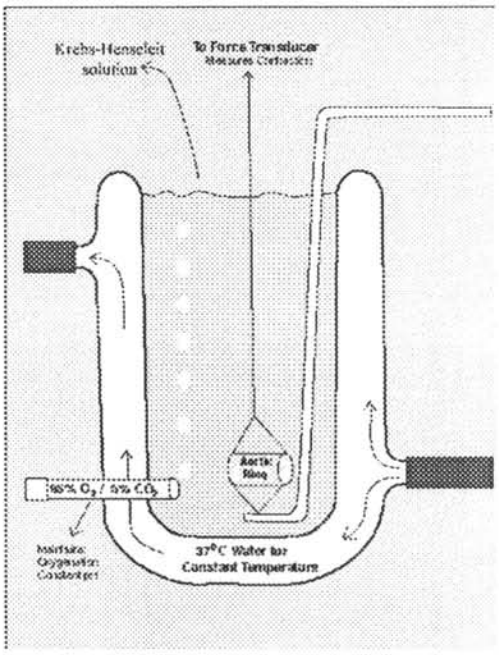
ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของหลอดเลือดนั้น จะคำนวณเป็นร้อยละของแรงในการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อได้รับ acetylcholine ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเทียบกับการหดตัวสูงสุดของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัวด้วย norepinephrine

4.3) ทดสอบการคลายตัวของหลอดเลือดแดงใหญ่ที่ไม่อาศัยเยื่อหุ้มผนังหลอดเลือดโดยเหนี่ยวนำด้วย Sodium nitroprusside

การคลายตัวของหลอดเลือดที่อาศัยกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดนั้นสามารถทดสอบได้โดยการใช้ sodium nitroprusside เป็นตัวเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดเกิดการคลายตัว

หลังจากเหนี่ยวนำให้หลอดเลือดหดตัวด้วย norepinephrine ขนาด $1x10^{-7}$ M เมื่อการหดตัวอยู่ในสภาวะคงที่ แล้วจึงใส่ Sodium nitroprusside แบบสะสม ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ $1x10^{-9}$, $1x10^{-8}$, $1x10^{-7}$,$1x10^{-6}$, $1x10^{-5}$ และ $1x10^{-4}$ M ตามลำดับ โดยมีระยะเวลาห่างกันนาน 5 นาทีในแต่ละความเข้มข้น แล้วนำค่าที่ได้ไปเขียนกราฟ concentration-response curve

ผลของสารทดสอบต่อการตอบสนองของหลอดเลือดนั้น จะคำนวณเป็นร้อยละของแรงในการคลายตัวของหลอดเลือดเมื่อได้รับ sodium nitroprusside ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยเทียบกับการหดตัวสูงสุดของหลอดเลือดที่เหนี่ยวนำด้วยให้หลอดเลือดหดตัวด้วย norepinephrine



รูปที่ 3.2 การแขวนหลอดเลือด Thoracic aorta เข้ากับเครื่องขยายสัญญาณและ organ bath

5. การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหลอดเลือด

หลอดเลือด thoracic aorta ส่วนที่เหลือจากการทดสอบการทำงาน จะถูกนำมาศึกษาทางพยาธิวิทยา โดยตัดให้หลอดเลือด thoracic aorta ให้มีความยาวประมาณ 3-4 มิลลิเมตร แช่ในสารละลาย 10% formaline in phosphate buffer เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำสะอาด แล้วนำน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้สารละลาย dehydrant คือ ethyl alcohol โดยใช้ความเข้มข้นจากต่ำไปหาสูง หลังจากนั้นทำให้ชิ้นเนื้อโปร่งใสโดยใช้ clearing agent คือ xylene แล้วจึงนำขี้ผึ้งเหลว (paraffin)ใส่เข้าไปในเนื้อเยื่อ แล้วทำการอบ จากนั้นนำเนื้อเยื่อที่ฝังอยู่ในพาราฟินมาตัดเป็นชิ้นด้วยวิธี ultrasectioning หนาประมาณ 5-6 ไมโครเมตร รอให้แห้งแล้วนำไปย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin (H&E) เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อและเซลล์ภายใน sections แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การศึกษาจุลพยาธิวิทยาของหลอดเลือดนั้นจะมีการให้คะแนนตามระดับพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น ดังตารางที่ 3.1

ระดับความรุนแรง	คะแนน	พยาธิสภาพที่เกิดขึ้น
Non-remarkable lesion	0	ไม่มีพยาธิสภาพของการเกิดโรค
mild	+1	มีการเสื่อมหรือเกิดการตายของเยื่อบุหลอดเลือด เพียง 1-2 จุด
moderate	+2	มีการเสื่อมหรือเกิดการตายของเยื่อบุหลอดเลือดหลายจุด มีการเรียงตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดผิดปกติ และเกิดการฉีกขาดของชั้น elastic lamina ชั้นใน และ elastic lamellae
severe	+3	มีการเสื่อมหรือเกิดการตายของเยื่อบุหลอดเลือดหลายจุด มีการเรียงตัวของกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดผิดปกติ เกิดการฉีกขาดของชั้น elastic lamina ชั้นใน และ elastic lamellae เกิดการเสื่อมหรือเกิดการตายของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือดหลายจุด พบ foam cells ฝังตัวอยู่ภายในผนังหลอดเลือด และเกิดการขยายตัวและบางลงของผนังหลอดเลือด

ตารางที่ 3.1 ตารางแสดงการให้คะแนนตามระดับพยาธิสภาพของหลอดเลือดที่เกิดขึ้น

6. การตรวจค่าทางชีวเคมี

เมื่อครบระยะเวลาให้สารทดสอบ หลังจากเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองหมดสติโดยฉีด zoletil® เข้าทางช่องท้องในขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมแล้ว ทำการเก็บเลือดหนูขาวจากหลอดเลือดแดงใหญ่โดยดูดจากหัวใจโดยตรง (cardiac puncture) ประมาณ 3 มิลลิลิตร นำเลือดที่ได้มาปั่นแยก (centrifuge) ที่ 2500 g เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำส่วนซีรั่ม (serum) ที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Cholesterol, Triglyceride โดยส่งให้หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเป็นผู้ทำการตรวจ ส่วน HDL ได้ส่งให้ทางหน่วยวิทยาศาสตร์สุขภาพ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นผู้ทำการตรวจ คำนวณหาค่า LDL โดยใช้สูตร freidewald equation ดังนี้คือ [LDL-C] = [TC]-[HDL-C]-[TG/5] และคำนวณหาค่า atherogenic index of plasma (AIT) ดังนี้คือ AIT = {[TC]-[HDL-C]}/[HDL-C] โดยที่ TC คือ total cholesterol, TG คือ triglyceride, LDL-C คือ LDL cholesterol และ HDL-C คือ HDL-cholesterol

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ผลการทดลองรายงานเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (Mean ± Standard error of means) วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ LSD พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($P < 0.05$)