

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการสร้างอนุมูลอิสระและการทำลาย
สมองจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงในหนูแรท



นางสาวอุษา ชัยมาด

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NEUROPROTECTIVE EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON OXIDATIVE
STRESS AND BRAIN DAMAGE INDUCED BY HIGH-FAT DIET IN RATS



MISS USA CHAIMAD

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

520238

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการ
สร้างอนุมูลอิสระและการทำลายสมองจากการเหนี่ยวนำด้วย
อาหารไขมันสูงในหนูแรท

โดย

นางสาว อูษา ชัยมาต

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

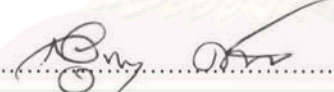
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สมลักษณ์ พวงชมพู

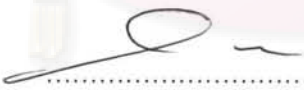
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต


..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบูรณ์)

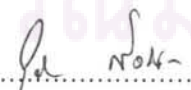
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอาวี)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง สมลักษณ์ พวงชมพู)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ดันตสิระ)


..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.ยุพิน สังวรินทะ)

อุษา ชัยมาต : ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการสร้างอนุมูลอิสระและการทำลายสมองจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงในหนูแรท. (NEUROPROTECTIVE EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON OXIDATIVE STRESS AND BRAIN DAMAGE INDUCED BY HIGH-FAT DIET IN RATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.สพ.ญ.สมลักษณ์ พวงชมพู, 118 หน้า

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape seed extract, GSE) เป็นสารประกอบ phenolic compounds ที่สกัดจากส่วนของเมล็ดองุ่น (*Vitis vernifera* Linn.) สารประกอบที่พบมากในเมล็ดองุ่นคือ proanthocyanidins ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า GSE มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากการทำลายด้วยอนุมูลอิสระ วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของ GSE ต่อการสร้างอนุมูลอิสระและการทำลายสมองจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงในหนูแรท การศึกษานี้ใช้หนูแรทเพศผู้พันธุ์สตาร์จำนวน 40 ตัว แบ่งหนูแรทแบบสุ่มออกเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 8 ตัว กลุ่ม 1 ได้รับอาหารพื้นฐาน, กลุ่ม 2 ได้รับอาหารไขมันสูง, กลุ่ม 3 ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการป้อนทางปากและเริ่มให้ในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลอง จัดเป็นกลุ่มอ้างอิง กลุ่ม 4 และ 5 ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ตามลำดับ โดยให้ GSE ผสมในอาหารไขมันสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อครบกำหนดระยะเวลา ทำให้หนูแรทหมดความรู้สึกโดยการสลบด้วย pentobarbital 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เจาะเก็บเลือดจากช่องหัวใจล่างซ้ายและเก็บสมอง แยกส่วนของสมองออกเป็น 2 ส่วน ด้านซ้ายแยกออกเป็น 3 ส่วนคือ cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus เพื่อศึกษาการตายของเซลล์ประสาทโดยการนับจำนวน dark neuron และสมองซีกขวานำมาเตรียม brain homogenate เพื่อตรวจวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น marker ของการเกิด lipid peroxidation และตรวจหาปริมาณสารสื่อประสาทไนตริกออกไซด์ (NO) ที่สร้างขึ้น ผลการทดลองพบว่า GSE มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองลดลง และยังคงปริมาณการสร้าง NO ในสมองที่เพิ่มสูงขึ้นจากการได้รับอาหารไขมันสูง และระดับ NO ที่สร้างขึ้นในเลือดเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง ผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นการตายของเซลล์ประสาทมีมากขึ้นเมื่อได้รับอาหารไขมันสูง GSE ที่ขนาด 0.5% และ 1.0% สามารถปกป้องการตายของเซลล์ประสาทได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า GSE มีประโยชน์ในการปกป้องเซลล์ประสาทถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงโดยมีฤทธิ์ลดไขมันในเลือดและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

สาขาวิชา เกษตรวิทยา
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อผู้ผลิต
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

4989240020: MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : PROANTHOCYANIDIN/ HIGH FAT DIET/ OXIDATIVE STRESS/ GRAPE SEED EXTRACT/ BRAIN/ ANTIOXIDANT

USA CHAIMAD : NEUROPROTECTIVE EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT ON OXIDATIVE STRESS AND BRAIN DAMAGE INDUCED BY HIGH-FAT DIET IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUPATRA SRICHAIRAT, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. SOMLAK POUNGSHOOMPOO, D.V.M., M.Sc, 118 pp.

Grape Seed Extracts (GSE) contain a number of polyphenols including proanthocyanidins and procyanidins, powerful free radical scavengers, are intended for use in food as functional ingredients exhibiting antioxidant activity. It is extracted from grape seed waste product obtained from grape fruit (*Vitis vernifera*, Linn). GSE have been reported to possess a broad spectrum of pharmacological and therapeutic effects including neuroprotective effect. The purpose of the present study was to investigate neuroprotective effect of grape seed extract on oxidative stress and brain damage induced by high-fat diet in rats. Forty rats were randomly divided into 5 groups. Each group comprised of 8 rats. These extracts were incorporated into chow and fed to rats for 8 weeks (60 days). Group I were fed normal diets (normal group), group II were fed high-fat diets (high-fat diet group), group III were fed high-fat diets and were orally administered with fenofibrate 100 mg/kg/day at 4th weeks (reference group). Groups IV and V were fed high-fat diets containing GSE at the concentrations of 0.5% and 1.0%, respectively. At the end of the experiment, all rats were anesthetized with pentobarbital (60 mg/kg). Blood was collected from left ventricle and their brain were immediately removed, dissected for cerebral cortex, cerebellum and hippocampus for pathological investigation of neuronal death (dark neuron counting). Brain homogenates was prepared for investigation of nitric oxide (NO) production and lipid peroxidation. Lipid peroxidation (malondialdehyde, MDA) in brain tissue and blood were examined. The results showed that GSE decreased MDA and NO production levels in brain tissue. Increasing of NO production and decreasing of MDA level in blood were found comparing with high-fat diet group. Furthermore, histopathologically examination showed that GSE prevented the high-fat diets induced cellular injury in brain tissue. These findings demonstrated that GSE potentially possess a benefit on neuroprotective effect from high-fat diets induced neuronal death via its lipid lowering effect and antioxidant activity

Field of Study : Pharmacology.....

Academic Year : 2009.....

Student's Signature *USA Chaimad*.....

Advisor's Signature *S. Supatra*.....

Co-Advisor's Signature *Somlak Pongshoompoor*.....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.สมลักษณ์ พวงชมภู ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำตลอดจนความช่วยเหลือในด้านต่างๆที่ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติ-สิระ และ รองศาสตราจารย์ ดร.ยุพิน สังวรินทระ ที่กรุณามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณเพื่อนนักศึกษาระดับปริญญาโทภาควิชาเภสัชวิทยา และเจ้าหน้าที่คณะสัตวแพทย์ ภาควิชาเภสัชวิทยาและภาควิชาพยาธิวิทยา ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจเสมอมาในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ นายจิรศักดิ์ มุลรัตน์ นางสาวศรียุญา อัครไชยสิทธิ์ และ นางสาววรรณพร สุวรรณเพชร ที่ร่วมกันทำงานวิจัยและคอยช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ รอง.ผบก.นต.นายแพทย์ (สบ6) พรชัย สุธีรกุล และ พ.ต.ท. วิรัช เทียวมาพบสุข (สบ3) นักเทคนิคการแพทย์ นต.รพ.ตร. ที่ให้ความสนับสนุนสถานที่ทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ครอบครัวช่วยมาด ที่ได้ให้กำลังใจและทุนอุดหนุนเสมอมา และขอขอบคุณบุคคลอื่นๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	
คำจำกัดความ.....	5
ประเภทของโรคหลอดเลือดสมอง.....	5
ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง.....	6
ส่วนประกอบของสมอง.....	6
เซลล์ประสาท.....	10
ความสัมพันธ์ระหว่างโรคหลอดเลือดสมองตีบ (stroke) หรือโรคสมองขาดเลือด กับการตายของเซลล์ประสาท.....	16
1. ความสัมพันธ์ระหว่างอาหารไขมันสูง (High-fat diet) กับการทำงานของหลอดเลือด และการตายของเซลล์ประสาท.....	16
2. ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไขมัน (lipid metabolism) ที่ผนัง เซลล์ประสาทกับการตายของเซลล์ประสาทเนื่องจากสมองขาดเลือด.....	18
3. การสร้าง NO และการเกิด signal transduction.....	19
4. บทบาทของ NO ต่อการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงสมอง (cerebral blood flow). องุ่นและสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape Seed Extract).....	20
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	22
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	23

บทที่	หน้า
3. วิธีดำเนินการทดลอง	
1. วัสดุและอุปกรณ์.....	28
2. วิธีดำเนินการทดลอง.....	31
3. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	50
4. ผลการวิเคราะห์	
1. ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อ นน.สมอง, นน.ตัว และน.นสมอง/น.นตัว ในหนูแรท.....	51
2. ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อระดับไขมันในเลือด.....	53
3. ผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นร่วมกับอาหารไขมันสูงต่อการทำงานของ ตับและไต.....	58
4. ผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และMDA(umol/mg protein) ในสมองของหนูแรท.	59
5. ผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และMDA (umol/ml) ในเลือดของหนูแรท.....	61
6. ผลของ GSE ต่อจำนวน Dark neurons ในสมองทั้ง 3 ส่วนด้วยวิธีการย้อม H&E และ Cresyl violet	63
7. ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของ GSE ต่อการปกป้องการทำลายของเซลล์ ประสาทส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus ด้วยการย้อม H&E และ Cresyl violet ในหนูแรท.....	67
8. ผลการศึกษาการเสื่อมของเซลล์ประสาทแบบมีไขมันสะสมด้วยการย้อมแบบ Oil Red O stain	74
5. อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง	
อภิปรายผลการทดลอง.....	80
สรุปผลการทดลอง.....	85
รายการอ้างอิง.	87
ภาคผนวก.....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	118

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงสูตรอาหารไขมันสูง.....	32
2	แสดงค่าที่ได้จากการวัดภายในวันเดียวกัน (Intraday) และในแต่ละวัน (Interday) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MDA ในสมอง.....	38
3	แสดงค่าที่ได้จากการวัดภายในวันเดียวกัน (Intraday) และในแต่ละวัน (Interday) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NO ในสมอง.....	42
4	แสดงน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองหนูแรททั้ง 5 กลุ่มตลอดการทดลอง 8 สัปดาห์.....	51
5	ตาราง 5.1 แสดงปริมาณ Triglycerideและcholesterol ในเลือด(mg/dl).... ตาราง 5.2 แสดงปริมาณ HDLและLDL ในเลือด(mg/dl).....	54
6	แสดงปริมาณค่าทางเคมีคลินิกในเลือด.....	58
7	แสดงปริมาณ MDAและ NOในสมอง (umole/mg protein).....	59
8	แสดงปริมาณ MDAและ NOในเลือด (umole/ml).....	61
9	แสดงผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของ GSE ต่อการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทด้วยการย้อม H&E และ Cresyl violet.....	64
10	แสดงผลของ GSE ต่อการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทแสดงเป็นระดับคะแนน (grade) 4 ระดับ.....	65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงส่วนประกอบของสมอง.....	7
2	แสดงส่วนประกอบของสมองส่วนหน้า.....	8
3	แสดงส่วนประกอบของสมองส่วน hippocampus.....	9
4	แสดงส่วนประกอบของสมองส่วน cerebellum.....	10
5	แสดงส่วนประกอบของเซลล์ประสาท.....	12
6	แสดงลำดับขั้นตอนการเกิด ischemic injury	15
7	แสดงกลไกการสร้างไนตริกออกไซด์ใน postsynaptic neuron.....	20
8	แสดงการสร้าง NO ที่ endothelial cells	21
9	แสดงตำแหน่งในการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO).....	22
10	แสดงเมล็ดองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล.....	23
11	แสดงแผนงานการวิจัย.....	33
12	แสดงปฏิกิริยาการเกิด Malondialdehyde (MDA).....	35
13	แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linerity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MDA ใน สมองและในเลือดแต่ละจุดบนกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจ 2 ครั้ง.....	36
14	แสดงปฏิกิริยาการสร้าง NO.....	39
15	แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linerity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NaNO ₂	41
16	กราฟแสดงน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองทั้ง 5 กลุ่มเมื่อครบระยะ เวลา 8 สัปดาห์.....	51
17	กราฟแสดงน้ำหนักสมอง/น้ำหนักตัว($\times 10^{-3}$)ของสัตว์ทดลองทั้ง 5 กลุ่ม เมื่อครบ 8 สัปดาห์.....	52
18	กราฟแสดงปริมาณอาหารที่ได้รับ (กรัม) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม เมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์	53
19	กราฟแสดงปริมาณไขมันในเลือด (mg/dl)	56
20	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อปริมาณ NO และ MDA ในสมองของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม.....	60

ภาพที่		หน้า
21	กราฟแสดงผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อปริมาณ NO และ MDA ในเลือดของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม.....	62
22	ผลของ GSE ที่ให้ร่วมกับอาหารไขมันสูงที่มีผลต่อพยาธิสภาพของเซลล์ ประสาทจากการย้อมด้วย H&E และ Cresyl violet ในหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม....	66
23	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน Cerebral cortex ด้วยการย้อม H&E	68
24	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาเซลล์ประสาทสมองส่วน Cerebellum ด้วยการย้อม H&E	69
25	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาเซลล์ประสาทสมองส่วน Hippocampus ด้วยการย้อม H&E.....	70
26	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาเซลล์ประสาทสมองส่วน Cerebral cortex ด้วยการย้อม Cresyl violet.....	71
27	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาเซลล์ประสาทสมองส่วน Cerebellum ด้วยการย้อม Cresyl violet.....	72
28	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาเซลล์ประสาทสมองส่วน Hippocampus ด้วยการย้อม Cresyl violet.....	73
29	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการเกิด vacuolar degeneration ในสมองส่วน cerebral cortex.....	75
30	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการเกิด vacuolar degeneration ในเนื้อสมองและในหลอดเลือด.....	75
31	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันในเซลล์ประสาท สมองปกติส่วน cerebral cortex.....	76
32	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันในเซลล์ประสาท สมองปกติส่วน cerebellum	76
33	ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันในเซลล์ประสาท สมองปกติส่วน hippocampus.....	77

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

μM	=Micromolar
μl	=Microlitre
μg	=Microgram
AA	= Arachidonic acid
AST (SGOT)	=Aspartate aminotransferase/serum glutamic oxaloacetic transaminase
ALT (SGPT)	=Alanine aminotransferase/Serum glutamate pyruvate transaminase
ALP	=Alkaline phosphatase
BSA	=Bovine Serum Albumin
BUN	=Blood Urea Nitrogen
BDNF	=Brain-derived neurotropic factor
BH4	=Tetrahydrobiopterin
CA	=Cornu ammonis
CRE	=Creatinine
%CV	=percent coefficient of variation
EDNO	=Endothelium-derived nitric oxide
eNOS	=endothelial nitric oxide synthase
FAD	=Flavin adenine dinucleotide
GTP	=Guanosine 5'-triphosphate
iNOS	=inducible nitric oxide synthase
LSD	= Least Significant Difference
ml	=Mililiter
mg	=Miligram
mg/kg	=Miligram per kilogram body weigh
MDA	=Malondialdehyde
nm	=Nanometer
nM	=Milimolar

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ (ต่อ)

nNOS	=neuronal nitric oxide synthase
NO	=Nitric oxide
NOS	=Nitric oxide synthase
NMDA	=N-methyl-D-aspartate
NADPH	=Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
r^2	=Coefficient of determination
SD	=Standard deviation
sGC	=Soluble guanylyl cyclase
TCA	=Trichloroacetic acid
TBA	=Thiobarbituric acid
TBARs	=Thiobarbituric
<	=น้อยกว่า
ก.	=กรัม
กก.	=กิโลกรัม
มก.	=มิลลิกรัม
มล.	=มิลลิลิตร

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ต้นฉบับไม่มีหน้า 1

NO PAGE 1 IN ORIGINAL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันขึ้นทั้งในกระแสเลือดและภายในสมองได้ จากการศึกษาของ Roberts และคณะ 2004 พบว่าอาหารไขมันสูง (High-Fat Diet) เหนี่ยวนำให้ผนังหลอดเลือดทำงานไม่สมบูรณ์, เพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ (free radicals) และทำให้สูญเสียความสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) เป็นสาเหตุสำคัญที่เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระออกมามากขึ้นและอนุมูลอิสระเหล่านี้ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ซึ่งรวมถึงเซลล์ประสาทด้วย

เนื่องจากสมองมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและธาตุเหล็กเป็นองค์ประกอบหลัก สมองจึงเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อการเกิดอนุมูลอิสระและทำให้เซลล์ถูกทำลายได้มาก (Srinivasarao และคณะ 1997, Pinol-Ripoll และคณะ 2006), นอกจากนี้ยังมีสารต้านอนุมูลอิสระน้อยและขาดแคลนกลไกในการซ่อมแซมเซลล์ประสาท (Candelario-Jalil และคณะ 2001)

เป็นที่ทราบกันดีว่าการเกิดอนุมูลอิสระภายในสมองมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะสมองขาดเลือดได้ พบว่าอนุมูลอิสระจำพวก Reactive Oxygen Species (ROS) และ Nitrogen Species จะสร้างออกมามากขึ้นเมื่อเกิดภาวะขาดเลือดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อสมอง (Sorrenti และคณะ 2006) และนอกจากนี้ยังพบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในสมองมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ (Pinol-Ripoll และคณะ 2006) จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาไม่นานนี้ของ Keynes และคณะ 2005 แสดงให้เห็นว่า lipid peroxidation มีความเกี่ยวข้องกับการบริโภคสารไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide consumption) อย่างมากมายในเซลล์ประสาทส่วนซีรีเบลลัมซึ่งเป็นส่วนที่มี NO signaling pathway อยู่มาก เนื่องจากไนตริกออกไซด์เป็นโมเลกุลสื่อสาร (signal molecule) ที่ทำหน้าที่ส่งผ่านสัญญาณระหว่างเซลล์ที่สำคัญ และมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบต่างๆภายในร่างกายตลอดจนพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น มีกลไกหลายอย่างที่คอยควบคุมให้ระดับของไนตริกออกไซด์อยู่ในภาวะสมดุล ไนตริกออกไซด์ที่มากเกินไปความต้องการจะเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยาออกซิเดชันให้กลายเป็นสาร peroxynitrite (ONOO⁻) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นอนุมูลอิสระที่ทำให้ปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆภายในร่างกายอย่างรุนแรงทำให้เกิด lipid peroxidation, protein peroxidation และ DNA damage (Yucel และคณะ 2005, Muralikrishna และคณะ 1999) และส่งผลทำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด (ischemic brain injury) ได้ในที่สุด (Myron และคณะ 2001)

ไนตริกออกไซด์ในสมองเกิดขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทสในสมอง (nNOS) โดยเปลี่ยน L-Arginine เป็น L-Citrulline ในสภาวะปกติไนตริกออกไซด์มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของสมอง (Wei และคณะ 1999) เช่น ควบคุม neuronal excitability, ควบคุม

glutamate transmission และควบคุมการไหลเวียนของเลือดมาเลี้ยงสมอง (cerebral blood flow) อย่างไรก็ตามไนตริกออกไซด์ที่สร้างออกมามากเกินไป กลับมีผลทำให้เกิด neuroexcitotoxicity และ เซลล์ประสาทตายได้ (Yucel และคณะ2005, Wei และคณะ1999)

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape Seed Extract, GSE) ได้จากของเหลือการทำไวน์หรือน้ำองุ่น มีสารประกอบจำพวก polyphenols อยู่มากมายอันได้แก่ proanthocyanidins และ procyanidins ผลการศึกษาที่ผ่านมาจำนวนมากในอดีตพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง เช่น ด้านการอักเสบ (Goncalves และคณะ2005), ปกป้องการเกิดโรคหัวใจ (Karthikeyan และคณะ2007), ปกป้องการเกิดโรคตับ (Orhan และคณะ2007), ด้านมะเร็ง (Zhang และคณะ2005), ด้านการแข็งตัวของเลือด, ฤทธิ์ลดน้ำตาล, ฤทธิ์ด้านการติดเชื้อจุลชีพ (Majheric และคณะ2007) และที่สำคัญคือมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Baydar และคณะ2007) รวมทั้งฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทถูกทำลาย (Hwang และคณะ2004) ปัจจุบันสารสกัดจากเมล็ดองุ่นได้ถูกนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริมหลายชนิด และเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางเพื่อช่วยลดริ้วรอยและได้รับการยอมรับแล้วว่ามีความปลอดภัยพอที่จะสามารถใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเสริม (Yamakoshi และคณะ2002, Bentivegna และคณะ 2002)

ดังนั้นในการศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการปกป้องเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่ทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นในสมองหนูแรท และหาความสัมพันธ์ของระดับไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้น จากการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงด้วยอาหารไขมันสูง นอกจากนี้ยังดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในสมองส่วนต่างๆที่เกี่ยวข้อง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย (Objective)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการปกป้องเซลล์ประสาทจากปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เหนี่ยวนำจากการบริโภคอาหารไขมันสูงในหนูแรท
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการปกป้องเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ซีรีเบลลัม (Cerebellum) และซีรีบรอลคอร์เทกซ์ (Cerebral cortex) จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารไขมันสูงในหนูแรท

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ด้านการสร้างอนุมูลอิสระในสมอง และสามารถปกป้องการทำลายเซลล์ประสาทจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารไขมันสูงในหนูแรทได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ(Expected Benefit Application)

1. ได้ข้อมูลสนับสนุนฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่สามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการบริโภคอาหารไขมันสูง
2. เป็นข้อมูลสนับสนุนการวิจัย การพัฒนาสารสกัดจากเมล็ดองุ่นซึ่งเป็นส่วนเหลือจากการทำไวน์มาเป็นอาหารเสริมที่มีฤทธิ์นำมาใช้ป้องกันการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับความจำเสื่อมของเซลล์ประสาท

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิดและเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญในการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular disease, CVD) โดยเฉพาะโรคหลอดเลือดสมองตีบ (Stroke) จากสถิติขององค์การอนามัยโลกปี พ.ศ.2548 ที่ได้รายงานไว้ว่า ประชาชนทั่วโลกเสียชีวิตจากโรคหลอดเลือดสมองตีบประมาณ 6 ล้านคนต่อปี หรือประมาณ 10% ของผู้เสียชีวิตจากสาเหตุอื่นๆ ส่วนประเทศไทยมีความชุกของโรคหลอดเลือดสมองประมาณ 690 คนต่อประชากรแสนคน และอัตราการตายในทุกกลุ่มอายุด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคความดันโลหิตสูง โรคหัวใจขาดเลือดและโรคสมองขาดเลือด มีผู้เสียชีวิต 108.4 คนต่อประชากรแสนคนหรือประมาณ 7 คนต่อชั่วโมง โดยที่เป็นในเพศชายมากกว่าเพศหญิงในอัตราส่วน 131.2 ต่อ 79.0 คนต่อประชากรแสนคน (Juntawises และคณะ 2009)

โรคหลอดเลือดสมองตีบ (Stroke) หมายถึง ภาวะที่สมองขาดเลือดไปเลี้ยง เนื่องจากหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองเกิดตีบตันหรือฉีกขาด จนเกิดการทำลายหรือการตายของเนื้อสมอง ทำให้สมองทำหน้าที่ผิดปกติไป ปัจจุบันแบ่งความผิดปกติของโรคหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองได้ 2 สาเหตุใหญ่ คือ

1. Ischemic stroke เป็นภาวะที่สมองขาดเลือดไปเลี้ยง พบมากถึง 80% มีสาเหตุเกิดจาก
 - Cerebral thrombosis เนื่องจากหลอดเลือดตีบลงซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น หลอดเลือดอักเสบ หรือหลอดเลือดหนาตัว มักพบในผู้ป่วยโรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูงและไขมันในเลือดสูง
 - Cerebral embolism เกิดจากก้อนเล็กๆที่เรียกว่า emboli ส่วนใหญ่เป็นก้อนจากการแข็งตัวของเลือด (blood clot) ที่หัวใจหรือหลอดเลือดใหญ่ที่ถูกบีบให้ล่องลอย ขึ้นไปตามหลอดเลือดสู่สมองผ่าน carotid artery และไปอุดตันหลอดเลือดไว้ในที่สุด emboli จากหัวใจมักเกิดจากการที่หัวใจเต้นไม่สม่ำเสมอ ลิ้นหัวใจรั่วทำให้เกิดลิ่มเลือด เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ การใส่ลิ้นหัวใจเทียม กล้ามเนื้อหัวใจตาย หรือเกิดจากการแข็งตัวของหลอดเลือด (atherosclerosis)
 - Transient ischemic attack (TIA) หรือ mini stroke เป็นภาวะที่สมองขาดเลือดชั่วคราวเกิดภายใน 24 ชั่วโมง ไม่มีการทำลายสมอง อาจมีอาการชา หรืออ่อนแรงของกล้ามเนื้อ

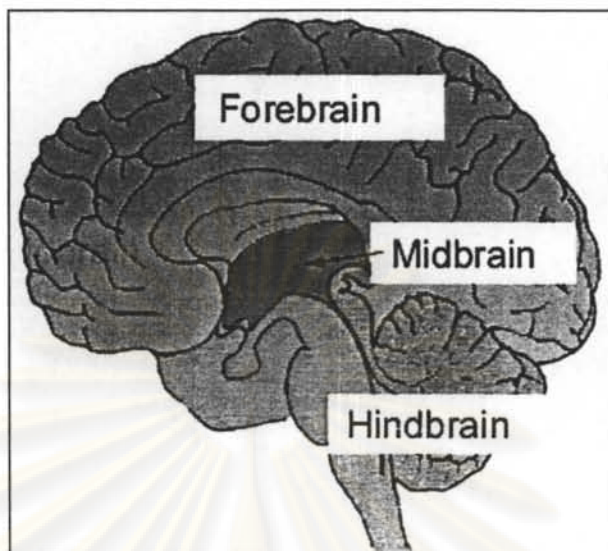
- Transient ischemic attack (TIA) หรือ mini stroke เป็นภาวะที่สมองขาดเลือดชั่วคราวเกิดภายใน 24 ชั่วโมง ไม่มีการทำลายสมอง อาจมีอาการชา หรืออ่อนแรงของกล้ามเนื้อ
- 2. Hemorrhagic stroke คือภาวะเลือดออกในสมองพบประมาณ 20% แต่มีอัตราตายสูงกว่าแบบแรก เกิดจาก
 - Cerebral hemorrhage มีเลือดออกในสมองเกิดจากหลอดเลือดแตก
 - Subarachnoid hemorrhagic เกิดจากหลอดเลือดที่ผิวเยื่อหุ้มสมองแตกและเลือดออกมาในช่องว่างระหว่างสมองกับกะโหลก

ปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรคหลอดเลือดสมอง

1. โรคความดันโลหิตสูง ผู้ที่มีความดันโลหิตสูงกว่า 160/90 mmHg เป็นระยะเวลานานจะทำให้หลอดเลือดแดงแข็งตัวเร็วกว่าปกติ ส่งผลทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบแข็งและแตกเป็นผลทำให้สมองทำงานผิดปกติ
2. โรคเบาหวาน ทำให้เกิดหลอดเลือดแดงตีบแข็ง เลือดที่ไปเลี้ยงสมองจึงถูกอุดตัน
3. โรคหัวใจ เช่น โรคหัวใจเต้นผิดจังหวะ โรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดทำให้มีลิ่มเลือดหลุดไปอุดตันหลอดเลือดเลี้ยงที่ไปเลี้ยงสมอง
4. ไขมันในเลือดสูง ทำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงที่ไปเลี้ยงสมองเร็วกว่าปกติ
5. การสูบบุหรี่ มีความเสี่ยงทำให้เกิดหลอดเลือดสมองและหลอดเลือดหัวใจตีบหรืออุดตันได้
6. ขาดการออกกำลังกาย

ส่วนประกอบของสมอง (Brain)

สมองประกอบด้วยเซลล์สมอง 2 ชนิด คือ เซลล์ประสาท (neuron) และเซลล์เกลีย (glial cell) เซลล์เกลียมีหน้าที่ในการดูแลและปกป้องเซลล์ประสาท เซลล์ประสาทเป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ส่งข้อมูลในรูปแบบของสัญญาณไฟฟ้าที่เรียกว่า ศักยะทำงาน (action potential) การติดต่อระหว่างเซลล์ประสาทรุนั้นเกิดขึ้นได้โดยการหลั่งสารเคมีชนิดต่างๆที่รวมเรียกว่า สารสื่อประสาท (neurotransmitter) ข้ามบริเวณระหว่างเซลล์ประสาทสองเซลล์ที่เรียกว่า ไซแนปส์ ส่วนประกอบและหน้าที่ของสมอง แบ่งได้เป็น 3 ส่วนดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ภาพแสดงส่วนประกอบของสมอง

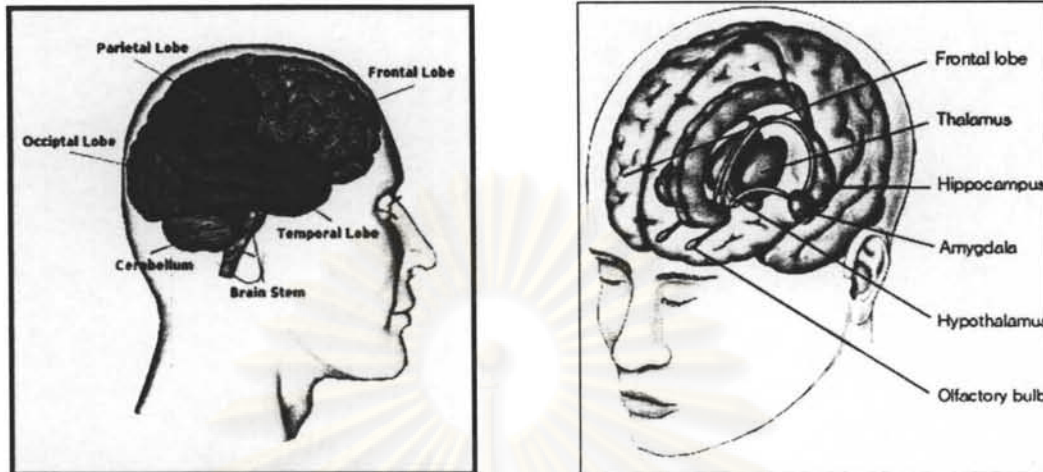
([http:// www. library.thinkquest.org/.../braindivisions.htm](http://www.library.thinkquest.org/.../braindivisions.htm))

1. สมองส่วนหน้า (Forebrain) มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีรอยหยักเป็นจำนวนมาก สามารถแบ่งออกได้ดังนี้

- ออลเฟกทอรีบัลบ์ (olfactory bulb) อยู่ด้านหน้าสุดทำหน้าที่เกี่ยวกับการดมกลิ่น
- ซีรีบรัม (Cerebrum) มีขนาดใหญ่ที่สุดและมีรอยหยักเป็นจำนวนมาก

ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ เป็นศูนย์กลางการทำงานของกล้ามเนื้อ การพูด การมองเห็น การดมกลิ่น และการรับรส (Devi และคณะ 2006) แบ่งเป็น 2 ซีกแต่ละซีกเรียกว่า cerebral hemisphere และแต่ละซีกแบ่งเป็น 4 พู ดังแสดงในรูปที่ 2

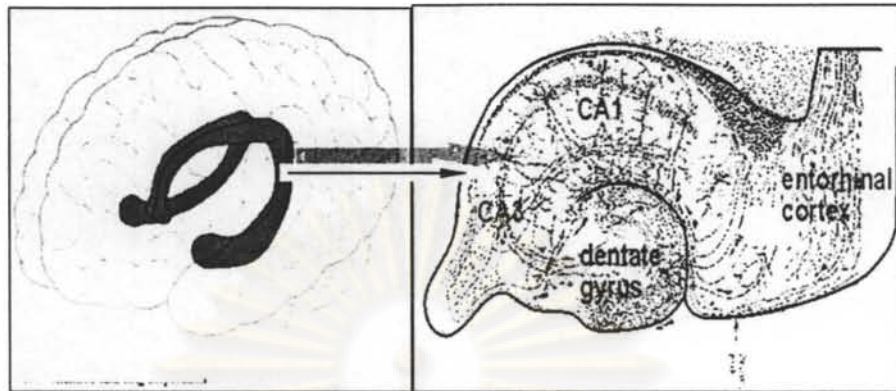
1. Frontal lobe ทำหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนไหว การออกเสียง ความคิด ความจำ สติปัญญา บุคลิกและความรู้สึก
2. Temporal lobe ทำหน้าที่ควบคุมการได้ยินและการดมกลิ่น
3. Occipital lobe ทำหน้าที่ควบคุมการมองเห็น
4. Parietal lobe ทำหน้าที่ควบคุมความรู้สึกด้านการสัมผัส การพูด และการรับรส



รูปที่ 2 ภาพแสดงส่วนประกอบของสมองส่วนหน้า

([http:// www.stanford.edu/.../basics/braintut/ab3.html](http://www.stanford.edu/.../basics/braintut/ab3.html))

- ทาลามัส (Thalamus) ทำหน้าที่ ถ่ายทอดกระแสประสาทเพื่อส่งไปจุดต่างๆ ของสมอง รับรู้และตอบสนองความรู้สึกเจ็บปวด ทำให้มีการแสดงออกของพฤติกรรมด้านความเจ็บปวด
 - ไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ทำหน้าที่ เป็นศูนย์กลางของระบบประสาทอัตโนมัติและควบคุมการผลิตฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองซึ่งจะควบคุมสมดุลของปริมาณน้ำและสารละลายในเลือดและเกี่ยวกับการควบคุมอุณหภูมิ
2. สมองส่วนกลาง (Midbrain) เป็นสมองที่ต่อจากสมองส่วนหน้า เป็นบริเวณที่รับและส่งสื่อประสาท ระหว่างสมองส่วนหน้ากับสมองส่วนท้าย ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนไหว สมองส่วน hippocampus มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับความยืดหยุ่นของสมอง (Neuroplasticity), ความจำและการเรียนรู้ (Wu และคณะ 2004, 2003) และ hippocampus ในพื้นที่ CA1 มีความไวต่อการเกิด cerebral ischemia และการตายของเซลล์ประสาทมากกว่าพื้นที่ส่วนอื่นๆ (Muralikrishna และคณะ 1999, Gioacechino และคณะ 2000) สาเหตุเกิดจากสมองส่วน CA1 มีความสามารถในการกำจัดส่วนเกินของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ประสาทออกได้น้อย นอกจากนี้มี NMDA-receptor จำนวนมากอีกด้วย (Gioacechino และคณะ 2000) อีกทั้งสมองในพื้นที่ส่วน CA1 ของ hippocampus มีการแสดงออกของเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเทส (Neuronal nitric oxide synthase, nNOS) มากกว่าพื้นที่ส่วน CA3 และ dentate gyrus (Lumme และคณะ 2000) ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ภาพแสดงสมองส่วน hippocampus, CA1 และ CA3 (Cornu Ammonis)

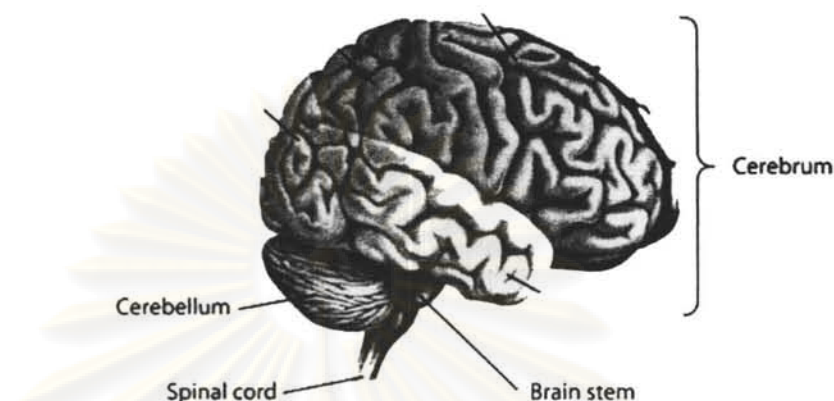
([http:// www. scienceblogs.com/purepedantry/2007/04/stress](http://www.scienceblogs.com/purepedantry/2007/04/stress))

([http:// www. neuroscience.bham.ac.uk/.../hippocampus.htm](http://www.neuroscience.bham.ac.uk/.../hippocampus.htm))

3. สมองส่วนท้าย (Hindbrain) ประกอบด้วย

1. พอนส์ (Pons) ติดกับสมองส่วนล่าง ทำหน้าที่ควบคุมกล้ามเนื้อบริเวณใบหน้า
2. เมดัลลา (Medulla) เป็นสมองส่วนท้ายสุด ต่อกับไขสันหลัง เป็นทางผ่านของกระแสประสาทระหว่างสมองกับไขสันหลัง เป็นศูนย์กลางการควบคุมการทำงานเหนืออำนาจจิตใจ เช่น ไอ จาม สะอึก หายใจ และการเต้นของหัวใจ
3. ซีรีเบลลัม (Cerebellum) อยู่ด้านหลังของ cerebrum ซีรีเบลลัม มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการทำงานหรือเกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการของระบบกล้ามเนื้อ (motor system) เพื่อให้เกิดการเคลื่อนไหวและทำหน้าที่เปรียบเทียบการเคลื่อนไหวที่ร่างกายต้องการจะทำการเคลื่อนไหวที่กำลังเกิดขึ้นจริงในขณะนั้น แล้วพยายามปรับให้เกิดการเคลื่อนไหวที่เหมาะสม (ดังแสดงในรูปที่ 4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 ภาพแสดงสมองส่วน cerebellum
([http:// www.nlm.nih.gov/.../ency/imagepages/18008.htm](http://www.nlm.nih.gov/.../ency/imagepages/18008.htm))

เซลล์ประสาท (Neuron)

เซลล์ประสาท (neuron) มีรูปร่างหลากหลายเช่น เซลล์ประสาท pyramidal พบมากใน cerebral cortex มีนิวเคลียสกลมรี โครมาตินโต เห็นนิวคลีโอลัสเด่นชัด มองดูคล้ายตาปลา (fish-eye appearance) ไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทเป็นรูปร่างสามเหลี่ยม ภายในมีจุดสีน้ำเงินของสาร Nissl (endoplasmic reticulum) กระจายอยู่ และเซลล์ประสาท granular ของ cerebellum มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กใกล้เคียงกัน นอกจากนี้ยังมี purkinje cell เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มาก มีเดนไดรต์แตกกิ่งก้านคล้ายต้นไม้ และมีเดนไดรติกสไปน์เป็นจำนวนมาก purkinje cell พบได้ในชั้นเปอรินาเรียที่มีการจัดระเบียบของเซลล์เป็นหลายชั้นในสมองส่วน cerebellum

เซลล์ค้ำจุนระบบประสาท (neuroglial cells หรือ glial cells)

เซลล์ชนิดนี้มีหลายลักษณะ มีรูปร่างและขนาดต่างกันเช่นเดียวกับชนิดแรก เซลล์พวกนี้จะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อของระบบประสาทส่วนกลาง โดยทำหน้าที่สำคัญคือ ค้ำจุนระบบประสาทส่วนกลาง นำอาหารและออกซิเจนมาเลี้ยงเซลล์ประสาท ขับถ่ายของเสียออกจากเซลล์ประสาท และทำหน้าที่เป็นด่านกั้น (blood brain barrier) ไม่ให้สารเคมีหรือเชื้อโรคบางชนิดเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลาง สามารถแบ่งตามชนิดที่พบบ่อย เป็น 4 ชนิด ดังนี้

1. Astroglia (astrocytes) เป็นเซลล์ชนิดที่พบมากที่สุดในระบบประสาทส่วนกลางมีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะคล้ายรูปดาว และมีแขนงมากมาย แขนงนี้ไปติดกับหลอดเลือด เรียกว่า perivascular feet (end feet) จะทำหน้าที่เป็นทางผ่านของอาหารเข้าสู่เซลล์ และเซลล์ชนิดนี้ยังช่วยค้ำจุนระบบประสาทส่วนกลางและนำอาหารมาเลี้ยงเซลล์ประสาท
2. Oligodendroglia (oligodendocytes) เป็นเซลล์ขนาดเล็กมีแขนงขนาดสั้น 2-3 แขนง ทำหน้าที่ในการนำอาหารมาเลี้ยงเซลล์ประสาท และสร้างปลอกไมอีลิน (myelin)
3. Microglia (microcytes) เป็นเซลล์ขนาดเล็ก นิวเคลียสใหญ่ มีแขนงขนาดสั้น 2-3 แขนง ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ภายในระบบประสาทส่วนกลาง
4. Ependymal cell เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายสี่เหลี่ยมหรือคล้ายแท่ง อยู่ตามผนังเวเนทริเคิล (Ventricles) ในสมองและผนังของช่องกลาง (central canal) ของไขสันหลังทำหน้าที่ในการสร้างและดูดซึมน้ำหล่อเลี้ยงสมองและไขสันหลัง

ส่วนประกอบของเซลล์ประสาท

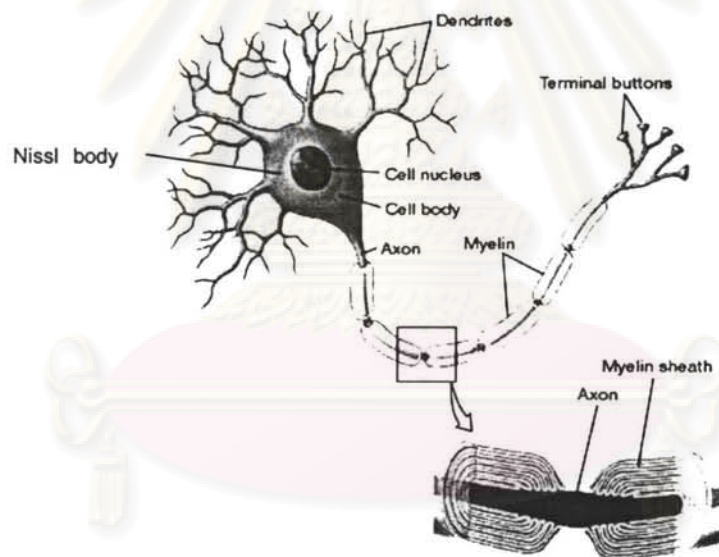
ส่วนประกอบของเซลล์ประสาทแต่ละเซลล์จะประกอบด้วยส่วนสำคัญ 2 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 5 คือ

1. ตัวเซลล์ (Cell Body) มีรูปร่างแตกต่างกันตามชนิดของเซลล์ประสาท ภายในมีนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมหรือนิวโรพลาสซึม ซึ่งมีออร์แกเนลล์ชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับเซลล์ทั่วไป ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทมีออร์แกเนลล์ที่สำคัญ คือ

- 1) นิสล์ บอดี (Nissl Body) เป็นออร์แกเนลล์ที่พบได้ในตัวเซลล์ประสาทและเดนไดรต์ แต่จะไม่พบในแอกซอน ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสังเคราะห์โปรตีนสำหรับนำไปสร้างเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการนำกระแสประสาท
- 2) ไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ออร์แกเนลล์นี้พบได้ทั้งในตัวเซลล์ประสาท เดนไดรต์ และแอกซอน พบมากบริเวณปลายประสาทโดยเฉพาะปลายประสาทนำคำสั่ง ไมโทคอนเดรียทำหน้าที่สร้างพลังงานให้แก่เซลล์
- 3) กอลจิบอดี (Golgi Body) มีลักษณะเป็นเส้นบาง ๆ เรียงขนานกันเป็นชั้น ๆ มีหน้าที่เก็บสารโปรตีนที่นิสล์ บอดี สร้างขึ้น

2. **ใยประสาท (Nerve Fiber)** เป็นส่วนที่แยกออกมาจากตัวเซลล์ มีลักษณะเป็นแขนงเล็ก ๆ จำนวนแขนงและความยาวของแขนงแตกต่างกันไปตามหน้าที่และตำแหน่งที่อยู่ ใยประสาทจำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ

- 1) **เดนไดรต์ (Dendrite)** เป็นส่วนของเซลล์ที่ยื่นออกไปเป็นแขนงสั้น ๆ แล้วแตกกิ่งก้านออกไปมากมาย เดนไดรต์ทำหน้าที่รับกระแสประสาทจากหน่วยรับความรู้สึก (Receptor) และรับกระแสประสาทจากเซลล์ประสาทเซลล์อื่นเข้าสู่ตัวเซลล์
- 2) **แอกซอน (Axon)** เป็นส่วนของไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาทที่ยื่นออกจากตัวเซลล์ ส่วนปลายของแอกซอนจะแตกเป็นแขนงเรียกว่า Telodendron



รูปที่ 5 ภาพแสดงส่วนประกอบของเซลล์ประสาท

([http:// www.cwx.prenhall.com/.../custom1/deluxe-content.html](http://www.cwx.prenhall.com/.../custom1/deluxe-content.html))

สาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ประสาทเสียหายหรือเกิดการบาดเจ็บมีดังนี้

1. Hypoxia หมายถึง การที่มีปริมาณออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อสมองน้อยลง ซึ่งเป็นสาเหตุที่สำคัญและพบบ่อยที่ทำให้เซลล์เกิด cell injury และ cell death hypoxia มีสาเหตุเกิดจาก
 - เกิดจากการขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (Brain ischemic) เนื่องจากการอุดตันของหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง โดยมีก้อนลิ่มเลือดแข็งตัวเข้าไปอุดตันอยู่หรือเกิดจากโรคของหลอดเลือดเอง
 - เกิดจากระบบหายใจหรือระบบไหลเวียนเลือดล้มเหลว ทำให้มีเลือดไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอ
2. Nutrition imbalance คือ การได้รับสารอาหารในปริมาณไม่เหมาะสมเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค เช่น การได้รับสารอาหารพวกไขมันมากเกินไปทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็ง (atherosclerosis) ได้ง่าย (พงษ์ศักดิ์ และพิเชษ และคณะ 2541)

การเปลี่ยนแปลงเนื่องจากขาดเลือดและขาดออกซิเจน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดที่คืนกลับสู่สภาพเดิมได้ (reversible cell injury) และชนิดที่ไม่คืนกลับสู่สภาพเดิม (irreversible cell injury) โดยที่ reversible cell injury นั้นการเกิด ischemic และ hypoxia จุดแรกที่ได้รับผลกระทบคือ กระบวนการหายใจที่ใช้ออกซิเจนของเซลล์ เซลล์นำออกซิเจนไปใช้สร้าง ATP โดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า oxidative phosphorylation ซึ่งเกิดในไมโทคอนเดรีย การสูญเสีย oxidative phosphorylation ทำให้ระดับ ATP ของเซลล์ลดลง แต่มี AMP เพิ่มมากขึ้น ซึ่งมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ phosphofructokinase และ phosphorylase ทำให้เพิ่มอัตราการเกิด anaerobic glycolysis ซึ่งเป็นขบวนการสร้าง ATP จากการสลายไกลโคเจน การเพิ่มของ glycolysis จะทำให้เกิดการสะสมของ lactic acid ทำให้สภาพภายในเซลล์เป็นกรดและมี pH ลดต่ำลง ซึ่งจะก่อให้เกิดการจับกลุ่มของโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ (clumping of nuclear formation)

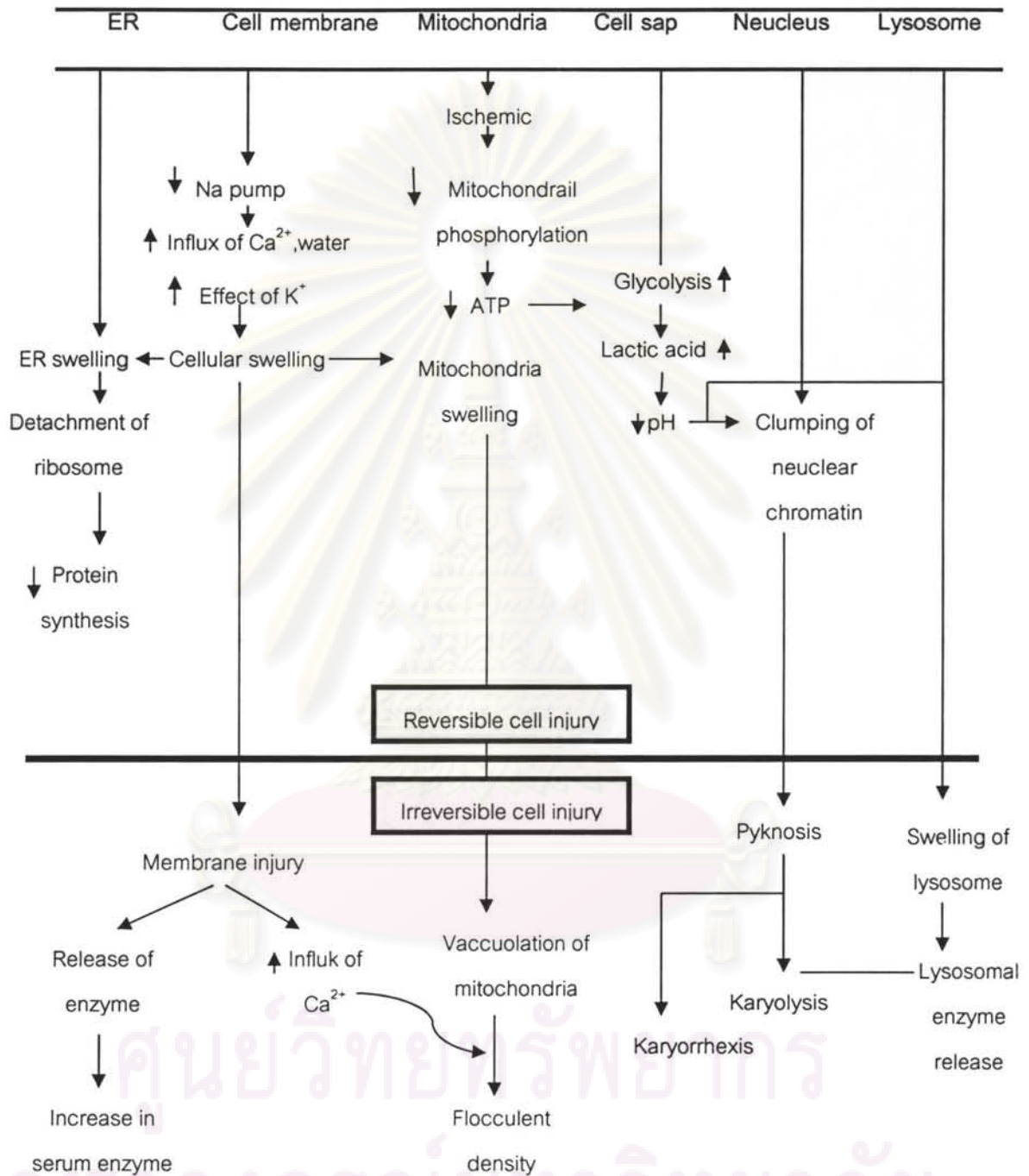
การขาด ATP ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการควบคุมออสโมนและน้ำของเซลล์โดยวิธี active transport ที่ต้องใช้ ATP เป็นผลทำให้มี Na^+ เข้ามาสะสมอยู่ภายในเซลล์และ K^+ ไหลออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้มีน้ำและออสโมนไหลเข้าสู่เซลล์เพิ่มมากขึ้น เกิดเซลล์บวมตัว (cell swelling)

การเคลื่อนที่ของน้ำและอิออนเข้าภายในเซลล์ระยะแรกนั้น จะทำให้ rough endoplasmic reticulum (RER) บวมตัวและหลุดออกมามากขึ้นทำให้มีการสร้างโปรตีนลดน้อยลง ถ้ามีการขาดเลือดและออกซิเจนเป็นเวลานาน เซลล์จะเกิดอันตรายชนิดที่ไม่สามารถคืนกลับสู่สภาพเดิมได้ (พงษ์ศักดิ์ และพิเชษ และคณะ 2541)

Irreversible cell injury เป็นการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเมื่อ ไมโทคอนเดรีย และส่วนของ cristae บวมเต่งมากขึ้น, plasma membrane เกิดการฉีกขาด, lysosome ก็บวมขึ้น มีการสะสมของแคลเซียมภายในเซลล์อย่างมากภายในไมโทคอนเดรีย ที่บวมจะมีสารซูนัมัวภายใน mitochondria matrix ถ้าเหตุการณ์ยังคงดำเนินต่อไปเรื่อยๆจะมีการรั่วไหลของโปรตีน เอนไซม์ และ metabolite ต่างๆของเซลล์ pH ที่ลดลงทำให้ lysosome บวมมากขึ้น มีการรั่วไหลของ เอนไซม์ lysosome (เช่น RNAase, DNAase, protease และ phosphatase) สูไซโทพลาสซึม เอนไซม์ดังกล่าวทำให้เกิดการย่อยสลายองค์ประกอบต่างๆภายในเซลล์ และเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส และเซลล์ตายในที่สุดกลายเป็นก้อนขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วย phospholipid ซึ่งต่อไปจะถูกเก็บกินโดย phagocyte (ดังแสดงในรูปที่ 6)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Cell compartment



รูปที่ 6 แสดงลำดับขั้นตอนการเกิด ischemic injury, ส่วนบนเป็น reversible cell injury, ส่วนล่างเป็น irreversible cell injury (พงษ์ศักดิ์และพิเศษ และคณะ 2541)

ความสัมพันธ์ระหว่างโรคหลอดเลือดสมองตีบแข็ง (atherosclerosis) หรือโรคสมองขาดเลือด (stroke) กับการตายของเซลล์ประสาท

1. ความสัมพันธ์ระหว่างอาหารไขมันสูง (High-fat diet) กับการทำงานของหลอดเลือดและการตายของเซลล์ประสาท

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานทำให้เกิดผลเสียต่อร่างกายที่ร้ายแรงมากที่สุดคือก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็ง(atherosclerosis) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการที่สมองขาดเลือดและเซลล์ประสาทตาย จากการศึกษาของ Hamdheydari และคณะ 2000 พบว่า Oxidized-LDLs (Low density lipoproteins) มีผลต่อ endothelial cell ของหลอดเลือดรวมทั้งหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง โดยมีผลลดการทำงานของปริมาณของเอนไซม์ eNOS ปริมาณไนตริกออกไซด์ที่ลดลงมีผลทำให้หลอดเลือดแดงตีบแข็ง และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ นอกจากนี้ ยังพบว่า Oxidized-LDLs มีผลลดปริมาณ L-arginine และลดการแสดงออกของเอนไซม์ NOS ซึ่งมีบทบาทต่อการทำงานของเกล็ดเลือด (platelet function) ด้วย (Chan และคณะ 1996)

จากการศึกษาของ Ying และคณะ 2000 แสดงให้เห็นว่าอาหารไขมันสูงสามารถเพิ่มการแสดงออกของ caveolin-1 ที่หลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) และลดการแสดงออกของเอนไซม์ eNOS (endothelial nitric oxide synthase) นอกจากนี้อาหารไขมันสูงยังเป็นต้นเหตุของโรคความดันเลือดสูง, stroke และ coronary artery disease (Wilde และคณะ 1999) และจากการศึกษาของ Yucel และคณะ 2005 พบว่าภาวะไขมันในเลือดสูงสามารถเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ iNOS (inducible nitric oxide synthase) ซึ่งมีผลเสียต่อการทำลายใยประสาทตาเป็นสาเหตุของโรคต้อหิน (glaucomatous optic neuropathy) และเกิดการอักเสบที่สมองซึ่งพบมากในผู้ป่วย Alzheimer's disease (Hamdheydari และคณะ 2000)

จากการศึกษาที่ผ่านมาไม่นานแสดงความสัมพันธ์ของอาหารไขมันสูงกับอนุมูลอิสระที่มีผลต่อการทำงานของสมอง โดยอาหารไขมันสูงมีผลเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระภายในสมอง อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีผลไปควบคุมการทำงานของ Brain-derived neurotropic factor (BDNF) โดยที่ BDNF มีหน้าที่สนับสนุนให้มีการสร้างเซลล์ประสาท

ชั้นใหม่ที่บริเวณ synapse (support synaptic plasticity) ซึ่งควบคุมการทำงานของ synaptosin I และ CREB (Cyclic AMP-response element-binding protein) ซึ่งโมเลกุลดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของรอยต่อเซลล์ประสาท เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Wu และคณะ 2003, 2004) ดังนั้นการรับประทานอาหารที่มีไขมันสูงเป็นเวลานานจะมีผลทำให้การเรียนรู้และความจำลดลง นอกจากนี้ อาหารที่มีกรดไขมัน (fatty acid) เป็นส่วนประกอบสูงจะมีผลไปเพิ่มการกระตุ้น excitatory ทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลาย (Valencia และคณะ 1998) และทำให้เซลล์ประสาททวม (Monique และคณะ 2001) และจากการศึกษาของ Ming และคณะ 2009 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีผลทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือด และโรคหลอดเลือดเลี้ยงสมอง (cerebrovascular) เพิ่มมากขึ้น เป็นผลมาจากอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น จากการศึกษาของ Baran และคณะ 2005 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานร่วมกับมีความเครียดเรื้อรัง มีผลทำให้เซลล์ประสาทสมอง hippocampus ส่วน dendrite หดสั้นและตายได้ในที่สุด

จากการศึกษาของ Christian และคณะ 2005 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูง รวมถึงอาหารที่มีน้ำตาลสูงมีผลทำให้เยื่อหลอดเลือดสูญเสียการทำงาน (endothelial dysfunction), ขาดความสมดุลระหว่าง oxidant กับ antioxidant และมีผลลดการแสดงออกของ NOS-isoform แต่ในทางตรงกันข้าม ภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) มีผลทำให้การแสดงออกของ nNOS (NOS-1) เพิ่มขึ้น ซึ่งการเพิ่มขึ้นนี้มีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ประสาทด้วย (Yucel และคณะ 2000) นอกจากนี้ การศึกษาของ Mader และคณะ 2005 ยังพบว่าในสภาวะสมองเกิดการอักเสบ มีการกระตุ้น glia cell ให้มีการแสดงออกของ inducible NOS (iNOS) ในสมองได้ ทำให้มีการสร้าง NO ในปริมาณมาก NO จำนวนมากเกินไปมีผลทำลายเซลล์ประสาทที่อยู่ใกล้เคียงได้ ในขณะที่เดียวกัน endothelial NOS (eNOS) ที่หลอดเลือดไปเลี้ยงสมองจะถูกกระตุ้นโดย Ca^{2+} ทำให้มีการสร้าง NO เพิ่มมากขึ้นเป็นผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilatation) และมีการรวมตัวของ macrophages, microglia และ astrocyte เพื่อจับกินเซลล์ประสาทที่ตาย

2. ความสัมพันธ์ของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงไขมัน (lipid metabolism) ที่ผนังเซลล์ ประสาทกับการตายของเซลล์ประสาทเนื่องจากสมองขาดเลือด (Muralikrishna และคณะ 1999)

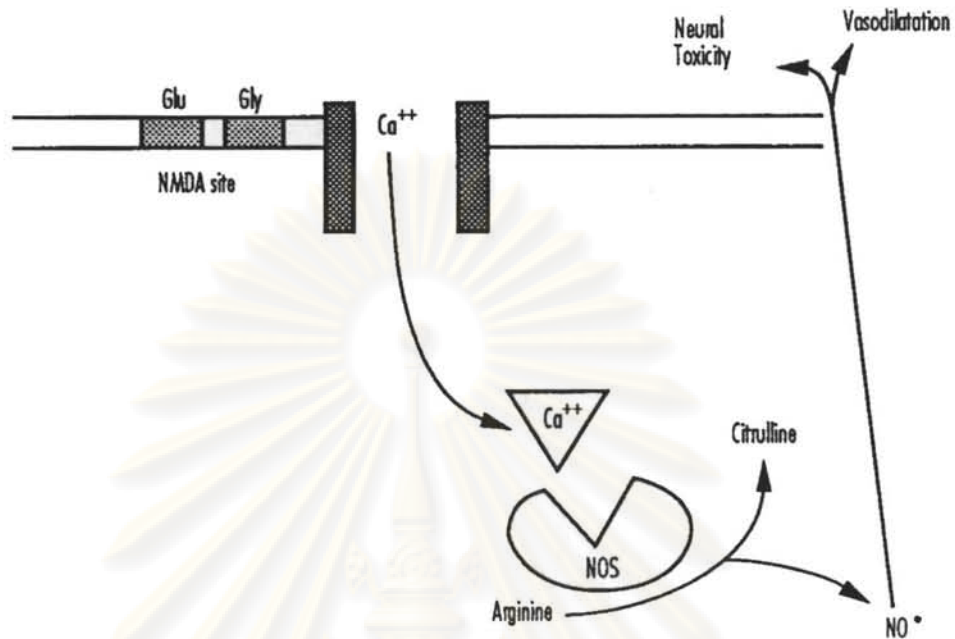
การเปลี่ยนแปลงไขมันที่ผนังเซลล์ มีผลทำให้เกิดการสร้าง arachidonic acid (AA) รวมด้วย พบว่า AA มีบทบาทสำคัญในการชักนำให้เซลล์ประสาทตาย โดยกระบวนการสร้าง arachidonic acid ต้องอาศัยเอนไซม์ phospholipase และ phosphatidylcholine synthase จากนั้น arachidonic acid จะถูกเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) และ lipoxygenase (LOX) เปลี่ยนให้เป็น prostaglandins, leukotrienes และ reactive oxygen species (ROS) ROS ที่เกิดขึ้นทำให้ไขมันเกิด lipid peroxidation และเกิดสารที่มีพิษต่อเซลล์ (cytotoxic product) คือ 4-hydroxynonenal (4-HNE) และ acrolein สารดังกล่าวสามารถเข้าจับกับโปรตีนแบบ covalent ทำให้โปรตีนสูญเสียการทำงาน นอกจากนี้ arachidonic acid ยังกระตุ้นเอนไซม์ sphingomyelinase ทำให้มีการผลิต ceramide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น pro-apoptotic agent ได้อีกด้วย การเกิด ceramide และ oxygen radicals มีผลทำให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียการทำงานและหลัง cytochrom C ออกมาเป็นการแสดงถึงจุดเริ่มต้นของการตายของเซลล์ประสาท โดยเหตุที่ neuronal membrane ประกอบด้วยไขมัน (ฟอสโฟไลปิด, สฟริงโกไมอีลิน), โปรตีนและธาตุเหล็ก จึงทำให้สมองมีความไวต่อการถูกทำลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากอนุมูลอิสระ (oxygen radicals) นอกจากนี้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นชนิด ROS (O_2^- และ OH^-) สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับไนตริกออกไซด์ (NO) ที่สร้างขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ nNOS ได้เป็นสาร peroxynitrite ($ONOO^-$) สามารถชักนำให้เกิด lipid peroxidation, protein peroxidation และ DNA damage และมีศักยภาพเหนี่ยวนำให้เซลล์ประสาทตายได้ในขณะเดียวกัน นอกจากนี้ยังพบว่า arachidonic acid และ metabolite สามารถทำให้ blood brain barrier (BBB) ทำงานผิดปกติ โดยมีผลต่อการคัดกรองสารผ่านเข้า-ออก สมองทำให้เกิดการบวมของสมองได้ (Muralikrishna และคณะ 1999, Gioacechino คณะ 2000, Monique และคณะ 2001) และทำให้เซลล์ประสาทตาย

การสร้าง NO และการเกิด signal transduction

ไนตริกออกไซด์ (NO) มีคุณสมบัติเป็นแก๊สละลายได้ดีทั้งในน้ำและไขมัน สามารถแพร่กระจายไปได้ทั่วและออกฤทธิ์ต่อเซลล์ที่อยู่ห่างออกไปได้ สร้างขึ้นจากการทำงานของเอนไซม์ nitric oxide synthase (NOS) เปลี่ยน amino acid L-arginine ได้เป็น L-citrullin และ ไนตริกออกไซด์ (Valencia และคณะ 1997) นอกจากนี้ยังต้องอาศัย cofactors เช่น heme, NADPH, tetrahydrobiopterin (BH_4), FAD, FMN และ calmodulin การขาด cofactors ดังกล่าวมีผลทำให้เกิด eNOS-uncoupling ที่ cerebral artery เป็นสาเหตุทำให้เกิด endothelial dysfunction, hypertension, hyperlipidemia, atherosclerosis และ hypoxic-ischemic brain injury (Toda และคณะ 2009)

ในระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system, CNS) ไนตริกออกไซด์ (NO) สร้างขึ้นจากการกระตุ้นของสารสื่อประสาท glutamate ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดกระตุ้นเซลล์เป้าหมาย (excitatory neurotransmitter) glutamate จับกับ NMDA receptor ทำให้ Ca^{2+} channel เปิดเกิดการไหลของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์ประสาทส่วน postsynaptic ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ nNOS (Yucel และคณะ 2005) NO ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ประสาท ทำหน้าที่เป็น neuromodulator หรือ neurotransmitter (Wei และคณะ 1999) โดยไม่มีการเก็บสะสมไว้ในเซลล์ประสาท แต่จะสังเคราะห์ขึ้นเมื่อต้องการ และสามารถแพร่กระจายอย่างรวดเร็วผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ มีลักษณะไม่คงตัวจึงสลายตัวไปเป็น nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) ได้อย่างรวดเร็ว NO ที่เกิดขึ้นที่ postsynaptic neurons สามารถแพร่กระจายไปยังปลายประสาทของ presynaptic neurons ได้และมีผลปรับเปลี่ยนการหลังสารสื่อประสาทชนิด glutamate ซึ่งมีบทบาทเกี่ยวข้องกับกระบวนการเรียนรู้และความทรงจำที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ (Valencia และคณะ 1997) (ดังแสดงในรูปที่ 7)

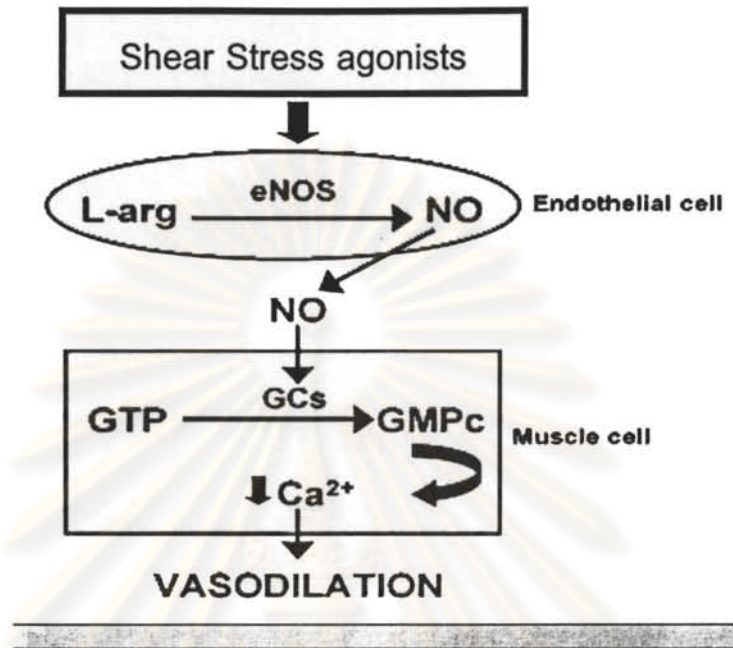
เมื่อปริมาณความเข้มข้นของ Ca^{2+} ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เนื่องมาจากการไหลของ Ca^{2+} เข้าสู่เซลล์หรือการปลดปล่อย Ca^{2+} ขึ้นเองภายในเซลล์ มีผลกระตุ้นการทำงานของ constitutive NOS (eNOS และ nNOS) ทำให้ eNOS จับกับ caveolin-1 ที่ endothelial plasma membrane ได้ดีขึ้น ส่งผลให้มีการสร้าง NO ได้มากขึ้น (Ying และคณะ 2007) นอกจากนี้ยังกระตุ้นการทำงานของ nNOS ซึ่งเป็น soluble enzyme ที่พบได้ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาท



รูปที่ 7 แสดงกลไกการสร้าง NO ใน postsynaptic neuron
([http:// www.nichd.nih.gov/.../pubs/acute/acute.cfm](http://www.nichd.nih.gov/.../pubs/acute/acute.cfm))

บทบาทของ NO ต่อการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงสมอง (Cerebral blood flow)

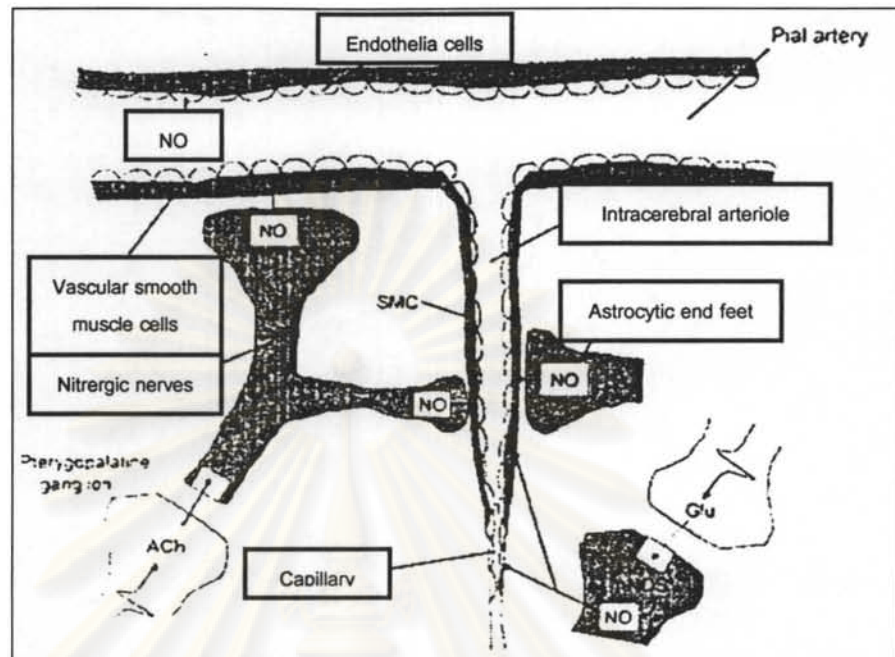
ไนตริกออกไซด์ (NO) ที่สร้างขึ้นจาก endothelial cells โดยการทำงานของเอนไซม์ eNOS มีบทบาทกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ soluble guanylyl cyclase (sGC) ให้เปลี่ยน guanosine triphosphate (GTP) ไปเป็น cyclic guanosine monophosphate (cGMP) ซึ่งไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ protein kinase G (PKG) ให้มีการขับ potassium (K⁺) และ calcium (Ca²⁺) ออกจากเซลล์ เกิดการคลายตัวของกล้ามเนื้อ และส่งผลทำให้หลอดเลือดขยายตัว (vasodilatation), ลดความดันโลหิต, ยับยั้งการเกาะกลุ่มและการยึดเกาะของเกล็ดเลือด (platelet aggregation), ยับยั้งการยึดเกาะของเซลล์เม็ดเลือดขาว (adhesion) และป้องกันการเกิดหลอดเลือดแดงตีบแข็ง (atherosclerosis) นอกจากนี้ ไนตริกออกไซด์ที่สร้างขึ้นจากหลอดเลือดบริเวณ peripheral efferent nerves ที่เรียกว่า Nitroergic (Toda และคณะ 2009) มีบทบาททำให้หลอดเลือดเลี้ยงสมองขยายตัว (cerebral vasodilatation), เพิ่มการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงสมองได้ดีขึ้น และ ทำให้กล้ามเนื้อเรียบคลายตัว (relaxation) (ดังแสดงในรูปที่ 8)



รูปที่ 8 ภาพแสดงการสร้าง NO ที่ endothelial cells
([http:// www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X200600...](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0066-782X200600...))

ตำแหน่งที่สำคัญในการสร้าง NO จากการทำงานของ nNOS คือ postganglionic (nitroergic) nerves และในเซลล์ประสาท (neurons) นอกจากนี้ยังสร้างขึ้นที่ endothelial cells (EC) ของหลอดเลือดแดงเป็ย (pial artery), intracerebral arterioles และ capillaries โดยการทำงาน of eNOS

NO ที่สร้างขึ้นล้วนมีบทบาทต่อ cerebral arterial, arteriolar smooth muscle cells และ หลอดเลือดฝอย (capillaries) โดย NO สามารถแพร่กระจายจากเซลล์ประสาทไปที่ vascular smooth muscle cells (Toda และคณะ 2009) ส่งผลทำให้หลอดเลือดขยายตัวและเพิ่มการไหลเวียนเลือดเลี้ยงสมองได้ดีขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 9)



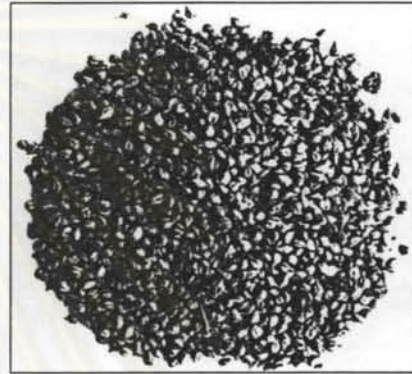
รูปที่ 9 แสดงตำแหน่งที่มีการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO)
(Toda และคณะ 2009)

ส่วนไนตริกออกไซด์ (NO) ที่เกิดจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS มีบทบาทเกี่ยวกับขบวนการอักเสบและควบคุมปฏิกิริยาภูมิคุ้มกัน (Toda และคณะ 2009) ซึ่งการมีปริมาณ NO ที่มากเกินไปมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพได้ เช่น เกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (tissue injury) และเกิดการตายของเซลล์ (cell apoptosis)

องุ่น (Grape)

มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Vitis vinifera* เป็นผลไม้ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งในเขตนานาเขตกึ่งร้อนถึงหนาว และเขตร้อน ปัจจุบันประเทศไทยมีการปลูกองุ่นในแถบภาคตะวันตก เช่น อำเภอดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อำเภอสามพราน อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร ซึ่งสามารถให้ผลผลิตได้ดี

องุ่นพันธุ์คาร์ดินัล เป็นองุ่นที่ปลูกง่าย การเจริญเติบโตดีมาก มีลักษณะช่อใหญ่ ผลดก ผลกลมค่อนข้างใหญ่ มีสีแดงหรือม่วงดำ รสหวาน กรอบ เปลือกบาง จึงทำให้ผลแตกง่ายเมื่อผลแก่ในช่วงฝนตกชุก ในผลหนึ่งๆ มีเมล็ด 1-2 เมล็ด ช่วงเวลาหลังจากตัดแต่งกิ่งจนเก็บผลได้ใช้เวลา 3 เดือนครั้ง ในเวลา 2 ปี สามารถให้ผลผลิตได้ถึง 5 ครั้ง ผลผลิตประมาณ 10-15 กิโลกรัม/ต้น/ครั้ง (ดังแสดงในรูปที่ 10)



รูปที่ 10 แสดงเมล็ดองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล

(<http://www.culture.go.th/grape.htm>)

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape Seed Extract) เป็นสารประเภท Phenolic compounds ซึ่งสารเหล่านี้สามารถพบในพืชอื่นๆ ได้เช่นกันแต่พบมากในเมล็ดองุ่น (Zhang และคณะ 2005) พบว่าในเมล็ดองุ่นมีสาร polyphenols ประมาณ 60% และมี flavon-3-ols, catechin และ epicatechin ในความเข้มข้นสูงอีกด้วย (Garcia-Marino และคณะ 2006) สารสำคัญที่พบในองุ่นคือ proanthocyanidins และ procyanidins เป็นสารประกอบซึ่งเกิดจากการทำปฏิกิริยา polymerization ของ polyhydroxyflavon-3-ol monomer units ((+)-catechin และ (-)-epicatechin) กับ oligomers (Dekic และคณะ 1998, Karthikeyan และคณะ 2007)

การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

1. ฤทธิ์ป้องกันหลอดเลือดแดงตีบแข็ง (anti-atherosclerosis) และฤทธิ์ลดไขมันในเลือด

Yamakoshi และคณะ 1999 ศึกษาฤทธิ์ปกป้องหลอดเลือดแดงตีบแข็งของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มี proanthocyanidin เป็นจำนวนมาก เมื่อเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงในกระต่ายโดยผสมสารสกัดที่มี proanthocyanidin ในอาหารไขมันสูงความเข้มข้น 0.1% และ 1.0% (w/w) จากการทดลองพบว่าสารสกัดที่มี proanthocyanidin ทำให้ระดับไขมันในเลือด และ malondialdehyde ในเส้นเลือดแดงใหญ่ลดลงได้ นอกจากนี้ผลทาง immunohistochemical แสดงให้เห็นว่า oxidized-LDL positive macrophage derived foam cell ลดลงด้วยเช่นกัน

2. ฤทธิ์ยับยั้งการแข็งตัวของเลือด (anti-thrombotic)

Sano และคณะ 2005 ศึกษาฤทธิ์ของ proanthocyanidin ต่อการแข็งตัวของเลือด โดยเหนี่ยวนำให้เกิดการแข็งตัวของเลือดที่ carotid artery ในหนูแรทด้วยการยิงเลเซอร์ และ shear stress เหนี่ยวนำการแข็งตัวของเลือดในหลอดทดลอง พบว่า proanthocyanidin สามารถยับยั้งการเกิดก้อนเลือดที่ carotid artery ได้และยับยั้งปฏิกิริยาการแข็งตัวของเกล็ดเลือดในหลอดทดลองได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า proanthocyanidin สามารถออกฤทธิ์ต่อต้านการแข็งตัวของเลือด โดยยับยั้งการทำงานของเกล็ดเลือดได้โดยตรง

3. ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ปกป้องหัวใจ (cardioprotective)

Shao ZH และคณะ 2003 ศึกษาฤทธิ์ของ grape seed proanthocyanidin ต่อการปกป้องหัวใจจากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระซึ่งเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 (exogeneous oxidant stress) และ antimycin A (endogeneous oxidant stress) ใน cell line ผลการทดลองพบว่า GSE สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและพบอัตราการมีชีวิตรอดของ cell line โดยฤทธิ์ดังกล่าวเป็นไปแบบ dose-dependent

4. ฤทธิ์ปกป้องการทำงานของตับและไต

Ray และคณะ 1999 ศึกษาฤทธิ์ปกป้องการทำงานของตับและไตจากการเหนี่ยวนำด้วย acetaminophen ขนาด 400 mg/kg ให้โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง พบว่า GSE สามารถลดปริมาณ alanine aminotransferase (AST) และ blood urea nitrogen (BUN) ในเลือดได้และจากผลทางพยาธิวิทยาของตับและไต พบว่า GSE

สามารถยับยั้งการเกิด apoptotic และ necrotic ในเซลล์ตับและไตได้

5. ฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ

Balu และคณะ 2006 ศึกษาฤทธิ์ของ GSE ในการป้องกันระบบประสาทส่วนกลาง (CNS) ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากอายุที่เพิ่มขึ้นในหนูแรท (age-related oxidative) โดยวิเคราะห์การสะสมของ DNA damage makers (8-OHdG) และ DNA protein cross-links ผลการทดลองพบว่า GSE สามารถยับยั้งการสะสมของ 8-OHdG ในสมองส่วน spinal cord, cerebral cortex, striatum และ hippocampus ได้

6. ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาท (neurons) ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ในปัจจุบันมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและไวน์แดงต่อการป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทมากมาย โดยการศึกษาก่อนหน้านี้ของ Hwang และคณะ 2004 ทำการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทของ GSE ใน gerbil hippocampus โดยเหนี่ยวนำให้หนูแรทเกิดภาวะสมองส่วนหน้าขาดเลือด (forebrain ischemia) ด้วยวิธี common carotid artery occlusion นาน 5 นาที และป้อนสาร GSE ผ่านทางปากขนาด 60 mg/kg ให้ทั้งก่อนและหลัง occlusion 30 นาทีจากการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับ GSE มีความหนาแน่นของเซลล์ประสาท pyramidal จากการย้อมด้วยวิธี cresyl violet (neuronal cell density) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม vehicle treated และเมื่อศึกษาด้วยวิธี immunoreactivity ของ 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG) พบว่า GSE สามารถยับยั้งการทำลาย DNA ในสมองส่วน CA1 ของ hippocampus ได้อีกด้วย ดังนั้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถป้องกันการทำลายเซลล์ประสาทในหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดได้

การทดลองต่อมาของ Feng และคณะ 2005 ศึกษาฤทธิ์ของ GSE ในการป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระในสมอง โดยใช้หนูแรทอายุ 7 วันเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด (hypoxic brain) ด้วยวิธี right carotid artery occlusion การฉีด GSE ขนาด 50 mg/kg เข้าช่องท้อง 5 นาทีก่อนทำให้สมองขาดเลือดโดยให้วันละ 2 ครั้ง นาน 22 วัน ในวันที่ 22 ซึ่งนำนักสมองส่วน right hemisphere และดูการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ด้วยวิธีการย้อม H&E ผลการทดลองพบว่าหนูแรทที่ได้รับ GSE มีน้ำหนักสมองลดลงจาก

20.0±4.4%S.E.M. (vehicle groups) เหลือ 3.1±1.6%S.E.M. (treated groups) และมีระดับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในสมองส่วน cortex, hippocampus และ thalamus น้อยกว่ากลุ่มควบคุม ระดับ thiobarbituric acid reacting substance (TBARs) ซึ่งเป็น marker ของ lipid peroxidation และ 8-isoprostaglandin-F_{2α} ใน brain homogenate ลดลง การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถกวดการเกิด lipid peroxidation แล้วยังลดความเสียหายของสมองหลังจากที่ทำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดในหนูแรท

ผลของการทดลองเมื่อไม่นานมานี้ของ Assuncao และคณะ 2007 ที่ศึกษาในหนูแรทอายุ 6 เดือน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์, กลุ่มที่ได้รับไวน์แดง (red wine) และ pair-fed control ติดต่อกันนาน 6 เดือน ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ lipid peroxidation, glutathione levels และ antioxidant enzyme activities ใน hippocampus homogenate และศึกษาเกี่ยวกับพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ (behaviorally test) ด้วยวิธี Morris water maze จากการทดลอง หนูแรทที่ได้รับ ไวน์แดง มี lipid peroxidation น้อยลงและมีระดับ reduced glutathione (GSH) และ antioxidant enzyme activities สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ ผลการทดลอง morris water maze พบว่าหนูแรทที่ได้รับไวน์แดงมีอัตราการเรียนรู้และความจำดีกว่ากลุ่มที่ได้รับแอลกอฮอล์ จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่า ไวน์แดง ซึ่งมีสารจำพวก flavonols เช่น catechins, procyanidins และ polyphenols มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในสมองและมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทส่วน hippocampus จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการบริโภคแอลกอฮอล์ได้

Montilla และคณะ 2006 ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ปกป้องสมองส่วน cerebral cortex และไตที่ถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระ จากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงในหนูแรท โดยใช้หนูแรทอายุ 3 เดือน เหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระด้วยอาหารไขมันสูง (ประกอบด้วยโคเลสเตอรอล 1.65%(w/w)) นาน 4 สัปดาห์ โดยกลุ่มที่รับอาหารไขมันสูง จะได้รับไวน์แดง ขนาด 400 ml/70kg/day (ad libitum) ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ total cholesterol, lipid peroxidation, reduced glutathione (GSH) content, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) และ catalase activities ในสมอง, ไต และในเม็ดเลือด จากผลการทดลองพบว่า หนูแรทที่ได้รับ ไวน์แดง มีอนุมูล-

อิสระในเลือดลดลง นอกจากนี้ยังลดปริมาณ urea, creatinine และ albumin ในปัสสาวะลงได้ ดังนั้น แสดงให้เห็นว่า ไวน์แดงมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องสมองและไต ที่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นจากภาวะไขมันสูงในหนูแรทได้

การศึกษาของ Devi และคณะ 2006 สนับสนุนผลที่ได้ศึกษาในหนูแรทที่อายุมาก (4 เดือน) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่มคือ ได้รับ GSE ความเข้มข้น 25, 50 และ 75 mg/kg/day ให้โดยการกินติดต่อกันเป็นเวลา 9 สัปดาห์ ตรวจวิเคราะห์ปริมาณ superoxide dismutase (SOD), catalase, malondialdehyde (MDA), protein carbonyl content, choline acetyl transferase (ChAT) และ acetylcholine esterase (AChE) ใน brain homogenate ของสมองส่วน cerebral cortex, hippocampus และ cerebellum ผลการทดลองพบว่า GSE ที่ความเข้มข้น 75 mg/kg/day ออกฤทธิ์ได้ดีที่สุด โดยสามารถเพิ่มปริมาณ SOD activity, ChAT activity และลดปริมาณ MDA และ protein carbonyl content ได้ นอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของ ChAT activity ซึ่งบ่งชี้ถึง Ach content ในสมองทั้ง 3 ส่วน ปริมาณ Ach ที่เพิ่มขึ้นในสมองนั้นเป็นการช่วยเพิ่มความสามรถในการเรียนรู้ของหนูแรทที่สูงอายุได้ด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถปกป้องสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex และ cerebellum จากการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระในหนูแรทได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

1. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทเพศผู้พันธุ์วิสตา (Wistar rat) น้ำหนัก 170-200 กรัม จำนวน 40 ตัว ดูแลตามมาตรฐานการดูแลสัตว์ทดลอง ของคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลี้ยงด้วยอาหารพื้นฐานเพื่อปรับสภาพก่อนเริ่มการทดลองให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลาหนึ่งสัปดาห์ แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็นสองตัวต่อหนึ่งกรง ให้น้ำตามต้องการและควบคุมให้อยู่ในสภาวะมืดและสว่าง 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียสตลอดเวลา

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

1. Autopipettes ขนาด 5, 10, 50, 100, 200 และ 1000 μl (Gibson, France)
2. Centrifuge (Beckman Instrument, USA)
3. Cryostat tube (Leica 500 Cryostat, USA)
4. Light microscope (Nikon, Japan)
5. Microplate reader (รุ่น Sunrise, Tecan)
6. Microcentrifuge (รุ่น 210A, Denville)
7. Microtome (Microm HM 335 E, USA)
8. Potter-Elvehjem homogenizer with pestle และ glass homogenizing vessel (Heidolph, Germany)
9. pH meter (Beckman Instrument, USA)
10. Spectrophotometer (Shizumadzu, Japan)
11. Vortex mixer (VM-300. Gemmy industrial)
12. Ultra-low temperature freezer (Forma Scientific Inc., USA)

13. Water bath
14. ชุดเครื่องมือผ่าตัดเล็ก
15. นาฬิกาจับเวลา (Citizen®)
16. เครื่องชั่งละเอียด (รุ่น A 200 S. Satorius)

3. สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง มีดังนี้

bovine serum albumin (BSA), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium citrate, sodium phosphate dibasic anhydrous (Na_2HPO_4), cresyl violet acetate, sodium phosphate monobasic anhydrous ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$), ZnSO_4 , p-aminobenzenesulfonamide, N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride, จัดซื้อจากบริษัท Sigma chemical Co., USA.

sodium nitrite (NaNO_2) และ cadmium bead จากบริษัท Oxford Biomedical Research Co., USA.

Hydrochloric acid (HCl), sodium chloride (NaCl), sodium hydroxide (NaOH) จากบริษัท Merk, Germany

Standard Malondialdehyde (MDA), Trichloroacetic acid (TCA), Thiobarbituric acid (TBA) จากบริษัท Fluka chemic, Japan

Oil Red O stain, Hematoxyline-Eosin stain, glacial acetic acid จากบริษัท C.V.Laboratories Co., LTD, 95% alcohol, xylene จาก LAB-SCAN analytical science, paraplast จาก McCormick Scientific Co., USA

Casein, sucrose, cellulose, cholesterol, mineral mix, vitamin mix, methaionine, choline bitartrate จากบริษัท Fluka chemic, Japan.

4. การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape Seed Extract, GSE)

4.1 วิธีสกัดสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Yamakoshi และคณะ 1999)

นำเมล็ดองุ่นพันธุ์คาร์ดินัล (*Vitis vinifera*, Linn.) ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทสยามไวน์เนอร์ จำกัด (Spy winecooler) เลขที่ 171/1-4 ซอย 78 ถนนวิภาวดี รังสิต ดอนเมือง กรุงเทพฯ 10210 โดยมีขั้นตอนการสกัดเมล็ดองุ่นดังนี้

5. วิธีดำเนินการวิจัย

5.1 สัตว์ทดลอง

ปรับสภาพหนูแรทด้วยอาหารพื้นฐานก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยเลี้ยง 2 ตัวต่อหนึ่งกรง ให้น้ำตามต้องการควบคุมให้อยู่ในสภาวะมืดและสว่าง 12 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 25 ± 1 องศาเซลเซียสตลอดเวลา ชั่งน้ำหนักทุกๆ 3 วันและแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 5 กลุ่มๆละ 8 ตัวดังนี้

กลุ่มที่ I : ได้รับอาหารพื้นฐาน (Normal Diet)

กลุ่มที่ II : ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว

กลุ่มที่ III : ได้รับอาหารไขมันสูงนาน 4 สัปดาห์แล้วเริ่มให้ร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate 100 มล./กก./วัน ในสัปดาห์ที่ 5 (Yamakoshi และคณะ 1999)

กลุ่มที่ IV : ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 0.5%

กลุ่มที่ V : ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 1.0%

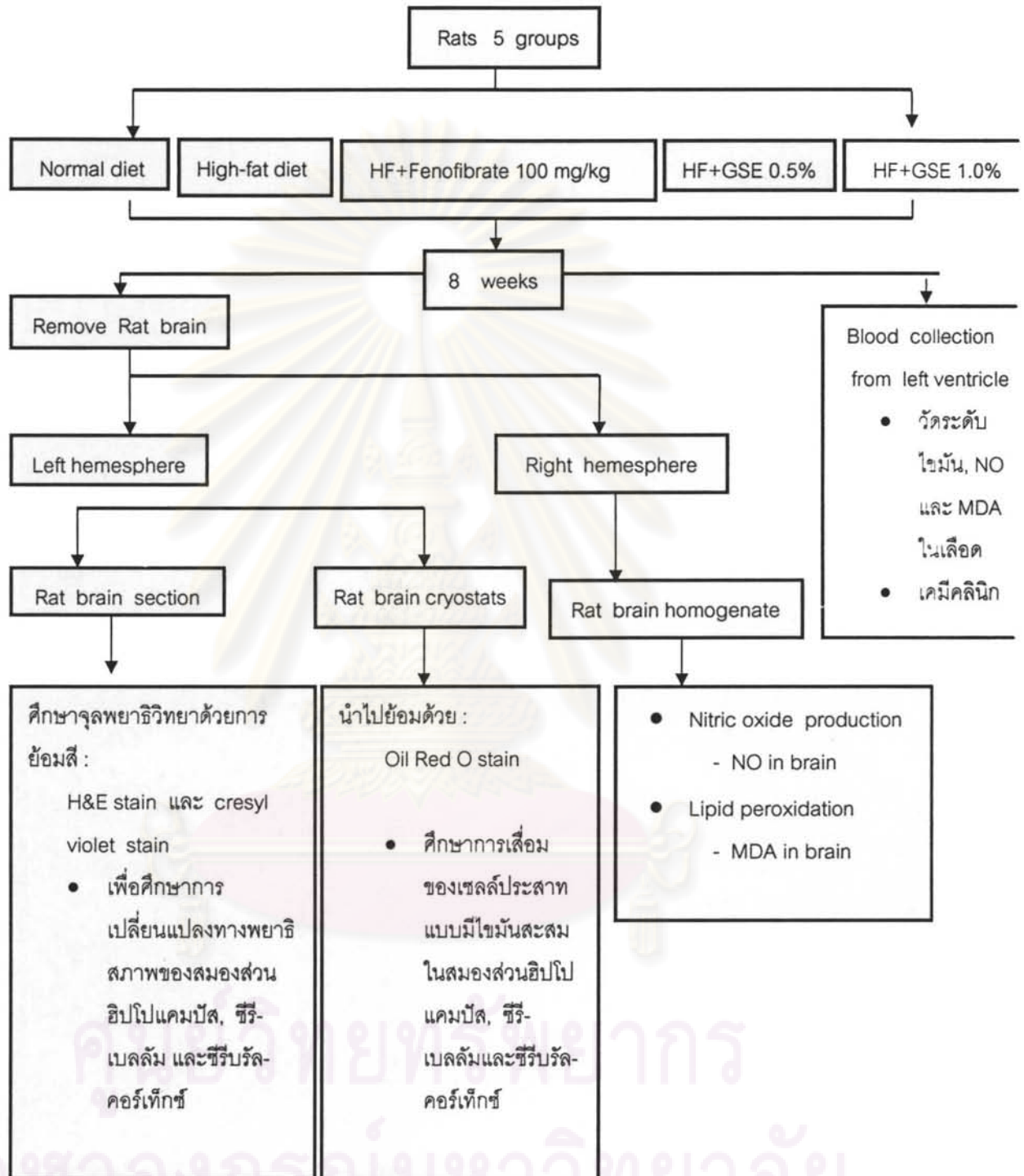
เตรียมอาหารไขมันสูงตามสูตรที่สรุปไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สูตรอาหารปกติและอาหารไขมันสูงของหนูทั้ง 5 กลุ่ม (Dennys E.C.Cintra และคณะ 2006)

ส่วนประกอบ	Normal diet	High Fat diet	High Fat + Fenofibrate	High Fat + GSE 0.5%	High Fat + GSE 1.0%
Casein	15.30	15.30	15.30	15.30	15.30
Sucrose	10.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Constarch	45.26	33.26	33.26	33.26	33.26
Cellulose	5.00	5.00	5.00	5.00	5.00
Lard	-	5.00	5.00	5.00	5.00
Cholesterol	-	1.00	1.00	1.00	1.00
Mineral mix	3.50	3.50	3.50	3.50	3.50
Vitamin mix	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Methionine	0.18	0.18	0.18	0.18	0.18
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
Soybean oil	4.00	10.00	10.00	10.00	10.00
Fenofibrate	-	-	100 mg/kg	-	-
GSE 0.5%	-	-	-	0.5	-
GSE 1.0%	-	-	-	-	1.0

นำอาหารทั้ง 5 สูตรดังกล่าวให้สัตว์ทดลองกินทุกวัน (ซึ่งนำหนักร่อนก่อนและหลังให้อาหารใหม่) โดยเตรียมอาหารใหม่ทุกครั้งก่อนการทดลองเลี้ยงเป็นเวลา 8 สัปดาห์ (2 เดือน) ซึ่งนำหนักร่อนทุก ๆ 3 วันและ คำนวณปริมาณอาหารที่หนูกินทุกวัน เมื่อครบ 8 สัปดาห์แล้วดำเนินการตามแผนงานดังแสดงในรูปที่ 11

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11 แสดงแผนงานการวิจัย

5.2 การทดลองที่ 1 การวิเคราะห์ปริมาณไขมันและค่าทางเคมีคลินิกในเลือด

5.2.1 เก็บเลือดเพื่อวัดปริมาณไขมันในเลือดและค่าทางเคมีคลินิกในเลือด

เจาะเลือดในวันแรก (baseline) และวันที่ครบ 1 เดือนโดยเจาะเลือดที่ปลายหางของหนูทดลอง และในวันที่ครบ 2 เดือน อดอาหารสัตว์ทดลองเป็นเวลา 12 ชั่วโมงก่อนทำให้สลบด้วย pentobarbital sodium ขนาด 60 มล./กก. โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง จากนั้นผ่าเปิดช่องอกเจาะเก็บเลือดที่หัวใจห้องล่างซ้ายเพื่อตรวจวัดปริมาณไขมันและค่าสมรรถนะการทำงานของตับและไต

5.2.2 การตรวจวัดระดับไขมันในเลือดตามวิธีของบริษัท Human Gesellschaft for Biochemica and Diagnostica mbH (Enzymatic colourimetric Test Kits)

5.2.3 การตรวจวัดค่าสมรรถนะการทำงานของตับและไต ตรวจวิเคราะห์โดยห้องปฏิบัติการ ฮา-ราล คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.3 การเตรียมสมองของหนูแรท

5.3.1 นำยาใช้สำหรับการเก็บสมอง

- liquid nitrogen
- 10% neutral buffered formalin
- phosphate buffer saline pH 7.4
- 0.1% Triton X-100 ใน 50 mM phosphate buffer (pH 7.4)
- 50 mM phosphate buffer (pH 7.4) ประกอบด้วย Na_2HPO_4 จำนวน 14.2 กรัม และ $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ จำนวน 26.8 กรัม จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปปรับ pH 7.4 ด้วย NaOH หรือ HCl

5.3.2 ขั้นตอนการเก็บสมอง

5.3.2.1 หลังจากเก็บเลือดแล้ว ทำการผ่าเปิดกะโหลกด้วยชุดเปิดกะโหลกและนำสมองทั้งหมดของหนูทดลองแช่ในน้ำแข็งบดละเอียดแล้วทันที

5.3.2.2 นำสมองทั้งหมดล้างด้วย ice-cold phosphate buffer saline pH 7.4 จากนั้นชั่งน้ำหนักสมอง และแบ่งสมองออกเป็นสองซีก ซีกซ้ายทำการตัดแยกสมองออกเป็น ส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ซีรีเบลลัม (cerebellum) และซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (cerebral cortex) แบ่งชิ้นส่วนสมองดังกล่าว fixed ใน 10% neutral buffered formalin และห่อด้วย aluminium foil แช่แข็งทันทีใน liquid nitrogen หรือเก็บไว้

ที่ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการทดลองต่อไป ส่วนสมองซีกขวาเตรียมเป็น homogenate

5.3.3 วิธีการเตรียม Brain homogenate

นำสมองซีกขวาจากข้อ 5.3.2.2 มาปั่นตามวิธีของ Assuncao และคณะ 2007 โดยมีขั้นตอนดังนี้

5.3.3.1 นำสมองซีกขวามาชั่งน้ำหนัก และจัดบันทึก

5.3.3.2 จากนั้นนำสมองมาบดใน 0.1% TritonX-100 ใน 50 mM phosphate buffer (pH7.4) จำนวน 3 เท่าของน้ำหนักสมองโดยใช้ glass-Teflon homogenizer

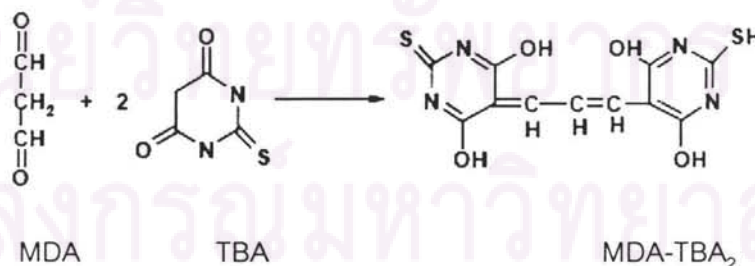
5.3.3.3 บดให้ละเอียดเป็นเวลา 30 วินาทีและนำ homogenate ที่ได้ใส่ใน centrifuge tube

5.3.3.4 จากนั้นปั่นที่ 5,000 g เป็นเวลา 60 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3.3.5 เก็บเฉพาะส่วนใสไว้ใน microtube และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสทันที สำหรับตรวจวิเคราะห์ lipid peroxidation, Nitric oxide (NO) production และ ปริมาณ protein

5.4 การทดลองที่ 2 การวิเคราะห์ Lipid peroxidation ในสมองและในเลือด

วิเคราะห์ lipid peroxidation ในสมองและในเลือดตามวิธีของ Keynes และคณะ 2005 โดย วัด Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น end product ของปฏิกิริยา peroxidation ของไขมัน MDA สามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) ดังแสดงในรูปที่ 12 ข้างล่างเกิดเป็นสารที่มี สีและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร



รูปที่ 12 แสดงปฏิกิริยาการเกิด Malondialdehyde (MDA)

5.4.1 น้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ Lipid peroxidation ในสมองและในเลือด

5.4.1.1 Trichloroacetic acid (TCA) 10% w/v in 0.25 N HCl

- เตรียม 0.25 N HCl จาก HCl เข้มข้น 21 มล. ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 979 มล.
- ชั่ง TCA จำนวน 100 กรัมผสมกับ 0.25 N HCl จำนวน 1000 มล.

5.4.1.2 Thiobabituric acid (TBA) 0.67% w/v in 0.25 N HCl

- เตรียมจากการชั่ง TBA จำนวน 2.01 กรัมผสมกับ 0.25N HCl จำนวน 300 มล.

5.4.2 วิธีการวิเคราะห์ Lipid peroxidation (MDA) (Keynes และคณะ2005)

5.4.2.1 เตรียมหลอดทดลอง 3 หลอด ใช้เป็นหลอดทดลอง 2 หลอดและอีก 1 หลอดใช้เป็น blank

5.4.2.2 เติมน้ำยาในแต่ละหลอด ดังนี้

- ใช้ brain homogenate จำนวน 250 μ l
- เติม Trichloroacetic acid (TCA) 10% w/v in 0.25 N HCl จำนวน 500 μ l

5.4.2.3 นำหลอดทดลองทั้งหมดปั่นด้วยความเร็ว 6,000 g เป็นเวลา 20 วินาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อตกตะกอนโปรตีน

5.4.2.4 ดูดส่วนใส (supernatant) จำนวน 500 μ l

5.4.2.5 เติม 0.67% w/v in 0.25 N HCl Thiobabituric acid (TBA) จำนวน 500 μ l ลงในส่วนใส ข้อ 5.4.2.4

5.4.2.6 ผสมปฏิกิริยาให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer จากนั้นตั้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

5.4.2.7 เมื่อครบเวลา นำหลอดทดลองทั้งหมดวางทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5.4.2.8 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 532 nm

5.4.3 การคำนวณปริมาณ Malondialdehyde (MDA)

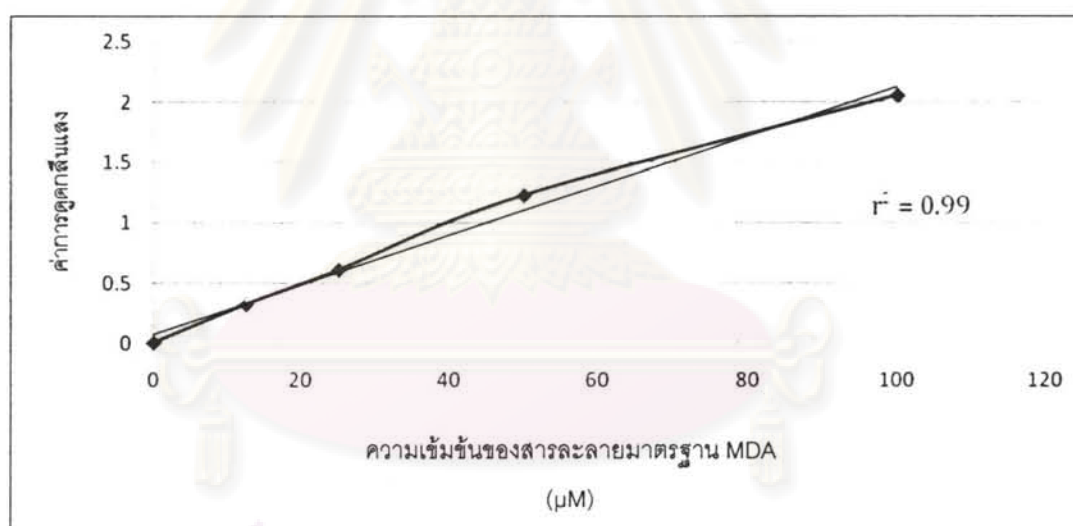
คำนวณหาปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองโดยการนำค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับค่าการดูดกลืนแสง อัตราการเกิดปฏิกิริยาคำนวณจากค่า MDA ของแต่ละตัวในหน่วย μ M และจำนวน brain homogenate protein คำนวณเป็นหน่วย mg รายงานปริมาณ MDA ในสมองในหน่วย μ mole/mg protein และปริมาณ MDA ในเลือดในหน่วย μ mole/ml

$$\begin{aligned} \text{MDA } (\mu\text{mole/mg protein}) &= \text{ปริมาณ MDA } (\mu\text{mole}) / \text{ปริมาณความเข้มข้น protein } (\mu\text{g}) \\ &= \frac{\text{ปริมาณ MDA } (\mu\text{mole})}{\text{ปริมาณความเข้มข้น protein } \times 10^{-3} \text{ (mg)}} \end{aligned}$$

5.4.4 การประเมินวิธีวิเคราะห์ปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ในสมองและในเลือด

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity assay)

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์กระทำได้โดยใช้สารละลายมาตรฐาน MDA 5 ความเข้มข้น คือ 100, 50, 25, 12.5 และ 0 μM ตามลำดับ หาค่า Coefficient of variation (r^2) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ MDA ในสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.99 (ดังแสดงในรูปที่ 13)



รูป 13 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MDA ในสมอง และในเลือดแต่ละจุดบนกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจซ้ำ 2 ครั้ง

5.4.5 วิธีวิเคราะห์ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision assay): Intraday และ Interday

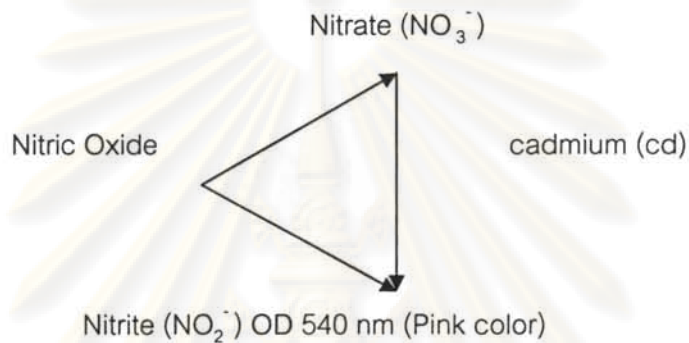
Intraday และ Interday ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณMDAในสมองโดยใช้ brain homogenate จำนวน 250 μ l เปอร์เซ็นต์ CV ของ Intraday precision ในแต่ละวันเท่ากับ 10.126, 13.55, 4.545 และ 2.793 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ CV ของ Interday precision เท่ากับ 7.753 (ตาราง 2)

ตาราง 2 แสดงค่าที่ได้จากการวัดภายในวันเดียวกัน (Intraday) และในแต่ละวัน (Interday) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ MDA ในสมอง

วันที่		วันที่1	วันที่2	วันที่3	วันที่4
ค่าการดูดกลืนแสง	ครั้งที่ 1	0.323	0.357	0.458	0.365
	ครั้งที่ 2	0.342	0.341	0.457	0.243
	ครั้งที่ 3	0.312	0.455	0.408	0.357
	ครั้งที่ 4	0.263	0.365	0.443	0.312
	ครั้งที่ 5	0.341	0.328	0.438	0.513
ค่าเฉลี่ยในวันเดียวกัน		0.316	0.369	0.440	0.358
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		0.032	0.050	0.020	0.010
% CV of intraday precision		10.126	13.55	4.545	2.793
ค่าเฉลี่ยในแต่ละวัน			0.371		
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.028		
% CV of interday precision			7.753		

5.5 การทดลองที่ 3 การวิเคราะห์ปริมาณ Nitric oxide (NO) ในสมองและในเลือด

Nitric oxide สามารถเปลี่ยนเป็น nitrate และ nitrite ได้อย่างรวดเร็ว ทำการวิเคราะห์ปริมาณ nitrite ที่เกิดขึ้นด้วย Griess reagent โดยใช้ metallic cadmium เปลี่ยน nitrate (NO_3^-) ให้เป็น nitrite (NO_2^-) (ดังแสดงในรูปที่ 14) ปริมาณของ nitrite ที่วัดได้เป็นปริมาณของ nitric oxide ที่สร้างขึ้นทั้งหมด



รูปที่ 14 แสดงปฏิกิริยาการเกิด NO

5.5.1 น้ำยาที่ใช้วิเคราะห์ไนตริกออกไซด์ (NO) ในสมองและในเลือด

- ZnSO_4 30% w/v ซึ่ง ZnSO_4 จำนวน 90 กรัม ผสมกับน้ำกลั่น 300 มล.
- 3 N HCl ผสมกรด HCl เข้มข้น จำนวน 62.2 มล.กับน้ำกลั่นจำนวน 187.8 มล.

Griess reagent ประกอบด้วย

- Color reagent I (1% sulfanilamide) เตรียมโดยซึ่ง (1% sulfanilamide) (p-aminobenzenesulfonamide) 1.5 กรัม ผสมกับ 3N HCl จำนวน 150 มล.
- Color reagent II (0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride) เตรียมโดยซึ่ง 0.1% N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 0.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นจำนวน 500 มล.
- 0.1 M HCl เตรียมโดยใช้ 0.1 M HCl เข้มข้น จำนวน 4.0 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 460 มล.
- 0.1 M. NH_4OH เตรียมโดยใช้ NH_4OH เข้มข้น จำนวน 4.59 มล. ผสมกับน้ำกลั่น 495.4 มล.

5.5.2 วิเคราะห์ปริมาณ nitrite (NO_2^-) ตามวิธีของบริษัท Oxford Biomedical Research

5.5.2.1 การเตรียมตัวอย่างสมองโดยการตกตะกอนโปรตีน

- ก. นำ brain homogenate ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง
- ข. ดูดตัวอย่างสมองจำนวน 10 μl เติมลงในน้ำกลั่นปริมาณ 190 μl
- ค. เติม 10 μl ของ (30%w/v) ZnSO_4 solution ผสมให้เข้ากันและ incubate ไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที
- ง. นำไปปั่นที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- จ. เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับตรวจวัดปริมาณ nitrite ต่อไป

5.5.2.1 วิธีการตรวจวัด nitrite

- ก. เตรียม เม็ด Cd^{++} bead ที่ผ่านการล้างและทำให้แห้งแล้ว จำนวน 0.5 กรัม (ด้วยตาชั่ง)
- ข. เติมตัวอย่างที่ผ่านการตกตะกอนโปรตีน 200 μl ใส่ลงใน centrifuge tube ที่มี Cd^{++} bead
- ค. Incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ง. ดูดตัวอย่างที่ผ่านการ incubate แล้วใส่ใน microcentrifuge tube
- จ. ปั่นที่ 3,000 g เป็นเวลา 5 นาที
- ฉ. ทำการตรวจวัด nitrite ภายใน 1 ชั่วโมง (ควรล้างและเก็บ Cd^{++} bead ในน้ำยาสำหรับเก็บ) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้
 - เติมตัวอย่าง 100 μl ใน respective wells (ถ้าตัวอย่างมีความเข้มข้นมากเกินไป ควรเจือจางด้วยน้ำกลั่น)
 - เติม 50 μl color reagent 1 ผสมให้เข้ากัน
 - เติม 50 μl color reagent 2 ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
 - วัดการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

5.5.3 การคำนวณปริมาณ Nitric oxide (NO)

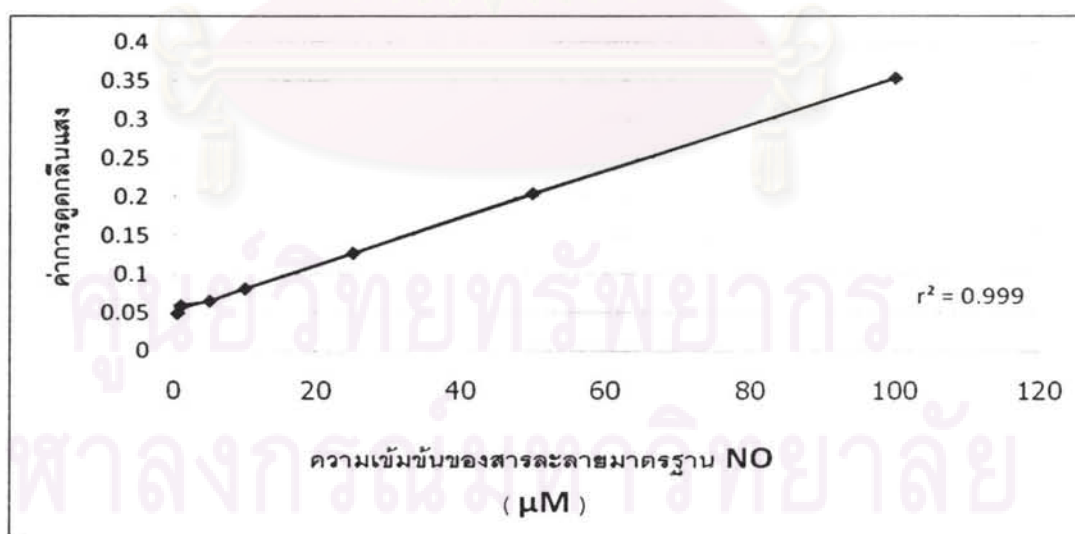
ปริมาณ NO ในเลือดและในสมองสามารถคำนวณโดยใช้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสง อัตราการเกิดปฏิกิริยาคำนวณจากค่า NO ของแต่ละตัวในหน่วย μM และจำนวน brain homogenate protein คำนวณเป็นหน่วย mg รายงานปริมาณ NO ในสมองในหน่วย $\mu\text{mole/mg protein}$ และปริมาณ NO ในเลือดในหน่วย $\mu\text{mole/ml}$

$$\begin{aligned}\text{NO } (\mu\text{mole/mg protein}) &= \text{ปริมาณ NO } (\mu\text{mole}) / \text{ปริมาณความเข้มข้น protein } (\mu\text{g}) \\ &= \frac{\text{ปริมาณ NO } (\mu\text{mole})}{\text{ปริมาณความเข้มข้น protein } \times 10^{-3} \text{ (mg)}}\end{aligned}$$

5.5.4 การประเมินวิธีวิเคราะห์ปริมาณ ไนตริกออกไซด์ (NO) ในสมอง

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity assay)

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของวิธีวิเคราะห์กระทำได้โดยใช้สารละลายมาตรฐาน NaNO_2 7 ความเข้มข้น คือ 100, 50, 25, 10, 5, 1 และ 0.5 μM ตามลำดับ หาค่า Coefficient of variation (r^2) จากกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณ NaNO_2 ในสารละลายมาตรฐานกับค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.99 (ดังแสดงในรูปที่ 15)



รูป 15 แสดงค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (Linearity) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NaNO_2 ในสมอง แต่ละจุดบนกราฟเป็นค่าเฉลี่ยจากการตรวจซ้ำ 2 ครั้ง

5.5.5 วิธีวิเคราะห์ความแม่นยำของวิธีวิเคราะห์ (Precision assay) : Intraday และ Interday

Intraday และ Interday ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NO ในสมองโดยใช้ brain homogenate จำนวน 10 μ l เปรอร์เซ็นต์ CV ของ Intraday precision ในแต่ละวันเท่ากับ 9.77, 7.45, 8.73 และ 7.65 ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์ CV ของ Interday precision เท่ากับ 8.355 (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงค่าที่ได้จากการวัดภายในวันเดียวกัน (Intraday) และในแต่ละวัน (Interday) ของวิธีวิเคราะห์ปริมาณ NO ในสมอง

วันที่		วันที่1	วันที่2	วันที่3	วันที่4
ค่าการดูดกลืนแสง	ครั้งที่ 1	0.306	0.400	0.357	0.373
	ครั้งที่ 2	0.316	0.444	0.351	0.372
	ครั้งที่ 3	0.367	0.402	0.304	0.319
	ครั้งที่ 4	0.367	0.381	0.381	0.375
	ครั้งที่ 5	0.384	0.453	0.382	0.394
ค่าเฉลี่ยในวันเดียวกัน		0.348	0.416	0.355	0.366
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน		0.034	0.031	0.031	0.028
% CV of intraday precision		9.77	7.45	8.73	7.65
ค่าเฉลี่ยในแต่ละวัน			0.371		
ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน			0.031		
% CV of interday precision			8.355		

5.6 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในสมองและในเลือด (protein concentration)

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในสมองและในเลือดทำการวิเคราะห์ตามวิธีของ Lowry et al. (1951)

5.6.1 น้ำยาสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนในสมองและในเลือด

- Na_2CO_3 2% w/v : เตรียมจากชั่ง Na_2CO_3 20 กรัมผสมกับน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มล.
- NaOH 0.5 M : เตรียมจากชั่ง NaOH 20 กรัมผสมกับน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มล.
- sodium citrate 2% w/v: เตรียมจากชั่งsodium citrate 10 กรัมผสมกับน้ำกลั่นให้ครบ ปริมาตร 500 มล.
- cupric sulfate 1% w/v : เตรียมจากชั่ง cupric sulfate 5 กรัมผสมกับน้ำกลั่นให้ครบ ปริมาตร 500 มล.
- BSA 1 มก./มล. ละลายใน NaOH 0.5 M : ชั่ง BSA 0.005 กรัม ผสมกับ 0.5 M NaOH 5 มล.
- Folin & Ciocalteu's phenol reagent
- Working protein reagent : ประกอบด้วย Na_2CO_3 2% w/v, NaOH 0.5 M, 2% sodium citrate w/v และ cupric sulfate 1% w/v ใน อัตราส่วน 100:10:1:1 ตามลำดับ

5.6.2 วิธีการทดลอง

5.6.2.1 เตรียมหลอดทดลองขนาด 16x25 mm (duplicate) สำหรับทดสอบสารละลายมาตรฐาน 7 ความเข้มข้นดังนี้ 0, 100, 150, 200, 250 และ 300 มก. และหลอดทดลองสำหรับตัวอย่าง

5.6.2.2 เติมน้ำยาลงในหลอดทดลองสารละลายมาตรฐาน ดังตาราง

Standard tube	0	50	100	150	200	250	300	มก.
1 มก./มล. BSA	0	50	100	150	200	250	300	μl
0.5 M NaOH	500	450	400	350	300	250	200	μl

ผสมสารละลายให้เข้ากัน จากนั้นเติมน้ำยาดังต่อไปนี้

5.6.2.3 ในหลอดตัวอย่าง เติม 0.5 M NaOH จำนวน 490 μ l และ brain homogenate จำนวน 10 μ l จากนั้นผสมน้ำยาให้เข้ากัน

5.6.2.4 เติม working protein reagent ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 6.5 ml จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที

5.6.2.5 จากนั้นเติม Folin & Ciocalteu's phenol reagent ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด หลอดละ 200 μ l และผสมน้ำยาให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลาอย่างน้อย 30 วินาที

5.6.2.6 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

5.6.2.7 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร

5.6.3 คำนวณปริมาณโปรตีน

5.6.3.1 จากค่าเฉลี่ยค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้น นำมาพลอตกราฟแสดงปริมาณโปรตีน และหา regression line ปริมาณโปรตีน ในตัวอย่างสามารถหาได้โดยการเปรียบเทียบระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (OD) ของตัวอย่างที่วัดได้กับ standard curve

5.6.3.2 ค่าปริมาณโปรตีนที่ได้จาก ข้อ 5.6.3.1 นำมาคำนวณเป็นความเข้มข้นของโปรตีน ในหน่วย mg/ml หรือ μ g/ μ l ซึ่งหมายถึงปริมาณโปรตีนทั้งหมดใน brain homogenate ที่ใช้ในแต่ละปฏิบัติการ

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.7 การทดลองที่ 4 การศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยาด้วยการนับจำนวน dark neuron ในสมอง ส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus ด้วยวิธีดังต่อไปนี้

5.7.1 ประเมินเซลล์ประสาทถูกทำลายด้วยวิธี Hematoxylin-Eosin Stain (H&E stain)

นำสมองซีกซ้ายมาล้าง (rinse) ด้วย PBS (phosphate buffered saline) และทำการตัดแยก (dissection) สมองออกเป็นส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus จากนั้น fixed ด้วย 10% neutral buffered formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผ่านขบวนการเตรียมชิ้นเนื้อด้วยเครื่อง tissue processing และ embedding ใน paraffin ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 4-5 ไมครอน (μm) และย้อมด้วยสี hematoxylin-eosin นำไปวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (light microscope) โดยประเมินเซลล์ประสาทที่มีลักษณะฝ่อเล็กลง (shrunken cell) และติดสีเข้ม (dark neuron) นับจำนวนต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ หากค่าเฉลี่ย และให้ระดับคะแนน (grade) โดยแบ่งเป็น 4 ระดับดังนี้

- 0 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย < 10%
- 1 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 10-15%
- 2 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 15-20%
- 3 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 20%

5.7.1.1 น้ำยาสำหรับการย้อม H and E ประกอบด้วย

- Xylene	จำนวน	1000	มล.
- 95% alcohol	จำนวน	1000	มล.
- absolute alcohol	จำนวน	1000	มล.
- hematoxylene	จำนวน	500	มล.
- eosin	จำนวน	500	มล.

5.7.1.2 วิธีการเตรียมชิ้นเนื้อ (Tissue processing)

นำชิ้นเนื้อที่ผ่านการ fixed และการตรวจวินิจฉัยด้วยตาเปล่า (Gross examination) ไปผ่านขบวนการทางเคมี (processing) เพื่อให้ชิ้นเนื้อนั้นมีความแข็งพอที่จะตัดออกเป็นชิ้นบางๆ ได้ง่ายและสะดวกยิ่งขึ้น ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อประกอบด้วย

ก. ขบวนการดึงน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (Dehydration)

เป็นการทำให้ชิ้นเนื้อปราศจากน้ำและของเหลวต่างๆโดยการใช้แอลกอฮอล์ที่มีคุณสมบัติในการดึงน้ำและของเหลวออกจากชิ้นเนื้อ ขณะเดียวกันตัวมันเองสามารถเข้าไปแทนที่ในชิ้นเนื้อนั้นได้ น้ำยาที่ใช้คือแอลกอฮอล์ (absolute alcohol) แช่ไว้นาน 2 ชั่วโมง

ข. ขบวนการ clearing

น้ำยาที่ใช้ คือ xylene ซึ่งมีคุณสมบัติดึงแอลกอฮอล์ออกจากชิ้นเนื้อและยังสามารถเข้าไปแทนที่ แอลกอฮอล์ได้ พร้อมกับเป็นสื่อให้นำสาร embedding medium แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อได้อย่างดีตลอดทั่วชิ้นเนื้อ แช่ไว้นาน 2 ชั่วโมง

ค. ขบวนการ Infiltration

ทำโดยการใช้ paraplant (embedding medium) ซึ่งต้องอยู่ในรูป liquid wax แทรกซึมเข้าไปในชิ้นเนื้อ พร้อมกับช่วยพยุงโครงสร้างต่างๆของชิ้นเนื้อให้คงความแข็งแรงไว้ แช่ชิ้นเนื้อไว้ 2 ชั่วโมง

ง. ขบวนการขึ้นบล็อก (Embedding)

นำชิ้นเนื้อที่ได้ฝังลงใน liquid wax medium (paraplant) ซึ่งบรรจุอยู่ในแบบ (molds) ที่มีขนาดต่างๆตามขนาดของชิ้นเนื้อนั้น และเมื่อ paraplant แข็งตัว ก็จะช่วยพยุงชิ้นเนื้อไว้ในลักษณะที่จะทำให้การตัดชิ้นเนื้อบางประมาณ 3-5 ไมครอนได้

จ. การตัดบาง (Sectioning)

ทำการตัดชิ้นเนื้อออกเป็นแผ่นบางๆด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome) มีความหนา 3-5 ไมครอน

5.7.1.3 การย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธี Hematoxyline & Eosin

เพื่อเป็นการแยกส่วนประกอบต่างๆของเซลล์เนื้อเยื่อ (Tissue structure) โดยอาศัยปฏิกิริยาทางเคมี มีขั้นตอนดังนี้

- ก. จุ่มน้ำยา xylene 2 ครั้งๆละ 3 นาที
- ข. จุ่มน้ำยา absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 1-2 นาที
- ค. จุ่มน้ำยา 95% alcohol 2 ครั้งๆละ 1-2 นาที
- ง. ผ่านน้ำ (Tap water) 1-2 นาที
- จ. ย้อมด้วยสี hematoxyline 5-10 นาที และผ่านน้ำ 1-2 นาที
- ฉ. จุ่มใน bluing solution ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นด่างทำให้สไลด์มีสีน้ำเงิน 1-2 วินาที

- ข. ผ่านน้ำ 2 นาทีและย้อมด้วยสี Eosin 1-2 นาที
- ช. จุ่มน้ำยา 95% alcohol 2 ครั้งๆละ 30 วินาที
- ฉ. จุ่มน้ำยา absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 30 วินาที
- ญ. จุ่มน้ำยา xylene 2 ครั้งๆละ 1 นาทีและเคลือบแผ่นสไลด์ด้วย mounting medium

5.7.2 การประเมินเซลล์ประสาทถูกทำลายด้วยการย้อม cresyl violet stain

เพื่อแยกเซลล์ประสาท(neuron) ที่ถูกทำลาย ในชิ้นเนื้อสมองออกจากเซลล์ประสาทปกติ โดยมีหลักการ เซลล์ประสาทประกอบด้วยส่วนประกอบที่เรียกว่า Nissl substance ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่พบได้ใน rough endoplasmic reticulum สามารถพบจำนวน รูปร่าง และการกระจายตัวได้แตกต่างกันในเซลล์ประสาทแต่ละชนิด Nissl substance มีคุณสมบัติเป็นต่างซึ่งสามารถย้อมติดสีได้ดีในสีที่เป็นกรด และสามารถพบได้เมื่อสมองถูกทำลาย โดยประเมินเซลล์ประสาทที่มีลักษณะฝ่อเล็กลง (shrunken cell) และติดสีฟ้าเข้ม (dark neuron) นับจำนวนต่อหนึ่งหน่วยพื้นที่ หาค่าเฉลี่ย และให้ระดับคะแนน (grade) โดยแบ่งเป็น 4 ระดับดังนี้

- 0 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย < 5%
- 1 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 6-10%
- 2 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 11-15%
- 3 = เซลล์ประสาทถูกทำลาย > 15%

5.7.2.1 น้ำยาสำหรับการย้อม Cresyl violet ประกอบด้วย

- Cresyl violet solution: เตรียมโดยชั่งผงสี Cresyl violet 0.5 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นที่อุ่นจำนวน 100 มล.จากนั้นเติม absolute alcohol จำนวน 20 มล.ผสมให้เข้ากัน และเก็บในภาชนะป้องกันแสง
- Working reagent : เตรียมโดยนำ stock cresyl violet จำนวน 45 มล.และเติม acetic acid จำนวน 15 หยด ผสมให้เข้ากันและควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง

5.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

- 5.9.1 ผลจากการทดลองต่างๆจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean±standard error of mean) ซึ่งมีจำนวน $n=8$
- 5.9.2 วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทางสถิติโดยวิธี One-way analysis of variance (ANOVA) ทดสอบด้วย Least Significant Difference (LSD) โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์

4.1 ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อ นน.สมอง(กรัม), นน.ตัว (กรัม) และ นน.สมอง/นน.ตัว(มิลลิกรัม) ในหนูแรท

จากการทดลองพบว่า หนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงนาน 8 สัปดาห์ มีผลทำให้ค่าเฉลี่ยของ นน.ตัว, นน.สมอง และนน.สมอง/นน.ตัว (มิลลิกรัม) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน (ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 17) การได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate 100 มก./กก./วัน และได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE 0.5% และ 1.0% ตามลำดับ มีผลลดนน.สมอง, นน.ตัว และ นน.สมอง/นน.ตัวในหนูแรทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แสดงดังตารางที่ 4) โดยที่ GSE ความเข้มข้น 0.5%และ1.0% ไม่ให้ผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการได้รับ GSE ไม่มีผลทำให้น้ำหนักสมอง/น้ำหนักตัว เพิ่มขึ้น

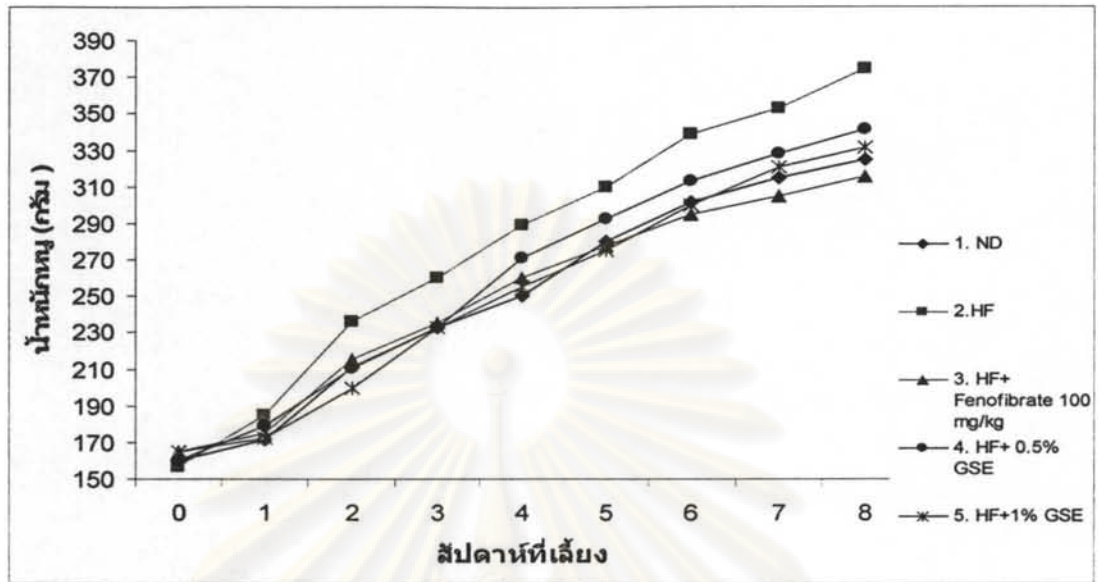
ตารางที่ 4 แสดงผลของอาหารไขมันสูงและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อ นน.สมอง (กรัม), นน.ตัว (กรัม) และ นน.สมอง/นน.ตัว (มิลลิกรัม) ในหนูแรท เมื่อครบกำหนด 8 สัปดาห์

กลุ่มการทดลอง	นน.ตัวก่อนทดลอง(กรัม)	นน.ตัวที่ 8 สัปดาห์ (กรัม)	นน.สมอง (กรัม)	นน.สมอง/นน.ตัว
ND	160±0.25	249±60.66	1.91±0.084	5.85×10 ⁻³ ±0.26
HF	157±0.28	279±75.14**	2.81±0.280**	7.51×10 ⁻³ ±0.73**
HF+fenofibrate	165±0.37	249±55.28**	1.99±0.150**	6.23×10 ⁻³ ±0.73**
HF+GSE0.5%	160±0.45	258±66.01**	2.02±0.078**	5.78×10 ⁻³ ±0.23**
HF+GSE1.0%	165±0.77	250±61.90**	1.96±0.063**	5.96×10 ⁻³ ±0.18**

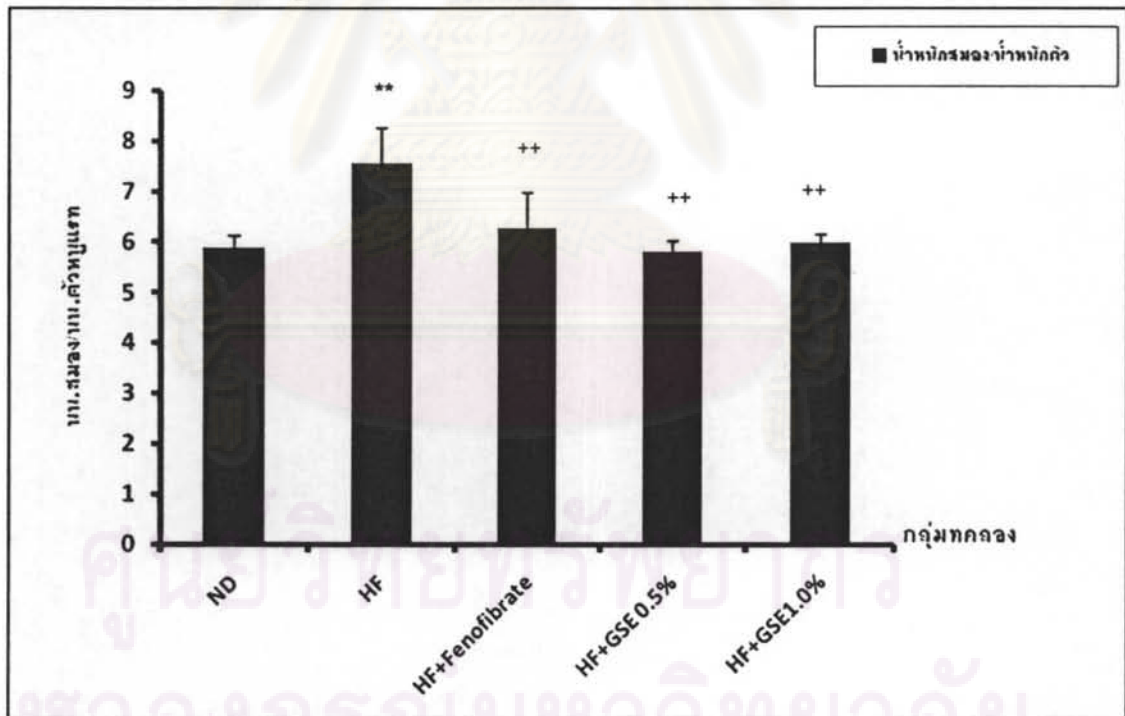
ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n=8)

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง



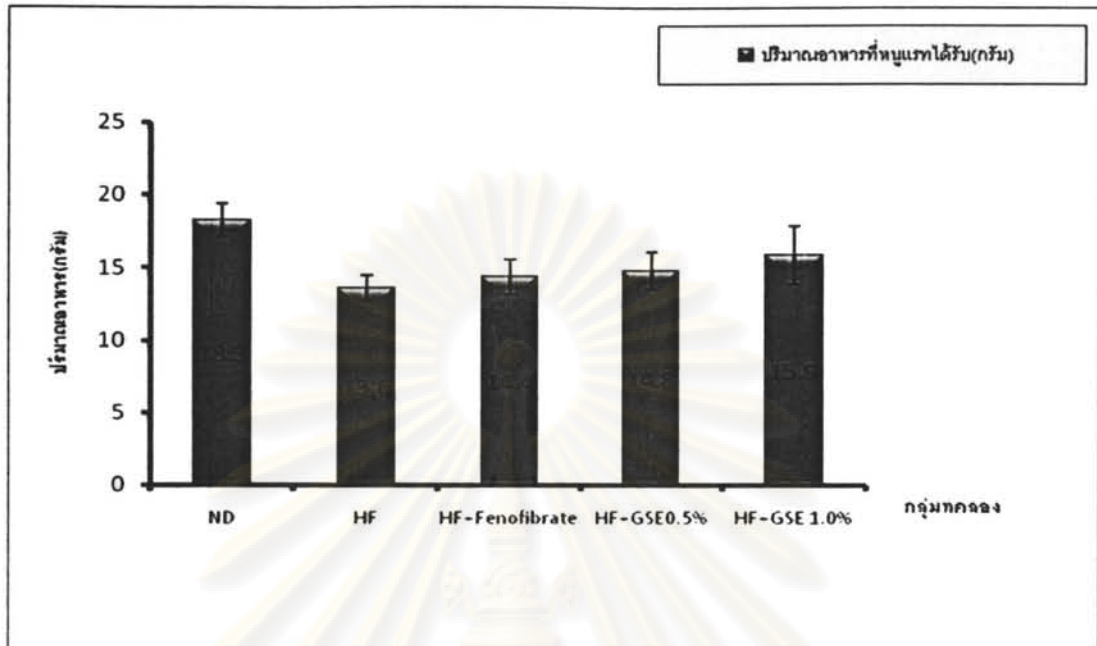
รูปที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวหนูแรททั้ง 5 กลุ่มเมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n= 8)



รูป 17 แสดงน้ำหนักรวมของน้ำอสุจิ (x10³) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่มเมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n= 8)

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง



รูป 18 แสดงปริมาณอาหารที่ได้รับ (กรัม) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่มเมื่อครบระยะเวลา 8 สัปดาห์ ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM (n= 8)

4.2 ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อระดับไขมันในเลือด

จากผลการทดลองพบว่า ใน 4 สัปดาห์แรก อาหารไขมันสูงทำให้หนูแรทอยู่ในสภาวะไขมันในเลือดสูงและระดับยังคงสูงขึ้นไปอีกเท่าตัวเมื่อครบกำหนด 8 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 5.1 และตารางที่ 5.2 โดยที่ค่า total-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol และ LDL-cholesterol ในเลือดหนูแรทมีค่าเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน หนูแรทที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% มีระดับ total-cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol และ LDL-cholesterol (mg/dl) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (แสดงดังรูปที่ 19 a,b,c,d) ตามลำดับ โดยที่ GSE ความเข้มข้น 1.0% ทำให้ระดับไขมันในเลือดลดลงได้ดีกว่า GSE ความเข้มข้น 0.5% ($p < 0.01$) การได้รับ fenofibrate เพื่อการรักษาในสัปดาห์ที่ 4 ช่วยควบคุมให้ระดับไขมันในเลือดไม่เพิ่มขึ้นมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อสิ้นสุดในสัปดาห์ที่ 8 การได้รับ GSE 0.5% และ 1.0% ร่วมด้วยตั้งแต่สัปดาห์แรก ช่วยควบคุมให้ไขมันในเลือดไม่สูงเท่ากับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามทั้ง GSE และ fenofibrate ไม่มีผลทำให้ระดับไขมันที่สูงขึ้นลดลงเท่าระดับปกติ

ตารางที่ 5.1 ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อระดับ Total-cholesterol และ Triglyceride (mg/dl) ในเลือดของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

กลุ่มการทดลอง	ปริมาณ Total-cholesterol			ปริมาณ Triglyceride		
	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks
ND	88.57±7.26	91.45±6.32	91.29±3.37	122.48±11.09	127.15±7.65	125.24±3.67
HF	87.79±5.15	222.50±4.4 ^{**}	482.86±23.12 ^{**}	123.15±2.99	238.52±5.54 ^{**}	546.42±18.92 ^{**}
HF+fenofibrate	86.13±2.69	223.05±2.45	220.92±2.22 ^{**}	125.29±1.79	236.80±6.35	203.81±2.69 ^{**}
HF+GSE0.5%	87.52±1.42	205.37±3.11 ^{**}	232.25±4.73 ^{**}	125.61±2.66	224.20±6.56 ⁺	233.28±2.45 ^{**}
HF+GSE1.0%	86.52±4.05	188.03±1.76 ^{**}	192.23±1.82 ^{**}	124.59±2.79	190.17±17.32 ^{**}	205.02±2.23 ^{**}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8)

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

⁺ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง



ต้นฉบับไม่มีหน้า 55 - 57

NO PAGE 55 - 57 IN ORIGINAL

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 ผลของการให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นร่วมกับอาหารไขมันสูงต่อการทำงานของตับและไต

ตารางที่ 6 แสดงค่าทางเคมีคลินิกที่บ่งบอกถึงภาวะการทำงานของตับและไต โดยพบว่าหนูแรกกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีระดับ BUN และ CRE ในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับ SGOT, SGPT และ ALP เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ส่วนกลุ่มที่ได้รับ HF+fenofibrate มีระดับ BUN, CRE, SGOT, SGPT และ ALP เพิ่มสูงขึ้นมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงและกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ส่วนหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% มีระดับ BUN, CRE, SGOT, SGPT และ ALP แตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับ HF+fenofibrate โดยที่ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นมีผลทำให้ค่าทางเคมีคลินิกต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ HF+fenofibrate อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ แต่ยังคงมีระดับสูงกว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

ตารางที่ 6 แสดงผลของ GSE ต่อค่าทางเคมีคลินิกที่บ่งบอกถึงภาวะการทำงานของตับและไต

กลุ่ม	BUN	Creatinine	SGOT	SGPT	ALP
1. ND	22.63±4.17	0.8±0.07	73.3±15.45	19.6±4.9	66.75±19.4
2. HF	19.9±8.2	1.04±0.36	166±130.6 [*]	79.5±78.5 [*]	138.3±53 [*]
3. HF+ Fenofibrate	46.9±17.07 ^{***}	2.52±0.95 ^{**}	254.9±104.6 ^{**}	102±92.4 ^{**}	596.1±354.8 ^{***}
4. HF+ GSE0.5%	32.8±9.52 ^{†*}	1.7±0.63 ^{†*}	180.8±111.8 ^{†*}	95.1±75.7 ^{†*}	246.3±151 ^{†**}
5. HF+ GSE1.0%	37.9±5.2 ^{†*}	1.9±0.42 ^{†*}	171.9±39.13 ^{†*}	72.9±19.5 [†]	261.2±239.6 ^{†**}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ±SEM (n = 8)

- ^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน
- [†] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
- ^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
- [†] $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HF+fenofibrate
- ^{††} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ HF+fenofibrate

4.4 ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อ Lipid peroxidation ในสมองและในเลือด

4.4.1 ผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และ MDA (umol/mg protein) ในสมองของหนูแรท

จากตารางที่ 7 และรูปที่ 19 แสดงให้เห็นว่าการได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีผลทำให้ระดับ NO และ MDA ในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน และเมื่อได้รับยาลดไขมัน fenofibrate ร่วมกับอาหารไขมันสูงพบว่า fenofibrate สามารถลดระดับ NO และ MDA ในสมองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง และการให้ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ร่วมกับอาหารไขมันสูง มีผลทำให้ระดับ NO และ MDA ในสมองลดลงอย่างมาก ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง โดยที่การลดระดับ NO และ MDA ในสมองของ fenofibrate และ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่าหนูแรทกลุ่มที่ได้รับ GSE ความเข้มข้น 1.0% มีระดับ NO ในสมองต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับ GSE ความเข้มข้น 0.5% ($p < 0.05$)

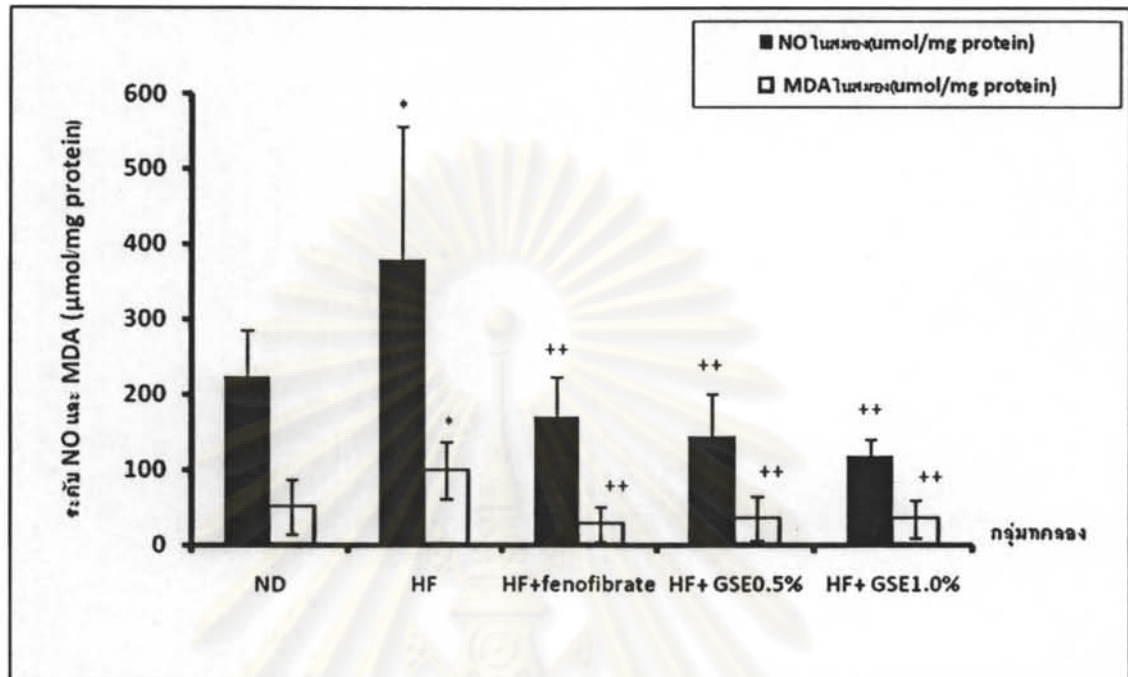
ตารางที่ 7 แสดงผลของ GSE มีต่อปริมาณ NO และ MDA ในสมองหนูแรท (umol/mg protein)

กลุ่มทดลอง	NO ในสมอง (umol/mg protein)	MDA ในสมอง (umol/mg protein)
ND	221.6±63.40	49.9±36.28
HF	378.7±176.50 [*]	98.5±37.70 [*]
HF+fenofibrate	168.3±54.30 ^{**}	26.43±23.20 ^{**}
HF+ GSE0.5%	142.9±57.70 ^{**}	34.4±30.00 ^{**}
HF+ GSE1.0%	117.8±21.09 ^{**}	33.3±25.52 ^{**}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8)

^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง



รูป 20 แสดงผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และ MDA (umol/mg protein) ในสมองของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8)

* $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4.2 ผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และMDA (umol/ml) ในเลือดของหนูแรท

จากผลการทดลองพบว่า การได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีผลทำให้ระดับ NO ในเลือดลดลง และระดับMDA ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน และเมื่อได้รับยาลดไขมัน fenofibrate ร่วมกับอาหารไขมันสูงพบว่าระดับ NO เพิ่มขึ้นและระดับ MDA ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง หนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% มีระดับ NO ในเลือดเพิ่มขึ้นและระดับ MDA ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ และ $p < 0.05$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตาม GSE ที่ความเข้มข้น 0.5% ทำให้ระดับ NO ในเลือดเพิ่มขึ้นได้น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับยาลดไขมัน fenofibrate ($p < 0.05$) นอกจากนี้ GSE ความเข้มข้น 1.0% ทำให้ระดับ NO เพิ่มขึ้น และระดับ MDA ในเลือดลดลงได้ใกล้เคียงกับกลุ่มอาหารพื้นฐาน (แสดงดังตารางที่ 8 และรูปที่ 20)

ตารางที่ 8 แสดงผลของ GSE มีต่อปริมาณ NO และ MDA (umol/ml) ในเลือดของหนูแรท

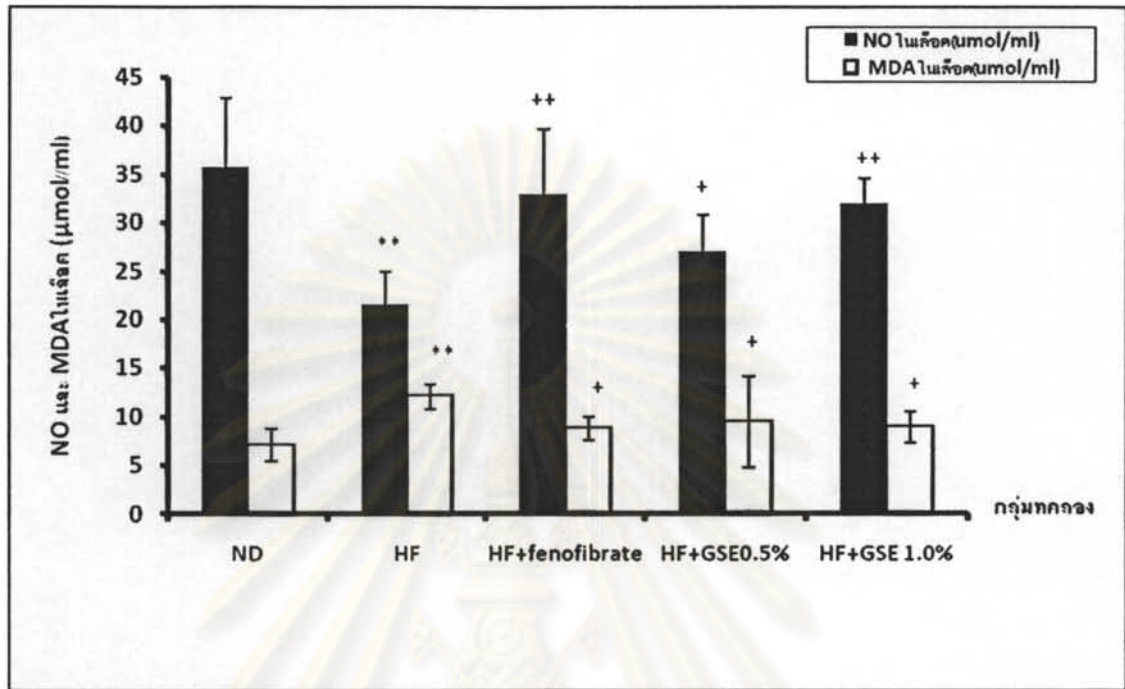
กลุ่มทดลอง	NO ในเลือด(umol/ml)	MDA ในเลือด(umol/ml)
ND	35.6±7.23	7.07±1.63
HF	21.49±3.43 ^{**}	12.06±1.23 ^{**}
HF+fenofibrate	32.87±6.80 ^{**}	8.75±1.21 [*]
HF+GSE0.5%	26.9±3.86 [*]	9.41±4.72 [*]
HF+GSE 1.0%	31.9±2.67 ^{**}	8.93±1.61 [*]

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8)

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง



รูป 21 แสดงผลของ GSE ที่มีต่อปริมาณ NO และ MDA ในเลือดของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM (n = 8)

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

+ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

** $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus ในหนูแรทที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

4.5.1 ผลของ GSE ที่ให้ร่วมกับอาหารไขมันสูงที่มีผลต่อพยาธิสภาพของเซลล์ประสาท (dark neuron) ด้วยวิธีการย้อม H&E และ Cresyl violet

ผลของ GSE ต่อจำนวนการตายของเซลล์ประสาทด้วยการย้อม H&E และ Cresyl violet เมื่อพิจารณาลักษณะของเซลล์ประสาทที่ติดสีเข้ม (dark staining) และมีการฝ่อเล็กน้อย (shrunken) ของเซลล์ประสาท พบว่าการได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีผลทำให้จำนวน dark neuron ในสมองทั้ง 3 ส่วนเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน (HF+fenofibrate) มีจำนวน dark neuron ในสมองทั้ง 3 ส่วนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง แต่ไม่มีความแตกต่างกันของจำนวน dark neuron ในสมองส่วน cerebellum เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานและกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง พบว่าหนูแรทกลุ่มที่ได้รับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ร่วมกับอาหารไขมันสูง มีจำนวน dark neuron ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง ($p < 0.05$) โดยที่จำนวน dark neuron ลดลงได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน (แสดงดังตารางที่ 9 และรูปที่ 21) เมื่อศึกษาผลของ GSE ต่อจำนวนการตายของเซลล์ประสาทด้วยการให้คะแนน (grade) จากการย้อมทั้ง 2 วิธีพบว่าให้ผลไปในแนวทางเดียวกันคือ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นสามารถลดคะแนนการเกิด dark neuron ในสมองทั้ง 3 ส่วนได้ (แสดงดังตารางที่ 10) โดยที่ผลของ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นสามารถลดการเกิด dark neuron ได้ไม่มีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$)

และเมื่อเปรียบเทียบการย้อมทั้ง 2 วิธีพบว่า การย้อมด้วย H&E เป็นวิธีการศึกษารูปร่างลักษณะ และส่วนประกอบโดยทั่วไปของเซลล์ประสาท ส่วนการย้อมด้วย Cresyl violet เป็นวิธีการย้อมแบบพิเศษเพื่อศึกษาการเกิดสารประกอบ Nissl substance ซึ่งใช้บ่งบอกการตายของเซลล์ประสาทได้ ดังนั้นการย้อมทั้ง 2 วิธีจึงนำมาเพื่อศึกษาการตายของเซลล์ประสาท และเมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้ พบว่าทั้งจำนวนการเกิด dark neurons และระดับคะแนน (grade) ในสมองทั้ง 3 ส่วน ให้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน โดยสามารถใช้การย้อม Cresyl violet เป็นการศึกษายืนยันวิธี H&E ได้

ตารางที่ 9 แสดงผลของ GSE ต่อจำนวนการตายของเซลล์ประสาท (dark neuron) ด้วยการย้อม H&E และ Cresyl violet

พื้นที่สมอง	Cerebral cortex		Cerebellum		Hippocampus	
	H&E	Cresyl violet	H&E	Cresyl violet	H&E	Cresyl violet
ND	5.50± 1.97	5.40±1.67	9.61±1.46	8.75±1.28	9.61±1.68	8.40±3.92
HF	13.60±6.86 ^{**}	13.70±6.24 ^{**}	11.90±1.80 [*]	10.50±1.74 ^{**}	18.40±4.15 ^{**}	13.10±7.06 ^{**}
HF+Fenofibrate	8.90±3.13 [*]	5.60±1.45 ^{**}	10.80±1.35	8.12±1.39 ^{**}	7.70±3.92 [*]	3.40±1.58 ^{**}
HF+GSE 0.5%	7.70±3.22 [*]	6.10±2.13 ^{**}	9.08±0.56 ^{**}	8.10±2.08 ^{**}	7.70±4.31 ^{**}	9.10±6.07 ^{**}
HF+GSE1.0%	6.20±2.08 ^{**}	4.70±1.46 ^{**}	8.30±1.0 ^{**}	7.50±2.56 ^{**}	8.10±2.07 [*]	6.30±2.46 ^{**}

ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8)

^{*} $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน

⁺ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

^{**} $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงผลของ GSE ต่อการปกป้องการทำลายของเซลล์ประสาท แสดงเป็นคะแนน (grade) 4 ระดับ

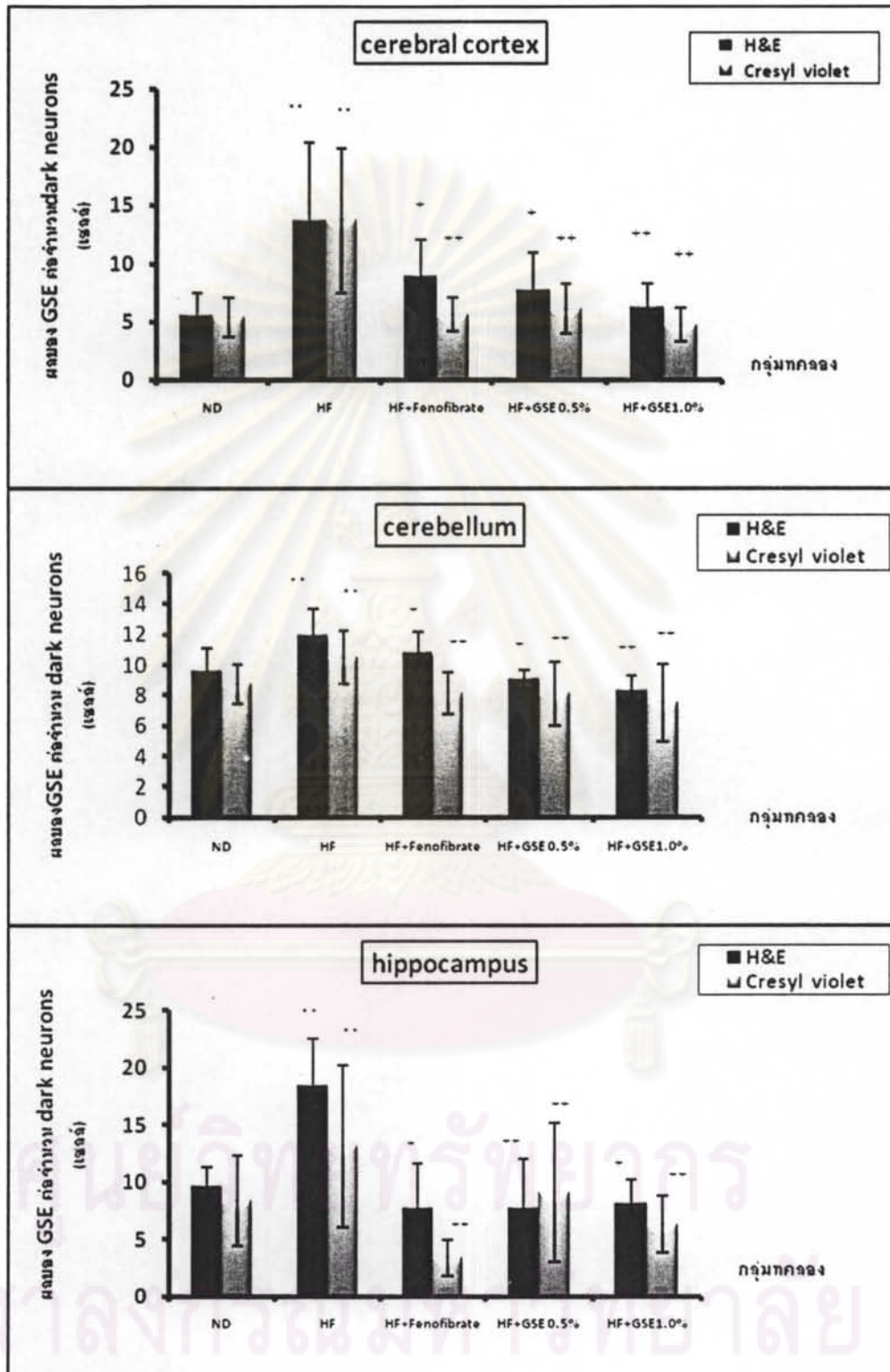
พื้นที่สมอง	Cerebral cortex		Cerebellum		Hippocampus	
	H&E	Cresyl violet	H&E	Cresyl violet	H&E	Cresyl violet
ND	0	0	1+	1+	0	1+
HF	3+	2+	2+	3+	3+	3+
HF+Fenofibrate	1+	0	2+	1+	2+	0
HF+GSE 0.5%	1+	1+	1+	1+	2+	1+
HF+GSE1.0%	1+	0	1+	1+	1+	1+

การให้คะแนน (grade) สำหรับวิธี H&E stain 4 ระดับ

- 0 = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย < 10%
- 1+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 10-15%
- 2+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 15-20%
- 3+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 20 %

การให้คะแนน (grade) สำหรับวิธี Cresyl violet stain 4 ระดับ

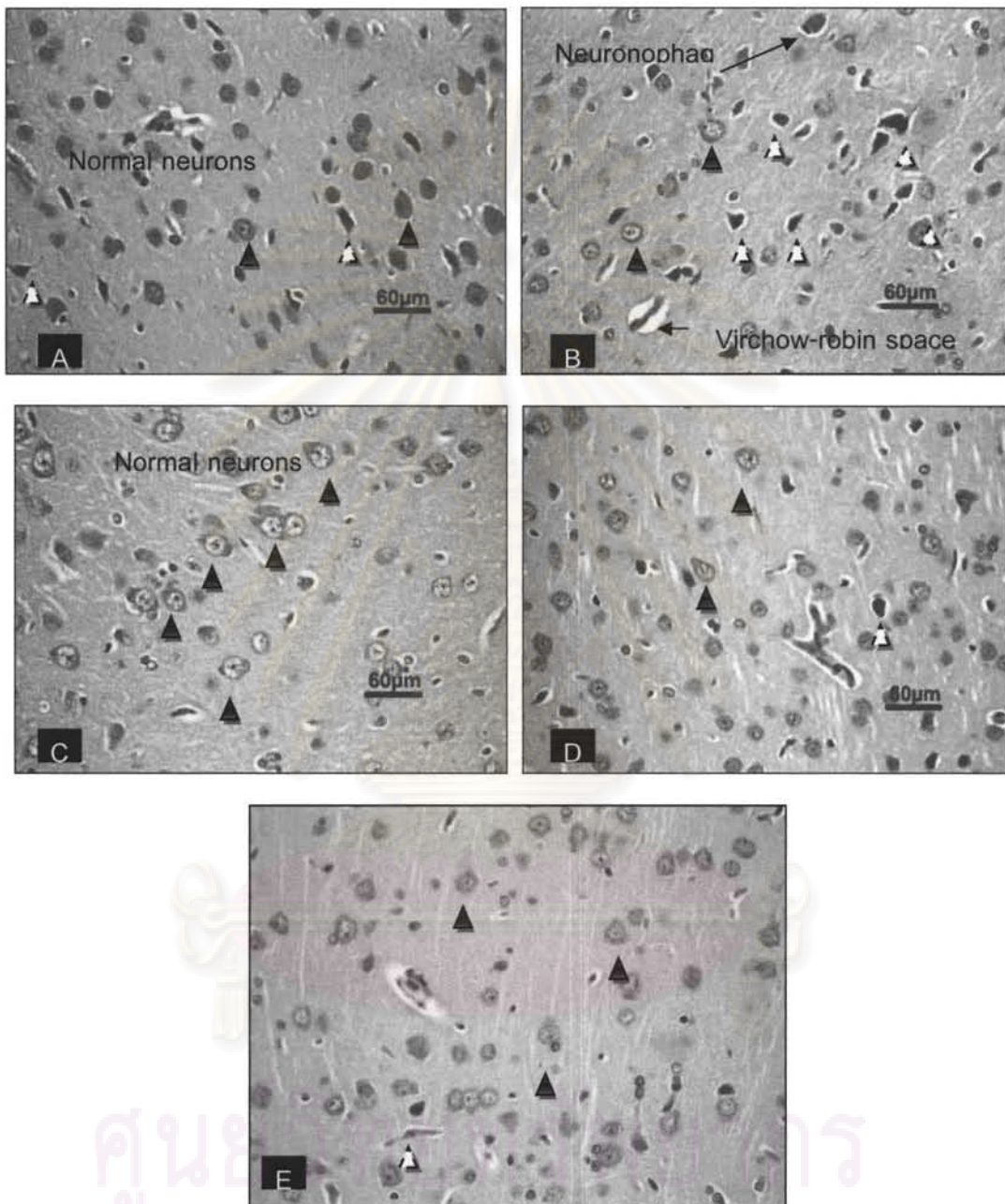
- 0 = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย < 5%
- 1+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 5-10%
- 2+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 10-15%
- 3+ = พบเซลล์ประสาทถูกทำลาย > 15 %



รูป 22 ผลของ GSE ที่ให้ร่วมกับอาหารไขมันสูงที่มีผลต่อพยาธิสภาพของเซลล์ประสาท (dark neuron) ด้วยวิธีการย้อม H&E และ Cresyl violet ในหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม ข้อมูลแสดงเป็นค่าเฉลี่ย±SEM (n = 8) $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

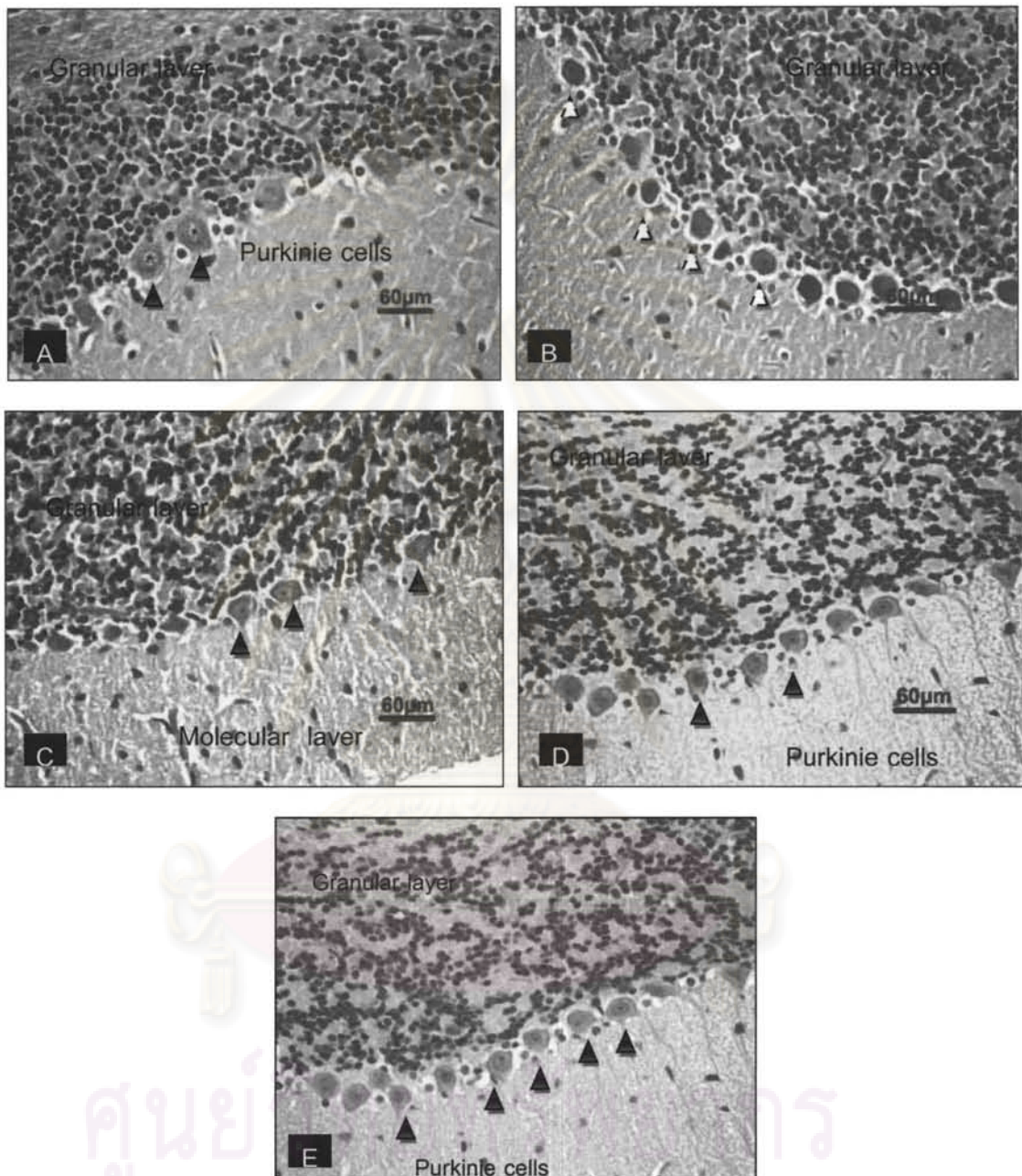
ภาพที่ 23-28 แสดงผลทางพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาท (neurons) สมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus ของหนูแรททุกกลุ่ม พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน เซลล์ประสาทของสมองทั้ง 3 ส่วนมีส่วนประกอบของเซลล์ประสาทสมบูรณ์ที่สุด มีลักษณะเซลล์ (cell bodies) กลม ขนาดใหญ่ ติดสีชมพูอมม่วงส่วนของ nucleolus ติดสีเข้มจากการย้อมด้วย H&E หรือติดสีน้ำเงินอมม่วงจางๆรอบตัวเซลล์จากการย้อมด้วย cresyl violet ไม่พบการอักเสบ (inflammation) ไม่พบเซลล์บวม (cell swollen) และสามารถมองเห็นนิวเคลียสได้อย่างชัดเจนจัดอยู่ในระดับคะแนน (grade) 0 โดยพบการทำลายของเซลล์ประสาทร้อยกว่า 10% ย้อมด้วย H&E หรือ น้อยกว่า 5% ย้อมด้วย cresyl violet (แสดงดังรูปที่ 23-28A) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (high fat-diet) พบว่า มีผลเพิ่มการทำลายเซลล์ประสาท (dark neurons) ในสมองทั้ง 3 ส่วน โดยพบการติดสีย้อม H&E เข้มขึ้น (dark staining) พบการฝ่อ เล็กของ (shrunken cells) ของตัวเซลล์ประสาท ในบางเซลล์อาจพบการหดตัว (pyknotic nuclei) ของนิวเคลียสร่วมด้วยจากการย้อม H&E นอกจากนี้ พบการติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้มขึ้นในส่วนของไซโทพลาสซึม (cytoplasm) หรือพบทั่วทั้งตัวเซลล์ประสาทด้วยวิธีการย้อม cresyl violet ซึ่งแสดงถึงการย้อมติดส่วนของ Nissl substance เข้มขึ้นจัดอยู่ในระดับคะแนน +3 โดยพบการทำลายของเซลล์ประสาทมากกว่า 20% ย้อมด้วย H&E หรือ มากกว่า 15% ย้อมด้วย cresyl violet (แสดงดังรูปที่ 23-28B) ตามลำดับ และจากรูปกลุ่มที่ได้รับยาลดไขมัน fenofibrate 100 มก./กก./วัน มีลักษณะของเซลล์ประสาทใกล้เคียงกับควบคุมที่ได้รับอาหารพื้นฐาน แต่จะมีการทำลายของเซลล์ประสาทบ้างเล็กน้อย จัดอยู่ในระดับคะแนน (grade) +1 โดยพบการทำลายของเซลล์ประสาท 10-15% ย้อมด้วย H&E หรือ 5-10% ย้อมด้วย cresyl violet (แสดงดังรูปที่ 23-28C) ตามลำดับ ส่วนลักษณะของเซลล์ประสาทในกลุ่มที่ได้รับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ร่วมกับอาหารไขมันสูง (แสดงดังรูปที่ 23-28D,E) ตามลำดับ พบว่ามีลักษณะของเซลล์ประสาทใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับยาลดไขมันและกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน แต่จะมีการทำลายของเซลล์ประสาท (dark neurons) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับยาลดไขมัน fenofibrate ถ้ามีการทำลายของเซลล์ประสาท 15-20% ย้อมด้วย H&E หรือ 10-15% ย้อมด้วย cresyl violet จัดอยู่ในระดับคะแนน +2 ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นมีจำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายไม่แตกต่างกันและเกิดน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

CEREBRAL CORTEX ย้อมด้วยวิธี H&E



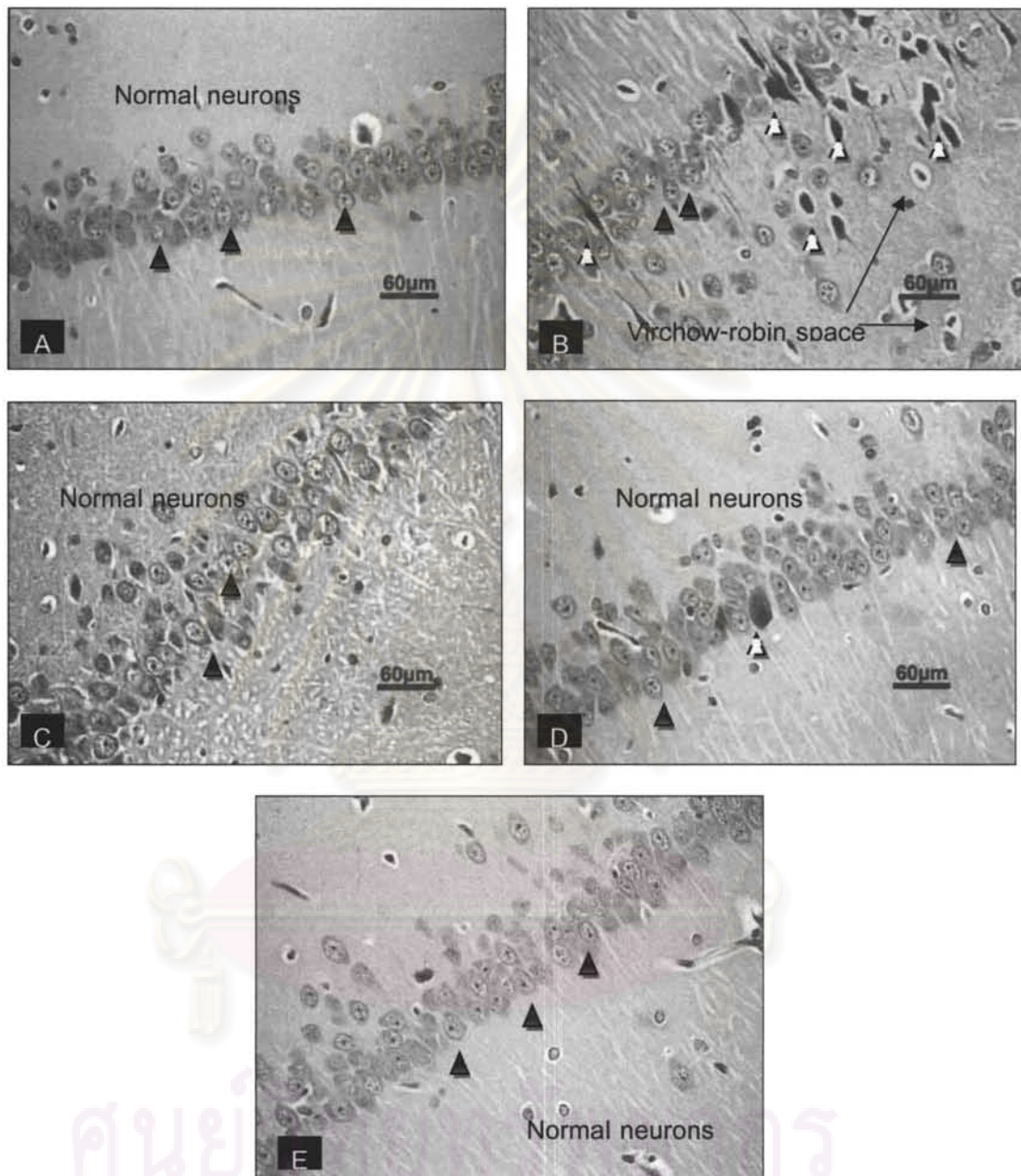
รูป 22 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebral cortex ย้อมด้วย H&E (x400) ในหนูแรททุกกลุ่ม (n=8) จากภาพ A,C,D และE แสดงเซลล์สมองปกติ (ลูกศรสีดำ ▲) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีเข้มรูปร่างฝ่อเล็กน้อยเรียกว่า dark neurons (ลูกศรสีขาว ▲) ส่วนภาพ B พบ dark neurons ร่วมกับ neuronophagia และการขยายเพิ่มขึ้นของ Virchow-robin space เป็นจำนวนมาก (A=ND, B=HF, C=HF+Fenofibrate100mg/kg/day, D=HF+GSE0.5% และ E=HF+GSE1.0%)

CEREBELLUM ย้อมด้วย H&E



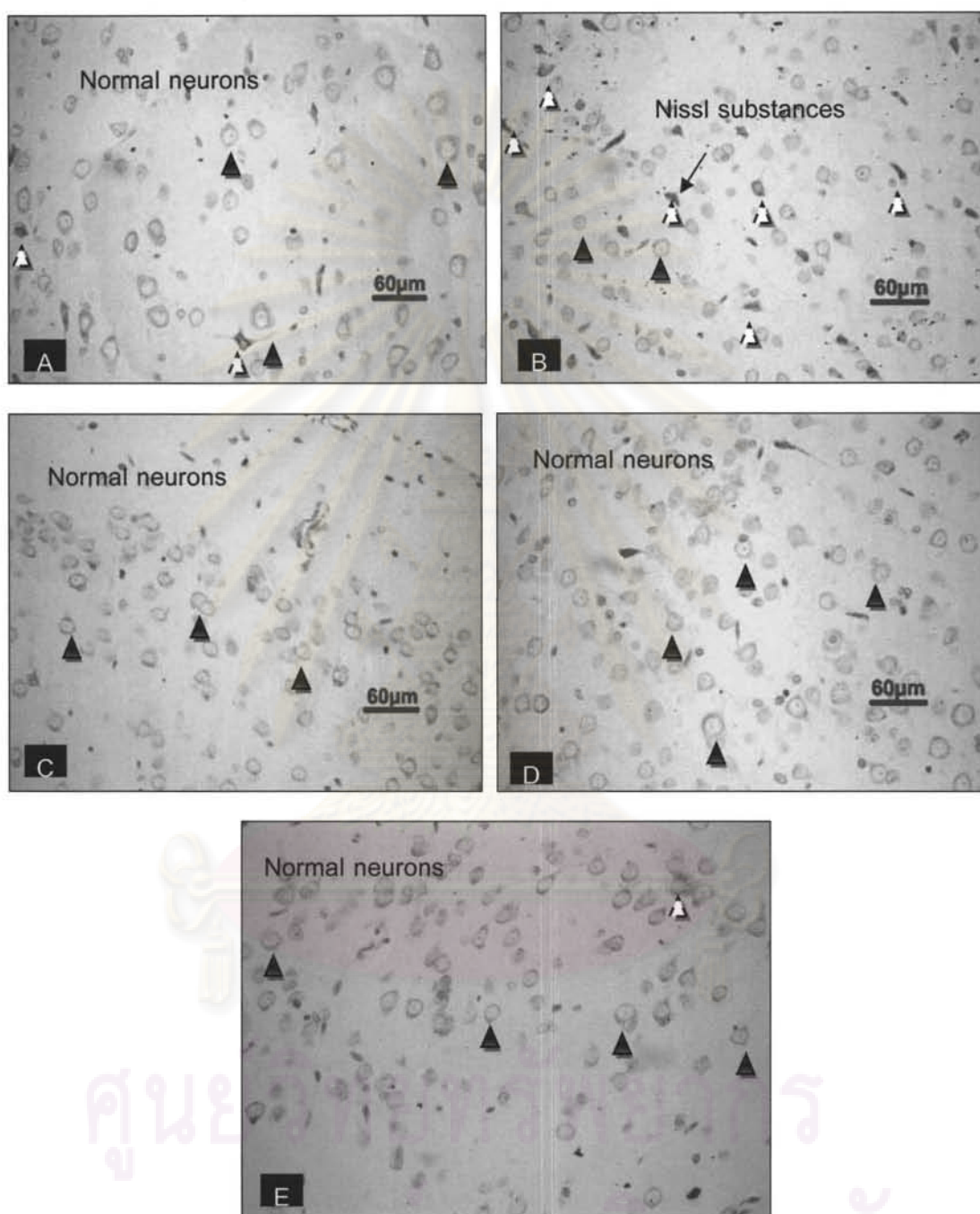
รูป 23 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebellum ย้อมด้วย H&E (x400) ในหนูแรททุกกลุ่ม (n=8) จากภาพ A,C,D และE แสดงเซลล์สมอง purkinje cells ปกติ (ลูกศรสีดำ▲) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีเข้มรูปร่างผ้อเล็กน้อยเรียกว่า dark neurons (ลูกศรสีขาว ◡) ส่วนภาพ B พบ dark neurons เป็นจำนวนมาก (A=ND, B=HF, C=HF+Fenofibrate100mg/kg/day, D=HF+GSE0.5% และE=HF+GSE1.0%)

HIPPOCAMPUS ย้อมด้วย H&E



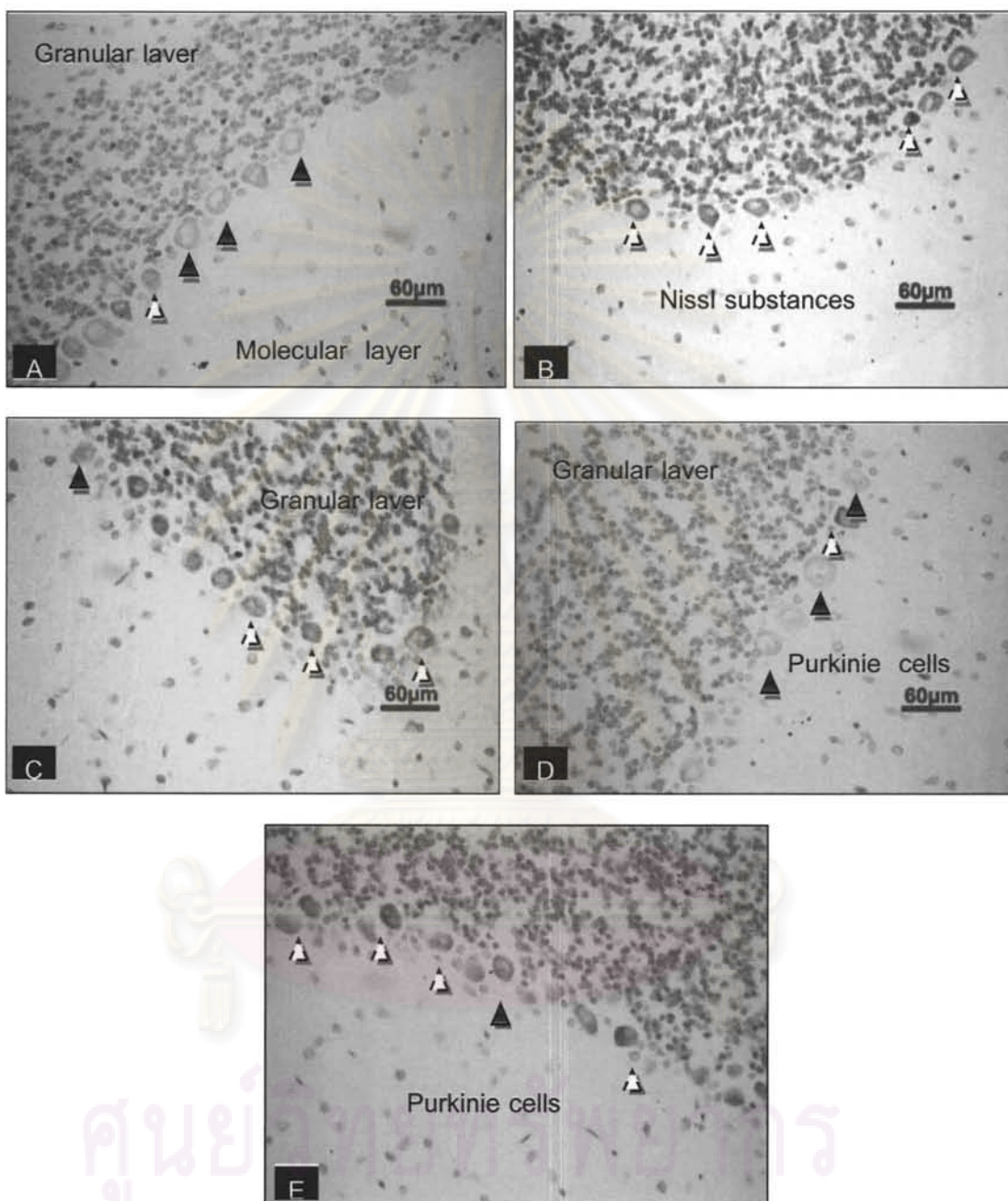
รูป 24 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน hippocampus ย้อมด้วย H&E (x400) ในหนูแรททุกกลุ่ม (n=8) จากภาพ A,C,D และE แสดงเซลล์สมองปกติเรียงตัวกันเป็นแถวตอนเรียงหนึ่ง (ลูกศรสีดำ ▲) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีเข้มรูปร่างฝ่อเล็กน้อยเรียกว่า dark neurons (ลูกศรสีขาว ▽) ส่วนภาพ B พบ dark neurons ร่วมกับ neuronophagia และการขยายเพิ่มขึ้นของ Virchow-robin space เป็นจำนวนมาก (A=ND, B=HF, C=HF+Fenofibrate100mg/kg/day, D=HF+GSE0.5% และE=HF+GSE1.0%)

CEREBRAL CORTEX ย้อมด้วย Cresyl violet



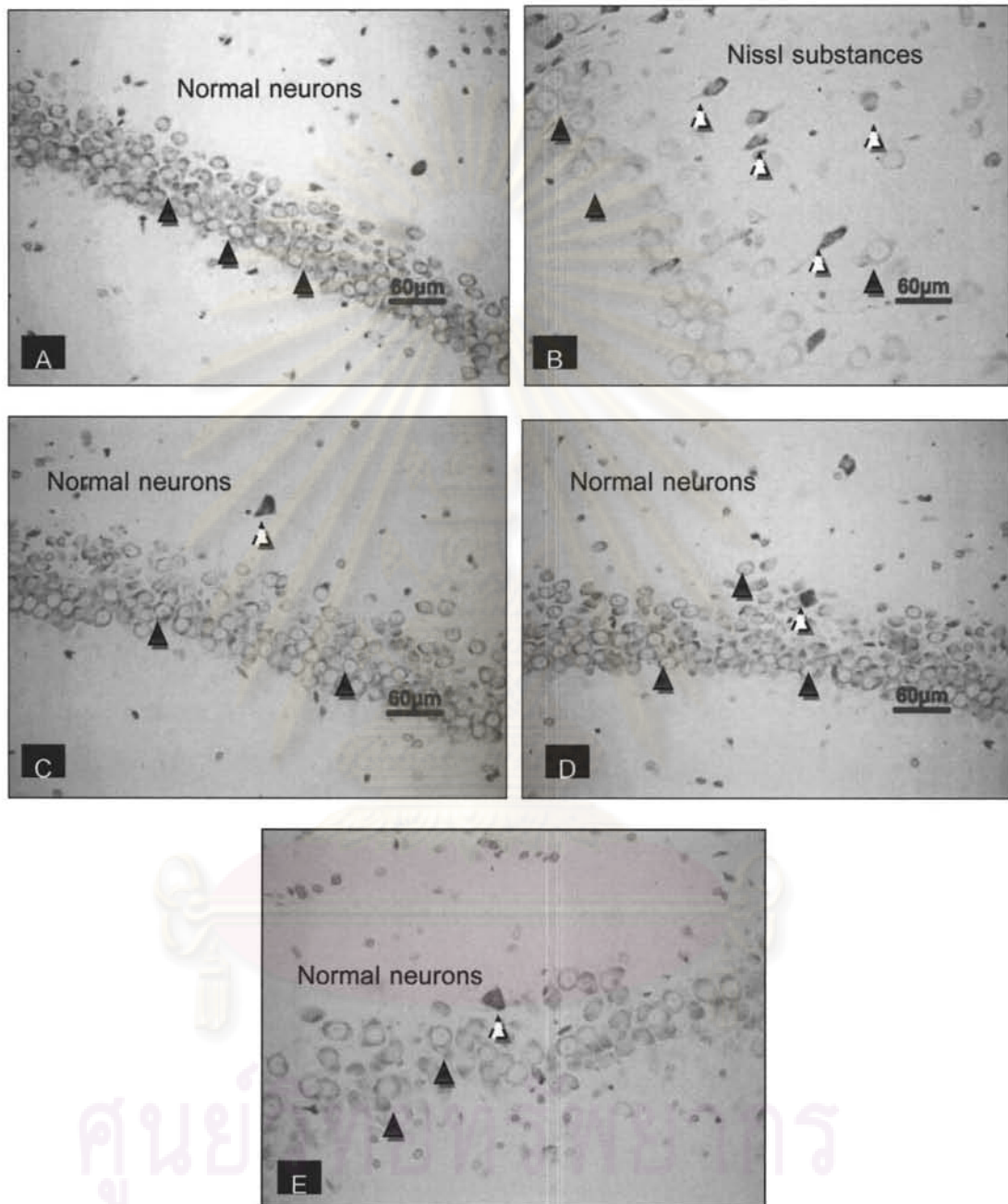
รูป 25 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebral cortex ย้อมด้วย Cresyl violet ($\times 400$) ในหนูแรททุกกลุ่ม ($n=8$) จากภาพ A,C,D และ E แสดงเซลล์สมองปกติ (ลูกศรสีดำ \blacktriangle) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้ม รูปร่างฝ่อเล็กน้อยเรียกว่า dark neurons (ลูกศรสีขาว \triangle) ส่วนภาพ B พบการตายของเซลล์ประสาทย้อมติดสีส่วน Nissl substances (dark neurons) เป็นจำนวนมาก (A=ND, B=HF, C=HF+Fenofibrate 100mg/kg/day, D=HF+GSE 0.5% และ E=HF+GSE 1.0%)

CEREBELLUM ย้อมด้วย Cresyl violet



รูป 26 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebellum ย้อมด้วย Cresyl violet (x400) ในหนูแรททุกกลุ่ม (n=8) จากภาพ A,C,D และE แสดงเซลล์สมอง purkinje cells ปกติ (ลูกศรสีดำ▲) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้ม รูปร่างฝ่อเล็กน้อยเรียกว่า dark neurons (ลูกศรสีขาว▲) ส่วนภาพ B พบการตายของเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสีส่วน Nissl substances (dark neurons) เป็นจำนวนมาก(A=ND,B=HF, C=HF+Fenofibrate100mg/kg/day, D=HF+GSE0.5% และE=HF+GSE1.0%)

HIPPOCAMPUS ย้อมด้วย Cresyl violet

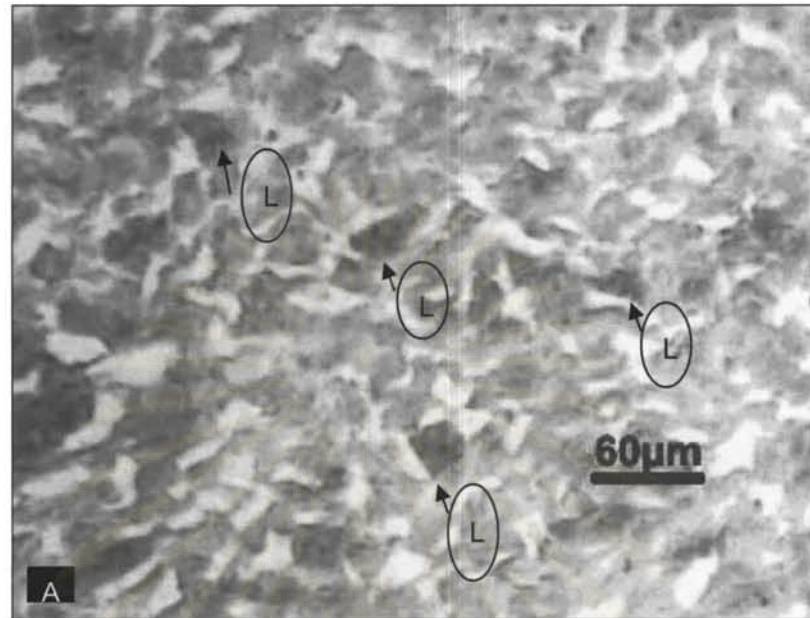


รูป 27 แสดงภาพจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทสมองส่วน hippocampus ย้อมด้วย Cresyl violet (x400) ในหนูแรททุกกลุ่ม (n=8) จากภาพ A,C,D และE แสดงเซลล์สมองปกติเรียงตัวกันเป็นแถวตอนเรียงหนึ่ง(ลูกศรสีดำ ▲) แทรกด้วยเซลล์ประสาทที่ติดสีน้ำเงินอมม่วงเข้ม รูปร่างผ่อเล็กน้อย เรียกว่า dark neurons(ลูกศรสีขาว▼) ส่วนภาพ B พบการตายของเซลล์ประสาทย้อมติดสีส่วน Nissl substances (dark neurons) เป็นจำนวนมาก (A=ND,B=HF, C=HF+Fenofibrate100mg/kg/day, D=HF+GSE0.5% และE=HF+GSE1.0%)

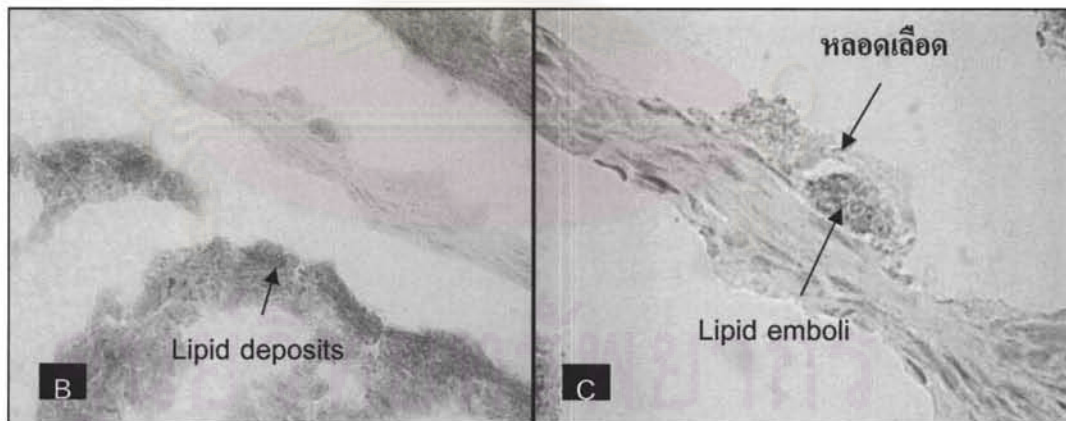
4.5.2 ผลการศึกษาการเสื่อมของเซลล์ประสาทแบบมีไขมันสะสมย้อมพิเศษด้วยวิธี Oil Red O stain

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า การย้อมติดสีแดงเรียบเสมอกัน เป็นลักษณะการกระจายตัวของไขมันปกติซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของเนื้อเยื่อสมอง แต่ถ้าพบการติดสีแดงเป็นกลุ่มก้อนอยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาท แสดงถึงการเกิด vacuolar degeneration ซึ่งเป็นขบวนการอย่างหนึ่งที่เซลล์ประสาทแสดงออกมาเมื่อเกิดการบาดเจ็บ

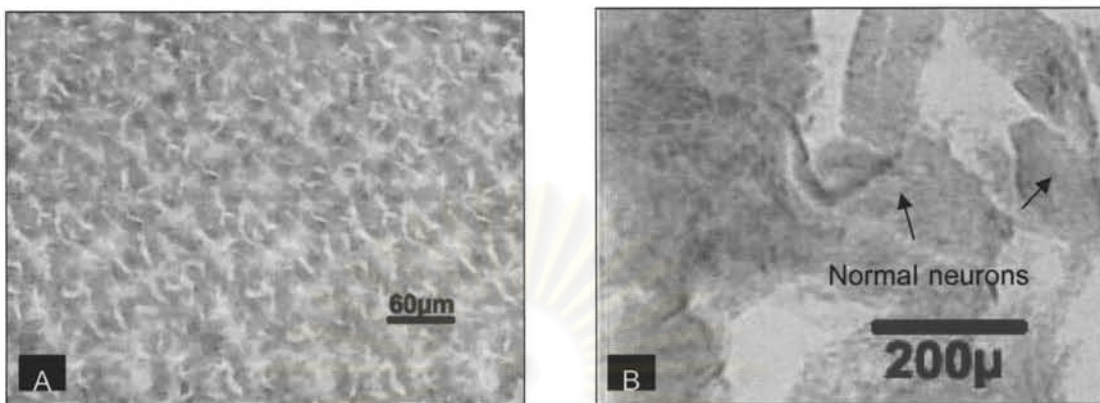
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทในสมองทั้ง 3 ส่วนด้วยวิธีการย้อม H&E และ Cresyl violet ไม่พบลักษณะ degeneration ของไขมัน (vacuolar degeneration) ในหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม แต่เมื่อศึกษาด้วยวิธีการย้อม Oil Red O พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาท คือพบการสะสมของไขมันในส่วน ไซโทพลาสซึมของเซลล์ประสาท เห็นเป็นเม็ดไขมันขนาดเล็กติดสีแดงเข้ม และรวมกันเป็นกลุ่มก้อน (แสดงดังรูปที่ 28) และจากรูปที่ 29 แสดงให้เห็นจุลพยาธิสภาพในหลอดเลือดเลี้ยงสมอง ซึ่งพบว่ามี การอุดตันของไขมัน (ติดสีแดง) ในหลอดเลือด ส่วนกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน, กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate, กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ขนาด 0.5% และ 1.0% ตามลำดับ ไม่พบการเกิด vacuolar degeneration ในสมองทั้ง 3 ส่วน ดังแสดงในรูปที่ 30, 31 และ 32 ตามลำดับ



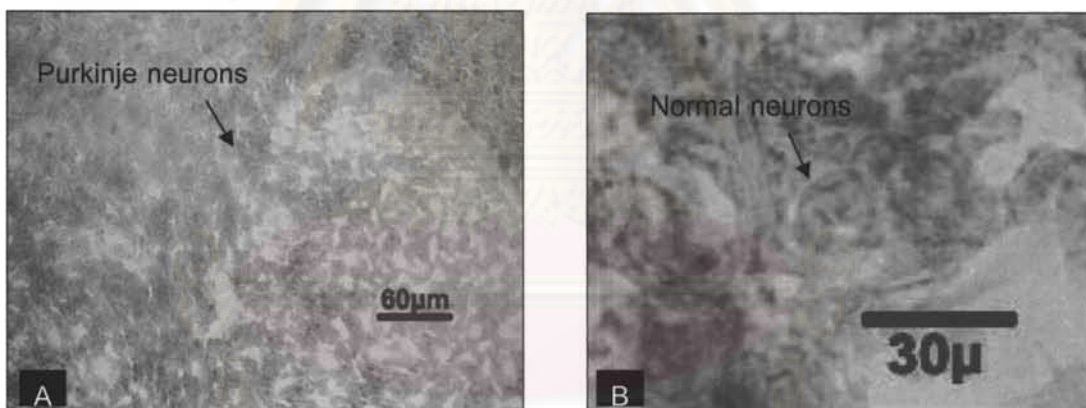
รูป 28 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการเกิด vacuolar degeneration ของเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebral cortex ของกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงนาน 8 สัปดาห์ พบลักษณะของเซลล์ประสาทติดสีแดงเข้มรวมกันเป็นกลุ่มในส่วน cytoplasm ของเซลล์ (ลูกศรชี้) Oil Red O x400 (L=Lipid accumulation)



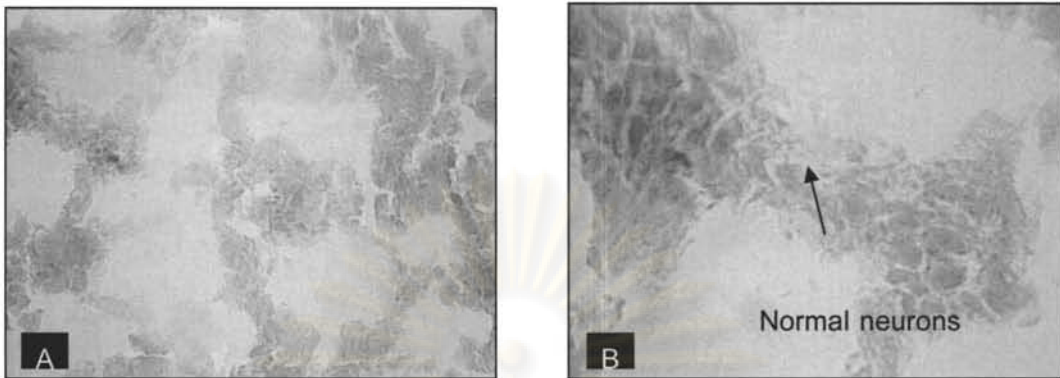
รูป 29 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงลักษณะการเกิด vacuolar degeneration ในเนื้อสมองและในหลอดเลือดสมอง สังเกตเห็นก้อนไขมันซึ่งติดสีแดงอุดตันอยู่ภายในหลอดเลือด Oil Red O (B x400, Cx100)



รูป 30 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันอย่างสม่ำเสมอในเซลล์ประสาทสมองปกตีส่วน cerebral cortex (A) ติดสีแดง Oil Red O (A x100) และภาพ B แสดงเซลล์ประสาทปกติซึ่งติดสีน้ำเงิน (ลูกลูครซี) Oil Red O (B x400)



รูป 31 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันอย่างสม่ำเสมอในเซลล์ประสาทสมองปกตีส่วน cerebellum (A) ติดสีแดง Oil Red O (A x100) และภาพ B แสดง purkinje cells ปกติซึ่งติดสีน้ำเงิน (ลูกลูครซี) Oil Red O (B x400)



รูป 32 ภาพทางจุลพยาธิวิทยาแสดงการกระจายตัวของไขมันอย่างสม่ำเสมอในเซลล์ประสาทสมองปกติส่วน hippocampus (A) ติดสีแดง Oil Red O (A x100) และภาพ B แสดงเซลล์ประสาทปกติซึ่งติดสีน้ำเงิน (ลูกลูครี) Oil Red O (B x400)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล และสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

จุดมุ่งหมายของการทดลองเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของภาวะไขมันในเลือดสูง กับการสร้างอนุมูลอิสระในสมอง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคทางสมองมากมาย และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (Grape Seed Extract) ในการปกป้องการทำลายเซลล์ประสาทจากอนุมูลอิสระที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคด้วยอาหารไขมันสูง จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำในหลอดทดลอง ในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ แสดงให้เห็นว่าฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นนั้นมีมากมาย รวมถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่มีผลต่อเซลล์เยื่อหุ้มหลอดเลือดและสมอง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาฤทธิ์ปกป้องสมองของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่นิยมใช้เป็นอาหารเสริมในปัจจุบัน โดยเหนี่ยวนำให้สมองเกิดการเสียหายด้วยอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ GSE ร่วมกับอาหารไขมันสูง ทำการตรวจสอบตัวแปรที่เกี่ยวข้องและดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้น ได้แก่ ปริมาณไขมันในเลือด, lipid peroxidation (MDA) และการสร้างไนตริกออกไซด์ (NO) ในเลือดและในสมอง หาความสัมพันธ์ของภาวะไขมันในเลือดสูง (hyperlipidemia) กับการเกิดอนุมูลอิสระในเลือดและในสมอง และตรวจสอบทางพยาธิวิทยาต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเซลล์ประสาทในสมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus

5.1 ผลของอาหารไขมันสูงและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมอง

จากผลการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองของหนูแรทในแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มได้รับอาหารพื้นฐาน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Ming และคณะ 2009 และรายงานของ Unno และคณะ 2009 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงยังมีผลทำให้เนื้อเยื่อไขมันชนิด white adipose tissue เพิ่มขึ้นและทำให้เกิดการบวมที่สมองส่วน cerebrum การศึกษาครั้งนี้ยังพบว่าการให้ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นติดต่อกันนาน 8 สัปดาห์ร่วมกับอาหารไขมันสูงมีผลทำให้น้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองของหนูแรทที่เพิ่มสูงชันนั้น ลดลงอยู่ในเกณฑ์ปกติ ทั้งนี้แสดงว่า GSE ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองหนูแรท แต่ในทางตรงกันข้าม GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นมีผลทำให้น้ำหนักสมองของหนูแรทลดลงเท่ากับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ

อาหารไขมันสูง จากผลการทดลองของ Feng และคณะ 2005 ที่ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองของหนูแรท ดังนั้นการที่น้ำหนักตัวและน้ำหนักสมองของหนูแรทที่ลดลงจากกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง เป็นผลปกป้องสมองของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นจากอาหารไขมันสูงเท่านั้น

5.2 ผลของอาหารไขมันสูงและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อระดับไขมันในเลือด

พบว่าหนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HF-diet) โดยเพิ่ม cholesterol ลงไป 1% นาน 8 สัปดาห์ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงได้เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำมาก่อนหน้านี้ของ Godard และคณะ 2009 และ Ming และคณะ 2009 และเมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate และ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นช่วยลดระดับไขมันในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้นได้แต่ก็ยังไม่ลดลงเท่ากับระดับปกติ การที่ GSE มีผลทำให้ปริมาณไขมันในเลือดลดลงได้ (Quesada และคณะ 2009) อาจเป็นเพราะ GSE มีผลยับยั้งการดูดซึมไขมันเข้าสู่กระแสเลือดได้โดยตรง (Tebib และคณะ 1996) อย่างไรก็ตาม ผลการยับยั้งนี้ยังไม่แรงพอที่จะลดลงจนถึงระดับปกติ ส่วนการให้ fenofibrate ในสัปดาห์ที่ 4 มีส่วนช่วยลดระดับไขมัน LDL-c ได้ และ GSE ที่ความเข้มข้น 1.0% ให้ผลลดระดับ LDL-c ได้เท่ากับ fenofibrate และสูงกว่า GSE ที่ความเข้มข้น 0.5% แสดงว่าการลดไขมันของ GSE เป็นไปตามขนาดที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาที่ได้รับ GSE ร่วมกับอาหารไขมันสูงที่ยาวนาน (8 สัปดาห์) จะเห็นผลลดไขมันได้ชัดเจนกว่าระยะเวลาที่ได้รับนาน 4 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับระดับไขมันชนิดดี (HDL) ในทุกกลุ่ม จะเห็นได้ว่า GSE ที่ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ช่วยรักษาระดับ HDL-c ได้พอกัน แต่ที่ 1.0% ทำให้ LDL-c ลดลงได้ดีพอๆกับยาลดไขมัน fenofibrate

5.3 ผลของอาหารไขมันสูงและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อการทำงานของตับและไต

จากผลการทดลอง การบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน ไม่มีผลทำให้การทำงานของไตเปลี่ยนแปลง ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Montilla และคณะ 2005 แต่ค่าเอนไซม์ที่บ่งบอกถึงสมรรถนะของตับ (liver enzyme) ในเลือดหนูแรทเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ซึ่ง Nakayama และคณะ 2007 ได้เสนอไว้ว่าการที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานมีผลทำให้การทำงานของตับลดลง โดยพบว่ามีสารสะสมของไขมัน (lipids deposit) ที่ไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับเป็นจำนวนมาก ส่วนหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยา

ลดไขมัน fenofibrate ร่วมกับอาหารไขมันสูงพบว่า มีค่า BUN, CRE, SGOT, SGPT และ ALP เพิ่มสูงขึ้นมากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากอาหารไขมันสูงมีผลทำให้ค่าทางเคมีคลินิกที่แสดงถึงการทำงานของตับและไตเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับการทดลองอื่นๆ (Molnar และคณะ 2007 และ Nakamura และคณะ 2002) การได้รับยาลดไขมัน fenofibrate กลับมีผลทำให้ enzyme activity ยังสูงขึ้น อาจเป็นเพราะว่ายา fenofibrate เองก็มีผลต่อตับและไตจึงเป็นสาเหตุทำให้ค่า CRE และ SGPT เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (Hottelart และคณะ 2002, Ansquer และคณะ 2008) ส่วนผลของ ALP ที่เพิ่มสูงขึ้นมาก น่าจะเกิดจาก ALP เป็นเอนไซม์ที่พบในเนื้อเยื่อหลายแห่งในร่างกาย เช่น ตับ, กระดูก, ลำไส้เล็ก, ไต, รก และเม็ดเลือดขาว การที่ ALP นี้สูงขึ้นกว่าปกติแสดงว่าอาจหลังจากอวัยวะอื่นๆ เช่น ลำไส้เล็ก เนื่องจากมีรายงานว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงมีผลทำให้เกิดการสร้าง ALP ที่ลำไส้เล็กเพิ่มสูงขึ้น (สุธาทิพย์ พิชญไพบุลย์ 2544) อย่างไรก็ตาม เมื่อได้รับ GSE ทั้ง 2 ความเข้มข้นพบว่าปริมาณ BUN, CRE, SGOT, SGPT และ ALP ในเลือดหนูแรทต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยา fenofibrate แม้ว่าระดับพารามิเตอร์ดังกล่าวยังไม่ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ทำให้พอจะสรุปได้ว่าการทำงานของตับและไตที่ลดลงไปนั้นเกิดจากผลของการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน มากกว่าเป็นผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น เนื่องจากผลการศึกษาของ Montilla และคณะ 2005 และ Wren และคณะ 2005 ระบุว่า การได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นเป็นเวลานาน 90 วันไม่ก่อให้เกิดพิษต่อร่างกาย ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ พอจะสรุปได้ว่า GSE ไม่มีผลปกป้องตับจากอาหารไขมันสูง

5.4 ผลของอาหารไขมันสูงและสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีต่อปริมาณ NO และ MDA ในสมองและในเลือดของหนูแรท

หนูแรทกลุ่มที่บริโภคอาหารไขมันสูงนาน 8 สัปดาห์ ทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูงซึ่งมีผลทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระในเลือดและในสมองเพิ่มมากขึ้น โดยวัดจาก lipid peroxidation markers คือ malondialdehyde (MDA) และ nitric oxide (NO) ทั้งในเลือด และในสมอง จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองเพิ่มสูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงนาน 8 สัปดาห์ทำให้เกิด lipid peroxidation เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Abdul และคณะ 2004 และ Yao และคณะ 2008 และมีผลเพิ่มปริมาณ NO ในสมองเช่นกัน ผลที่ได้สอดคล้องกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ในขณะที่เดียวกันปริมาณ NO ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานอีกด้วย การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การที่ระดับ

cholesterol ในเลือดสูงซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็งจากไขมันสะสม เนื่องจากการสร้างอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น (Ming และคณะ 2009) ทั้งในเลือดและในสมอง ซึ่งอนุมูลอิสระมีผลเหนี่ยวนำให้เกิด endothelial cell injury (Godard และคณะ 2009) ได้

และจากผลการทดลอง พบว่าหนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ทำให้ปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองลดลง ส่วน NO ในสมองมีปริมาณลดลงและปริมาณ NO ในเลือดเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว โดยที่ผลของ GSE ความเข้มข้น 0.5% มีฤทธิ์ไม่แตกต่างกับกลุ่ม GSE 1.0% และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยาลดไขมัน fenofibrate จากการศึกษาที่ผ่านมาจำนวนมากแสดงให้เห็นว่า GSE มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นการที่ปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองรวมทั้งปริมาณ NO ในสมองที่ลดลง น่าจะเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ GSE ในทำนองเดียวกัน NO ที่เพิ่มขึ้นในเลือด มีบทบาทสำคัญทำให้ endothelial ที่ผนังหลอดเลือดทำงานได้ดีขึ้น ทำให้หลอดเลือดไปเลี้ยงสมองขยายตัว (vasodilatation) มีการไหลเวียนเลือด (cerebral blood flow) ไปเลี้ยงสมองได้ดีขึ้น, ป้องกันการเกิด platelet aggregation และเพิ่มฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระ (Toda และคณะ 2009) จากการศึกษาทดลองของ Wei และคณะ 1999 พบว่าหลังจากเกิดภาวะสมองขาดเลือด เอนไซม์ eNOS และ nNOS ที่ผนังหลอดเลือดและที่เซลล์ประสาทซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้าง NO ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของหลอดเลือดและการทำงานของสมอง โดยที่ NO ที่เกิดขึ้นนั้นมีหน้าที่แตกต่างกัน คือ NO ที่สร้างขึ้นจาก eNOS ทำหน้าที่ลดการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทโดยทำให้หลอดเลือดเลี้ยงสมองขยายตัว และมีเลือดไปเลี้ยงสมองได้ดีขึ้น ส่วน NO ที่สร้างขึ้นจากเอนไซม์ nNOS และเกิดจากการเหนี่ยวนำของ iNOS เนื่องจากภาวะไขมันในเลือดสูง (Yucel และคณะ 2005) ในกรณีที่มี NO ในปริมาณที่มากเกินไปในสมองจะทำให้เกิด peroxynitrite ซึ่งเป็นพิษและเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายเซลล์ประสาทได้มากกว่า

ภาวะไขมันในเลือดสูงมีผลทำให้เกิดการสร้าง oxidized-LDL เพิ่มขึ้น (Hamdheydari และคณะ 2003) oxidized-LDL มีผลทำให้ membrane fluidity ที่สมองลดลง แต่ไม่มีผลทำให้ endothelial cell ตาย นอกจากนี้ยังพบว่า oxidized-LDL สามารถกระตุ้นให้มีการสร้าง NO จากเซลล์เยื่อหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (brain endothelial cell) เพิ่มขึ้นอันเนื่องมาจากการอักเสบของสมอง NO ที่เกิดขึ้นนี้สามารถแพร่กระจายเข้าสมองได้อย่างรวดเร็วและมีผลไปกระตุ้นการทำงานของ nNOS ให้มีการสร้าง NO ที่สมองเพิ่มมากขึ้น (Calapai และคณะ 2000) การได้รับ

GSE มีผลทำให้ลดการเกิด oxidized-LDL และลดระดับไขมันในเลือดได้ (Tebib และคณะ 1996) นอกจากนี้ ภาวะไขมันในเลือดสูง ทำให้มีการสะสมของ cholesterol ใน platelet, polymorphonuclear cells, leukocyte และ endothelial cells เกิดการสร้างอนุมูลอิสระและเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งมี end product คือ MDA และ 4-hydroxynonenal (4-HNE) ซึ่งมีบทบาทสำคัญทำให้องค์ประกอบที่เป็นโปรตีนสูญเสียการทำงาน (Yazadanparast และคณะ 2008)

ภาวะไขมันในเลือดสูงเป็นผลทำให้หลอดเลือดอุดตัน (vascular ischemia) ทำให้เลือดไปเลี้ยงสมองน้อยลง metabolic activity ในสมองลดลงและเหนียวหนาทำให้เกิดการสร้าง glutamate เพิ่มมากขึ้น โดยที่ glutamate เป็น excitatory neurotransmitter ที่หลังจาก presynaptic neurons และเข้าจับกับ *N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptors บริเวณ postsynaptic neurons เมื่อเกิดการกระตุ้น NMDA receptors มากเกินไปส่งผลทำให้เกิดการไหลของ Ca^{2+} เข้าสู่ภายในเซลล์ และกระตุ้นการทำงานของ neuronal nitric oxide synthase (nNOS) เกิดการสร้าง NO ในสมองมากเกินไปทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (apoptotic) โดยไม่มีผลกระตุ้นการทำงานของ p53 ทำให้เกิด DNA damage นอกจากนี้ NO ที่เกิดขึ้นที่มีในปริมาณมากเกินไป สามารถทำปฏิกิริยากับ hydroxyl radicals (OH^{\cdot}) ได้เป็น peroxynitrite ($ONOO^{\cdot}$) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ประสาท (Yucel และคณะ 2005) โดยไปทำลายโครงสร้าง, ผนังเซลล์, โปรตีน และ DNA ของเซลล์ประสาท จากความรู้ที่ว่า สมองมีธาตุเหล็กและไขมันเป็นองค์ประกอบหลัก (Gulati และคณะ 2008) จึงทำให้สมองมีความไวต่อการถูกทำลายด้วยอนุมูลอิสระมากกว่าอวัยวะอื่นๆ

การพัฒนาไปสู่การทำลายสมองนั้น ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) กับการเกิดอนุมูลอิสระ (free radicals) ในสมอง จากการศึกษาของ Christian และคณะ 2005 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานานทำให้เกิดความไม่สมดุลของ antioxidant กับ oxidant ถ้ามีอนุมูลอิสระเช่น ไนตริกออกไซด์ เกิดในปริมาณน้อยจะมีบทบาทเป็น second messenger ในการเกิด signal transduction pathway แต่ถ้ามี free radicals เกิดขึ้นในปริมาณมากเกินไปทำให้เกิด oxidative damage ภายในเซลล์ได้ (Yazadanparast และคณะ 2008) จากการศึกษาของ Ming และคณะ 2009 ช่วยยืนยันได้ว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงมีผลทำให้ antioxidant enzyme activity (SOD, CAT, GSH-Px และ glutathione reductase (GR)) และ non-enzymatic antioxidant (Vitamin-C, Vitamin-E และ GSH) ลดลงทั้งในเลือดและในเนื้อเยื่อ

(tissue homogenate) ของตับ, ไต, ปอด, หัวใจ และสมอง อีกด้วย (Motilla และคณะ2008, Yazdanparast และคณะ2008, Xu และคณะ2009) นอกจากนี้สมองยังเป็นอวัยวะที่ต้องการพลังงานสูง จึงทำให้สมองมีความต้องการใช้ออกซิเจนเพื่อผลิตเป็นพลังงานให้กับเซลล์ประสาท ซึ่งต้องอาศัยขบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ดังนั้นเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดจะทำให้สมองขาดออกซิเจนและขาดพลังงานให้กับเซลล์ เป็นสาเหตุทำให้เซลล์ประสาทตายได้ (Swamkar และคณะ2009) และจากการศึกษาของ Gulati และคณะ2009 ให้ผลสนับสนุนว่าภาวะความเครียดเรื้อรังมีผลต่อเซลล์ประสาท ทำให้เพิ่มปริมาณ MDA ในสมอง และมีผลทำให้ pro-antioxidant และ antioxidant ในสมองขาดความสมดุล นอกจากนี้ยังพบว่าสารบริโภคอาหารไขมันสูงมีผลต่อความจำและการเรียนรู้ในหนูแรท (Wu และคณะ2004) โดยกระตุ้นการเกิด oxidative stress ซึ่งมีบทบาทไปยับยั้งการทำงานของ BDNF (Brain-derived neurotropic factor) ที่มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของ Synapsin I และ CREB (cyclic AMP-response element-binding protein) ที่เกี่ยวข้องกับความจำและการเรียนรู้ จากการศึกษาทั้งหมดก่อนหน้านี้นี้แสดงให้เห็นว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน มีกลไกมากมายที่มีผลทำให้เกิดโรคทางสมอง (neurodegenerative disease) ซึ่งสาเหตุที่สำคัญเกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นมีปริมาณมากเกินไปที่สารต้านอนุมูลอิสระจะกำจัดได้

5.5 ผลทางจุลพยาธิวิทยาของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นและฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทถูกทำลายจากการบริโภคอาหารไขมันสูง

เป็นการยืนยันผลการปกป้องเซลล์ประสาทที่ถูกทำลาย โดยแยกตรวจบริเวณสมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus ของหนูแรททุกกลุ่ม โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงพบจำนวนเซลล์ประสาทถูกทำลาย (dark neurons) ในสมองทั้ง 3 ส่วนเป็นจำนวนมาก และมีจำนวนเซลล์ประสาทที่ตายสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐาน ส่วนอีก 3 กลุ่มคือ HF+fenofibrate, HF+GSE 0.5% และ 1.0% พบจำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกทำลาย (dark neurons) ในสมองทั้ง 3 ส่วนน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามการเกิด dark neurons ในสมองทั้ง 3 ส่วน มีจำนวนไม่แตกต่างกัน เมื่อเพิ่มขนาดของ GSE ความเข้มข้น 0.5%ไปเป็น1.0% จำนวนเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายหรือการตายของเซลล์ประสาทในสมองทั้ง 3 ส่วนลดลงได้ ส่วนการศึกษาด้วยวิธี cresyl violet stain ในหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม เป็นวิธีการศึกษาเพื่อช่วยยืนยันผลของ H&E stain และยังระบุถึงระดับความรุนแรงการตายของเซลล์ประสาทได้นั้น (Salford และคณะ2003) ให้ผลการทดลองไปในแนวทาง

เดียวกับผล H&E stain โดยหนูแรทกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง มีการตายของเซลล์ประสาท (dark neurons) มากกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากการทำลายของอนุมูลอิสระได้ ผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ Baran และคณะ 2005 พบว่าการบริโภคอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน ร่วมกับการมีความเครียดเรื้อรัง มีผลทำให้ความยาวและแขนงของ dendrites ของเซลล์ประสาทส่วน CA3 hippocampus หดสั้นลงได้ และจากการศึกษายืนยันด้วยวิธีการย้อมไขมันด้วยเทคนิค Oil Red O stain พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับ GSE ในขนาด 0.5% และ 1.0% สามารถป้องกันการเกิดการเสื่อมของเซลล์จากการสะสมของไขมัน (lipid degeneration) ในเซลล์ประสาทได้

จากผลการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Devi และคณะ 2006 ว่า GSE สามารถลดความรุนแรงของการทำลายเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูง และ grape seed proanthocyanidin extract มีฤทธิ์เป็น antioxidant ในสมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus โดยมีผลเพิ่มปริมาณ SOD, catalase ลดปริมาณ MDA ในสมองและเพิ่มเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความจำและการเรียนรู้เช่น choline acetyl transferase (ChAT) ในสมอง นอกจากนี้ GSE สามารถยับยั้งการทำลาย DNA ในสมองส่วน hippocampus หลังจากหนูแรทเกิดภาวะสมองขาดเลือดได้ (Hwang และคณะ 2004)

การศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีกลไกการออกฤทธิ์เป็น neuroprotective มากมายเช่น มีฤทธิ์เป็น antioxidant โดยสามารถลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ซึ่งมีฤทธิ์ได้ดีกว่า vitamin C และ vitamin E, สามารถยับยั้ง DNA oxidative damage เมื่อทำให้หนูเจอร์บิล (gerbil) เกิดการขาดเลือดที่สมองส่วนหน้า (Hwang และคณะ 2004), ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดยยับยั้ง signal transduction ของ pro-apoptotic factors เช่น JNK-1 และ c-JUN (Feng และคณะ 2005, และ Sato และคณะ 2001), ออกฤทธิ์เป็น anti-inflammation โดยลดการสร้าง pro-inflammatory cytokines (Hou และคณะ 2007) และลดการบวมของอวัยวะที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย carragenan และลดการตายของเซลล์ประสาทจากภาวะสมองขาดเลือดลดลง โดยลดการสูญเสีย cellular ATP, ป้องกันการหลั่ง glutamate จาก presynaptic neurons เมื่อเหนี่ยวนำให้หนูแรทเกิดภาวะสมองขาดเลือดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณ MDA ในสมองเพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน การได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นร่วมด้วยมีผลทำให้ปริมาณ MDA ในสมองลดลงได้ (Feng และคณะ 2005) นอกจากนี้ ผลการทดลองใน

อดีตที่ทดสอบกับส่วนประกอบสำคัญที่มีอยู่ใน GSE เช่น flavonoid, polyphenols และ proanthocyanidins สารทุกตัวมีคุณสมบัติเป็น antioxidants ทั้งสิ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารประกอบ polyphenolic compound ที่พบในไวน์แดง (red wine) สามารถป้องกันโรคที่เกิดจาก oxidative stress เช่น โรคหัวใจ, โรคหลอดเลือดแดงตีบแข็ง และปกป้องสมองจากการเกิด cerebral ischemic injury ได้ (Motilla และคณะ2005, Feng และคณะ2005 และ Hwang และคณะ2004)

จากการศึกษาของ Godard และคณะ2009 และ Hur และคณะ2005 ที่ได้รายงานไว้ว่า การมีปริมาณไขมันในเลือดสูงเป็นปัจจัยเสี่ยงอันดับต้นๆในการเกิดโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็งจากไขมันสะสม (atherosclerosis) ซึ่งผลการทดลองทั้งหมดจากการศึกษาครั้งนี้ ช่วยสนับสนุนรายงานดังกล่าวว่า การบริโภคอาหารไขมันสูงติดต่อกันเป็นเวลานาน มีความเสี่ยงในการเกิดโรคไขมันในเลือดสูงและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดแดงตีบแข็งจากไขมันสะสม (atherosclerosis) ซึ่งรวมถึงภาวะสมองขาดเลือดที่เกิดจากหลอดเลือดที่ไปเลี้ยงสมองตีบตัน

งานวิจัยนี้จึงแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาทสมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus จากการทำลายด้วยอนุมูลอิสระที่เกิดจากการบริโภคอาหารไขมันสูงในหนูแรท ซึ่งสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

จากผลการทดลองสรุปได้ว่า

1. การที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นเวลานาน 8 สัปดาห์ ทำให้หนูแรทอยู่ในภาวะไขมันในเลือดสูงได้ การได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ทำให้ปริมาณไขมันเลือดลดลงได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารพื้นฐานโดยที่ GSE ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต
2. ภาวะไขมันในเลือดสูงมีผลทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นทั้งในเลือดและในสมอง โดยพบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองเพิ่มสูงขึ้น, ปริมาณ NO ในสมองเพิ่มสูงขึ้น แต่ปริมาณ NO ในเลือดลดลง ผลทางพยาธิวิทยาสอดคล้องกับผลที่ได้ คือมีจำนวนการตายของเซลล์ประสาท (dark neurons) ในสมองส่วน cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus เพิ่มขึ้น

3. ผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (GSE) ความเข้มข้น 0.5% และ 1.0% ร่วมกับอาหารไขมันสูง มีผลทำให้ปริมาณ MDA ในเลือดและในสมองลดลง, NO ในสมองลดลงและเพิ่มปริมาณ NO ในเลือดได้ นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน dark neuron ลดลงโดยมีระดับ (score) ความรุนแรงการตายของเซลล์ประสาทต่ำกว่าในสมองทั้ง 3 ส่วน (cerebral cortex, cerebellum และ hippocampus)
4. จากผลทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถออกฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทที่ถูกทำลายในสมองทั้ง 3 ส่วน (cerebral cortex, cerebellum, hippocampus) ได้ไม่แตกต่างกัน
5. จากผลการทดลองฤทธิ์ของ GSE ความเข้มข้น 0.5% พบว่ามีผลลดการเกิดอนุมูลอิสระในเลือดและในสมอง รวมถึงผลในการปกป้องการตายของเซลล์ประสาทในสมองทั้ง 3 ส่วนที่เกิดจากอาหารไขมันสูงได้ไม่มีความแตกต่างกับฤทธิ์ของ GSE ความเข้มข้น 1.0% และให้ผลใกล้เคียงกับ fenofibrate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

พงษ์ศักดิ์ จรรณโกโรโรจน์และ พิเชษ สัมผทานุกูล. ตำราภาพจุลพยาธิวิทยา.1-14.พิมพ์ครั้งที่ 1.
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,2541.

สุธาทิพย์ พิชญไพบุลย์.การแปลผลห้องปฏิบัติการสำหรับเภสัชกร. 193-195.พิมพ์ครั้งที่ 2.
เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด,2544.

สุพัตรา ประศุพัฒนา. สารพิษวิทยา : อนุมูลอิสระและการทำลายเซลล์. (2005)96-108.

ภาษาอังกฤษ

Animal and Witter. Review of the literature : Anatomy of the septo-hippocampal system.
(1995).

Abdul HM, Wenk GL, Gramling M, Hauss-Wegrzyniak B, and Butterfield D.A. APP. PS-1
mutation induce brain oxidative stress independent of dietary cholesterol :
implications for Alzheimer's disease. Neuroscience Letters.368(2004):148-150.

Assuncao M, Santos-Marques MJ, De Freitas V, Carvalho F, Andrade JP, Lukoyanov
NV, and Paula-Barbosa MM. Red wine antioxidants protect hippocampal neurons
against ethanol-induced damage : A biochemical, morphology and behavioral
study. Neuroscience.146(2007):1581-1592.

Ansquer JC, Dalton RN, Causse E, Crimet D, Malicat KL and Foucher C. Effect of fenofibrate on kidney function: A 6-week randomized crossover trial in healthy people. American Journal of Kidney Disease.51(2008):904-913.

Bulur H, Ozdemirler G, Buge Oz, Toker G, Ozturk M, and Uysal M. High cholesterol diet supplemented with sunflower seed oil but not olive oil stimulates lipid peroxidation in plasma, liver, and aorta of rats. Nutrition Biochemistry.6(1995):547-550.

Bagchi D, Garg A, Krohn RL, Bagchi M, Bagchi DJ, Balmoori J, and Stohs SJ. Protective effect of grape seed proanthocyanidins and selected antioxidants against TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation and DNA fragmentation, and peritoneal macrophage activation in mice. General Pharmacology.30(1998):771-776 .

Bentivega SS, Whitney KM. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. Food Chemical Toxicology.40(2002):1731-1743.

Baran SE, Campbell AM, Kleen JK, Foltz CH, Wright RL, Diamond DM and Conrad CD. Combination of high fat diet and chronic stress retracts hippocampal dendrites. Neuroreport.16(2005)39-43.

Baydar NG, Ozkan G, and Yasar S. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape seed extracts. Food Control.18(2007):1131-1136.

Chan LY, Mehta P and Mehta JL. Oxidized LDL decrease L-arginine uptake and nitric oxide synthase (NOS) protein expression in human platelets. Circulation.93(1996):1740-1746.

Calapai G, Crupi A, Firenzuoli F, Marciano MC, Squadrito F, Inferrera G, Parisi A, Crisafulli C, Fiore A and Caputi AP. Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract in brain ischemia are mediated by inhibition of nitric oxide synthesis. Life Science.67(2000):2673-2683.

Candelario-Jalil E, Mhadu NH, Al-Dalain SM, Martinez G and Leon OS. Time course of oxidative damage in different brain regions following transient cerebral ischemia in gerbils. Neuroscience Research.41(2001):233-241.

Devi ACDGE SA, Jolitha AB and Ishii N. Grape seed proanthocyanidin (GSPE) and antioxidant defense in the brain of adult rats. Medical Science Monitor.12(2006):124-129.

Denny EC, Costa GV, Carmo M, Peluzio G, Matta LP, Silva M and Costa N. Lipid profile of rats fed high-fat diets based on flaxseed, peanut, trout, or chicken skin. Nutrition.22(2006):197-205.

Fuster JM. Memory in the cerebral cortex : An empirical approach to neuronal networks in the human and nonhuman primate. Cambridge, Massachusetts: The MIT Pres.(1995):26.

Feng Y, Liu YM, Fratkins JD and Blanc MH. Grape seed extract suppresses lipid peroxidation and reduces hypoxic ischemic brain injury in neonatal rats. Brain Research Bulletin.66(2005):120-127.

Garcia JH, Liu KF and Ho KL. Neuronal necrosis after middle cerebral artery occlusion in wistar rats progresses at different time intervals in the caudoputamen and the cortex. Stroke.26(1995):636-643.

- Goncalves C, Dennis T and Baltista M. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction : a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry.66(2005):89-98.
- Garia-marino M, Rivas-Gonzalo J, Elena Ibanez and Comcepian. Grape seed extract from winery by-products using subcritical water extraction. Analytical Chimica Acta.563(2003):44-50
- Gabetta B, Fuzzati N, Griffini A, Lolla E, Pace R, Ruffilli T and Peterlongo F. Characterization of proanthocyanidins from grape seeds. Fitoterapia.71(2000):162-175.
- Ginsberg MD. Role of free radicals reactions in ischemic brain injury. Dury news perspect.14(2001):81.
- Godard M, Decorde K, Ventura E, Soteras G, Baccou JC, Cristol JP, Rouanet JM. Polysaccharides from the green alga *Ulva rigida* improve the antioxidant status and prevent model of nutritionally-induced atherosclerosis. Food Chemistry.115(2009):176-180.
- Gulati K, Chakraborti A and Ray A. Differential role of nitric oxide (NO) in acute and chronic stress induced neurobehavioral modulation and oxidative injury in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior.92(2009):272-276.
- Hottelart C, Esper NE, Rose F, Achard JM and Albert F. Fenofibrate increase creatininemia by increasing metabolic production of creatinine. Nephron Journals.92(2002):536-541.

Hwang IK, Yoo KY, Kim DS, Jeong YK, Kim JD, Shin HK, Lim SS, Yoo ID, Kang TC, Kim DW, Moon WK and Won MH. Neuroprotective effects of grape seed extract on neuronal injury by inhibiting DNA damage in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia. Life Science.75(2004):1989-2001.

Hamdheydari L, Christov A, Ottman T, Hensley K and Grammas P. Oxidized LDLs affect nitric oxide and radicals generation in brain endothelial cells. Biochemical and Biophysical Research Communications.311(2003):486-490.

Hs K, CJ K and Ws R. Effect of fenofibrate on lipoprotein (a) in hypertriglyceridemia patients : impact of change in triglyceride level and liver function. Cardiovascular Pharmacology.46(2005):405-411.

Hou DX, Masuzaki S, Hashimoto F, Uto T, Tanigawa S, Fujii M and Sakata Y. Green tea proanthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2-expression in LPS-activated mouse macrophages : Molecular mechanisms and structure-activity relationship. Archives of Biochemistry and Biophysics.460(2007):67-74.

Ikeda M, Kanai H, Akaike M, Tsutsumi S, Sadamatsu M, Masui A and Kato N. Nitric oxide synthase-containing neurons in the hippocampus are preserved in trimethyltin intoxication. Brain Research.712(1996):168-170.

Ilhan A, Gurel A, Armutcu F, Kamisli S, Iraz M, Akyol O and Ozen S. Ginkgo biloba prevent mobile phone-induced oxidative stress in rat brain. Clinica Chimica Acta.340(2004):153-162.

Jhoo JH, Kim HC, Nabeshima T, Yamada K, Shin EJ, Jhoo WK, Kim W, Kang KS, Jo SA and Woo JI. β -Amyloid (1-42)-induced learning and memory deficits in mice : involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. Behavioural Brain Research.155(2004):185-196.

Juntawises U, Sathirapanya P, Voragul C, Wattanasit Y, Yeesakul C, Sasatranuruk S. The result of the clinical pathway implementation for ischemic stroke patients In Songklanagarind Hospital. Thailand Songkla Medical Journal. 27(2009):117-129.

Keynes RG, Griffiths CH and Hall G. Nitric oxide consumption through lipid peroxidation in brain suspensions and homogenates. Biochemical Journal.387(2005):685-694.

Karthikeyan K, Bai BR and Devaraj N. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. International Journal of Cardiology.115(2007):326-333.

Lumme A, Soinila S, Sadeniemi M, Halonen T and Vanhatalo S. Nitric oxide synthase immunoreactivity in the rat hippocampus after status epilepticus induced by perforant pathway stimulation. Brain Research.871(2000):303-310.

Mulder M, Blokland A, Van den Berg DJ, Schulten H, Nakker HF, Terwel D, Honig W, Kloet RD, Havekes LM, Steinbusch WM and Lange CM. Apolipoprotein E protects against neuropathology induced by a high-fat diet and maintain the integrity of the blood brain barrier during aging. Laboratory Investigation.81(2001):953-960.

Mander P, Borutaite V, Moncada S and Brown GC. Nitric oxide from inflammatory-activated glia synergizes with hypoxia to induce neuronal death. Journal of Neuroscience Research.79(2005):208-215.

Montilla P, Espejo I, Munoz MC, Bujalance I, Munoz-Castaneda JR and Tunez I. Protective effect of red wine on oxidative stress and antioxidant enzyme activity in the brain and kidney induced by feeding high cholesterol in rats. Clinical Nutrition.25(2006):146-153.

Majhenic L, Skerget M and Knes Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. Food Chemistry.104(2007):1258-1268.

Ming M, Guanhua L, Zhanhai Y, Guang C and Xuan Z. Effect of the Lycium barbarum polysaccharides administration on blood lipid metabolism and oxidative stress: mice fed high-fat diet in vivo. Food Chemistry.113(2009):872-877.

Molar A. High fat diet makes mice susceptible to liver injury. American Association For The Study of Liver Disease.(2007).

Nakamura Y and Tonogai Y. Effects of grape seed polyphenols on serum and hepatic lipid contents and fecal steroid excretion in normal and hypercholesterolemic rats. Journal of Health Science.48(2002):570-578.

Nakayama T, Suzuki S, Kudo H, Sassa S, Nomura M and Sakamoto S. Effects of three chinese herbal medicines on plasma and liver lipids in mice fed high-fat diets. Journal of Ethnopharmacology.109(2007):236-240.

Orhan DD, Orhan N, Ergun E and Ergun F. Hepatoprotective effect of *Vitis vinifera* L. leaves on carbon tetrachloride –induced acute liver damage in rats. Journal of Ethnopharmacology.112(2007):145-151.

Pekic B, Kovac V, Alonso E, and Revilla E. Study of the extraction of proanthocyanidins from grape seeds. Food Chemistry.61(1998):201-206.

Rao AM, Hatcher JF and Dempsey RJ. Lipid metabolism in ischemic neuronal death. Research Neurochemistry.2 (1999):533-549.

Roberts CK, Barnard RJ, Sindhu RK, Jurczak M, Ehdai A and Vaziri ND. A high-fat refined-carbohydrate diet induces endothelial dysfunction and oxidant/antioxidant imbalance and depresses NOS protein expression. Journal of Applied Physiology.98 (2005):203-210.

Ripoll-Pinoal G, Frumtas-Broto L, Millan-Plano S, Reyes-Gonzales M, Mauri JA, Matinez-Ballarín E, Reiter RJ and Garcia JJ. Protective effect of melatonin and pinoline on nitric oxide-induced lipid peroxidation and protein peroxidation in rat brain homogenates. Journal of Neuroscience Letters.405(2006):89-93.

Sriivasarao P, Vajreswari A, Suryaprakash P, Rupalatha and Narayanareddy K. Lipid composition and fatty acid profiles of myelin and synaptosomal membranes of rat brain in response to the consumption of different fats. Nutritional Biochemistry.8 (1997):527-534.

Sato M, Bagchi D, Tosaki A, Das DK. Grape seed proanthocyanidin reduces cardiomyocyte apoptosis by inhibiting ischemia/reperfusion-induced activation of JNK-1 and C-Jun. Biology and Medicine.31(2001):729-737.

Singer, Pierre, Shapiro, Haim, Cohen and Jonathan. Brain death and organ damage: The modulating effects of nutrition. Transplantation.80(2005):1363-1368.

Singh G, Gupta P, Rawat P, Puri A, Bhatia G and Maurya R. Antidyslipidemia activity of polyphenol from *Coccoloba grandis* in high-fat diet fed hamster model. Phytomedicine.(2007):1-7.

Swarnkar S, Tyagi E, Agrawal R, Singh MP and Chandishwar N. A comparative study on oxidative stress induced by LPS and rotenone in homogenates of rat brain regions. Environmental Toxicology and Pharmacology.27(2009):219-224.

Tebib K, Rouanet JM and Besancon P. Antioxidant effects of dietary polymeric grape seed tannins in tissues of rats fed a high cholesterol-vitamin E-deficient diet. Food Chemistry.59(1996)135-141.

Tong XK and Hamel E. Basal forebrain nitric oxide synthase (NOS)-containing neurons project to microvessels and NOS neurons in the rat neocortex : cellular basis for cortical blood flow regulation. European Journal of Neuroscience.12(2000):303-310.

Unno K, Yamamoto H, Maeda K, Takabayashi F, Yoshida H, Kikunaga N, Takamori N, Asahina S, Iguchi K, Sayama K and Hoshino M. Protection of brain and pancreas from high-fat diet: Effects of catechin and caffeine. Physiology and Behavior.96(2009):262-269.

Valencia P, Carver JD, Wyble LE, Benford VJ, Gilbert-Barness E, Wiener DA and Phelps C. The fatty acid composition of maternal diet affects the response to excitotoxic neuronal injury in neonatal rat pups. Brain Research Bulletin.45(1998):637-640.

- Wilde DW, Massey KD, Walker GK, Vollmer A and Grekin RJ. High-fat diet elevates blood pressure and cerebrovascular muscle Ca^{2+} current. Hypertension.(1999):832-837.
- Wei G, Dawson VL and Zweier JL. Role of neuronal and endothelial nitric oxide synthase in the nitric oxide generation in the brain following cerebral ischemia. Biochimica Biophysica Acta.1455(1999):23-34.
- Wu A, Molteni R, Yign Z and Gomez-Penilla F. A Saturated fat aggravates the outcome of traumatic brain injury on hippocampal plasticity and cognitive function by reducing brain-derived neurotropic factor. Neuroscience.1189(2003):365-375.
- Wei IH, Wu YC, Wen CY and Shieh JY. Green tea polyphenol (-) epigallocatechin gallate attenuates the neuronal NADPH-d/nNOS expression in the nodose ganglion of acute hypoxia rats. Brain Research.999(2004):73-80.
- Wu A, Ying Z and Gomez-Panilla F. The interplay between oxidative stress and brain derived neurotropic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. European Journal of Neuroscience.2(2004):1699-1707.
- Xu C, Haiyan Z, Hua Z, Jianhong Z and Pin D. Effect of Curcuma kwangseensis polysaccharides on blood lipid profiles and oxidative stress in high-fat rats. International Journal of Biological Macromolecules.44(2009):138-142.
- Yamakoshi J, Kataoka S, Koga T and Ariga T. Proanthocyanidin-rich extract from grape seeds attenuates the development of aortic atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. Atherosclerosis.142(1999):139-149.

Yucel I, Akar Y, Yucel G, Ciftcioglu MA, Keles N and Asian M. Effect of hypercholesterolemia on induced nitric oxide synthase expression in a rat model of elevated intraocular pressure. Vision Research.45(2005):1107-1114.

Yazdanparast R, Bahramikia S and Ardestani A. Nasturtium officinale reduces oxidative stress and enhances antioxidant capacity in hypercholesterolemic rats. Chemico-Biological Interactions.172(2008):176-184.

Zhang XY, Li WG, Wu YJ, Zheng TZ, Li W, Qu SY and Liu NF. Proanthocyanidin from grape seeds potentiates anti-tumor activity of doxorubicin via immunomodulatory mechanism. International Immunopharmacology.5(2005):1247-1257.

Zhang Y, Wang X, Xu Z, Liu Z, Ni Q, Chu X, Qiu M, Zhao A and Jia W. Protective effect of flavonoid from *Scutellaria baicalensis georgii* on cerebral ischemia injury. Journal of Ethnopharmacology.108(2006):355-360.

Zaafir S and Auer RN. Pharmacologic analysis of the mechanism of dark neuron production in cerebral cortex. Acta Neuropathol.116(2008):447-452.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำหนักของสมอง/นน.ตัว					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	5.9	7.2	6.2	5.8	6.0
n=2	5.8	7.1	5.7	5.8	6.0
n=3	5.8	7.4	5.9	5.9	5.9
n=4	5.8	7.2	5.7	5.4	5.8
n=5	5.3	7.4	6.3	6.1	6.2
n=6	6.2	7.1	6.4	5.6	6.2
n=7	5.9	7.4	6.8	5.9	5.7
n=8	6.1	9.3	6.9	-	5.9
Average	5.85	7.51	6.23	5.78	5.96
SD	0.26	0.73	0.73	0.23	0.18

ตารางที่ 11 แสดงข้อมูลน้ำหนักของสมอง (กรัม)/นน.ตัว (มก.) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ Total cholesterol (mg/dl)

กลุ่ม	ND			HF			HF+ Fenofibrate			HF+GSE 0.5%			HF+GSE 1.0%		
	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks
n=1	104.20	98.89	90.02	92.23	218.18	468.29	85.58	224.39	223.96	87.80	201.33	227.49	85.14	188.47	190.24
n=2	90.02	103.32	93.56	93.56	214.63	466.07	81.15	221.28	222.17	89.13	204.43	228.39	84.25	190.68	191.57
n=3	86.03	87.80	94.01	87.80	222.17	442.57	87.80	221.72	222.17	90.02	207.98	238.58	84.25	186.25	191.13
n=4	86.03	91.35	95.34	86.91	225.75	486.03	88.69	224.83	220.39	87.80	202.21	231.04	86.03	189.35	195.12
n=5	78.93	87.80	87.36	84.25	226.16	512.63	85.58	218.18	220.17	86.47	204.43	229.26	88.24	189.35	192.90
n=6	84.70	85.14	86.03	94.45	227.93	506.87	89.13	224.39	218.62	88.69	204.43	239.02	89.57	185.88	194.67
n=7	88.69	89.57	93.56	96.67	221.72	494.90	83.81	224.39	222.61	86.03	210.19	231.92	94.01	188.02	191.57
n=8	90.02	87.80	90.46	82.48	223.50	485.58	87.36	225.27	217.29	-	-	-	80.70	186.25	190.68
Average	88.57	91.45	91.29	89.79	222.50	482.86	86.13	223.05	220.92	87.52	205.37	232.25	86.52	188.03	192.23
SD	7.26	6.32	3.37	5.15	4.40	23.12	2.69	2.45	2.22	1.42	3.11	4.73	4.05	1.76	1.82

ตารางที่ 12 แสดงข้อมูลระดับ Total cholesterol (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ระดับ Triglyceride (mg/dl)

กลุ่ม	ND			HF			HF+ Fenofibrate			HF+GSE 0.5%			HF+GSE 1.0%		
	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks	baseline	4 weeks	8 weeks
n=1	112.73	132.39	122.34	121.93	241.85	542.05	121.52	232.99	201.20	126.76	221.73	230.18	124.74	204.42	203.62
n=2	118.30	138.42	119.11	124.34	241.44	531.58	124.74	228.87	201.60	127.16	218.10	232.59	123.94	178.67	206.84
n=3	131.18	129.97	123.13	125.70	241.04	554.92	125.95	239.43	202.41	127.56	216.09	235.41	121.52	168.72	205.63
n=4	106.23	133.19	125.95	127.16	239.83	520.72	124.34	232.59	208.85	128.37	224.14	236.21	119.91	192.75	202.81
n=5	142.45	125.95	129.57	125.15	233.40	529.97	125.97	230.58	203.62	124.74	228.97	234.01	126.76	197.76	201.60
n=6	123.54	116.29	125.15	122.73	243.46	567.80	126.76	240.64	205.63	123.94	235.41	229.77	127.16	208.45	205.63
n=7	124.74	119.11	129.97	119.51	240.24	549.69	127.16	243.46	205.63	120.72	224.94	233.80	127.96	206.03	208.45
n=8	120.72	121.93	126.76	118.71	226.96	574.64	125.95	245.87	201.60	-	-	-	124.74	164.58	205.63
Average	122.48	127.15	125.24	123.15	238.52	546.42	125.29	236.80	203.81	125.61	224.20	233.28	124.59	190.17	205.02
SD	11.09	7.65	3.67	2.99	5.54	18.92	1.79	6.35	2.69	2.66	6.56	2.45	2.79	17.32	2.23

ตารางที่ 13 แสดงข้อมูลระดับ Triglyceride (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ระดับ HDL - Cholesterol (mg/dl)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2
n=1	43.86	123.60	105.66	70.00	74.65
n=2	45.18	122.50	102.56	75.32	75.31
n=3	46.29	118.06	102.78	72.65	79.30
n=4	48.06	118.73	107.87	74.87	76.87
n=5	44.08	121.39	104.11	73.43	74.45
n=6	43.86	121.17	101.89	74.65	76.22
n=7	44.96	123.38	105.22	74.22	74.34
n=8	45.41	119.17	102.78	-	76.20
Average	45.21	121	104.1	73.59	75.92
SD	1.43	2.14	2.02	1.82	1.65

ตารางที่ 14 แสดงข้อมูลระดับ HDL - Cholesterol (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ LDL - Cholesterol (mg/dl)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2	เดือนที่2
n=1	21.69	236.29	73.51	111.45	74.99
n=2	24.56	237.25	75.18	106.55	74.86
n=3	23.10	213.53	74.96	118.85	70.71
n=4	22.09	263.16	68.44	108.93	77.67
n=5	17.37	391.24	72.03	109.03	78.13
n=6	17.14	272.14	72.01	118.42	77.32
n=7	22.61	261.58	72.87	110.94	75.54
n=8	19.70	251.48	71.05	-	73.35
Average	21.03	265.83	72.50	112.02	75.32
SD	2.70	5.41	2.18	4.78	2.47

ตารางที่ 15 แสดงข้อมูลระดับ LDL - Cholesterol (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ BUN (mg/dl)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	21	14	56	28	44
n=2	22	18	81	27	41
n=3	24	11	45	45	28
n=4	21	20	50	39	35
n=5	17	19	25	53	41
n=6	20	22	32	39	34
n=7	25	16	38	31	39
n=8	31	38	48	-	41
Average	22.63	19.9	46.9	32.8	37.9
SD	4.17	8.20	17.07	9.52	5.20

ตารางที่ 16 แสดงข้อมูลระดับ BUN (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ Creatinine (mg/dl)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	0.9	0.9	3.2	1.8	2.7
n=2	0.8	0.8	4.5	1.0	2.4
n=3	0.9	0.9	2.4	2.0	1.8
n=4	0.8	0.9	2.5	1.7	1.7
n=5	0.9	1.1	1.5	3.1	1.7
n=6	0.8	0.8	2.1	1.7	1.6
n=7	0.8	1.0	2.1	2.1	1.6
n=8	1.0	1.9	1.8	-	1.6
Average	0.8	1.04	2.52	1.7	1.9
SD	0.07	0.36	0.95	0.63	0.42

ตารางที่ 17 แสดงข้อมูลระดับ Creatinine (mg/dl) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ SGOT (IU/L)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	108	120	369	261	201
n=2	69	123	303	115	230
n=3	60	76	152	4	155
n=4	66	80	165	257	134
n=5	63	97	184	-	136
n=6	66	107	154	298	129
n=7	73	449	297	150	212
n=8	81	274	415	-	178
Average	73.30	166.00	254.90	180.80	171.90
SD	15.45	130.60	104.60	111.8	39.10

ตารางที่ 18 แสดงข้อมูลระดับ SGOT (IU/L) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ SGPT (IU/L)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	21	65	77	53	63
n=2	20	67	64	24	85
n=3	14	23	18	234	41
n=4	15	33	42	146	41
n=5	14	40	147	154	94
n=6	21	40	88	151	51
n=7	27	263	160	49	58
n=8	25	105	220	-	72
Average	19.60	79.50	102.00	95.10	79.20
SD	4.90	78.5	92.40	75.70	19.50

ตารางที่ 19 แสดงข้อมูลระดับ SGPT (IU/L) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ ALP (IU/L)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	47	148	127	-	245
n=2	68	176	-	-	-
n=3	50	132	785	205	224
n=4	51	96	497	131	172
n=5	56	74	554	-	341
n=6	75	104	511	181	227
n=7	86	134	528	468	860
n=8	101	243	615	-	457
Average	66.75	138.30	596.10	246.30	261.20
SD	19.40	53.00	354.80	151.00	239.60

ตารางที่ 20 แสดงข้อมูลระดับ ALP (IU/L) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ NO ในสมอง (umol/mg protein)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	289.50	662.60	127.40	158.40	113.30
n=2	312.40	334.50	195.50	144.40	98.00
n=3	183.90	275.80	151.80	245.60	159.50
n=4	232.70	647.80	139.10	116.60	89.20
n=5	144.80	350.10	212.70	167.80	113.30
n=6	173.80	250.70	258.30	106.50	125.40
n=7	270.20	300.50	177.40	61.60	118.00
n=8	165.40	207.50	83.90	-	126.00
Average	221.60	378.68	168.30	142.98	117.83
SD	63.40	176.50	54.30	57.78	21.09

ตารางที่ 21 แสดงข้อมูลระดับ NO ในสมอง (umol/mg protein) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ NO ในเลือด (umol/ml)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	35.80	26.80	37.80	24.80	34.30
n=2	43.30	21.30	36.80	23.80	32.30
n=3	38.80	25.80	37.30	24.30	34.80
n=4	30.30	19.30	23.80	23.30	28.80
n=5	24.80	18.30	24.80	28.30	34.80
n=6	27.30	18.80	29.80	32.80	29.80
n=7	42.30	23.30	29.80	31.30	32.30
n=8	41.80	18.30	42.80	-	28.30
Average	35.55	21.48	32.86	26.94	31.92
SD	7.23	3.43	6.80	3.86	2.67

ตารางที่ 22 แสดงข้อมูลระดับ NO ในเลือด (umol/ml) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ MDA ในสมอง (umol/mg protein)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	109.40	146.10	44.50	81.80	60.50
n=2	84.00	134.30	68.20	53.20	69.40
n=3	79.40	126.20	31.90	51.10	35.40
n=4	25.10	117.40	29.40	13.70	55.70
n=5	25.70	46.60	-2.90	-0.82	4.90
n=6	5.20	85.90	1.40	5.02	8.90
n=7	38.20	54.10	25.90	36.80	15.60
n=8	32.40	77.20	13.10	-	16.10
Average	49.90	98.50	26.43	34.40	33.30
SD	36.28	37.70	23.20	30.00	25.52

ตารางที่ 23 แสดงข้อมูลระดับ MDA ในสมอง (umol/mg protein) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ระดับ MDA ในเลือด (umol/ml)					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	4.96	11.90	8.27	4.26	8.57
n=2	7.48	11.30	7.28	9.16	5.80
n=3	6.89	11.29	7.13	7.28	9.32
n=4	6.10	12.08	8.23	9.06	9.46
n=5	9.46	12.63	9.26	19.41	7.58
n=6	9.42	13.87	9.70	7.93	11.02
n=7	6.39	13.37	9.76	8.82	9.96
n=8	5.90	10.05	10.40	-	9.78
Average	7.07	12.06	8.75	9.41	8.93
SD	1.63	1.23	1.21	4.72	1.61

ตารางที่ 24 แสดงข้อมูลระดับ MDA ในเลือด (umol/ml) ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebral cortex (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	5.10	12.30	10.20	7.10	1.90
n=2	4.20	6.30	8.70	15.20	8.30
n=3	5.70	12.80	5.80	6.10	6.80
n=4	4.20	10.80	10.00	9.20	7.70
n=5	9.50	7.90	10.40	8.10	7.60
n=6	3.60	28.80	10.90	10.00	6.10
n=7	5.90	14.80	2.80	5.80	6.60
n=8	-	14.80	12.50	-	4.60
Average	5.45	13.56	8.91	8.78	6.20
SD	1.97	6.86	3.13	3.22	2.08

ตารางที่ 25 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebral cortex (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebellum (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	10.10	-	-	9.30	9.60
n=2	12.50	12.10	13.30	8.70	8.60
n=3	7.90	15.70	10.40	9.10	6.80
n=4	8.70	10.80	10.20	9.80	7.60
n=5	8.90	10.90	11.00	9.40	8.60
n=6	9.70	10.30	11.30	8.20	8.00
n=7	9.50	11.60	8.80	-	8.90
n=8	-	12.30	10.80	-	9.80
Average	9.61	11.95	10.82	9.08	8.48
SD	1.46	1.8	1.35	0.56	1.00

ตารางที่ 26 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebellum (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Hippocampus (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	5.50	-	-	11.80	5.40
n=2	5.60	18.60	-	3.20	5.90
n=3	4.20	14.40	3.10	8.10	9.20
n=4	9.20	21.50	5.60	-	8.20
n=5	6.10	11.00	10.50	-	9.00
n=6	6.70	20.20	13.00	-	10.80
n=7	-	22.10	4.40	-	-
n=8	-	20.80	9.80	-	-
Average	6.21	18.37	7.73	7.70	8.08
SD	1.68	4.15	3.92	4.31	2.07

ตารางที่ 27 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Hippocampus (เซลล์) ย้อมด้วย H&E stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebral cortex (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	5.20	12.50	7.60	2.90	5.10
n=2	5.40	13.30	6.60	6.30	6.50
n=3	7.10	13.10	4.70	9.30	4.60
n=4	4.60	12.30	5.60	6.20	4.00
n=5	7.70	26.00	6.70	4.50	4.60
n=6	5.50	4.20	5.00	5.10	4.70
n=7	2.60	10.50	3.30	7.90	6.50
n=8	-	17.80	-	-	1.90
Average	5.44	13.71	5.64	6.02	4.73
SD	1.67	6.24	1.45	2.13	1.46

ตารางที่ 28 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebral cortex (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebellum (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	8.10	9.50	7.20	8.30	5.90
n=2	9.10	15.50	8.10	7.80	5.50
n=3	10.80	13.90	6.30	8.50	8.50
n=4	7.90	11.70	10.70	9.00	4.50
n=5	10.10	14.80	7.90	9.20	8.30
n=6	7.70	15.80	7.70	8.90	6.90
n=7	7.50	8.30	8.90	3.40	11.50
n=8	-	-	-	-	-
Average	8.74	12.78	8.11	7.87	7.30
SD	1.28	2.99	1.39	2.03	2.35

ตารางที่ 29 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Cerebellum (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Hippocampus (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain					
กลุ่มทดลอง	ND	HF	HF+Fenofibrate	HF+GSE0.5%	HF+GSE1.0%
n=1	7.00	14.80	3.90	15.80	7.80
n=2	6.90	19.80	2.80	4.10	6.50
n=3	11.10	13.00	2.10	7.10	3.80
n=4	14.90	31.20	5.00	-	10.20
n=5	4.20	16.50	6.00	-	6.40
n=6	6.00	24.50	-	-	2.80
n=7	-	11.20	-	-	6.90
n=8	-	-	-	-	-
Average	8.35	18.71	3.96	9.00	6.34
SD	3.92	7.06	1.58	6.07	2.46

ตารางที่ 30 แสดงข้อมูลจำนวน Dark neurons ในสมองส่วน Hippocampus (เซลล์) ย้อมด้วย Cresyl violet stain ของหนูแรททั้ง 5 กลุ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว อูษา ชัยมาต เกิดเมื่อวันที่ 11 มีนาคม 2521 จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีเทคนิคการแพทย์ จากมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เมื่อปีการศึกษา 2544 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2549



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย