

ผลของไซโคลอัลลิอิน ต่อการสลายไขมันและลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

Effect of cycloalliin on lipolysis and lipid peroxidation

อชิดา จารุโชติกมอล^{1*}, จินตนา ประทุมชาติ², จิราพร พรหมโคตร², ฉวีวรรณ พุ่มเพ็ชร²,
ศิรินันท์ จันรุ่งคำ², พรทิพย์ วรกีจพูนผล², พรปวีณ์ บรรลึงค์², ปวีตรา พูลบุตร¹,
เบญจมาศ คุชนี¹

Achida Jaruchotikamol^{1*}, Jintana Pratumchart², Jiraporn Promkod², Chaweewan Pumpet²,
Sirinan Janrongkhum², Pornthip Worakitpoonpal², Pornpawee Banlung², Pawitra Pulbutr¹,
Benjamart Cushnie¹

Received: 5 July 2017 ; Accepted: 13 September 2017

บทคัดย่อ

พืชตระกูล *Allium* (หอมหัวใหญ่และกระเทียม) เป็นพืชที่ใช้ประกอบอาหารและเป็นพืชสมุนไพรทางการแพทย์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลายอย่าง ไซโคลอัลลิอินเป็นสารประกอบหลักในกลุ่มออร์แกโนซัลเฟอร์ที่พบในพืชตระกูล *Allium* ที่มีฤทธิ์ในการช่วยลดระดับไขมันในเลือดและลดความอ้วน แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงกลไกการเกิดฤทธิ์ดังกล่าว เมื่อกระบวนการสลายไขมันของเซลล์ไขมันมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับการควบคุมเมแทบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน และความผิดปกติของเมแทบอลิซึมของสารเหล่านี้ สามารถสร้างอนุมูลอิสระและนำมาซึ่งภาวะไขมันในเลือดสูงและโรคเบาหวาน การศึกษาในหลอดทดลองครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาผลของสารไซโคลอัลลิอินต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูขาวและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ เซลล์ไขมันของหนูสองกลุ่ม (กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (normal pellet diet; NPD) และกลุ่มที่ได้รับอาหารไขมันสูง (high fat diet; HFD)) ถูกทดสอบกับไซโคลอัลลิอินในสภาวะเซลล์ปกติ หรือในสภาวะที่เติม isoprenaline (0.1 μM ; ISO-induced lipolysis) พบว่าที่สภาวะ ISO-induced lipolysis ในเซลล์ไขมันที่ได้จากหนูขาวกลุ่ม NPD ไซโคลอัลลิอินที่ 1, 10 และ 100 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันได้ โดยมีระดับความเข้มข้นของ FFAs เท่ากับ 581.47 ± 67.79 , 575.3 ± 28.95 และ 555.77 ± 45.53 $\mu\text{M}/\text{mL}$ PCV/h ตามลำดับ ระดับการสลายไขมันมีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (651.03 ± 31.98 $\mu\text{M}/\text{mL}$ PCV/h) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$; $n = 5$) อย่างไรก็ตาม ไซโคลอัลลิอินไม่มีผลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันที่ได้จากหนูขาวกลุ่ม HFD อีกทั้งไซโคลอัลลิอินไม่มีผลต่อการสลายไขมันที่สภาวะปกติทั้งในเซลล์ไขมันที่ได้จากหนูขาวกลุ่ม NPD และ HFD ในการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของไซโคลอัลลิอินทดสอบด้วยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay และ anti-oxidation assay พบว่าไซโคลอัลลิอินมีฤทธิ์ต้านการเข้าจับอนุมูล DPPH ในการทดสอบ anti-oxidation assay ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยา ไซโคลอัลลิอินที่ 10, 30 และ 100 μM สามารถต้าน autooxidation ของกรดไขมัน linoleic ได้ แต่หลัง 72 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาพบฤทธิ์นี้เฉพาะที่ความเข้มข้น 100 μM ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าไซโคลอัลลิอินสามารถยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาวกลุ่ม NPD ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis และมีฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ซึ่งผลนี้อาจจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งระดับไขมันและน้ำตาลในเลือดของไซโคลอัลลิอิน

คำสำคัญ: ไซโคลอัลลิอิน การสลายไขมัน เซลล์ไขมันของหนูขาว ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน

¹ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, ² นิสิตหลักสูตรเภสัชศาสตรบัณฑิต คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

¹ Lecturer, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, ² PharmD Student, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University

* Corresponding author: Achida Jaruchotikamol, Faculty of Pharmacy, Mahasarakham University, Maha Sarakham 44150. E-mail : atika.j@msu.ac.th

Abstract

Allium species (garlic and onion) are edible plants that are also used as herbal medicines. These plants have been found to possess various pharmacological activities. Cycloalliin is one of the major organosulfur compounds found in *Allium* species. The hypolipidemic and anti-obesity effects of cycloalliin were reported previously. However, its actual mechanism of action has not been established. Adipocyte lipolysis plays an important role in the regulation of lipid and glucose metabolism. Abnormal conditions of these metabolism can produce reactive oxygen species and usually lead to hyperlipidemia and diabetes. The present study aimed to investigate the *in vitro* effects of cycloalliin on rat adipocyte lipolysis and antioxidant activity. Adipocyte suspensions of two groups of rat (normal pellet diet (NPD)-fed rat and high fat diet (HFD)-fed rat) were treated with cycloalliin in the absence (basal lipolysis) or the presence of isoprenaline (0.1 μ M; ISO-induced lipolysis). Cycloalliin at concentrations of 1, 10 and 100 μ M inhibited ISO-induced lipolysis in adipocytes derived from NPD-fed rats with free fatty acid concentrations of 581.47 ± 67.79 , 575.30 ± 28.95 and 555.77 ± 45.53 μ M/mL packed cell volume/h, respectively. These results showed significantly lower levels than the control (651.03 ± 31.98 μ M/mL packed cell volume/h) ($p < 0.05$; $n = 5$). However, no significant difference was found when cycloalliin was tested on adipocytes derived from HFD-fed rats. Cycloalliin did not produce a significant effect on basal lipolysis in adipocytes derived from both NPD-fed rats and HFD-fed rats. In terms of antioxidant activity of cycloalliin, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay and anti-oxidation assay were applied. Cycloalliin showed low capability on DPPH scavenging. In anti-oxidation assay, 48 h incubation of cycloalliin at concentrations of 10, 30 and 100 μ M inhibited significantly autooxidation of linoleic acid, but after 72 h incubation, only at the 100 μ M demonstrated this effect. In conclusion, cycloalliin significantly inhibits ISO-induced lipolysis in adipocytes derived from NPD-fed rats, and shows anti-lipid peroxidation activity. These may suggest that effects of cycloalliin could be related to hypolipidemia and hypoglycemia.

Keywords : cycloalliin, lipolysis, rat adipocyte, lipid peroxidation

บทนำ

White adipose tissue (WAT) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อสีขาวภายในประกอบด้วย white adipocytes สามารถพบได้ในบริเวณเยื่อบุช่องท้องและในอวัยวะภายใน มีบทบาทสำคัญต่อ lipid metabolism, glucose metabolism และ endocrine functions (Avram et al., 2005) สำหรับ lipid metabolism นั้น WAT ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญ การควบคุมเมแทบอลิซึมของไขมันในเซลล์ไขมัน ได้แก่ FFAs uptake, lipogenesis และ lipolysis เมื่อรับประทานอาหารที่มีไขมันเข้าไปร่างกายจะมีกระบวนการย่อยไขมันเหล่านี้ในลำไส้และดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งร่างกายจะนำไขมัน cholesterol และ triglyceride (TG) เข้าสู่กระแสเลือด โดยอาศัยโปรตีน (lipoproteins) ในเลือดช่วยลำเลียง ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ชนิด คือ very low density lipoproteins (VLDL), low density lipoproteins (LDL), high-density lipoproteins (HDL) และ total cholesterol การกำจัด LDL ออกจากกระแสเลือดผ่านทาง LDL receptor ร่างกายจะเก็บสะสมไขมันในรูปแบบ triglyceride (TG) ในเซลล์ไขมัน (adipocytes) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ WAT เมื่อร่างกายต้องการ

พลังงานจะเกิดกระบวนการสลายไขมัน (lipolysis) โดยอาศัยเอนไซม์ hormone sensitive lipase (HSL) และปฏิกิริยา hydrolysis ได้เป็น free fatty acids (FFAs) และ glycerol (Zechner et al., 2009; Zimmermann et al., 2009) ซึ่งพบว่าในคนที่มีความอ้วนสามารถเกิดการเก็บสะสมไขมันในรูปแบบ TG ได้มากกว่าคนปกติ (Avram et al., 2005; Goossens, 2008) อีกทั้งยังเกิด perilipin expression ลดลง จึงส่งผลให้ร่างกายเกิดกระบวนการ lipolysis เพิ่มขึ้น (Wang et al., 2003; Wang et al., 2011) นำไปสู่ความผิดปกติของระดับไขมันในเลือด (dyslipidemia) และเกิดภาวะ metabolic syndrome (Wajchenberg, 2000; Langin, 2006) ในกระบวนการ glucose metabolism เนื้อเยื่อไขมันทำงานร่วมกันกับกล้ามเนื้อหัวใจและกล้ามเนื้อลาย เพื่อควบคุม GLUT-4 ที่ทำหน้าที่ขนส่ง glucose จากกระแสเลือดไปเก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ซึ่ง glucose ถูกนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ *de novo* FFAs และ glycerol synthesis (lipogenesis) ผ่านทาง glycolytic pathway (Wajchenberg, 2000) และกระบวนการ lipolysis ของ TG ใน adipocytes ที่

เพิ่มขึ้นจะทำให้ระดับ FFAs ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลต่ออัตราการสร้าง glucose จาก glycerol, lactate และ amino acids (gluconeogenesis) และมีผลต่อ hepatic clearance ของ insulin ซึ่งส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น (hyperglycemia) ทำให้เกิด insulin resistance ตามมาได้ (Goossens, 2008) ขณะที่ endocrine function เซลล์ไขมันเป็นแหล่งสร้างสารพวก peptides ที่มีความสำคัญต่อ adipose tissue, endocrine, paracrine และ autocrine signals (Kim and Moustaid-Moussa, 2000; Poulos et al., 2010) ดังนั้นกระบวนการ lipolysis จึงมีความสำคัญอย่างมากต่อการควบคุมระดับไขมันและน้ำตาลในร่างกาย

อนุมูลอิสระ (free radicals) คือ อะตอม โมเลกุล หรือ สารประกอบที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยว (unpaired electron) ตั้งแต่ 1 อิเล็กตรอนขึ้นไปอยู่ในวงออร์บิทัลวงนอกสุด (outer orbital) ทำให้ไม่เสถียรและเป็นสารที่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาได้อย่างว่องไวกับอะตอมหรือโมเลกุลของสารอื่นๆ รวมถึงสารภายในร่างกาย (macromolecule) เช่น โปรตีน ไขมัน และ DNA เป็นต้น ลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) เป็นกระบวนการออกซิเดชันของกรดไขมันโดยอนุมูลอิสระ มักเกิดกับไขมันชนิดไม่อิ่มตัวและสามารถเกิดขึ้นได้เองในบรรยากาศ (autooxidation) แบ่งขั้นตอนของปฏิกิริยาเป็น 3 ขั้นตอน คือ ขั้นเริ่มต้น (initiation) ขั้นถ่ายทอด (propagation) และขั้นสิ้นสุด (termination) กระบวนการนี้สามารถเกิดเป็นกระบวนการลูกโซ่หากไม่มีการหยุดปฏิกิริยา (Adly, 2010) ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นได้อย่างมากมาย (oxidative stress) อนุมูลอิสระมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคระบบหัวใจและหลอดเลือด ภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ เป็นต้น (Adly, 2010) ในภาวะ oxidative stress โดยเฉพาะเมื่อนำมาซึ่งกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน พบว่ามีความเกี่ยวข้องอย่างยิ่งกับภาวะไขมันในเลือดสูงและโรคเบาหวาน (Yang et al., 2008; Arora et al., 2013)

ในปัจจุบันการใช้สมุนไพรและอาหารสุขภาพจัดเป็นการแพทย์ทางเลือกในการรักษาโรค รวมถึงป้องกันผลแทรกซ้อนที่เกี่ยวข้องกับโรคทาง metabolic syndrome หอมหัวใหญ่และกระเทียม (พืชตระกูล *Allium*) พืชสมุนไพรในครัวเรือนที่นิยมนำมาใช้ประกอบอาหาร มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด (Ozougwu, 2011; Zeng et al., 2017) ด้านออกซิเดชัน (Meriga et al., 2012) และลดความอ้วน (Yoshinari et al., 2012) เป็นต้น ซาโคลอัลลิอินเป็นสารในกลุ่ม organosulfur ที่พบในหอมหัวใหญ่และกระเทียม (Ueda et al., 1994; Allison et al., 2006)

มีฤทธิ์เพิ่มการสลายลิ้มเลือดในผู้ป่วย angina pectoris หรือ old myocardial infarction (Agarwal et al., 1977) ลดการหลั่ง apoB100 และลดระดับ TG ในเลือดของหนู (Yanagita et al., 2003) ช่วยเหนี่ยวนำการทำงานของเอนไซม์ quinone reductase (Xiao and Parkin, 2002) ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ใน phase II metabolism ที่มีบทบาทในการช่วยกำจัดของเสียออกจากร่างกาย (detoxification) ช่วยให้สารต้านออกซิเดชันที่อยู่ในร่างกายทำงานได้ดีขึ้น (Hedges and Lister, 2007)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่าไซโคลอัลลิอินมีผลต่อระดับไขมันในร่างกาย แต่ในปัจจุบันไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้ที่มีผลต่อกระบวนการใดที่ทำให้สามารถลดระดับไขมันในเลือด การศึกษาที่สนใจศึกษาฤทธิ์ของไซโคลอัลลิอินต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว โดยแบ่งหนูเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ (normal pellet diet; NPD) และกลุ่มที่ได้อาหารไขมันสูง (high fat diet; HFD) โดยแต่ละกลุ่มจะแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 สภาวะ คือ ในสภาวะเซลล์ปกติและในสภาวะที่เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสลายไขมัน อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้ยังได้ทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) โดยทดสอบในหลอดทดลอง (*in vitro*) ด้วย 2 วิธีการ คือ 1) การทดสอบความสามารถในการเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay; DPPH radical scavenging assay) และ 2) การทดสอบความสามารถในการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นเองของกรดไขมัน linoleic (anti-autooxidation assay of linoleic acid) ผลจากการศึกษานี้จะช่วยอธิบายฤทธิ์ของไซโคลอัลลิอินที่มีผลต่อไขมัน และจะเป็นข้อมูลยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารนี้ที่สามารถนำมาเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์สุขภาพหรือประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ในทางคลินิกต่อไป

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการศึกษา

สารเคมี

(1S,3R,5S)-5-methyl-1,4-thiazane-3-carboxylic acid 1-oxide (cycloalliin; $C_6H_{11}NO_3S$; Wako chemical, Japan), isoprenaline (Sigma, USA), collagenase type II (Sigma, USA), non-esterified fatty acid assay kit (Wako chemical, Japan), bovine serum albumin; BSA (Sigma, USA), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$) (Sigma, USA), ascorbic acid ($C_6H_8O_6$) (Carlo Erba Reagent, Italy), linoleic free fatty acid ($C_{18}H_{32}O_2$) (Sigma, USA), butylated hydroxytoluene ($C_{15}H_{24}O$) (Fluka, Swit-

zerland), ammonium thiocyanate (NH_4SCN) (Carlo Erba Reagent, Italy), ferrous chloride ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) (Aldrich, USA) สารเคมีทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองเป็นสารเคมีมาตรฐานจากบริษัท

วิธีการศึกษา

1. การทดสอบฤทธิ์ต่อการสลายไขมัน (Pulbutr et al., 2011; อธิกา จารุโชติกมลและคณะ, 2556) รายละเอียดการเตรียมการและการทดสอบดังนี้

สัตว์ทดลอง

หนูขาวสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 150-200 g จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล จังหวัดนครปฐม เลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองโดยมีระยะเวลาการให้แสงสว่าง 12 ชั่วโมง (06.00 น.-18.00 น.) และมีมืด 12 ชั่วโมง (18.00 น.- 06.00 น.) ภายใต้ห้องควบคุมอุณหภูมิ ความชื้น และเสียง วิธีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้ผ่านการยื่นขออนุมัติการทำงานวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยธรรมการทำวิจัยในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ก่อนดำเนินการทดลอง (หมายเลข 0016/2554)

หนูถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 8 ตัว) คือกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารสัตว์ทดลองชนิดปกติ (normal pellet diet; NPD) ใช้อาหารสัตว์ทดลองชนิดพินแทะสูตร 082 (สำหรับหนูขาว; บริษัท C.P.ประเทศไทย) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และกลุ่มเลี้ยงด้วยอาหารสัตว์ทดลองชนิดที่มีไขมันสูง (high fat diet; HFD) ใช้สูตรอาหารสัตว์ทดลองที่มีไขมันสูงตามการศึกษาของ อธิกา จารุโชติกมลและคณะ (2556) โดยในสัปดาห์แรกเลี้ยงหนูด้วยอาหารปกติเพื่อปรับสภาพหนูก่อน จากนั้นจึงเปลี่ยนเป็นอาหารสำหรับแต่ละกลุ่มทดลอง ซึ่งหนูจะได้รับอาหารและน้ำเพียงพอตามความต้องการ (*ad libitum*) ทำการชั่งน้ำหนักของหนูขาวเมื่อเริ่มทำการทดลอง และจดบันทึกข้อมูลน้ำหนักตัวของหนูขาวแต่ละตัวทุกสัปดาห์หลังเริ่มทำการทดลองนาน 3 สัปดาห์ (วันที่ 28) เปรียบเทียบน้ำหนักของหนูกลุ่ม NPD และ HFD ที่เวลาเลี้ยงต่าง ๆ

การเตรียม adipocyte suspension

วันที่ 28 นำหนูมาเพื่อเตรียม epididymal fat pads จากหนูขาวทั้งกลุ่ม NPD และ HFD โดยนำหนูมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำให้ตายอย่างสงบโดยการตั้งคอ นำเอา epididymal fat pads บริเวณใกล้กับอวัยวะของหนูขาวจำนวน 1 คู่/ตัว มาชั่งน้ำหนัก (คำนวณน้ำหนัก epididymal fat pads/น้ำหนักตัวหนูขาว) เปรียบเทียบน้ำหนัก epididymal fat pads ของหนูกลุ่ม NPD และ HFD

ตัดแยกเอาเส้นเลือดและ epididymal tissue ออก จากนั้นล้างด้วย Hanks/BSA buffer solution อีกครั้ง ทำการตัด epididymal fat pads ให้เป็นชิ้นเล็กๆ จนกว่าจะไม่มีเนื้อเยื่อชิ้นใหญ่ปรากฏอยู่ เพื่อให้เนื้อเยื่อขนาดประมาณ $0.5\text{-}1\text{ mm}^2$ ย่อยเนื้อเยื่อด้วย collagenase enzyme (type II) in Hanks/BSA buffer solution ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ปริมาตร 10 ml โดยเขย่าใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 7-10 นาที จนได้ส่วนผสมที่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน นำส่วนผสมที่ได้มากรองด้วยผ้าก๊อช 2-3 ชั้น เพื่อแยกเนื้อเยื่อที่มีชิ้นใหญ่ออกจากเซลล์ไขมัน ตั้งทิ้งไว้ให้แยกชั้น 5 นาที และดูเอาชั้นของ adipocytes ออกมาเติม Hanks/BSA buffer solution ปริมาตร 40 ml เพื่อล้าง collagenase ออก และเตรียม adipocytes suspension ด้วย Hanks/BSA solution ในอัตราส่วน 1:1 (v/v)

การทดสอบ adipocyte suspension กับสารเพื่อศึกษาฤทธิ์ต่อการสลายไขมัน

นำไซโคลอัลลิอินเติมลงใน adipocytes suspension (ที่ได้จากทั้งกลุ่ม NPD หรือ HFD) ปริมาตร 800 μl ทดสอบในสภาวะที่มีและไม่มี $0.1\text{ }\mu\text{M}$ isoprenaline (ISO) ปริมาตรของปฏิกิริยารวมสุทธิเท่ากับ 1,000 μl บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 1 ชั่วโมง ทำการเก็บ sample media ชั้นใสที่อยู่ส่วนล่างจากแต่ละหลอดทดลองไปใส่ในหลอดทดลองใหม่ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการวิเคราะห์หาระดับกรดไขมันอิสระต่อไป

การวิเคราะห์หาระดับกรดไขมันอิสระ (Free fatty acids; FFAs) ใช้ non-esterified free fatty acid kit (Wako chemicals, Japan) และวัดการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนไปโดยใช้ microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 nm การคำนวณระดับ FFAs ในสารละลายตัวอย่าง โดยใช้สูตร :

FFAs concentration in sample (μM) =

$$\frac{\text{FFAs standard conc. } (\mu\text{M}) \times \text{Sample absorbance}}{\text{Standard absorbance}}$$

(ค่า FFAs concentration in sample ที่คำนวณได้ จะนำมาคูณกับ dilution factor และเทียบเป็น 1 ml ของ packed cell volume ซึ่งจะเป็นระดับ FFAs ที่แท้จริง ($\mu\text{M/ml}$ packed cell volume/h))

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเมื่อได้รับไซโคลอัลลิอินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

2. การทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 DPPH assay (Pulbutr et al., 2014)

นำสารละลาย $63.4\text{ }\mu\text{M}$ DPPH 180 μL มา

เติมไฮโคลอัลลิอิน 20 μL วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm โดยใช้เครื่อง microplate reader ซึ่งค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรผันตรงกับปริมาณสาร DPPH ที่ยังคงเหลืออยู่ รายงานผลเป็นร้อยละความสามารถในการเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (% inhibition of DPPH คำนวณได้ตามสูตร[#]), ร้อยละความสามารถในการเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH ได้สูงสุด (maximum response; R_{max}) และความเข้มข้นของสารที่สามารถเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH ได้ร้อยละ 50 (IC_{50}) เปรียบเทียบผลที่ได้กับ ascorbic acid

2.2 Anti-oxidation assay (อิริกา จารุโชติกรมและคณะ, 2554) นำ 2.51 % linoleic acid 4.7 mL เติมไฮโคลอัลลิอิน 50 μL จากนั้นนำมา aliquot ใส่ใน microfuge tube สำหรับการทดสอบ 7 วัน โดยใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40° C และทุก 24 ชั่วโมงจะนำสารละลายออกมาเพื่อวัดระดับ lipid hydroperoxide (LOOH) ที่เกิดขึ้นโดยการทดสอบ ferric thiocyanate โดยนำสารละลายมา 50 μL เติม 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 50 μL , และ 20 mM ferrous chloride 50 μL จากนั้นทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารประกอบเชิงซ้อน iron thiocyanate (FeSCN^{2+} complex) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 486 nm ค่าการดูดกลืนแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ LOOH ซึ่งเป็น primary product จากกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่เกิดขึ้น นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้มาคำนวณร้อยละการต้านการเกิด autooxidation (% inhibition of autooxidation) ตามสูตร[#] เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มเมื่อได้รับไฮโคลอัลลิอินที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และเปรียบเทียบผลกับ butylated hydroxytoluene (BHT)

$$\# \text{ สูตรคำนวณ \% inhibition} = \left(\frac{A_{\text{Control}} - A_{\text{Sample}}}{A_{\text{Control}}} \right) \times 100$$

(เมื่อ A_{Control} และ A_{Sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม และสารละลายตัวอย่าง (cycloalliin หรือ สารมาตรฐาน) ตามลำดับ)

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลนำเสนอด้วยค่า mean \pm S.D. และใช้โปรแกรม Graph Pad Prism ver. 6 ในการคำนวณหาค่า IC_{50} การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม ดำเนินการดังต่อไปนี้ จะใช้สถิติ Independent-samples Student's *t*-test สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม NPD และ HFD ในเรื่องน้ำหนักตัวของหนูขาว และน้ำหนักของ epididymal fat pads และจะใช้สถิติ one-way ANOVA, LSD post-hoc test สำหรับวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มเมื่อได้รับสารทดสอบแตกต่างกัน ในการทดสอบฤทธิ์ของสารต่อการสลายไขมัน และการทดสอบฤทธิ์ของสารในการต้านอนุมูลอิสระ

ผลการศึกษา

1. ผลการทดสอบฤทธิ์ต่อการสลายไขมัน

1.1 ผลของอาหารต่อน้ำหนักตัวของหนูขาวและน้ำหนัก epididymal fat pads หนูขาว 2 กลุ่ม คือ กลุ่มหนูที่ได้รับอาหารปกติ (NPD) และกลุ่มหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (HFD) มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยแรกเริ่ม (วันที่ 0) เท่ากับ 137.50 + 4.33 g และ 142.50 + 4.33 g ตามลำดับ นำหนูทั้งสองกลุ่มมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพ 1 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการชั่งน้ำหนักของหนูในวันที่ 7 พบว่าน้ำหนักหนูขาวทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ตั้งแต่วันที่ 7 ได้เริ่มให้อาหารที่แตกต่างกัน พบว่าน้ำหนักหนูขาวเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยง โดยในกลุ่ม NPD และกลุ่ม HFD มีน้ำหนักไม่แตกต่างกันทั้งในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 (วันที่ 14 และ 21) หลังจากเลี้ยงด้วยอาหารแตกต่างกัน 3 สัปดาห์ (วันที่ 28) พบว่าน้ำหนักหนูขาวกลุ่ม NPD และ HFD เพิ่มขึ้น โดยมีน้ำหนักหนูกลุ่ม HFD (346.25 ± 17.28 g) มากกว่ากลุ่ม NPD (311.25 ± 20.27 g) ($p < 0.01$) (ดัง Figure 1)

เมื่อตัดแยก epididymal fat pads ของหนูออกมาและชั่งน้ำหนักพบว่า หนูกลุ่ม HFD มีน้ำหนักของ epididymal fat pads มากกว่ากลุ่ม NPD ($p < 0.01$) ดัง Table 1

1.2 ผลของไฮโคลอัลลิอินต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว

โดยทำการศึกษาในเซลล์ไขมันจากหนูขาว 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม NPD และ HFD ที่สภาวะปกติ basal lipolysis และสภาวะ ISO-induced lipolysis ซึ่งผลการสลายตัวของไขมันที่เกิดขึ้นจะแปรผันตรงกับระดับ FFAs ใน sample media นั้น

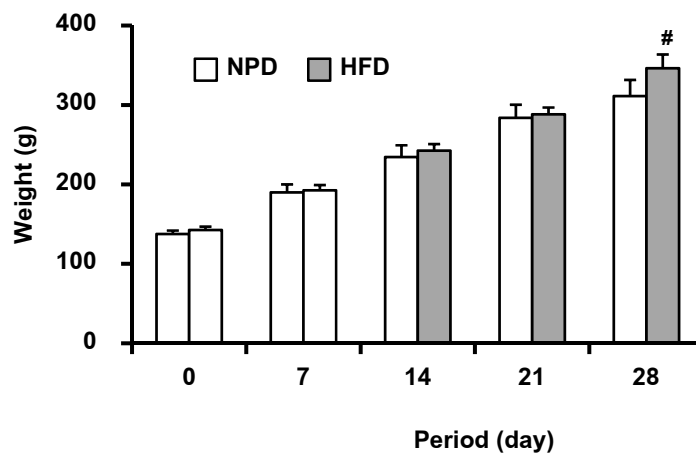


Figure 1 Body weight of Normal Pellet Diet (NPD)-fed rats and High Fat Diet (HFD)-fed rats for 0, 7, 14, 21, and 28 days. Each value represent the mean \pm SD (n=8). [#] $p < 0.01$, mean value was significantly different from NPD-fed group at the same period.

Table 1 Epididymal fat pads weight of NPD-fed rats and HFD-fed rats at day 28

Group	Weight of Epididymal fat pads (g) (mean \pm S.D.; n=8)	
	Weight	Relative weight / 100 g body weight
Normal Pellet Diet (NPD)-fed rats	4.20 \pm 0.81	1.35 \pm 0.26
High Fat Diet (HFD)-fed rats	8.53 \pm 1.52 [#]	2.46 \pm 0.39 [#]

Each value represent the mean \pm SD (n=8). [#] $p < 0.01$ mean value was significantly different from NPD-fed group

1.2.1 ที่สภาวะ basal lipolysis (ตั้ง

Figure 2)

กลุ่มควบคุม (ไม่มีไซโคลอัลลิอิน) หนูกลุ่ม NPD มีระดับ FFAs เท่ากับ 327.23 \pm 47.08 μ M/ml packed cell volume/h ไซโคลอัลลิอินที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 μ M พบว่ามีระดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

กลุ่มควบคุมของหนูกลุ่ม HFD มีระดับ FFAs เท่ากับ 330.82 \pm 13.06 μ M/ml packed cell volume/h ซึ่งระดับ FFAs นี้ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่ม NPD ที่สภาวะเดียวกัน และเมื่อเติมสารไซโคลอัลลิอินที่ความเข้มข้น 0.01 ถึง 100 μ M พบว่าระดับของ FFAs ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

1.2.2 ที่สภาวะ isoprenaline (ISO)-induced lipolysis (ตั้ง Figure 3)

สำหรับเซลล์ไขมันของหนูกลุ่ม NPD นั้นพบว่า 0.1 μ M isoprenaline (ISO) สามารถกระตุ้นการ

สลายไขมันได้โดยทำให้ระดับ FFAs (651.03 \pm 31.98 μ M/ml packed cell volume/h) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนู NPD ในสภาวะ basal lipolysis และเช่นกันกับเซลล์ไขมันของหนูกลุ่ม HFD พบว่า Isoprenaline ทำให้ระดับ FFAs (587.12 \pm 93.14 μ M/ml packed cell volume/h) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนู HFD ในสภาวะ basal lipolysis แต่ไม่แตกต่างจากหนูกลุ่ม NPD ในสภาวะ ISO-induced lipolysis

ในสภาวะ ISO-induced lipolysis เซลล์ไขมันจากหนูกลุ่ม NPD ไซโคลอัลลิอินที่ 1, 10 และ 100 μ M มีระดับ FFAs (581.47 \pm 67.79, 575.30 \pm 28.95 และ 555.77 \pm 45.53 μ M/ml packed cell volume/h ตามลำดับ) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่หนูกลุ่ม HFD ไซโคลอัลลิอินที่ 0.01 ถึง 100 μ M พบว่าระดับ FFAs ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

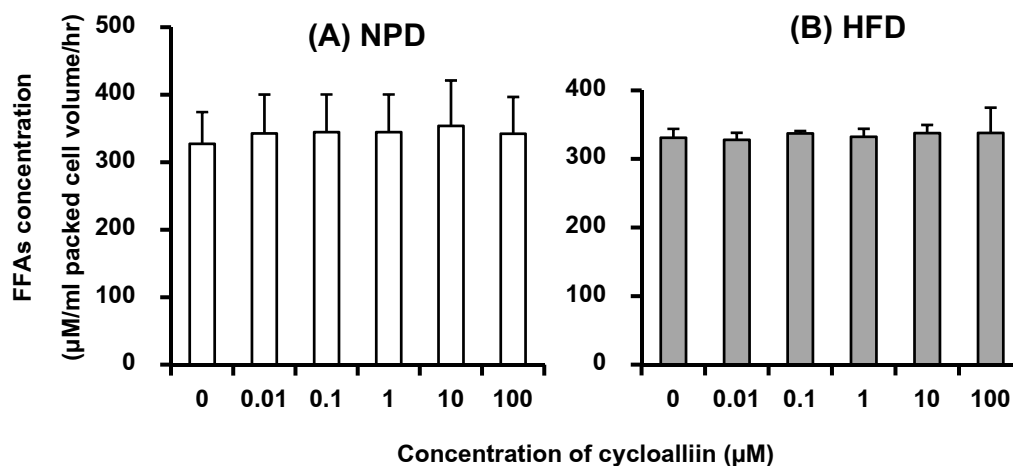


Figure 2 Effect of cycloalliin on basal lipolysis in the adipocytes derived from (A) NPD-fed rats and (B) HFD-fed rats. Each value represent the mean \pm SD (n=5).

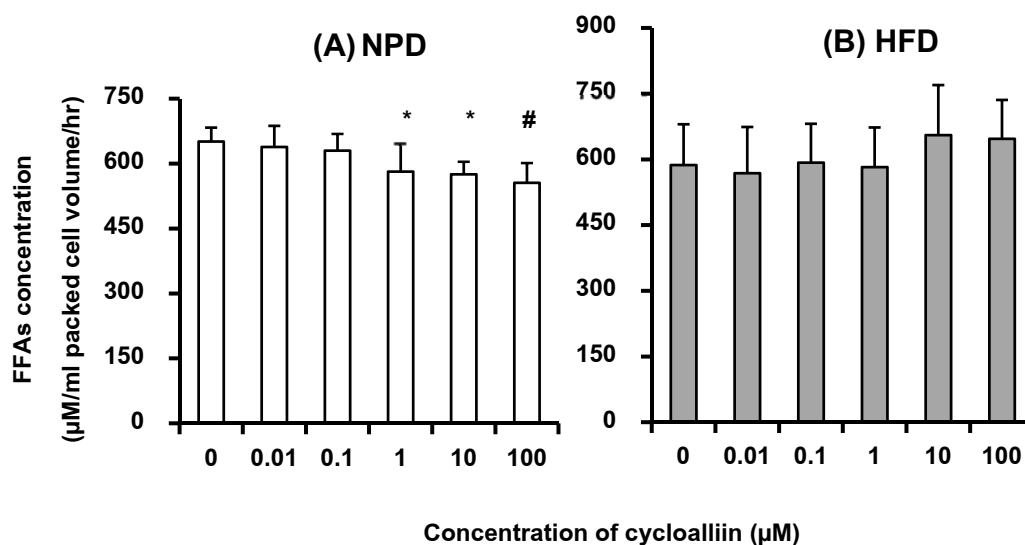


Figure 3 Effect of cycloalliin on ISO-induced lipolysis in the adipocytes derived from (A) NPD-fed rats and (B) HFD-fed rats. Each value represent the mean \pm SD (n=5). * $p < 0.05$, # $p < 0.01$, mean value was significantly different from control group.

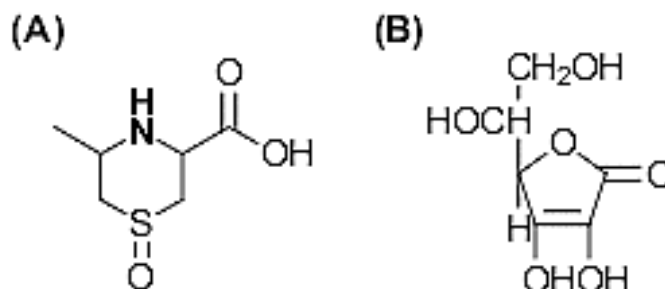


Figure 4 Chemical structure of (A) cycloalliin and (B) ascorbic acid

2. ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

2.1 DPPH assay (ดัง Table 2)

สารมาตรฐาน ascorbic acid ที่ 0.1 ถึง 1,000 μM พบว่าสามารถเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH ได้อย่างรวดเร็วแบบ concentration-dependent manner เกิดปฏิกิริยาได้ตั้งแต่ที่เวลาเริ่มต้นการทดสอบ ที่เวลา 60 นาทีเริ่มถึงช่วงการตอบสนองที่สภาวะคงที่ (steady state)

และเมื่อเวลาผ่านไปค่าการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ในขณะที่ไซโคลอัลลิอินพบว่าเกิดปฏิกิริยากับ DPPH ได้ช้า และอัตราการเกิดปฏิกิริยาค่ามาก ที่ 10 ถึง 1,000 μM พบว่าที่เวลา 30 นาทียังไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ DPPH ได้ และที่ 60 นาทีไซโคลอัลลิอิน 1,000 μM เริ่มเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH ได้โดยมี %inhibition เพียง 5.20 ± 2.17 ($p < 0.01$)

Table 2 Percentage of radical scavenging activity (% inhibition), concentration to produce half of the maximum response (IC_{50}), maximum response (R_{max}) of cycloalliin and ascorbic acid (Asc) determined by DPPH assay at different times of reaction period.

Time (minute) ^a	% inhibition of DPPH : Asc (%) ^b					R_{max} (%) ^b	IC_{50} (μM)
	0.1 μM	1 μM	10 μM	100 μM	1,000 μM		
5	-6.48 \pm 0.88	-6.86 \pm 0.75	11.26 \pm 5.37	34.65 \pm 13.39	93.65 \pm 4.11	93.65 \pm 4.11	155.80
30	-8.29 \pm 1.08	-8.29 \pm 2.39	24.26 \pm 4.08	68.18 \pm 9.99	93.98 \pm 0.71	93.98 \pm 0.71	24.56
60	-8.77 \pm 1.54	-8.46 \pm 2.24	30.24 \pm 0.71	95.42 \pm 0.29	94.66 \pm 0.97	95.42 \pm 0.29	14.99
Time (minute) ^a	% inhibition of DPPH : cycloalliin (%) ^b					R_{max} (%) ^b	IC_{50} (μM)
	10 μM	30 μM	100 μM	300 μM	1,000 μM		
5	-5.79 \pm 0.93	-4.97 \pm 0.26	-4.91 \pm 1.03	-4.97 \pm 1.16	-4.78 \pm 1.40	N/A	N/A
30	-6.35 \pm 1.36	-5.45 \pm 1.20	-5.41 \pm 1.22	-4.28 \pm 1.59	-0.74 \pm 1.52	N/A	N/A
60	-6.24 \pm 1.69	-3.47 \pm 1.33	-4.09 \pm 1.42	-1.11 \pm 1.50	5.20 \pm 2.17	N/A	N/A

^a reaction time ^b mean \pm SD (n=5)

2.2 Anti-oxidation assay (ดัง Table 3)

การเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระ linoleic แบบเกิดขึ้นเองเมื่อถูกทิ้งไว้ในบรรยากาศ พบว่ากรดไขมันอิสระ linoleic จะเกิด autooxidation โดยมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น ($p < 0.05$) และที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยา ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และภายหลังจาก 72 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยา เป็นต้นไป การเกิด autooxidation ของกรดไขมันอิสระ linoleic มีแนวโน้มลดลง โดยที่ 120 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยามีค่าการดูดกลืนแสงต่ำมาก คือ 0.05 ± 0.003 ดังนั้นในการทดสอบนี้จึงทำการทดสอบเพียง 5 วัน ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของสารมาตรฐาน BHT ที่ 0.3 และ 3 μM พบว่า BHT มีฤทธิ์ต้านการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในรูปแบบ concentration-dependent manner และที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยา BHT มีฤทธิ์เพิ่มขึ้นตามระยะ

เวลาของการทำปฏิกิริยาและตั้งแต่ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาฤทธิ์จะเริ่มคงที่ ขณะที่ฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันของสารละลายไซโคลอัลลิอินพบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาไซโคลอัลลิอินออกฤทธิ์ได้ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 10 ถึง 100 μM ที่เวลา 48 ชั่วโมงไซโคลอัลลิอินออกฤทธิ์ได้ที่มีความเข้มข้นต่ำลง คือ ตั้งแต่ 0.3 ถึง 100 μM แต่พบว่าฤทธิ์ต้านการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันลดลงเมื่อเวลาผ่านไป (% inhibition ค่อย ๆ ลดลง) เมื่อเปรียบเทียบกับไซโคลอัลลิอินกับ BHT ที่ 24 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาพบว่าไซโคลอัลลิอินที่ 30 และ 100 μM ฤทธิ์ใกล้เคียงกับ BHT ที่ 3 μM ($p > 0.05$) และที่ 48 ชั่วโมงของการทำปฏิกิริยาพบว่าไซโคลอัลลิอินที่ 10 และ 30 μM มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ BHT ที่ 0.3 μM ($p > 0.05$) และฤทธิ์ของไซโคลอัลลิอินที่ 100 μM ใกล้เคียงกับ BHT ที่ 3 μM ($p > 0.05$)

Table 3 Percentage of anti-oxidation activity (% inhibition) of cycloalliin and butylated hydroxytoluene (BHT) determined from oxidation products of linoleic acid free fatty acid at different time of incubation period.

Time (h) ^a	% inhibition of autooxidation (%) ^b							
	BHT (μM)		Cycloalliin (μM)					
	0.3	3.0	0.3	1.0	3.0	10.0	30.0	100.0
24	27.13 ±8.28	47.69 ±4.42	-9.52 ±5.41	-19.52 ±23.65	-19.65 ±23.65	43.84 ±26.30	51.42 ±5.81	68.12 ±16.38
48	44.75 ±5.25	61.03 ±3.39	14.57 ±2.52	10.66 ±4.88	20.92 ±7.13	35.74 ±7.93	44.44 ±3.01	64.49 ±11.60
72	59.57 ±11.41	78.31 ±6.49	6.09 ±0.41	10.00 ±4.99	19.37 ±1.44	22.51 ±3.01	30.47 ±6.16	42.22 ±11.14
96	49.85 ±7.40	70.20 ±4.29	-17.10 ±8.13	1.19 ±12.95	-21.85 ±5.41	7.08 ±28.04	-0.88 ±19.20	3.41 ±2.70
120	56.53 ±18.75	83.65 ±6.72	-24.72 ±0.81	24.81 ±2.02	-9.03 ±16.27	36.00 ±27.27	-5.58 ±39.68	19.96 ±5.65

^a incubation period ^b mean±SD (n=3)

วิจารณ์และสรุปผล

ในการทดสอบผลต่อการสลายไขมันเมื่อพิจารณาน้ำหนักตัวหนูขาวกลุ่ม NPD และ HFD ในวันที่ 7, 14 และ 21 พบว่าไม่แตกต่างกัน ขณะที่ในวันที่ 28 น้ำหนักตัวหนูแตกต่างกัน ($p < 0.01$) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Pulbutr และคณะ (2011) ความผันผวนของข้อมูลน้ำหนักนี้สามารถพบได้ในช่วงการเลี้ยงตั้งแต่ 2 - 4 สัปดาห์ (Srinivasan et al., 2005) ทั้งนี้การที่หนูขาวกลุ่ม HFD มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนูกลุ่ม NPD นั้น เนื่องจากอาหารไขมันสูงมีส่วนประกอบของไขมันอิ่มตัว (lard) จึงทำให้กลุ่มหนู HFD มีน้ำหนักตัวมากกว่าหนู NPD (Srinivasan et al., 2005) และสำหรับน้ำหนักของ epididymal fat pads ในผลการศึกษานี้พบว่ากลุ่ม HFD มีค่ามากกว่ากลุ่ม NPD ($p < 0.01$) สอดคล้องกับ Pulbutr และคณะ (2011)

เพื่อพิจารณารูปแบบการทดสอบก่อนการพิจารณาผลการศึกษานั้น ผลการศึกษานี้ในกลุ่มควบคุม เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม NPD และ HFD พบว่าการสลายไขมันของหนูขาวทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน (ทั้งในสภาวะ basal lipolysis และ ISO-induced lipolysis) ซึ่งสอดคล้องกับ Pulbutr และคณะ (2011) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างสองสภาวะคือ basal lipolysis และ ISO-induced lipolysis พบว่า isoprenaline สามารถเพิ่มการสลายไขมันในเซลล์ไขมันได้ isoprenaline มีกลไกเป็น non-selective beta-adrenergic receptor agonist ส่งผลให้ระดับ cAMP ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ HSL ในการสลายไขมัน (Zechner et al., 2009; Zim-

mermann et al., 2009) ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis มี การสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาวสูงกว่าสภาวะ basal lipolysis ($p < 0.05$) (ทั้งในหนูกลุ่ม NPD และ HFD) โดยหนูกลุ่ม NPD และ HFD ในสภาวะ ISO-induced lipolysis มีระดับ FFAs เพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 198.95 และ 177.47 ของสภาวะ basal lipolysis ตามลำดับ สอดคล้องกับ Pulbutr และคณะ (2011) และ Zhang และคณะ (2009) ที่ในสภาวะ ISO-induced lipolysis ระดับ FFAs เพิ่มเป็นร้อยละ 191 และ 196 ของสภาวะ basal lipolysis ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาผลของไซโคลอัลลิอินต่อการสลายไขมันพบว่าไซโคลอัลลิอินที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่ม NPD ที่สภาวะ ISO-induced lipolysis (แต่ไม่มีผลต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูกลุ่มเดียวกันที่สภาวะ basal lipolysis อีกทั้งไม่มีผลต่อการสลายไขมันของกลุ่ม HFD ในทั้งสองสภาวะ) ฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายไขมันที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 μM ทำให้ระดับการสลายไขมันลดลงเหลือร้อยละ 89.31, 88.37 และ 85.37 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ จากองค์ความรู้ที่ว่าการสลายไขมันจะทำให้ระดับ FFAs ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น และ FFAs มีผลต่ออัตราการเกิด gluconeogenesis และมีผลต่อ hepatic clearance ของ insulin ซึ่งส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น จนอาจเกิดภาวะ insulin resistance และพัฒนาเป็นโรคเบาหวานได้ (Avram et al., 2005; Goossens, 2008) insulin เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันได้โดยไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ phosphodiesterase type 3B

(PDE3B) ส่งผลให้ cAMP ลดลง จึงลดการ hydrolyze TG ทำให้ลดการปลดปล่อย FFAs จาก adipocytes (Zechner et al., 2009) อีกทั้ง Zhang และคณะ (2009) ศึกษาพบว่า metformin มีกลไกการลดระดับน้ำตาล โดยการยับยั้งการสลายไขมันของเซลล์ไขมันที่ได้รับ isoprenaline ได้เช่นกัน โดยทำให้การทำงานของ PKA และ MAPK1/3 ลดลง และส่งผลลดระดับ cAMP ไชโคลอัลลิอินเป็นสารประกอบออร์แกโนซิลเฟออร์ที่พบมากในผลกระเทียมและหอมหัวใหญ่ (Ueda et al., 1994; Allison et al., 2006) แม้จะยังไม่มียารายงานผลของไชโคลอัลลิอินต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยตรง แต่จากข้อมูลพบว่าหอมหัวใหญ่และกระเทียมมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่สามารถลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด และลดความอ้วนได้ (Ozougwu et al., 2011; Yoshinari et al., 2012; Zeng et al., 2017) ประกอบกับสารประกอบในกลุ่มออร์แกโนซิลเฟออร์หลายชนิดในหอมหัวใหญ่และกระเทียม พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และบางการศึกษาพบฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือด (Sheela and Augusti, 1992; Kumari and Augusti, 1994; Hsu et al., 2004) ข้อมูลที่กล่าวมาทำให้เห็นความเป็นไปได้ว่าสารไชโคลอัลลิอินอาจมีบทบาทในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดและรักษาเบาหวานได้ โดยกลไกส่วนหนึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสลายไขมัน และน่าสนใจศึกษาผลของสารนี้ต่อระดับ cAMP และ signaling pathway ที่เกี่ยวข้อง เพราะฤทธิ์บางอย่างอาจคล้ายกับอินซูลินหรือ metformin รวมถึงควรศึกษาผลต่อระดับน้ำตาลในเลือดในสัตว์ทดลองต่อไป เมื่อ Lipid metabolism เกี่ยวข้องกับการสลายไขมันที่สะสมในเซลล์ไขมันเป็นพลังงาน โดยอาศัยเอนไซม์ HSL ทำให้ไขมัน TG เปลี่ยนเป็น FFAs และ glycerol ซึ่ง FFAs ในเลือดจะจับกับโปรตีนเพื่อนำส่ง ไปที่อวัยวะต่างๆ ของร่างกาย FFAs จะเข้าสู่เซลล์และไม่โตคอนเดรียเพื่อย่อยสลายให้ได้พลังงานด้วยปฏิกิริยา β -oxidation หากมีระดับ FFAs ในเลือดที่สูงแต่การเผาผลาญเป็นพลังงานไม่ทันจะทำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติได้ พบว่าในคนที่มีความอ้วนมี perilipin expression ลดลง (perilipin เป็นโปรตีนที่ช่วยหุ้ม lipid droplets ป้องกัน HSL เปลี่ยน TG ให้เป็น FFAs) ส่งผลให้ร่างกายเกิดกระบวนการ lipolysis เพิ่มขึ้นและมีระดับ FFAs เพิ่มขึ้น (Wang et al., 2003; Zechner et al., 2009; Zimmermann et al., 2009; Wang et al., 2011) ทำให้ระดับไขมันในเลือดผิดปกติ (dyslipidemia) ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญของการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ และ metabolic syndrome (Wajchenberg, 2000; Langin, 2006) ยาไนอาซิน (niacin) ซึ่งเป็นยาลดระดับไขมันในเลือดที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันโดยยาจะจับกับ nicotinic receptor ในเซลล์ไขมัน

ส่งผลทำให้การทำงานของ adenylyate cyclase ลดลง cAMP ลดลง ลดการทำงานของ HSL นำไปสู่การยับยั้งการสลายไขมัน และการลดระดับไขมัน TG, LDL-cholesterol, total cholesterol ในเลือด (Schandelmaier et al., 2007) ดังนั้นการลดกระบวนการสลายไขมันจึงทำให้ระดับไขมันในเลือดลดลงได้ การที่ผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าไชโคลอัลลิอินสามารถยับยั้งกระบวนการสลายไขมัน ดังนั้นสารไชโคลอัลลิอินอาจจะมีฤทธิ์ในการช่วยลดระดับไขมันในเลือดได้เช่นกัน ประกอบกับข้อมูลผลการศึกษาของ Yanagita และคณะ (2003) ที่พบว่าการผสมไชโคลอัลลิอินในอาหารไขมันสูงให้หนูขาวรับประทานนาน 2 สัปดาห์สามารถลด TG ในเลือดได้ โดยขนาดร้อยละ 0.1 และ 0.3 ของปริมาณอาหารทั้งหมด ทำให้ระดับ TG ในเลือดลดลงถึงร้อยละ 39 และ 44 ของกลุ่มควบคุม ตามลำดับ อย่างไรก็ตามไชโคลอัลลิอินไม่มีผลต่อระดับไขมันชนิดอื่นๆ อีกทั้งไม่มีผลต่อไขมันในตับ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ซึ่งใช้ในการสังเคราะห์ TG ที่ตับ โดยได้อภิปรายผลไว้ว่าการที่ไชโคลอัลลิอินสามารถลดระดับไขมันในเลือดได้นั้นไม่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสังเคราะห์ TG ข้อมูลที่กล่าวมาทำให้เห็นว่าไชโคลอัลลิอินน่าจะมีส่วนต่อ lipid metabolism และมีฤทธิ์ลดระดับไขมันในเลือดได้โดยเฉพาะในกลไกการยับยั้งการสลายไขมัน ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์นี้ เช่น ผลต่อ nicotinic receptor เป็นต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าไชโคลอัลลิอินมีผลยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว NPD ในสภาวะ ISO-induced lipolysis โดยไม่ปรากฏฤทธิ์กับเซลล์ไขมันจากหนูกลุ่ม HFD ในสภาวะเดียวกัน อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ไขมันจากหนูทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างของกลไกการออกฤทธิ์ จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเซลล์ไขมันจากหนูกลุ่ม HFD ที่สภาวะ epinephrine-induced lipolysis มีการสลายไขมันลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม NPD เนื่องจากหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูงจะทำให้เกิดความบกพร่องของ adrenergic receptor signaling และลดกระบวนการ phosphorylation ของ HSL ทำให้กระบวนการสลายไขมันเกิดได้ลดลง (Gaidhu et al., 2010) และจากการศึกษาของ Bost และคณะ (2005) พบว่าเซลล์ไขมันส่วน WAT จากหนูกลุ่มที่ HFD นั้น ERK pathway (มีบทบาทต่อการควบคุมการสลายไขมัน) สามารถถูกกระตุ้นได้มากกว่ากลุ่มหนู NPD ส่งผลให้เซลล์ไขมันจากหนู HFD เกิดการกระตุ้นกระบวนการสลายไขมันมากขึ้น จากข้อมูลข้างต้นการที่สารไชโคลอัลลิอินไม่สามารถออกฤทธิ์ในเซลล์ไขมันของหนูกลุ่ม HFD อาจเพราะกลไกการออกฤทธิ์ของไชโคลอัลลิอินมีความเกี่ยวข้องกับ adrenergic receptor signaling และกระบวนการ phosphorylation ของ HSL หรือเกี่ยวกับ ERK

pathway ก็เป็นไปได้ เมื่อกลไกดังกล่าวถูกเปลี่ยนแปลงไปจากปกติในหนูกลุ่ม HDL ดังนั้นฤทธิ์ของไซโคลอัลลิอินจึงไม่สามารถทำงานได้ ควรศึกษากลไกนี้เพิ่มเติมต่อไป อีกทั้งในผลการศึกษาคั้งนี้ที่พบว่าไซโคลอัลลิอินไม่พบฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายไขมันในเซลล์ไขมันในสภาวะ basal lipolysis ของทั้งหนู NPD และ HFD สาเหตุอาจเป็นเพราะเซลล์ไขมันที่สภาวะ ISO-induced lipolysis จะเพิ่มระดับการสลายไขมันและระดับ FFAs ทำให้การแสดงออกของฤทธิ์ยับยั้งการสลายไขมันของไซโคลอัลลิอินปรากฏได้ชัดเจนมากกว่าที่สภาวะ basal lipolysis ที่เซลล์ไขมันไม่ได้รับการกระตุ้นการเพิ่มการสลายไขมัน

DPPH assay เป็นวิธีการทดสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชันที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายเพราะสะดวกและทำได้ง่าย วิธีนี้ใช้พิจารณาความสามารถในการเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH (scavenging capacity) ซึ่งเป็นกลไกการทำงานแบบหนึ่งของสารต้านอนุมูลอิสระ (Valko et al., 2006) DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียรไม่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเหมือนอนุมูลอิสระทั่วไปเพราะมีโครงสร้างที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวที่ถูกบดบังด้วยวงแหวน (benzene ring) 3 วงทำให้ยากต่อการเกิดปฏิกิริยา (Molyneux, 2004) สารต้านอนุมูลอิสระบางชนิดอาจไม่สามารถทำปฏิกิริยากับ DPPH ได้ หรือเกิดปฏิกิริยาได้ช้ากว่าความเป็นจริง ทั้งนี้ขึ้นกับโครงสร้างทางเคมีของสาร (Brand-Williams et al., 1995) ascorbic acid เป็นสารมาตรฐานที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและเป็นสารที่มี scavenging capacity ที่ดี (Valko et al., 2006) จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ascorbic acid 10 ถึง 1,000 μM สามารถเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระ DPPH ในรูปแบบขึ้นกับความเข้มข้นและถึง steady state ภายใน 60 นาที มีค่า IC_{50} (30 นาที) เท่ากับ 24.56 μM ซึ่งค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของการศึกษาอื่นๆ ที่มีค่า IC_{50} ประมาณ 25-29 μM (Hasan et al., 2009; Hassine et al., 2012) ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารไซโคลอัลลิอินพบว่าที่ 1,000 μM สามารถเข้าจับและยับยั้งอนุมูลอิสระที่เสถียร DPPH ได้ที่เวลา 60 นาทีเป็นต้นไป และมีฤทธิ์เพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาผ่านไป % inhibition ของไซโคลอัลลิอิน (ที่ 60 นาที) มีค่าเพียงร้อยละ 5.20 \pm 2.17 จากโครงสร้างของไซโคลอัลลิอินที่มีวงแหวน 6 เหลี่ยม 1 วงและมีหมู่ carboxylic acid 1 หมู่ (Ichikawa et al., 2006) ซึ่งแตกต่างจาก ascorbic acid ที่มีวงแหวน 5 เหลี่ยม 1 วงที่มีหมู่ hydroxyl ถึง 4 หมู่ (Valko et al., 2006) ดัง Figure 4 โดยปกติหมู่ hydroxyl เป็นหมู่ที่มีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนกับสารอื่นได้ดี สารที่มีจำนวนหมู่ hydroxyl มากขึ้นจะ scavenge กับ DPPH ได้ดีขึ้น (Brand-Williams et al., 1995) จากข้อมูลข้างต้นยังไม่สามารถสรุปได้ว่าไซโคลอัลลิอินเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์อ่อน

(weak antioxidant) เนื่องจาก DPPH assay เป็นวิธีทดสอบฤทธิ์ในกลไกที่เป็น radical scavenging เท่านั้น และจากการศึกษาของ Xiao และ Parkin (2002) พบว่าไซโคลอัลลิอินมีผลต่อเอนไซม์ quinone reductase ซึ่งเอนไซม์นี้จัดเป็นเอนไซม์ใน phase II metabolism ที่ช่วยให้สารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายทำงานได้ดีขึ้น (Hedges and Lister, 2007) ดังนั้นไซโคลอัลลิอินยังอาจมีฤทธิ์อื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ

ในการทดสอบ anti-oxidation assay พบว่าการดักไขมันอิสระ linoleic เกิด autooxidation ได้และเมื่อทิ้งไว้ 24, 48 และ 72 ชั่วโมงพบว่าระดับการเกิด autooxidation ใน 3 ช่วงเวลาดังกล่าวอยู่ในระดับไม่ต่างกัน และที่ 96 ชั่วโมงพบว่าเกิดการเกิด autooxidation เริ่มลดลง ซึ่งผลเป็นไปในทางเดียวกับการศึกษาอื่นๆ ที่การเกิดออกซิเดชันของไขมันนั้นจะเพิ่มขึ้นในช่วง 24 และ 48 ชั่วโมง (Ardestani and Yazdanparast, 2007; Siddhuraju and Becker, 2007) เนื่องจากเมื่อเวลาผ่านไป LOOH ที่เกิดขึ้นบางส่วนจะเกิดปฏิกิริยาต่อเนื่องไปเป็น secondary product ที่ไม่สามารถวัดได้ด้วยวิธี ferric thiocyanate (Rahmat et al., 2003) BHT หรือ synthetic analog ของวิตามินอีใช้เป็นสารมาตรฐานเนื่องจากเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันที่ดี (Asgarpanah et al., 2011; Nugraheni et al., 2011) ผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า BHT ที่ 0.3 และ 3 μM มีฤทธิ์ต้านการเกิด autooxidation ในรูปแบบขึ้นกับความเข้มข้น ความสามารถในการยับยั้งการเกิด autooxidation เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในช่วง 72 ชั่วโมงแรก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ (Asgarpanah et al., 2011; Nugraheni et al., 2011) ผลการทดสอบฤทธิ์ของไซโคลอัลลิอินพบว่าที่ความเข้มข้น 10 ถึง 100 μM มีฤทธิ์ต้านการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ที่เวลา 24 ชั่วโมงไซโคลอัลลิอินมีค่า % inhibition ใกล้เคียงกับ BHT โดยมีฤทธิ์น้อยกว่าประมาณ 10-30 เท่า เมื่อเวลาผ่านไปพบว่าความสามารถในการต้านการเกิด autooxidation ของไซโคลอัลลิอินค่อยๆ ลดลง เมื่อภาวะที่มีไขมันและน้ำตาลในเลือดสูงเกี่ยวข้องกับการเกิดลิปิดออกซิเดชัน (Yang et al., 2008 ; Arora et al., 2013) การที่ไซโคลอัลลิอินมีฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ จึงอาจจะมีประโยชน์ในการช่วยป้องกันอันตรายจากภาวะดังกล่าวได้

การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบ *in vitro* ที่พบว่าไซโคลอัลลิอินสามารถยับยั้งการสลายไขมันและมีฤทธิ์ต้านลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ควรมีการศึกษาให้เข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการสลายไขมัน หรือฤทธิ์ลดระดับไขมันและน้ำตาลในเลือด รวมถึงการศึกษาใน *in vivo* ในด้านฤทธิ์และความเป็นพิษเพิ่มเติมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารอ้างอิง

1. อธิกา จารุโชติกมล, ปวีตรา พูลบุตร, จริญญาพร เพรศแก้ว และคณะ.ฤทธิ์ของสารสกัดใบมะรุมต่อการสลายไขมันในเซลล์ไขมันจากหนูขาว วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2556;32(2):129-39.
2. อธิกา จารุโชติกมล, พัชรวิทย์ ปั่นเหนงเพชร, วีรพล คู่คง วิริยพันธุ์, และคณะ. ฤทธิ์ต้านไลโปโปรตีนออกซิเดชันและต้านออกซิเดชันของสารสกัดผักแพว. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม 2554;30(3):249-61.
3. Adly A. oxidative stress & disease:an updated review. Res J Immunol2010;3(2):129-45.
4. Agarwal RK, Dewar HA, Newell DJ, Das B. Controlled trial of the effect of cycloalliin on the fibrinolytic activity of venous blood. Atherosclerosis 1977;27(3):347-51.
5. Allison GL, Lowe GM, Rahman K. Aged garlic extract and its constituents inhibit platelet aggregation through multiple mechanisms. J Nutr 2006;136(3 Suppl):782S-8S.
6. Ardestani A, Yazdanparast R. Antioxidant and free radical scavenging potential of Achillea santolina extracts. Food Chem 2007;104:21-9.
7. Arora R, Vig AP, Arora S. Lipid Peroxidation: A Possible Marker for Diabetes. Diabetes Metab 2013;S11:007
8. Asgarpanah J, Motamed S, Farzaneh A, et al. Antioxidant activity and total phenolic and flavonoid content of *A. squarrosus* Bunge. Afr J Biotechnol 2011;10(82):19176-80.
9. Avram AS, Avram MM, James WD. Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. J Am Acad Dermatol 2005;53(4):671-83.
10. Bost F, Aouadi M, Caron L, et al. The extracellular signal-regulated kinase isoform ERK1 is specifically required for in vitro and in vivo adipogenesis. Diabetes 2005 Feb;54(2): 402-11.
11. Brand-Williams W, Cuvelier M, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Lebenson Wiss Technol1995;2825-30.
12. Gaidhu MP, Anthony NM, Patel P, et al. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. Am J Physiol Cell Physiol 2010; 298:961-71.
13. Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. Physiol Behav 2008; 94(2):206-18.
14. Hasan R, Hossain M, Akter R, et al. DPPH free radical scavenging activity of some Bangladeshi medicinal plants. J Med Plant Res 2009;3(11):875-9.
15. Hassine D, Abderrabba M, Yvon Y, et al. Chemical composition and *in vitro* evaluation of the antioxidant and antimicrobial activities of *Eucalyptus gillii* essential oil and extracts. Molecules 2012;17:9540-58.
16. Hedges LJ, Lister CE. The nutritional attributes of Allium speccise. Christchurch New Zealand: Institute for crop & food research limited; 2007.
17. Hsu CC, Yen HF, Yin MC, et al. five cysteine-containing compounds delay diabetic deterioration in Balb/c mice. J Nutr. 2004 Dec;134(12):3245-9.
18. Ichikawa M, Mizuno I, Yoshida J, et al. Pharmacokinetics of cycloalliin, an organosulfur compound found in garlic and onion, in rats. J Agric Food Chem 2006; 54(26):9811-9.
19. Kim S, Moustaid-Moussa N. Secretory, endocrine and autocrine/paracrine function of the adipocyte. J Nutr 2000;130:3110S-5S.
20. Kumari K, Augusti KT. Antidiabetic effects of s-methylcysteine sulphoxide on alloxan diabetes. Planta Med 1994;61(1):72-4.
21. Langin D. Adipose tissue lipolysis as a metabolic pathway to define pharmacological strategies against obesity and the metabolic syndrome. Pharmacol Res 2006;53(6):482-91.
22. Meriga B, Mopuri R, Muralikrishna T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of *Allium sativum*. Asian Pac J Trop Med 2012;5(5):391-5.

23. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004;26(2):211-9.
24. Nugraheni M, Santoso U, Wuryastuti H. Potential of *Coleus tuberosus* as an antioxidant and cancer chemoprevention agent. *Int Food Res J* 2011;18(4):1471-80.
25. Ozougwu JC. Anti-diabetic effects of *Allium cepa* (onions) aqueous extracts on alloxan-induced diabetic *Rattus norvegicus*. *J Med Plant Res* 2011;5(7):1134-9.
26. Poulos SP, Hausman DB, Hausman GJ. The development and endocrine functions of adipose tissue. *Mol Cell Endocrinol* 2010; 323(1):20-34.
27. Pulbutr P, Jaruchotikamol A, Cushnie B, et al. Antilipolytic, alpha-amylase inhibitory and antioxidant activities of *Pseuderanthemum palatiferum* (Nees) Radlk. leaf ethanolic extract. *J Med Plant Res* 2014;8(28):967-74.
28. Pulbutr P, Thunchomnang K, Lawa K, et al. Lipolytic effects of zingerone in adipocytes isolated from normal diet-fed rats and high fat diet-fed rats. *Int J Pharm* 2011;7(5):629-34.
29. Rahmat A, Kumar V, Fong L, et al. Determination of total antioxidant activity in three types of local vegetables shoots and the cytotoxic effect of their ethanolic extracts against different cancer cell lines. *Asia Pac J clin nutr* 2003;12(3):308-11.
30. Schandelmaier S, Briel M, Saccilotto R, et al. Nicotin for primary and secondary prevention of cardiovascular events. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017 Jun 14;6:CD009744.
31. Sheela CG, Augusti KT. Antidiabetic effects of S-allyl cysteine sulphoxide isolated from garlic *Allium sativum* Linn. *Indian J Exp Bio* 1992; 30(6):523-6.
32. Siddhuraju P, Becker K. The antioxidant and free radical scavenging activities of processed cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.) seed extracts. *Food Chem* 2007;101:10-9.
33. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, et al. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res* 2005;52(4):313-20.
34. Ueda Y, Tsubuku T, Miyazima R. Composition of sulfur-containing components in onion and their flavor characters. *Biosci Biotech Biochem* 1994; 58:108-10.
35. Valko M, Rhodes C, Moncola J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico Biol Interac* 2006;160:1-40.
36. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev* 2000;21:697-738.
37. Wang H, Sreenevasan U, Hu H, et al. Perilipin 5, lipid droplet associated protein provides physical and metabolic linkage to mitochondria. *J Lipid Res* 2011;52(8):1-40.
38. Wang Y, Sullivan S, Trujillo M, et al. Perilipin expression in human adipose tissues: effects of severe obesity, gender, and depot. *Obes Res* 2003;11:930-6.
39. Xiao H, Parkin K. Antioxidant functions of selected *Allium* thiosulfinates and s-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides. *J Agric Food Chem* 2002;50:2488-93.
40. Yanagita T, Han S, Wang Y, et al. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. *Nutrition* 2003;19(2):140-3.
41. Yang R, Shi Y, Hao G, et al. Increasing oxidative stress with progressive hyperlipidemia in human: relation between malondialdehyde and atherogenic index. *J Clin Biochem Nutr* 2008 November;43:154-8.
42. Yoshinari O, Shiojima Y, Igarashi K. Anti-obesity effects of onion extract in Zucker diabetic fatty rats. *Nutrients*. 2012 Oct 22;4(10):1518-26.
43. Zechner R, Kienesberger PC, Haemmerle G, et al. Adipose triglyceride lipase and the lipolytic catabolism of cellular fat stores. *J Lipid Res* 2009;50:1-10.
44. Zeng Y, Li Y, Yang J, et al. Therapeutic Role of Functional Components in Alliums for Preventive Chronic Disease in Human Being. *Evid Based Complement Alternat Med eCAM* 2017;2017:9402849.
45. Zhang T, He J, Xu C, et al. Mechanisms of metformin inhibiting lipolytic response to isoproterenol in

primary rat adipocytes. *J Mol Endocrinol.* 2009;42(1):57-66.

46. Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R. Fate of fat: the role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1791(6):494-5