

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเบญจกุลต่อการแก่ของเซลล์ตับอ่อนในหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูง
เป็นระยะเวลากลางๆ

The study of the effects of Benjakul water extract on pancreatic cell aging in obese rats
subjected to a high-fat diet over a moderate period

เกวลิน วงศ์โทอง^{1*}, วิรุฬห์ ปุณยหทัยพันธ์², อชิรญา คำจันทร์ศุภสิน³, สุรัสวดี สมณี⁴

¹สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา
กรุงเทพมหานคร

²สถาบันนิติวิทยาศาสตร์ กระทรวงยุติธรรม ปทุมธานี

³สถาบันโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล มหาวิทยาลัยมหิดล นครปฐม

⁴คณะวิทยาศาสตร์การกีฬาและสุขภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

*ผู้รับผิดชอบบทความ: kvongthoung@gmail.com

Kevalin Vongthoung^{1*}, Wirune Punyahathaibhan², Achiraya Kamchansupasin³,
Surasawadee Somnuk⁴

¹Medical Technology Program, Faculty of Science and Technology, Bansomdejchaopraya
Rajabhat University, Bangkok

²Central Institute of Forensic Science Thailand, Justice Ministry of Thailand, Pathum Thani

³Institute of Nutrition, Mahidol University, Nakhon Pathom

⁴Department of Sports and Health Sciences, Faculty of Sport Science, Kasetsart University,
Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom

*Corresponding authors: kvongthoung@gmail.com

บทคัดย่อ

สารสกัดน้ำเบญจกุลเป็นยาปรับธาตุที่ใช้ในการรักษาแบบพื้นบ้านในประเทศไทยเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือด อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเบญจกุลต่อการแก่ของเซลล์ตับอ่อนในหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ การศึกษาในครั้งนี้มุ่งหวังให้ความเข้มของเอนไซม์ senescence-associated beta-galactosidase (sa- β -gal) ในเซลล์ตับอ่อนเป็นตัวชี้วัดในการศึกษาฤทธิ์ด้านชราของสารสกัดน้ำของเบญจกุล โดยใช้วิธีการทดสอบอิมมูโนฮิสโตเคมี ศึกษาในหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley จำนวน 18 ตัว ที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว เมื่อเลี้ยงหนูจนครบ 16 สัปดาห์ จึงทำการทดสอบน้ำหนักตัวหนู ระดับน้ำตาลในเลือดหนูและอิมมูโนฮิสโตเคมีของ sa- β -gal ของตับอ่อนหนู ผลการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมหรือหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกุลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ระดับน้ำตาลในเลือดและการติดสีของ sa- β -gal มีแนวโน้มที่จะลดลง

Received: 26 January 2024

Revised: 29 May 2024

Accepted: 29 June 2024

Online publication date: 15 July 2024

แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลในเลือดและการติดสีของ sa- β -gal ของตับอ่อนมีแนวโน้มที่จะลดลง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีแนวโน้มที่จะช่วยลดน้ำหนัก แต่ไม่สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดการชราภาพของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ (15 สัปดาห์) โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.182$) และ ($p = 0.139$) ตามลำดับ

คำสำคัญ: สารสกัดน้ำของเบญจกูล, ภาวะอ้วนลงพุง, ความชรา, เอนไซม์เบต้ากาแลกโตสิเดส

Abstract

The water extract of Benjakul is a traditional remedy used in Thailand to regulate body systems and reduce blood sugar levels. However, there have been no studies on the effects of Benjakul water extract on pancreatic cells aging in obese rats fed a high-fat diet over a moderate period. This study aims to use the intensity of the enzyme senescence-associated beta-galactosidase (sa- β -gal) in pancreatic cells as an indicator to evaluate the anti-aging effects of the Benjakul water extract, using immunohistochemical methods. The study was conducted on 18 male Sprague-Dawley rats, divided into 3 groups of 6 rats each. After 16 weeks of feeding, the rats were tested for body weight, blood sugar levels, and pancreatic sa- β -gal immunohistochemistry. The results showed that compared to the control group or the group fed a normal diet, the group fed a high-fat diet along with a low dose of Benjakul water extract (41.3 mg/kg rat weight) had a statistically significant increase in body weight. However, their blood sugar level and sa- β -gal staining tended to decrease, although not significantly. Compared to the group fed a high-fat diet alone, the group fed a high-fat diet along with a low dose of Benjakul water extract (41.3 mg/kg rat weight) showed a tendency for decreased body weight, blood sugar levels, and sa- β -gal staining in the pancreas, but these differences were not statistically significant. In conclusion, a low dose of Benjakul water extract (41.3 mg/kg rat weight) tends to help reduce weight but does not significantly reduce blood sugar levels or pancreatic aging in rats fed a high-fat diet over a moderate period (15 weeks) ($p = 0.182$) and ($p = 0.139$) respectively.

Keywords: Benjakul water extract, metabolic syndrome, aging, senescence-associated beta-galactosidase (sa- β -gal)

บทนำ

ในปี พ.ศ. 2565 ประเทศไทยได้เข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขได้ดำเนินการดูแลสุขภาพของผู้สูงอายุผ่านแผนปฏิบัติการที่เน้นการรักษาส่งเสริมสุขภาพป้องกันและฟื้นฟูสุขภาพรวมถึงการดำเนินแผนเชิงรุกและเชิงรับ มีปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ที่เป็นสาเหตุของกลุ่มโรคไม่ติดต่อเรื้อรังที่มีผลต่อโรคอ้วน โรคไขมันในตับที่ไม่เกิดจากการดื่มแอลกอฮอล์ เบาหวานและโรคหัวใจ (Silawan, 2024) ปัจจุบันปัจจัยที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคอ้วนและภาวะแทรกซ้อนคือการบริโภคอาหารที่มีพลังงานสูงทำให้เซลล์ไขมันขยายตัวและหลั่ง adipokine เช่น MCP-1, TNF- α และ IL-6 ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบและดื้อต่ออินซูลินรวมถึงการหลั่งกรดไขมันอิสระเข้าสู่กระแสเลือดทำ

ให้เพิ่มความเสถียรต่อความผิดปกติในอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตับและตับอ่อน นอกจากนี้ยังส่งผลให้เกิดภาวะอ็อกเสบและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Clemente-Suárez, 2023)

โรคอ้วนถือเป็นปัญหาร้ายที่สุดทั่วโลก ทำให้เกิดการสะสมไขมันเกินไปในร่างกาย ทำให้เกิดผลกระทบที่มีความรุนแรงต่อสุขภาพร่างกาย การสะสมไขมันมากเกินไปนี้มีผลทำให้เกิดสภาวะชราในเซลล์ (cellular aging) และเพิ่มความเสถียรต่อปัญหาสุขภาพที่หลากหลาย อาทิเช่นโรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดและโรคหัวใจ อีกทั้งยังทำให้อายุสั้นลง กระบวนการการเกิดความชราเกิดขึ้นเมื่อมนุษย์เข้าสู่ช่วงวัยชราซึ่งนำมาซึ่งการสูญเสียประสิทธิภาพของอวัยวะและเนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกาย นอกจากนี้ยังเกิดการลดการทำงานของอวัยวะต่างๆ ซึ่งทำให้ระบบหลายๆ ด้านไม่สามารถทำงานได้ตามปกติอีกต่อไปทำให้เกิดปัญหาเกี่ยวกับ oxidative stress ภายในเซลล์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่เกิดจากการสะสมของสารออกซิเดชันภายในร่างกาย ซึ่งสามารถทำให้เกิดความเสียหายในเซลล์และระบบต่างๆ ของร่างกาย ในขณะที่การทำงานของระบบซ่อมแซมเซลล์ลดลง ทำให้ไม่สามารถซ่อมแซมความเสียหายของเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Silawan, 2024)

ความเครียดที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาออกซิเดชันมีต้นเหตุมาจากอนุมูลอิสระที่สร้างความเสียหายในโครงสร้างของสารชีวโมเลกุลภายในร่างกาย (Lobo, 2010) ภาวะเครียดนี้ทำให้เซลล์ทำหน้าที่ผิดปกติและเสี่ยงต่อการตาย (กรมสุขภาพจิต, 2564) การเผชิญหน้ากับความเครียดสามารถเกิดขึ้นในทุกเซลล์ของร่างกาย และหากเกิดต่อเนื่องนานมากๆ นั้นทำให้เกิดภาวะการแก่ของเซลล์ (senescence) ซึ่งเป็นกระบวนการที่เซลล์สูญเสียความสามารถในการทำงาน และมีผลให้เกิดความผิดปกติหรือโรค (ภาวะ "เครียด" จากวิกฤติโควิด เช็กอาการเบื้องต้น หลายคนเผชิญโดยไม่รู้ตัว, 2564)

ความชราในระดับเซลล์มีผลทำให้เพิ่มความเสี่ยงในการเป็นโรคต่างๆ และในทางกลับกันก็ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ การเข้าใจถึงกระบวนการนี้มีความสำคัญในการพัฒนาวิธีการป้องกันและการรักษาที่เน้นการบรรเทาความเครียดและรักษาสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ เพื่อลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคและส่งเสริมการฟื้นฟูและการเจริญเติบโตของเซลล์อย่างเหมาะสม (Tenchov, 2024)

การวิจัยทางวิทยาศาสตร์ได้สรุปว่าปัจจัยที่มีผลต่อความชราในระดับเซลล์เกิดจากกระบวนการต่างๆ ซึ่งรวมถึงความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage) ที่สะสมขึ้นเรื่อยๆ ซึ่งทำให้เซลล์ไม่สามารถแบ่งตัวและเข้าสู่ภาวะเซลล์ชราได้ นักวิจัย López-Otin ได้นำเสนอแนวความคิดเกี่ยวกับ hallmarks of aging ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่รวมถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลในการเกิดภาวะชรา (López-Otin, 2013)

เอนไซม์เบต้ากาแลคโตสิเดสหรือ senescence-associated beta-galactosidase (sa- β -gal) เป็นสารที่ปรากฏในเซลล์ชราและมีความจำเพาะที่ภาวะค่า pH 6 ซึ่งเพิ่มขึ้นตามอายุของเซลล์ การทดสอบ sa- β -gal มีประโยชน์ในการจำแนกและวัดปริมาณเซลล์ชรา (Valieva, 2020)

ตับอ่อน (pancreas) เป็นอวัยวะที่อยู่บริเวณช่องท้องส่วนบนวางพาดจากแนวขวาไปซ้าย ตำแหน่งจะอยู่ก่อนไปทางด้านหลังเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นๆ และอยู่ใกล้กับอวัยวะสำคัญหลายส่วน โดยมีหน้าที่ในการย่อยอาหารและควบคุมระดับน้ำตาล ดังนี้ 1) ผลิตเอนไซม์ (enzyme) เช่น อะไมเลส (amylase) และไลเปส (lipase) เป็นต้น เพื่อช่วยในการย่อยอาหาร ทั้งคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน 2) ผลิตฮอร์โมน (hormones) โดยเฉพาะฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เช่น อินซูลิน (insulin) และกลูคากอน (glucagon) เป็นต้น (Karpínska, 2022)

สารสกัดเบญจกูลเป็นส่วนผสมทางธรรมชาติที่มีคุณสมบัติที่สามารถปรับสมดุลร่างกายและมีประโยชน์ในการบำรุงธาตุทั้ง 4 ตัว (คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2561) ส่วนประกอบของสูตรเบญจกูลประกอบด้วยข้าพสุ ดิปลี สะค้าน เจตมูลเพลิงแดง และชิงแห้ง การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าเบญจกูลช่วยลดระดับไขมันโคเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และลดการแสดงออกของ NF- κ B p65 ในหนูที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูง (ปราณี ขวลิธธำรง, 2539) การศึกษาผลของสารสกัดน้ำเบญจกูลในตับอ่อนของหนูที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงพบว่าช่วยลดความเข้มข้นของการติดสีของ sa- β -gal และลดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ในตับอ่อน

(Vongthoung, 2016) cellular aging ของ pancreatic cells จะส่งผลกระทบต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ต่อมไร้ท่อ และระบบภูมิคุ้มกันเนื่องจากตับอ่อนเป็นอวัยวะที่ผลิตเอนไซม์ช่วยย่อยอาหาร และผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการทำงานของน้ำตาลในร่างกาย อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ด้านชราของสารสกัดเบญจกูลในตับอ่อนในการเลี้ยงหนูเป็นระยะเวลากลางๆ การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจศึกษาผลของสารสกัดเบญจกูลต่อการยับยั้งความแก่ของเซลล์ตับอ่อนในการเลี้ยงหนูเป็นระยะเวลากลางๆ ที่สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ตับอ่อนได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ศึกษาผลของสารสกัดเบญจกูลต่อการยับยั้งความแก่ของเซลล์ตับอ่อนในการเลี้ยงหนูเป็นระยะเวลากลางๆ ที่สามารถลดความเสี่ยงในการเกิดโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การสกัดน้ำจากเบญจกูลประกอบด้วยพืช 5 ชนิดที่มีส่วนผสมดังนี้ ดอกดีปลี (*Piper retrofractum* Vahl.) : 2 ส่วน, รากข้าวฟ่าง (*Piper sarmentosum* Roxb.) : 16 ส่วน, เถาสะค้าน (*Piper interruptum* Opiz.) : 8 ส่วน, รากเจตมูลเพลิงแดง (*Plumbago indica* Linn.) : 6 ส่วน, เหง้าขิงแห้ง (*Zingiber mekongens* Gagnep.) : 4 ส่วน (สมุนไพรรดอทคอม, 2559) จากนั้นนำพืชทั้ง 5 ชนิดมาอบที่อุณหภูมิ 55 °C จนแห้ง และนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 °C โดยสัดส่วนน้ำ:พืช = 2:1 จนเหลือน้ำเพียง 1 ส่วน จากนั้นทำการกรองและทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer จะได้ผลผลิตคือ 6.6% หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C และนำไปให้อาหารหนู

การเลี้ยงหนูในงานวิจัยนี้ใช้หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague – Dawley อายุ 6-8 สัปดาห์ จำนวน 18 ตัว โดยทำการเลี้ยงหนูตลอดระยะเวลา 16 สัปดาห์ โดยให้อาหารหนูปกติเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ หลังจากนั้นแบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่มและให้อาหารแยกตามกลุ่มที่เลี้ยงอีก 15 สัปดาห์ ได้แก่ กลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารหนูปกติ 6 ตัว กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูง 6 ตัว และกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) 6 ตัว (Reagan-Shaw, 2008) งานวิจัยนี้ได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยบรรณและได้รับการติดตามผลโครงการวิจัยการใช้สัตว์ทดลองทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เลขที่ AE001/2015

อาหารมาตรฐานได้มาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (CP, สมุทรปราการ, ประเทศไทย) ซึ่งประกอบด้วยพลังงานจากไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน 13%, 55% และ 31% ตามลำดับ อาหารที่กระตุ้นให้เกิดโรคอ้วนเป็นอาหารที่ดัดแปลงจากงานของ Claret และคณะในปี 2004 อาหารกระตุ้นให้เกิดโรคอ้วนประกอบด้วยพลังงานจากไขมันสูง (65%, 23% และ 11% ของพลังงานมาจากไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีน ตามลำดับ) และมีกรดไขมันอิ่มตัวและคอเลสเตอรอลสูง เตรียมอาหารเม็ดที่มีไขมันสูงในห้องครัวของหน่วยโภชนาการ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ป้อนอาหารหนูทุกวันเป็นเวลา 16 สัปดาห์ โดยการป้อนผ่านทางปาก หนูกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการรักษาจะได้รับการป้อนน้ำกลั่นในปริมาณที่เท่ากัน ติดตามและบันทึกน้ำหนักตัวของหนูและการบริโภคอาหาร (ปริมาณอาหารและพลังงาน) ทุกวันตลอดระยะเวลาการศึกษา ให้อาหารหนูในเวลาเดียวกันช่วง 9.00-10.00 น. ของทุกวัน

ละลายผงเบญจกูลแห้งบดหยาบในน้ำกลั่นและให้ทางปากในขนาด 41.3 มก./กก. น้ำหนักหนู/วัน ให้แก่กลุ่มหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงพร้อมกับสารสกัดน้ำเบญจกูลในช่วงสัปดาห์ที่ทำการทดลอง เตรียมขนาดยาให้มีปริมาตรคงที่ 0.1 มล./100 กรัมของน้ำหนักตัวหนูแต่ละตัว กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงจะได้รับน้ำกลั่นในปริมาตรเดียวกันกับสารสกัดเบญจกูลและและให้ทางปากเหมือนกัน ขนาดของสารสกัดน้ำเบญจกูลถูกคำนวณตามสมการต่อไปนี้ (Reagan-Shaw, 2008)

$$\begin{aligned}
 \text{Normal people eat } & 2 \text{ g} \times 3 \text{ times/day} & = 6 & \text{ g/day} \\
 \text{Benjakul yield} & = 6.7\% & = \frac{6.7 \times 6}{100} & = 0.4 \text{ g/day} \\
 \text{Dose} & & = \frac{0.4 \times 37}{6 \times 60} & = 0.0413 \text{ g/kg BW/day} \\
 & & & = 4.13 \text{ mg/kg BW/day}
 \end{aligned}$$

บันทึกน้ำหนักตัวของหนูทุกวันตลอดระยะเวลาการศึกษา การคำนวณน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นสามารถทำได้โดยใช้สูตรดังนี้: น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม) = น้ำหนักตัวสุดท้าย (กรัม) - น้ำหนักตัวเริ่มต้น (กรัม) โดยน้ำหนักตัวเริ่มต้นและน้ำหนักตัวสุดท้ายของแต่ละตัวจะแสดงถึงน้ำหนักตัวในวันแรกและวันสุดท้ายก่อนที่จะทำการฆ่าหนูตามลำดับ

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการวิจัย ทำการสลบและฆ่าหนูด้วยการฉีด sodium pentobarbital (nembutal) ปริมาณสูง (150 มก./กก.) ทางช่องท้อง หลังจากการอดอาหารประมาณ 16 ชั่วโมง (Eu, C. H., 2010) ผ่าตัดหนูตามเส้นยาวจากด้านบนของทรวงอกถึงบริเวณอุ้งเชิงกรานเพื่อเปิดเผยอวัยวะภายใน ภายใต้สภาพปลอดเชื้ออย่างระมัดระวัง นำตับอ่อนมาใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์เย็น (4 °C) หรือน้ำเกลือปกติ และทำความสะอาดเนื้อเยื่อที่ปนเปื้อนด้วยความระมัดระวัง ดำเนินกระบวนการผ่าตัดไปอย่างรวดเร็วที่สุด หลังจากนั้นนำตับอ่อนมา fix ในฟอร์มาลิน 10% และเก็บเนื้อเยื่อไว้เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

ในการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดขณะที่หนูอดอาหาร (fasting blood glucose, FBG) หลังจากการเลี้ยงหนูในสัปดาห์ที่ 16 ให้หนูอดอาหารข้ามคืน (16 ชั่วโมง) ก่อนที่จะทำการชั่งน้ำหนักของหนูและทำการตัดปลายหางแล้ววัดระดับน้ำตาลในเลือดโดยใช้เครื่องตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือด Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, Zurich, Switzerland) หลักการของการตรวจคือเอนไซม์ในแถบทดสอบ Accu-Chek Performa ที่มีชื่อว่า Mut. Q-GDH ของเชื้อ *Acinetobacter calcoaceticus* ซึ่งได้รับการตัดต่อพันธุกรรมเพื่อเพิ่มจำนวนในเซลล์เจ้าบ้าน โดยเปลี่ยนกลูโคสในตัวอย่างเลือดเป็น gluconolactone และทำการวัดสัญญาณกระแสไฟฟ้าเพื่อรายงานระดับน้ำตาลในเลือด

การย้อม Sa- β -gal ด้วยอิมมูโนฮิสโตเคมี (de Mera-Rodríguez, 2022) จะทำตามขั้นตอนต่อไปนี้: อบสไลด์ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะเริ่มกระบวนการตรวจอิมมูโนฮิสโตเคมีเพื่อตรวจหา sa- β -gal ในชิ้นเนื้อ deparaffinize เพื่อเอา paraffin ที่เคลือบบนสไลด์ออกโดยการแช่สไลด์ใน coplin jar ตามขั้นตอนต่อไปนี้: ไซลีน: 5 นาที 100% เอทานอล: 3 นาที 95% เอทานอล: 3 นาที 90% เอทานอล: 3 นาที 80% เอทานอล: 3 นาที 70% เอทานอล: 3 นาที ทำขั้นตอน rehydrate โดยล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นวางรอบชิ้นเนื้อด้วยปากกา PAPPen และทำในกล่องชื้นที่มีlid ขั้นตอน antigen retrieval ด้วยเอ็นไซม์ไฮยาลูโรนเนส (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) incubate สไลด์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที ล้างสไลด์ในน้ำปราศจากไอออน 5 นาที ชะล้าง (quenching) เอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดสภายในเซลล์โดย incubate 37 °C ด้วย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในเมทานอล (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน 3 ครั้ง ล้างใน 1 x PBST 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนการ blocking background ที่เกิดจาก non-specific binding โดย incubate ชิ้นเนื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ด้วย 5% BSA ใน 1x PBST (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) ห้ามล้าง serum ออกหลัง incubate เติมน้ำ primary antibody (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย 1x PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เติมน้ำ secondary antibody (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) และ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 60 นาที ล้างด้วย 1x PBST 5 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ตรวจจับสีด้วยสารละลาย 0.05% DAB + 0.06% H₂O₂ (200 μ l/ชิ้นเนื้อ) เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาการย้อมสีด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) counterstain ด้วย hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที ล้างออกด้วยน้ำประปาเป็นเวลา 5 นาที ล้างด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) dehydrate โดยการแช่สไลด์ใน coplin jar ตามขั้นตอนต่อไปนี้: 95% เอทานอล: 3 นาที 100% เอทานอล: 3 นาที ไซลีน: 5 นาที ไซลีน: 5 นาที ไซลีน: 5 นาที เมื่อชิ้นเนื้อแห้งแล้วใส่ mounting media แล้วปิดด้วย coverslip

บันทึกสไลด์ที่เป็นภาพที่ย้อมสีของตับอ่อนไว้โดยใช้เลนส์ขยาย X40 ที่ต่ออยู่กับกล้องจุลทรรศน์ Olympus BX60 ที่มีกล้องดิจิทัล (Nikon, ประเทศญี่ปุ่น) และเชื่อมต่อกับซอฟต์แวร์ NIH Image 1.63 เพื่อวิเคราะห์ความหนาแน่นเฉลี่ยของ sa- β -gal ในเซลล์ของตับอ่อนด้วยโปรแกรม NIH program

การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ผลทางสถิติของความเข้มข้นของการติดสีเฉลี่ยของ sa- β -gal ในตับอ่อนโดยใช้โปรแกรม ZEN 2 lite ทำตามขั้นตอนต่อไปนี้: นำผลลัพธ์ที่ได้จาก ZEN 2 lite มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยเลขคณิตบวกหรือลบความกระเจิงของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean: SEM) ใช้สถิติของโคลโมโกรอฟ-สมินอฟ (Kolmogorov-Smirnov) ดำเนินการตรวจสอบการแจกแจงว่าเป็นแบบปกติหรือไม่ ใช้โปรแกรม SPSS เพื่อทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) ด้วยวิธี Tukey ทำการวิเคราะห์ค่า p -value โดยกำหนดให้ค่า p -value น้อยกว่า 0.05 ($p < 0.05$) เพื่อพิจารณาว่ามีความสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

1. ผลการวัดน้ำหนักตัวหนู

หลังจากให้อาหารครบ 15 สัปดาห์ หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) เท่ากับ 358.38 ± 6.19 กรัม สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า body weight gain เท่ากับ 289.75 ± 5.74 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$) หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) เท่ากับ 346.38 ± 11.41 กรัม สูงกว่าหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติที่มีค่า body weight gain เท่ากับ 289.75 ± 5.74 กรัม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.000$) และหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีปริมาณไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) เท่ากับ 346.38 ± 11.41 กรัม ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.313$) กับหนูกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว ที่มีค่า body weight gain เท่ากับ 358.38 ± 6.19 กรัม ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักหนูเริ่มต้น (initial body weight) และน้ำหนักตัวหนูที่เพิ่มขึ้น (body weight gain) ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ของหนู 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว (* แทนความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ โดยใช้สถิติ One-way ANOVA)

Parameters	ICT	IHF	IBL
Initial BW (g)	244.00 ± 3.37	240.38 ± 2.25	245.63 ± 3.65
BW gain (g)	289.75 ± 5.74	$358.38 \pm 6.19^*$	$346.38 \pm 11.41^*$

หมายเหตุ

ICT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ

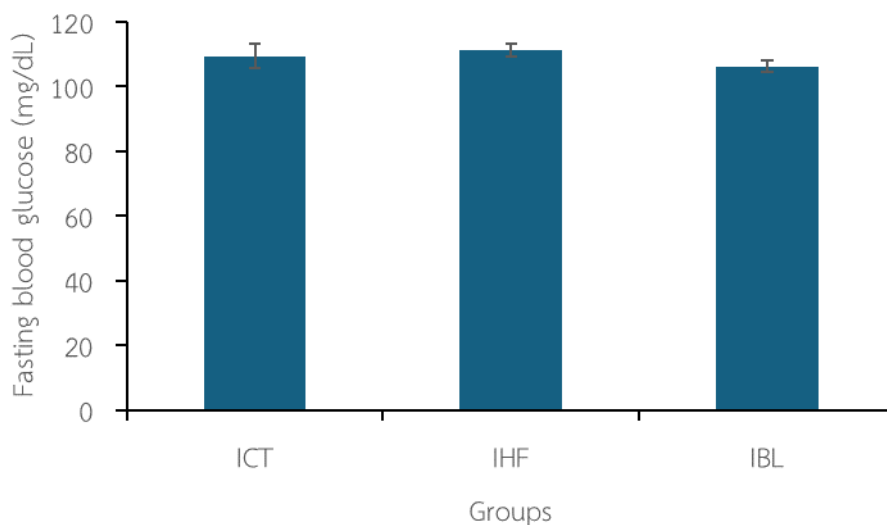
IHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

IBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)

2. ผลการตรวจหาระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร (fasting blood glucose, FBG)

หลังจากให้อาหารครบ 15 สัปดาห์ หนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติมีค่า FBG เท่ากับ 109.38 ± 3.62 mg/dL หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียวมีค่า FBG เท่ากับ 111.25 ± 2.10 mg/dL ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.619$ หนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./

น้ำหนักหนู 1 กก.) มีค่า FBG เท่ากับ 106.13 ± 1.77 mg/dL ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.391$ และ $p = 0.182$ กับหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติและหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียวตามลำดับ ดังที่แสดงไว้ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ผลน้ำตาลในเลือด (fasting blood glucose) ของหนู ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ของหนู 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

หมายเหตุ

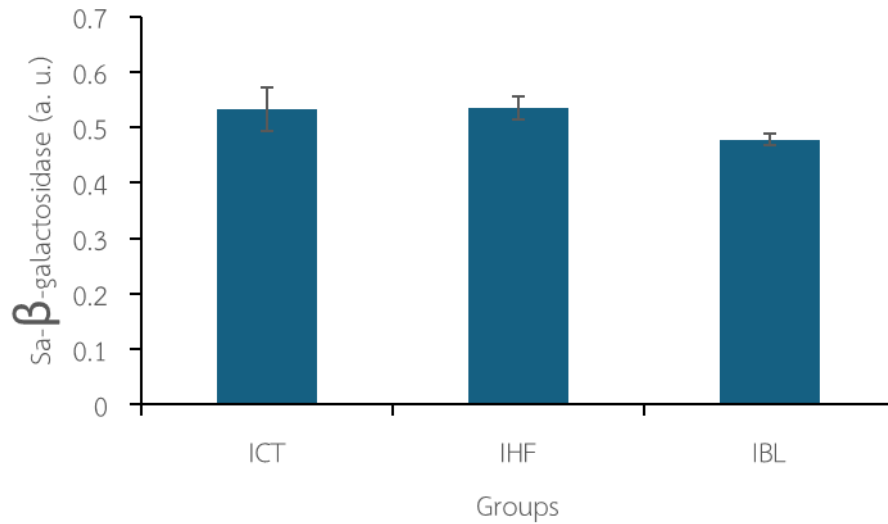
ICT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ

IHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

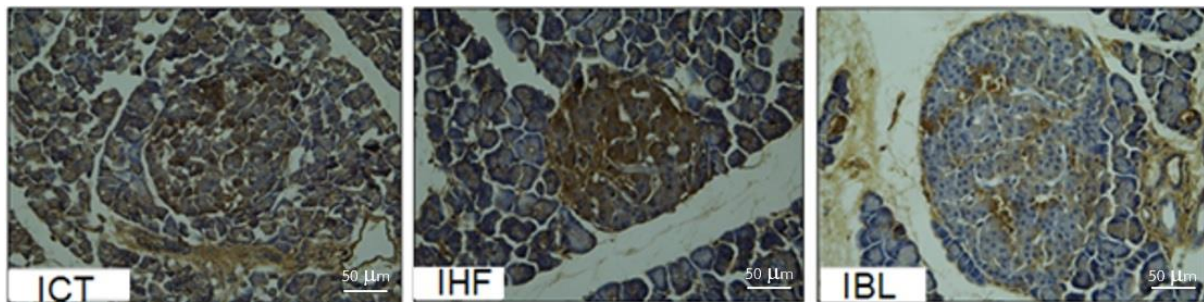
IBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)

3. ผล density ของ sa- β -gal ในตับอ่อนของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ

กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติมีค่า density ของ sa- β -gal เท่ากับ 0.533 ± 0.04 a. u. กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีค่า density ของ sa- β -gal เท่ากับ 0.535 ± 0.02 a. u. ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.955$ กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) ที่มีค่า density ของ sa- β -gal เท่ากับ 0.478 ± 0.01 a. u. ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p = 0.151$ และ $p = 0.139$ กับหนูกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติและหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียวตามลำดับดังที่แสดงไว้ดังภาพที่ 2 และภาพที่ 3



ภาพที่ 2 ผล density ของ sa-β-gal ของหนู ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ของหนู 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว



ภาพที่ 3 ความหนาแน่นของการย้อมสี sa-β-gal ในเซลล์ไอส์เลตของตับอ่อน (กำลังขยาย $\times 400$, มาตรฐานเกล = 50 μm)

หมายเหตุ

ICT = กลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารหนูปกติ

IHF = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง

IBL = กลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.)

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

หนูที่เลี้ยงด้วยอาหารไขมันสูงสามารถพัฒนากลุ่มอาการเมตาบอลิซึม เช่น โรคอ้วน ไขมันในเลือดสูง ความดัน ความทนทานต่อกลูโคสผิดปกติและความต้านทานต่ออินซูลินผิดปกติ (Wong, 2016) เบญจกูลเป็นตำรายาที่บัญญัติอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ มีสรรพคุณในการใช้เป็นยาปรับธาตุ (Rattarom, 2014) นอกจากนี้การศึกษาของเกวลิน และคณะเมื่อปี 2016 ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลสามารถลดการชราภาพของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ (4 สัปดาห์) ได้ (Vongthoung, 2016) การวิจัยครั้งนี้ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านชราของสารสกัดน้ำของเบญจกูลในตับอ่อนของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ (15 สัปดาห์) เราตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลอาจจะลด sa-β-gal ในเซลล์ตับอ่อนของหนูอ้วนที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ (15 สัปดาห์) ได้ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูงมีน้ำหนักตัวสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมหรือกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ สอดคล้องกับผลการวิจัยของอชิรญาและคณะ (Kamchansupasin, 2020) และ ณรงค์ศักดิ์และคณะ (Munkong, 2022) สิ่งที่น่าสนใจคือพบว่าหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงร่วมกับสารสกัดน้ำของเบญจ

กลูโคสขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีแนวโน้มที่จะช่วยลดน้ำหนักตัว ลดระดับน้ำตาลในเลือดและลด sa- β -gal ในตับอ่อนเมื่อเทียบกับหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงอย่างเดียว การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีแนวโน้มที่จะทำให้ตับอ่อนแก่น้อยลงซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ เกวลินและคณะเมื่อปี 2016 ที่รายงานไว้ว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) สามารถลดความหนาแน่นของการติดสีของ sa- β -gal ในเซลล์ไอส์เลตของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลาสั้นๆ (4 สัปดาห์) ได้ (Vongthoung, 2016) กลไกการทำงานของสารสกัดน้ำเบญจกูลมีส่วนในการทำให้เกิดผลในการศึกษาครั้งนี้คือมีแนวโน้มที่ทำให้ตับอ่อนแก่น้อยลงน่าจะเกิดจากการเพิ่มการตอบสนองของอินซูลินผ่านการแสดงออกของยีน insulin receptor substrate-2 (IRS-2) ลดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ควบคุมการแสดงออกของยีน NF-kappa B p65 และปรับปรุงโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเซลล์ไอส์เลต และเซลล์อะซินาร์ของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงให้มีลักษณะที่ดีขึ้น (Vongthoung, 2016) และสอดคล้องกับผลการวิจัยของ เกวลินและคณะเมื่อปี 2024 ที่รายงานไว้ว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลมีแนวโน้มสามารถลดความหนาแน่นของการติดสีของ sa- β -gal ในเซลล์ตับในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงได้ (Vongthoung, 2024) ปัจจัยที่ทำให้ไม่ได้ผลที่มีนัยสำคัญทางสถิติอย่าง ที่คาดไว้ว่าจะเกิดจากความเข้มข้นของสารสกัดที่ใช้ และระยะเวลาที่ให้หนู รวมถึงข้อจำกัดเช่น ชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ที่มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมตรงกับวัตถุประสงค์และเป้าหมายของงานวิจัย และใช้สัตว์จำนวนน้อยที่สุดที่จะให้ผลงานถูกต้อง แม่นยำ และเป็นที่ยอมรับมากที่สุด

สรุป

การวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดน้ำของเบญจกูลขนาดต่ำ (41.3 มก./น้ำหนักหนู 1 กก.) มีแนวโน้มที่จะช่วยลดน้ำหนัก แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและลดการชราภาพของตับอ่อนในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงเป็นระยะเวลากลางๆ (15 สัปดาห์) ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดน้ำเบญจกูลใน dose ที่สูงขึ้น และระยะเวลาที่นานขึ้น รวมถึงควรมีการศึกษาการต้านการชราในอวัยวะอื่นๆ เช่น ปอด ไต หลอดเลือดและหัวใจ เป็นต้น เพื่อดูว่าสารสกัดน้ำเบญจกูลมีฤทธิ์ต้านการชราในเซลล์ต่างๆ เหล่านี้ด้วยหรือไม่

บรรณานุกรม

- คณะกรรมการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. (2561). **เบญจกูล ตำรับยาประจำธาตุ ปรับธาตุให้สมบูรณ์**. สืบค้นเมื่อ 11 มกราคม 2567. เข้าถึงได้จาก. <https://www.ttmed.psu.ac.th/th/blog/219>.
- ปราณี ขวลิตรำรง เอมมนัส อัตตวิชญ์ พิช รักษามัน และปราณี จันทเพ็ชร. (2539). **พิษกึ่งเฉียบพลันของยาแผนโบราณเบญจกูล**. ไทยเภสัชสาร ปีที่ 20 ฉบับที่ 1: หน้า 39 – 51.
- สมุนไพรรดอทคอม. (2559). **โสมเบญจกูล**. สืบค้นเมื่อ 10 มกราคม 2567. เข้าถึงได้จาก. <https://www.samunpri.com/phikadya/>.

Clemente-Suárez, V. J., Redondo-Flórez, L., Beltrán-Velasco, A. I., Martín-Rodríguez, A., Martínez-Guardado, I., Navarro-Jiménez, E., Laborde-Cárdenas, C. C., & Tornero-Aguilera, J. F. (2023). The Role of Adipokines in Health and Disease. *Biomedicines*. 11(5), 1290.

de Mera-Rodríguez, J. A., Álvarez-Hernán, G., Gañán, Y., Santos-Almeida, A., Martín-Partido, G., Rodríguez-León, J., & Francisco-Morcillo, J. (2022). Endogenous pH 6.0 β -Galactosidase Activity Is Linked to Neuronal Differentiation in the Olfactory Epithelium. *Cells*. 11(2), 298.

Eu, C. H., Lim, W. Y., Ton, S. H., & bin Abdul Kadir, K. (2010). Glycyrrhizic acid improved lipoprotein lipase expression, insulin sensitivity, serum lipid and lipid deposition in high-fat diet-induced obese rats. *Lipids in health and disease*. 9, 81.

- Kamchansuppasin, A., Vongthoung, K., Temrangsee, P., Munkong N., & Lerdvuthisopon, N. (2020). Benjakul supplementation improves hepatic fat metabolism in high-fat diet-induced obese rats. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**. 19 (4), 797-803.
- Karpińska, M., & Czauderna, M. (2022). Pancreas-Its Functions, Disorders, and Physiological Impact on the Mammals' Organism. **Frontiers in physiology**. 13, 807632.
- Lobo, V., Patil, A., Phatak, A., & Chandra, N. (2010). Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**. 4(8), 118–126.
- López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M., & Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. **Cell**. 153(6), 1194–1217.
- Munkong, N., Lonan, P., Mueangchang, W., Yadyookai, N., Kanjoo, V., & Yoysungnoen, B. (2022). Red Rice Bran Extract Attenuates Adipogenesis and Inflammation on White Adipose Tissues in High-Fat Diet-Induced Obese Mice. **Foods (Basel, Switzerland)**. 11(13), 1865.
- Rattarom, R., Sakpakdeejaroen, I., Hansakul, P., & Itharat, A. (2014). Cytotoxic activity against small cell lung cancer cell line and chromatographic fingerprinting of six isolated compounds from the ethanolic extract of Benjakul. **Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet**. 97 Suppl 8, S70–S75.
- Reagan-Shaw, S., Nihal, M., & Ahmad, N. (2008). Dose translation from animal to human studies revisited. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. 22(3), 659–661.
- Silawan, T., Powwattana, A., Ponsen, P., & Ninkarnjanakun, N. (2024). Promoting the Wellness of Older Adults through Integrated Health-Promoting Programs and Supportive Peers: A Quasi-Experimental Study in Semi-Urban Communities of Northeastern Thailand. **Journal of primary care & community health**. 15, 21501319241241456.
- Tenchov, R., Sasso, J. M., Wang, X., & Zhou, Q. A. (2024). Aging Hallmarks and Progression and Age-Related Diseases: A Landscape View of Research Advancement. **ACS chemical neuroscience**. 15(1), 1–30.
- Valieva, Y., Ivanova, E., Fayzullin, A., Kurkov, A., & Igrunkova, A. (2022). Senescence-Associated β -Galactosidase Detection in Pathology. **Diagnostics (Basel, Switzerland)**. 12(10), 2309.
- Vongthoung, K., Kamchansuppasin, A., Temrangsee, P., Munkong, N., Kaendee, N., & Lerdvuthisopon, N. (2016). Effects of Benjakul water extract on pancreas in high-fat fed rats. **Thammasat Medical Journal**. 16(2), 161-175.
- Vongthoung K, Munkong N, Kamchansuppasin A, Morchang A. (2024). Benjakul water extract affects liver cell aging in obese rats with high-fat diet. **Advanced Science Journal**. 24(1), 57-74.
- Wong, S. K., Chin, K. Y., Suhaimi, F. H., Fairus, A., & Ima-Nirwana, S. (2016). Animal models of metabolic syndrome: a review. **Nutrition & metabolism**. 13, 65.