

ผลของว่านหางจระเข้ต่อการลดการอักเสบ และการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรท ที่มีภาวะตับ
อักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2558
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects of *Aloe vera* on inflammation and apoptosis in rat with non-
alcoholic steatohepatitis

Miss Jutamas Wongphoom



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

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2015

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของวุ้นหางจระเข้ต่อการลดการอักเสบ และการตาย
ของเนื้อเยื่อตับในหนูแรท ที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลง
ตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

โดย

นางสาวจุฑามาศ วงศ์ภูมิ

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นฤมล คล้ายแก้ว

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดวงพร วีระวัฒนกานนท์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วีชรสินธุ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง นฤมล คล้ายแก้ว)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดวงพร วีระวัฒนกานนท์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิไล อโนมะศิริ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ สุพีชา วิทย์เลิศปัญญา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ แพทย์หญิง บุษผา พรธิดาร)

จุฑามาศ วงศ์ภูมิ : ผลของว่านหางจระเข้ต่อการลดการอักเสบ และการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรท ที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ (Effects of *Aloe vera* on inflammation and apoptosis in rat with non-alcoholic steatohepatitis) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. พญ. นฤมล คล้ายแก้ว, อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. พญ. ดวงพร วีระวัฒนกานนท์, 111 หน้า.

โรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์หรือ Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) เป็นโรคตับที่เป็นปัญหาสำคัญของโลก พบในผู้ที่มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน มีภาวะอ้วน โดยจะพบการสะสมเม็ดไขมันทั้งแบบใหญ่และแบบเล็ก รวมทั้งพบการอักเสบเกิดขึ้นในเนื้อตับเมื่อส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์ หากมีการพัฒนาความรุนแรงของโรคเกิดขึ้นจะทำให้เกิดภาวะตับแข็ง จนอาจกลายเป็นมะเร็งตับได้ในที่สุด แต่ปัจจุบันยังไม่มียาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้โดยเฉพาะเจาะจง ในงานวิจัยนี้เป็นการรักษาทางเลือกโดยใช้สมุนไพร คือว่านหางจระเข้ในการรักษาและป้องกันภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ โดยทำการทดลองในหนูแรทสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้ แบ่งเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่ม NASH และกลุ่ม *Aloe* โดยในกลุ่มควบคุม จะให้อาหารปกติ กลุ่ม NASH จะให้อาหารที่มีไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง และกลุ่ม *Aloe* จะให้อาหารที่มีไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูงร่วมกับการให้ว่านหางจระเข้ 50 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม ทางท้อให้อาหารทุกวัน โดยทุกกลุ่มการทดลองให้อาหารและน้ำแบบไม่จำกัด ทำการทดลองจนครบ 8 สัปดาห์จึงนำหนูทดลองมาทำการวิเคราะห์ โดยจะแบ่งออกเป็น ส่วนของซีรัมนำมาวิเคราะห์ระดับเอนไซม์ aspartate transaminase (AST) และ alanine transaminase (ALT) และ ส่วนของเนื้อเยื่อตับ นำมาตรวจดูระดับของ malondialdehyde (MDA) และ glutathione (GSH) การแสดงออกของ peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) การแสดงออกของ interleukin-18 (IL18) การตายแบบ apoptosis และดูลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ

จากการทดลองพบว่าหนูในกลุ่ม NASH พบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ โดยพบเม็ดไขมันทั้งแบบใหญ่และแบบเล็ก มีการบวมของเซลล์ รวมทั้งพบเซลล์อักเสบเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่ามีระดับ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีระดับของ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของ PPAR γ ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของ IL-18 การตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ระดับของเอนไซม์ AST เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

และเมื่อมีการให้ว่านหางจระเข้ 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัมพบว่ามิลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพดีขึ้น โดยพบการสะสมของเม็ดไขมัน การบวมของเซลล์และเซลล์อักเสบลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH นอกจากนี้พบว่ามีระดับ MDA เอนไซม์ AST ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ระดับของ GSH เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของ PPAR γ เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การแสดงออกของ IL-18 และการตายแบบ apoptosis ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH

สรุปได้ว่าว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม สามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มการแสดงออกของ PPAR γ และลดการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรทที่ให้อาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง จึงมีผลทำให้พยาธิสภาพของตับดีขึ้น ดังนั้นผลการศึกษาดังกล่าวจึงสนับสนุนผลของว่านหางจระเข้ในครั้งนี้ จึงอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการรักษาและป้องกันโรคไขมันในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2558

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาร่วม

5674015630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS, ALOE VERA, APOPTOSIS, INFLAMMATION, PPAR γ

JUTAMAS WONGPHOOM: Effects of *Aloe vera* on inflammation and apoptosis in rat with non-alcoholic steatohepatitis. ADVISOR: ASSOC. PROF. NARUEMON KLAIKAEW, M.D., CO-ADVISOR: PROF. DUANGPORN WERAWATGANON, M.D., 111 pp.

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is one of the liver diseases that composed features of macro vesicular and micro vesicular fat, hepatocellular ballooning and lobular inflammation on histopathological examination. Although, the prevalence of NASH is increasing, the sufficient medicines of this disease has not been proposed. The aim of this study was to examine the effects of *Aloe vera* on inflammation and apoptosis in rat with NASH. Male Sprague - Dawley rats were randomly allocated into 3 groups divided 6 rats in each group. In control group, rats were fed ad libitum with standard diet. In NASH group, rats were fed ad libitum with high-fat high-fructose diet (HFHFD) to induce NASH. In *Aloe* group, rats were fed ad libitum with HFHFD plus 50 mg/kg of *Aloe vera* in distilled water by gavage once daily. After 8 weeks of the experiment, all rats were sacrificed to collect blood and liver samples for biochemical analysis. The liver enzymes; aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT), were examined in the serum. Malondialdehyde (MDA), glutathione (GSH), interleukin-18 (IL18) expression, peroxisome proliferators-activated receptor gamma (PPAR γ) expression, hepatocytes apoptosis and histopathology were determined in liver samples.

The results demonstrated that aspartate transaminase (AST) levels was increased significantly in the NASH group as compared with the control group. The level of hepatic MDA and IL-18 showed significantly increased, whereas, hepatic GSH level was decreased in NASH group. Moreover, the apoptosis of hepatocytes increased in NASH group. In addition, rats in NASH group showed significantly lower PPAR γ expression than rats in control group.

A compared with the NASH group, the *Aloe vera* treated group showed significantly decreased in the hepatic levels of MDA, IL-18 and hepatocytes apoptosis. The hepatic GSH level and PPAR γ expression in *Aloe* group were significantly increased. In addition, serum level of AST significantly decreased in *Aloe* group. The liver histopathology of NASH group showed macro and micro vesicular fat, hepatocellular ballooning and inflammation. Moreover, *Aloe* group demonstrated an improvement of liver histopathology. In conclusion, *Aloe vera* may attenuate oxidative stress, inflammation and hepatocytes apoptosis in the liver of rats diet-induced to NASH, which contribute to improve liver histopathology in NASH rat.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2015

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนฤมล คล้ายแก้ว อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ แพทย์หญิง ดวงพร วีระวัฒกานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่เมตตาและเสียสละเวลาในการให้คำปรึกษา รวมทั้งชี้แนะแนวทาง อันเป็นประโยชน์ในการเรียนและการทำการวิจัยเสมอมา

ขอขอบพระคุณอาจารย์ปรีชา เรืองเวชวรชัย คุณเทียมจิต ไชยชนะ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ที่คอยช่วยเหลือในด้านเทคนิคที่ใช้ในการวิจัย ตลอดจนสนับสนุนช่วยเหลืองานวิจัยชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ขอบพระคุณ คุณอาทิตย์ ชันทบัณฑิต คุณวรัญญา อาจหาญ คุณกัลยา เต่าทอง และเพื่อนนิสิต ภาควิชาสรีรวิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยาทุกคนที่คอยให้กำลังใจและช่วยเหลือการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยให้การสนับสนุน ให้คำปรึกษา เป็นกำลังใจอันยิ่งใหญ่ และเป็นแรงผลักดันที่สำคัญในชีวิตเสมอมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1	11
บทนำ.....	11
บทที่ 2	16
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	16
ลักษณะเซลล์ภายในตับ	17
ระบบไหลเวียนเลือดในตับ	19
ปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะตับอักเสบ.....	21
กลไกการเกิดไขมันลงตับ	22
การเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในตับ.....	26
ความสำคัญของพีพาร์ (PPAR) ต่อตับ.....	28
การอักเสบและการตายของเซลล์ตับ.....	29
ว่านหางจระเข้ (<i>Aloe vera</i>).....	32
คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์.....	33
บทที่ 3	39
อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย	39
อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย.....	39

การเตรียมสไลด์ทดลอง	42
การตรวจหาระดับของซีรั่ม ALT and AST	43
การตรวจหาระดับของ malondialdehyde (MDA) ในตับ	44
การตรวจหาระดับของ glutathione (GSH).....	47
การตรวจเนื้อเยื่อตับทางพยาธิวิทยา	49
การย้อม hematoxylin & eosin.....	49
การบันทึกข้อมูลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ	50
ขั้นตอนการทำ manual tissue microarray block.....	53
ขั้นตอนการ เตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการย้อม Immunohistochemistry	54
การย้อม.....	55
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	58
บทที่ 4	59
ผลการวิจัย	59
การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูแรท	59
การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของหนูแรท	60
การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของตับในหนูแรท	61
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ serum AST	62
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ serum ALT	63
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของ hepatic MDA	64
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของ hepatic GSH.....	65
การศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของ Immunoreactive ของ IL18	66
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Immunoreactive ใน PPAR γ	68
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis โดยการย้อม TUNEL.....	70

ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ	72
บทที่ 5	77
วิเคราะห์และสรุปผลวิจัย.....	77
ผลของว่านหางจระเข้ต่อภาวะการเกิดไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์	81
รายการอ้างอิง	85
ภาคผนวก.....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	110



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ตารางแสดงการทำ MDA standards.....	45
ตารางที่ 2	ตารางแสดงการทำ GSH standards	48
ตารางที่ 3	ตารางแสดงการให้คะแนนลักษณะทางพยาธิสภาพในเนื้อตับ	72



สารบัญภาพ

รูปที่ 1 ภาพแสดงลักษณะของ hepatocyte cells เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์	17
รูปที่ 2 ภาพแสดงลักษณะของเซลล์ตับชนิดต่าง ๆ	18
รูปที่ 3 ภาพแสดงลักษณะ liver acinus	20
รูปที่ 4 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของภาวะ insulin resistance กั้กับการเกิด steatosis.....	22
รูปที่ 5 ภาพแสดงลักษณะของเม็ดไขมันแบบใหญ่.....	25
รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะของเม็ดไขมันแบบเล็ก	24
รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดไขมันสะสมในเนื้อตับ	24
รูปที่ 8 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดการบวมของตับ	25
รูปที่ 9 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดการอักเสบ	25
รูปที่ 10 ภาพแสดงลักษณะตำแหน่งการจับของ Peroxisome proliferator activated receptors	28
รูปที่ 11 ภาพแสดงลักษณะลำต้นและใบของว่านหางจระเข้	32
รูปที่ 12 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร aloe-emodin และ aloin	34
รูปที่ 13 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร acemanan.....	34
รูปที่ 14 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร β sitosterol	35
รูปที่ 15 ภาพแสดง เครื่อง Reflotron® Plus.....	43
รูปที่ 16 ภาพแสดงค่า standard curve ของ MDA.....	46
รูปที่ 17 ภาพแสดง ค่า standard curve ของ GSH.....	48
รูปที่ 18 ภาพแสดงการให้คะแนนของจำนวนของเม็ดไขมันในตับ	50
รูปที่ 19 ภาพแสดงการให้คะแนนการเกิดการอักเสบในตับ	51
รูปที่ 20 ภาพแสดงการให้คะแนนการบวมในตับ.....	52
รูปที่ 21 ภาพแสดงชุดอุปกรณ์ทำ manual tissue microarray	53

รูปที่ 22	ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของ PPAR γ	56
รูปที่ 23	ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของ IL18.....	56
รูปที่ 24	ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของการตายแบบ apoptosis	57
รูปที่ 25	ภาพแสดงลักษณะโปรแกรม aperio imagescope.....	57
รูปที่ 26	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของหนูแรททั้งสามกลุ่ม.....	59
รูปที่ 27	ภาพแสดงลักษณะภายนอกของหนูแรทแต่ละกลุ่ม.....	60
รูปที่ 28	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของตับในหนูแรททั้งสามกลุ่ม	61
รูปที่ 29	ภาพแสดงระดับของเอนไซม์ AST	62
รูปที่ 30	ภาพแสดงระดับของเอนไซม์ ALT	63
รูปที่ 31	ภาพแสดงระดับของ hepatic MDA	64
รูปที่ 32	ภาพแสดงระดับของ GSH.....	65
รูปที่ 33	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน IL18	66
รูปที่ 34	ภาพแสดงระดับของ IL18	67
รูปที่ 35	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ immunoreactive ใน PPAR γ	68
รูปที่ 36	ภาพแสดงระดับเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกด้วยการย้อม immuno ใน PPAR γ ...	69
รูปที่ 37	ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงการตายแบบ apoptosis.....	70
รูปที่ 38	ภาพแสดงระดับการเกิด apoptosis.....	71
รูปที่ 39	ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม control	74
รูปที่ 40	ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม NASH.....	75
รูปที่ 41	ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม Aloe	76

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

คำย่อ	=	คำเต็ม
NASH	=	Nonalcoholic steatohepatitis
NAFLD	=	Non alcoholic fatty liver disease
ALT	=	Alanine transaminase
AST	=	Aspartate transaminase
LDL	=	Low density lipoprotein
HDL	=	High density lipoprotein
MDA	=	Malondialdehyde
ROS	=	Reactive oxygen species
GSH	=	Glutathione
RXR	=	Retinoic acid receptor
FFA	=	Free fatty acid
HFHFD	=	High-fat high-fructose diet
HFD	=	High-fat diet
IL	=	Interleukin
iNOS	=	Inducible nitric oxide synthase
JNK	=	c-Jun N-terminal kinase
LPS	=	Lipopolysaccharides
OTG	=	Triglyceride
TNF α	=	Tumor necrosis factor alpha

VLDL	=	Very low density lipoprotein
HDL	=	high-density lipoprotein
NK cell	=	Natural killer cell
OD	=	Optical density
PBS	=	Phosphate buffer saline
PPAR γ	=	Peroxisome proliferators-activated receptor gamma
PLP	=	Pyridoxalphosphate
RIPA	=	Radioimmunoprecipitation assay
SD	=	Standard deviation
SREBP-1c	=	Sterol regulatory element binding protein-1c
TBA	=	Thiobarbituric acid
TBARS	=	Thiobarbituric acid reactive substances
DAB	=	Diaminobenzidine
TRADD	=	TNFR1-associated death domain protein
RIP	=	Receptor interacting protein
DD	=	Death domains
NF- κ B	=	Nuclear factor kappa B
FADD	=	Fas associated death domain
DED	=	Death effector d

บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาทางวิจัย (Background and Rationale)

โรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ (Non alcoholic fatty liver disease; NAFLD) เป็นโรคตับที่เป็นปัญหาสำคัญของโลก ⁽¹⁾ โดยโรคตับชนิดนี้จะพัฒนาความรุนแรงของโรคมีการอักเสบร่วมด้วยเป็น Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) NAFLD เป็นลักษณะของโรคไขมันสะสมในตับ จะปรากฏลักษณะของเม็ดไขมันทั้งแบบเล็กและใหญ่เกิดขึ้น (macrovesicular และ microvesicular) ในเซลล์ตับ สามารถมองเห็นได้อย่างชัดเจนเมื่อนำมาทำการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อมีการพัฒนาไปเป็น NASH จะพบว่ามีอาการอักเสบปรากฏร่วมด้วยในเนื้อตับ สมมติฐานการเกิด NAFLD ปัจจุบันยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่มีสมมติฐานที่น่าสนใจคือสมมติฐาน the “two-hit” hypothesis ซึ่งจะพบการเกิดไขมันสะสมในตับของผู้ป่วยที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์มีสองระยะการเกิด กล่าวคือ ระยะแรก (the first hit) เป็นระยะที่พบไขมันสะสมในตับ พบทั้งแบบขนาดเม็ดใหญ่และเล็ก เมื่อมีการสะสมของไขมันเพิ่มขึ้น และเกิดความเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) จนพัฒนาไปสู่ระยะที่สอง (second hit) ซึ่งจะมีอาการอักเสบ และอาจมีการพัฒนาความรุนแรงของโรคเกิดเป็นเนื้อเยื่อพังผืด ซึ่งเป็นลักษณะของเนื้อเยื่อคอลลาเจนในเนื้อตับร่วมด้วย เนื้อเยื่อพังผืดจะทำให้ตับการทำงานตามปกติเสียไป เกิดภาวะตับแข็งได้ในที่สุด ⁽²⁾ ผู้ที่เป็นโรค NASH มักพบภาวะอื่นร่วมด้วย เช่นภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ⁽³⁾ ความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง พันธุกรรม ^(4, 5) และมักมีน้ำหนักเกินมาตรฐานหรือเป็นโรคอ้วน ซึ่งสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งมาจากการรับประทานอาหารที่มีไขมัน แป้ง และน้ำตาลฟรุกโทส เป็นประจำ เช่น การดื่มน้ำหวาน ชาเขียวที่มีปริมาณน้ำตาลสูง นอกจากนี้การรับประทานอาหารในมื้อเย็นในปริมาณมากและร่างกายมักนำพลังงานไปใช้ไม่ทัน จึงแปรรูปพลังงานที่ได้รับเกินขนาดมาสะสมเป็นไขมันตามร่างกายและในอวัยวะภายใน โดยเฉพาะที่ตับ ^(1, 4, 5) สาเหตุดังกล่าวจึงเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เกิดโรคอ้วน นำไปสู่การกระตุ้นให้เกิดไขมันเข้ามาสะสมบริเวณตับ และโดยเฉพาะถ้ามีน้ำตาลฟรุกโทสเป็นตัวหลัก จะเป็นตัวกระตุ้นทำให้เกิดการสะสมของไขมันและเกิดความเป็นพิษในตับ โดยจะกระตุ้นและเพิ่มระดับไตรกลีเซอไรด์ ระดับคลอเลสเทอรอล การอักเสบของเซลล์ตับ ^(6, 7) จนทำให้เกิดความบกพร่องของการแสดงออกในหน้าที่ของ glutathione,

lipid peroxidation , inflammatory และ apoptosis ซึ่งนำไปสู่ภาวะตับอักเสบและพังผืดในที่สุด (8, 9)

ยาที่ใช้ในการรักษาของโรคนี้ มักเป็นยาที่รักษาภาวะดื้ออินซูลิน⁽¹⁰⁾ โดยมียาที่ใช้รักษาอาการอยู่สองกลุ่มได้แก่ metformin และ thiazolidinediones โดยจะเป็นตัวกระตุ้น peroxisome proliferator-activated gamma receptor (PPAR γ) ทำให้การเมตาบอลิซึมไขมันและน้ำตาลดีขึ้น จึงทำให้ลดการอักเสบและลดการเกิดพังผืดที่ตับ^(10, 11) แม้ว่าโรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์จะเป็นโรคที่พบได้ทั่วไป แต่ก็ยังไม่มียาใดที่รักษาโรคนี้ได้อย่างเฉพาะเจาะจง

ดังนั้นการรักษาทางเลือกจึงเป็นอีกวิธีที่น่าสนใจเพื่อช่วยลดการสะสมของไขมันที่ตับ พบว่ามีการศึกษาประโยชน์ของว่านหางจระเข้ ที่สามารถเพิ่มระดับการแสดงออกของ PPAR γ ซึ่งเป็น receptors ที่สำคัญที่ช่วยในการลดการสะสมไขมันในตับของหนูแรท⁽¹²⁾ ว่านหางจระเข้เป็นพืชสมุนไพรที่มีลักษณะเป็นใบแข็ง ขอบมีหยักรั้งคล้ายหนามแหลม ด้านในเห็นเป็นวุ้นใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น พบขึ้นตามภูมิภาคต่าง ๆ ทั่วไปในโลก มีมานาน มักใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ทั่วไป โรคที่นิยมใช้คือการรักษาแผลน้ำร้อนลวก พุพอง พบว่าสามารถลดอาการอักเสบและบวมแดง ลดอนุมูลอิสระ⁽¹³⁾ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์เป็นยาระบาย ช่วยรักษาแผลในกระเพาะอาหารได้ดี⁽¹⁴⁾ ว่านหางจระเข้ประกอบด้วยสารสำคัญหลายชนิด ช่วยตัวกระตุ้นการทำงานของตับให้ทำงานได้ดีขึ้น⁽¹⁵⁾ โดยช่วยกำจัดของเสียที่เป็นพิษต่อตับอย่างช้า ๆ ลดการเกิดการตายแบบ apoptosis ภายในเซลล์ตับ^(14, 15) จึงอาจเป็นไปได้ว่า ว่านหางจระเข้จะสามารถป้องกันและลดการเกิดโรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยที่ใช้ว่านหางจระเข้ ในการลดการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาผลของว่านหางจระเข้ในการเปลี่ยนแปลงระดับของซีรั่ม AST , ALT การปรับปรุงลักษณะทางพยาธิสภาพ การเปลี่ยนแปลงระดับของGSH ผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ PPAR γ , IL18 ใน macrophages ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและศึกษาการตายแบบ apoptosis ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรท ที่เป็นโรคไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

2. คำถามงานวิจัย (Research Questions)

ว่านหางจระเข้สามารถลดระดับของซีรัม AST , ALT ระดับของ GSH ลดการอักเสบ และการตาย ทำให้พยาธิวิทยาของตับในหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจาก แอลกอฮอล์ดีขึ้นได้หรือไม่ ?

3. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Research Objective)

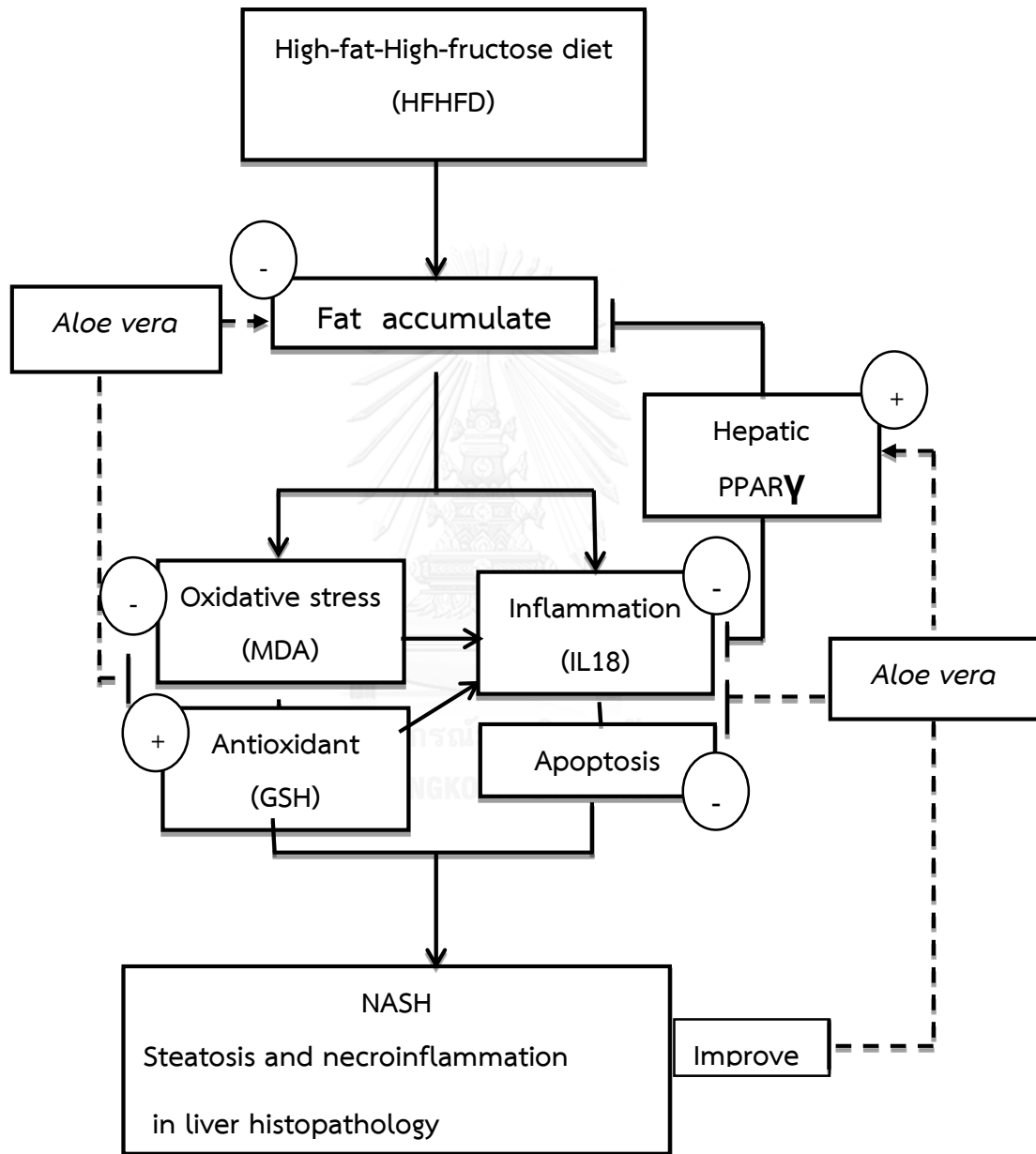
1. เพื่อศึกษาผลของว่านหางจระเข้ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ GSH ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
2. เพื่อศึกษาผลของว่านหางจระเข้ต่อการเปลี่ยนแปลงของ PPAR γ ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
3. เพื่อศึกษาผลของว่านหางจระเข้ต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของ IL18 ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
4. เพื่อศึกษาผลของว่านหางจระเข้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
5. เพื่อศึกษาผลของว่านหางจระเข้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงผลทางพยาธิวิทยา (histopathology) ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

4. สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

- 1.ว่านหางจระเข้มีผลเพิ่มระดับของ GSH ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
- 2.ว่านหางจระเข้มีผลเพิ่มระดับของ PPAR γ ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
- 3.ว่านหางจระเข้มีผลลดระดับของ IL18 ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์
- 4.ว่านหางจระเข้มีผลลดระดับการเกิด apoptosis ในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

5. ว่านหางจระเข้มีทำให้ผลทางพยาธิวิทยาดีขึ้นในเนื้อเยื่อตับของหนูแรทที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

5. กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)



6. ข้อตกลงเบื้องต้น (Assumption)

สัตว์ทดลองทุกตัวไม่มีความแตกต่างกัน

7. คำสำคัญ (Keywords)

non-alcoholic steatohepatitis, *Aloe vera*, apoptosis, inflammation, PPAR γ , IL18.

8. รูปแบบงานวิจัย (Research Design)

เป็นการทดลองโดยศึกษาในหนูทดลอง (Animal experimental design)

9. ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

ทำให้ทราบผลของว่านหางจระเข้ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ ALT , AST, GSH, IL 18, PPAR γ , apoptosis ในตับของหนูแรทที่อยู่ในภาวะไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ ซึ่งอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกเพื่อลดและป้องกันการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อตับ ซึ่งปัจจุบันยังไม่มียาที่รักษาภาวะดังกล่าวได้โดยตรง จึงอาจเป็นทางเลือกในการรักษาโรคได้

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ตับเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่และมีความสำคัญมาก อยู่บริเวณใต้ชายโครงด้านขวาของร่างกาย โดยมีลักษณะเป็นสีชมพูอมน้ำตาล ในคนตับมีสี่กลีบ ทางด้านหน้าจะพบเป็นกลีบซ้าย (left lobe) กลีบขวา (right lobe) ทางด้านหลัง จะพบอีกสองกลีบ คือ กลีบคอเดต (caudate lobe) และ กลีบ ควอเดรต (quadrate lobe) ⁽¹⁶⁾

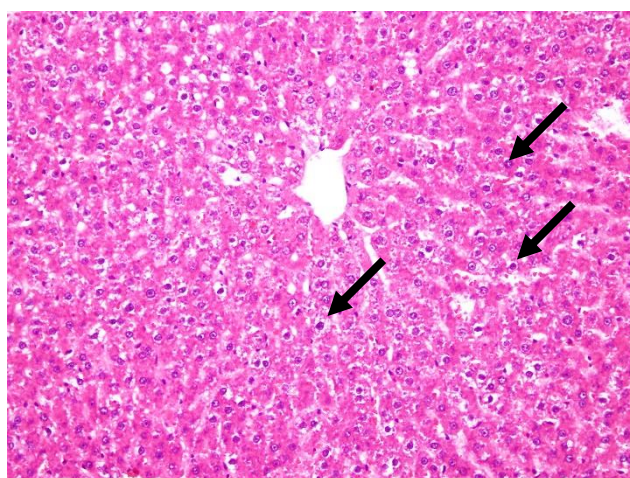
ตับมีหน้าที่สำคัญต่าง ๆ มากมาย เช่น หน้าที่ในการสร้างควบคุมและสลายไขมัน โปรตีน วิตามิน เอ ดี อี เค คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ จากอาหารที่รับประทานไปในแต่ละมื้อให้อยู่ในภาวะสมดุลอยู่เสมอ เมื่อมีการรับประทานอาหารเข้าไปในแต่ละมื้อ จะทำให้มีปริมาณของสารอาหารเพิ่มขึ้น ร่างกายจำเป็นต้องมีการรักษาภาวะสมดุลของสารอาหารในร่างกายโดยการเปลี่ยนแปลงไปในรูปต่าง ๆ เช่น มีการรักษาระดับกลูโคสในร่างกาย ถ้าหากร่างกายเกิดภาวะน้ำตาลกลูโคสสูงจะมีการแปรรูปกลูโคสเข้าไปเก็บในรูปของไกลโคเจน ไปสะสมบริเวณตับและกล้ามเนื้อ หรือเปลี่ยนเป็นไขมัน ถ้าร่างกายอยู่ในสภาวะขาดพลังงาน ร่างกายจะมีการปรับสมดุลโดยการสลายไกลโคเจนออกมาใช้เป็นพลังงาน ซึ่งกระบวนการสลายไกลโคเจนเราเรียกกระบวนการนี้ว่า glycogenolysis นอกจากการควบคุมกลูโคสในร่างกายแล้ว ยังมีการควบคุมระดับของไขมันด้วย เกี่ยวกับไขมันตับมีหน้าที่สร้าง very-low-density lipoprotein หรือ VLDL และ high-density lipoprotein หรือ HDL ซึ่งทั้งสองตัวนี้เกี่ยวข้องกับการขนส่งไขมันประเภทไตรกลีเซอไรด์ออกไปนอกเซลล์ตับ โดยไตรกลีเซอไรด์คือรูปแบบกรดไขมันที่สะสมไว้ในเซลล์ โดย VLDL เมื่อถูกปล่อยไปในกระแสเลือด จะถูกย่อยด้วย เอนไซม์ไลโปโปรตีน และเปลี่ยนรูปเป็น low-density lipoprotein (LDL), intermediate - density lipoprotein (IDL) และ high-density lipoprotein (HDL) ซึ่งไลโปโปรตีนทั้งสามชนิดนี้จะ เป็นแหล่งให้คอเลสเตอรอลแก่อวัยวะต่าง ๆ ภายในร่างกาย

นอกจากนี้ตับยังมีหน้าที่สำคัญในการขับหรือเปลี่ยนรูปของสารเคมี ยา สารพิษ หรือผลผลิตของกระบวนการภายในเซลล์ที่ทำให้เกิดพิษต่อร่างกายให้อยู่ในรูปที่สามารถขับออกทางเหงื่อ ปัสสาวะ จากร่างกายได้ โดยอาจใช้ปฏิกิริยา รีดักชัน (reduction) และออกซิเดชัน (oxidation) ทำการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษให้อยู่ในรูปที่ไม่เป็นพิษ หลังจากนั้นจะใช้ปฏิกิริยาคอนจูเกชัน (conjugation) เป็นการรวมของสารพิษกับสารอื่น ๆ ในเซลล์ เพื่อให้สารพิษนั้นละลายในน้ำได้ดีขึ้น และถูกขับออกทางนอกร่างกาย ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾

ลักษณะเซลล์ภายในตับ

ในตับปกติ ประกอบด้วยด้วยเซลล์กลุ่มใหญ่ๆ 2 ชนิด คือ

1. **Hepatocyte cells** หรือ parenchymal cell เป็นเซลล์ตับที่มีรูปร่างเป็น polygonal cell เรียงตัวเป็นแถว มี endothelial cells อยู่ริมขอบเกิดเป็นช่องว่างเรียก sinusoids ในหนึ่งแถวจะพบเซลล์ตับเรียงตัวหนา 1-2 เซลล์ พบประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ทั้งหมด



รูปที่ 1 ภาพแสดงลักษณะของ hepatocyte cells เมื่อมองด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. **Non-parenchymal cells** หรือเซลล์อื่นซึ่งไม่ใช่เซลล์ตับ ดังรูปที่ 2 ซึ่งแบ่งประเภทได้ดังนี้⁽¹⁷⁾

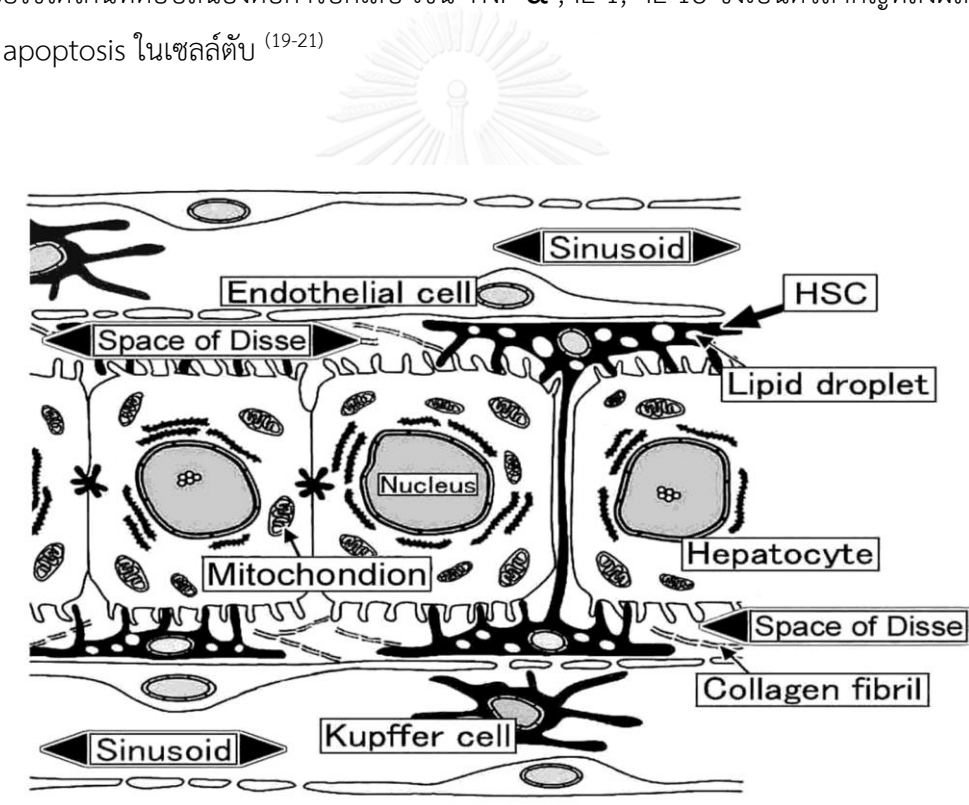
2.1 kupffer cells เป็น macrophage cells ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับ พบว่ามีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปกระสวย พบเกาะที่บริเวณผิวของ endothelial cells และมักจะพบว่ามีารรวมตัวกันเป็นจำนวนมาก ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรียที่เข้ามาทางหลอดเลือด portal vein และกำจัดเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตายแล้ว เป็นต้น⁽¹⁸⁾ นอกจากนี้ kupffer cells บางส่วนยังสร้างเนื้อเยื่อ collagen ขึ้นเมื่อเซลล์ในตับเกิดการตายหรือบาดเจ็บด้วย⁽¹⁷⁾

2.2 stellate cells มีลักษณะเป็นรูปดาว พบมากบริเวณช่องว่างระหว่าง sinusoidal กับ hepatocytes พบว่า stellate cells เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญต่อร่างกายมากเพราะเป็นเซลล์ที่มีการ

เก็บวิตามินเอและเก็บสะสมไขมัน⁽¹⁹⁾ โดย stellate cells เมื่อถูกกระตุ้นจะมีการสร้างคอลลาเจนขึ้นจนกลายเป็นพังพืดภายในตับ^(17, 18)

2.3 sinusoidal endothelial cells หรือเอนโดทีเลียม ซึ่งเป็นเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยพบว่าอยู่บริเวณ sinusoids เป็นเซลล์มีรูปร่างแบน โดยจะพบการเรียงตัวกันที่ผนังหลอดเลือด โดยจะพบ endothelial cells ที่มีช่องว่างระหว่างเซลล์แต่ละเซลล์ เพื่อให้มีการซึมผ่านของสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ตับ⁽²⁰⁾

เมื่อมีสิ่งแปลกปลอมผ่านมาที่ตับ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส kupffer cells จะเคลื่อนที่เข้ามาและคอยเก็บกินเข้าไปในเซลล์ โดยจะเป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และจะมีการปล่อยไซโตไคน์ที่ตอบสนองต่อการอักเสบ เช่น TNF α , IL 1, IL 18 ซึ่งเป็นตัวสำคัญที่ส่งผลต่อการเกิด apoptosis ในเซลล์ตับ⁽¹⁹⁻²¹⁾



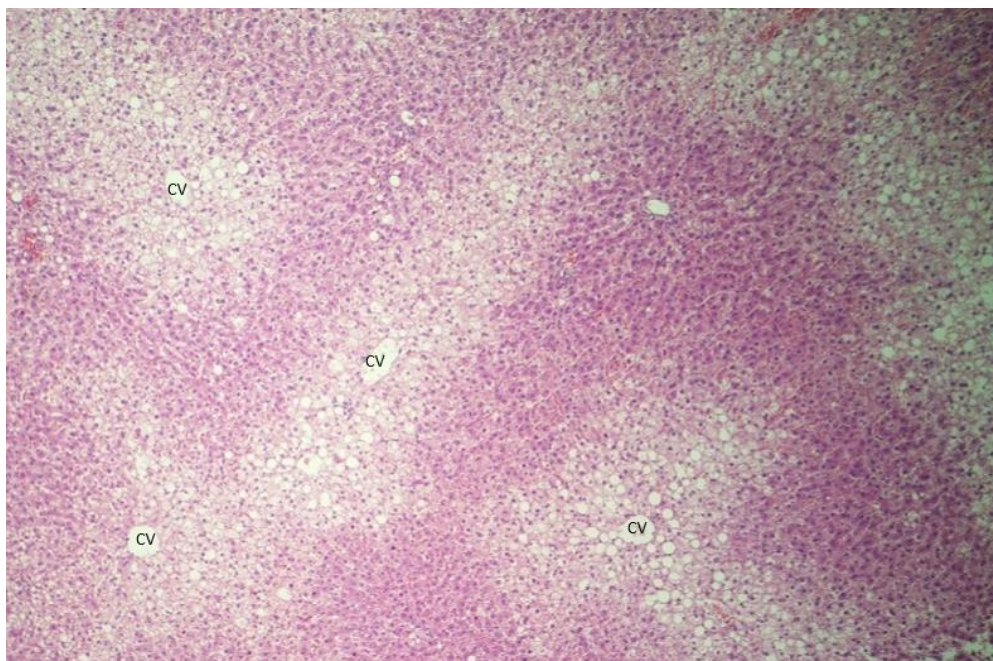
รูปที่ 2 ภาพแสดงลักษณะของเซลล์ตับชนิดต่าง ๆ⁽²²⁾

ระบบไหลเวียนเลือดในตับ

ตับจะมีการไหลเวียนโลหิตของตับจะเป็นแบบ dual blood supply เลือดเข้าไปเลี้ยงในตับ 2 ทางใหญ่ ๆ คือ หลอดเลือดดำพอร์ทัล (hepatic portal vein) โดยคิดเป็นอัตราส่วนจากเลือดทั้งหมดที่เข้าตับคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ และ หลอดเลือดแดง (hepatic artery) จะนำเลือดที่มีออกซิเจนสูงจากหัวใจ เป็นอัตราส่วนจากเลือดทั้งหมดที่เข้าตับคิดเป็น 25 เปอร์เซ็นต์⁽¹⁶⁾

หลอดเลือดดำพอร์ทัล นำเลือดจากระบบทางเดินอาหาร ม้าม และเลือดจากลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ และตับอ่อนโดยเลือดที่เข้าสู่ตับนั้นจะเป็นเลือดที่มีปริมาณออกซิเจนไม่สูงมาก หากแต่มีปริมาณสารอาหารที่ถูกดูดซึมเข้ามา และฮอร์โมนสารเคมีอื่น ๆ ที่ได้จากการดูดซึมจากทางเดินอาหาร นำเข้ามาสู่เพื่อผ่านกระบวนการต่าง ๆ ภายในตับต่อไป โดยลักษณะสมมติทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อตับ จะเป็นรูปหกเหลี่ยมเรียงมาเรียงติดกัน เรียกเป็น classic hepatic lobules และบริเวณที่เป็นมุมของหกเหลี่ยมที่มาเรียงต่อกันกันจะเกิดสามเหลี่ยมเล็ก ๆ เรียกว่า portal triads ดังรูปที่ 3 ซึ่งประกอบไปด้วยท่อสามชนิดคือ หลอดเลือดดำ (portal vein) หลอดเลือดแดงเฮปาติก (hepatic artery) และ แขนงท่อน้ำดี (bile duct)⁽²³⁾ ส่วนของ sinusoids ซึ่งบุด้วย endothelial cells จะมีลักษณะเป็นคลองยาว⁽¹⁸⁾ เมื่อเลือดไหลเข้ามาจะไหลออกจากตับโดยผ่านหลอดเลือด hepatic central vein ซึ่งอยู่ตรงกลางในแต่ละ lobules เข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตเพื่อนำเลือดกลับเข้าสู่หัวใจต่อไป⁽¹⁶⁾

บริเวณที่ได้รับสารอาหารและออกซิเจนในปริมาณที่สูงจะอยู่ในบริเวณที่มีเลือดที่มาจาก portal vein ไหลผ่าน บริเวณนี้มักจะไม่พบการอักเสบและการตายของเซลล์ตับ เราเรียกบริเวณนี้ว่า โซนที่ 1 ซึ่งจะแตกต่างจากบริเวณโซนที่ 3 ที่มักเกิดการอักเสบ การถูกทำลายจากเชื้อโรคและมีการตายของเซลล์ตับได้ง่ายกว่า บริเวณโซนที่ 3 เป็นบริเวณที่จะพบเส้นเลือด central vein ซึ่งเป็นเส้นเลือดที่นำของเสียออกจากตับ และส่วนโซนที่ 2 เป็นบริเวณที่มีปริมาณออกซิเจนและสารอาหารที่อยู่ระหว่างโซนที่ 1 และ 3⁽¹⁶⁾



รูปที่ 3 ภาพแสดงลักษณะ liver acinus

โดยในรูปแสดงภาพของเซลล์ตับ โดยทำการศึกษาจากกล้องจุลทรรศน์ เมื่อทำการย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin จะพบลักษณะของเซลล์ตับเกิดเม็ดไขมัน (steatosis) ที่บริเวณ โซน 3 หรือบริเวณที่อยู่รอบเส้นเลือด central vein (CV) มากกว่าบริเวณโซนที่ 1 ซึ่งพบการเกิดเม็ดไขมัน น้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด

ปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะตับอักเสบ

ในภาวะที่ร่างกายได้รับปัจจัยเสี่ยงเป็นเวลานาน จะทำให้เกิดความเสียหายเกิดขึ้นในระดับทั้งแบบอาการค่อยเป็นค่อยไปจนถึงระยะของอาการที่มีความรุนแรงเพิ่มขึ้น จนเกิดภาวะตับวายในที่สุด ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดภาวะตับอักเสบบีมีหลายประการ ^(17, 21-23) เช่น

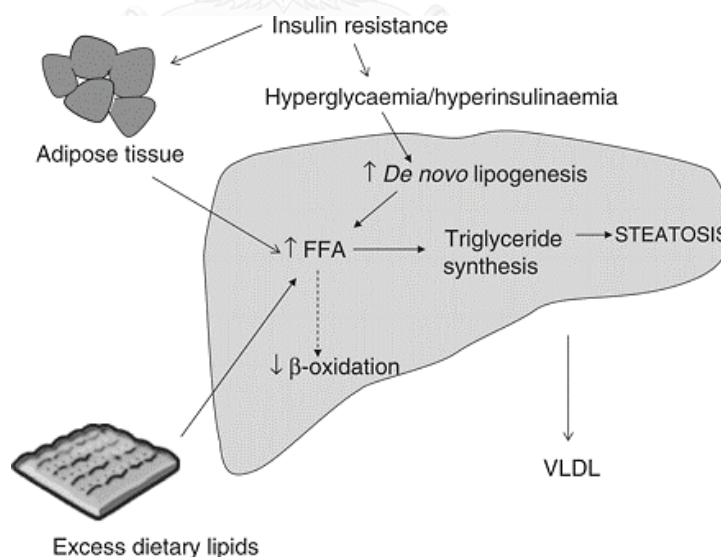
1. การติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี เชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดตับอักเสบบีได้นั้นมีหลายชนิด เช่น ชนิด A, B, C, D ชนิดที่พบได้บ่อยคือเชื้อไวรัสตับอักเสบบีชนิด B และ C เชื้อไวรัสจะติดต่อผ่านการมีเพศสัมพันธ์ การใช้ของร่วมกัน การสัมผัสสารคัดหลั่งของผู้ป่วย เมื่อเชื้อไวรัสเข้าสู่ร่างกายมีปริมาณมากเกินกว่าที่ร่างกายจะกำจัดออกไปได้ จะทำให้เกิดภาวะตับอักเสบ ตับแข็งและตับวายได้ในที่สุด
2. การได้รับยาและสารเคมีบางชนิดในปริมาณที่มากเกินไป เช่น acetaminophen หรือ ยาพาราเซตามอล ในปริมาณสูงทำให้เกิดตับอักเสบบีได้เช่นกัน เพราะตับทำหน้าที่ในการกำจัดยาและสารพิษโดยเมตาบอลิซึมสารเหล่านั้นแล้วขับออกจากร่างกาย หากได้รับสารเคมีแปลกปลอมเป็นจำนวนมาก ก็ทำให้ตับต้องทำงานหนักในการขับสารออก จะเกิดภาวะตับอักเสบบีและตับวายได้
3. การดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เหล้า เบียร์ สำ โดยเฉพาะผู้ที่ดื่มสุราสะสมเป็นระยะเวลานานหลายปี จัดเป็นผู้ที่มีความเสี่ยงสูงที่จะเกิดภาวะตับอักเสบบีจากแอลกอฮอล์ เพราะร่างกายต้องทำงานหนักในการกำจัดแอลกอฮอล์ออกจากร่างกาย และกลายเป็นตับแข็งได้ในที่สุด และหากผู้ที่ดื่มแอลกอฮอล์เป็นประจำร่วมกับมีปัจจัยเสี่ยงด้านอื่น ๆ ร่วมด้วย เช่นติดเชื้อไวรัสตับอักเสบบี มีภาวะความดันโลหิตสูง ไขมันในเลือดสูง จะทำให้เพิ่มโอกาสเสี่ยงในการเป็นโรคมะเร็งตับได้
4. ภาวะไขมันสะสมในตับ เป็นภาวะที่เกิดจากการรับประทานอาหารที่มีไขมันและกลูโคสสูง เช่น การรับประทานอาหารที่เป็นของทอด ของมัน อาหารขยะ เช่น แฮมเบอร์เกอร์ มันฝรั่งทอด น้ำหวาน น้ำชาเขียว เป็นประจำ ซึ่งปัจจุบันอาหารจำพวกนี้มีอยู่มากมาย หาซื้อง่าย เมื่อร่างกายได้รับอาหารเหล่านี้มากเกินไปเกินความต้องการ ก็จะมีการสะสมในร่างกายทำให้เป็นโรคอ้วน และอาหารเหล่านี้ทำให้มีการสะสมของไขมันในตับเพิ่มขึ้น จนสุดท้ายก็จะทำให้เกิดตับอักเสบบีและตับแข็งได้ในที่สุด

กลไกการเกิดไขมันลงตับ หรือ ไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มสุรา

ภาวะไขมันลงตับ หรือ ไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มสุรา หรือ Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD) และถ้ามีการอักเสบของตับและการบวมของเซลล์ตับร่วมด้วย ก็จะเรียกภาวะนี้ว่า Non - alcoholic steatohepatitis

กลไกการเกิดยังไม่เป็นที่เข้าใจอย่างแน่ชัด แต่มีการนำเสนอสมมติฐานการเกิด NASH ในปี 1998 โดย Day and James ได้เสนอ สมมติฐาน “two-hit” hypothesis ⁽²⁴⁾

เริ่มจากระยะที่ 1 หรือ first hit โดยในระยะนี้ จะพบว่าการขนส่งปริมาณของ free fatty acids (FFA) หรือกรดไขมันอิสระเข้ามาในตับเพิ่มขึ้น โดยมีสาเหตุมาจากความผิดปกติจากภาวะ insulin resistance การมีระดับของไขมันในเลือด ระดับของน้ำตาลในเลือดสูง การเกิดภาวะน้ำหนักเกินหรืออ้วน ทุกสาเหตุพบเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดการขนส่งกรดไขมันอิสระ (FFA) ไปยังตับที่เพิ่มขึ้น ปริมาณของ FFA ที่เพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการ β -oxidation ซึ่งที่ใช้ในการสังเคราะห์กรดไขมัน เกิดมีการสร้าง triglyceride เพิ่มขึ้นในตับ ^(25, 26) แต่การขนส่ง triglyceride ผ่าน VLDL ออกนอกเซลล์ตับลดลง จึงเกิดการสะสมของไขมันในตับ เรียก steatosis เกิดขึ้นภายในเซลล์ ⁽⁹⁾ ดังรูปที่ 4



รูปที่ 4 ภาพแสดงความสัมพันธ์ของภาวะ insulin resistance กับการเกิด steatosis ⁽²⁶⁾

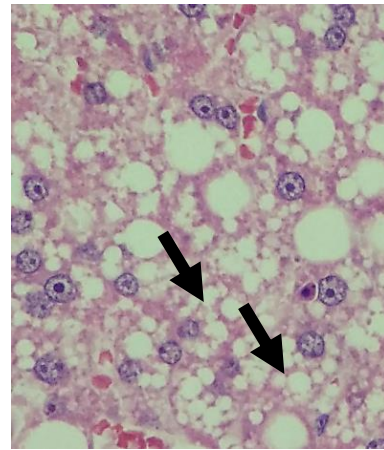
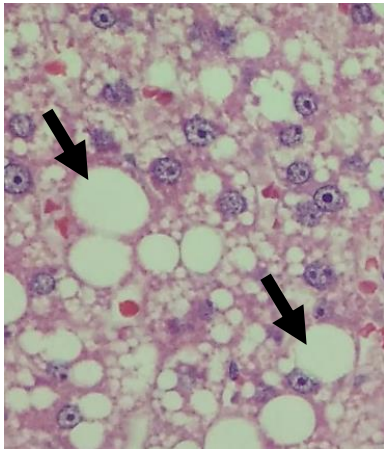
เมื่อศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาจะปรากฏเม็ดไขมันทั้งขนาดใหญ่ (macrovesicular) ดังรูปที่ 5 และเล็ก (microvesicular) ดังรูปที่ 6 ซึ่งพบว่ามีสาเหตุมาจากการขาดเอนไซม์ที่จำเป็นต่อปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไขมัน เช่น เอนไซม์ acylcoenzyme A oxidase ครอบคลุมกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันสายยาว (very long chain fatty acid) ที่ต้องขนส่งออกนอกเซลล์⁽²⁷⁾

โดยในระยะนี้หากลดปัจจัยเสี่ยงที่เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสะสมของไขมัน เช่น การลดอาหารไขมันสูง การรักษาระดับไขมัน และน้ำตาลในเลือด จะทำให้ตับสามารถกลับไปเป็นตับปกติได้^(24, 25)

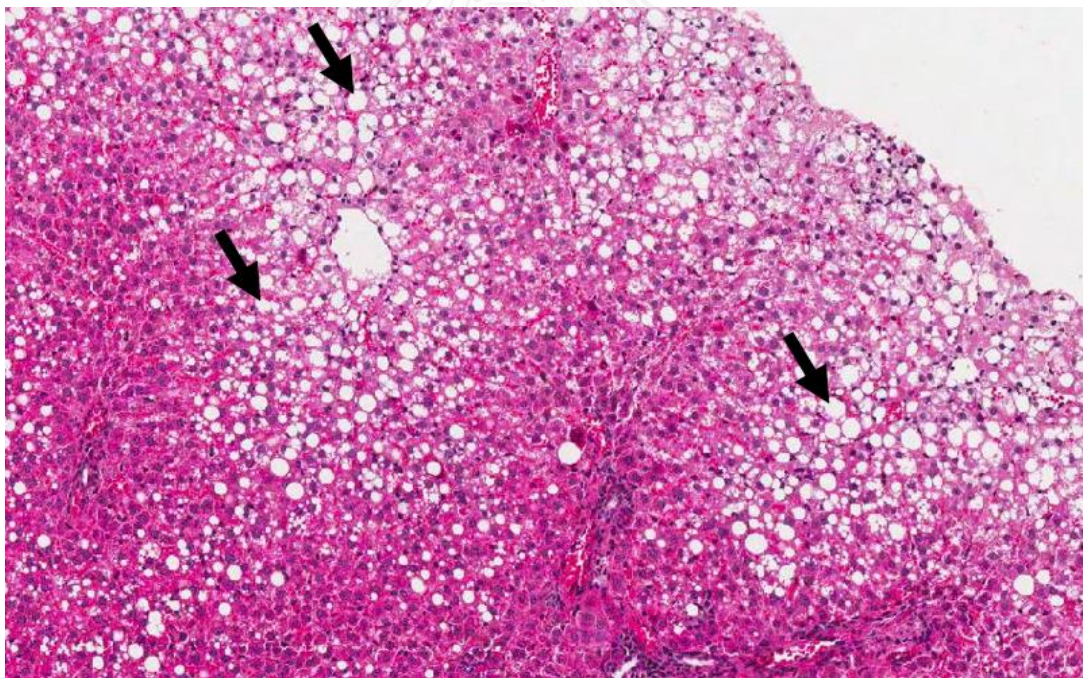
ระยะที่ 2 หรือ second hit จะพบการอักเสบ โดยเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์จะพบมีเซลล์อักเสบร่วมกับพบการสะสมเม็ดไขมัน⁽⁵⁾ ดังรูปที่ 7 โดยการเหนี่ยวนำเซลล์บวม ดังรูปที่ 8 และเซลล์อักเสบภายในตับ ดังรูปที่ 9 เกิดจากการสะสมของ FFA ที่เพิ่มมากขึ้นในตับ ส่งผลให้เกิดภาวะตึงเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้น ทำให้มีระดับของ ROS (reactive oxygen species) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระในตับลดลง

โดยระดับ ROS ที่เพิ่มสูงขึ้น ยังเป็นตัวการที่สำคัญในการกระตุ้นการอักเสบเกิดขึ้นภายในตับ โดยจะพบลิพิดโฟไซด์ มาโครฟาจและนิวโตรฟิล ภายในตับ มีการกระตุ้น proinflammatory cytokine เช่น TNF alpha (TNF α), IL 12, IL18 หลั่งออกมา กระตุ้นการตายของเซลล์ทั้งแบบ necrosis และ apoptosis นอกจากนี้ยังมีกระตุ้น stellate cell ให้สร้าง collagen ขึ้นมาในตับ ทำให้เกิดพังผืดเกาะตับ⁽²⁶⁾ ซึ่งนำไปสู่ภาวะตับแข็งและมะเร็งตับตามมา^(5, 26)

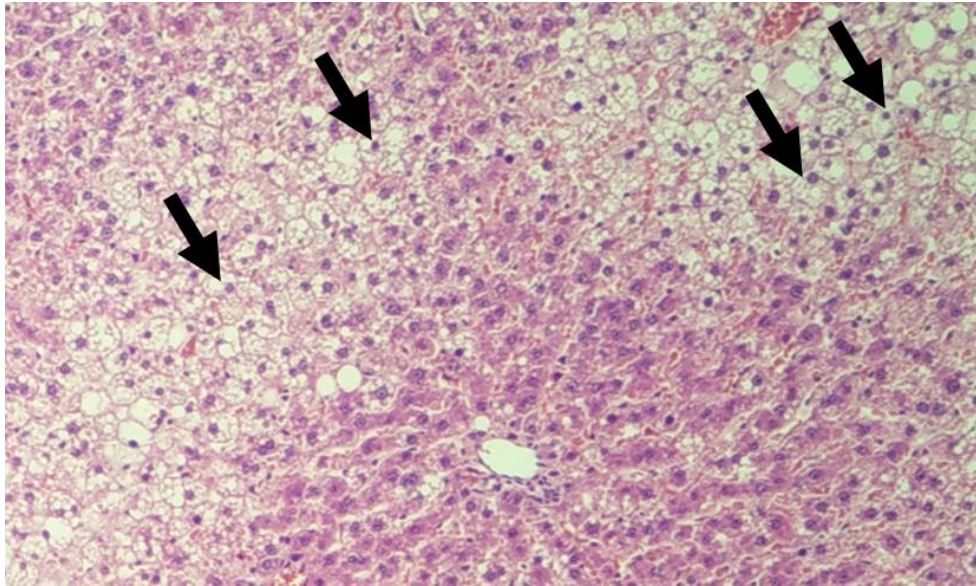
เมื่อทำการศึกษาจุลพยาธิของเซลล์ตับโดยการย้อมด้วยสี hematoxylin and eosin จะพบว่า ในตับที่มีภาวะไขมันลงในตับ จะพบเม็ดไขมันทั้งแบบใหญ่และเล็ก และจะพบการบวมของเซลล์ตับ หรือมีการอักเสบร่วมด้วย เรียกภาวะนี้ว่า non - alcoholic steatohepatitis (NASH)



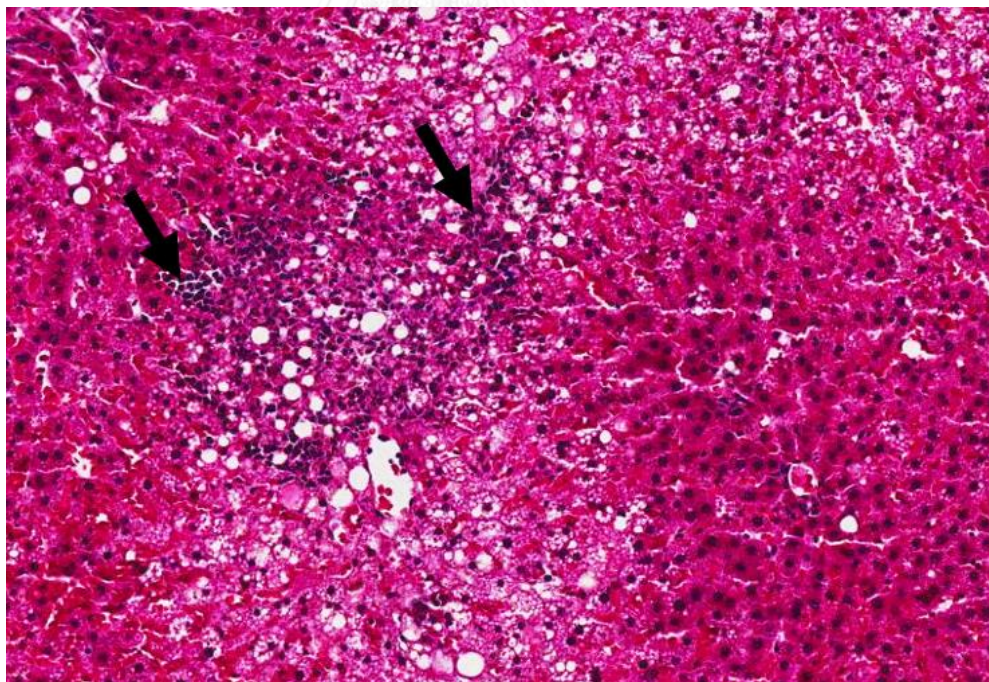
รูปที่ 5 ภาพแสดงลักษณะของเม็ดไขมันแบบใหญ่ (macrovesicular) (x40) รูปที่ 6 ภาพแสดงลักษณะของเม็ดไขมันแบบเล็ก (microvesicular) (x40)



รูปที่ 7 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดไขมันสะสมในเนื้อตับ (x10)



รูปที่ 8 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดการบวมของตับ (Ballooning degeneration) (x10)



รูปที่ 9 ภาพแสดงลักษณะของการเกิดการอักเสบโดยจะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวในตับ (x10)

การเกิดภาวะความเครียดออกซิเดชันและสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในตับ

เมื่อมีการขนส่งกรดไขมันอิสระเข้ามาในตับมากกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดภาวะไขมันสะสมในตับ พบว่าตับจะเกิดมีอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น จนทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภาวะนี้เกิดจากการที่มีอนุมูลอิสระในร่างกายมากจนเกินกว่าที่ระบบสมดุลในร่างกายจะต้านทานไหว ทำให้ระบบสมดุลในร่างกายบกพร่อง ผลจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้มีการทำลายสารชีวโมเลกุล เช่น DNA โปรตีน ไขมัน วิตามินต่าง ๆ และหากดีเอ็นเอเกิดความเสียหายจนไม่สามารถซ่อมแซมได้ ก็จะเกิดการกลายพันธุ์ จนอาจพัฒนาไปเป็นมะเร็งได้ในที่สุด

อนุมูลอิสระ หมายถึง โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนที่โดดเดี่ยวอยู่ในวงโคจรวงนอกสุดของโมเลกุล โมเลกุลนี้จะไปแย่งจับอิเล็กตรอนวงนอกสุดของโมเลกุลอื่น ส่งผลให้โมเลกุลที่ถูกแย่งจับอิเล็กตรอนไปนั้นกลายเป็นอนุมูลอิสระ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) โดยปฏิกิริยาที่โมเลกุลมีการสูญเสียอิเล็กตรอนเรียก ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และโมเลกุลที่รับอิเล็กตรอนจากโมเลกุลอื่นเรียกว่าปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) การเกิดขึ้นของอนุมูลอิสระในร่างกาย พบว่าจะถูกสร้างขึ้นจากกิจกรรมของเซลล์ เช่น เกิดจากปฏิกิริยาของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย การหายใจระดับเซลล์ (27) การเสื่อมสลายของเซลล์ การชราภาพภายในเซลล์ (28) การสังเคราะห์เซลล์ (27, 28) ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้เป็นกิจกรรมที่เกิดขึ้นภายในร่างกายปกติได้ตลอดเวลา โดยพบว่ามีอนุมูลอิสระหรือ reactive oxygen species (ROS) มีหลายประเภท เช่น superoxide radical, hydroxyl radical และ nitrous radical เป็นต้น (34)

โดยในเซลล์ตับ เมื่อเกิดการสะสมของไขมันในตับ จะพบระดับของ ROS ที่เพิ่มสูงขึ้น (28) ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันขึ้น จะเกิดการทำลายผนังเซลล์ (lipid peroxidation) ทำลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยใช้ปฏิกิริยาออกซิเดชัน และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะตับอักเสบได้มากที่สุด โดยระดับของ ROS เพิ่มขึ้นจะกระตุ้นการเคลื่อนที่เซลล์เม็ดเลือดขาวและมาโครฟาจ ให้มีการหลั่งไซโตไคน์ เช่น TNF- α (29) โดยสามารถตรวจ lipid peroxidation ได้จาก malondialdehyde หรือ MDA จะพบสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของ MDA เมื่อเกิดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นในตับ (30-33)

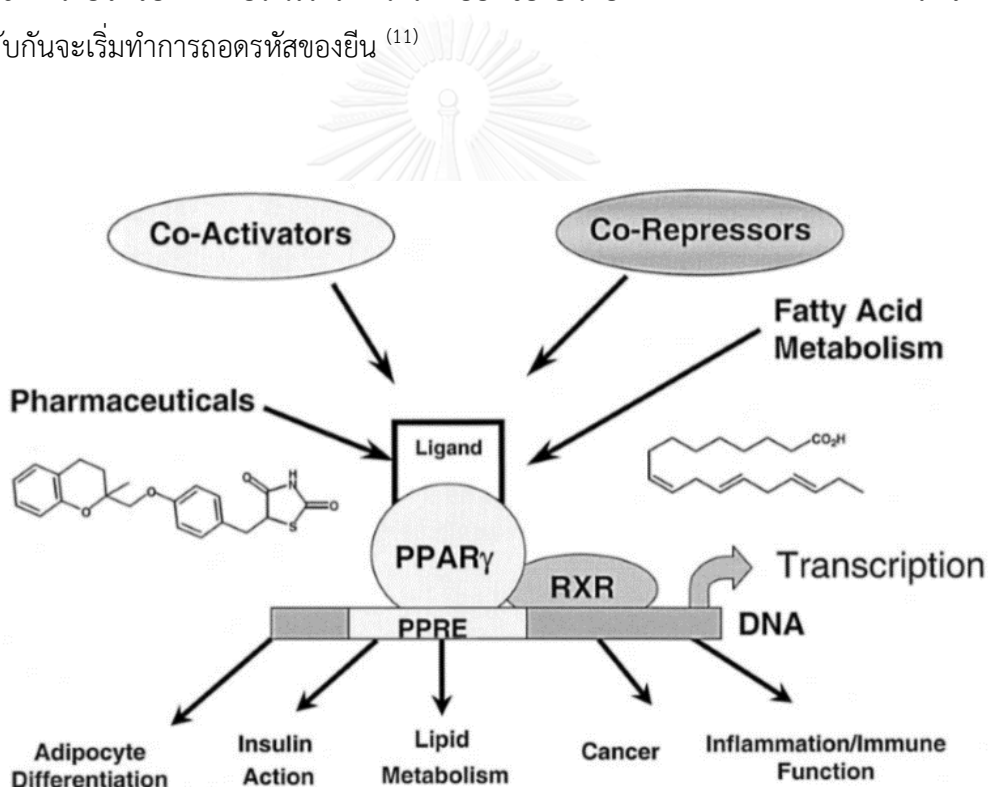
ดังนั้นเพื่อให้เซลล์สามารถดำรงอยู่ได้อย่างปกติมากที่สุด เซลล์จึงมีระบบการปรับตัวเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดที่เกิดกับยีน โดยการกำจัดสารแปลกปลอม (xenobiotic metabolism) เรียกว่า กระบวนการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant process) เกิดขึ้นในร่างกาย โดยสารต้านอนุมูลอิสระ มีทั้งที่ร่างกายรับเข้ามา และที่ร่างกายสร้างขึ้นเอง หนึ่งในกระบวนการที่ร่างกายสร้างขึ้นคือ การสร้างเอนไซม์ที่ต้านการออกซิเดชัน อาทิเช่น กลไกการเข้ายับยั้งหรือ การทำงานของเอนไซม์

ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase, SOD) และ เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) เป็นต้น⁽³⁴⁾

Glutathione (GSH) จัดเป็น antioxidant⁽³⁵⁾ หมายถึงสารที่ทำหน้าที่ยับยั้ง หรือขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกายโดย glutathione ประกอบด้วยกรดอะมิโน 3 ชนิด คือ ซิสเตอีน (cystein) ไกลซีน (glycine) และ กลูตาเมต (glutamate) จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีผลในการลดอนุมูลอิสระที่ตีที่สุดตัวหนึ่งในร่างกายตามธรรมชาติ⁽³⁶⁾ มีฤทธิ์ลดการอักเสบที่เกิดขึ้น สร้างภูมิคุ้มกันภายในร่างกายให้เพิ่มขึ้น เป็นตัวลดความชราภาพของเซลล์ โดยมีกลไกในการช่วยยับยั้งสารอนุมูลอิสระ ทำให้ลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง glutathione จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ glutathione peroxidase (glutathione peroxidase; GPx) โดยจะมีลักษณะรูปแบบภายในเซลล์ 2 รูปแบบคือ อยู่ในรูป reduced form (GSH) และ อยู่ในรูป oxidized form (GSSG)⁽³⁷⁾ glutathione พบเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในตับ⁽³⁸⁾ เพราะว่าตับเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปและกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย⁽²⁷⁾ พบว่าผู้ที่มีภาวะไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ ระดับของ glutathione ในตับจะมีปริมาณน้อยลง⁽³⁹⁾

ความสำคัญของพีพาร์ (PPAR) ต่อตับ

ในผู้ป่วยที่เป็น NASH จะพบว่ามียกระดับของ Peroxisome proliferator activated receptors หรือ PPAR ลดลง โดยพบว่า PPAR พบได้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด เป็นตัวควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนและไขมันที่มีความสำคัญในร่างกาย ซึ่ง PPAR จะจับกับดีเอ็นเอบริเวณตัวรับอยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ที่เรียกว่า retinoid nuclear receptor superfamily โดยจะจับกับตัวรับ 9-cis retinoic receptor หรือ retinoid x receptor (RXR) ซึ่งเป็นตัวที่ช่วยในการกระตุ้นการแสดงออกของยีน ดังรูปที่ 10 จะเกิดเป็น heterodimer PPAR ประกอบด้วย 3 ส่วนคือ ส่วนที่จับกับปลาย C terminal และปลาย N terminal และส่วนที่จับกับส่วนของ DNA binding domain โดยจะจับ DNA บริเวณที่มีการแสดงออกของยีนคือ AGGTACA n AGGTCA หลังจากเกิดการจับกันจะเริ่มทำการถอดรหัสของยีน⁽¹¹⁾



รูปที่ 10 ภาพแสดงลักษณะตำแหน่งการจับของ Peroxisome proliferator-activated receptors

(11)

โดย PPAR แบ่งออกได้เป็นสามรูปแบบคือ พีพาร์แอลฟา (PPAR α) พีพาร์บีต้า(PPAR β) และพีพาร์แกมมา (PPAR γ) โดย PPAR γ พบมากในตับ และกล้ามเนื้อ PPAR γ มีหน้าที่สำคัญ การเกิดการ metabolism และการสร้างไขมัน การควบคุมสมดุลของพลังงาน โดยเฉพาะในตับ PPAR γ มีความสำคัญในการลดการสะสมของระดับไตรกลีเซอไรด์ และควบคุมระดับกรดไขมัน และกระบวนการอักเสบในตับ ⁽¹²⁾ PPAR γ ยับยั้งการเกิดการอักเสบ ⁽⁴⁰⁾ โดยกระตุ้นโมโนไซต์ให้เปลี่ยนรูปเป็นมาโครฟาจเพื่อจำกัดสิ่งแปลกปลอมในเนื้อเยื่อ ⁽¹¹⁾ และลดการเกิดเม็ดไขมันทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็กในเซลล์ตับ ⁽¹³⁾ โดย PPAR γ จะมีการลดกรดไขมัน ⁽⁴¹⁾ ซึ่งเป็นกลไกที่ทำให้เกิดภาวะไขมันลดต่ำในที่สุด ดังนั้น PPAR γ จึงมีความสำคัญในการทำให้ระดับของไขมันในตับดีขึ้น

การอักเสบและการตายของเซลล์ตับ

เมื่อตับเริ่มเข้าสู่ระยะการเกิด first hit หรือ มีการการกระตุ้นสะสมของไขมันและอนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้นมาจากสภาวะปกติ เมื่อตับเกิดการเกิดความเครียดออกซิเดชันเพิ่มขึ้น ทำให้มีระดับของอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น เซลล์ตับจะมีความพยายามในการกำจัดสิ่งเหล่านั้น เพื่อให้ตับสามารถกลับมาทำงานได้อยู่ในสภาวะปกติ จึงพบว่าตับจะมีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายแบบ Innate immune หรือภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดขึ้นมา โดยกระตุ้นการทำงานของเซลล์อักเสบเข้ามาในตับ

โดยกระบวนการเพื่อกำจัดอนุมูลอิสระ (ROS) ที่เกิดขึ้น จะเกิดการกระตุ้นให้หลอดเลือดขยายมากขึ้น ทำให้สารภายในหลอดเลือดจะรั่วเข้าสู่บริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์ ส่งผลให้เม็ดเลือดขาวจะเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณที่อักเสบ จะพบว่าเซลล์ตับมีลักษณะบวม ร่วมกับพบเม็ดเลือดขาวมีการเคลื่อนที่มารวมตัวกันเป็นบริเวณมากเป็นพิเศษ เซลล์เม็ดเลือดขาวออกมาดักกินหรือทำลาย เช่น neutrophils, monocytes และ activated macrophage ที่พบภายในตับที่เรียกว่า kupffer cells ⁽⁴²⁾

จากการศึกษาพบว่าภายในตับจะมี kupffer cells ซึ่งเป็นมาโครฟาจ ลักษณะจะมีรูปร่างคล้ายกระสวย เคลื่อนที่ไปตามช่องว่างบริเวณ sinusoids ในตับ เพื่อคอยดักจับเชื้อโรค และ endotoxin ต่าง ๆ ที่อาจเข้ามาพร้อมกับเลือด พบว่าทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวและ kupffer cells จะมีการสร้าง cytokine ⁽⁴³⁾ ชนิดต่างๆ ออกมา เช่น tumor necrosis factor alpha (TNF- α) และ NF-kB เป็นต้น ⁽⁴⁴⁾

Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) เป็นอีกตัวที่มีบทบาทสำคัญในการกระตุ้น kupffer cells ให้มีการปล่อย cytokine ต่าง ๆ ออกมา เช่น interleukin1 และ interleukin 18⁽⁴⁵⁾ ขึ้นมาในตับ จากการศึกษาของ Wei Zhang และคณะ พบว่า ในผู้ป่วยที่เป็นโรคไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์มีระดับการแสดงออกของ TNF- α เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ TNF- α ยังกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ตับ⁽⁴⁶⁾

นอกจากนี้การที่ตับถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระ และกรดไขมันอิสระสะสมที่มากเกินไปภายในเซลล์ตับ จะกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดแล้ว ทำให้มีการกระตุ้น adaptive immune ผ่านการเปลี่ยนแปลงของ T-cell , B-cell lymphocyte โดยมีการกระตุ้นการสร้าง antibody ขึ้นมา หลังจากที่ได้รับกระตุ้นด้วยการจับกันของ antigens กับ receptors ที่บริเวณของผิวเซลล์ โดยพบว่าใน T cell lymphocyte จะมี T cell receptor หรือ TCR ขึ้นมาที่บริเวณผิวเซลล์ TCR⁽⁴⁷⁾ จะมีการจับกับตัวอื่น ทำให้มีการกระตุ้นและหลั่ง cytokine ต่าง ๆ ออกมา โดยสามารถใช้วิธีการตรวจหาทาง immunohistochemistry เพื่อหาการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับได้⁽⁴⁸⁾ การอักเสบที่เกิดขึ้นในตับเป็นระยะเวลานาน ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้น stellate cells (HSCs) และ stellate cells ก็จะมีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจน⁽⁴⁹⁾ ขึ้นมาบริเวณที่มีการอักเสบ ส่งผลให้เกิดการขัดขวางการทำงานตามปกติของเซลล์ตับ

การเกิดการตายของเซลล์ตับ มีผลมาจากหลายปัจจัยร่วมกัน เช่น การเกิดภาวะอนุมูลอิสระที่มากเกินไป การเกิดความเครียดออกซิเดชัน การติดเชื้อ การมีแอลกอฮอล์สะสมภายในตับเป็นระยะเวลานาน ปัจจัยเหล่านี้ล้วนนำมาสู่การอักเสบและเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นภายในตับได้ทั้งสิ้น

การตายของเซลล์ หรือ แบบแผนการตายของเซลล์ (programmed cell death)⁽⁵⁰⁾ เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการรักษาความสมดุลของสิ่งมีชีวิต มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิต เช่น การเปลี่ยนรูปของอวัยวะ การเจริญเติบโตของอวัยวะ การควบคุมจำนวนเซลล์ให้อยู่ในสภาวะปกติ การกำจัดเซลล์ที่ผิดปกติ ตัวอย่างเช่น เซลล์ที่มีการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งการเกิด apoptosis ก็เป็นกระบวนการหนึ่งป้องกันไม่ให้เซลล์ที่ผิดปกติเจริญเติบโตไปเป็นเซลล์มะเร็ง

โดยการตายของเซลล์แบ่งเป็นสองชนิด คือการตายตามธรรมชาติ (apoptosis) เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อการเสียหายของดีเอ็นเอและการเสียหายบาดเจ็บที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และการตายแบบที่สองคือ การตายแบบฉับพลัน (necrosis) ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่พบการอักเสบเกิดขึ้น ตัวอย่าง เช่น ในภาวะติดเชื้ออย่างรุนแรง การได้รับบาดเจ็บจากอุบัติเหตุ การที่ร่างกายสัมผัสความร้อนและความเย็นเกินขีดจำกัด การได้รับรังสี สารเคมีและยาต่าง ๆ เป็นปริมาณมากในระยะเวลาอัน

สั้น และ ภาวะร่างกายขาดออกซิเจนอย่างเฉียบพลัน เนื่องจากร่างกายต้องอาศัยออกซิเจนในการสร้างพลังงาน ATP ซึ่งเป็นพลังงานที่ใช้ในขบวนการสำคัญต่างๆของร่างกาย การขาดออกซิเจนที่เกิดขึ้น ส่งผลให้เกิดเซลล์ตายเป็นบริเวณกว้าง โดยลักษณะของเซลล์ที่ตายในแบบ necrosis จะพบเซลล์บวม อักเสบและแตก ทำให้สารที่อยู่ภายในเซลล์รั่วออกมา ซึ่งก่อให้เกิดการทำลายของเนื้อเยื่อข้างเคียงได้⁽⁵¹⁾

การตายแบบ apoptosis เป็นกลไกปกติที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อกำจัดความผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น โดยพบว่าเซลล์ที่เกิดการ apoptosis จะมีการทำลายของออร์แกเนลจากภายใน เซลล์ที่ถูกทำลายจะแตกตัวเป็นเศษเล็ก ๆ ที่เรียกว่า apoptotic bodies และจะถูกเก็บกินด้วยเซลล์ macrophages หรือ kupffer cell นอกจากนี้อาจพบลักษณะของ เยื่อหุ้มเซลล์หดแฟบ (plasma membrane blebbing) นิวเคลียสรวมตัวกันแน่น (nuclear condensation) การเกาะกลุ่มกันของโครมาติน (chromatin aggregation) เกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (DNA fragmentation)^(46, 51-53)

การเปลี่ยนแปลงของ apoptosis จะมีการเชื่อมโยงสัญญาณภายในเซลล์ (cascade of cell signaling) โดยมีเอนไซม์ caspase เป็นตัวกลาง สามารถถูกเหนี่ยวนำโดยวิถีหลัก 2 วิถี กล่าวคือ extrinsic pathway และ intrinsic pathway

โดยใน extrinsic pathway มี death signal เช่น TNF- α (tumor necrosis factor- α), Fas L (Fas ligand) และ Trail (TNF-related apoptosis inducing ligand) มาจับที่ receptor โดยทั้งสองตัวรับจัดว่าอยู่ในกลุ่ม TNF receptor (TNFR) family จะมีกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเกิดการอักเสบขึ้นโดย death signal จะส่งผลให้เกิดการกระตุ้น caspase 8 กระตุ้นให้เกิด apoptosis ขึ้น นอกจากนี้มีการส่งสัญญาณกระตุ้นให้เกิด intrinsic pathway จากการศึกษาพบว่า intrinsic pathway เป็นกลไกการเหนี่ยวนำสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal) เกิดการกระตุ้นที่ mitochondria ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง permeability ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของ cytochrome c เหนี่ยวนำให้ cytochrome c เคลื่อนที่ออกสู่บริเวณระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก และเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน ซึ่งมีลักษณะเป็นช่องว่าง การเคลื่อนที่ของ cytochrome c จะกระตุ้น BAX และ BAK ที่ mitochondria ในที่สุดก็เกิดการกระตุ้น caspase 3 จนทำให้เกิด apoptosis ในที่สุด^(46, 53)

ทั้งนี้สามารถตรวจการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis โดยวิธีการวิเคราะห์ DNA laddering terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick – end labeling (TUNEL) ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบ DNA fragmentation ในเซลล์ที่เกิด apoptosis โดยหลักการ คือ การแทรกอนุพันธ์ของ dUTP (deoxyuridine 5'triphosphate) นำไปเติมที่ปลายของ DNA ที่แตกหักด้วย

ปฏิกิริยา terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) แล้วทำการติดตามด้วยฉลากที่ติดด้วยสารสี เพื่อให้เกิดการแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ปรากฏขึ้น^(54, 55)

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*)

ว่านหางจระเข้มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ *Aloe barbadensis* Miller ดังรูปที่ 11 ในทางพฤกษศาสตร์ พบว่าอยู่ในวงศ์ Liliaceae มีถิ่นกำเนิดในแถบอาฟริกา เดิมเป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อน ต่อมาได้ถูกนำไปแพร่พันธุ์ไปทั่วโลก สายพันธุ์ของว่านหางจระเข้มีมากมายกว่า 420 ชนิด⁽⁵⁶⁾ ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ ว่านหางจระเข้เป็นพืชอวบน้ำ ลำต้นสั้น ใบอวบหนา มีสีเขียว มีจุดสีขาวกระจายตัวตามใบ ลักษณะขอบใบ มีการลดรูปของใบให้มีลักษณะคล้ายหนามหรือฟันเล็กๆ มีใบเดี่ยวแทงใบอ่อนจากด้านกลางต้น ใบจะเวียนออกไปโดยรอบ หากมองจากด้านบนจะพบลักษณะเป็นรัศมี โดยมีใบอ่อนอยู่ตรงกลาง ใบแก่จะอยู่วงนอกสุดของต้น ใบเมื่อตัดตามขวางจะพบส่วนนอกสุดจะเป็นลักษณะแข็ง สีเขียว พบของเหลวสีเหลืองขุ่นซึ่งเป็นส่วนของยาง ส่วนเนื้อชั้นใน มีลักษณะคล้ายเจล ไม่มีสี หนา ยืดหยุ่นมีเมือกเส้น จะพบว่าส่วนที่เป็นเจล เป็นสัดส่วนที่มีมากที่สุด ลักษณะการออกดอก จะพบก้านชูดอกยาว แทงขึ้นมาด้านบน ดอกมีสีเหลือง สีแดงอมเหลือง ตามแต่สายพันธุ์ ดอกคล้ายรูปหลอด ลักษณะดอกเป็นดอกห้อย ผลเป็นรูปไข่ ว่านหางจระเข้ถูกนำมาใช้หลากหลายทั้งเป็น เครื่องสำอางค์ อาหาร ยาระบาย ยาลดรอยแผลเป็น เป็นต้น^(57, 58)



รูปที่ 11 ภาพแสดงลักษณะลำต้นและใบของว่านหางจระเข้

สารสกัดจากว่านหางจระเข้ได้จากสองส่วนคือ

1) สารสกัดที่ได้จากเปลือกแข็งสีเขียว และยาง ซึ่งเป็นส่วนของเหลวสีเหลืองพบได้ที่เปลือกของว่านหางจระเข้ เมื่อทิ้งไว้จะปรากฏเป็นสีดำ ซึ่งเป็นส่วนของยาง โดยยางจะมีฤทธิ์เป็นยาระบาย

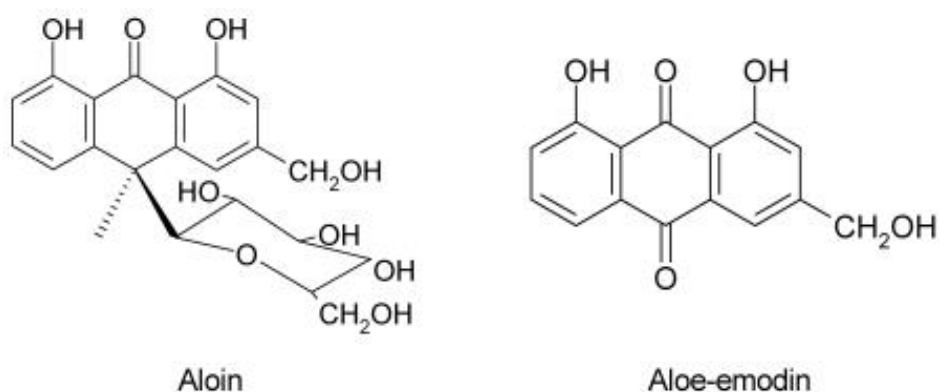
2) สารสกัดที่ได้จากวุ้นด้านในใบบว่านหางจระเข้ พบว่ามีส่วนที่เป็นของแข็งเพียงเล็กน้อย นอกนั้นเป็นน้ำถึงร้อยละ 95 พบสารประกอบสำคัญ หลายชนิด เช่น สารพวก polysaccharides ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ลดอาการอักเสบและช่วยสมานแผล และการซ่อมแซมบาดแผล นอกจากนี้ยังพบสารประกอบอื่น ๆ เช่น วิตามิน A, C, B, B2, B12 โปรตีน เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์อะไมเลส, lignin, saponins และ salicylic acids (57-60)

คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์

ว่านหางจระเข้รู้จักในนาม “healing plant” โดยพบว่าทั่วภูมิภาคในโลกใช้ว่านหางจระเข้ในการรักษาโรคที่เกิดจากการอักเสบจากแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก จากการศึกษาพบว่า สารประกอบในว่านหางจระเข้หลายตัว มีฤทธิ์เด่นในการส่งเสริมการรักษาโรคต่าง ๆ ได้ โดยจากงานวิจัยของ Seongwon Choi ในปี 2003 ได้ทำการศึกษาและจำแนกสารสำคัญในว่านหางจระเข้ที่มีฤทธิ์ในทางการแพทย์ มี 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม Anthraquinones กลุ่ม Glycoprotein และกลุ่ม Low molecular weight ⁽⁶¹⁾ โดยมีรายละเอียดดังนี้

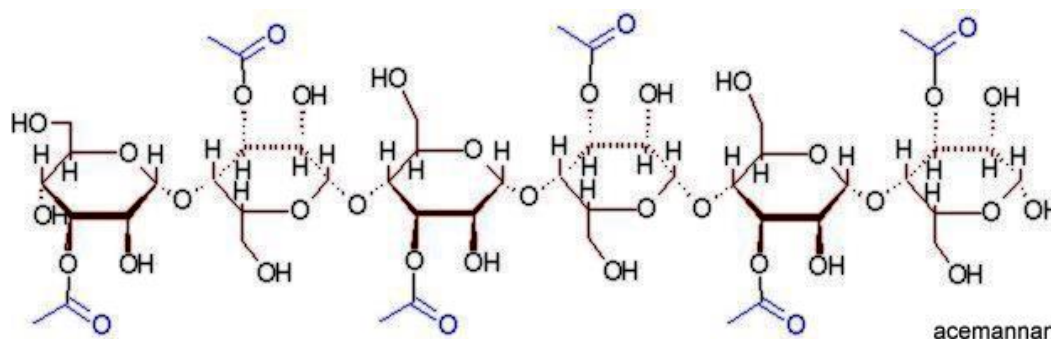
1.กลุ่ม Anthraquinones เป็นกลุ่มที่มีสารประกอบหลายชนิด อาทิ เช่นสารในกลุ่ม aloemodin, aloetic acid aloin A, aloin B, barbaloin และ emodin โดยช่วยลดการเกิดมะเร็ง และลดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในหนูทดลอง ^(62, 63) ลดปริมาณเชื้อ *Helicobacter pylori* ในกระเพาะอาหารที่ทำให้เกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหารได้ ⁽⁶⁴⁾ ส่วนสาร barbaloin ลดการอักเสบโดยลด nitric oxide (NO), tumour necrosis factor alpha และ interleukin ในหนูทดลองได้ ⁽⁶⁵⁾ สาร aloin A, aloin B พบว่าเป็นทรินิเมนที่ช่วยป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มาจากแสงอาทิตย์ได้ดี ⁽⁶⁶⁾

ดังรูปที่ 12



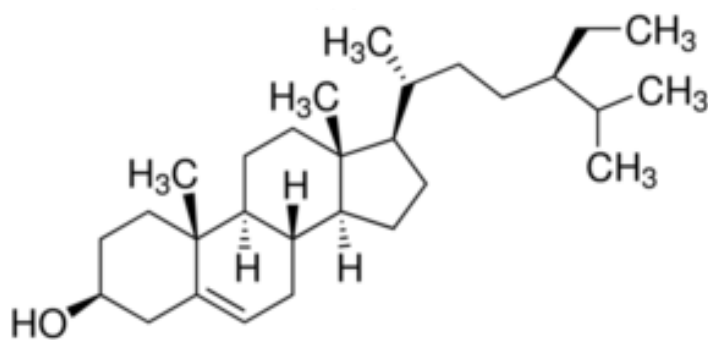
รูปที่ 12 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร aloe-emodin และ aloin ⁽⁶⁷⁾

2.กลุ่ม Saccharides สารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มักอยู่ในส่วนของเจลใสหรือส่วนที่เป็นเนื้อของว่านหางจระเข้ โดยปกติส่วนที่เป็นเนื้อพบเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณทั้งหมดของว่านหางจระเข้เท่านั้น โดยสารสำคัญของกลุ่ม Saccharides ได้แก่ สาร acemannan และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แมนแนน หรือ mannose-6-phosphate ⁽⁶¹⁾ โดยพบว่าสาร acemannan ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการกระตุ้นการทำงานของ macrophage ให้มีการหลั่งไซโตไคน์ ชนิดต่าง ๆ ออกมา ช่วยต้านเชื้อจุลชีพก่อโรค ลดการอักเสบ นอกจากนี้ยังสามารถลดผลข้างเคียงที่เกิดจากการฉายรังสีรักษาในคนไข้ ⁽⁶⁸⁾ ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร acemannan ⁽⁶⁹⁾

3. กลุ่ม Low-moleccular weight สารในกลุ่มนี้พบสารที่สำคัญ ได้แก่ สาร aloesin สาร β -sitosterol และสาร diethylhexylphthalate โดยพบว่า aloesin เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ(70) โดยช่วยลดการอักเสบ ช่วยลดการทำงานของ tyrosine hydroxylase และ dihydroxyphenylalanine (DOPA) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น tyrosinase ของเซลล์ melanocyte ที่มีหน้าที่ในการสร้างเม็ดสี ซึ่งพบที่บริเวณผิวหนัง^(61, 71) สาร β -sitosterol สามารถลดการอักเสบและการเกิดมะเร็งได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดการบาดเจ็บของเส้นเลือดและเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่ในหนูทดลองได้^(61, 71) ดังรูปที่ 14



รูปที่ 14 ภาพแสดงสูตรโครงสร้างของ สาร β -sitosterol⁽⁷²⁾

คุณสมบัติของว่านหางจระเข้ต่อภาวะการสะสมของไขมันในตับที่ไม่ได้เกิดจาก แอลกอฮอล์ในทางการแพทย์

การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาพบว่า ว่านหางจระเข้เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ มีรายงานการศึกษา รายงานว่า ว่านหางจระเข้สามารถลดการเกิด lipid peroxides⁽⁷³⁾ Benson และ คณะพบว่า ว่านหางจระเข้สามารถช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตในร่างกายได้⁽⁷⁴⁾ สอดคล้องกับการศึกษาในปี 2012 Kaithwas และคณะ พบว่าสาร polysaccharides ที่สกัดจาก *Aloe vera barbadensis* Miller ในหนูแรทที่ให้ doxorubicin (DOX) เหนี่ยวนาให้เกิดภาวะ myocardial oxidative stress (OS) พบว่าสารสกัดจากว่านหางจระเข้ทำให้ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) มีระดับที่เพิ่มขึ้น และระดับของ MDA ลดลง⁽⁷⁵⁾ และมีอีกหลายงานวิจัยที่พบว่าว่านหางจระเข้สามารถเพิ่มระดับของ ตัวต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่น ๆ เช่น myeloperoxidase (MPO)⁽⁷³⁾ และ วิตามิน A⁽⁷⁶⁾

การเป็นสารลดระดับน้ำตาลในเลือด

ว่านหางจระเข้สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดจากภาวะหนูเบาหวานได้ โดยมีการศึกษา ในปี 1996 พบว่า ว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลและระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเลือด สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด (Fasting blood glucose) ระดับ cholesterol และระดับ triglyceride ที่เกิดขึ้นในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน ทั้งแบบ Type I และ Type II โดยการกระตุ้น hypoglycaemic ภายในเซลล์ ทำให้มีการนำว่านหางจระเข้ไปใช้เป็นทางเลือกในการใช้รักษา โรคเบาหวานต่อไป⁽⁷⁷⁾ ซึ่งการมีระดับของน้ำตาล ไตรกลีเซอไรด์และไขมันในเลือดที่มากเกินไปจะมีการขนส่งมาสะสมในตับ ทำให้เกิดภาวะความเป็นพิษต่อดับ นำไปสู่การกระตุ้นเซลล์อักเสบต่าง ๆ จนทำให้เกิดการอักเสบเกิดขึ้นภายในตับต่อไป

การเป็นสารต้านการอักเสบและการตายของเซลล์

ว่านหางจระเข้เป็นสารที่มีฤทธิ์เด่นในด้านลดการอักเสบ การเร่งการหายของแผล ทั้งจาก แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก เป็นพืชสมุนไพรที่มีความนิยมนำมาใช้กันทั่วโลก โดยนำเจลใสภายในใบ หรือนำน้ำเมือกที่อยู่บริเวณเจลใส มาวางทับหรือทาบริเวณที่มีแผลอักเสบหรือแผลที่โดนน้ำร้อนลวก จาก

การทดลองต่างๆพบว่า เจลของว่านหางจระเข้สามารถลดอาการระคายเคือง บวมแดง อักเสบ ลดการเกิดรอยแผลเป็นได้^(65, 68, 70)

ในปี 2004 Langmead L. และคณะ ได้ทำการศึกษาพบว่าว่านหางจระเข้สามารถป้องกันการเกิดแผลและรักษาแผลในกระเพาะอาหาร โดยจะไปลดการสังเคราะห์ prostaglandin E2 และ Interleukin-8 มีผลป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร และลดการอักเสบที่เกิดขึ้น⁽⁶⁶⁾ นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่าสาร aloin และ aloesin ช่วยลดการเกิด TNF- α และ Interleukin-1 β (IL-1 β) ในหนูที่ทำถูกเหนียวทำให้เกิดลำไส้อักเสบ⁽⁷⁸⁾

สาร aloe-emodin สามารถลด TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่เกี่ยวกับการอักเสบ^(79,80) โดยพบว่าลดการอักเสบและการตายทั้งแบบ necrosis และ apoptosis ที่เกิดจาก hydrogen peroxide ในหนูแรท⁽⁷⁹⁾ โดย Arosio และคณะ ได้ใช้ว่านหางจระเข้ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ควบคู่กับการให้ carbon tetrachloride (CCl₄) ในหนูแรทเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่ง carbon tetrachloride ที่ให้จะเป็นตัวทำให้ระดับของ lipid peroxidation เพิ่มสูงขึ้น พบว่าสาร aloe-emodin ช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันในตับ เช่น เอนไซม์ lipoyxygenase ช่วยเพิ่มระดับการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ ลดระดับของเอนไซม์ aspartate aminotransferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แสดงคุณสมบัติความเสียหายของในกล้ามเนื้อ หัวใจ และตับ นอกจากนี้สาร aloe-emodin ยังช่วยเพิ่มการสังเคราะห์โปรตีน อัลบูมิน ช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวน kupffer cell และลดการตายของเซลล์แบบ necrosis โดยพบมากในบริเวณ central veins ซึ่งเป็นบริเวณที่มีสารอาหารและออกซิเจนปริมาณน้อยที่สุด⁽⁸⁰⁾ นอกจากนี้สาร aloe-emodin พบว่าสาร acemannan ก็เป็นสารที่มีความสำคัญอีกชนิดหนึ่งที่อยู่ในว่านหางจระเข้ สามารถใช้ลดการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเนื้อเยื่อได้ ช่วยในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย ช่วยยับยั้งการทำงานของเซลล์อักเสบ ทั้งเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ macrophages ให้ลดการหลั่ง cytokines ต่าง ๆ ออกมา เช่น tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 , interleukin-6, interleukin-18 และ interferon- γ โดยสารเหล่านี้จะถูกปล่อยออกมาเพื่อตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของร่างกาย ตามความเหมาะสมของสิ่งกระตุ้นชนิดต่าง ๆ ส่งผลให้เกิดการเร่งซ่อมแซมบริเวณที่บาดเจ็บและอักเสบในตับ และพบลักษณะการสร้างคอลลาเจน และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ช่วยเร่งการหายของบาดแผลที่มีการบาดเจ็บในหนูทดลองได้^(81, 82)

ในปี 2008 มีการศึกษาโดย Saleh และคณะ ทำการเปรียบเทียบผลของระดับซีรั่ม alkaline phosphatase (ALP), ซีรั่ม glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), glutamic-oxaloacetic transaminase (SGOT) และ bilirubin ซึ่งทั้งสี่ชนิดเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญของตับในหนูแรท โดยทำให้หนูแรทเหนียวทำให้เป็นภาวะตับอักเสบโดยให้สาร carbon tetrachloride

(CCl₄) ปริมาณ 1.25 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลของสารสกัดจากพืช ทั้ง สี่ชนิด ได้แก่ สารสกัด *clematis hirsuta* สารสกัด *cucumis prophetarum* สารสกัด *bee propolis* และสารสกัด *aloe vera* โดยพบว่าวุ้นหางจระเข้สามารถลดระดับซีรัม alkaline phosphatase (ALP), ซีรัม glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), ซีรัม glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) และ bilirubin ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁸³⁾ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Werawatganon และคณะ ที่ได้ศึกษาการให้วุ้นหางจระเข้ปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมในหนูแรท ที่เป็นตับอักเสบจากการได้รับยาพาราเซตามอลเกินขนาด โดยให้ปริมาณยาที่ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าสาร acetaminophen ที่ได้รับมากเกินไปจะเข้าไปจะทำให้ตับซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการขับหรือเปลี่ยนแปลงสภาพของสารเคมีที่เข้าไปให้อยู่ในรูปที่สามารถละลายน้ำได้ออกมา ถ้าในกรณีที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่มากเกินไป จะทำให้เกิดภาวะเซลล์ตับเกิดการอักเสบและตายจนกระทั่งเกิดตับวาย เมื่อให้วุ้นหางจระเข้ปริมาณ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่าวุ้นหางจระเข้สามารถลดระดับซีรัม glutamic-pyruvic transaminase (SGPT), ซีรัม glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) ในตับ และสามารถลดการเกิด lipid peroxidation ลดการอักเสบภายในเซลล์ตับ โดยลดจำนวน IL12 และ IL18 ที่เกิดจากการถูกกระตุ้นของ kupffer cells ในตับ และยังสามารถปรับสมดุลของสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยปรับการทำงานของตับให้ดีขึ้นได้⁽⁸⁴⁾ ในปี 2010 Nomaguchi และคณะ ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารสกัดวุ้นหางจระเข้ในหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยอาหาร HFD เป็นเวลา 4 สัปดาห์พบว่าสารสกัดวุ้นหางจระเข้สามารถกระตุ้นการสร้าง PPAR γ ซึ่งเป็น receptor ที่สำคัญเป็นตัวการที่ทำให้การเมแทบอลิซึมในไขมันของตับหนูดีขึ้น และช่วยลดระดับของซีรัมไตรกลีเซอไรด์และซีรัมคอเลสเตอรอลได้อีกด้วย⁽¹³⁾

อย่างไรก็ดี ยังไม่มีการศึกษาผลของวุ้นหางจระเข้ต่อการลดการอักเสบ และการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรท ที่มีภาวะตับอักเสบจากไขมันลงตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ที่เหนียวนำด้วยอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทำวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมีในการทำวิจัย

อุปกรณ์ในการทำวิจัยหรือการเก็บตัวอย่าง (sample collection)

เครื่อง embedded (Leica, Germany)

Microcentrifuge tube

Automatic micropipette (Biohit, Finland)

Microtome (Thermo electron corporation, USA)

Slide superfrost plus (Thermo scientific, USA)

Cover slip

Hybridizer (DAKO cytometric)

Cool - box

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Vortex mixer)

Dako pen

กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS Microscope Digital Camera DP21)

สารเคมี

absolute, 95% และ 70% alcohol

10 % formalin solution

Aloe vera (Sigma®, USA)

Acetic acid (Cayman Chemical, MI, USA)

Assay Diluent RD 1-41 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, MI)

Calibrator Diluent RD5-17 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, MO)

Xylene

Distilled water

Diluent (DAKO)

Protenase K

Peroxidase blocking

ApopTag Plus Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection kit (Millipore, US & CA)

Phosphate buffer saline (PBS)

DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous)

Mounting media

EDTA buffer,pH8

3% H₂O₂

3% Normal horse serum

IL18 antibody (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA; dilution: 1:200)

PPAR γ antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; dilution: 1:1000)

DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous)

Hematoxyline (C.V. Laboratories, Thailand)

Eosin (C.V. Laboratories, Thailand)

Malondialdehyde standard (Cayman Chemical, MI, USA)

NaCl (Merck, Germany)

Na₂HPO₄ (Merck, Germany)

NaOH (Merck, Germany)

Sodium dodecyl sulfate (SDS; Cayman Chemical, MI, USA)

Sodium hydroxide (Cayman Chemical, MI, USA)

Sodium thiopental (Abbott, Italy)

Stop solution (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Substrate solution (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

Thiobarbituric acid (Cayman Chemical, MI, USA)

Wash buffer (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)



ระเบียบวิธีการวิจัย (Research methodology)

การเตรียมสัตว์ทดลอง (Experimental animals)

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ หนูขาวเพศผู้ พันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 220-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา กิ่งอ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม นำมาเลี้ยงในกรง สแตนเลส โดยให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปมาตรฐาน และน้ำสะอาดอย่างไม่จำกัด อยู่ในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง อาคารพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 องศาเซลเซียส และมีแสงสว่างอย่างน้อยวันละ 12 ชั่วโมง อย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนการทดลอง เพื่อให้สัตว์ได้ปรับสภาพร่างกาย และดูแลตามหลัก 3R โดยงานวิจัยนี้ได้ผ่านการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์จากคณะกรรมการจริยธรรมในสัตว์ทดลอง มีเลขที่โครงการวิจัยคือ 003/58

ขั้นตอนการทดลอง โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น สามกลุ่มคือ

1. กลุ่มควบคุม (n = 6) คือหนูที่มีสภาวะปกติให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปที่มีค่าปริมาณสารอาหารปกติคือ ไขมัน 35% คาร์โบไฮเดรต 47% โปรตีน 18% โดยรับประทานอาหารและน้ำได้อย่างไม่จำกัด ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

2. กลุ่มที่มีภาวะไขมันลงตับ (n = 6) คือหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูงเพียงอย่างเดียว โดยมีปริมาณสารอาหาร คือ ไขมัน 55% คาร์โบไฮเดรต 35% (แบ่ง 15% น้ำตาลฟรุกโทส 20%) โปรตีน 10%⁽⁷⁶⁾ โดยรับประทานอาหารและน้ำได้อย่างไม่จำกัด ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

3. กลุ่ม *Aloe* (n = 6) คือหนูที่ได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง โดยรับประทานอาหารและน้ำได้อย่างไม่จำกัด ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ร่วมกับการให้สารละลายวุ้นทางจระเข้ 1.75 มิลลิลิตร (ผงสกัดจากวุ้นจระเข้ละลายกับน้ำกลั่นที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวหนู)⁽⁸⁰⁾ (Sigma®)⁽⁸⁴⁾ ทาง oralgastric tube วันละ 1 ครั้ง โดยให้ในช่วงเวลาเดียวกันติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

หลังจากเลี้ยงจนครบ 8 สัปดาห์ จากนั้นอดอาหารหนูเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้หนูสลบโดย pentobarbital sodium ฉีดทางช่องท้อง จากนั้นนำหนูทดลองที่สลบ จับนอนในท่าหงาย ทำการผ่าตัดเปิดช่องท้อง แล้วทำการเก็บตัวอย่างเลือด จาก cardiac puncture แล้วตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมงที่

อุณหภูมิต่ำ แล้วนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 1000 G เป็นเวลา 20 นาที เก็บซีรัมไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้วิเคราะห์

ส่วนของตับ ทำการตัดตับออกมา ล้างใน normal saline จากนั้นแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปแช่ใน -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์ MDA และ GSH ส่วนที่สองนำไป fix ใน 10% formalin เพื่อทำการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และทำการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อตรวจหา IL18, PPAR γ และตรวจการตายแบบ apoptosis ในตับการวิเคราะห์ข้อมูลและการดำเนินการวิจัย

การตรวจหาระดับของซีรัม ALT and AST

การตรวจหาระดับของซีรัม ALT และ AST เพื่อดูความผิดปกติของเอนไซม์ที่เกิดขึ้นในตับ โดยทำการเก็บตัวอย่างเลือด และนำมาวิเคราะห์ผลค่าเอนไซม์โดยวิธีการดังต่อไปนี้

วิธีการ

ดูดเลือดที่หัวใจจากการทำ cardiac puncture ใส่ในหลอดทดลอง ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนที่อุณหภูมิห้อง 2 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 1000 G เป็นเวลา 10 นาที โดยดูดเฉพาะส่วนใสเก็บไว้และเขียนกำกับที่ฝาขวดให้เรียบร้อย นำมาทำการตรวจหาระดับเอนไซม์ AST และ ALT โดยใช้เครื่อง biochemical analyzer Reflotron® ดังรูปที่ 15 โดยใช้ micropipette ดูดซีรัมที่เตรียมไว้ ปริมาตร 32 ไมโครลิตร และนำ serum มาหยดบน strip ที่ออกแบบเฉพาะกับเครื่อง ซึ่งจะมีค่าแสดงออกมาเป็นตัวเลขของความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยมีหน่วยเป็น units/liter or U/L จากนั้นนำค่าที่ได้ไปเทียบกับค่ามาตรฐาน



รูปที่ 15 ภาพแสดง เครื่อง Reflotron® Plus

การตรวจหาระดับของ malondialdehyde (MDA) ในตับ

Malondialdehyde (MDA) เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการยับยั้ง Lipid peroxidation โดย จะมีการใช้ commercial assay kit (Cayman Chemical, MI, USA) นำมาใช้ในการวิเคราะห์ มีวิธีการดังต่อไปนี้^(85, 86)

วิธีการ

นำตับแยกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส นำมาชั่งปริมาณ 1 กรัม เพื่อทำ homogenized โดยนำไปใส่ใน microcentrifuge tube นำตับไปใส่ใน RIPA buffer (radio immune precipitation assay buffer) ปริมาตร 250 μ l แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง ต่อจากนั้นนำไปทำ homogenized แล้วนำไปเข้าเครื่อง centrifuged ที่ความเร็ว 1600 G เป็นเวลา 10 นาที ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตูดส่วนใสด้านบนขึ้นมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

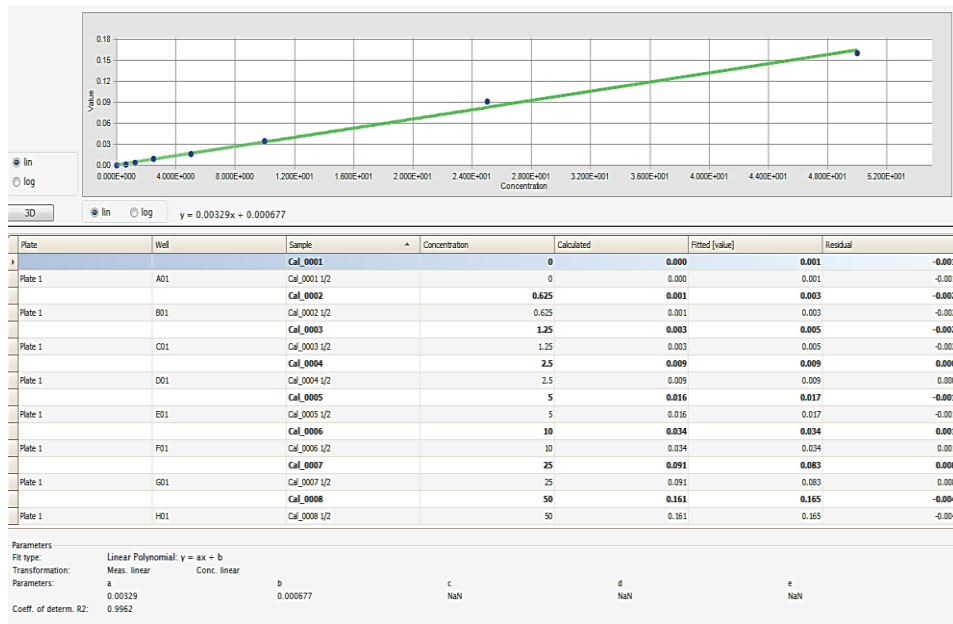
หลังจากนั้นทำการตรวจวัดวิเคราะห์ MDA โดยตูดส่วน stock solution ที่เตรียมไว้มา 125 ไมโครลิตร เตรียม sodium dodecyl sulfate (SDS) , TBA, acetic acid, และ sodium hydroxide นำมาผสมกันกับตัวอย่าง แล้วนำไปเข้าเครื่อง water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมานำมาแช่ในน้ำแข็ง 10 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา แล้วนำมาปั่นที่ ความเร็วรอบ 1600 G ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จึงตูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ใน wells เพื่อนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm

เมื่อได้ค่าการดูดกลืนแสง แล้วนำไปคำนวณหา % inhibition ตามสมการ ซึ่งจะแสดงการ คำนวณอยู่ในค่า standard curve การคำนวณค่า MDA standards โดยจะใช้ External MDA standard โดยเป็น MDA ที่บรรจุใน stock มาใช้คู่กับ distilled water โดยรายละเอียดการทำ MDA standards ดังตารางที่ 1 หลังจากนั้นนำค่าที่ได้ มาคำนวณค่าของ lipid peroxide ให้อยู่ในรูป ของ nmol/mg protein

Tube	MDA (μl)	Distilled water (μl)	MDA concentration (μM)
A	0	1000	0
B	5	995	0.625
C	10	990	1.25
D	20	980	2.5
E	40	960	5
F	80	920	10
G	200	800	25
H	400	600	50

ตารางที่ 1 ตารางแสดงการทำ MDA standards

จากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณ ค่า standard curve จากในกราฟที่ปรากฏดังภาพ โดยให้ แกน X คือค่าความเข้มข้นของ MDA และแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ความเข้มข้นของโปรตีนจะอยู่ในรูปของ nmol/mg protein โดยจากกราฟจะแสดงสมการ $y = ax + b$ ดังรูปที่ 16 ได้ดังนี้



รูปที่ 16 ภาพแสดงค่า standard curve ของ MDA

การตรวจหาระดับของ glutathione (GSH)

การตรวจหาระดับของ glutathione เป็นการใช้วิธี enzymatic recycling method⁽⁸⁷⁾ โดยทำการวัดระดับของกลูตาไธโอนภายในตับ มีวิธีการทำดังต่อไปนี้

วิธีการ

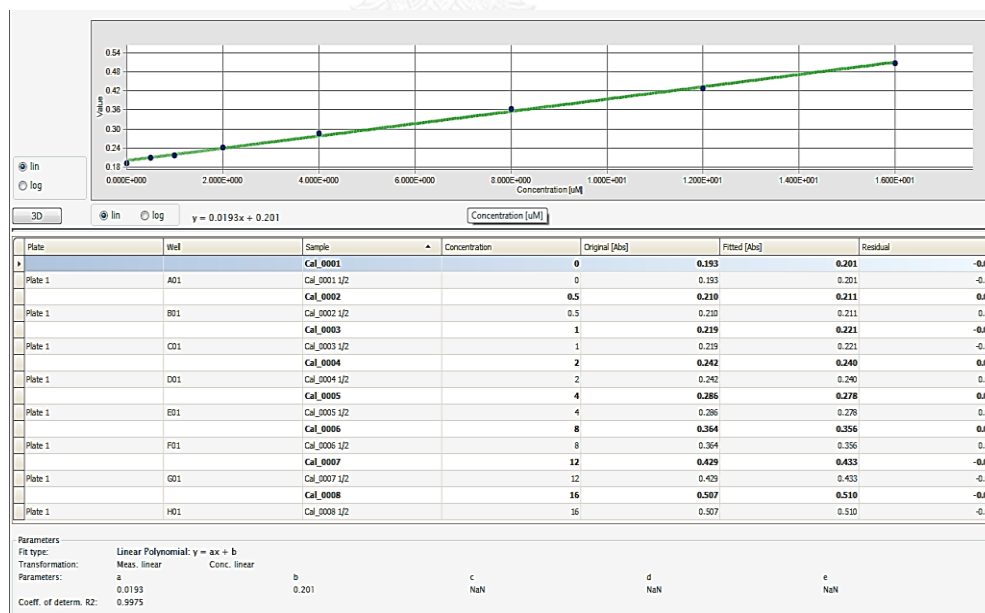
นำตับแยกเก็บไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส นำมาชั่ง ให้ได้ปริมาตร 0.5 กรัมใส่ ใน micro-centrifuge tube ตามด้วยใส่ phosphate buffered saline solution ปริมาตร 250 มิลลิลิตร นำไปแช่ในถังน้ำแข็งที่เตรียมไว้ ใส่ใน microcentrifuge tube จากนั้นนำไปทำ homogenized โดยปั่นที่ความเร็วรอบ 1600 G ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ดูดส่วนใสออกมาเก็บไว้ที่ -80°C เมื่อวิเคราะห์ใช้ micropipette ดูดตัวอย่างที่ต้องการศึกษาออกมา 500 ไมโครลิตร ดูด MPA 500 ไมโครลิตร ใส่ลงไปและนำไป mix ด้วย vortex ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ใช้ micropipette ดูดส่วนใสออกมา 500 ไมโครลิตร ใช้ micropipette ดูดสาร TEAM มาใส่ในหลอดตัวอย่าง 25 ไมโครลิตร นำไป mix ด้วย vortex แล้วใช้ micropipette ดูดตัวอย่าง 50 ไมโครลิตร ใส่ใน wells นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 nm

ทำการคำนวณค่า GSH standards โดยการดูด external standard ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน wells โดยการทำให้ GSH standards จะดูด GSSG มากคู่กับ MES buffer โดยค่ารายละเอียดการทำ GSH standards ได้ดังตารางที่ 2

เมื่อวัดค่า GSSH ด้วย เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงแล้ว นำค่าที่ได้ มาคำนวณค่า standard จากในกราฟที่ปรากฏดังรูปที่ 17 โดยให้แกน X คือค่าความเข้มข้น GSH และแกน Y คือค่าการดูดกลืนแสง ความเข้มข้นของโปรตีนจะอยู่ในรูปของ nmol/mg protein

tube	GSSG standard	MES Buffer	Final concentration	Equivalent total GSH
a	0	500	0	0
b	5	495	0.25	2.5
c	10	490	0.5	1
d	20	480	1	2
e	40	460	2	4
f	80	420	4	8
g	120	380	6	12
h	160	340	8	16

ตารางที่ 2 ตารางแสดงการทำ GSH standards



รูปที่ 17 ภาพแสดง ค่า standard curve ของ GSH

การตรวจเนื้อเยื่อตับทางพยาธิวิทยา

นำเนื้อเยื่อตับบางส่วนมา fixed ใน 10% formaldehyde 24-48 ชั่วโมง เพื่อรักษาสภาพชิ้นเนื้อ ให้เป็นสภาพที่ใกล้เคียงกับสภาพปกติมากที่สุด จากนั้นนำไปเข้าสู่กระบวนการ processing แล้วนำมาวางชิ้นเนื้อลงในตลับ ทำเป็น parafin block แล้วตัดด้วยเครื่อง microtome (Thermo electron corporation, USA) ด้วยความหนา 3 ไมครอน นำสไลด์มา deparaffinized ก่อน จากนั้นจึงนำมาย้อมสี hematoxylin & eosin โดย hematoxylin จะติดสีม่วงที่บริเวณ nucleus ส่วน cytoplasm จะติดสีชมพูของ eosin จากนั้นนำมาให้พยาธิแพทย์ร่วมอภิปรายผลดูการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของเนื้อตับ

ขั้นตอนการย้อม hematoxylin & eosin คือนำ parafin block มาวางบนถาดเย็น เพื่อให้หน้า block เย็น เตรียมการตัด โดยเครื่อง microtome ในตำแหน่งวาง block จากนั้นตัด tissue section ด้วยความหนา 3 ไมครอน นำ tissue ที่ตัดได้ไปลอยใน 30% alcohol แล้วใช้ superfrost plus slide (Thermo scientific, USA) ที่เตรียมไว้ ซ้อน tissue section ที่ตัดออกมา ไปลอยในอ่างน้ำลอยชิ้นเนื้อ (floating bath) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 43 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเขียนรหัสและชนิดการย้อมที่หัวสไลด์ให้เรียบร้อย แล้วนำไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ (hot air oven) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้เวลาอบทิ้งไว้ข้ามคืน เมื่อต้องการย้อมสีชิ้นเนื้อจึงทำการ deparaffinized จุ่มลงใน xylene 3 โถ ๆ ละ 3 นาที จุ่มใน 95% alcohol 3 โถ ๆ ละประมาณ 30 วินาที หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที

การย้อม hematoxylin & eosin

นำสไลด์มาจุ่มลงใน hematoxylin 5 นาที นำไปล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที ล้าง slide ด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที จุ่ม slide 95% alcohol 30 วินาที หลังจากนั้นจุ่ม slide ลงใน eosin เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจุ่มใน slide 95% alcohol โถละ 10 dips จำนวน 2 โถ และใน absolute alcohol โถละ 10 dips จำนวน 2 โถ จากนั้นจุ่ม slide ใน xylene โถละ 10 dips จำนวน 2 โถและนำไป mounting slides หลังจากได้สไลด์แล้วนำไปอภิปรายผลโดยศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ร่วมกับพยาธิแพทย์

การบันทึกข้อมูลทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ

บันทึกข้อมูลการให้เกรดของการเกิด steatosis, ballooning degeneration และ necroinflammation โดยใช้หลักเกณฑ์ของ Brunt *et al.* ⁽⁸⁸⁾ ซึ่งมีหลักการให้คะแนนตามระดับ

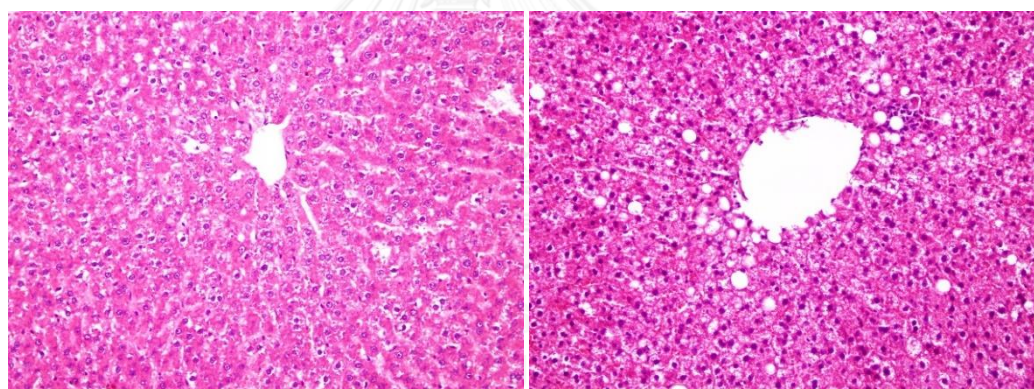
ความรุนแรงตั้งแต่ระดับ 0 ถึง 3+ โดยดูจากการเกิด macrovesicular fat และ microvesicular fat การบวม และการอักเสบ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งแบ่งตามเกณฑ์ได้ดังนี้
คะแนนจำนวนของเม็ดไขมันในตับ (steatosis) แบ่งออกเป็น graded มีระดับ 0-3

0 = no hepatocytes containing fat

1 = < 33% of the hepatocytes containing fat

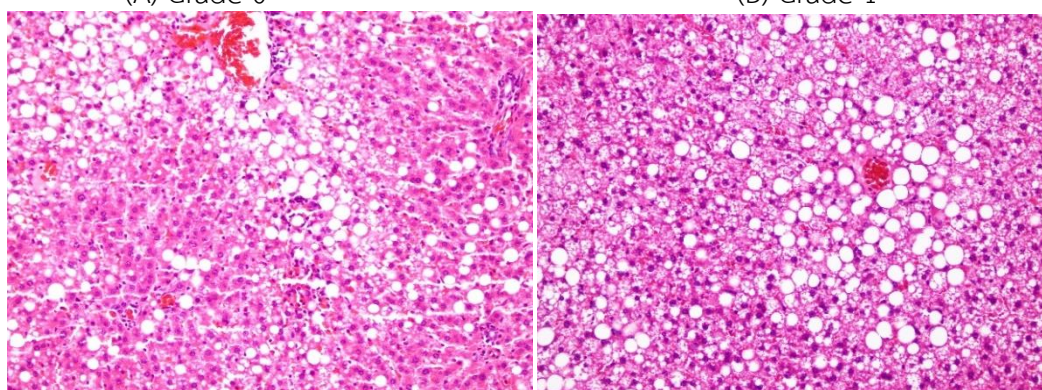
2 = 33 - 66% of the hepatocytes containing fat

3 = > 66% of the hepatocytes containing fat



(A) Grade 0

(B) Grade 1



(C) Grade 2

(D) Grade 3

รูปที่ 18 ภาพแสดงการให้คะแนนของจำนวนของเม็ดไขมันในตับ (steatosis) (20x)

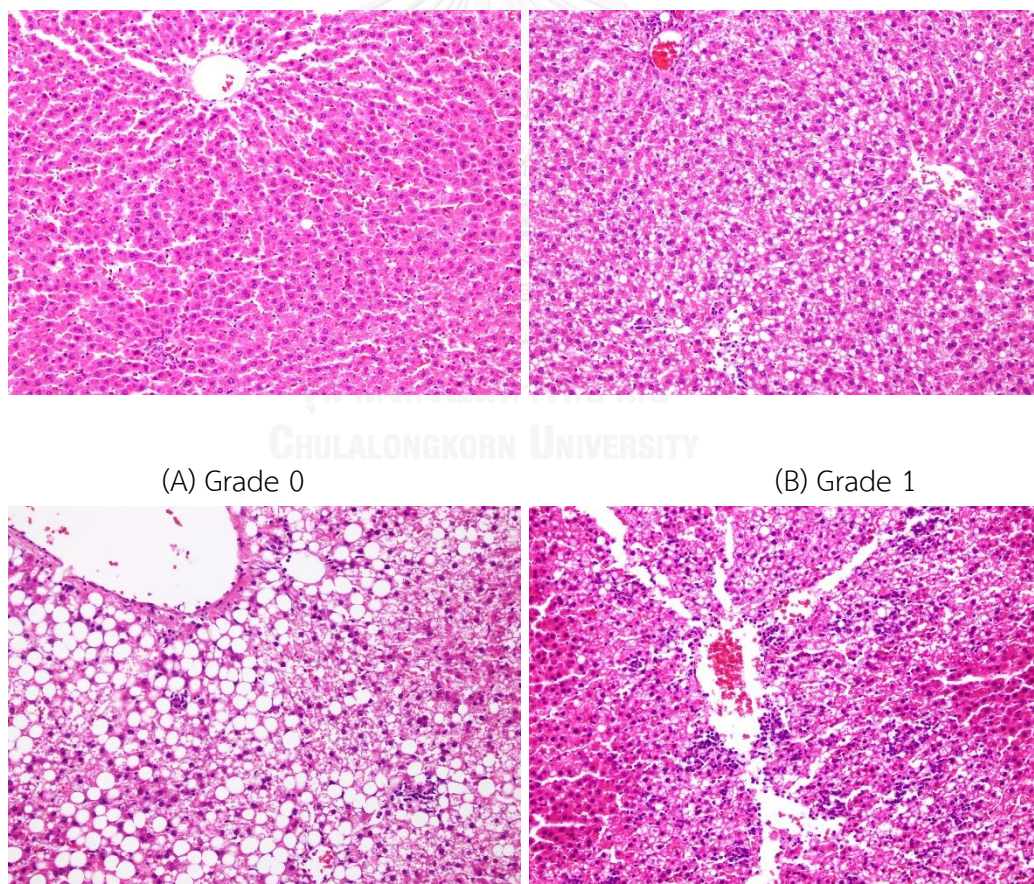
คะแนนการเกิดการอักเสบ necroinflammation แบ่งออกเป็น graded มีระดับ 0-3

0 = no inflammation and necrosis

1 = mild Intra-acinar neutrophils \pm Intra-acinar lymphocytes with < 2 foci per 20 x field

2 = moderate Intra-acinar neutrophils \pm Intra-acinar lymphocytes, may be associated with zone 3 pericellular fibrosis, with 2-4 foci per 20 x field

3 = severe Intra-acinar neutrophils \pm Intra-acinar lymphocytes, with > 4 foci per 20 x field



(A) Grade 0

(B) Grade 1

(C) Grade 2

(D) Grade 3

รูปที่ 19 ภาพแสดงการให้คะแนนการเกิดการอักเสบ (necroinflammation) (20X)

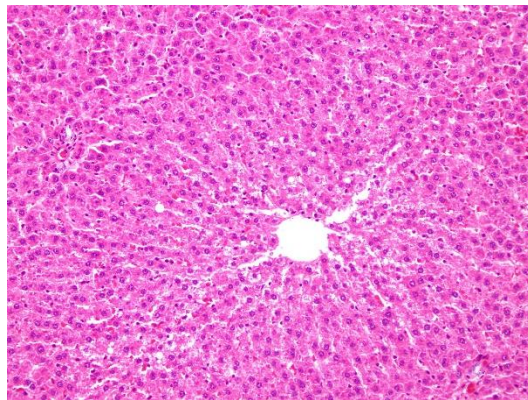
คะแนนการเกิดการบวม ballooning degeneration

แบ่งออกเป็น graded มีระดับ 0-2 ระดับ

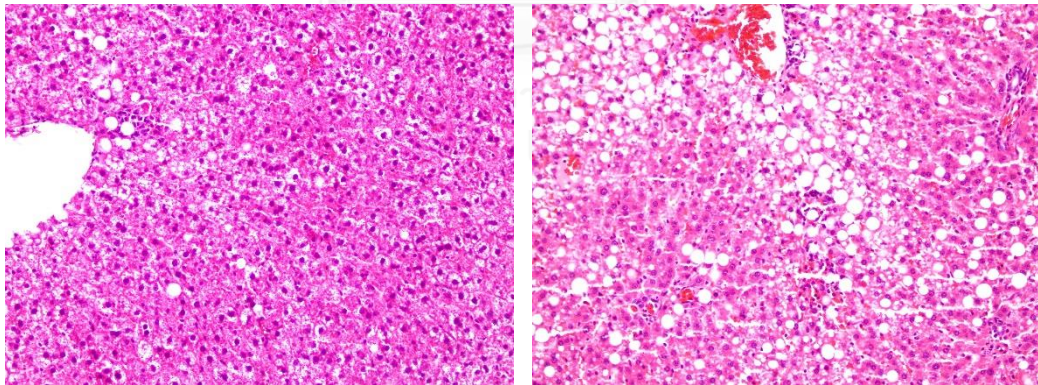
0 = no ballooning

1 = few ballooning hepatocytes injury/inflammation

2 = many ballooning hepatocytes



(A) Grade 0



(B) Grade 1

(C) Grade 2

รูปที่ 20 ภาพแสดงการให้คะแนน ballooning degeneration ในตับ (20X)

ขั้นตอนการทำ manual tissue microarray block

หลังจากพยาธิแพทย์ได้ทำการดูสไลด์เนื้อเยื่อที่ผ่านการย้อมสี hematoxylin-eosin (H&E) ด้วยกล้องจุลทรรศน์แล้ว จะวงเลือกตำแหน่งที่ต้องการศึกษาจากสไลด์ที่ย้อม H&E จากนั้นนำสไลด์ที่วงแล้วไปเทียบกับชิ้นเนื้อบน paraffin block ให้ตำแหน่งที่ต้องการศึกษาตรงกัน จากนั้นทำการเจาะชิ้นเนื้อบน paraffin block ด้วยแท่งเหล็กท่อกวาง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร ในบริเวณที่เลือกตำแหน่งไว้ สิ่งที่สำคัญคือควรทำแผนที่ชิ้นเนื้อไว้ก่อน ดังรูปที่ 21 เพื่อป้องกันการสลับตำแหน่ง ของชิ้นเนื้อที่เจาะ เพราะชิ้นเนื้อหลังจากเจาะด้วยแท่งเหล็กแล้วจะมีลักษณะเป็นแท่งกลม ยาว คล้ายกัน หลังจากนั้นจึงนำแท่งชิ้นเนื้อที่เจาะออกมาเคาะออกจากแท่งเหล็กท่อกวาง แล้วนำไปจัดเรียงเป็นแถวใน mold เตรียมไว้ เท paraffin ลงใน mold นำไปวางที่ถาดเย็นเพื่อให้ paraffin เซ็ตตัว แล้วแกะออกจาก mold ได้เป็น tissue microarray paraffin block จากนั้นนำไปตัด ขั้นตอนการตัดด้วย microtome ออกมาเป็น section ต่อไป แล้วซ้อนบน slide เพื่อการย้อมสีต่อไป (89, 90)



รูปที่ 21 ภาพแสดงชุดอุปกรณ์ทำ manual tissue microarray

ขั้นตอนการ เตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการย้อม Immunohistochemistry

นำชิ้นเนื้อบน tissue microarray block มาตัด section ให้มีความหนา 3 ไมครอน จำนวน 3 สไลด์ (3 สไลด์สำหรับการย้อม immunohistochemistry 3 ชนิด คือ IL 18, PPAR γ , TUNEL และอีก 1 สไลด์สำหรับย้อม H&E (TMA) เพื่อสำหรับใช้ตรวจสอบว่าตรงกับตำแหน่งที่เลือกมาหรือไม่ หลังจากนั้น นำสไลด์ไปอบที่ตู้อบอุณหภูมิ 60°C ทิ้งไว้ข้ามคืน

นำสไลด์มา deparaffinized แล้วทำการกู้คืนแอนติเจนโดยวิธี antigen retrieval โดยการ ใช้เครื่อง DAKO retrieval แช่สไลด์ ใน wash buffer 15 นาที จากนั้นหยด DAKO peroxidase blocking reagent (3% H_2O_2) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อ block endogenous peroxidase activity ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จากนั้นล้างด้วย phosphate buffer saline 3 นาที เททิ้ง ล้างด้วย phosphate buffer saline 3 นาที เตรียม IL18 antibody (Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA; dilution: 1:200) และ PPAR γ antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA; dilution: 1:1000) ครอบ tissue section ด้วย Dako cytostation pen จากนั้นหยด primary antibody ที่เตรียมไว้ ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย phosphate buffer saline 3 นาที เททิ้ง 2 ครั้ง หยด secondary antibody DAKO Envision Flex / HRP บนสไลด์ ทิ้งไว้ เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย phosphate buffer saline 3 นาที 2 ครั้ง จากนั้นหยด DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อทำ color development ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที จุ่มสไลด์เพื่อ counter stain ลงในสี hematoxilin จำนวน 10 dip ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่านเป็นเวลา 5 นาที mounting slides ด้วย mounting media แล้วปิดด้วย cover glass slides

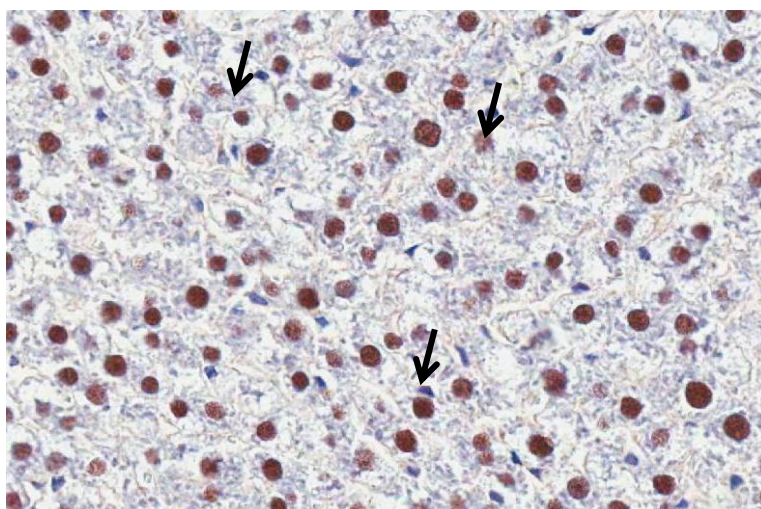
การย้อม terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)

Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) เป็นวิธีตรวจสอบ DNA fragmentation ที่เกิดขึ้นในเซลล์ที่เกิด apoptosis โดยใช้หลักการคือ การแทรกอนุพันธ์ของ dUTP (deoxyuridine 5'triphosphate) นำไปเติมที่ปลายของ DNA ที่แตกหักด้วยปฏิกิริยา terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)⁽⁵⁵⁾ แล้วทำการติดตามด้วยแอนติบอดีที่ติดด้วยสารเรืองแสงหรือ DAB โดยใช้ ApopTag Plus Peroxidase In Situ Apoptosis Detection kit (Millipore, US & CA) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

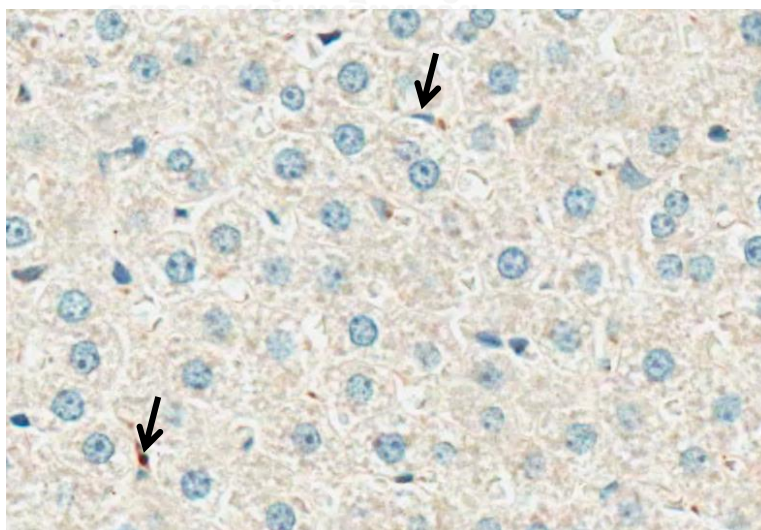
ขั้นตอนการย้อม apoptosis

ทำการ deparaffinized สำหรับการย้อม TUNEL หยด proteinase K (20 µg/mL) ลงบนสไลด์ เป็นเวลา 15 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที หยด peroxidase blocking ลงบนสไลด์ 5 นาที ล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เตรียม working strength TdT enzyme จำนวน 10 µL โดยมีส่วนประกอบคือ Reaction buffer 7.7 µL และ TdT enzyme 3.3 µL จากนั้นหยด equilibration buffer 20 µL ต่อ 1 slide 10 วินาที หยด working strength TdT enzyme ปิดด้วย plastic cover slip นำสไลด์เข้า เครื่อง hybridizer ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำสไลด์ออกมา ตั้ง plastic cover slip ออก หยด stop / wash buffer ที่เตรียมไว้ลงบนสไลด์ เวลา 10 นาที ใส่สไลด์ใน phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง หยด mouse anti- digoxigenin peroxidase 20 µL เป็นเวลา 30 นาที จุ่มสไลด์ใน phosphate buffer saline (PBS) เป็นเวลา 3 นาที 2 ครั้ง หยด DAB (3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride anhydrous) 5 นาที ล้างด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที จุ่มสไลด์ในสี hematoxylin 10 วินาที ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที จุ่มสไลด์ตัวอย่างใน Lithium 10 วินาที จุ่มสไลด์ใน 95% alcohol 10 วินาที ใน absolute alcohol 10 วินาที และใน xylene 10 วินาที หลังจากนั้นนำไป mount slides

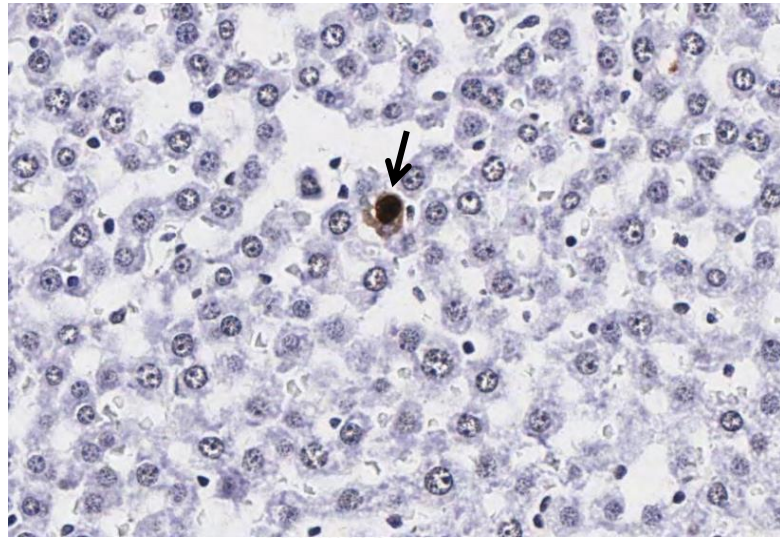
หลังจากได้สไลด์แล้ว นำสไลด์มาวิเคราะห์ดูการแสดงออก (expression) โดยการติดสีได้กล้องจุลทรรศน์ โดยจะพบว่า PPAR γ จะพบการติดสีน้ำตาลที่นิวเคลียส ดังรูปที่ 22 และ IL18 จะมีการติดสีน้ำตาลที่ kupffer cells ดังรูปที่ 23 และ apoptosis จะพบการติดสีน้ำตาลในเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ดังรูปที่ 24



รูปที่ 22 ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของ PPAR γ จะพบการติดสีน้ำตาลที่นิวเคลียส

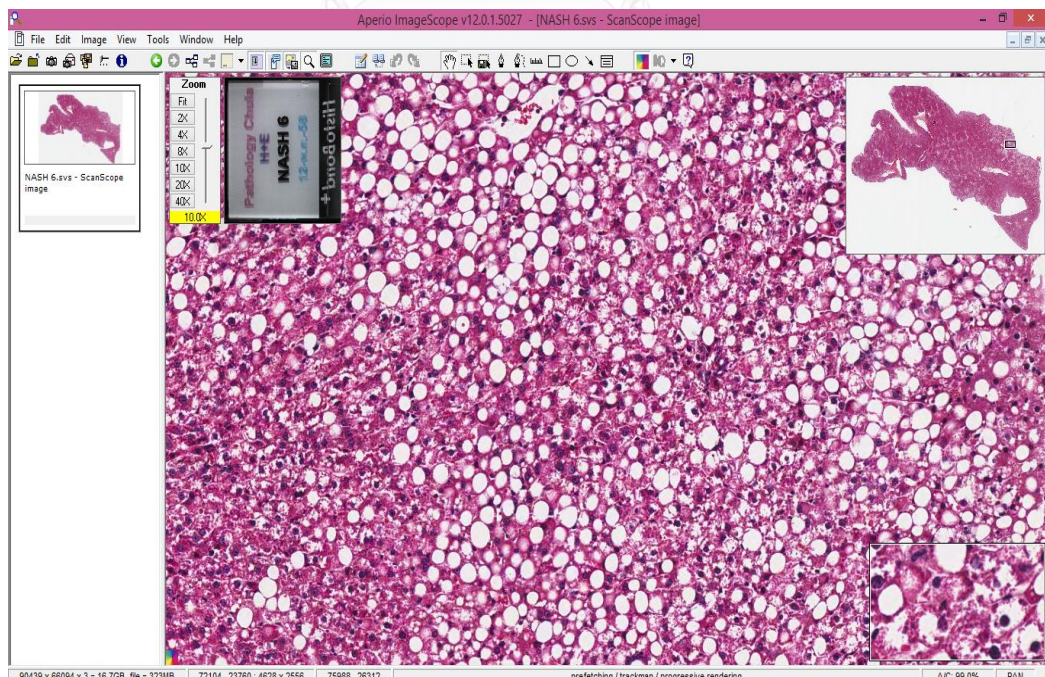


รูปที่ 23 ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของ IL18 จะมีการติดสีน้ำตาลที่ kupffer cells



รูปที่ 24 ภาพแสดงบริเวณที่มีการแสดงออกของการตายแบบ apoptosis จะมีการติดสีน้ำตาลที่เซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis

หลังจากนั้นนำไปคำนวณด้วยเครื่องอ่าน ด้วยโปรแกรม Image scope เพื่อมาคำนวณเปอร์เซ็นต์ การติดสีของเซลล์ ดังรูปที่ 25 (91)



รูปที่ 25 ภาพแสดงลักษณะโปรแกรม aperio imagescope

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของพารามิเตอร์ต่าง ๆ ระหว่างกลุ่ม เพื่อวิเคราะห์ ผลของว่านหางจระเข้ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับของ ALT , AST, MDA, GSH, IL 18, PPAR γ , TUNEL ของตับ ด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) และ Tukey post-hoc ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ($p < 0.05$) โดยใช้โปรแกรม Social Sciences (SPSS) software version 18.0⁽⁸⁴⁾

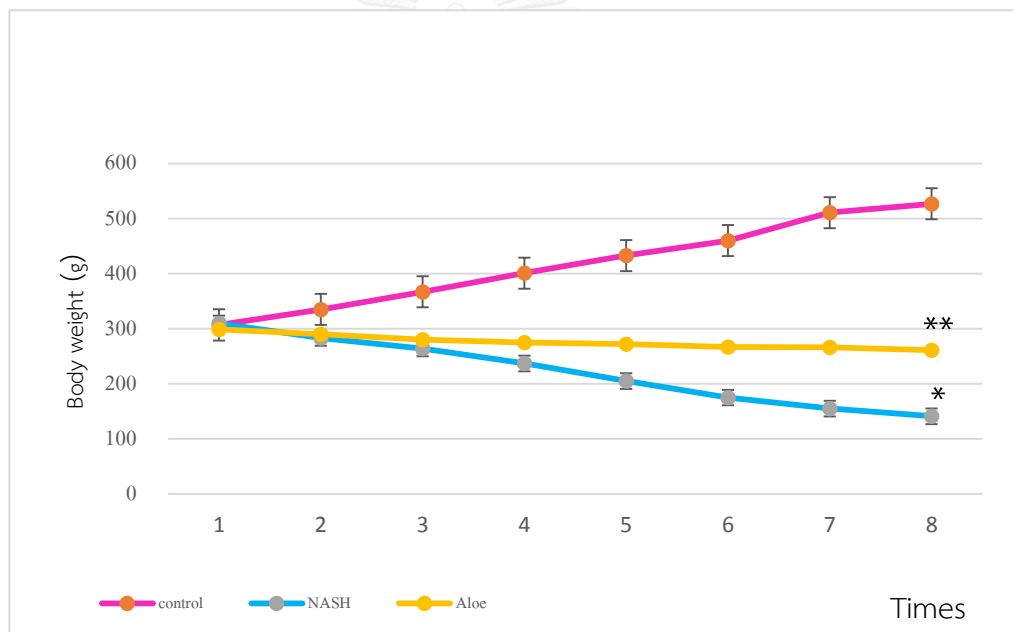


บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของหนูแรท

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ ทำการเปรียบเทียบหนูแรทในกลุ่ม NASH* กับกลุ่ม control พบว่ามีการลดลงของน้ำหนักตัวในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่มที่ให้ Aloe** เมื่อเปรียบเทียบกับหนูแรทในกลุ่ม NASH พบว่าน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 26



รูปที่ 26 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของหนูแรททั้งสามกลุ่ม

โดย * กลุ่ม NASH 223 ± 14.0 g เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 417 ± 11.2 g โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

** กลุ่ม Aloe 276 ± 3.6 g เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 223 ± 14.0 g โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพของหนูแรท

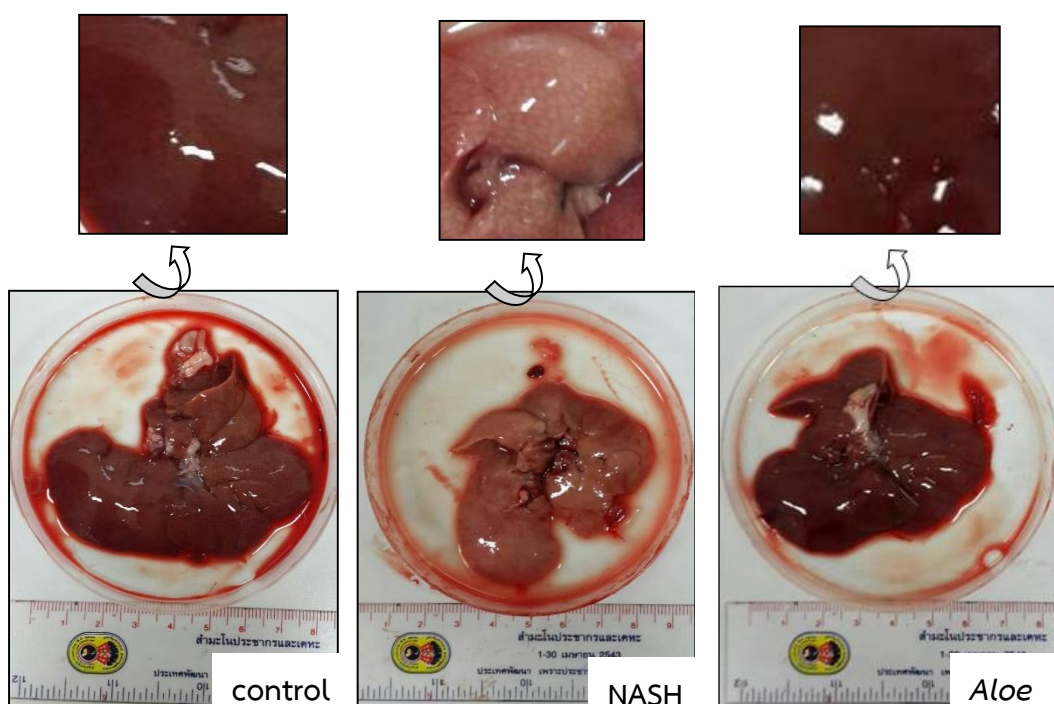


รูปที่ 27 ภาพแสดงลักษณะภายนอกของหนูแรทแต่ละกลุ่ม

จากการศึกษา โดยแบ่งหนูแรทออกเป็นสามกลุ่ม ทำการเลี้ยงจนครบเวลา 8 สัปดาห์ เมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพ ดังรูปที่ 27 พบว่า

1. หนูกลุ่ม control จะพบว่าลักษณะของขนเป็นมันเงา อุปนิสัยร่าเริง การเคลื่อนไหวรวดเร็ว มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นในทุกสัปดาห์ มีความกระตือรือร้นต่อสิ่งเร้าต่าง ๆ เช่น เสียง และการมองเห็น ตอบสนองได้เร็ว
2. หนูกลุ่ม NASH มีลักษณะพอม ขนสืบติดกันกระจุก ขนมีสีขาวมอม ติดกันเป็นแพ มีขนร่วงเป็นหย่อม ๆ น้ำหนักลดลงอย่างชัดเจน ไม่ active พบความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่ม control
3. หนูในกลุ่ม Aloe พบว่ามีน้ำหนักตัวในระยะแรกลดลงเล็กน้อย หลังจากนั้นน้ำหนักตัวค่อนข้างคงที่ หนูในกลุ่มนี้มีลักษณะขนสีขาว เป็นมัน ขนไม่ร่วงหรือสืบเป็นกระจุก ลักษณะภายนอกไม่แตกต่างกับกลุ่ม control

การศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของตับในหนูแรท

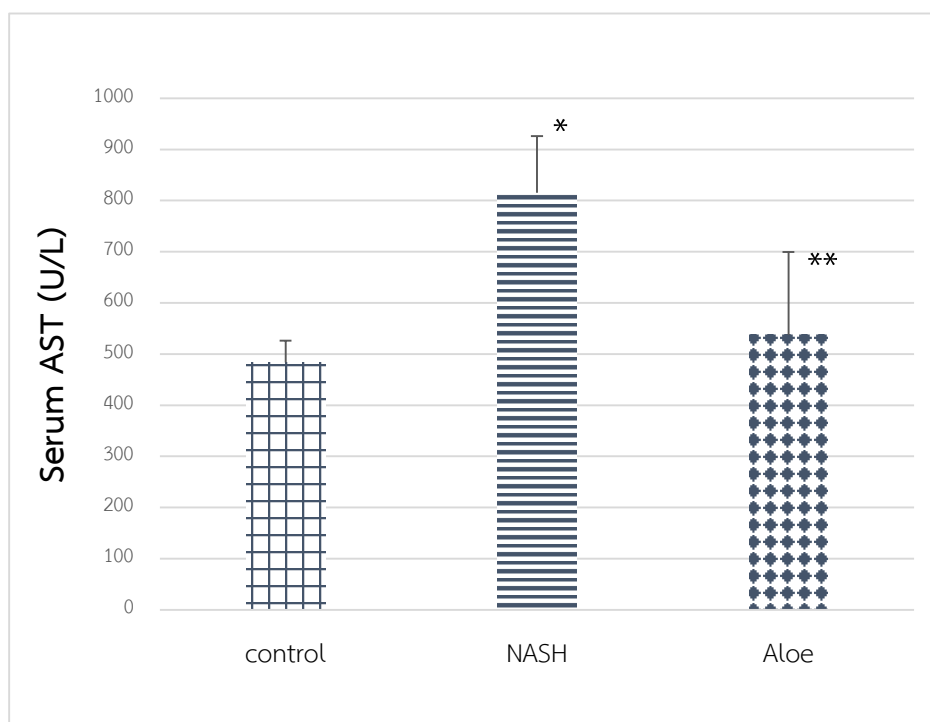


รูปที่ 28 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของตับในหนูแรททั้งสามกลุ่ม

เมื่อทำการศึกษาโดยวิธีการสังเกตลักษณะทางกายวิภาคของตับ ในหนูแรท เมื่อทำการทดลอง พบว่า ลักษณะสีของตับในหนูกลุ่ม NASH มีสีน้ำตาลอ่อน มีสีเหลืองแทรกในบางจุดของเนื้อตับ มีขนาดเล็ก ขนาดประมาณ 5-6 เซนติเมตร โดยเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่าจะเห็นความแตกต่างกับกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน ทั้งในเรื่องขนาด และสีของตับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับสีของตับหนูในกลุ่ม control จะพบว่าลักษณะสีของตับในกลุ่ม control มีสีตับเป็นสีแดง มีขนาดของเนื้อตับใหญ่ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบจากทั้งสามกลุ่ม พบว่าตับในกลุ่ม control มีขนาดประมาณ 8-9 เซนติเมตร และลักษณะสีของตับในหนูกลุ่ม Aloe จะพบว่ามีสีแดงสด ขนาดเล็กกว่ากลุ่ม control เล็กน้อยคือ ขนาดประมาณ 6-7 เซนติเมตร ดังรูปที่ 28

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ serum AST

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของเอนไซม์ AST ในกลุ่มของ NASH เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม *Aloe* พบว่ามีระดับของเอนไซม์ AST ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูป 29



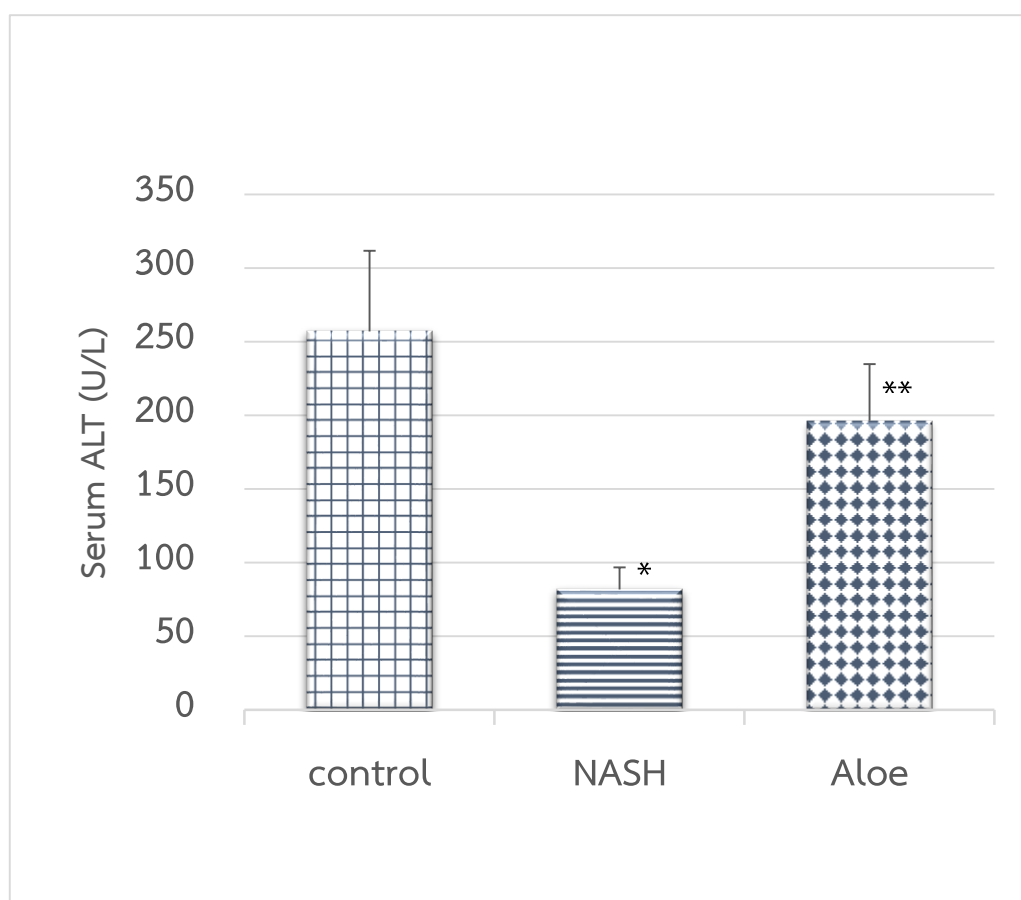
รูปที่ 29 ภาพแสดงระดับของเอนไซม์ AST ทั้งสามกลุ่ม (mean \pm SD) โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 815 ± 110 U/L เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 483 ± 42 U/L โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

** กลุ่ม *Aloe* 537 ± 162 U/L เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 815 ± 110 U/L โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.002$

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับ serum ALT

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของเอนไซม์ ALT ในกลุ่มของ NASH มีระดับที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม Aloe พบว่ามีระดับของเอนไซม์ ALT เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับเอนไซม์ในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 30



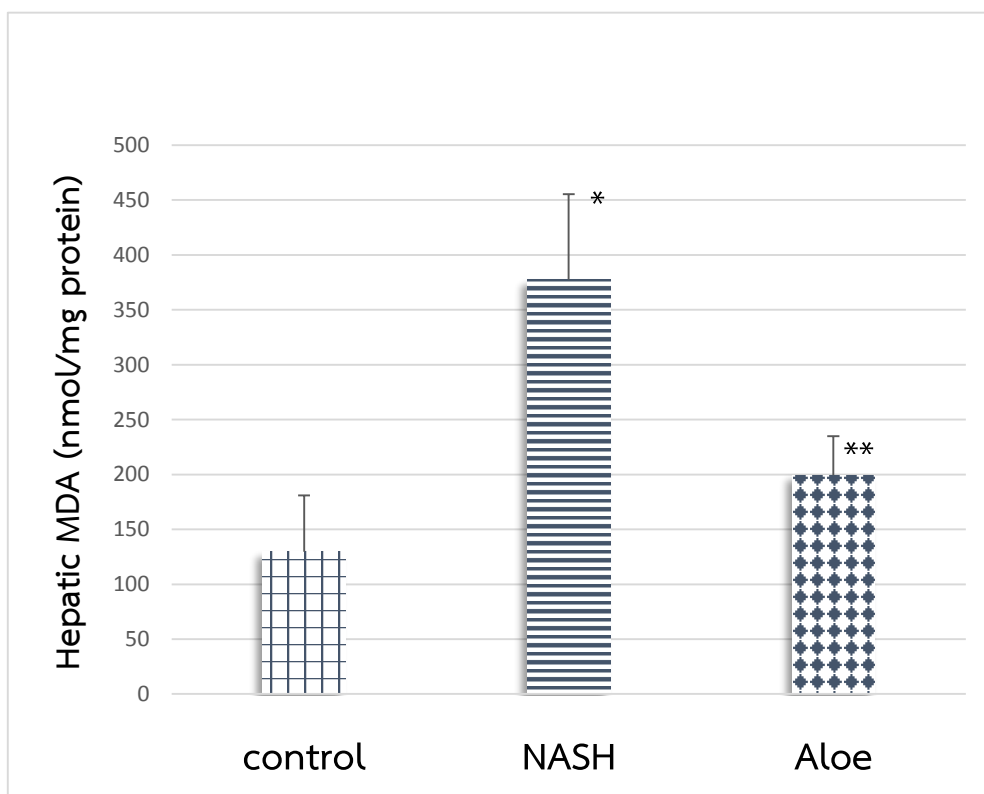
รูปที่ 30 ภาพแสดงระดับของเอนไซม์ ALT ทั้งสามกลุ่ม (mean \pm SD) โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 81 ± 14 U/L เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 257 ± 54 U/L โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

** กลุ่ม Aloe 196 ± 38 U/L เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 81 ± 14 U/L โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของ hepatic MDA

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับ Hepatic MDA ในหนูทั้งสามกลุ่มเปรียบเทียบกัน พบว่าหนูในกลุ่มของ NASH พบว่ามีระดับ MDA เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม *Aloe* พบว่ามีระดับของ MDA ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ MDA ในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 31



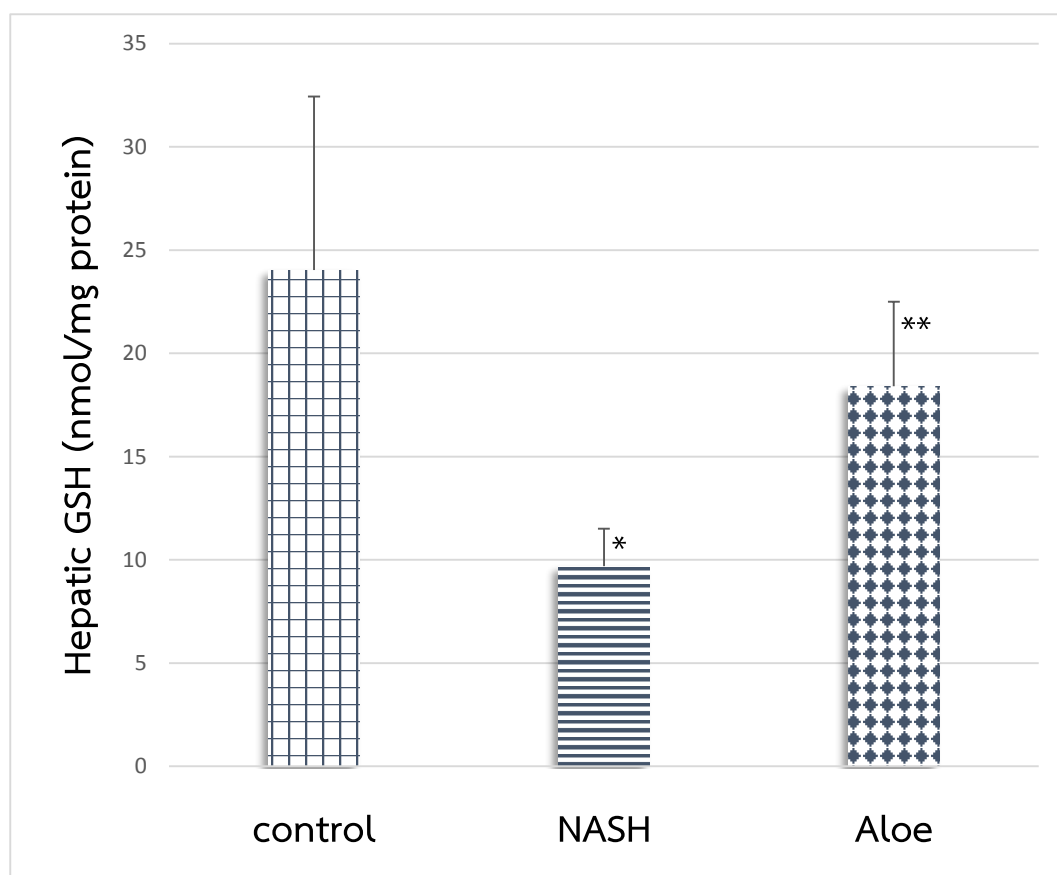
รูปที่ 31 ภาพแสดงระดับของ Hepatic MDA ทั้งสามกลุ่ม (mean ± SD) โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 377 ± 77 nmol/mg protein เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 129 ± 51 nmol/mg protein โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

** กลุ่ม *Aloe* 199 ± 35 nmol/mg protein เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 377 ± 77 nmol/mg protein โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับของ ของ hepatic GSH

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับ GSH ในหนูทั้งสามกลุ่มเปรียบเทียบกัน พบว่าหนูในกลุ่มของ NASH มี GSH ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการศึกษาในกลุ่ม *Aloe* พบว่ามีระดับของ GSH เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับระดับ GSH ในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 32



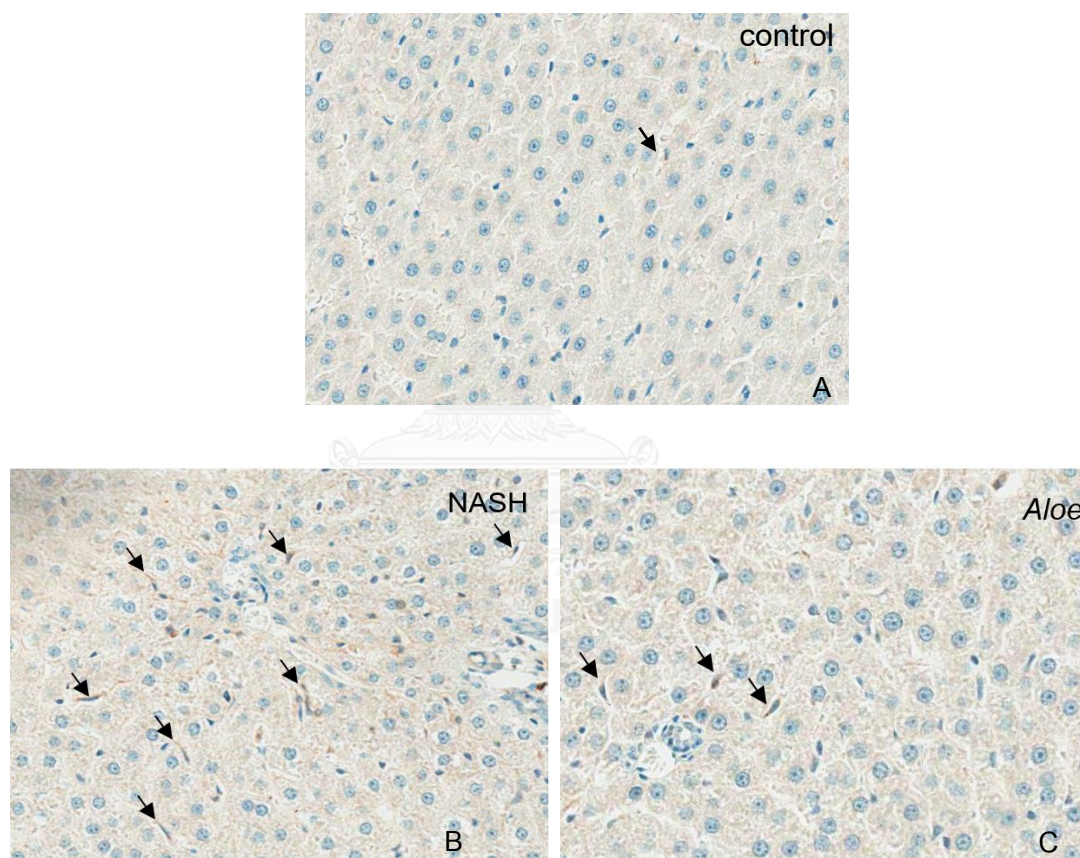
รูปที่ 32 ภาพแสดงระดับของ GSH ทั้งสามกลุ่ม (mean ± SD) โดยพบว่าทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 9 ± 1 nmol/mg protein เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 24 ± 8 nmol/mg protein โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.001$

** กลุ่ม *Aloe* 18 ± 4 nmol/mg protein เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 9 ± 1 nmol/mg protein โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.039$

การศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงในการแสดงออกของ Immunoreactive ของ IL18

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ เมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ IL18 ด้วยเทคนิคการย้อม Immunohistochemistry ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์จะพบการแสดงออกของ IL18 ปรากฏขึ้น โดยจะแสดงออกใน kupffer cell ซึ่ง kupffer cell เป็นเซลล์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการอักเสบของเนื้อเยื่อตับ เมื่อทำการศึกษาโดยทำการย้อมทาง immunohistochemistry จะพบการแสดงออกคือ kupffer cell ที่มีการแสดงออกต่อ IL18 จะพบการติดสีน้ำตาลที่เซลล์ ดังรูปที่ 33



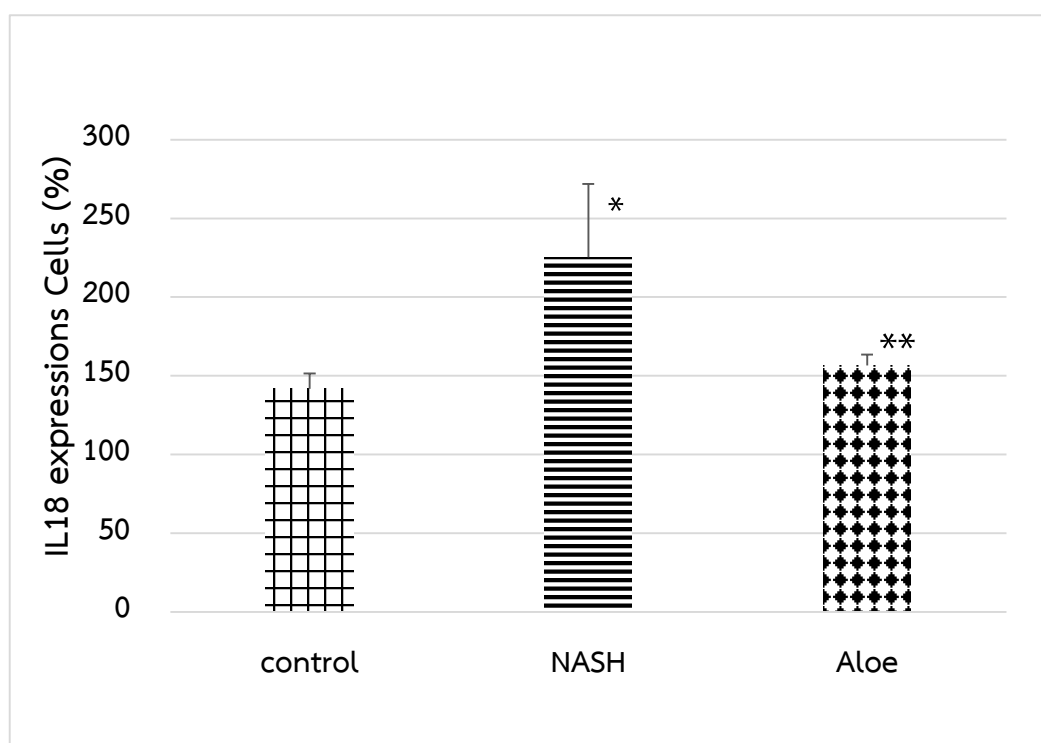
รูปที่ 33 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน IL18

A ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน IL18 ในกลุ่ม control

B ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน IL18 ในกลุ่ม NASH

C ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน IL18 ในกลุ่ม Aloe

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับเปอร์เซ็นต์ของ IL18 ในหนูทั้งสามกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Aperio Imagescope เปรียบเทียบกัน พบว่าหนูในกลุ่มของ NASH มีเปอร์เซ็นต์ของ IL18 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม *Aloe* พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของ IL18 ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 34



CHULALONGKORN UNIVERSITY

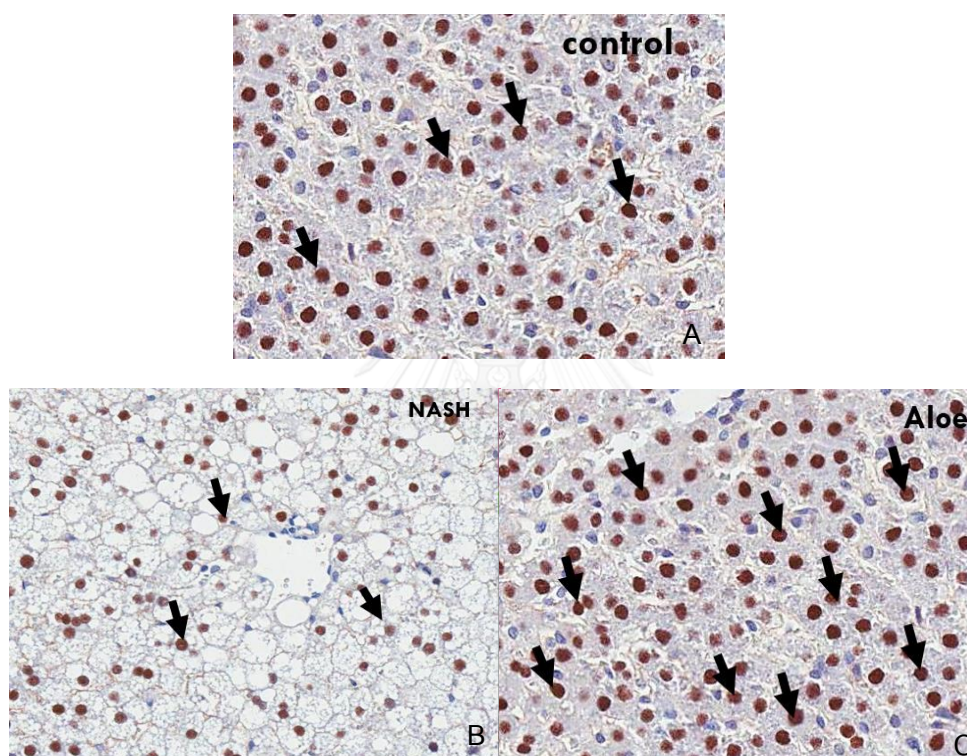
รูปที่ 34 ภาพแสดงระดับของ IL18 ทั้งสามกลุ่ม (mean ± SD) โดยพบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 225 ± 46 % เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 141 ± 9.7 % โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ p=0.000

** กลุ่ม *Aloe* 156 ± 6 % เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 225 ± 46 % โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ p=0.002

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ Immunoreactive ใน PPAR γ

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับของ PPAR γ ภายในเนื้อเยื่อตับ เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคการย้อม Immunohistochemistry ได้กล้องจุลทรรศน์ มีการแสดงออกของ PPAR γ ปรากฏขึ้นในนิวเคลียสของเซลล์ โดยการแสดงออกของ PPAR γ จะพบการติดสีน้ำตาลภายในนิวเคลียสของเซลล์ตับ ดังรูปที่ 35



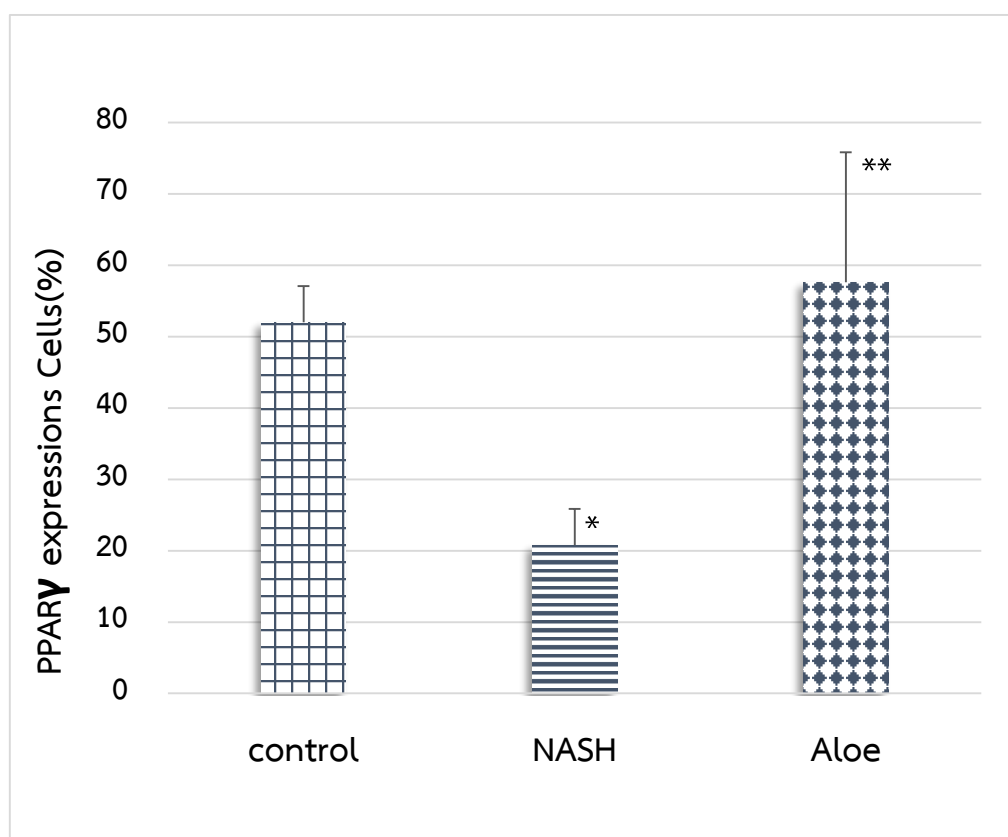
รูปที่ 35 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ใน PPAR γ

A ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ของ PPAR γ ในกลุ่ม control

B ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ของ PPAR γ ในกลุ่ม NASH

C ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของ Immunoreactive ของ PPAR γ ในกลุ่ม Aloe

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าระดับเปอร์เซ็นต์ PPAR γ ในหนูทั้งสามกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Aperio Imagescope เปรียบเทียบกัน โดยหนูในกลุ่มของ NASH มีระดับเปอร์เซ็นต์ของ PPAR γ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ PPAR γ ในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และระดับเปอร์เซ็นต์ของ PPAR γ ในกลุ่มที่ Aloe พบว่ามีระดับของ PPAR γ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระดับ PPAR γ ในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 36



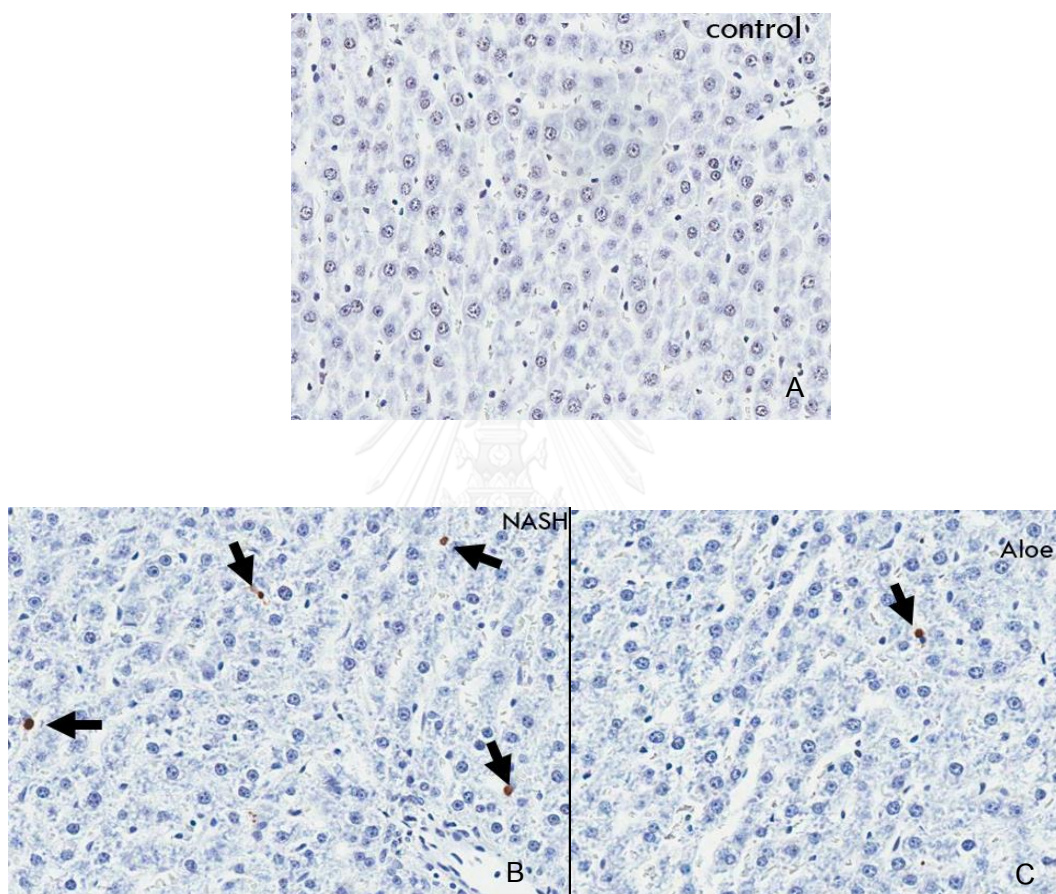
รูปที่ 36 ภาพแสดงระดับเปอร์เซ็นต์ของการแสดงออกด้วยการย้อม Immuno ใน PPAR γ ในหนูทั้งสามกลุ่ม โดยพบว่าทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH 20 ± 5% เปรียบเทียบกับกลุ่ม control 52 ± 5% โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ p=0.001

** กลุ่ม Aloe 57 ± 18% เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH 20 ± 5% โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ p=0.000

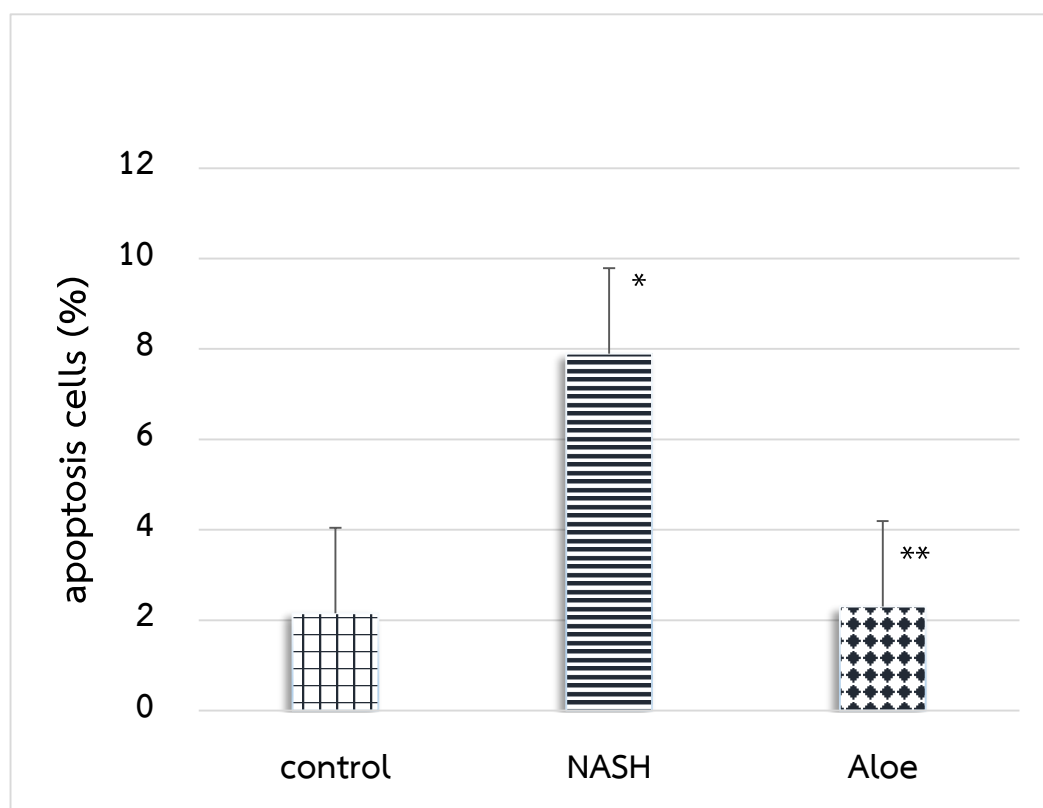
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการเกิด apoptosis โดยการย้อม TUNEL

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบการตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อศึกษาด้วยเทคนิคการย้อม TUNEL จะพบเซลล์ที่มีการตายเป็น apoptosis ปรากฏ โดยจะพบการติดสีน้ำตาลในเซลล์ตับที่เกิดการตายแบบ apoptosis ดังรูปที่ 37



- รูปที่ 37 ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงการตายแบบ apoptosis ในหนูทั้งสามกลุ่ม
- A ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis ในกลุ่ม control
 - B ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis ในกลุ่ม NASH
 - C ภาพแสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการตายแบบ apoptosis ในกลุ่ม Aloe

จากการศึกษาเมื่อทำการเลี้ยงหนูทดลองไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าระดับเปอร์เซ็นต์ apoptosis ในหนูทั้งสามกลุ่มโดยใช้โปรแกรม Aperio Imagescope เปรียบเทียบกัน พบว่าหนูในกลุ่มของ NASH มีจำนวนเปอร์เซ็นต์ การเกิด apoptosis ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่ม Aloe พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ของการเกิด apoptosis มีระดับที่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับระดับเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ในกลุ่ม NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังรูปที่ 38



รูปที่ 38 ภาพแสดงระดับการเกิด apoptosis ภายในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มศึกษาทั้งสามกลุ่ม (mean ± SD) โดยพบว่าทั้งกลุ่มศึกษาสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โดย * กลุ่ม NASH $2 \pm 0.9\%$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม control $8 \pm 1\%$ โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

** กลุ่ม Aloe $2 \pm 0.9\%$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH $8 \pm 1\%$, โดยมีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p=0.000$

ผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ

จากการศึกษาเมื่อครบ 8 สัปดาห์พบว่ามี การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับโดยทำการบันทึกเป็นคะแนนได้ดังนี้ ดังตารางที่ 3

Group	Steatosis				Inflammation				Ballooning		
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2
Control (n=6)	6	-	-	-	6	-	-	-	6	-	-
NASH (n=6)	-	-	3	3	-	5	1	-	-	4	2
Aloe (n=6)	3	3	-	-	2	4	-	-	3	3	-

ตารางที่ 3 ตารางแสดงการให้คะแนนลักษณะทางพยาธิสภาพในเนื้อตับ⁽⁹¹⁾

เมื่อทำการศึกษาทางพยาธิวิทยาโดยการให้คะแนนในส่วนของการเกิดการสะสมของไขมัน การบวมและการอักเสบภายในเซลล์ โดยให้คะแนนเป็นระดับต่าง ๆ ในกลุ่มหนูทดลองทั้งหมดสามกลุ่ม แบ่งเป็นกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว พบว่า

หนูในกลุ่ม control ทั้ง 6 ตัวไม่พบการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้น ไม่พบ การสะสมของไขมัน (steatosis) การเกิดการบวมภายในเซลล์ตับ (cellular ballooning) และการเกิดการอักเสบ (Inflammation) ภายในเนื้อเยื่อตับ

จากการศึกษา พบว่าระดับเปอร์เซ็นต์ของหนูในกลุ่ม NASH มีการสะสมของไขมัน (steatosis) การบวม ภายในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น ในหนูทั้ง 6 ตัว โดยพบในเกรด 2 และเกรด 3 ซึ่งการบวมที่เกิดขึ้นจะเห็นช่องว่างเพิ่มขึ้นบริเวณ cytoplasm ในส่วนของการเกิดการอักเสบ

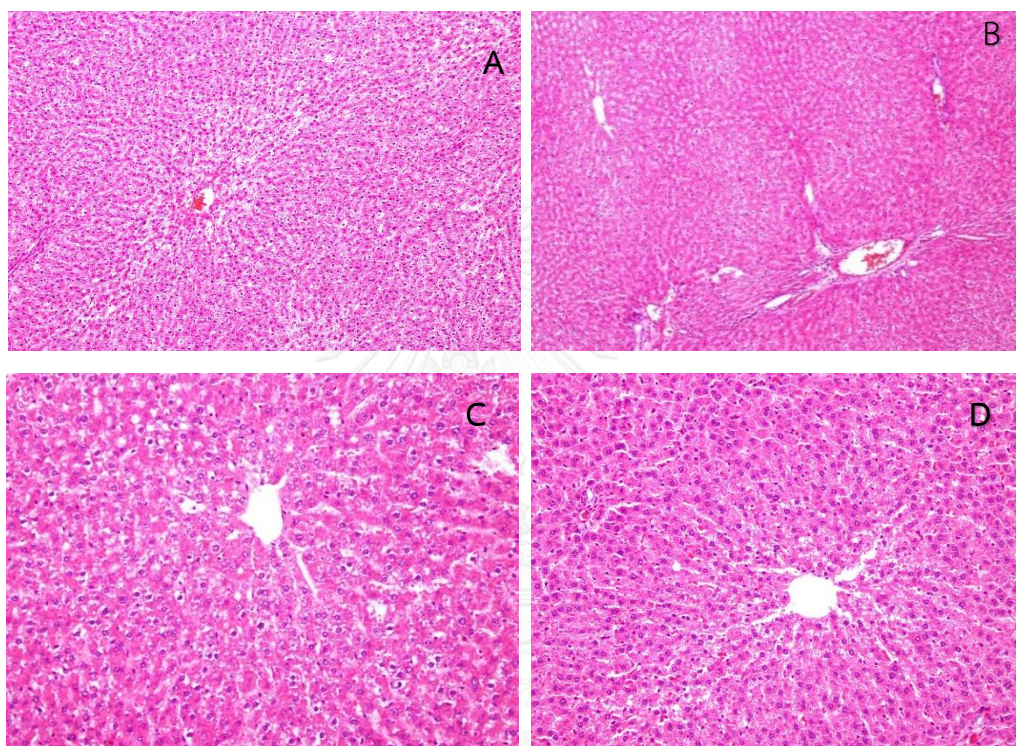
(Inflammation) และพบว่ามีการอักเสบเพิ่มขึ้น โดยของหนูในกลุ่มนี้จะพบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพภายในเนื้อตับมากกว่าหนูในกลุ่ม control

หนูในกลุ่ม *Aloe* พบว่ามีการเกิด การสะสมของไขมัน (steatosis) การเกิดการบวมภายในเซลล์ตับ และการอักเสบในเนื้อตับลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NASH โดยพบว่าหนูครึ่งหนึ่งในกลุ่มลักษณะทางพยาธิวิทยาไม่พบการเปลี่ยนแปลง ในขณะที่หนูอีกครึ่งหนึ่งพบว่าการสะสมของไขมัน การบวม การอักเสบของเนื้อตับลดลง



การศึกษาลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

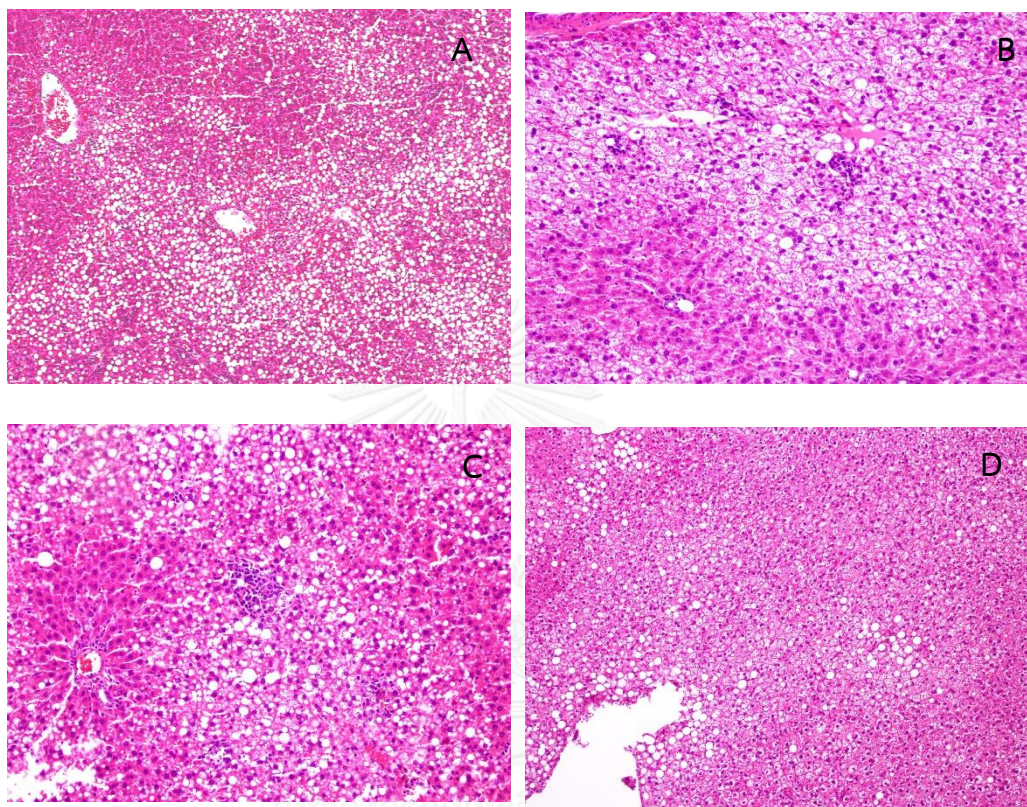
หนูในกลุ่ม control ทั้ง 6 ตัว ไม่พบ การสะสมของไขมัน (steatosis) การเกิดการบวมภายในเซลล์ตับ (cellular Ballooning) และการเกิดการอักเสบ (Inflammation) ภายในเนื้อเยื่อตับ ดังรูปที่ 39



รูปที่ 39 ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม control

- A ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม control ในหนูแรทตัวที่ 1 (10x)
- B ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม control ในหนูแรทตัวที่ 2 (10x)
- C ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม control ในหนูแรทตัวที่ 3 (20x)
- D ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม control ในหนูแรทตัวที่ 4 (20x)

หนูในกลุ่ม NASH พบว่ามี การสะสมของไขมัน (steatosis) โดยพบเม็ดไขมันทั้งขนาดใหญ่ และเล็ก เกิดการบวม (cellular Ballooning) และการอักเสบ (Inflammation) เกิดขึ้นในตับของ หนูแรท ดังรูปที่ 40



รูปที่ 40 ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ใน กลุ่ม NASH

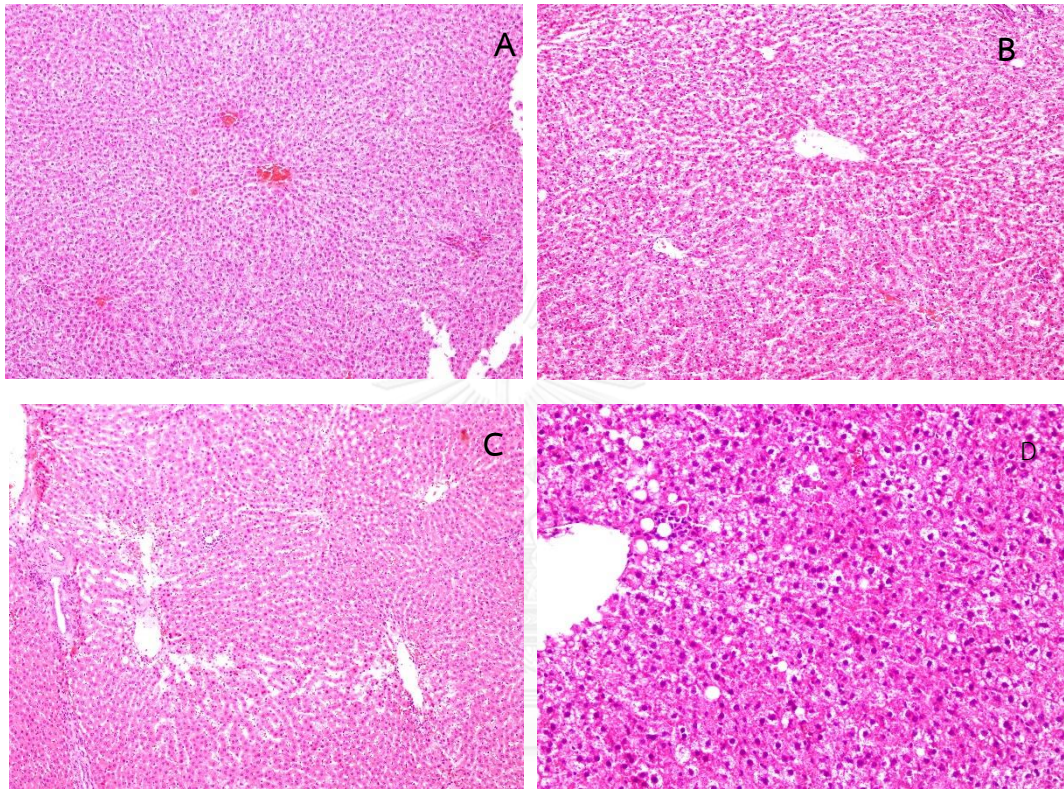
A ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม NASH ในหนูแรทตัวที่ 1 โดยพบเม็ดไขมัน ภายใต้นับ (20x)

B ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม NASH ในหนูแรทตัวที่ 2 โดยพบเซลล์อักเสบ เกิดการบวม และ พบเม็ดไขมันภายใต้นับ (20x)

C ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม NASH ในหนูแรทตัวที่ 3 โดยพบเซลล์อักเสบ เกิดการบวม และ พบเม็ดไขมันภายใต้นับ (20x)

D ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม NASH ในหนูแรทตัวที่ 4 พบเม็ดไขมัน และ เกิดการบวม (20x)

เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า หนูในกลุ่ม Aloe มีการเกิดการสะสมของไขมัน (steatosis) การเกิดการบวมภายในเซลล์ตับ และการอักเสบในเนื้อตับน้อยกว่าหนูในกลุ่ม NASH ดังรูปที่ 41



รูปที่ 41 ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับเมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในกลุ่ม Aloe

A ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม Aloe ในหนูแรทตัวที่ 1 (10x)

B ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม Aloe ในหนูแรทตัวที่ 2 (20x)

C ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม Aloe ในหนูแรทตัวที่ 3 (10x)

D ภาพแสดงลักษณะทางพยาธิวิทยาของกลุ่ม Aloe ในหนูแรทตัวที่ 4 (20x)

บทที่ 5

วิเคราะห์และสรุปผลวิจัย

ปัจจุบันพบว่าการเกิดโรคไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดการจากแอลกอฮอล์มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น สืบเนื่องการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมกรกินอาหารที่มีไขมันและน้ำตาลสูง เช่น อาหารจำพวก มันฝรั่งทอด แฮมเบอร์เกอร์ ชาเขียว น้ำหวาน ซึ่งเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดภาวะสะสมของไขมันในร่างกายที่เพิ่มขึ้น ปัจจุบันยังไม่ยาที่ใช้ในการรักษาโรคนี้โดยตรง แนวทางในการป้องกันและรักษาโรคจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำสารสกัดจากว่านหางจระเข้มาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคดังกล่าว เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าว่านหางจระเข้สามารถลดการอักเสบที่เกิดขึ้นในตับได้^(60, 92, 93) ว่านหางจระเข้สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกาย^(15, 56, 60) กระตุ้นการแสดงออกของ PPAR ให้เพิ่มขึ้น⁽¹³⁾ ช่วยลดการอักเสบและการตายของเซลล์ตับที่เกิดขึ้นในตับที่เกิดภาวะไขมันสะสมในตับที่เกิดจากการรับประทานอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง

ผลของอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูงต่อหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH

เมื่อทำการทดลอง โดยเลี้ยงหนูไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่าการให้อาหาร HFHFD เป็นตัวการที่สำคัญที่ทำให้น้ำหนักตัวของหนูทดลองลดลง และมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพภายในตับเกิดขึ้น โดยจะพบเม็ดไขมัน การบวม และเซลล์อักเสบเกิดขึ้นในตับ ซึ่งการให้อาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดไขมันสะสมในตับของหนูทดลอง^(24,99)

จากการทดลอง ในหนูขาวเพศผู้ พบว่าหนูในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH ซึ่งได้รับอาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง มีน้ำหนักตัวลดลงทุกอาทิตย์ และเมื่อทำการศึกษาดังกล่าวด้วยวิธีการทาง histochemistry โดยการย้อม hematoxylin และ eosin จะพบว่าหนูในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH พบเม็ดไขมัน การบวม และเซลล์อักเสบเกิดขึ้นในตับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yoshihisa Takahashi ได้ทำการศึกษาในหนูทดลองที่ให้อาหารไขมันสูง 60 % โดยเมื่อเลี้ยงหนูเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าสูตรอาหารไขมันสูงสามารถเหนี่ยวนำให้หนูทดลองเกิดอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น มีปริมาณของไขมันและน้ำตาลในเลือดสูง และพบการเกิดไขมันสะสมในตับเพิ่มขึ้น โดยมีน้ำหนักตัวในหนูทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH ลดลง 9 % เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวหนูทดลองในกลุ่มควบคุม⁽⁵⁾ นอกจากนี้มีการศึกษาทดลองในหนู Wistar rat โดยการให้

อาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง โดยเลี้ยงไปจนครบ 5 สัปดาห์ เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบเกิด steatosis และพบการอักเสบเกิดขึ้นในตับ ในส่วนของน้ำหนักตัวของหนูทดลองไม่พบการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักในหนูทดลองกลุ่มดังกล่าวแต่อย่างใด⁽¹⁾ และงานวิจัยของ Duangporn Thong-Ngam และคณะ ได้ทำการศึกษา โดยทำการให้อาหารไขมันสูง 100 % แก่หนู rat โดยทำการเลี้ยงจนครบ 12 สัปดาห์ พบว่าในหนูทดลองในกลุ่มที่ให้อาหารไขมันสูง 100 % มีน้ำหนักตัวที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽⁹⁴⁾ และเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบการสะสมของไขมัน การบวม และการอักเสบเกิดขึ้นที่ตับ^(3, 94) ซึ่งการลดลงของน้ำหนักตัวในหนูทดลองเกิดจากการให้สัดส่วนของอาหารที่ไม่เหมาะสม จึงเกิดการ metabolism ที่ผิดปกติ ทำให้มีกระบวนการใช้พลังงานที่ผิดปกติ จึงทำให้น้ำตัวหนูทดลองลดลง⁽⁹⁵⁾ และในส่วนของ การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพเกิดจากการที่หนูในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH ได้รับน้ำตาลฟรุกโทสเข้าไปในร่างกาย

ฟรุกโทสเป็นตัวการสำคัญ ที่ทำให้เกิดการสะสมของไขมันในตับ^(6,7) โดยในตับ ฟรุกโทสจะความสามารถดูดซึมได้มากกว่ากลูโคส ร่างกายจะมีการเมแทบอลิซึมฟรุกโทสจะใช้เอนไซม์ สองชนิด คือ glucokinase และ phosphofructokinase โดยเริ่มเกิดการ phosphorylation เป็น fructose-1- phosphate โดยเอนไซม์ fructokinase ซึ่งจะเกิดในบริเวณตับ⁽⁷⁾ มีการใช้ ATP เป็น สับสเตรท ให้ฟอสเฟตแก่ ADP เพื่อสร้าง ATP แล้วกลายเป็นไพรูเวท (pyruvate)⁽⁹⁶⁾ ไพรูเวทที่อยู่ในไซโตพลาสซึมจะผ่านเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและเกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟที่คีคาร์บอนซิลเลซ เป็น acetylco A ที่ผนังไมโทคอนเดรีย โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ acetyl-co A จะมีเปลี่ยนเป็น carboxylated เป็น malonylcoA ซึ่งเป็นตัวช่วยยับยั้งการสังเคราะห์ไขมันและยังยับยั้งเบต้าออกซิเดชัน ซึ่งทำให้มีระดับของกรดไขมันอิสระและระดับของไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้นในตับ^(8, 96) นอกจากนี้ ฟรุกโทสยังทำให้เกิดภาวะ insulin resistance เพิ่มขึ้นโดย ทำให้มีการขนส่งน้ำตาลและไขมันเข้าสู่ตับเพิ่มขึ้น⁽⁹⁶⁾ และมีการขนส่งไขมันที่มีความหนาแน่นต่ำ (VLDL: very low density lipoprotein) ลดลง ทำให้มีการสะสมของไขมันในตับเพิ่มขึ้น กระตุ้นให้ระดับอนุโมลลิอิสระในเซลล์เพิ่มขึ้น จนทำให้เกิดการอักเสบในตับ ดังนั้นการได้รับฟรุกโทสในปริมาณที่มากจึงทำให้เกิดภาวะไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์^(8, 96-98)

จากการทำการทดลองพบว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH มีระดับการ เอนไซม์ AST เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยที่มี NASH จะพบว่ามีค่าระดับเอนไซม์ ALT ที่เพิ่มสูงขึ้น เมื่อเกิดความผิดปกติขึ้นในตับ และเอนไซม์ AST เป็นเอนไซม์ที่แสดงความผิดปกติของทั้งกล้ามเนื้อ ตับ หัวใจ เพิ่มขึ้นจากการทดลองในหนูทดลองกลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เป็น NASH พบว่า ระดับเอนไซม์ AST มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมสอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่มีการเหนี่ยวนำให้หนูมีภาวะ

ตับอักเสบทั้งจากการให้สาร คาร์บอนเตตระคลอไรด์⁽⁹²⁾ การให้ยาพาราเซตามอลเกินขนาด⁽⁸⁴⁾ และการให้อาหารไขมันสูง⁽⁹⁴⁾ ซึ่งพบว่าปัจจัยดังกล่าวเป็นตัวการที่ทำให้ค่าเอนไซม์ AST สูงขึ้นได้ทั้งสิ้น

จากการทดลองในหนูทดลองที่เหนียวนำไปเป็น NASH พบว่า ระดับเอนไซม์ ALT มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสาเหตุการลดลงของเอนไซม์ ALT อาจจะได้จากการขาดวิตามิน B6 โดยในปี 2007 Thong-Ngam และคณะ ได้ทำการศึกษาในหนูทดลองในการให้อาหาร HFD เพื่อเหนียวนำไปเกิด NASH โดยพบว่า ในหนูทดลองที่ได้รับอาหาร HFD มีค่าเอนไซม์ ALT ลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และในกลุ่มหนูทดลองที่ได้รับอาหาร HFD ร่วมกับการให้ วิตามิน บี 6 พบว่าหนูในกลุ่มดังกล่าวมีค่าเอนไซม์ ALT เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหาร HFD เพียงอย่างเดียว⁽⁹⁹⁾ ซึ่งวิตามิน B6 อยู่ในรูปของ pyridoxal phosphate (PLP) มีหน้าที่เป็น coenzyme ที่สำคัญต่อเอนไซม์ ALT โดยจะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนรูปกรดอะมิโนจากของ aspartate หรือ alanine ไปเป็นกรด glutamate หรือ α -ketoglutarate^(99, 100) หากขาดวิตามิน B6 จึงเป็นตัวการสำคัญที่ทำให้ระดับเอนไซม์ ALT ในตับลดลง โดยวิตามิน บี 6 เป็นวิตามินที่พบมากในโปรตีน ในขณะที่อาหารที่มีไขมันสูง 100 % และ อาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูงทำให้ร่างกายได้รับระดับโปรตีนในแต่ละวันไม่เพียงพอ จึงเป็นเหตุทำให้ระดับเอนไซม์ลดต่ำลง

ในผู้ที่มีความไขมันสะสมในระดับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ นอกจากจะพบสะสมของไขมันในระดับเพิ่มมากขึ้น จะพบการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เพิ่มขึ้น มีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น⁽²⁷⁾ จากการทดลองเมื่อเลี้ยงหนูไปจนครบ 8 สัปดาห์ พบว่า ในหนูทดลองกลุ่มที่ถูกเหนียวนำไปเป็น NASH มีระดับของ MDA เพิ่มขึ้น และมีระดับของ GSH ลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยระดับของ MDA เป็นตัวที่ใช้วัดการเกิด lipid peroxidase ที่เกิดขึ้นในตับ แสดงถึงการเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น^(35, 84) สอดคล้องกับจากการศึกษาของ Dominguez ในปี 1998 พบว่าในหนูทดลองที่เป็น NASH จะมีระดับของ GSH ลดลง มีค่าน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น แสดงว่าน้ำตาลกลูโคสที่หนูทดลองได้รับเข้าไปในปริมาณมากมีผลต่อระบบการต้านอนุมูลอิสระ โดยจะพบระดับของ ROS เพิ่มขึ้น ซึ่งการผลิต ROS ที่เพิ่มขึ้น และสะสมของไขมันในระดับเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน มีหลายงานวิจัย ทำการศึกษา พบว่าหนูในกลุ่มที่มีความไขมันลดต่ำ จะมีระดับของ MDA เพิ่มขึ้น และมีระดับของ GSH ซึ่งระบบสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ^(30, 35, 36, 101)

จากการทำการทดลองพบว่าในหนูทดลองกลุ่มที่ถูกเหนียวนำไปเป็น NASH พบเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ kupffer cells ต่อ IL18 และพบการเกิด apoptosis cells มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับในกลุ่มปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการสะสมของไขมันในตับ การเกิด oxidative stress และการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS⁽¹⁰²⁾ ปัจจัยเหล่านี้ล้วนส่งเสริมให้เกิดการ

ขยายตัวของหลอดเลือด กระตุ้นเซลล์อักเสบ ทำให้มีการกระตุ้นการหลั่งไซโตไคน์ต่าง ๆ ออกมาเช่น tumour necrosis factor-alpha (TNF- α)⁽¹⁰²⁾ เกิดการกระตุ้น kupffer cells ให้ส่งสัญญาณออกมาให้มีการผลิต signals ที่มีการตอบสนองต่อการอักเสบ เกิดการปล่อย interleukin (IL)-1 β ซึ่งผลผลิตของ interleukin -1 β คือ interleukin (IL-18) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ถูกผลิตที่บริเวณ epidermis ของ kupffer cells⁽¹⁰³⁾

นอกจากนี้ TNF- α และ IL-18 ยังเป็นตัวการที่สำคัญในการส่งสัญญาณแห่งความตายหรือเป็น death signal^(6, 53) โดยพบว่า TNF- α จะไปจับกับ tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) เกิดโครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีน ประกอบด้วย tumor necrosis factor receptor-associated death domain (TRADD), receptor interacting protein 1 (RIP1) และ tumor necrosis factor receptor associated protein (TRAF-2) และ IL-18 จะไปกระตุ้น Fas ligand (FASL) ให้ไปจับ FAS เกิด โครงสร้างเชิงซ้อนของโปรตีน โดยทั้ง FASL และ TNFR1 จะไปกระตุ้น NF κ B เคลื่อนที่ไปที่นิวเคลียสทำให้มีการส่งสัญญาณทำให้เซลล์เกิดการอักเสบขึ้น นอกจากนี้ยังมีการกระตุ้น caspase 8 ให้มีการส่งสัญญาณทำให้ mitochondrial dysfunction และเกิด apoptosis ในที่สุด⁽⁵⁰⁾

จากการวิจัยในปี 2009 ของ Roser Calafell และคณะ ได้ทำการศึกษาในหนูแรท โดยให้สาร galactosamine (GalN) เพื่อให้เกิด hepatitis โดย GalN จะไปทำให้เกิดภาวะ mitochondrial dysfunction กระตุ้นให้มือนูมิสสรีระเพิ่มสูงขึ้น และกระตุ้น TNF- α ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ caspase3 เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis โดย GalN เป็นโดยการทำหน้าที่สำคัญที่ทำให้เกิด liver injury ในที่สุด การทดลอง พบว่าหนูที่ได้รับ GalN มีระดับของ TNF- α และพบการตายแบบ apoptosis เพิ่มขึ้น โดยระดับของ TNF- α ที่เพิ่มขึ้นในตับ จะไปกระตุ้น caspase 8 ให้มีการปล่อย cytochrome c และกระตุ้น caspase 3 และ caspase 7 เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis และ TNF- α ยังกระตุ้นการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดการอักเสบ⁽⁵³⁾ และเป็นตัวส่งสัญญาณให้มีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง IL-18 อีกด้วย⁽⁵²⁾

ในการทดลองพบว่าในกลุ่มของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH มีเปอร์เซ็นต์การแสดงออกของ PPAR γ ภายในตับน้อยกว่าในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ ในปี 2014 ได้ทำการทดลองในหนูโดยให้อาหารไขมันและน้ำตาลสูงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า หนูทดลองมีการระดับของ PPAR γ ลดลง และระดับของ NF- κ B, TNF- α เพิ่มขึ้น⁽¹⁰⁴⁾ และงานวิจัยของ Wang LL และคณะในปี 2015 ได้ทำการทดลองในหนูทดลองที่ทำให้เกิดการสะสมของไขมันในตับด้วยอาหาร high fat diet (HFD) เป็นเวลา 8 สัปดาห์ จากการศึกษาพบว่าใน

หนูทดลองมีระดับ PPAR γ ลดลง และเกิดภาวะไขมันสะสมในตับและ การอักเสบเพิ่มสูงขึ้น ในกลุ่ม หนูที่ให้อาหาร HFD เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽¹⁰⁵⁾ PPAR γ มีความสำคัญในเรื่องการลดการสะสม ระดับกรดไขมัน และกระบวนการเกิดการอักเสบ⁽¹¹⁾ ซึ่งการแสดงออกของ PPAR γ มีความสัมพันธ์ กับการเพิ่มขึ้นของ TNF- α โดยในปี 2005 YE และคณะได้ทำการศึกษา พบว่า TNF- α เป็นตัวการ สำคัญที่ไปยับยั้งการถอดรหัสและการสังเคราะห์ของไขมันที่ควบคุมโดย PPAR โดย TNF- α จะลด การแปลรหัสของ PPAR gene โดย และทำการส่งสัญญาณออกมาที่ receptors กระตุ้นให้เกิดการ ยับยั้งการ transcription ภายในเซลล์ ซึ่งพบว่าหากมีระดับ TNF- α เพิ่มสูงขึ้นจะทำให้ระดับของ PPAR γ ลดลง⁽¹⁰⁶⁾

ผลของว่านหางจระเข้ต่อภาวะการเกิดไขมันสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์

จากการศึกษาเมื่อให้ว่านหางจระเข้ ความเข้มข้น 50 mg/kg เป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่าสาร สกัดว่านหางจระเข้ทำให้น้ำหนักตัวของหนูทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ว่านหางจระเข้ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือด และการ สังเคราะห์ไขมันในหนูทดลองไม่มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจากภาวะปกติ จะหลายงานวิจัยพบว่า ใน การศึกษาในกลุ่มหนูทดลองในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH พบระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด ของหนูทดลองมีระดับสูงขึ้น และพบว่าว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนู เบาทหวานให้อยู่ในระดับปกติ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁹⁾ จึงทำให้หนูทดลองที่ได้รับว่านหางจระเข้มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นเมื่อ เปรียบเทียบกับหนูทดลองในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดลองพบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้มีระดับ MDA ลดลงและมีระดับของ GSH เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย สอดคล้องกับงานวิจัย ที่ได้ทำการทดลองโดยให้ว่านหางจระเข้ในหนูทดลองที่ให้สารคาร์บอนเตตระ คลอไรด์ เพื่อให้เกิดภาวะตับอักเสบแบบเฉียบพลัน พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้ร่วมกับการให้ สารคาร์บอนเตตระคลอไรด์ มีระดับของ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และลดการเกิดไขมันที่ สะสมในตับ ลดเซลล์อักเสบและลดการตายที่เกิดขึ้นในตับ อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า ว่านหางจระเข้ สามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระในตับของหนูแรทได้⁽⁹²⁾ จากการทดลองของ Rajasekaran ในปี 2005 ได้ทำการทดลองในหนูที่เป็นโรคเบาหวานจากการให้ streptozotocin พบว่าการให้ว่านหางจระเข้ ความเข้มข้น 300 mg/kg ในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน เป็นเวลา 21 วัน พบว่ามีระดับสารต้านอนุมูล อิสระ glutathione, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione-S-transferase ในตับและไตของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ⁽¹⁰⁸⁾ และมีการ

ลดลงของระดับ MDA ^(84, 108) แสดงว่าสารสกัดว่านหางจระเข้มีความสามารถในการลดความเครียดออกซิเดชันได้

จากการศึกษาสาร emodin เป็นสารสำคัญภายในว่านหางจระเข้ที่ช่วยเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระ และช่วยลดการเกิด peroxidation ของกรดไขมันอิสระที่อยู่ในเซลล์ตับ ช่วยลดการสังเคราะห์เอนไซม์ lipoxygenase ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ทำให้เกิด lipid peroxidation ⁽⁹²⁾ และช่วยลดการอักเสบ ^(75, 110, 111) นอกจากนี้สาร anthraquinones ตัวอื่น ๆ ในว่านหางจระเข้ก็ช่วยเหนี่ยวนำให้ระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น ซึ่งปกติ กลูต้าไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย ⁽¹¹²⁾ จะอยู่ในรูปของเอนไซม์ ซึ่งจะมี 2 รูปแบบคือ กลูต้าไธโอน แบบ รีดิวซ์(reduced glutathione) และ กลูต้าไธโอนแบบออกซิไดซ์ (oxidized glutathione) เวลาที่มีการทำงาน glutathione ในแบบออกซิไดซ์จะถูกเปลี่ยนเป็นแบบรีดิวซ์ และกลูต้าไธโอนแบบรีดิวซ์ก็จะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในแบบออกซิไดซ์ เพื่อไปใช้ในเชิงงานต่อไป ⁽³⁷⁾ ซึ่งการลดลงของระดับกลูต้าไธโอนในตับเกิดจากการเพิ่มของไขมันที่สะสมในตับ สอดคล้องกับงานวิจัยในปี 2014 โดย werawaganon และคณะ ได้ทำการศึกษาหนูแรทเพศผู้ที่ย้ำพาโรคตามออลเกินขนาด โดยให้ว่านหางจระเข้ทั้งที่มีความเข้มข้น 400 และ 150 mg/kg พบว่าสาร acemannan ในว่านหางจระเข้ช่วยลดระดับ MDA และการมีระดับของ glutathione เพิ่มขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า ว่านหางจระเข้สามารถช่วยทำให้ระบบการต้านอนุมูลอิสระในร่างกายดีขึ้น ⁽⁸⁴⁾

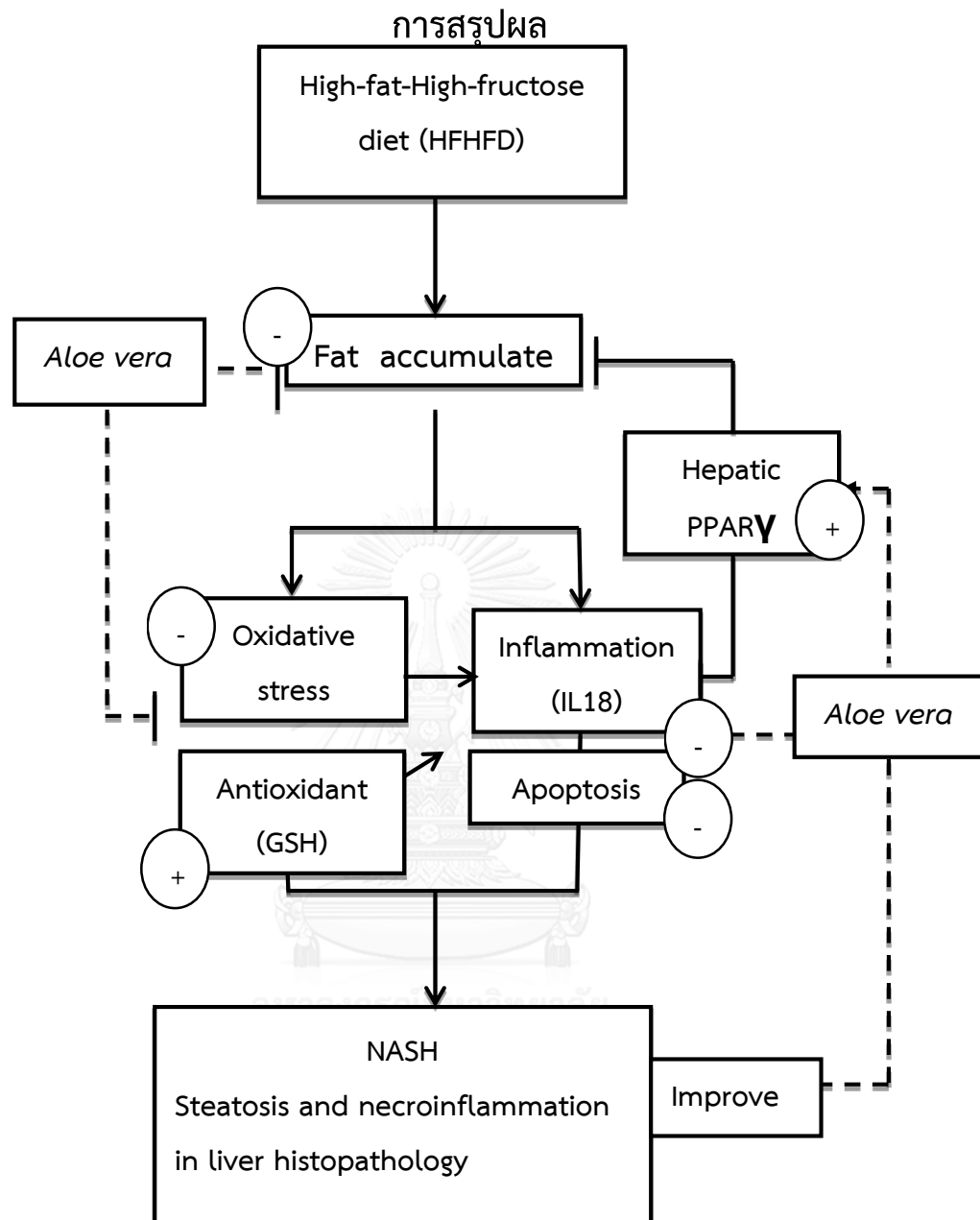
จากการทดลองพบว่าในหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้มีระดับของ IL 18 และมีการตายแบบ apoptosis ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งอาจจะมีสาเหตุจากการที่ว่านหางจระเข้เป็นพืชที่มีคุณสมบัติเด่นในการรักษาแผลน้ำลวก แผลไฟไหม้ แผลอักเสบวมแดง ⁽⁵⁶⁾ โดยสารประกอบในว่านหางจระเข้หลายตัวที่มีความสำคัญในการลดการอักเสบและสามารถลดการเจริญเติบโตของเชื้อโรค เช่น สาร aloe-emodin สาร acemannan และ สาร aloin เป็นต้น โดยจากหลายงานวิจัยพบว่าสาร acemannan ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ^(56, 84) โดยกระตุ้นการทำงานของมาโครฟาจที่อยู่ในเซลล์ตับ ให้มีการปล่อยไซโตไคน์ออกมาเพื่อทำให้เกิดการลดการอักเสบ และเสริมสร้างการหายของแผล ⁽¹⁵⁾ มีการศึกษาในหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นตับอักเสบจากสารคาร์บอนเตตระคลอไรด์โดย Arosio และคณะ พบว่าว่านหางจระเข้สามารถลดการอักเสบ โดยลดจำนวนของ kupffer cell พบว่าจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิ้มโฟไซต์ที่เข้ามาบริเวณ central vein มีจำนวนลดลง และพบการตายแบบ necrosis ลดลง ⁽⁸⁴⁾ นอกจากนี้สาร aloe-emodin ยังช่วยลดจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวแบบ neutrophils ในตับลด LPS ที่ผลิต

IL-1 β และ IL-6⁽¹¹¹⁾ สอดคล้องกับการศึกษาของ Boyang Hu และคณะพบว่า สาร aloe-emodin ช่วยลดระดับของ NF-KB ซึ่งเป็นตัวส่งสัญญาณที่สำคัญ ในการกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ การที่มีระดับของ NF-KB ลดลง จึงทำให้ลดการส่งสัญญาณให้ death signal ทำให้เซลล์เกิดการ apoptosis ลดลง⁽¹¹³⁾

จากการทดลองพบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้เมื่อทำการย้อม immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ PPAR γ เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nomaguchi และคณะ ในปี 2011 ได้ทำการทดลองเรื่อง PPAR ในหนูทดลองเพศผู้ โดยการให้อาหารไขมันสูง ปริมาณไขมันในอาหารอยู่ที่ 60 % แบ่งหนูทดลองออกเป็นสามกลุ่มคือ กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ให้อาหารไขมันสูง และกลุ่มที่ให้อาหารว่านหางจระเข้ ความเข้มข้น 1 mg/kg ร่วมกับได้รับอาหารไขมันสูง จากนั้นนำตับมาวิเคราะห์ DNA microarray และ real-time quantitative RT-PCR (qPCR) โดยพบว่าในกลุ่มที่ให้ว่านหางจระเข้มีการแสดงออกของยีน *Acs1 1* ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันภายในตับ *Scd 1* และ *Scd 2* ที่เกี่ยวกับกระบวนการ lipogenesis หรือการสังเคราะห์ไขมัน เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในส่วนของยีน *Ppar α* และ *Pxr α* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของ PPAR α มีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ยังพบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้มีระดับของไตรกลีเซอไรด์และระดับของคอเลสเตอรอลลดลง⁽¹³⁾

จากการทดลองพบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้มีระดับของเอนไซม์ AST ลดลงเมื่อเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อดูผลทางพยาธิวิทยา พบว่ากลุ่มของหนูทดลองในกลุ่มที่ได้รับว่านหางจระเข้ การเกิดการอักเสบ การบวม และการสะสมของเม็ดไขมันในตับลดลง พบระดับการแสดงออกของ IL-18 ลดลง และลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็น NASH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จึงกล่าวได้ว่าว่านหางจระเข้สามารถลดการเกิดภาวะ NASH ได้ โดยลดปัจจัยที่ทำให้เกิด NASH สามารถลดการเกิดภาวะไขมันสะสมในตับ ลดระดับน้ำตาลในเลือด⁽¹⁰⁷⁾ ลดการอักเสบ⁽¹⁵⁾ ช่วยเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ⁽⁹²⁾ ซึ่งปัจจัยทั้งหมด⁽⁸⁴⁾ เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการพัฒนาจากการเกิดไขมันสะสมในตับ จนกระตุ้นการอักเสบ ทำให้เกิดการตาย (apoptosis) ซึ่งการที่ว่านหางจระเข้สามารถลดปัจจัยดังกล่าว จึงทำให้เซลล์ตับไม่มีการพัฒนาของโรคจนเกิดภาวะ NASH จึงทำให้ระดับของเอนไซม์ AST ที่แสดงความเสียหายในตับ และกล้ามเนื้อ ต่าง ๆ ไม่มีค่าที่เพิ่มสูงขึ้น



สรุปผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงว่า ว่านหางจระเข้ที่ความเข้มข้น 50 mg/kg สามารถเพิ่มสารต้านอนุมูลอิสระ เพิ่มการแสดงออกของ PPAR γ และลดการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อตับในหนูแรทที่ให้อาหารไขมันและน้ำตาลฟรุกโทสสูง ดังนั้นผลการศึกษาประสิทธิภาพประสิทธิผลของว่านหางจระเข้ในครั้งนี้ จึงอาจสามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นยาในการรักษาและบรรเทาโรคไขมันในตับที่ไม่ได้เกิดจากแอลกอฮอล์ได้

รายการอ้างอิง



รายการอ้างอิง

1. Kanuri G, Bergheim I. In Vitro and in Vivo Models of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease (NAFLD). *International journal of molecular sciences*. 2013;14(6):11963-80.
2. Rezazadeh A, Yazdanparast R, Molaei M. Amelioration of diet-induced nonalcoholic steatohepatitis in rats by Mn-salen complexes via reduction of oxidative stress. *Journal of biomedical science*. 2012;19:26.
3. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2012;18(19):2300-8.
4. Longato L. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): a tale of fat and sugar? *Fibrogenesis & Tissue Repair*. 2013;6:14-.
5. Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World journal of gastroenterology: WJG*. 2012;18(19):2300.
6. Basaranoglu M, Basaranoglu G, Sabuncu T, Senturk H. Fructose as a key player in the development of fatty liver disease. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(8):1166-72.
7. Kawasaki T, Igarashi K, Koeda T, Sugimoto K, Nakagawa K, Hayashi S, et al. Rats fed fructose-enriched diets have characteristics of nonalcoholic hepatic steatosis. *The Journal of nutrition*. 2009;139(11):2067-71.
8. Spruss A, Bergheim I. Dietary fructose and intestinal barrier: potential risk factor in the pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2009;20(9):657-62.
9. Tessari P, Coracina A, Cosma A, Tiengo A. Hepatic lipid metabolism and non-alcoholic fatty liver disease. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*.19(4):291-302.
10. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ). *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(22):12953-6.

11. Houseknecht KL, Cole BM, Steele PJ. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) and its ligands: a review. *Domestic animal endocrinology*. 2002;22(1):1-23.
12. Rubenstrunk A, Hanf R, Hum DW, Fruchart J-C, Staels B. Safety issues and prospects for future generations of PPAR modulators. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2007;1771(8):1065-81.
13. Nomaguchi K, Tanaka M, Misawa E, Yamada M, Toida T, Iwatsuki K, et al. Aloe vera phytosterols act as ligands for PPAR and improve the expression levels of PPAR target genes in the livers of mice with diet-induced obesity. *Obesity Research & Clinical Practice*. 2011;5(3):e190-e201.
14. Bunyapraphatsara N, Yongchaiyudha S, Rungpitarangsi V, Chokechaijaroenporn O. Antidiabetic activity of Aloe vera L. juice II. Clinical trial in diabetes mellitus patients in combination with glibenclamide. *Phytomedicine*. 1996;3(3):245-8.
15. Rabe C, Musch A, Schirmacher P, Kruis W, Hoffmann R. Acute hepatitis induced by an Aloe vera preparation: A case report. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2005;11(2):303-4.
16. Sherwood L. *Human physiology: from cells to systems*: Cengage learning; 2015.
17. Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent T. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochemical journal*. 1990;266(2):313.
18. Smedsrød B, De Bleser P, Braet F, Lovisetti P, Vanderkerken K, Wisse E, et al. Cell biology of liver endothelial and Kupffer cells. *Gut*. 1994;35(11):1509-16.
19. Kurose I, Miura S, Fukumura D, Yonei Y, Saito H, Tada S, et al. Nitric oxide mediates Kupffer cell-induced reduction of mitochondrial energization in hepatoma cells: a comparison with oxidative burst. *Cancer research*. 1993;53(11):2676-82.
20. Arii S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 2000;7(1):40-8.
21. Lee Y, Friedman SL. Fibrosis in the liver: acute protection and chronic disease. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2010;97:151-200.

22. Shimizu I, Kamochi M, Yoshikawa H, Nakayama Y. Gender Difference in Alcoholic Liver Disease. *Alcohol*. 2012;47(1):1-11.
23. Smedsrød B, Pertoft H, Gustafson S, Laurent TC. Scavenger functions of the liver endothelial cell. *Biochemical Journal*. 1990;266(2):313-27.
24. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 1998;114(4):842-5.
25. Ninomiya M, Kondo Y, Shimosegawa T. Murine models of nonalcoholic fatty liver disease and steatohepatitis. *ISRN Hepatology*. 2012;2013.
26. Dowman JK, Tomlinson JW, Newsome PN. Pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. *QJM: An International Journal of Medicine*. 2010;103(2):71-83.
27. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1998;75(2):199-212.
28. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1993;90(17):7915-22.
29. Pham-Huy LA, He H, Pham-Huy C. Free radicals, antioxidants in disease and health. *International journal of biomedical science: IJBS*. 2008;4(2):89.
30. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress: Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidants from fruits. *Journal of Chromatography B*. 2005;827(1):76-82.
31. Koruk M, Taysi S, Savas MC, Yilmaz O, Akcay F, Karakok M. Oxidative stress and enzymatic antioxidant status in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Annals of Clinical & Laboratory Science*. 2004;34(1):57-62.
32. Milagro FI, Campión J, Martínez JA. Weight Gain Induced by High-Fat Feeding Involves Increased Liver Oxidative Stress. *Obesity*. 2006;14(7):1118-23.
33. Albano E. Oxidative mechanisms in the pathogenesis of alcoholic liver disease. *Molecular aspects of medicine*. 2008;29(1):9-16.

34. Das SK, Nair RC. Superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase and lipid peroxidation of normal and sickled erythrocytes. *British journal of haematology*. 1980;44(1):87-92.
35. Narasimhan S, Gokulakrishnan K, Sampathkumar R, Farooq S, Ravikumar R, Mohan V, et al. Oxidative stress is independently associated with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) in subjects with and without type 2 diabetes. *Clinical biochemistry*. 2010;43(10):815-21.
36. Haque JA, McMahan RS, Campbell JS, Shimizu-Albergine M, Wilson AM, Botta D, et al. Attenuated progression of diet-induced steatohepatitis in glutathione-deficient mice. *Laboratory Investigation*. 2010;90(12):1704-17.
37. Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2003;57(3-4):145-55.
38. Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015;97:55-74.
39. Videla LA, Rodrigo R, Orellana M, Fernandez V, Tapia G, Quinones L, et al. Oxidative stress-related parameters in the liver of non-alcoholic fatty liver disease patients. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2004;106(3):261-8.
40. Yang W-L, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT-29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2001;22(9):1379-83.
41. Martin H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2009;669(1):1-7.
42. Zhang W, Kudo H, Kawai K, Fujisaka S, Usui I, Sugiyama T, et al. Tumor necrosis factor-alpha accelerates apoptosis of steatotic hepatocytes from a murine model of non-alcoholic fatty liver disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391(4):1731-6.
43. Kanai T, Watanabe M, Okazawa A, Sato T, Yamazaki M, Okamoto S, et al. Macrophage-derived IL-18-mediated intestinal inflammation in the murine model of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2001;121(4):875-88.

44. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991;13(1):83-95.
45. Dinarello CA. Interleukin 1 and interleukin 18 as mediators of inflammation and the aging process. *The American journal of clinical nutrition*. 2006;83(2):447S-55S.
46. Wang K. Molecular mechanisms of liver injury: apoptosis or necrosis. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft für Toxikologische Pathologie*. 2014;66(8):351-6.
47. Mei T, Xuyan W, Aiqin W, Ninghan G, Jie P, Xiaoquan L, et al. Effect of Jiaweiwumei decoction on regulatory T cells and interleukin-10 in a rat model of ulcerative colitis. *Journal of Traditional Chinese Medicine*. 2015;35(3):312-5.
48. Jung Y, Witek RP, Syn W-K, Choi SS, Omenetti A, Premont R, et al. Signals from dying hepatocytes trigger growth of liver progenitors. *Gut*. 2010;59(5):655-65.
49. Yin C, Evason KJ, Asahina K, Stainier DY. Hepatic stellate cells in liver development, regeneration, and cancer. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(123 (5)):1902-10.
50. Malhi H, Gores GJ. Apoptosis: Mechanisms and Relevance in Liver Diseases.
51. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*. 2007;35(4):495-516.
52. Thomas WD, Hersey P. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) induces apoptosis in Fas ligand-resistant melanoma cells and mediates CD4 T cell killing of target cells. *The Journal of Immunology*. 1998;161(5):2195-200.
53. Calafell R, Boada J, Santidrian AF, Gil J, Roig T, Perales JC, et al. Fructose 1,6-bisphosphate reduced TNF- α -induced apoptosis in galactosamine sensitized rat hepatocytes through activation of nitric oxide and cGMP production. *European Journal of Pharmacology*. 2009;610(1-3):128-33.
54. Misseri R, Meldrum D, Dinarello C, Dagher P, Hile K, Rink R, et al. TNF- α mediates obstruction-induced renal tubular cell apoptosis and proapoptotic signaling. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005;288(2):F406-F11.

55. Watanabe I, Toyoda M, Okuda J, Tenjo T, Tanaka K, Yamamoto T, et al. Detection of Apoptotic Cells in Human Colorectal Cancer by Two Different in situ Methods: Antibody against Single-stranded DNA and Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP-biotin Nick End-labeling (TUNEL) Methods. *Cancer Science*. 1999;90(2):188-93.
56. Reynolds T, Dweck A. Aloe vera leaf gel: a review update. *Journal of ethnopharmacology*. 1999;68(1):3-37.
57. Hamman JH. Composition and applications of Aloe vera leaf gel. *Molecules*. 2008;13(8):1599-616.
58. Dagne E, Bisrat D, Viljoen A, Van Wyk B. Chemistry of Aloe species. *Current Organic Chemistry*. 2000;4(10):1055-78.
59. Joseph B, Raj SJ. Pharmacognostic and phytochemical properties of Aloe vera—an overview.
60. Foster M, Hunter D, Samman S. Evaluation of the Nutritional and Metabolic Effects of Aloe vera. In: Benzie IFF, Wachtel-Galor S, editors. *Herbal Medicine: Biomolecular and Clinical Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press Llc.; 2011.
61. Choi S, Chung M-H. A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. *Seminars in Integrative Medicine*. 2003;1(1):53-62.
62. Pecere T, Gazzola MV, Mucignat C, Parolin C, Vecchia FD, Cavaggioni A, et al. Aloe-emodin is a new type of anticancer agent with selective activity against neuroectodermal tumors. *Cancer Res*. 2000;60(11):2800-4.
63. Abd-Alla HI, Abu-Gabal NS, Hassan AZ, El-Safty MM, Shalaby NM. Antiviral activity of Aloe hijazensis against some haemagglutinating viruses infection and its phytoconstituents. *Archives of pharmacal research*. 2012;35(8):1347-54.
64. Wang HH, Chung JG, Ho CC, Wu LT, Chang SH. Aloe-emodin effects on arylamine N-acetyltransferase activity in the bacterium *Helicobacter pylori*. *Planta medica*. 1998;64(2):176-8.

65. Patel DK, Patel K, Tahilyani V. Barbaloin: a concise report of its pharmacological and analytical aspects. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*. 2012;2(10):835-8.
66. Martinez-Romero D, Guillen F, Perez-Aguilar H, Castillo S, Serrano M, Zapata PJ, et al. Is it possible to increase the aloin content of Aloe vera by the use of ultraviolet light? *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013;61(9):2165-70.
67. Park M-Y, Kwon H-J, Sung M-K. Intestinal absorption of aloin, aloe-emodin, and aloesin; A comparative study using two in vitro absorption models. *Nutrition Research and Practice*. 2009;3(1):9-14.
68. Sierra-Garcia GD, Castro-Rios R, Gonzalez-Horta A, Lara-Arias J, Chavez-Montes A. Acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera: A literature review. *Natural product communications*. 2014;9(8):1217-21.
69. Boonyagul S, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Effect of acemannan, an extracted polysaccharide from Aloe vera, on BMSCs proliferation, differentiation, extracellular matrix synthesis, mineralization, and bone formation in a tooth extraction model. *Odontology*. 2014;102(2):310-7.
70. Yagi A, Kabash A, Okamura N, Haraguchi H, Moustafa SM, Khalifa TI. Antioxidant, free radical scavenging and anti-inflammatory effects of aloesin derivatives in Aloe vera. *Planta medica*. 2002;68(11):957-60.
71. Choi S, Kim KW, Choi JS, Han ST, Park YI, Lee SK, et al. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil. *Planta medica*. 2002;68(4):330-5.
72. Sheng Y, Chen X-B. Isolation and identification of an isomer of β -sitosterol by HPLC and GC-MS. *Health*. 2009;1(03):203.
73. Lu J, Xiao W, Geng Z, Liu D, Wang Y. [Effect of aloe polysaccharides pretreatment on the cerebral inflammatory response and lipid peroxidation in severe hemorrhagic shock rats first entering high altitude]. *Zhonghua wai ke za zhi [Chinese journal of surgery]*. 2012;50(7):655-8.
74. Benson KF, Newman RA, Jensen GS. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of Nerium

- oleander leaves (nae-8®). *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2015;8:239.
75. Kaithwas G, Singh P, Bhatia D. Evaluation of in vitro and in vivo antioxidant potential of polysaccharides from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Drug and chemical toxicology*. 2014;37(2):135-43.
76. Anilakumar KR, Sudarshanakrishna KR, Chandramohan G, Ilaiyaraja N, Khanum F, Bawa AS. Effect of Aloe vera gel extract on antioxidant enzymes and azoxymethane-induced oxidative stress in rats. *Indian journal of experimental biology*. 2010;48(8):837-42.
77. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sutlupinar N. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytotherapy research : PTR*. 2001;15(2):157-61.
78. Park M-Y, Kwon H-J, Sung M-K. Dietary aloin, aloesin, or aloe-gel exerts anti-inflammatory activity in a rat colitis model. *Life Sciences*. 2011;88(11–12):486-92.
79. Harhaji L, Mijatovic S, Maksimovic-Ivanic D, Popadic D, Isakovic A, Todorovic-Markovic B, et al. Aloe emodin inhibits the cytotoxic action of tumor necrosis factor. *European Journal of Pharmacology*. 2007;568(1–3):248-59.
80. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LM, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, et al. Aloe-Emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacol Toxicol*. 2000;87(5):229-33.
81. Peng SY, Norman J, Curtin G, Corrier D, McDaniel HR, Busbee D. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Molecular biotherapy*. 1991;3(2):79-87.
82. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: The major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. *Immunopharmacology*. 1996;35(2):119-28.
83. Alqasoumi SI, Al-Howiriny TA, Abdel-Kader MS. Evaluation of the hepatoprotective effect of Aloe vera, *Clematis hirsute*, *Cucumis prophetarum* and bee propolis against experimentally induced liver injury in rats. *International Journal of Pharmacology*. 2008;4(3):213-7.

84. Werawatganon D, Linlawan S, Thanapirom K, Somanawat K, Klaikeaw N, Rerknimitr R, et al. Aloe vera attenuated liver injury in mice with acetaminophen-induced hepatitis. *BMC complementary and alternative medicine*. 2014;14(1):229.
85. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*. 1951;193(1):265-75.
86. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry*. 1979;95(2):351-8.
87. Rahman I, Kode A, Biswas SK. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nature protocols*. 2006;1(6):3159-65.
88. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *The American journal of gastroenterology*. 1999;94(9):2467-74.
89. Namnak S, Kittikowit W, Wongphoom J. The role of Immunohistochemistry in diagnosis of renal cell carcinoma subtypes.
90. Chaisuparat R, Rojanawatsirivej S, Yodsanga S. Ribosomal protein S6 phosphorylation is associated with epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Pathology & Oncology Research*. 2013;19(2):189-93.
91. Singh SV, Kim S-H, Sehwat A, Arlotti JA, Hahm E-R, Sakao K, et al. Biomarkers of phenethyl isothiocyanate-mediated mammary cancer chemoprevention in a clinically relevant mouse model. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012.
92. Arosio B, Gagliano N, Fusaro LMP, Parmeggiani L, Tagliabue J, Galetti P, et al. Aloe-emodin quinone pretreatment reduces acute liver injury induced by carbon tetrachloride. *Pharmacology & toxicology*. 2000;87(5):229-33.
93. Benson KF, Newman RA, Jensen GS. Antioxidant, anti-inflammatory, anti-apoptotic, and skin regenerative properties of an Aloe vera-based extract of *Nerium oleander* leaves (nae-8((R))). *Clinical, cosmetic and investigational dermatology*. 2015;8:239-48.
94. Thong-Ngam D, Samuhasaneeto S, Suyasanont D, Wisedopas N. Development of a simple rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Thai J Gastroenterol*. 2005;6:144-8.

95. Thong-Ngam D, Onanong Kulaputana M, Klaikew N. Effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in rats with non-alcoholic steatohepatitis. *J Med Assoc Thai*. 2007;90(4):788-97.
96. Samuel VT. Fructose induced lipogenesis: from sugar to fat to insulin resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2011;22(2):60-5.
97. Abdelmalek MF, Suzuki A, Guy C, Unalp-Arida A, Colvin R, Johnson RJ, et al. Increased fructose consumption is associated with fibrosis severity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*. 2010;51(6):1961-71.
98. Ouyang X, Cirillo P, Sautin Y, McCall S, Bruchette JL, Diehl AM, et al. Fructose consumption as a risk factor for non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol*. 2008;48(6):993-9.
99. Samuhasaneeto S, Thong-Ngam D, Kulaputana O, Klaikew N. Effects of Vitamin B6 Supplement on Serum Transaminase and Total Glutathione in Rats with Nonalcoholic Steatohepatitis (NASH). *Thai J Gastroenterol*. 2007;8(3):119-22.
100. Braunstein AE. Binding and Reactions of the Vitamin B6 Coenzyme in the. *Vitamins and hormones*. 1964;22:451.
101. Haque JA, McMahan RS, Campbell JS, Shimizu-Albergine M, Wilson AM, Botta D, et al. Attenuated progression of diet-induced steatohepatitis in glutathione-deficient mice. *Lab Invest*. 2010;90(12):1704-17.
102. Harrison SA, Kadakia S, Lang KA, Schenker S. Nonalcoholic steatohepatitis: what we know in the new millennium. *The American journal of gastroenterology*. 2002;97(11):2714-24.
103. Cumberbatch M, Dearman RJ, Antonopoulos C, Groves RW, Kimber I. Interleukin (IL)-18 induces Langerhans cell migration by a tumour necrosis factor- α - and IL-1 β -dependent mechanism. *Immunology*. 2001;102(3):323-30.
104. Zhao X, Xue J, Wang X-L, Zhang Y, Deng M, Xie M-L. Involvement of hepatic peroxisome proliferator-activated receptor α/γ in the therapeutic effect of osthole on high-fat and high-sucrose-induced steatohepatitis in rats. *International immunopharmacology*. 2014;22(1):176-81.

105. Wang LL, Zhang ZC, Hassan W, Li Y, Liu J, Shang J. Amelioration of free fatty acid-induced fatty liver by quercetin-3-O- β -D-glucuronide through modulation of peroxisome proliferator-activated receptor- α /sterol regulatory element-binding protein-1c signaling. *Hepatology Research*. 2015.
106. Ye J. Regulation of PPAR γ function by TNF- α . *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;374(3):405-8.
107. Okyar A, Can A, Akev N, Baktir G, Sütülpinar N. Effect of Aloe vera leaves on blood glucose level in type I and type II diabetic rat models. *Phytotherapy Research*. 2001;15(2):157-61.
108. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. Antioxidant effect of Aloe vera gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological reports : PR*. 2005;57(1):90-6.
109. Rajeswari R, Umadevi M, Rahale CS, Pushpa R, Selvavenkadesh S, Kumar KS, et al. Aloe vera: the miracle plant its medicinal and traditional uses in India. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2012;1(4):118-24.
110. Nemmar A, Al-Salam S, Yuvaraju P, Beegam S, Ali BH. Emodin mitigates diesel exhaust particles-induced increase in airway resistance, inflammation and oxidative stress in mice. *Respiratory physiology & neurobiology*. 2015.
111. Hu B, Zhang H, Meng X, Wang F, Wang P. Aloe-emodin from rhubarb (*Rheum rhabarbarum*) inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in RAW264.7 macrophages. *Journal of ethnopharmacology*. 2014;153(3):846-53.
112. Nobili V, Pastore A, Gaeta LM, Tozzi G, Comparcola D, Sartorelli MR, et al. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in patients affected by nonalcoholic steatohepatitis. *Clinica Chimica Acta*. 2005;355(1-2):105-11.



ภาคผนวก



ภาคผนวก

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
BW control	6	417.5000	11.29159	4.60977	405.6502	429.3498
NASH	6	223.3333	14.09492	5.75423	208.5416	238.1250
Aloe	6	276.6667	3.66970	1.49815	272.8156	280.5178
Total	18	305.8333	84.87240	20.00462	263.6273	348.0394
AST control	6	483.4167	42.80936	17.47685	438.4910	528.3423
NASH	6	815.0000	110.90537	45.27693	698.6120	931.3880
Aloe	6	537.1667	162.56127	66.36536	366.5691	707.7643
Total	18	611.8611	185.16287	43.64331	519.7818	703.9404
ALT control	6	257.0000	54.74304	22.34875	199.5507	314.4493
NASH	6	81.7667	14.99355	6.12109	66.0319	97.5014
Aloe	6	196.3333	38.58843	15.75366	155.8373	236.8294
Total	18	178.3667	83.51778	19.68533	136.8343	219.8991
MDA control	6	129.7588	51.25378	20.92427	75.9713	183.5464
NASH	6	377.5188	77.74075	31.73753	295.9349	459.1027
Aloe	6	199.1892	35.74476	14.59274	161.6773	236.7010
Total	18	235.4889	120.23394	28.33941	175.6980	295.2799
GSH control	6	24.0367	8.38918	3.42487	15.2328	32.8406
NASH	6	9.7633	1.84487	.75317	7.8273	11.6994
Aloe	6	18.4567	4.18035	1.70662	14.0697	22.8437
Total	18	17.4189	7.96006	1.87620	13.4604	21.3773
IL18d control	6	141.8117	9.74790	3.97956	131.5819	152.0415
NASH	6	225.3083	46.49945	18.98332	176.5102	274.1065
Aloe	6	156.6417	6.81811	2.78348	149.4865	163.7968
Total	18	174.5872	45.58896	10.74542	151.9164	197.2581

PPAR control	6	52.0383	5.05647	2.06430	46.7319	57.3448
NASH	6	20.8178	5.07367	2.07132	15.4933	26.1423
Aloe	6	57.6265	18.25262	7.45160	38.4715	76.7815
Total	18	43.4942	19.76924	4.65966	33.6632	53.3252
TUNEL control	6	2.1550	.93511	.38176	1.1737	3.1363
NASH	6	7.9117	1.46654	.59871	6.3726	9.4507
Aloe	6	2.3950	.93633	.38225	1.4124	3.3776
Total	18	4.1539	2.93829	.69256	2.6927	5.6151



Descriptive

		Minimum	Maximum
BW	control	400.00	435.00
	NASH	207.00	245.00
	Aloe	272.00	281.00
	Total	207.00	435.00
AST	control	444.00	550.00
	NASH	690.00	945.00
	Aloe	370.00	845.00
	Total	370.00	945.00
ALT	control	206.00	329.00
	NASH	52.60	95.00
	Aloe	149.00	240.00
	Total	52.60	329.00
MDA	control	72.86	217.83
	NASH	284.94	500.68
	Aloe	158.29	246.01
	Total	72.86	500.68
GSH	control	12.58	35.07
	NASH	7.14	11.62
	Aloe	14.48	24.47
	Total	7.14	35.07
IL18d	control	132.86	156.55
	NASH	170.95	297.55

	Aloe	149.13	169.54
	Total	132.86	297.55
PPAR	control	45.35	58.52
	NASH	15.59	28.83
	Aloe	43.20	93.97
	Total	15.59	93.97
TUNEL	control	1.02	3.41
	NASH	5.41	9.89
	Aloe	1.14	3.94
	Total	1.02	9.89

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.



ANOVA

		Sum of Squares	DF	Mean Square	F	Sig.
BW	Between Groups	120758.333	2	60379.167	533.333	.000
	Within Groups	1698.167	15	113.211		
	Total	122456.500	17			
AST	Between Groups	380055.81	2	190027.931	14.056	.000
	Within Groups	202794.042	15	13519.603		
	Total	582849.903	17			
ALT	Between Groups	95025.373	2	47512.687	30.259	.000
	Within Groups	23553.367	15	1570.224		
	Total	118578.740	17			
MDA	Between Groups	196014.118	2	98007.059	29.555	.000
	Within Groups	49741.308	15	3316.087		
	Total	245755.426	17			
GSH	Between Groups	620.877	2	310.438	10.205	.002
	Within Groups	456.286	15	30.419		
	Total	1077.163	17			
IL18d	Between Groups	23813.467	2	11906.733	15.506	.000
	Within Groups	11518.533	15	767.902		
	Total	35332.000	17			
PPAR	Between Groups	4721.650	2	2360.825	18.421	.000
	Within Groups	1922.341	15	128.156		
	Total	6643.991	17			

TUNEL	Between Groups	127.261	2	63.630	48.923	.000
	Within Groups	19.509	15	1.301		
	Total	146.770	17			

Homogeneous Subsets

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

BW

grop		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	NASH	6	223.3333		
	Aloe	6		276.6667	
	control	6			417.5000
	Sig.		1.000	1.000	1.000

CHULALONGKORN UNIVERSITY

AST

N	Subset for alpha = 0.05	
	1	2
6	483.4167	
6	537.1667	
6		815.0000
	.708	1.000

ALT

grop		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Tukey HSD ^a	NASH	6	81.7667		
	Aloe	6		196.3333	
	control	6			257.0000
Sig.			1.000	1.000	1.000



Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



MDA

grop		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	control	6	129.7588	
	Aloe	6	199.1892	
	NASH	6		377.5188
Sig.			.126	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

GSH

grop		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	NASH	6	9.7633	
	Aloe	6		18.4567
	control	6		24.0367
	Sig.		1.000	.219

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



IL18d

grop		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	control	6	141.8117	
	Aloe	6	156.6417	
	NASH	6		225.3083
	Sig.		.632	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

PPAR

grop		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	NASH	6	20.8178	
	control	6		52.0383
	Aloe	6		57.6265
Sig.			1.000	.676



Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.



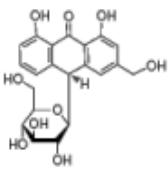
TUNEL

grop		N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD ^a	control	6	2.1550	
	Aloe	6	2.3950	
	NASH	6		7.9117
Sig.			.930	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Aloe vera

SIGMA-ALDRICH [®]		sigma-aldrich.com
3050 Spruce Street, Saint Louis, MO 63103, USA Website: www.sigmaaldrich.com Email USA: techserv@sial.com Outside USA: eurtechserv@sial.com		
Product Specification		
Product Name: Aloin - from Aloe barbadensis Miller leaves, ≥97%		
Product Number: CAS Number: MDL: Formula: Formula Weight: Storage Temperature:	B6906 1415-73-2 MFCD00151160 C ₂₁ H ₂₂ O ₉ 418.39 g/mol 2 - 8 °C	
TEST		Specification
Appearance (Color) Appearance (Form) Solubility (Color) Solubility (Turbidity) 50 mg/mL, MeOH % Water % Purity (HPLC) Source Aloe barbadensis miller leaves	Light Yellow to Beige Powder Light Yellow to Dark Yellow Clear to Very Slightly Hazy < 9 ≥ 97 Conforms	
Specification: PRD.0.ZQ5.10000020735		



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว จุฑามาศ วงศ์ภูมิ เกิดเมื่อวันที่ 14 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2528

ประวัติการศึกษา

- ปีพ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยม โรงเรียนอ้อมน้อยโสภณชนูปถัมภ์ จังหวัดสมุทรสาคร
- ปีพ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
- ปีพ.ศ. 2556 เข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท สาขาพยาบาลวิทยา สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



