สารสกัดน้ำเบญจกูลมีผลต่อการแก่ของเซลล์ตับในหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง

เกวลิน วงศ์โถง[1], ณรงค์ศักดิ์ มั่นคง[2], อชิรญา คำจันทร์ศุภสิน[3], อัฐพันธ์ หมอช้าง[4*]

[1]สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร
[2]ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา
[3]สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม
[4]หน่วยวิจัยมะเร็งและภูมิคุ้มกันวิทยา สำนักวิชาแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เชียงราย
[*]Corresponding author email: atthapan.mor@mfu.ac.th

ได้รับบทความ: 21 มิถุนายน 2566
ได้รับบทความแก้ไข: 25 กรกฎาคม 2566
ยอมรับตีพิมพ์: 25 สิงหาคม 2566

บทคัดย่อ

สารสกัดน้ำเบญจกูลเป็นยาปรับธาตุที่ใช้ในการรักษาแบบพื้นบ้านในประเทศไทย เพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับผลและกลไกของสารสกัดน้ำของเบญจกูลต่อตับ การศึกษาในครั้งนี้มุ่งหวังให้ความเข้มของเอนไซม์ Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) ในเซลล์ตับเป็นตัวชี้วัดในการศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดน้ำของเบญจกูล โดยใช้วิธีการทดสอบอิมมูโนฮิสโตเคมีศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley จำนวน 18 ตัว ที่แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว เมื่อเลี้ยงหนูจนครบ 4 สัปดาห์ จึงทำการทดสอบน้ำหนักตัวหนู ระดับน้ำตาลในเลือดหนูและอิมมูโนฮิสโตเคมีของ SA-β-gal ของตับหนู ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติพบว่าหนูทุกกลุ่มมีน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลในเลือดและการติดสีของ SA-β-gal ของตับหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำและหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูงมีการติดสีของ SA-β-gal ลดลงแต่หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลูและหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin มีการติดสี

ของ SA-β-gal เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลสามารถป้องกันกระบวนการแก่ของเซลล์ตับในสภาวะที่เกี่ยวข้องกับการได้รับอาหารไขมันสูงได้

คำสำคัญ: สารสกัดน้ำของเบญจกูล / ภาวะอ้วนลงพุง / ความชรา / เอนไซม์เบต้ากาแลกโตสิเดส

Benjakul Water Extract Affects Liver Cell Aging in Obese Rats with High-fat Diet

Kevalin Voungthoung[1], Narongsuk Munkong[2], Achiraya Kamchansuppasin [3]
Atthapan Morchang[4*]

[1]Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology,
Bansomdejchaopraya Rajabhat University, Bangkok
[2]Department of Pathology, School of Medicine,
University of Phayao, Phayao
[3]Institute of Nutrition, Mahidol University, Nakhon Pathom
[4]Cancer and Immunology Research Unit, School of Medicine,
Mae Fah Luang University, Chiang Rai
[*]Corresponding author email: atthapan.mor@mfu.ac.th

Received: 21 June 2023
Revised: 25 July 2023
Accepted: 25 August 2023

Abstract

The Benjakul water extract (BWE) is a traditional remedy in Thailand utilized for managing blood sugar levels. However, there has been limited research into the effects and mechanisms of BWE on the liver. This study aimed to evaluate the anti-aging properties of BWE by assessing the activity of the Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) enzyme in the liver cells of obese rats subjected to a high-fat diet. The study involved 18 male Sprague-Dawley rats, divided into 6 groups of 3 rats each. Following a 4-week period of high-fat diet consumption, the rats' body weight, blood sugar levels, and SA-β-gal immunohistochemistry in the liver were evaluated. Comparing the results with the control group (rats on a normal diet), all rat groups exhibited increased body weight, blood sugar levels, and SA-β-gal staining in the liver, indicating statistical significance. Among the groups fed a high-fat diet,

those supplemented with low-dose BWE and high-dose BWE showed reduced SA-β-gal staining. In contrast, the group receiving a high-fat diet along with wild betal leaf bush water extract, and the group receiving a high-fat diet along with Metformin, exhibited increased SA-β-gal staining. Moreover, wild betal leaf bush water extract and Metformin were found to accelerate cellular aging in the liver cells of obese rats receiving a high-fat diet. Conclusion, both low and high doses of BWE demonstrated potential in mitigating liver cell aging in obese rats subjected to a high-fat diet. Furthermore, wild betal leaf bush water extract and Metformin were observed to expedite liver cell aging, suggesting that BWE might possess protective properties against the aging process in liver cells under conditions associated with high levels of dietary fat.

Keywords: Benjakul water extract / metabolic syndrome / aging / Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal)

บทนำ

ประเทศไทยเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (Aged Society) ในปี พ.ศ. 2565 กระทรวงสาธารณสุขดูแลสุขภาพผู้สูงอายุด้วยแผนปฏิบัติราชการเน้นรักษา ส่งเสริมสุขภาพ ป้องกันและฟื้นฟูสุขภาพ รวมถึงการดำเนินแผนเชิงรุกและเชิงรับ [1] ปัจจัยเสี่ยงต่างๆ ที่เป็นสาเหตุให้เกิดกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Noncommunicable diseases) ที่ส่งผลให้เกิดโรคอ้วน โรคไขมันในตับที่ไม่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ เบาหวาน และโรคหัวใจ [2] สาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอ้วนและภาวะแทรกซ้อน คือ การบริโภคอาหารที่มีพลังงานสูง ทำให้เซลล์ไขมันขยายตัว หลั่ง Adipokine เช่น MCP-1, TNF-α, IL-6 ทำให้เกิดการอักเสบและดื้อต่ออินซูลิน พร้อมกับการหลั่งกรดไขมันอิสระเข้าสู่กระแสเลือด เสี่ยงต่อความผิดปกติในอวัยวะต่างๆ เช่น ตับและตับอ่อน ส่งผลให้เกิดภาวะอักเสบและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) [3]

โรคอ้วนเป็นปัญหาร้ายแรงที่พบมากที่สุดในโลก ทำให้เกิดการสะสมไขมันมากเกินไป ส่งผลกระทบต่อสุขภาพร่างกาย เกิดสภาวะชราในเซลล์ (Cellular aging) และปัญหาสุขภาพเพิ่มขึ้น และอายุสั้นลง [4]

ความชราเกิดเมื่อมนุษย์เข้าสู่วัยชราทำให้อวัยวะและเนื้อเยื่อสูญเสียประสิทธิภาพ ลดการทำงานและไม่สามารถต้าน Oxidative stress ภายในเซลล์และซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์ได้ [5]

ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชันเกิดจากอนุมูลอิสระที่ทำลายสารชีวโมเลกุลภายในร่างกาย [6] ทำให้เซลล์ทำหน้าที่ผิดปกติและเสี่ยงต่อการตาย [7] ภาวะเครียดสามารถเกิดได้ในทุกเซลล์ของร่างกาย ถ้าเกิดต่อเนื่องนานทำให้เกิดการแก่ของเซลล์ (Senescence) และส่งผลให้เกิดความผิดปกติหรือเกิดโรค [8] ความชราระดับเซลล์เป็นกระบวนการที่เพิ่มความเสี่ยงทำให้เกิดโรคต่าง ๆ และในทางกลับกันก็ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ [9]

การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้สรุปว่าปัจจัยที่มีผลต่อความชราในระดับเซลล์เกิดจากกระบวนการต่างๆ ได้แก่ ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ที่สะสมขึ้นเรื่อยๆ ทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวและเข้าสู่ภาวะเซลล์ชรา นักวิจัย Lopez-Otín ได้แสดงถึงแนวความคิดเกี่ยวกับ "Hallmarks of aging" ซึ่งรวมองค์ความรู้เกี่ยวกับปัจจัยต่างๆ ที่ส่งผลให้เกิดภาวะชราซึ่งมีทั้งสาเหตุหลักและผลที่ตามมาที่ทำให้เกิดภาวะชราขึ้น [10]

เอนไซม์เบต้ากาแลกโตสิเดสหรือ Senescence-associated beta-galactosidase (SA-β-gal) เป็นสารที่พบในเซลล์ชรา และมีความจำเพาะที่ภาวะค่า pH 6 ซึ่งเพิ่มขึ้นตามอายุของเซลล์ การตรวจวัด SA-β-gal ช่วยในการจำแนกและตรวจวัดเซลล์ชรา [11, 12]

การสะสมไขมันในตับเป็นจุดเริ่มต้นสำคัญที่มีผลต่อการทำงานของเมแทบอลิซึม [13] ตับมีบทบาทสำคัญในควบคุมสมดุลของไขมันและกลูโคสในร่างกาย การสะสมไขมันมากในตับอาจเป็นสาเหตุของโรคไขมันพอกตับและมีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน การสะสมไขมันและกลูโคสสูงสามารถทำให้เนื้อเยื่อต่างๆ เกิดพยาธิสภาพได้ และเกิดการสร้างสารที่กระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระและต้นตอของการอักเสบในตับ [14, 15] ภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระที่มีมากเกินไปสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งทำให้เกิดการสะสมสารต่างๆ และพังผืดในตับ [16, 17] การเกิดความผิดปกติที่เกิดขึ้นในตับสามารถทำให้เกิดการอักเสบและสามารถพัฒนาเป็นภาวะไขมันคั่งสะสมในตับที่ไม่ได้เกิดจากการดื่มสุรา (Non-alcoholic steatohepatitis) และตับแข็ง (Cirrhosis) [18] การแก่ของเซลล์มีบทบาทในการจำกัดความเสียหายของเซลล์และทำให้เซลล์ที่เหลืออยู่ยังคงสามารถทำงานได้ตามปกติ [19]

สารสกัดเบญจกูลเป็นตำรับยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ปรับสมดุลของร่างกายและมีสรรพคุณในการบำรุงธาตุทั้ง 4 ตัว [20] ตำรับเบญจกูลประกอบด้วยช้าพลู ดีปลี สะค้าน เจตมูลเพลิงแดง และขิงแห้ง การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเบญจกูลช่วยลดระดับไขมัน โคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และลดการแสดงออกของ NF-**K**B p65 ในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง [21, 22] การศึกษาผลของสารสกัดน้ำเบญจกูลในตับอ่อนของหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงพบว่าช่วยลดความเข้มของการติดสีของ SA-β-gal และลดปริมาณ Malondialdehyde (MDA) ในตับอ่อน [23] อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดเบญจกูลในตับ การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดเบญจกูลต่อการยับยั้งความแก่ของเซลล์ตับ ซึ่งส่งผลให้ลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์

งานวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดเบญจกูลด้วยการทดสอบอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อวัดความเข้มของการติดสีของเอนไซม์ SA-β-gal ในเซลล์ตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง

วัสดุและวิธีการ

1. การสกัดน้ำของเบญจกูล นำพืช 5 ชนิด ซึ่งมีอัตราส่วนดังนี้ *Piper retrofractum* Vahl. (fruit): ดอกดีปลี 2 ส่วน *Piper sarmentosum* Roxb. (root): ราก ช้าพลู 16 ส่วน *Piper interruptum* Opiz. (stem): เถาสะค้าน 8 ส่วน *Plumbago indica* Linn. (root): รากเจตมูลเพลิง 6 ส่วน *Zingiber mekongens* Gagnep. (rhizome): เหง้าขิงแห้ง 4 ส่วน [24] นำเข้าอบที่อุณหภูมิ 55 °C จนแห้ง นำไปบด นำไปต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 °C สัดส่วน น้ำ : พืช = 2 : 1 จนกระทั่งเหลือน้ำ 1 ส่วน ทำการกรองและทำ

ให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer ได้ % Yield คือ 6.6 % yield จากนั้นทำให้แห้งที่อุณหภูมิ -20 °C แล้วนำไป Feeding ให้หนู

2 การเลี้ยงหนู เลี้ยงหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague – Dawley จำนวน 18 ตัว โดยจะเลี้ยงหนู 4 สัปดาห์ ให้อาหารหนูปกติ 1 สัปดาห์ แล้วแบ่งหนูเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) 3 ตัว [25] กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลู 3 ตัว กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin 3 ตัว ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองให้ดำเนินการวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณและติดตามผลโครงการวิจัยการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ AE001/2015

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของอาหารที่มีไขมันสูงซึ่งประเมินโดยโปรแกรมการสำรวจโภชนาการของกองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข

วัตถุดิบ	**ปริมาณ (g)**	**คาร์โบไฮเดรต (g)**	**โปรตีน (g)**	**ไขมัน (g)**	**พลังงาน (kcal)**
น้ำตาล	58	57.7	-	-	223.5
อาหารหนูปกติ	100	41.8	24	4.5	304
แป้งสาลี	150	114.5	15.5	1.5	546.5
ตับหมู	100	2.4	19.9	4	126
ไข่ขาว	33	-	3.3	0.4	16.8
หมูสามชั้น	100	2.8	13.9	33.5	368.1
เนยเทียม	200	-	0.8	172.6	1,558.8
ไข่แดง	200	4	28.6	60.2	672.1
รวมทั้งหมด	**941**	**223.2**	**106**	**276.7**	**3,816**

2.1 การวัดน้ำหนักตัวหนูน้ำหนักตัวของหนูถูกบันทึกไว้ทุกวันตลอดระยะเวลาการศึกษา การคำนวณน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวเริ่มต้นและน้ำหนักตัวสุดท้ายของหนูแต่ละตัวแสดงด้วยน้ำหนักตัวในวันแรกและวันสุดท้ายก่อนฆ่าหนูตามลำดับ น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นต่อหนูแต่ละตัวคำนวณดังนี้

น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (g) = น้ำหนักตัวสุดท้าย (g) - น้ำหนักตัวเริ่มต้น (g)

2.2 การเตรียมและการเก็บตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการวิจัย สัตว์จะถูกทำให้สลบและฆ่าด้วยการฉีด Sodium pentobarbital (Nembutal) ปริมาณสูง (150 มก./กก.) เข้าทางช่องท้อง หลังจากอดอาหารข้ามคืนประมาณ 16 ชั่วโมง [26] หนูถูกผ่าตัดตามยาวจากด้านบนของทรวงอกถึงบริเวณอุ้งเชิงกรานเพื่อเผยให้เห็นอวัยวะภายใน ภายใต้สภาวะปลอดเชื้ออย่างระมัดระวัง ตับจะถูกนำมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น (4 °C) หรือน้ำเกลือปกติ และค่อยๆ ทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่ปนเปื้อน การผ่าจะดำเนินการอย่างรวดเร็วที่สุด หลังจากการผ่าตับจะถูก Fix ในฟอร์มาลิน 10 % และเนื้อเยื่อจะถูกเก็บไว้ทำการวิเคราะห์ทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

2.3 การตรวจหาระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (Fasting blood glucose, FBG) เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงหนูในสัปดาห์ที่ 4 หนูจะอดอาหารข้ามคืน (16 ชั่วโมง) ชั่งน้ำหนักและตัดปลายหางเพื่อหาระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด ACCU-CHEK performa (Roche Diagnostics, Zurich, Switzerland) หลักการคือ เอนไซม์ในแถบทดสอบ Accu-Check Performa ที่มีชื่อว่า Mut. Q-GDH ในเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน โดยเปลี่ยนกลูโคสในตัวอย่างเลือดเป็น Gluconolactone และวัดสัญญาณกระแสไฟฟ้ารายงานเป็นระดับน้ำตาลในเลือด

3. การย้อม SA-β-gal ด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมี [27] อบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนเริ่มการตรวจอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา SA-β-gal ในชิ้นเนื้อ Deparaffinize เพื่อเอา Paraffin ที่เคลือบบนสไลด์ออกโดยการแช่สไลด์ใน Coplin jar ตามขั้นตอนต่อไปนี้ 1) ไซลีน: 5 นาที 2) 100% เอทานอล: 3 นาที 3) 95% เอทานอล: 3 นาที 4) 90% เอทานอล: 3 นาที 5) 80% เอทานอล: 3 นาที 6) 70% เอทานอล: 3 นาที ขั้นตอน Rehydrate ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวงรอบชิ้นเนื้อด้วยปากกา PAPPen และจากขั้นตอนนี้ให้ทำในกล่องชื้นที่มืด ขั้นตอน Antigen retrieval ด้วยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (200 µl/ชิ้นเนื้อ) Incubate สไลด์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที ล้างสไลด์ในน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) 5 นาที ชะล้าง (Quenching) เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสภายในเซลล์โดยการ Incubate 37 °C ด้วย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเมทานอล (200 µl/ชิ้นเนื้อ) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง จากนั้นล้างใน 1 x PBST 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนการ Blocking background ที่เกิดจาก Non-specific binding โดยการ Incubate ชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ด้วย 5% BSA ใน 1x PBST (200 µl/ชิ้นเนื้อ) ห้ามล้าง Serum ออกหลัง Incubate เติม Primary antibody (200 µl/ชิ้นเนื้อ) และ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60

นาที ล้างด้วย 1x PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติม Secondary antibody (200 µl/ชิ้นเนื้อ) และ Incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย 1x PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจจับสีด้วยสารละลาย 0.05% DAB + 0.06% H_2O_2 (200 µl/ชิ้นเนื้อ) เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาการย้อมสีด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) Counterstain ด้วย Hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) Dehydrate โดยการแช่สไลด์ใน Coplin jar ตามขั้นตอนต่อไปนี้ 1) 95% เอทานอล: 3 นาที 2) 100% เอทานอล: 3 นาที 3) ไซลีน: 5 นาที 4) ไซลีน: 5 นาที 5) ไซลีน: 5 นาที เมื่อชิ้นเนื้อแห้งแล้วใส่ Mounting media แล้วปิดด้วย Coverslip ปฏิกิริยา DAB นั้นจะถาวรและเสถียรจึงสามารถวิเคราะห์ได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

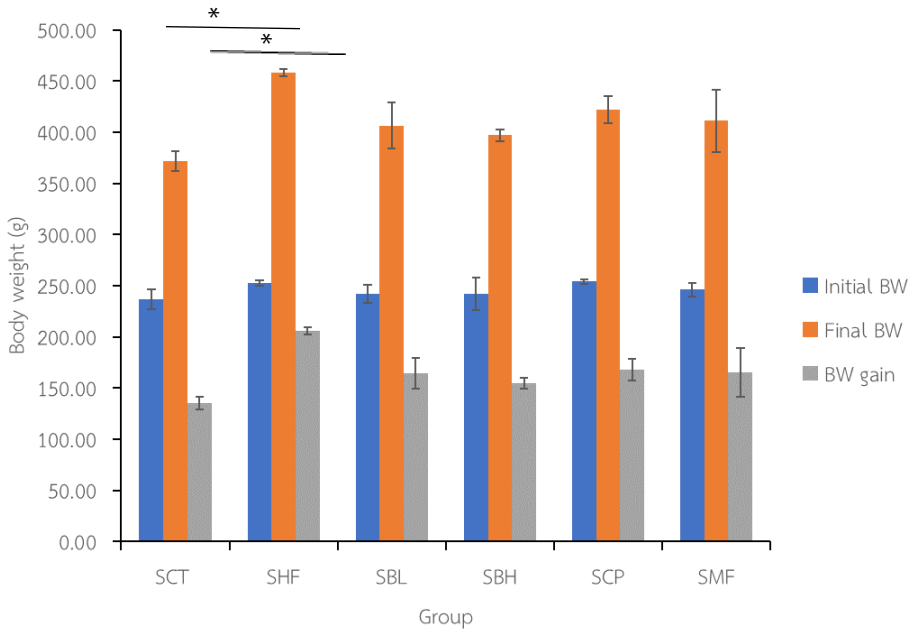
4. การวัดการติดสี SA-β-gal ด้วยโปรแกรม ZEN 2 lite เปิดโปรแกรม ZEN 2 lite ปรับ Scaling ไปที่ 100X@ERc5 ปรับ Display histogram โดยกำหนดค่า Black 62 ค่า White 255 ปรับ Exposure time ให้อยู่ที่ 24.00 ms แล้ววางสไลด์ที่แท่นวางสไลด์และปรับเลนส์กล้องจุลทรรศน์ยี่ห้อ Zeiss ไปที่ 100X คลิก Live เพื่อดู Section slide และปรับ Fine focus knob ของกล้องจุลทรรศน์เพื่อเลือกจุดที่ต้องการ Analyse เมื่อได้จุดที่ต้องการ Analyse แล้ว ให้คลิก Snap ภาพ แล้วคลิก Scale bar คลิกที่ Graphics เลือกรูปทรงวงกลม (Circle (diameter)) และวงไปที่ Nucleus ของเซลล์ที่ต้องการ Analyse จำนวน 20 เซลล์ จากนั้นดูค่าที่ Analyse เสร็จแล้วกดที่ Burn in annotation จากนั้นคลิก Measures และคลิกที่ Create documents จะได้ค่า Intensity ออกมา Copy ค่า Intensity ที่ได้ไปใส่ใน Microsoft Excel จากนั้น คำนวณหาค่า Reciprocal intensity จากสูตรของ Devid Nguyen คือ Reciprocal intensity (r) = 250 – Intensity (y) คำนวณหาค่าผลรวมและค่าเฉลี่ยเลขคณิตของค่า Reciprocal intensity ด้วยโปรแกรม Microsoft Excel จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของค่า Reciprocal intensity ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยโปรแกรม SPSS

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ วิเคราะห์ความเข้มข้นของการติดสีเฉลี่ยของ SA-β-gal ในตับโดยใช้โปรแกรม ZEN 2 lite ผลลัพธ์แสดงเป็นค่าเฉลี่ยเลขคณิตบวกหรือลบความกระเจิงของค่าเฉลี่ย (Standard error of the mean: SEM) ตรวจสอบการแจกแจงว่าเป็นแบบปกติ (Normal distribution) หรือไม่โดยการใช้สถิติของโคลโมโกรอฟ-สมินอฟ (Kolmogorov-Smirnov) โดยใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way ANOVA) โดยวิธี Tukey (One-way ANOVA) โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 23 ค่า P-value น้อยกว่า 0.05 ($P < 0.05$) ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการศึกษา

1. ผลการวัดน้ำหนักตัวหนู

หลังจากให้อาหารครบ 4 สัปดาห์ หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว มีน้ำหนักตัวสุดท้าย (Final body weight) เท่ากับ 458.14 ± 6.15 กรัม และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (Body weight gain) เท่ากับ 205.54 ± 5.91 กรัม สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Final body weight เท่ากับ 371.56 ± 15.21 กรัมและมีค่า Body weight gain เท่ากับ 134.99 ± 10.33 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 1

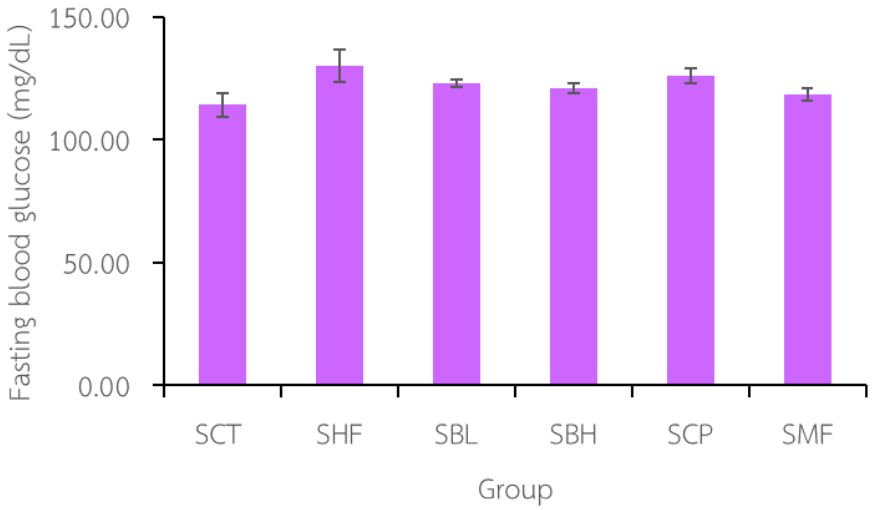


SCT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ
SHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
SBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SBH = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SCP = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลู
SMF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin

ภาพที่ 1 แสดงน้ำหนักหนูเริ่มต้น (Initial body weight) น้ำหนักตัวหนูสุดท้าย (Final body weight) และน้ำหนักตัวหนูที่เพิ่มขึ้น (Body weight gain) ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM ของหนู 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA)

2. ผลการตรวจหาระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (Fasting blood glucose, FBG)

หลังจากให้อาหารครบ 4 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติมีค่า FBG เท่ากับ 114.00 ± 4.58 mg/dL หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียวมีค่า FBG เท่ากับ 130 ± 6.77 mg/dL หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีค่า FBG เท่ากับ 122.67 ± 1.53 mg/dL หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีค่า FBG เท่ากับ 120.67 ± 2.03 mg/dL หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลูมีค่า FBG เท่ากับ 126.00 ± 3.18 mg/dL และหนูได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin มีค่า FBG เท่ากับ 118.33 ± 2.33 mg/dL ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังที่แสดงไว้ในภาพที่ 2



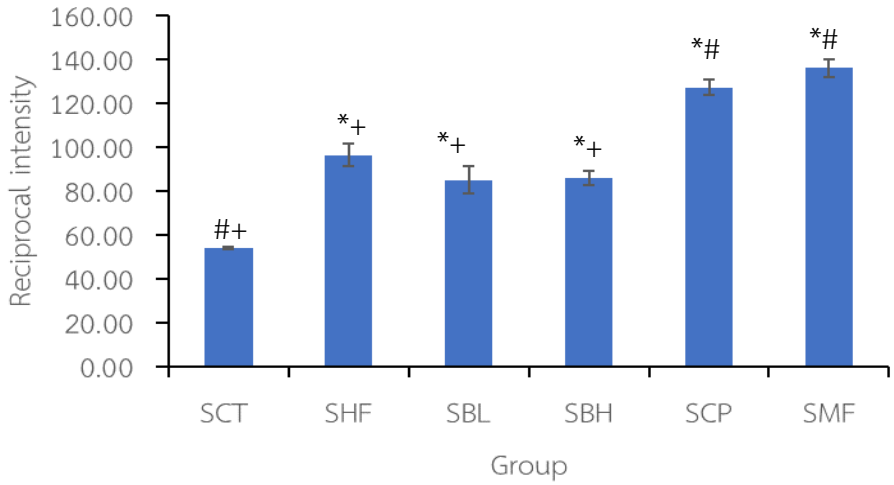
SCT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ
SHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
SBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SBH = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SCP = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลู
SMF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin

ภาพที่ 2 ผลน้ำตาลในเลือด (Fasting blood glucose) ของหนู ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM ของหนู 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA)

3. ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดเบญจกูลในตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง

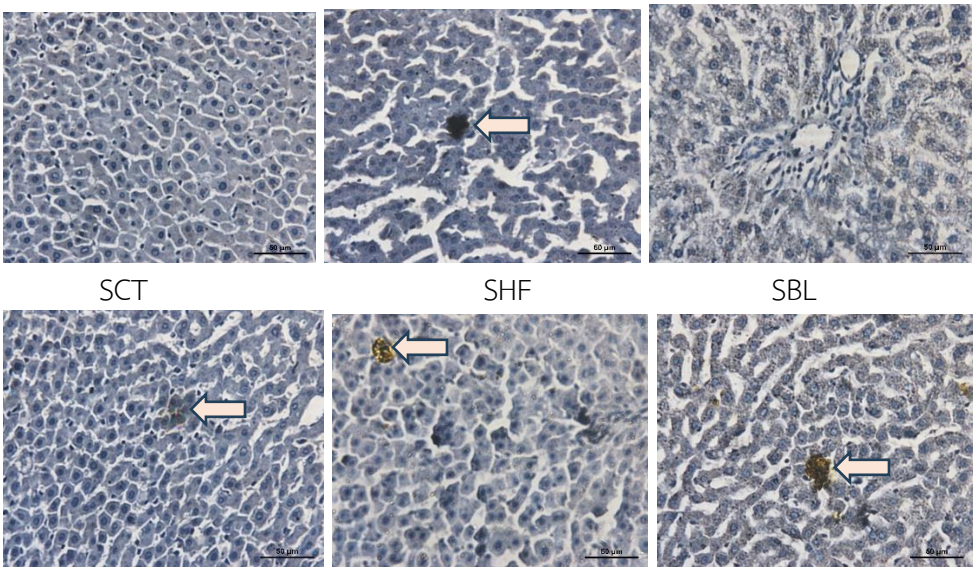
การศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดเบญจกูลในตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง โดยทำการศึกษาตับของหนูขาวเพศผู้สายพันธ์ Sprague-Dawley จำนวน 18 ตัว ที่แบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ได้แก่ 1. กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติมีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 $\pm$ 1.19 พบว่ามีค่าน้อยกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 2. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงพบว่ามีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 96.42 $\pm$ 10.15 มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 $\pm$ 1.19 มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของข้าพลูที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 127.12 $\pm$ 8.41 และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 136.12 $\pm$ 9.82 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 3. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 84.94 $\pm$ 13.79 พบว่ามากกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 $\pm$ 1.19 แต่น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของข้าพลูที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 127.12 $\pm$ 8.41 และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 136.12 $\pm$ 9.82 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 4. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 86.10 $\pm$ 6.51 พบว่ามีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 $\pm$ 1.19 แต่มีค่าน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของข้าพลูที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 127.12 $\pm$ 8.41 และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 136.12 $\pm$ 9.82 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 5. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของข้าพลูมีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 127.12 $\pm$ 8.41 พบว่ามีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 $\pm$ 1.19 กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 96.42 $\pm$ 10.15 กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 84.94 $\pm$ 13.79 และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) ที่มีค่า

Reciprocal intensity เท่ากับ 86.10 ± 6.51 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) 6. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 136.12 ± 9.82 พบว่ามีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 54.10 ± 1.19 กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 96.42 ± 10.15 กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 84.94 ± 13.79 และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) ที่มีค่า Reciprocal intensity เท่ากับ 86.10 ± 6.51 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 3 และภาพที่ 4



* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCT
# แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SHF, SBL และ SBH
+ แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SCP และ SMF
SCT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ
SHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
SBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SBH = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SCP = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลู
SMF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin

ภาพที่ 3 ความเข้มของการย้อม SA-β-gal ในเซลล์ตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ค่าที่แสดงคือ ค่า mean ± SEM (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA)



SCT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ
SHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง
SBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SBH = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูง (413 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)
SCP = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของช้าพลู
SMF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับยา Metformin

ภาพที่ 4 ภาพการติดสี SA-β-gal ในเซลล์ตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง 6 กลุ่ม กลุ่มละ 3 ตัว ลูกศรชี้ระบุจุดการติดสี SA-β-gal ในภาพ ถ่ายรูปเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด light microscope (Primo Star Carl Zeiss) กำลังขยาย 400 เท่า scale bar = 50 micrometer

วิจารณ์

โรคอ้วน ไขมันในเลือดสูง ความดัน ความทนทานต่อกลูโคสผิดปกติและความต้านทานต่ออินซูลินผิดปกติคือกลุ่มอาการเมตาบอลิซึม หนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงสามารถพัฒนากลุ่มอาการเหล่านี้ได้ [28] เบญจกูลได้รับการยอมรับในทางการแพทย์อายุรเวชว่าสามารถใช้เพื่อควบคุมสภาวะสมดุลของร่างกายได้ [29] นอกจากนี้การศึกษาของเกวลินและคณะเมื่อปี 2559 ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลสามารถลดการชราภาพของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงได้ [23] การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดน้ำของเบญจกูลในตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง เราตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลอาจจะลด SA-β-gal ในเซลล์ตับของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมัน

สูง ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีน้ำหนักตัวสูงขึ้นสอดคล้องกับผลการวิจัยของณรงค์ศักดิ์และคณะ [30] และอชิรญาและคณะ [31] และพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ สิ่งที่น่าสนใจคือพบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำและหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดสูงมีแนวโน้มที่จะช่วยลด SA-β-gal ในตับเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดน้ำของเบญจกูลทั้งขนาดต่ำและขนาดสูงมีแนวโน้มที่จะทำให้ตับแก่น้อยลงซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของเกวลินและคณะเมื่อปี 2559 ที่รายงานไว้ว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำและขนาดสูงสามารถลดความหนาแน่นของการติดสีของ SA-β-gal ในเซลล์ไอซ์เลตของตับอ่อนได้ [23]

สรุป

การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลทั้งขนาดต่ำและขนาดสูงไม่ได้ช่วยลดน้ำหนักและลดระดับน้ำตาลในเลือดแต่มีแนวโน้มที่จะช่วยลดการชราภาพของตับในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง ในขณะที่สารสกัดน้ำของช้าพลูและยา Metformin ทำให้ตับแก่กว่าเดิม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเบญจกูลในการต้านการชราในอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด ไต หลอดเลือดและหัวใจ เป็นต้น เพื่อดูว่าสารสกัดน้ำเบญจกูลมีฤทธิ์ต้านการชราในเซลล์เหล่านี้ด้วยหรือไม่

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ผู้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททุนภายใน เพื่อสนับสนุนงานวิจัยนี้ ขอขอบคุณนักศึกษาสาขาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ได้แก่ นางสาวนัยนา ชูเลิศ และนางสาวญาณิศา อินอ่อน ที่ได้ร่วมปฏิบัติงานวิจัยจนสำเร็จ

เอกสารอ้างอิง

1. Adil SO, Islam MA, Musa KI, Shafique K. Prevalence of Metabolic Syndrome among Apparently Healthy Adult Population in Pakistan: A Systematic Review and Meta-Analysis. Healthcare 2023;11(4):531.
2. Malnick SDH, Alin P, Somin M, Neuman MG. Fatty Liver Disease-Alcoholic and Non-Alcoholic: Similar but Different. Int J Mol Sci 2022;23(24):16226.

3. Ciesielska K, Gajewska M. Fatty Acids as Potent Modulators of Autophagy Activity in White Adipose Tissue. Biomolecules 2023;13(2):255.
4. Valenti MT, Pietrobelli A, Romanelli MG, Franzolin E, Malerba G, Zipeto D, et al. Molecular and Lifestyle Factors Modulating Obesity Disease. Biomedicines 2020;8(3):46.
5. Bürkle A, Moreno-Villanueva M, Bernhard J, Blasco M, Zondag G, Hoeijmakers JH et al. MARK-AGE biomarkers of ageing. Mech Ageing Dev 2015;151:2-12.
6. Tejchman K, Kotfis K, Sieńko J. Biomarkers and Mechanisms of Oxidative Stress—Last 20 Years of Research with an Emphasis on Kidney Damage and Renal Transplantation. Int J Mol Sci 2021;22(15):8010.
7. Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. Pathophysiology 2000 ;7(3):153-63.
8. Bhatt HB, Smith RJ. Fatty liver disease in diabetes mellitus. Hepatobiliary Surg Nutr 2015 ;4(2):101-8.
9. Hayflick L, Moorhead PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. Exp Cell Res 1961;25:585-621.
10. López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. Cell 2013;153(6):1194-217.
11. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, Roskelley C, Medrano EE, Linskens M, Rubelj I, Pereira-Smith O, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. Proc Natl Acad Sci U S A 1995;92(20):9363-7.
12. Valieva Y, Ivanova E, Fayzullin A, Kurkov A, Igrunkova A. Senescence-associated β-gal detection in pathology. Diagnostics (Basel) 2022;12(10) :2309.
13. Muoio DM, Newgard CB. Obesity-related derangements in metabolic regulation. Annu Rev Biochem 2006;75:367-401.
14. Ipsen DH, Lykkesfeldt J, Tveden-Nyborg P. Molecular mechanisms of hepatic lipid accumulation in non-alcoholic fatty liver disease. Cell Mol Life Sci 2018;75(18):3313-27.

15. Fabbrini E, Mohammed BS, Magkos F, Korenblat KM, Patterson BW, Klein S. Alterations in adipose tissue and hepatic lipid kinetics in obese men and women with nonalcoholic fatty liver disease. Gastroenterology 2008; 134(2):424-31.
16. Conde de la Rosa L, Goicoechea L, Torres S, Garcia-Ruiz C, Fernandez-Checa JC. Role of Oxidative Stress in Liver Disorders. Livers [Internet] 2022;2(4):283–314.
17. Zelber-Sagi S, Ivancovsky-Wajcman D, Fliss-Isakov N, Hahn M, Webb M, Shibolet O, Kariv R, Tirosh O. Serum Malondialdehyde is Associated with Non-Alcoholic Fatty Liver and Related Liver Damage Differentially in Men and Women. Antioxidants (Basel) 2020;9(7):578.
18. Keshavjee B, Lambelet V, Coppola H, Viertl D, Prior JO, Kappeler L, et al. Stress-Induced Premature Senescence Related to Oxidative Stress in the Developmental Programming of Nonalcoholic Fatty Liver Disease in a Rat Model of Intrauterine Growth Restriction. Antioxidants 2022;11(9):1695.
19. Campisi J, d'Adda di Fagagna F. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8(9):729-40.
20. Itharat A, Sakpakdeejaroen I. Determination of cytotoxic compounds of Thai traditional medicine called Benjakul using HPLC. J Med Assoc Thai 2010;93(7):S198-203.
21. Ruangnoo S, Itharat A, Sakpakdeejaroen I, Rattarom R, Tappayutpijam P, Pawa KK. *In vitro cytotoxic activity* of Benjakul herbal preparation and its active compounds against human lung, cervical and liver cancer cells. J Med Assoc Thai 2012;95 Suppl 1:S127-34.
22. Li XH, McGrath KC, Nammi S, Heather AK, Roufogalis BD. Attenuation of liver pro-inflammatory responses by *Zingiber officinale* via inhibition of NF-kappa B activation in high-fat diet-fed rats. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2012;110(3):238-44.
23. Vongthoung K, Kamchansuppasin A, Temrangsee P, Munkong N, Kaendee N, Lerdvuthisopon N. Effects of Benjakul water extract on pancreas in high-fat fed rats. TMJ 2016;16(2):161-75.

24. โสฬสเบญจกูล สมุนไพรดอทคอม [อินเทอร์เน็ต]. กรุงเทพฯ: [สืบค้นเมื่อวันที่ 2 กุมภาพันธ์ 2559]. จาก: https://link.bsru.ac.th/onu.
25. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J 2008;22(3):659-61.
26. Eu CH, Lim WY, Ton SH, bin Abdul Kadir K. Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. Lipids Health Dis 2010 ;9:81.
27. de Mera-Rodríguez JA, Álvarez-Hernán G, Gañán Y, Santos-Almeida A, Martín-Partido G, Rodríguez-León J, Francisco-Morcillo J. Endogenous pH 6.0 β-galactosidase activity is linked to neuronal differentiation in the olfactory epithelium. Cells 2022;11(2):298.
28. Wong SK, Chin KY, Suhaimi FH, Fairus A, Ima-Nirwana S. Animal models of metabolic syndrome: a review. Nutr Metab (Lond) 2016;13:65.
29. Rattarom R, Sakpakdeejaroen I, Hansakul P, Itharat A. Cytotoxic activity against small cell lung cancer cell line and chromatographic fingerprinting of six isolated compounds from the ethanolic extract of Benjakul. J Med Assoc Thai 2014;97(8):S70-5.
30. Munkong N, Lonan P, Mueangchang W, Yadyookai N, Kanjoo V, Yoysungnoen B. Red rice bran extract attenuates adipogenesis and inflammation on white adipose tissues in high-fat diet-Induced Obese Mice. Foods [Internet] 2022;11(13):1865.
31. Kamchansuppasin A, Vongthoung K, Temrangsee P, Munkong N, Lerdvuthisopon N. Benjakul supplementation improves hepatic fat metabolism in high-fat diet-induced obese rats. Trop J Pharm Res 2020 ;19(4):797-803.