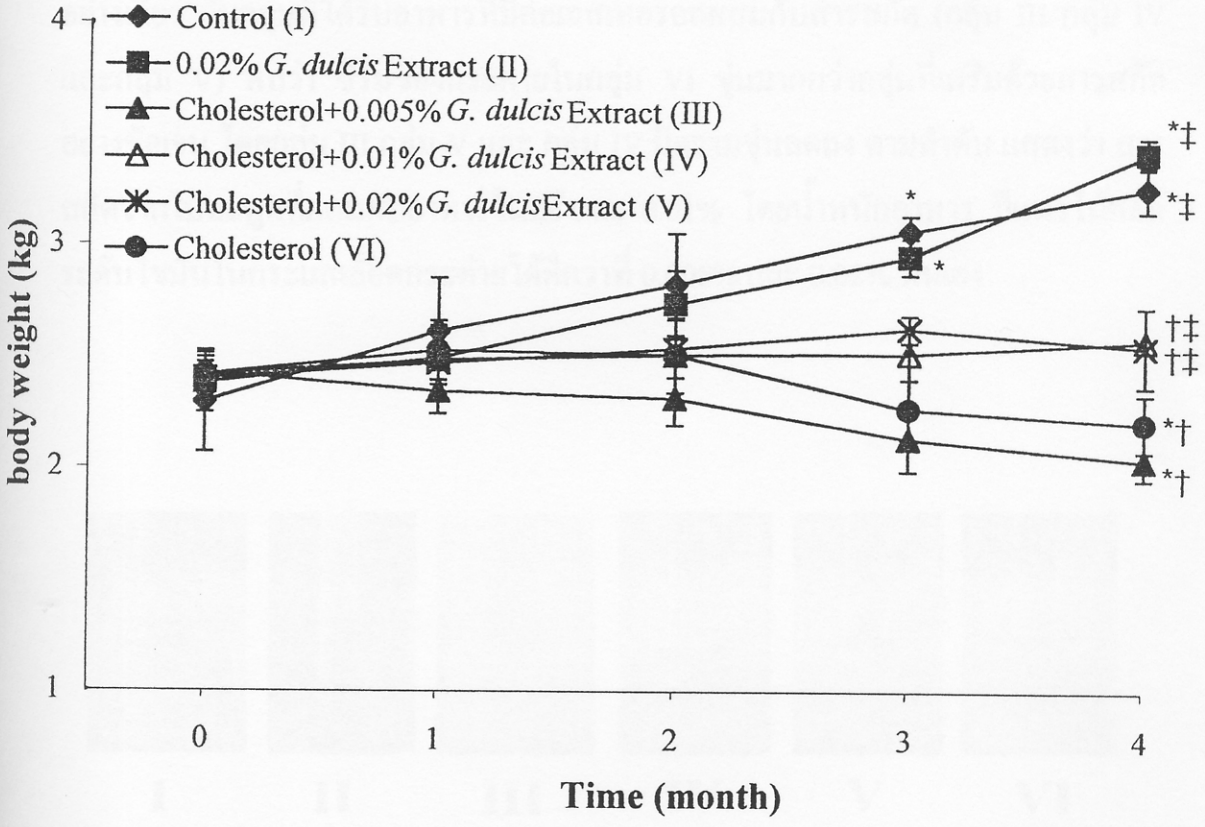
3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 น้ำหนักตัวของกระต่าย

เนื่องจากกระต่ายทุกตัวกินอาหารที่กำหนดให้ในแต่ละวัน (100 กรัม) จนหมดตลอด 4 เดือนของการทดลอง ดังนั้น ปริมาณอาหารที่กระต่ายแต่ละตัวได้รับจึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกระต่ายแต่ละกลุ่มตลอดระยะเวลาดังกล่าวมาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 7) พบว่า กระต่ายในกลุ่มควบคุม ซึ่งได้รับอาหารปกติ (กลุ่ม I) กับ กระต่ายในกลุ่ม II ซึ่งได้รับอาหารปกติเสริมด้วยสารสกัดจากใบมะพูดในปริมาณ 0.02% โดยน้ำหนักอาหาร มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และมีค่าใกล้เคียงกันตลอดการทดลอง แสดงว่า สารสกัดไม่มีผลต่อการเติบโตตามวัยของกระต่ายปกติ ในขณะที่ กลุ่ม III ซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัด 0.005% กับ กลุ่ม VI ซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอล 1% อย่างเดียว กลับมีน้ำหนักตัวลดลงจากเริ่มต้น (เดือนที่ 0) โดยกลุ่ม III ลดลงอย่างช้า ๆ ตั้งแต่เดือนแรกไปจนสิ้นสุดการทดลอง ส่วนกลุ่ม VI ลดลงหลังจากเดือนที่ 2 สำหรับอีก 2 กลุ่มที่เหลือนั้น มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยค่อนข้างคงที่ตลอดการทดลอง และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกระต่ายแต่ละกลุ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (เดือนที่ 4) พบว่า กระต่ายทั้ง 4 กลุ่มซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมอยู่ด้วย (กลุ่ม III-VI) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยน้อยกว่ากระต่ายกลุ่ม I โดย กลุ่ม III ซึ่งมีน้ำหนักตัวน้อยที่สุดนั้น มีความแตกต่างอย่างชัดเจนจากกลุ่ม IV และ กลุ่ม V แต่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่ม VI ซึ่งได้รับคอเลสเทอรอลอย่างเดียว

การที่น้ำหนักตัวของกระต่ายลดลงหลังจากได้รับคอเลสเทอรอลในปริมาณสูงไประยะหนึ่งนั้น ไม่ได้มีสาเหตุจากการเบื่ออาหาร เนื่องจากกระต่ายทุกตัวกินอาหารได้ดี อีกทั้งไม่ปรากฏอาการผิดปกติใด ๆ ทั้งสิ้น แต่น่าจะเป็นผลของการสะสม cholesten–3-ones ที่เกิดจากการสลายคอเลสเทอรอลโดยแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ซึ่งมีรายงานว่าสามารถยับยั้งการเพิ่มน้ำหนักตัวรวมทั้งการสะสมไขมันในร่างกายของสัตว์ทดลองหลายชนิด (Watanabe, 1980; Tanzawa *et al.,* 1980; Suzuki *et al.,* 1993 และ Suzuki *et al.,* 1997 อ้างโดย Suzuki *et al.*, 1998) ดังนั้น ผลการทดลองของ กระต่ายในกลุ่ม IV และ กลุ่ม V ซึ่งมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยไม่ค่อยเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง และมากกว่า

กลุ่ม VI ที่ไม่ได้รับสารสกัดนั้น จึงแสดงถึงความสามารถต้านการลดน้ำหนักในกระต่ายที่กินอาหารมีคอเลสเทอรอลสูง ของสารสกัดจากใบมะพูด (0.01%-0.02% โดยน้ำหนักอาหาร) ได้เป็นอย่างดี เช่นเดียวกับสารสกัดจากเหง้า (rhizome) ของว่านชักมดลูก (*Curcuma comosa*) (Piyachaturawat *et al.*, 1999) และ สารสกัด catechins จากใบชาเขียว (*Camellia sinensis*) (Miura *et al.*, 2001)



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาทดลองกับน้ำหนักตัวของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

[หมายเหตุ – ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm$ S.D.) ที่ได้จาก N = 4]

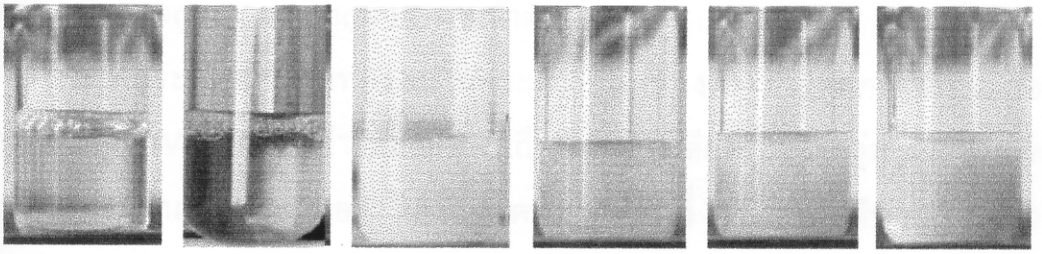
*$p < 0.05$ เทียบกับเดือนที่ 0

$^{\dagger}p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม I

$^{\ddagger}p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม VI

3.2 ลักษณะของซีรัมกระต่าย

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ซีรัมที่เตรียมได้จากเลือดกระต่ายทั้ง 6 กลุ่ม มีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งพบว่า ซีรัมของกระต่ายทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลมีสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนม บ่งบอกถึงการมีระดับไขมันในกระแสเลือดสูง (hyperlipidemia) (นันทยา ชนะรัตน์, 2532) เทียบกับกลุ่ม I และกลุ่ม II ซึ่งมีสีเหลืองอ่อนและใส และเมื่อเปรียบเทียบลักษณะซีรัมของกลุ่ม VI ซึ่งได้รับคอเลสเทอรอลเพียงอย่างเดียว กับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมกับสารสกัด (กลุ่ม III กลุ่ม IV และกลุ่ม V) พบว่า ซีรัมของกระต่ายในกลุ่ม VI ขุ่นมากกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารสกัดอย่างชัดเจน โดยกลุ่ม III กลุ่ม V และ กลุ่ม IV มีความขุ่นลดลง ตามลำดับ แสดงว่า สารสกัดจากใบมะพูดที่ผสมกับอาหารในปริมาณ 0.01% โดยน้ำหนักอาหาร มีแนวโน้มลดระดับไขมันในกระแสเลือดกระต่ายได้ดีกว่าที่ 0.005% และ 0.02% นั่นเอง



รูปที่ 8 ลักษณะซีรัมของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

I Control

II 0.02% *G. dulcis* Extract

III Cholesterol+0.005% *G. dulcis* Extract

IV Cholesterol+0.01% *G. dulcis* Extract

V Cholesterol+0.02% *G. dulcis* Extract

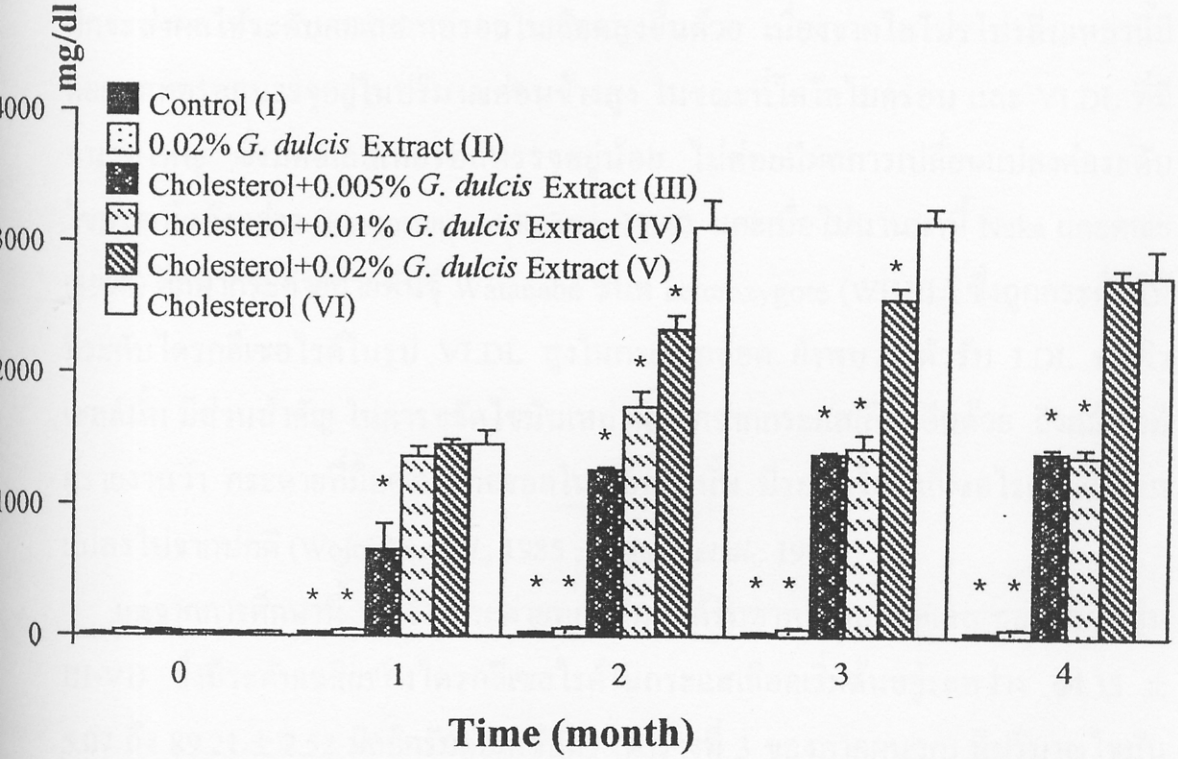
VI Cholesterol

3.3 ระดับของคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด

เนื่องจากระดับคอเลสเทอรอลสูงในกระแสเลือดสามารถบ่งชี้การเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้ดี (พรทิพย์ โล่ห์เลขา, 2536) ดังนั้น จึงทำการเปรียบเทียบระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายทั้ง 6 กลุ่ม ตลอดระยะเวลาของการทดลอง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 9 ซึ่งพบว่า ก่อนเริ่มการทดลอง กระต่ายมีระดับคอเลสเทอรอลในเลือดโดยเฉลี่ย อยู่ระหว่าง 16.73 ± 3.83 ถึง 38.89 ± 8.76 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ตารางที่ 2 ของภาคผนวก) หลังจากผ่านไป 1 เดือน ระดับคอเลสเทอรอลของกลุ่มควบคุม (กลุ่ม I) กับกลุ่ม II ยังคงที่ ในขณะที่กลุ่มอื่น ๆ เริ่มเข้าสู่ภาวะคอเลสเทอรอลในเลือดสูง (hypercholesterolemia) เนื่องจากอาหารที่กินเข้าไป โดยกลุ่ม IV กลุ่ม V และกลุ่ม VI เพิ่มขึ้นจากปกติกว่า 50 เท่า ส่วนกลุ่ม III เพิ่มขึ้นแค่ 20 เท่า แสดงว่า อาจมีปัจจัยบางอย่างที่ทำให้กระต่ายกลุ่มนี้ มีอัตราการดูดซึมและ/หรือขับคอเลสเทอรอลออกจากร่างกายต่างจากกลุ่ม IV, V และ VI ในเดือนต่อมา (เดือนที่ 2) คอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายทั้ง 4 กลุ่มที่ได้รับคอเลสเทอรอล ยังคงเพิ่มปริมาณขึ้นอีก และเริ่มเห็นผลของสารสกัดในเดือนที่ 3 โดยกลุ่ม VI ที่ไม่ได้รับสารสกัด มีระดับสูงสุด รองลงมาได้แก่ กลุ่ม V กลุ่ม IV และ กลุ่ม III ตามลำดับ

การเพิ่มระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายทุกกลุ่มเริ่มชะลอตัว ยกเว้น กลุ่ม IV ซึ่งกลับมีค่าลดลงมา จนถึงระดับใกล้เคียงกับของกลุ่ม III และรักษาระดับคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง ในเดือนสุดท้าย (เดือนที่ 4) ถึงแม้ระดับคอเลสเทอรอลในกลุ่ม VI จะลดลงบางส่วนแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากเดือนที่ผ่านมา ผลการทดลองข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การได้รับอาหารผสมสารสกัดจากใบมะพูดในปริมาณ 0.005% และ 0.01% สามารถชะลอการเพิ่มปริมาณของคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายได้ดีกว่า ที่ 0.02% ซึ่งสอดคล้องกับผลของลักษณะซีรัมในข้อ 3.2 อย่างไรก็ตาม ความสามารถลดระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของสารสกัดพืชธรรมชาติเท่าที่มีรายงานนั้น เป็นผลจากการขจัดไขมันชนิดนี้ออกจากร่างกายเพิ่มขึ้นนั่นเอง โดยเมื่อไม่นานมานี้ Piyachaturawat และคณะ (1999) พบว่า การให้อาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมกับสารสกัดว่านชักมดลูกกับแฮมสเตอร์ (hamster) เป็นเวลา 7 วัน กระตุ้นการขับออกของคอเลสเทอรอลเข้าสู่น้ำดี เนื่องจากพบหลักฐานว่า แฮมสเตอร์

เหล่านี้มีปริมาณคอเลสเทอรอลเพิ่มขึ้นกว่าปกติ ทั้งในตับและน้ำดี เช่นเดียวกับ Koshy และคณะ (2001) ซึ่งรายงานว่า การลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือดหนู (hypocholesterolmic rat) ของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์จากผลส้มแขก (*Garcinia cambogia*) เป็นผลจากการกระตุ้นกระบวนการสลายไขมันชนิดนี้ในร่างกาย เนื่องจากพบกรดน้ำดี (bile acids) เพิ่มขึ้นอย่างมากในตับ รวมทั้งมีกรดน้ำดี และ neutral sterols ปริมาณสูงอยู่ในมูลของหนูเหล่านี้อีกด้วย ในขณะที่ Aprikian และคณะ (2001) พบว่าในหนูที่กินอาหารที่มีคอเลสเทอรอลสูง (cholesterol-fed rat) ผสมกับผลแอปเปิ้ลในรูปผงแห้ง [lyophilized apple (Gala variety)] นอกจากมีการขับ neutral sterols จากทางเดินอาหารเพิ่มขึ้นแล้ว ยังมีการดูดซึมของไขมันชนิดนี้ลดลงอีกด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากใบมะพูดในกรณีดังกล่าวนั้น ยังคงเป็นเรื่องที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมกันต่อไป



รูปที่ 9 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาทดลองกับระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

[หมายเหตุ – ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm$ S.D.) ที่ได้จาก N = 4]

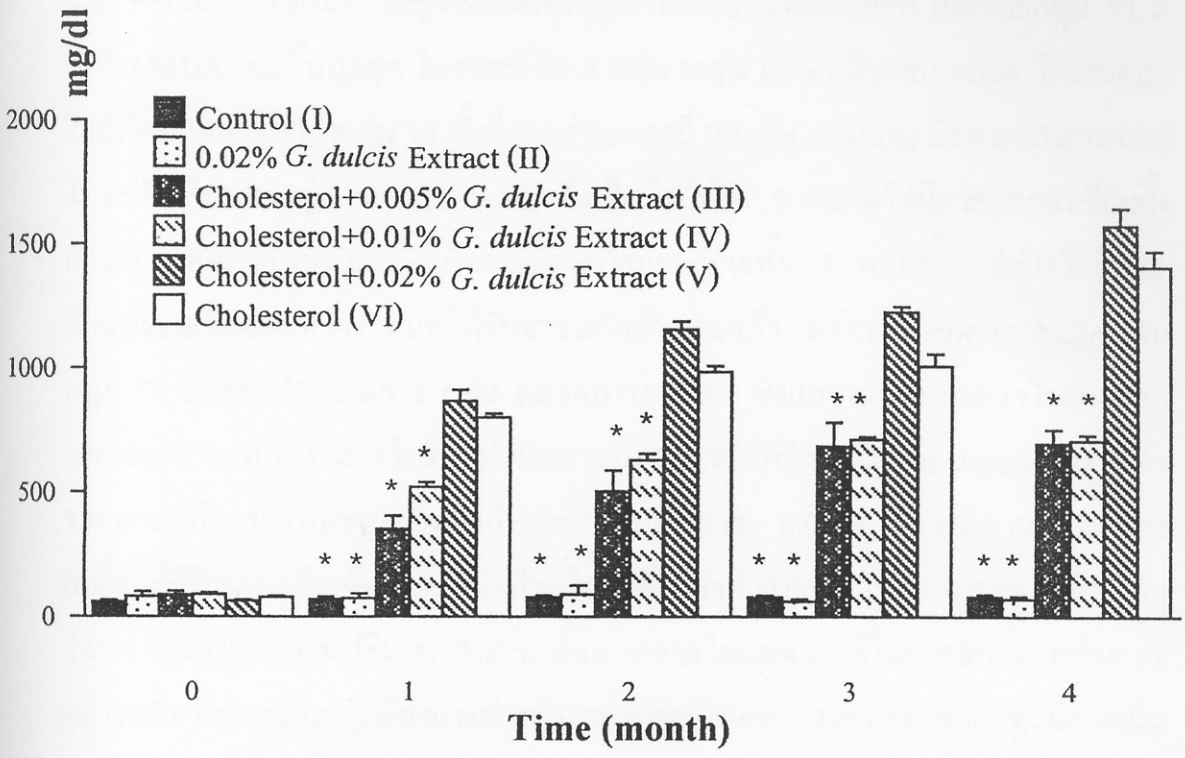
*$p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม VI

3.4 ระดับของไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือด

ถึงแม้การมีระดับไตรกลีเซอไรด์สูงในกระแสเลือด (hypertriglyceridemia) ไม่ได้ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (Jones and Chambliss, 2000) แต่อาจทำให้ภาวะดังกล่าวรุนแรงขึ้นได้จากอิทธิพลของปริมาณคอเลสเทอรอลที่ลดลงใน HDL และการเพิ่มขึ้นของ LDL ที่มีขนาดเล็ก (small dense LDL) ซึ่งจัดเป็นตัวการสำคัญของการเกิดภาวะดังกล่าว (Brower Jr., 1999 อ้างโดย Chaput *et al.*, 2000) นอกจากนี้ จากการที่ VLDL (very low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein) และไคโลไมครอน (chylomicron) ซึ่งล้วนเป็นไลโปโปรตีนที่มีส่วนช่วยในการขนส่งคอเลสเทอรอลในกระแสเลือดด้วยนั้นประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ทั้งสิ้น จึงทำให้ระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสัมพันธ์กับระดับไตรกลีเซอไรด์อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ โดยเฉพาะเมื่อไตรกลีเซอไรด์อยู่ในรูปของ VLDL ที่มีขนาดเล็ก หรืออยู่ในรูปของ IDL นั้นมักจะส่งผลให้ระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสูงขึ้นด้วย เนื่องจากไลโปรโปรตีนเหล่านี้มีคอเลสเทอรอลบรรจุอยู่ในปริมาณค่อนข้างสูง ในขณะที่ไคโลไมครอน และ VLDL ที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งมีคอเลสเทอรอลบรรจุอยู่น้อย ไม่ค่อยมีผลการเปลี่ยนแปลงต่อระดับไขมันชนิดดังกล่าว (Rosenson and Robert, 1999) และเมื่อไม่นานมานี้ Naka และคณะ (1998) ศึกษากระต่ายสายพันธุ์ Watanabe ชนิด heterozygote (WHHL) ซึ่งถูกกระตุ้นให้มีระดับไตรกลีเซอไรด์ในรูป VLDL สูงในกระแสเลือด ยังพบว่า ตัวรับ LDL บนผิวเซลล์นั้น มีส่วนสำคัญ ในการขจัดไขมันเหล่านี้ออกจากกระแสเลือดอีกด้วย ถึงแม้เคยมีผู้รายงานว่า กระต่ายที่มีคอเลสเทอรอลในเลือดสูงนั้น มีระดับไตรกลีเซอไรด์ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ (Wojcicki *et al.*, 1985 ; Sugano *et al.*, 1988)

แต่จากการศึกษานี้ พบว่า กระต่ายทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอล (กลุ่ม III-VI) ซึ่งมีระดับเฉลี่ยของไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 64.35 $\pm$ 5.07 ถึง 89.21 $\pm$ 2.52 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (ตารางที่ 3 ของภาคผนวก) มีปริมาณไขมันดังกล่าวเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในระหว่าง 2 เดือนแรกของการทดลอง (รูปที่ 10) โดยกลุ่ม V มีระดับเพิ่มขึ้นสูงสุด รองลงมาคือ กลุ่ม VI กลุ่ม IV และ กลุ่ม III ตามลำดับ ต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่ม I) กับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารสกัด (กลุ่ม II) ซึ่งมีค่าคงที่ตลอดการทดลอง แสดงว่า สารสกัดไม่ได้มีผลต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของกระต่ายปกติ

เมื่อเข้าสู่ระยะสุดท้ายของการทดลอง (เดือนที่ 3 และ 4) ระดับของไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่ม III และ IV เข้าสู่ภาวะคงที่ ในขณะที่ กลุ่ม V และ กลุ่ม VI ยังคงมีระดับเพิ่มขึ้นจนถึงเดือนสุดท้ายของการทดลองและจะเห็นว่า ระดับไตรกลีเซอไรด์ในกลุ่ม III จะเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มอื่นๆ เช่นเดียวกับลักษณะการเปลี่ยนแปลงของระดับคอเลสเทอรอล ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบมะพูดในปริมาณ 0.005% และ 0.01% ออกใกล้เคียงกันในการออกฤทธิ์ยับยั้งกระต่ายที่มีระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสูงไม่ให้หลั่งไตรกลีเซอไรด์ออกมาในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ตั้งแต่เดือนแรกของการทดลอง ซึ่งต่างจากการลดระดับของคอเลสเทอรอลที่เริ่มเห็นผลในเดือนที่ 2 (รูปที่ 9) ในขณะที่สารสกัดในปริมาณสูงกว่านี้ (0.02%) ไม่แสดงผลยับยั้งใด ๆ ต่อระดับไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้น สำหรับกลไกการเปลี่ยนแปลงระดับไตรกลีเซอไรด์ที่เกิดขึ้นในกระต่ายที่ได้รับสารสกัดดังกล่าว ขณะนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่เข้าใจว่า อาจเกิดจากการที่ VLDL และไคโลไมครอน มีปริมาณไขมันชนิดนี้น้อยลง เช่นเดียวกับในหนูที่มีความบกพร่องของตัวรับ LDL (LDL receptor deficient mice) ซึ่งได้รับ probucol แล้ว มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลง (Benson *et al*., 1998)

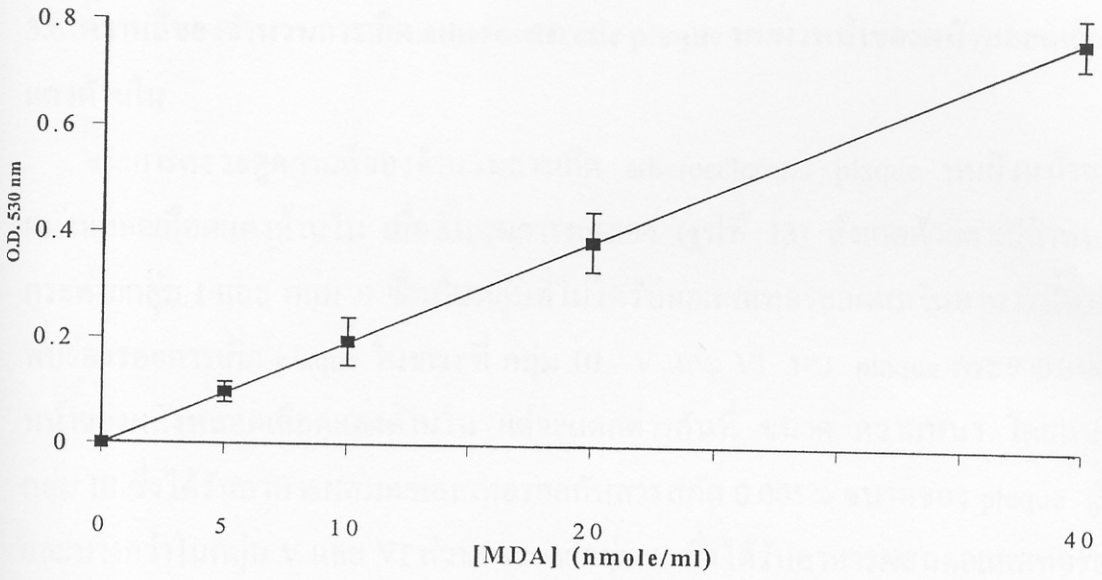


รูปที่ 10 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาทดลองกับ
ระดับไตรกลีเซอไรด์ในกระแสเลือดของกระต่ายแต่ละกลุ่ม
[หมายเหตุ – ผลที่แสดงในกราฟ เป็นค่าเฉลี่ย ($\overline{X} \pm$ S.D.) ที่ได้จาก N = 4]
*$p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม VI

3.5 ปริมาณของ MDA ในกระแสเลือด

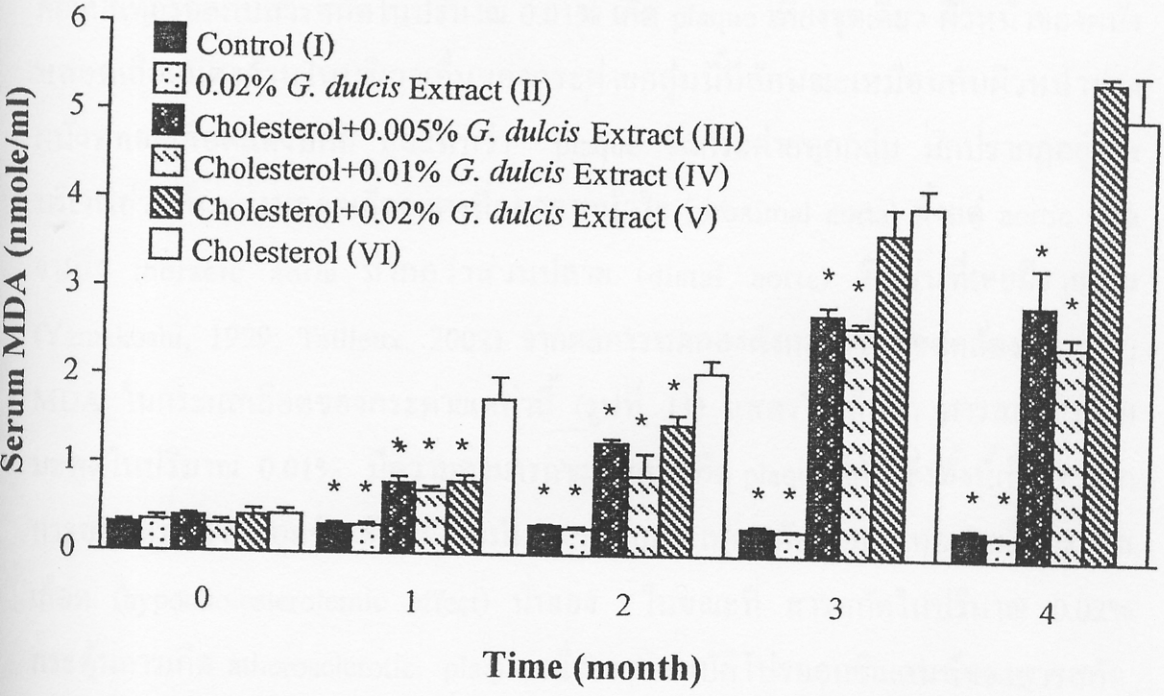
เนื่องจากกระบวนการออกซิเดชันของไขมันนั้น จะให้ผลิตผลสุดท้ายที่สำคัญคือ MDA และสารอนุพันธ์ของ MDA (MDA like substances) ดังนั้นเราจึงสามารถใช้ปริมาณสารอัลดีไฮด์เหล่านี้ในกระแสเลือดเพื่อตรวจวัดระดับการเกิดออกซิเดชันของไขมันภายในหลอดเลือดได้ (Coudray *et al.*, 1991) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ในซีรัมของกระต่ายทุกกลุ่มที่ถูกกระตุ้นจากอาหารให้มีระดับคอเลสเทอรอลในเลือดสูง (กลุ่ม III-กลุ่ม VI) มีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ (รูปที่ 12) เช่นเดียวกับที่เคยมีรายงานมาแล้ว (Prasad and Kalra, 1993; Mahfouz *et al.*, 1997; Yamakoshi *et al.*, 1999; Park, *et al.*, 2002) แสดงให้เห็นว่า การเกิดออกซิเดชันของไขมันในหลอดเลือดอาจถูกกระตุ้น

จาก คอเลสเทอรอลปริมาณสูงในเลือดนั่นเอง โดยในช่วงเดือนแรก กระต่ายกลุ่ม VI มีระดับ MDA เพิ่มขึ้นสูงสุด ในขณะที่อีก 3 กลุ่ม (กลุ่ม III-V) มีระดับ MDA ในเลือดสูงใกล้เคียงกันแต่ต่ำกว่ากลุ่ม VI ทั้งที่กระต่ายเหล่านี้ (ยกเว้น กลุ่ม III) มีคอเลสเทอรอลอยู่ในระดับเดียวกับกลุ่ม VI (รูปที่ 10) จึงเป็นไปได้ว่า สารสกัดได้มีการออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนออกซิเดชันของไขมันบางส่วนในกระต่ายทั้ง 3 กลุ่มนี้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดด้วยกันแล้ว มีข้อน่าสังเกตว่า MDA ในกลุ่ม IV มีระดับต่ำกว่าอีก 2 กลุ่ม ตลอดการทดลอง ซึ่งแสดงว่า ความแรงในการออกฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวไม่ได้แปรผันตามปริมาณสารที่ได้รับ (dose-dependent) เนื่องจากสารสกัดจากใบมะพูดที่ผสมกับอาหารในปริมาณ 0.01% มีความสามารถในการยับยั้งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันในเลือดได้ดีกว่าที่ 0.005% และ 0.02% ตามลำดับ โดยเฉพาะสารสกัดในปริมาณ 0.02% นั้นนอกจากไม่แสดงผลดีในการยับยั้งปฏิกิริยาดังกล่าวแล้ว ยังกระตุ้นปฏิกิริยาบางส่วนในระยะสุดท้ายของการทดลองด้วย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสารสกัดดังกล่าวแสดงสมบัติที่เรียกว่า โปรออกซิแดนท์ (pro-oxidant) (วัลยา เนาวรัตน์วัฒนา และ พัชรี บุณศิริ, 2542) เมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น ดังเช่นที่พบเมื่อทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของ LDL ในหลอดทดลอง (สุญาณี คงคาช่วย และคณะ, 2544) และอาจเนื่องมาจากการปนเปื้อนของสารอื่น ๆ ในสารสกัดที่ใช้ทดลอง



รูปที่ 11 กราฟมาตรฐานของ MDA ที่ได้จากการเตรียมสารละลาย MDA ในสารละลาย 50 mM H_2SO_4

[หมายเหตุ- ผลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm S.D.$) ที่ได้จากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง]



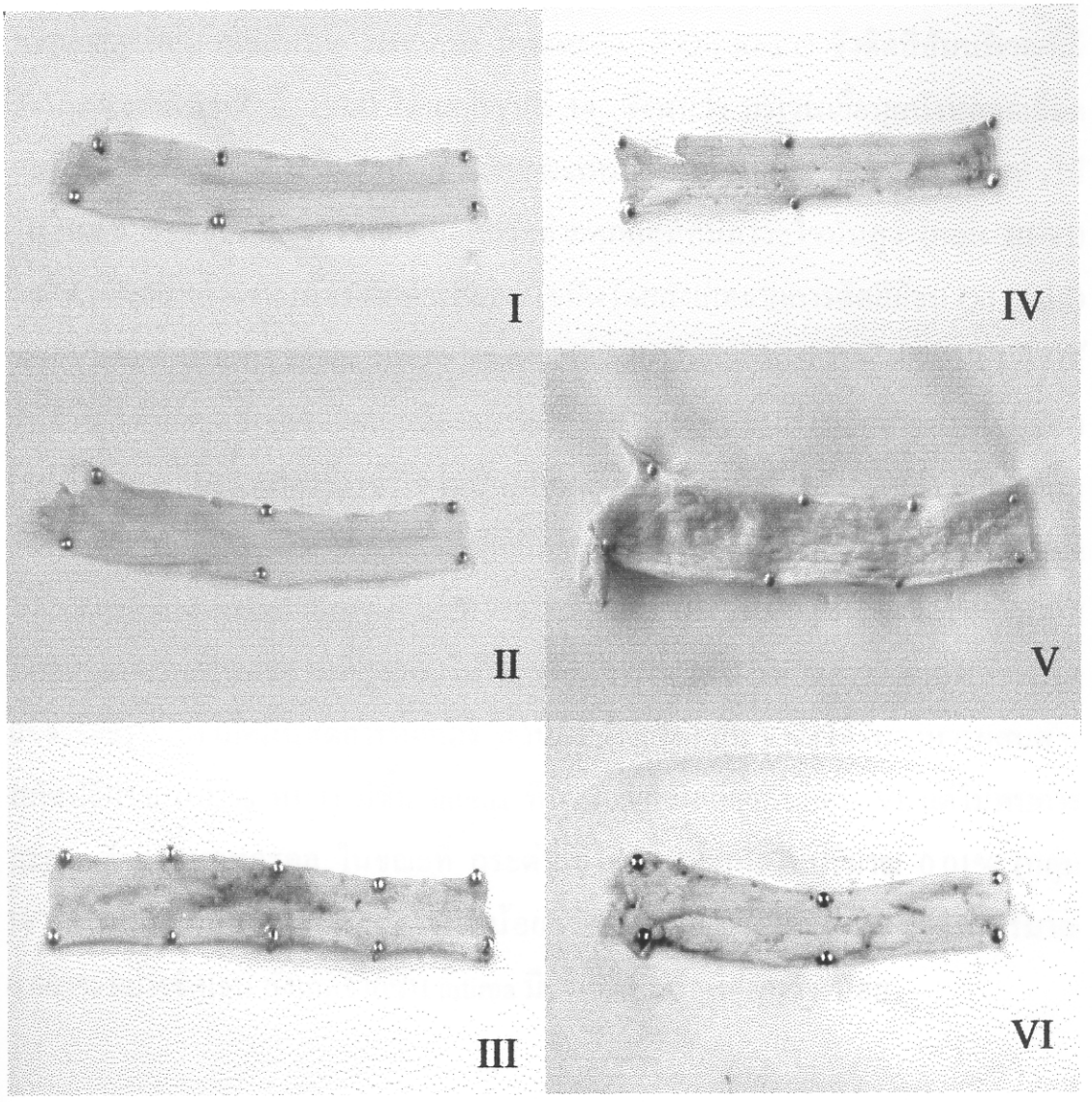
รูปที่ 12 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระยะเวลาทดลองกับระดับ MDA ในกระแสเลือดของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

[หมายเหตุ - ผลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย ($\bar{X} \pm S.D.$) ที่ได้จาก N = 4]

*$p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม VI

3.6 ความถี่ของจำนวนการเกิด atherosclerotic plaque บนผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน

จากการตรวจดูความถี่ของจำนวนการเกิด atherosclerotic plaque บนผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน เมื่อสิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 13) สังเกตด้วยตาเปล่าพบว่ากระต่ายกลุ่ม I และ กลุ่ม II ซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ได้รับคอเลสเทอรอลผสมในอาหารนั้น ไม่พบร่องรอยการเกิด plaque ในขณะที่ กลุ่ม III, V และ VI พบ plaque กระจายบนผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านใน แต่จะแตกต่างกันที่ ขนาด ความหนา โดยพบว่ากลุ่ม III ซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัด 0.005% ขนาดของ plaque เล็กและบางกว่าในกลุ่ม V และ VI ส่วนกระต่ายกลุ่ม V ซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัด 0.02% มีความถี่ของการเกิด plaque มากกว่าในกลุ่ม VI แต่จะมีขนาดของ plaque บางกว่า และกระต่ายกลุ่ม VI ซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมอยู่อย่างเดียว plaque มีขนาดใหญ่และหนาที่สุด ในขณะที่กระต่ายกลุ่ม IV ซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัดในปริมาณ 0.01% เกิด plaque เพียงจุดเดียว ผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านในบริเวณอื่นของกระต่ายกลุ่มนี้มีลักษณะเหมือนกับผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงปกติ และพบว่า plaque ในกระต่ายทุกกลุ่ม มักปรากฏอยู่ตรงบริเวณส่วนต้นของหลอดเลือดแดงที่ออกจากหัวใจ (proximal aorta) ตั้งแต่ aortic arch จนถึง thoracic aorta มากกว่าส่วนปลาย (distal aorta) ดังเช่นที่เคยมีรายงาน (Yamakoshi, 1999; Tailleux, 2002) จากผลการทดลองดังกล่าวซึ่งสอดคล้องกับระดับ MDA ในกระแสเลือดของกระต่ายเหล่านี้ (รูปที่ 11) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบมะพูดในปริมาณ 0.01% มีความสามารถชะลอการเกิด plaque ได้ดี ซึ่งทั้งนี้เป็นผลจากการออกฤทธิ์ต้านออกซิเดชันของไขมันผนวกกับการลดระดับคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด (hypocholesterolemic effect) นั่นเอง ในขณะที่ สารสกัดในปริมาณ 0.02% กระตุ้นการเกิด atherosclerotic plaque เนื่องจากสมบัติโปรออกซิแดนท์ของสารสกัดตามที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 13 ลักษณะผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดงด้านในบริเวณ thoracic aorta ของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

I Control

II 0.02% *G. dulcis* Extract

III Cholesterol+0.005% *G. dulcis* Extract

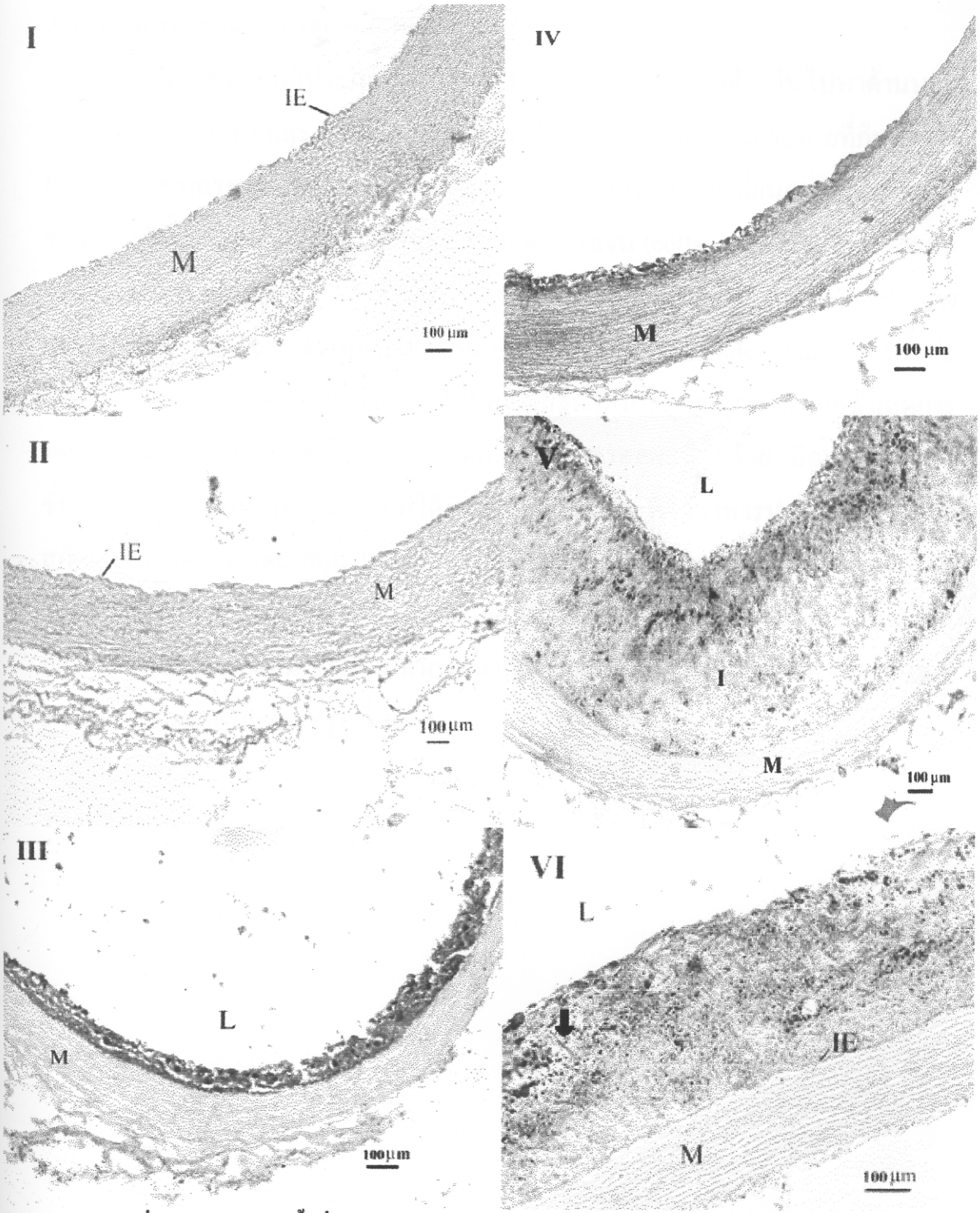
IV Cholesterol+0.01% *G. dulcis* Extract

V Cholesterol+0.02% *G. dulcis* Extract

VI Cholesterol

3.7 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของหลอดเลือดแดง

จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของหลอดเลือดแดงที่ออกจากหัวใจของกระต่ายทุกกลุ่ม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง โดยการย้อมสี Oil Red O ซึ่งติดสีส้มบริเวณที่มีไขมัน (เวคิน นพนิตย์, 2524) ได้ผลดังรูปที่ 14 ซึ่งพบว่า บริเวณเยื่อบุผนังหลอดเลือดของกลุ่ม I และ กลุ่ม II ไม่ติดสีส้ม มีลักษณะเหมือนกับหลอดเลือดแดงปกติโดยทั่วไป ในขณะที่ ชั้น intima ของหลอดเลือดกระต่ายทุกกลุ่มที่มีภาวะไขมันสูง (กลุ่ม III-VI) หนาตัวขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากการสะสมไขมันโดยสังเกตจากการติดสีย้อม Oil Red O นอกจากนี้ ภายในชั้น intima บริเวณ atherosclerotic plaque ของกระต่ายกลุ่ม VI ซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมเพียงอย่างเดียว สังเกตเห็นชิ้นส่วนลักษณะเหมือนผลึก (รูปที่ 14 กลุ่ม VI - ลูกศรชี้) เข้าใจว่าเป็นผลึกของคอเลสเทอรอลผลึกดังกล่าวมักปรากฏในบริเวณ atherosclerotic plaque ของผู้ที่มีภาวะหลอดเลือดแดงแข็งระยะรุนแรง (Type VI complicated lesion) (Stary *et al.*, 1995) แสดงว่ากระต่ายในกลุ่มนี้ ซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลในปริมาณที่สูงและไม่ได้เสริมด้วยสารสกัด อยู่ในภาวะหลอดเลือดแดงแข็งระยะรุนแรง เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ส่วนกระต่ายในกลุ่ม V ซึ่งได้รับอาหารผสมสารสกัดปริมาณ 0.02% พบว่า มีชั้น intima ที่หนามากเช่นเดียวกับกลุ่ม VI แต่ไม่พบการสะสมผลึกคอเลสเทอรอล ในขณะที่ กระต่ายที่ได้รับสารสกัดในปริมาณ 0.01% (กลุ่ม IV) มีบริเวณที่มีการสะสมของไขมันน้อยกว่ากลุ่ม III ซึ่งได้รับสารสกัดในปริมาณ 0.005% อย่างชัดเจน สังเกตจากชั้น intima มีบริเวณติดสีส้มค่อนข้างน้อย



รูปที่ 14 ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของหลอดเลือดแดงบริเวณ aortic arch ของกระต่ายแต่ละกลุ่ม

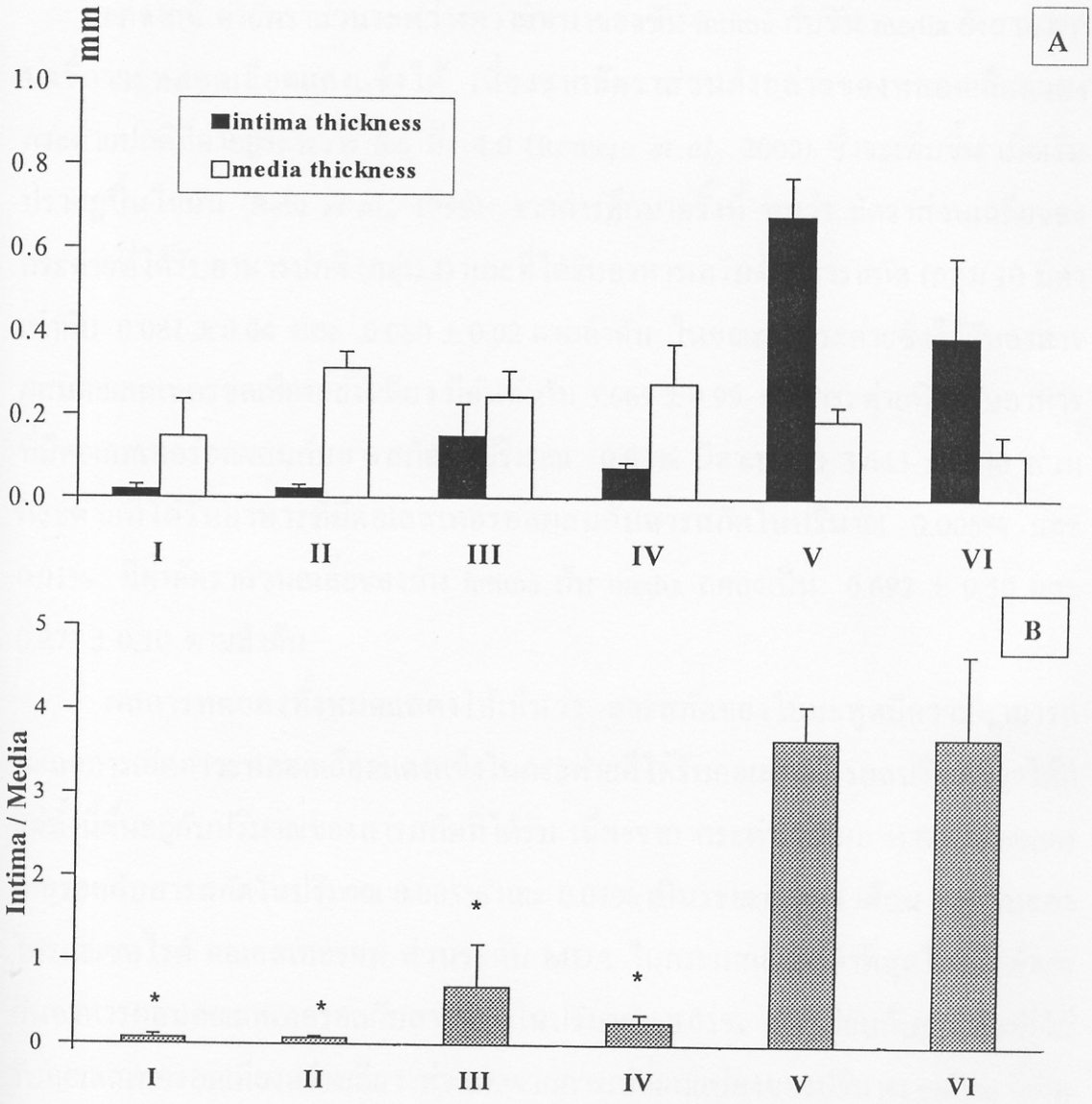
I	Control	IV	Cholesterol+0.01% *G. dulcis* Extract
II	0.02% *G. dulcis* Extract	V	Cholesterol+0.02% *G. dulcis* Extract
III	Cholesterol+0.005% *G. dulcis* Extract	VI	Cholesterol

[หมายเหตุ – ตำแหน่งลูกศรชี้ คือ ผลึกคอเลสเทอรอล]

IE = internal elastic lamina, L = lumen , M = media , I = intima

3.8 ความหนาของผนังหลอดเลือดแดง

หลอดเลือดแดงปกติประกอบด้วยผนัง 3 ชั้น เรียงลำดับจากด้านในไปหาด้านนอก ได้แก่ intima, media และ adventitia (พรทิพย์ โล่ห์เลขา, 2536) ในกระต่ายที่กินอาหารผสมคอเลสเทอรอลปริมาณสูงเป็นระยะเวลานาน มักพบการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญคือ ช่องว่างใต้ชั้น intima มีการขยายตัวของเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) เกิดการสะสมของ mucopolysaccharides รวมทั้งมีการเรียงตัวของเส้นใยอีลาสติก (elastic fiber) อย่างกระจัดกระจาย ส่งผลให้ความหนาของชั้น intima เพิ่มขึ้น (Hollander *et al.*, 1974) เมื่อเปรียบเทียบความหนาของชั้น intima ในหลอดเลือดแดงกระต่ายทุกกลุ่ม เมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า กระต่ายซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมอยู่ด้วย มีความหนาของชั้น intima มากกว่าของทั้งกระต่ายที่ได้รับอาหารปกติ และที่ได้อาหารปกติเสริมด้วยสารสกัด อย่างชัดเจน โดย กลุ่ม IV ซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมอยู่กับสารสกัดในปริมาณ 0.01% มีความหนาของชั้น intima เท่ากับ 0.075 ± 0.01 มิลลิเมตร ในขณะที่กลุ่ม III กลุ่ม V และกลุ่ม VI มีความหนาเท่ากับ 0.151 ± 0.08, 0.677 ± 0.09 และ 0.39 ± 0.19 มิลลิเมตร ตามลำดับ (รูปที่ 15)



รูปที่ 15 กราฟแสดงความหนาเฉลี่ยของชั้น intima และ ชั้น media (A) และกราฟอัตราส่วนระหว่างความหนาของชั้น intima และชั้น media (B) ของหลอดเลือดแดงบริเวณ aortic arch ในกระต่ายแต่ละกลุ่ม

[หมายเหตุ – ผลที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ย ($\overline{X} \pm$ S.D.) ที่ได้จาก N = 4]

*$p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม VI

I Control

II 0.02% *G. dulcis* Extract

III Cholesterol+0.005% *G. dulcis* Extract

IV Cholesterol+0.01% *G. dulcis* Extract

V Cholesterol+0.02% *G. dulcis* Extract

VI Cholesterol

นอกจากนี้ ค่าอัตราส่วนระหว่างความหนาของชั้น intima กับชั้น media ยังสามารถบ่งชี้ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้ เนื่องจากอัตราส่วนดังกล่าวของหลอดเลือดแดงกระต่ายปกติมีค่าอยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 (Romero *et al.*, 2000) ซึ่งจะเพิ่มขึ้น เมื่อเริ่มปรากฏปื้นไขมัน (Behr *et al.*, 1999) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า อัตราส่วนเฉลี่ยของกระต่ายที่ได้รับอาหารปกติ (กลุ่ม I) และที่ได้รับอาหารเสริมด้วยสารสกัด (กลุ่ม II) มีค่าเท่ากับ 0.081 ± 0.04 และ 0.080 ± 0.02 ตามลำดับ ในขณะที่ กระต่ายซึ่งได้รับอาหารผสมคอเลสเทอรอลเพียงอย่างเดียว มีค่าเท่ากับ 3.669 ± 0.99 และกระต่ายที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมกับสารสกัดในปริมาณ 0.02% มีค่าเท่ากับ 3.645 ± 0.40 ส่วนกระต่ายที่ได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมกับสารสกัดในปริมาณ 0.005% และ 0.01% มีค่าอัตราส่วนเฉลี่ยของชั้น intima กับ media ลดลงเป็น 0.692 ± 0.50 และ 0.277 ± 0.10 ตามลำดับ

ผลการทดลองทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า สารสกัดของใบมะพูดมีความสามารถชะลอการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งในกระต่ายที่ได้รับคอเลสเทอรอลปริมาณสูงได้ดี แต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสกัดที่ได้รับ เนื่องจาก กระต่ายที่กินอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัดในปริมาณ 0.005% และ 0.01% เป็นระยะเวลา 4 เดือน มีระดับของไตรกลีเซอไรด์ คอเลสเทอรอล ส่วนระดับ MDA ในกระแสเลือด ต่ำที่สุดในกระต่ายที่กินอาหารผสมคอเลสเทอรอลกับสารสกัดในปริมาณ 0.01% เมื่อเทียบกับกระต่ายที่ได้รับคอเลสเทอรอลเพียงอย่างเดียว ส่วนผลจากการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ plaque ที่เกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของผนังหลอดเลือดแดง รวมทั้งลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยา และค่าอัตราส่วนความหนาชั้น intima และชั้น media ของหลอดเลือดแดง แสดงให้เห็นว่า การผสมสารสกัดปริมาณ 0.01% ลงในอาหารกระต่ายที่มีคอเลสเทอรอลสูง ทำให้กระต่ายเหล่านี้มีโอกาสเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งน้อยกว่ากระต่ายกลุ่มอื่นอย่างชัดเจน ในขณะที่กระต่ายซึ่งได้รับอาหารที่มีคอเลสเทอรอลผสมกับสารสกัดในปริมาณที่สูงกว่า (0.02%) กลับมีบริเวณสะสมของไขมัน และ atherosclerotic plaque กระจายครอบคลุมผนังหลอดเลือดมากกว่ากลุ่มที่ได้รับคอเลสเทอรอลอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า สารสกัดในปริมาณดังกล่าว ไม่สามารถชะลอภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้ แต่กลับเป็นปัจจัยที่จะส่งเสริมให้เกิดภาวะดังกล่าวได้ดียิ่งขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสมบัติโปรออกซิแดนท์ นั่นเอง

อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากความสามารถต้านออกซิเดชัน และลดปริมาณของไขมันในกระแสเลือด ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเกิด atherosclerotic plaque แล้ว สารสกัดดังกล่าวอาจมี กลไกอื่น ๆ ที่ช่วยชะลอการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้ เช่น ยับยั้งการทำลายเยื่อบุผนังหลอดเลือด ยับยั้งการกระตุ้นเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือด เป็นต้น (Beretz and Cazenave, 1988 อ้างโดย Koshy *et al.*, 2001) ความสามารถเหล่านี้ของสารสกัดจากใบมะพูดจึงเป็นสิ่งที่ควรศึกษาต่อไป