

ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อภาวะดื้ออินซูลินของหนูแรทที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง



นางสาววรรณพร สุวรรณเพชร

ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT (*VITIS VINIFERA*) ON INSULIN RESISTANCE
IN HIGH FRUCTOSE-FED RATS



Miss Wannaporn Suwannaphet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University


Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511152

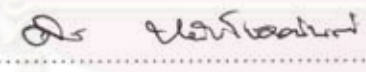
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อภาวะดีอินซูลินของ
หนูแรทที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
โดย นางสาววรรณพร สุวรรณเพชร
สาขาวิชา เกษษวิทยา (สหสาขาวิชา)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม อาจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

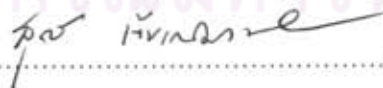
..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ไสภิต ธรรมอาวี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมิ่งคล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลินดา จุฬาโรจน์มนตรี)

วรรณพร สุวรรณเพชร : ฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อภาวะดื้ออินซูลินของหนูแรทที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง. (EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT (*VITIS VINIFERA*) ON INSULIN RESISTANCE IN HIGH FRUCTOSE-FED RATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร นียบโชคอนันต์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา, 105 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา และ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง สารประกอบเคมีในเมล็ดองุ่นที่สกัดด้วยน้ำพบบ phenolic compounds และปริมาณ flavonoids เท่ากับ 2.16 ± 0.01 และ 0.801 ± 0.059 มก./ก. ตามลำดับ แบ่งกลุ่มการทดลองอย่างสุ่มของหนูปกติออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มควบคุมได้รับอาหารปกติ, กลุ่มที่ 2 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง, กลุ่มที่ 3, 4, 5 ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ตามลำดับ และกลุ่มสุดท้ายได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและเสริมด้วยยา rosiglitazone (4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน) เป็นเวลา 3 สัปดาห์โดยเริ่มต้นจากสัปดาห์ที่ 5 ทดสอบฤทธิ์ในการขจัดน้ำตาลด้วยวิธี oral glucose tolerance test ก่อนสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 1 วัน เจาะเลือดเพื่อวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหาร, ระดับอินซูลิน, ค่าเคมีโลหิต และคำนวณค่า HOMA-IR นอกจากนี้ทำการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ

จากผลการทดลองพบว่า, ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ของการทดลอง ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% มีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อีกทั้งระดับพลาสมาอินซูลินของกลุ่มนี้ยังมีค่าน้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงด้วย ค่า HOMA-IR มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และยา rosiglitazone ในการทดสอบฤทธิ์การขจัดน้ำตาลด้วยวิธี oral glucose tolerance test, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และ 2% รวมทั้งกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาและระดับอินซูลินหลังจากนาที่ที่ 15 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ค่าสารเคมีในเลือดของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ยกเว้นระดับเอนไซม์ทรานส์อะมิโนทรานเฟอเรส (AST) นอกจากนี้ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่น (ขนาด 1 และ 2%) สามารถเพิ่มระดับเอนไซม์ superoxide dismutase และ catalase และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ระดับของกลูตาไธโอนและเอนไซม์ glutathione peroxidase ในเซลล์ตับเพิ่มขึ้นเล็กน้อยแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงเสริมด้วยสารสกัดเมล็ดองุ่นและกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ดังนั้นสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในหนูเบาหวานได้ และเพิ่มระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และยับยั้งการเกิด lipid peroxidation ในตับได้

สาขาวิชา..... ภาควิชา.....
ปีการศึกษา..... 2551.....

ลายมือชื่อนิสิต..... อรรณพร สุวรรณเพชร.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก..... อ.ศิรินทร นียบโชคอนันต์.....
ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม..... อ.ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา.....

4989172020 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORD : GRAPE SEED / INSULIN RESISTANCE / OXIDATIVE STRESS / HIGH FRUCTOSE-DIET

WANNAPORN SUWANNAPHET : EFFECT OF GRAPE SEED EXTRACT (*VITIS VINIFERA*) ON INSULIN RESISTANCE IN HIGH FRUCTOSE-FED RATS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.SIRINTORN YIBCHOK-ANAN, D.V.M., Ph.D., CO-ADVISOR : SIRICHAI ADISAKWATTANA, Ph.D., 105 pp.

The purpose of this study was to investigate the effect of grape seed extract on plasma glucose level and antioxidant enzyme in the liver of insulin resistance diabetic rats induced by high-fructose diet. Aqueous extract of grape seed was found that total phenolic compounds and flavonoids content were 2.16 ± 0.01 and 0.801 ± 0.059 mg/g extract respectively. Normal rats were randomly divided into 6 groups. The control group received a normal diet. Group 2 received a high-fructose diet. Group 3, 4, 5 received the high-fructose diet supplemented with grape seed extract (GSE) 0.5%, 1% and 2%, respectively. The last group received high-fructose diet and rosiglitazone (4 mg/kg/day) was administered for 3 weeks started from the 5th week. Oral glucose tolerance test was performed before the end of the experiment. Blood samples were collected for determining fasting plasma glucose, insulin levels, blood chemistry profiles and calculating of HOMA-IR. In addition, the antioxidant enzyme activities of the liver were measured.

The results showed that, at week 6 and 8 of the experiment, the fasting plasma glucose levels of the high-fructose diet supplemented 1%GSE group were significantly lower than those of the high-fructose diet group. The plasma insulin levels of this group were also significantly lower as compared to high-fructose diet group. HOMA-IR was significantly decreased in high-fructose diet supplemented 1%GSE, 2%GSE, and rosiglitazone. In oral glucose tolerance test, GSE at 1% and 2% as well as rosiglitazone significantly reduced plasma glucose and insulin levels after 15 min of glucose loading. The serum chemistry profiles were not different in comparisons between high-fructose diet supplemented GSE groups and high-fructose diet group, except for triglyceride and aspartate aminotransferase (AST) levels. In addition, GSE supplements (1% and 2%) significantly increased the levels of superoxide dismutase and catalase enzymes and significantly suppressed lipid peroxidation when compared to those in high-fructose diet group. The levels of glutathione and glutathione peroxidase enzymes in the liver lysate were slightly increased, but not significantly different from high-fructose diet supplemented GSE group and high-fructose diet group. In conclusion, GSE at 1% reduced the insulin resistance in diabetic rats and increased the levels of antioxidant enzymes and suppressed lipid peroxidation in the liver.

Field of Study :Pharmacology.....

Student's Signature *Hannaporn Suwannaphet*

Academic Year :2008.....

Advisor's Signature *S. Yibchok-anan*

Co-Advisor's Signature *Sirichai Adisakwattana*

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร นัยปไซคอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมากมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา อาจารย์ประจำคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลินดา จุฬาโรจนมนตรี คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลา และให้คำแนะนำต่างๆที่ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีคุณค่าและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ทนุอุตทมนวิทยานิพนธ์ บัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ทุนสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ของโรงพยาบาลสัตว์เล็ก คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัย

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา ซึ่งให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมา และขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

ศูนย์วิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
1. โรคเบาหวาน.....	4
2. การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน.....	4
3. อินซูลิน.....	6
4. โรคเบาหวานชนิดที่ 2.....	13
5. น้ำตาลฟรุกโตส.....	15
6. อนุมูลอิสระและการเกิดภาวะ Oxidative stress.....	20
7. Rosiglitazone.....	24
8. อังุ่น.....	28
3. วิธีดำเนินการวิจัย.....	32
วัสดุอุปกรณ์.....	32
วิธีดำเนินการทดลอง.....	36
การวิเคราะห์ผลทางสถิติ.....	42
4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	43
การตรวจหาสารประกอบเคมีในสารสกัดจากเมล็ดอังุ่น.....	43
การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดอังุ่นในหนูเบาหวาน	45
ผลของสารสกัดเมล็ดอังุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหาร ของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	45

ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวาน ที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	48
ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ Homeostasis model assessment of basal insulin resistance (HOMA-IR) ของหนูเบาหวานที่เกิด ภาวะดื้ออินซูลิน.....	51
ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อปริมาณการกินอาหาร การดื่มน้ำ และ น้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	54
การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลในเลือดของ หนูเบาหวานโดยการทำให้ oral glucose tolerance test (OGTT).....	57
ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหาร ของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	57
ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่ เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	61
การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับไขมันในเลือด และการทำงานของ ตับและไตในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	65
การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และเอนไซม์ ต้านอนุมูลอิสระในตับ.....	68
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	76
1. สรุปผลและอภิปรายผลการศึกษา.....	76
2. ข้อเสนอแนะ.....	87
รายการอ้างอิง.....	88
ภาคผนวก.....	98
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	105

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2-1	แสดงการจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน.....	5
2-2	แสดงชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส.....	11
2-3	แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน.....	12
2-4	แสดงโครงสร้างสารประกอบเคมีบางชนิดของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น.....	29
3-1	แสดงส่วนประกอบของอาหารสำหรับการทดลอง.....	33
4-1	แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol colorimetric method.....	43
4-2	แสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในเมล็ดองุ่น.....	43
4-3	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	46
4-4	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	49
4-5	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อค่า HOMA-IR ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	52
4-6	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อปริมาณการกินอาหาร การดื่มน้ำ และน้ำหนักตัวในสัปดาห์ที่ 8.....	55
4-7	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการขจัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยการทำให้ OGTT.....	58
4-8	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำให้ OGTT.....	62
4-9	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไตของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	67
4-10	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ.....	70

สารบัญญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	แสดงบทบาทของฮอริโมนอินซูลินต่อเซลล์ไขมัน.....	8
2-2	แสดงกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของอินซูลิน.....	9
2-3	แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟรุกโตสและกลูโคส.....	16
2-4	แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟรุกโตสในการเปลี่ยนเป็นไตรกลีเซอไรด์ในตับ.....	18
2-5	แสดงปฏิกิริยาการกำจัดสารอนุมูลอิสระโดยอาศัยเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ.....	20
2-6	แสดงกลไกการเกิด oxidative stress ในภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสสูง.....	23
2-7	แสดงโครงสร้างทางเคมีของยา Rosiglitazone.....	24
4-1	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	47
4-2	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	50
4-3	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อค่า HOMA-IR ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	53
4-4	แสดงน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์.....	56
4-5	แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำให้ OGTT.....	59
4-6	แสดงพื้นที่ใต้กราฟของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำให้ OGTT.....	60
4-7	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำให้ OGTT.....	63

4-8	แสดงพื้นที่ใต้กราฟของระดับพลาสมาอินซูลินของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการ ขจัดน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดย การทำ OGTT.....	64
4-9	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ malondialdehyde ของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	71
4-10	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	72
4-11	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ catalase ของหนูปกติและ หนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	73
4-12	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ glutathione peroxidase ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	74
4-13	แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ total glutathione ของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน.....	75

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

α	=	Alpha
AGEs	=	Advanced glycation end products
ALK	=	Alkaline phosphates
ALT	=	Alanine aminotransferase
AST	=	Asparate aminotransferase
ATP	=	Adenosine triphosphate
β	=	Beta
BUN	=	Blood urea nitrogen
CAT	=	Catalase
DAG	=	Diacylglycerol
DGAT	=	Diacylglycerol acyltransferase
EIA	=	Enzyme Immunoassay
FFA	=	Free fatty acid
FPG	=	Fasting plasma glucose
GAPDH	=	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GLP-1	=	Glucagon-like peptide-1
GLUT	=	Glucose transporter
G6PD	=	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
GPx	=	Glutathione peroxidase
GSH	=	Reduced glutathione
GSSG	=	Oxidized glutathione
HbA1c	=	Glycosylated hemoglobin
HDL	=	High-density lipoprotein cholesterol
HF diet	=	High fructose diet
HOMA	=	Homeostasis model assessment
HSL	=	Hormone-sensitive lipase
IFG	=	Impaired fasting glucose
IGT	=	Impaired glucose tolerance

IR	=	Insulin receptor
IRS	=	Insulin receptor substrate
IRS-1	=	Insulin receptor substrate-1
LPL	=	Lipoprotein lipase
μ IU/mL	=	Micro unit per millilitre
mM	=	Millimolar
NIDDM	=	Non-insulin dependent diabetes mellitus
OGTT	=	Oral glucose tolerance test
PI-3-kinase	=	Phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	=	Protein kinase C
pmol/L	=	Picomole per millilitre
PPAR- γ	=	Peroxisome proliferator-activated receptor γ
ROS	=	Reactive oxygen species
SEM	=	Standard error of mean
SDS	=	Sodium dodecyl sulfate
SOD	=	Superoxide dismutase
TC	=	Total cholesterol
TG	=	Triglyceride
TNF- α	=	Tumor necrosis factor- α
U	=	Unit
VLDL	=	Very low density lipoprotein
กก.	=	กิโลกรัม
ดล.	=	เดซิลิตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มล.	=	มิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่พบบ่อยที่สุดในโรคทางระบบต่อมไร้ท่อ มีผลกระทบ ต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยทั้งทางสภาพร่างกาย และจิตใจ แนวโน้มของจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวาน มีเพิ่มมากขึ้นทุกปี โรคเบาหวานมีลักษณะสำคัญ คือ มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่าปกติ (hyperglycemia) และร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในเกณฑ์ปกติได้ ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ต่ออวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะ ตา ไต หัวใจ และหลอดเลือดตามมา

ปัจจุบันมีการบริโภคน้ำตาลฟรุกโตสมากขึ้น โดยนิยมการบริโภคอาหารแบบ ตะวันตกซึ่งมีน้ำตาลฟรุกโตสเป็นส่วนประกอบ การบริโภคน้ำตาลฟรุกโตสอย่างต่อเนื่องใน ปริมาณสูงจะทำให้ร่างกายมีความผิดปกติของการเผาผลาญสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต และไขมัน ก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อในการตอบสนองต่ออินซูลิน ทำให้เกิดภาวะดื้อ อินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบผู้ป่วยชนิด นี้ประมาณ 90% ของผู้ป่วยทั้งหมด และมีอายุโดยเฉลี่ยมากกว่า 30 ปี (American Diabetes Association, 1995) จากการศึกษาทางระบาดวิทยาแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า ระดับอินซูลินที่ สูงกว่าปกติในภาวะดื้ออินซูลิน มีความสัมพันธ์โดยตรงกับความเสี่ยงในการเกิดหลอดเลือดแดง ตีบตัน (atherosclerosis) และโรคหัวใจโคโรนารี (coronary heart disease; CHD) ซึ่งนำไปสู่การ ตายด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular mortality) (Ginsberg, 2000)

ภาวะดื้ออินซูลินเกิดได้จากหลายสาเหตุ การรับประทานน้ำตาลฟรุกโตสใน ปริมาณสูงติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลง ได้ ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อระบบเมแทบอลิซึมของไขมัน และระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด การ ควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ จะอาศัยอินซูลินเป็นฮอร์โมนหลัก โดยจะ ทำหน้าที่กระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยโปรตีนจำเพาะที่ใช้ในการขนย้ายกลูโคส (glucose transporters; GLUT) โดยการส่งสัญญาณแบบต่อเนื่องผ่านตัวรับอินซูลินบนผิวเซลล์ และโปรตีนตัวกลางต่างๆภายในเซลล์ นอกจากนี้อินซูลินยังสามารถยับยั้งการสร้างกลูโคสที่ตับ (gluconeogenesis) และยับยั้งการสลายไขมันที่เซลล์ไขมัน (lipolysis) ได้ แต่เนื่องจากน้ำตาล ฟรุกโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสามารถดูดซึม และเมแทบอลิซึมอย่างรวดเร็วที่ตับ โดยน้ำตาล ฟรุกโตสจะทำให้ร่างกายมีการสร้างอะเซทิล-โคเอ (acetyl-CoA) เพิ่มขึ้นได้ไม่จำกัดเมื่อ

รับประทานน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณที่สูง ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ตับเกิดการสังเคราะห์และการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ และทำให้เกิดกระบวนการสลายไขมันที่เซลล์ไขมัน โดยการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ออกสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น เช่น กล้ามเนื้อและตับ โดยจะส่งผลทำให้ตับเกิดกระบวนการสร้างกลูโคสมากขึ้น ส่งเสริมทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้จะเกิดการออกซิเดชันของกรดไขมันอิสระภายในเซลล์ เมื่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลาานาน จะส่งผลทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายเป็นปัจจัยหนึ่งที่น่าไปสู่การเกิดภาวะดื้ออินซูลิน, เบต้าเซลล์หลังอินซูลินผิดปกติ (β -cell dysfunction), เกิดภาวะไม่ทนต่อน้ำตาลกลูโคส (impaired glucose tolerance) และในที่สุดพัฒนากลายเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ (Ceriello and Motz, 2004) ดังนั้นการลดภาวะ oxidative stress โดยการใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ อาจจะเป็นวิธีการที่ดีในการป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ และเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่มีปัจจัยเสี่ยงในการเป็นโรคเบาหวาน เพื่อลดโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดได้ ในปัจจุบันพบว่า สารประกอบในกลุ่มโพลีฟีนอลิก เป็นสารที่มีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ซึ่งพบมากในเมล็ดองุ่น คือ โปรแอนโทไซยานิดิน (proanthocyanidin) จากการศึกษาพบว่า มีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Bagchi et al. 2000; Ahn et al. 2002) ดีกว่าวิตามินอีและวิตามินซี ได้มีการทดลองในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin และทำการศึกษานำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ โดยใช้เซลล์ L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes พบว่าสามารถกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ซึ่งออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน (Pinent et al. 2004) นอกจากนี้การทดลองในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการป้องกันเซลล์ของตับอ่อน จากการทำลายของอนุมูลอิสระ พบว่าสามารถป้องกันความเสียหายของตับอ่อนจากอนุมูลอิสระได้, สามารถเพิ่มระดับกลูตาไธโอน และสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) ในตับอ่อนได้ ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานลดลง (El-Alfy et al. 2005) จึงเป็นไปได้ว่าการนำสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมาใช้ในการบริโภคเพื่อป้องกันการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน อาจช่วยเสริมการรักษาโรคเบาหวานให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาและระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยการใช้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระในตับหนู

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สารสกัดจากเมล็ดองุ่น สามารถป้องกันการเกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการลดระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับอินซูลิน รวมทั้งเปลี่ยนแปลงระดับไขมันในเลือดของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการใช้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง นอกจากนี้สามารถเพิ่มระดับเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการลดระดับน้ำตาลกลูโคส ระดับอินซูลิน และระดับไขมันในเลือดของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการใช้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. ทราบถึงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ และบทบาทของสารสกัดต่อการเกิดปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในเซลล์ตับของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการใช้อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
3. เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus)

โรคเบาหวานเป็นภาวะความผิดปกติทางระบบเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน เนื่องจากการขาดอินซูลินหรือเป็นผลมาจากความผิดปกติในการหลั่งหรือการออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ไม่เพียงพอ และ/หรือการตอบสนองของเนื้อเยื่อต่ออินซูลินลดลง ซึ่งอาจเกิดทั้งสองประการร่วมกันส่งผลทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) และการที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ได้แก่ ความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microvascular) ซึ่งทำให้เกิดไตวาย ประสาทตาเสีย ระบบประสาทส่วนปลายเสื่อมสภาพ และความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดใหญ่ (macrovascular) ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดสมองอุดตันและกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด เป็นต้น

2. การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน

โดยจำแนกชนิดของโรคเบาหวานตามสาเหตุการเกิดโรคและพยาธิสรีรวิทยาของโรคได้ดังตารางที่ 2-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2-1 แสดงการจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน (American Diabetes Association, 1997)

-
1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 diabetes): เบต้าเซลล์ถูกทำลาย ขาดอินซูลิน
 - 1.1 โรคเบาหวานที่เกิดจากภูมิคุ้มกันของร่างกาย (immune-mediated diabetes)
 - 1.2 สาเหตุไม่ได้

 2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 diabetes): ฤทธิ์ของอินซูลินต่อเนื้อเยื่อในร่างกายลดลง หรือจากการหลังอินซูลินไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะรักษาระดับน้ำตาลในเลือด หรือเกิดภาวะดื้อต่อฤทธิ์ของอินซูลินและหลังอินซูลินลดน้อยลง

 3. โรคเบาหวานชนิดอื่นๆ (other specific types)
 - 3.1 ความผิดปกติทางพันธุกรรมของเบต้าเซลล์
 - 3.2 ความผิดปกติทางพันธุกรรมของการออกฤทธิ์ของอินซูลินพบได้น้อย เกิด mutation ที่ตัวรับของอินซูลิน
 - 3.3 โรคของตับอ่อน การทำลายตับอ่อน ทั้งการอักเสบ การติดเชื้อ การผ่าตัด มะเร็ง ก่อให้เกิดโรคเบาหวานได้
 - 3.4 โรคทางต่อมไร้ท่อ ฮอร์โมนหลายชนิด เช่น growth hormone, คอร์ติซอล, กลูคาγον และ epinephrine ต่อด้านการทำงานของอินซูลิน โรคที่มีปริมาณฮอร์โมนเหล่านี้จำนวนมากเกินจะทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ เช่น acromegaly, glucagonoma, และ Cushing's syndrome
 - 3.5 เบาหวานที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของยาและสารเคมี เช่น pentamidine, vacor และ α -interferon มีผลทำให้การหลังอินซูลินลดลง ส่วน nicotinic acid และ glucocorticoids มีฤทธิ์ต้านอินซูลิน
 - 3.6 โรคติดเชื้อ เช่น congenital rubella, Coxsackievirus B, cytomegalovirus และ adenovirus
 - 3.7 โรคที่พบได้น้อยมากในกลุ่ม immune-mediated diabetes เช่น anti-insulin receptor antibodies หรือเดิม คือ type B insulin resistance
 - 3.8 โรคทาง genetic syndromes ที่สัมพันธ์กับโรคเบาหวาน เช่น Down's syndrome, Klinefelter และ Turner's syndrome

 4. โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (Gestational diabetes mellitus; GDM): ภาวะ glucose intolerance ที่เกิดขึ้นในช่วงตั้งครรภ์

3. อินซูลิน

อินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ผลิตจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน หน้าที่ที่สำคัญของฮอร์โมนอินซูลิน คือ ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ และอินซูลินยังมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ดังนี้

หน้าที่ของอินซูลิน (Belchetz and Hammond, 2003; Brodsky, 1999; Karam, 1998)

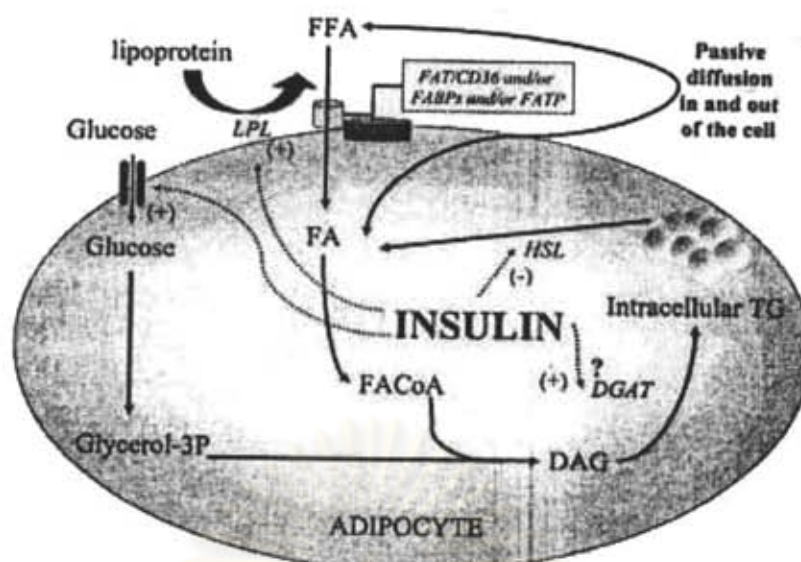
1. อินซูลินกระตุ้นให้มีการนำกลูโคสไปสลายผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) และการสังเคราะห์ไกลโคเจน ซึ่งเรียกว่ากระบวนการไกลโคเจเนซิส (glycogenesis) ในเซลล์กล้ามเนื้อ
2. กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของกลูโคส
3. ยับยั้งการสร้างกลูโคสจากตับโดยยับยั้งการสลายไกลโคเจน ซึ่งเรียกว่ากระบวนการไกลโคจิโนไลซิส (glycogenolysis) และยับยั้งกระบวนการสร้างกลูโคสจากตับ เรียกว่า กลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis)
4. ช่วยให้มีการสังเคราะห์โปรตีนในร่างกาย (proteogenesis) จากกรดอะมิโน และยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนเพื่อการเจริญเติบโต
5. กระตุ้นการสร้างไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) ในเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งเรียกว่ากระบวนการไลโปเจเนซิส (lipogenesis) เพื่อเก็บสะสมเป็นแหล่งพลังงานสำรองไว้ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย
6. กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ไลโปโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase) จึงช่วยในการนำไตรกลีเซอไรด์เข้าสู่เนื้อเยื่อไขมัน
7. ยับยั้งกระบวนการไลโปไลซิส (lipolysis) จากเนื้อเยื่อไขมันซึ่งเป็นกระบวนการสลายไตรกลีเซอไรด์เป็นกรดไขมันอิสระ

3.1 การทำงานของอินซูลิน

ก่อนที่อินซูลินจะออกฤทธิ์ได้จะต้องจับกับตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) บนผิวหน้าของเซลล์เป้าหมาย การยึดจับของฮอร์โมนกับตัวรับอินซูลินนี้ ทำให้เกิดกระบวนการภายในเซลล์ ส่งผลทำให้เซลล์สามารถใช้กลูโคสเป็นพลังงานได้ โดยกลูโคสส่วนหนึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไกลโคเจนและไขมันเก็บสะสมไว้ตามส่วนต่างๆของร่างกาย การออกฤทธิ์ของอินซูลินนี้จะขึ้นกับจำนวนตัวรับอินซูลิน และความสามารถในการจับของอินซูลินกับตัวรับ (Alberti et al. 1997)

เนื่องจากอินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการใช้สารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมันภายในร่างกาย ฉะนั้นเมื่อเกิดความบกพร่องของการหลั่งอินซูลินหรือการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอินซูลินเสียไป จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ต่างๆในร่างกายได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอวัยวะเป้าหมายหลัก คือ ตับ กล้ามเนื้อลาย และเนื้อเยื่อไขมัน ดังนี้ (Alberti et al. 1997)

1. ในเซลล์ของร่างกาย จะเกิดการยับยั้งการนำกลูโคสผ่านผนังเซลล์ ทำให้มีการใช้กลูโคสในเซลล์ต่าง ๆ น้อยลง
2. ในกล้ามเนื้อ พบความผิดปกติในการกำจัดน้ำตาลจากกระแสเลือด ภาวะนี้พบได้ในผู้ป่วยทุกรายที่มีภาวะไม่ทนต่อกลูโคส (Glucose intolerance) (Reaven, 1989)
3. ในเซลล์ไขมัน อินซูลินจะกระตุ้นให้เกิดการนำกรดไขมันอิสระ (FFA; free fatty acid) เข้าสู่เซลล์ไขมัน โดยการกระตุ้นเอนไซม์ lipoprotein lipase (LPL) สลายกรดไขมันอิสระจาก lipoprotein ในกระแสเลือด อินซูลินจะกระตุ้นให้เกิดการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ไขมัน และน้ำตาลกลูโคสจะถูกเปลี่ยนแปลงเป็น glycerol-3 phosphate ซึ่งเป็นขั้นตอนในการสร้างไตรกลีเซอไรด์สะสมในเซลล์ไขมัน พบว่าอินซูลินยังมีผลกระตุ้นเอนไซม์ในการสร้างไขมัน คือ diacylglycerol acyltransferase (DGAT) และยับยั้งเอนไซม์ hormone-sensitive lipase (HSL) ผลโดยรวมคือ ทำให้มีการสะสมไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ไขมันเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 2-1 เมื่อร่างกายได้รับพลังงานส่วนเกินหรือลดการใช้จนเกิดสมดุลพลังงานเป็นบวก (positive net energy balance) มีไตรกลีเซอไรด์สะสมในเซลล์ไขมันมากเกินไป เซลล์ไขมันจึงต้องปรับตัวเพื่อปกป้องตัวเองจากภาวะพลังงานเกิน (caloric over load) ผลคือ ทำให้มีการเพิ่มขบวนการสลายไขมัน เพิ่มปริมาณกรดไขมันอิสระเพื่อไปสะสมใน non-adipose tissues เช่น ตับ, กล้ามเนื้อ, เบต้าเซลล์ในตับอ่อน และส่งผลกระทบต่อทางด้านเมแทบอลิซึมต่ออวัยวะดังกล่าว (Lewis, 2002)



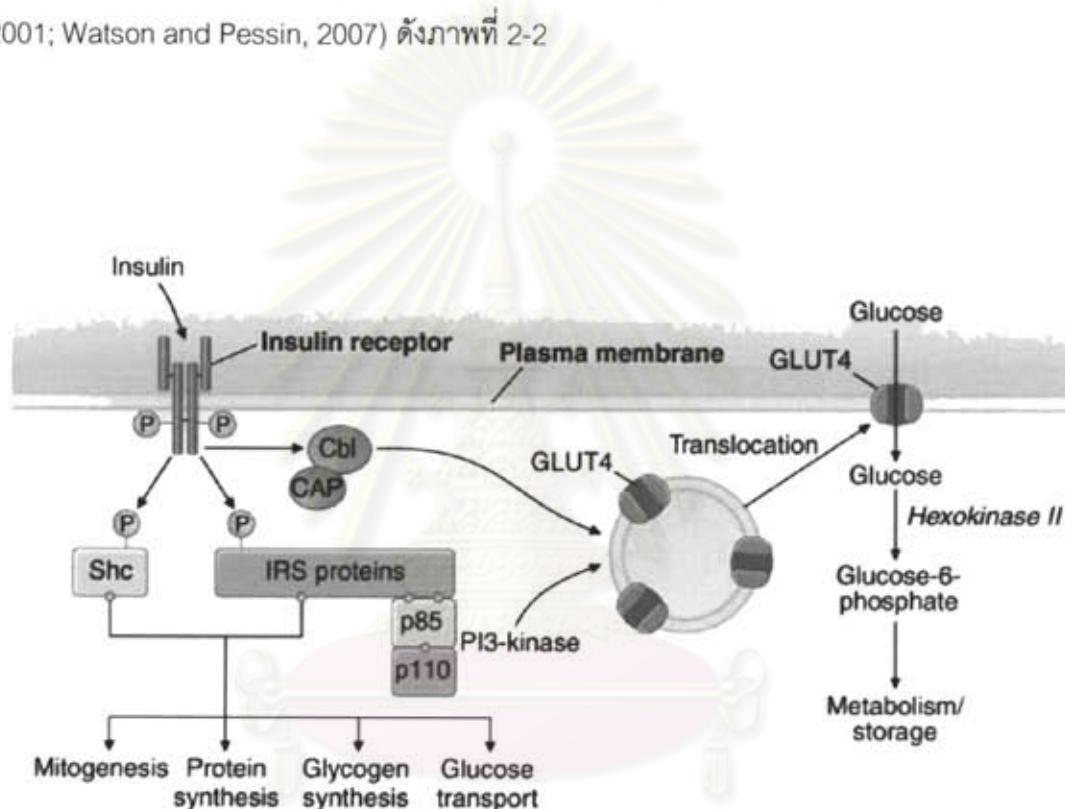
ภาพที่ 2-1 แสดงบทบาทของฮอร์โมนอินซูลินต่อเซลล์ไขมัน (Lewis et al. 2002)

4. ในตับ การสร้างกลูโคสจากตับจะเพิ่มขึ้นทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารเพิ่มขึ้นเนื่องมาจากการลดลงของระดับอินซูลิน ระดับอินซูลินที่ลดลงทำให้การสร้างกลูโคสจากตับเพิ่มขึ้น โดยส่วนหนึ่งเป็นผลจากการที่มีระดับกรดไขมันอิสระและกลีเซอรอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากระดับอินซูลินในเลือดมีไม่เพียงพอที่จะยับยั้งกระบวนการสลายไขมัน ทำให้เกิดการสร้างกลูโคสจากตับมากขึ้น และส่วนหนึ่งเป็นผลโดยตรงของระดับอินซูลินที่ลดลงทำให้ความสามารถในการยับยั้งการสร้างกลูโคสจากตับลดลงด้วย

3.2 กลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของอินซูลิน

อินซูลินจะออกฤทธิ์ผ่านทางตัวรับจำเพาะสำหรับอินซูลิน (insulin receptor, IR) ซึ่งมีลักษณะเป็นสายโพลีเปปไทด์สายเดี่ยวที่มี 2 หน่วยย่อย (subunit) คือ ส่วนของหน่วยย่อย α (α -subunit) และหน่วยย่อย β (β -subunit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โดยหน่วยย่อยในส่วนของ α จะเป็นส่วนที่ใช้จับกับอินซูลิน และส่วนหน่วยย่อย β จะมีทั้งส่วนที่อยู่ภายนอกเซลล์ (extracellular) ส่วนที่วางทอดอยู่ในเซลล์เมมเบรน (transmembrane) และส่วนที่หันเซลล์เมมเบรนเข้ามาในฝั่งไซโตพลาสซึม (intracellular) ซึ่งส่วนนี้เองจะเป็นส่วนที่แสดงฤทธิ์ของอินซูลิน โดยออกฤทธิ์ในลักษณะของเอนไซม์ไทโรซีนไคเนส (tyrosine kinase) กล่าวคือ เมื่อมีอินซูลินมากระตุ้นจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (conformation change) ของ IR ยังผลให้มีการกระตุ้นส่วนที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์นี้ ให้ทำงานเติมหมู่ฟอสเฟต (autophosphorylation) ให้กับ

ตำแหน่งของกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ IR ที่อยู่ที่บริเวณควบคุม (regulatory region) หลังจากนั้นจะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตอย่างต่อเนื่องของ insulin receptor substrate-1 (IRS-1) และ phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) จากนั้นจะเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ตำแหน่ง serine/threonine ในการกระตุ้นต่อไปที่ protein kinase B (PKB/Akt) ซึ่งการกระตุ้นอย่างต่อเนื่อง จะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของ glucose transporter-4 (GLUT-4) ซึ่งอยู่ใน vesicle ภายในเซลล์ไปที่เซลล์เมมเบรน เพื่อให้กลูโคสเข้ามาภายในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นของอินซูลินในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Storgaard et al. 2001; Watson and Pessin, 2007) ดังภาพที่ 2-2



ภาพที่ 2-2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ระดับเซลล์ของอินซูลิน

Available from: <http://e-medicaltextbook.blogspot.com/2008/08/insulin-biosynthesis.html>

3.3 การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

ร่างกายมีการควบคุมระดับกลูโคสให้อยู่ในระดับปกติ ด้วยความสมดุลของอัตราการผลิต (glucose production) และอัตราการใช้ (glucose utilization) หลังรับประทานอาหาร ระดับน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นรวมทั้ง gastrointestinal hormone โดยเฉพาะ gastric inhibitory polypeptide และ glucagon-like peptide-1 (GLP-1) จะกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ระดับน้ำตาลกลูโคสและอินซูลินที่สูงขึ้นจะไปยับยั้งกระบวนการสร้างกลูโคส (gluconeogenesis) และการสลายไกลโคเจน (glycogenolysis) ที่ตับ ขณะเดียวกันจะกระตุ้นเอนไซม์ glycogen synthase ให้มีการสะสมของไกลโคเจน ยับยั้งกระบวนการสลายโปรตีน (proteolysis) และการสลายไขมัน (lipolysis) กลูโคสในเลือดจะถูกใช้โดยเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออินซูลิน ได้แก่ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน เนื้อเยื่อเหล่านี้นำกลูโคสเข้าเซลล์โดยอาศัยโปรตีนจำเพาะที่ใช้ในการขนย้ายกลูโคส (glucose transporters; GLUT) ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยอินซูลิน ขณะอดอาหารประมาณร้อยละ 70 ของกลูโคสจะถูกใช้โดยเนื้อเยื่อที่ไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน ได้แก่ สมอง, เม็ดเลือดแดง, และไต โดยนำกลูโคสเข้าเซลล์โดยการแพร่ซึ่งไม่ถูกกระตุ้นด้วยอินซูลิน สมองต้องการกลูโคสตลอดเวลา เนื่องจากร่างกายไม่ได้รับกลูโคสจากภายนอก ดังนั้นร่างกายจึงต้องสลายกลูโคสออกจากตับ เพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ จะเห็นได้ว่าอวัยวะหลักที่มีความสำคัญต่อการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดมีอยู่ 3 แห่ง ได้แก่ เบต้าเซลล์ของตับอ่อน, กล้ามเนื้อลายและตับ ถ้าเบต้าเซลล์หลั่งอินซูลินไม่เพียงพอและกล้ามเนื้อลายไม่สามารถนำกลูโคสเข้าเซลล์ได้ และตับสร้างกลูโคสออกมามากเกินไป จะทำให้เกิดความผิดปกติของระดับน้ำตาลในเลือดได้

การนำกลูโคสเข้าเซลล์นั้นต้องอาศัย glucose transporters เนื่องจากเซลล์เมมเบรนไม่ยอมให้โมเลกุลที่ไม่ละลายในน้ำ (hydrophilic molecule) ผ่าน โดยชนิดและหน้าที่ของ glucose transporters (Mueckler, 1994) ดังแสดงในตารางที่ 2-2

ตารางที่ 2-2 แสดงชนิดและหน้าที่ของ glucose transporters (Mueckler, 1994; Sherwood, 2001)

ชนิด	เนื้อเยื่อ	หน้าที่
GLUT1	เนื้อเยื่อทุกชนิด โดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง, สมอง	นำกลูโคสผ่าน blood brain barrier
GLUT2	เบต้าเซลล์ของตับอ่อน, ตับ, ไต, ทางเดินอาหาร	ควบคุมการหลังอินซูลิน, glucose homeostasis ในด้านอื่น
GLUT3	สมอง, ไต, รก, เนื้อเยื่ออื่นๆ	นำกลูโคสเข้าเซลล์
GLUT4	กล้ามเนื้อ, เนื้อเยื่อไขมัน	นำกลูโคสเข้าเซลล์โดยการกระตุ้นของอินซูลิน
GLUT5	ทางเดินอาหาร, ไต	ดูดซึมฟรุกโตส
GLUT7	ตับ, เนื้อเยื่ออื่นที่สร้างกลูโคสได้	ควบคุมการไหลผ่าน endoplasmic reticulum membrane

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินการควบคุมกลูโคส

ตามเกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวานของสหพันธ์โรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association, 2005)

1. Fasting Plasma Glucose (FPG)

ค่านี้ใช้วัดความสามารถของอินซูลินในการป้องกันการเกิดน้ำตาลในเลือดสูงในช่วงอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนการตรวจ ทำการเจาะเลือด นำเลือดไปวัดระดับน้ำตาลเปรียบเทียบกับตารางที่ 2-3

2. Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)

ค่านี้จะวัดความสามารถของตับอ่อนในการหลังอินซูลิน หลังได้รับกลูโคสและวัดการตอบสนองของร่างกายต่อการทำงานของอินซูลิน ผู้ป่วยต้องอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมงก่อนการตรวจ และต้องทำการตรวจเลือดครั้งแรกก่อน หลังจากนั้นให้ดื่มกลูโคส 75 กรัม ทำการเจาะเลือดที่ 30 นาที, 1, 2 และ 3 ชั่วโมง นำเลือดไปวัดระดับน้ำตาล เปรียบเทียบกับตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 แสดงเกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน

Test	Diabetes mellitus	Impaired glucose tolerance (IGT)
Fasting glucose	≥ 126 มก./ดล. (70 มิลลิโมล/ลิตร)	110-125 มก./ดล. (61-69 มิลลิโมล/ลิตร)
OGTT (2h plasma glucose)	≥ 200 มก./ดล. (111 มิลลิโมล/ลิตร)	140-199 มก./ดล. (78-110 มิลลิโมล/ลิตร)

3. Glycosylated hemoglobin (HbA_{1c})

การตรวจหาระดับค่าไกลโคไซด์ฮีโมโกลบิน คือ การตรวจจำนวนน้ำตาลที่จับอยู่กับฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นสารโปรตีนชนิดหนึ่งในเม็ดเลือดแดง มีหน้าที่นำออกซิเจนเข้าสู่เซลล์ เมื่อน้ำตาลมากเกินจะเปลี่ยนจากฮีโมโกลบินเมาเป็นฮีโมโกลบิน เอ วัน ซี (HbA_{1c}) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวขึ้นกับความเข้มข้นของระดับน้ำตาลในเลือด และเนื่องจากฮีโมโกลบิน เอ วัน ซี มีอายุอยู่ในเลือดนาน 2-3 เดือน จึงเปรียบเสมือนบันทึกระดับน้ำตาลในเลือดช่วงระยะเวลา 2-3 เดือน ในคนปกติจะมีระดับค่าไกลโคไซด์ฮีโมโกลบินร้อยละ 4-6 ดังนั้นค่าไกลโคไซด์ฮีโมโกลบินจึงเป็นดัชนีบ่งชี้ว่า ผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้ดีเพียงใด

Homeostasis model assessment (HOMA-IR) (Matthews et al. 1985)

Homeostasis model assessment (HOMA-IR) เป็นวิธีที่ง่าย, ประยุกต์ใช้ในงาน routine ได้ และมีความแม่นยำสูง การประเมินการทำงานของเบต้าเซลล์ และความรุนแรงของภาวะดื้ออินซูลินโดย HOMA-IR ใช้ค่า basal (fasting) glucose กับ insulin ในการคำนวณ ตามสูตร

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{fasting plasma insulin } (\mu\text{IU/mL}) \times \text{fasting plasma glucose (mmol/L)}}{22.5}$$

โดย 1 $\mu\text{IU/mL} = 6.945 \text{ pmol/L}$ (SI units)

4. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM)

โรคเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบเมแทบอลิซึมของร่างกายเกิดจากการหลังอินซูลินผิดปกติ คือ ตับอ่อนสามารถหลังอินซูลินได้ แต่ไม่เพียงพอที่จะควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ และร่างกายเกิดภาวะดื้อต่อฤทธิ์อินซูลิน (insulin resistance) โดยอินซูลินรีเซปเตอร์ (insulin receptor) ทำงานผิดปกติ ทำให้ความสามารถของอินซูลินในการทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ไขมันและเซลล์กล้ามเนื้อลดลง นอกจากนี้ยังทำให้มีการสร้างน้ำตาลจากตับมากขึ้น ลักษณะที่สำคัญของเบาหวานชนิดนี้ คือ ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง, ระดับไขมันในเลือดผิดปกติ และเกิดโรคแทรกซ้อนทางระบบหลอดเลือด (Bell and Polonsky, 2001; Kahn, 2003)

ในสภาวะปกติ ร่างกายมีวิธีควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดโดยการประสานงานระหว่างเนื้อเยื่อต่างๆ ที่สำคัญ คือ ตับ เนื้อเยื่อไขมัน และกล้ามเนื้อ โดยตับเป็นอวัยวะสำคัญในการปรับระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยการสลายไกลโคเจน หรือสร้างน้ำตาลจากสารที่ไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต โดยได้รับสารตัวกลางจากกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันเมื่อร่างกายขาดน้ำตาล ผลจึงทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น ในทางกลับกัน ตับจะสร้างไกลโคเจนเมื่อมีระดับน้ำตาลในเลือดมากขึ้น หากกลไกดังที่ได้กล่าวมาเกิดความบกพร่องไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งอินซูลินซึ่งเป็นปัจจัยหลัก จะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงภายหลังรับประทานอาหาร และเมื่อการออกฤทธิ์ของฮอริโมนอินซูลินเสียไป จะส่งผลทำให้เกิดภาวะดื้อต่อฤทธิ์อินซูลินขึ้น

ภาวะดื้ออินซูลิน (Insulin resistance)

คือ ภาวะที่ความสามารถของอินซูลินในการทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลง โดยเนื้อเยื่อที่เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucose homeostasis ประกอบด้วย กล้ามเนื้อลาย เนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) และตับ ผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีอาการดื้อต่ออินซูลิน อาจเกิดจากความผิดปกติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ insulin signalling pathway เกิดกระบวนการเคลื่อนย้าย GLUT4 ไปยังเซลล์เมมเบรนลดลง ทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลง (Shepherd and Kahn, 1999)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่

1. พันธุกรรม
2. Glucose toxicity
3. Hexosamine pathway by-products
4. Free fatty acids
5. Islet amyloid
6. Reactive oxygen species

เชื่อว่าพันธุกรรมมีส่วนกำหนดปริมาณและการทำงานของเบต้าเซลล์ หรืออาจเป็นไปได้ว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมของเบต้าเซลล์ เป็นตัวกำหนดให้เกิด apoptosis มากขึ้น ซึ่งความผิดปกติของยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งอินซูลิน เช่น glucokinase ในผู้ป่วย maturity-onset diabetes in the young (MODY) เป็นต้น หรืออาจเกิดจากการหลั่งอินซูลินที่ลดลงในภาวะดื้ออินซูลิน ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูง การตอบสนองของเบต้าเซลล์ต่อกลูโคสจะลดลง คือ มีผลต่อการหลั่งและการทำงานของอินซูลิน โดยพบว่าการนำกลูโคสเข้าเซลล์ลดลงในภาวะดังกล่าว เรียกว่าภาวะนี้ว่า glucotoxicity ระดับน้ำตาลสูงในเลือดยังส่งผลกระทบต่อการทำงานของอินซูลิน ทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินมากขึ้น โดยทำให้ glucose transport ลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการเพิ่มขึ้นของ glucosamine-6 phosphate ภายในเซลล์ (McClain and Crook, 1996) ความอ้วนอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่ง ซึ่งร่างกายจะมีการสลายไตรกลีเซอไรด์ที่สะสมไว้ในเซลล์ไขมันเป็น fatty acid ทำให้มี fatty acid ในกระแสเลือดสูงขึ้น fatty acid ที่สูงอยู่นานๆ สามารถเข้าไปสะสมภายในเซลล์อื่นที่ไม่ใช่ adipocyte โดยถูกเปลี่ยนเป็นไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์นั้น เกิดภาวะที่เรียกว่า steatosis ร่างกายสามารถควบคุมไม่ให้มีการสะสมไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์อื่นมากเกินไป โดยการหลั่ง leptin ซึ่ง leptin จะช่วยให้เกิด oxidation ของ fatty acid ทำให้ไม่มีการสะสมของไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์ แต่ในภาวะที่ร่างกายมี fatty acid มากเกินไปจนเกินจุดที่ leptin จะสามารถช่วย oxidize fatty acid ได้ ก็จะทำให้มีการสะสมไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์มาก จนเกิดการทำลายเซลล์ขึ้น เรียกว่า steatoapoptosis ภาวะดังกล่าวถ้าเกิดภายในเบต้าเซลล์ จะส่งผลทำให้การทำงานของเบต้าเซลล์ลดลง เกิดภาวะ lipotoxicity (Kahn and Flier, 2000) นอกจากนั้น การสะสมของไตรกลีเซอไรด์ภายในเซลล์กล้ามเนื้อ จะทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินเพิ่มขึ้น และอีกสาเหตุเป็นสารพวกโปรตีนซึ่งพบในเบต้าเซลล์ คือ islet amyloid ได้มีการศึกษาระยะยาวในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานพบว่าปริมาณ islet amyloid ที่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณการหลั่งอินซูลินที่ลดลง (Kahn et al. 1999)

5. น้ำตาลฟรุกโตส

ฟรุกโตส อาจเรียกว่า คีโทส เลวูโลส หรือน้ำตาลผลไม้ เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีรสหวานกว่าน้ำตาลชนิดอื่น พบในเกสรดอกไม้ ผลไม้ ผัก น้ำผึ้ง และในโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส (กลูโคส+ฟรุกโตส) ฟรุกโตสจะถูกดูดซึมในลำไส้เล็กโดยวิธี carrier-mediated facilitated diffusion

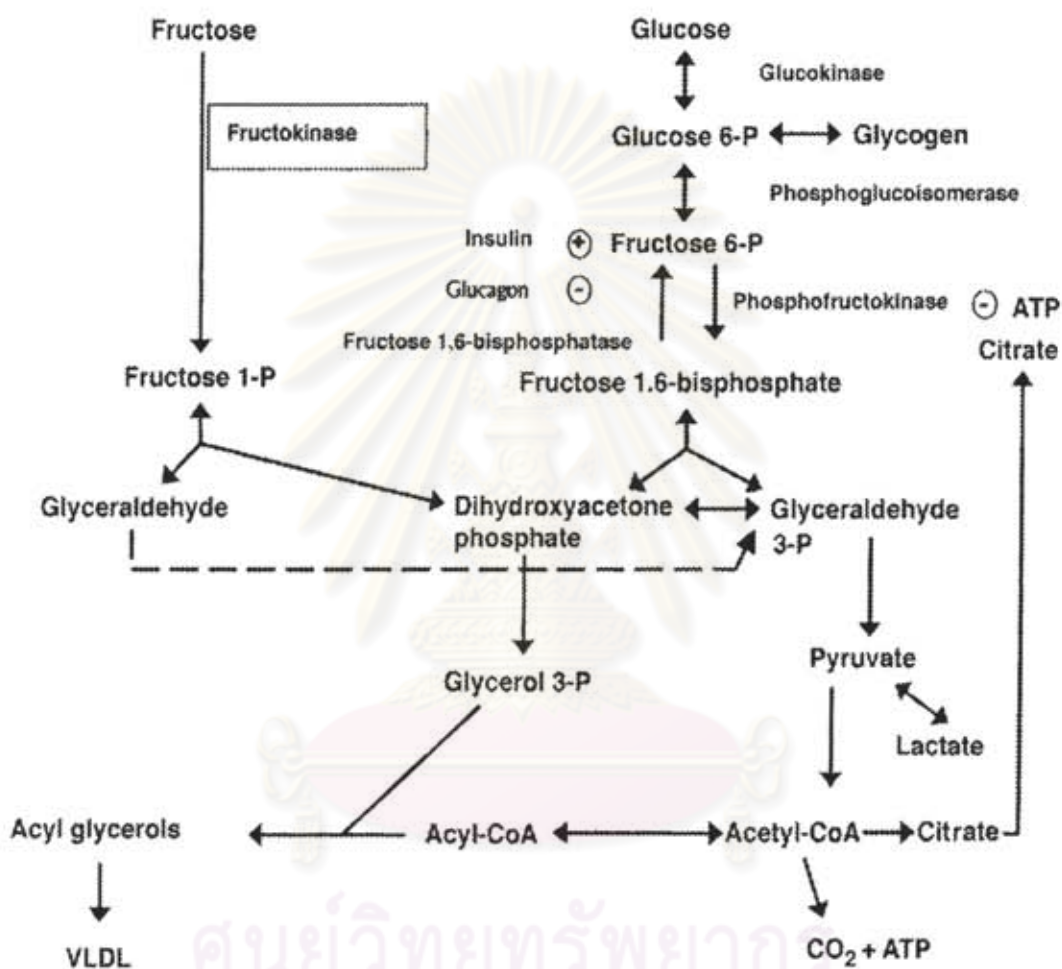
ปัจจุบันมีการบริโภคน้ำตาลฟรุกโตสมากขึ้นจาก 16-20 กรัมต่อวัน ซึ่งส่วนใหญ่มาจากผลไม้สดเป็น 85-100 กรัมของฟรุกโตสต่อวัน โดยการบริโภคอาหารแบบตะวันตกที่ใช้ น้ำตาลฟรุกโตส การรับประทานฟรุกโตสทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเปลี่ยนแปลงช้ากว่าน้ำตาลชนิดอื่น เช่น น้ำตาลซูโครส เนื่องจากมีค่าดัชนีไกลซีมิก (Glycemic index) ต่ำกว่า แต่การบริโภคฟรุกโตสอย่างต่อเนื่องในปริมาณสูง จะทำให้การดูดซึมกลูโคสและฟรุกโตสผิดปกติ ทำให้ร่างกายมีระดับของไตรกลีเซอไรด์และคลอเลสเตอรอลเพิ่มขึ้นมากกว่าคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่น (Hallfrisch, 1990)

5.1 เมแทบอลิซึมของฟรุกโตส

ฟรุกโตสจะถูกเมแทบอลิซึมโดยการนำเข้าสู่เซลล์ตับซึ่งไม่ต้องอาศัยฤทธิ์ของอินซูลิน สามารถเข้าสู่ไกลโคไลซิสได้ 2 วิถี ขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ เช่น ในกล้ามเนื้อ ฟรุกโตสสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้โดยตรง โดยอาศัยเอนไซม์ hexokinase ได้เป็น fructose-6-phosphate ส่วนในเซลล์ตับจะมีเอนไซม์จำเพาะสำหรับฟรุกโตส คือ fructokinase โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น fructose-1-phosphate จากนั้นเอนไซม์ aldolase จะเปลี่ยน fructose-1-phosphate ให้เป็นกลีเซอรอลดิไฮด์ (glyceraldehydes) และ ไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (dihydroxyacetone phosphate) โดยสารทั้งสองจะถูกเปลี่ยนไปเป็นกลีเซอรอลดิไฮด์-3-ฟอสเฟต (glyceraldehydes-3-phosphate) ซึ่งจะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสต่อไป (Mayes, 1993)

ฟรุกโตสสามารถผ่านจุดควบคุมปฏิกิริยา (rate-limiting step) ซึ่งอยู่ที่เอนไซม์ฟอสฟอฟรุกโตโคไเนส (phosphofructokinase) ได้ จึงสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้อย่างต่อเนื่อง ซึ่งแตกต่างจากเมแทบอลิซึมของกลูโคสในกระบวนการไกลโคไลซิส โดยการนำกลูโคสเข้าสู่ตับจะถูกยับยั้งได้เมื่อมีปริมาณเอทีพี (ATP) หรือซิเตรท (citrate) สูง สารเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ฟอสฟอฟรุกโตโคไเนส จึงช่วยยับยั้งการสร้างอะเซทิลโคเอ (acetyl CoA) ได้ ดังนั้นเมื่อรับประทานอาหารที่มีฟรุกโตสในปริมาณสูง ฟรุกโตสจะถูกเปลี่ยนจนกระทั่งได้เป็นอะเซทิลโคเอ

ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กรดไขมัน ปฏิกริยาการสังเคราะห์เป็นแบบ de novo synthesis คือ สร้างสารขนาดใหญ่จากโมเลกุลเล็ก ๆ พบที่ตับและเซลล์ไขมันเท่านั้น กรดไขมันอิสระเหล่านี้ จะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นไตรกลีเซอไรด์ต่อไป ดังภาพที่ 2-3



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 2-3 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟรุกโตสและกลูโคส

Available from: <http://www.ajcn.org/cgi/content-nw/full/76/5/911/F3>

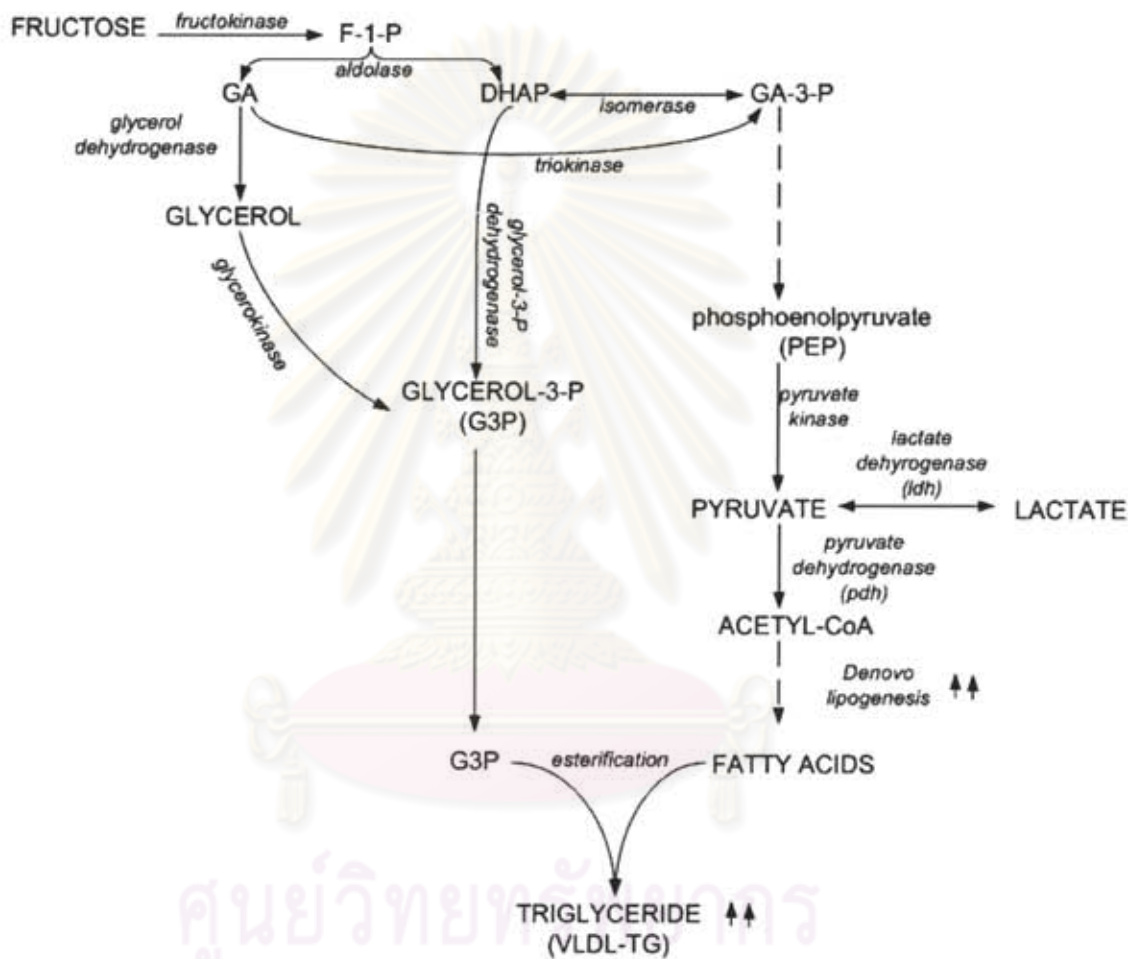
5.2 การสะสมไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ไขมัน (Adipocytes)

อาศัย glycerol-3-phosphate เป็นสารตั้งต้นของการสร้างไตรกลีเซอไรด์ สารนี้ มาจากการเปลี่ยน dihydroxyacetone phosphate ที่ได้จากวิถีไกลโคไลซิส โดยกลูโคสในเลือด สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ไขมัน โดยการเร่งของฮอริโมนอินซูลิน ซึ่งถ้ามีกลูโคสในเลือดมาก ฮอริโมนอินซูลินจะเร่งให้กลูโคสผ่านเข้าสู่เซลล์ไขมันได้เร็วและมาก กลูโคสจะถูกออกซิไดส์โดยขบวนการไกลโคไลซิสได้ dihydroxyacetone phosphate ขณะเดียวกันก็มีการสร้างกรดไขมันจาก acetyl CoA ภายในเซลล์ไขมัน และนำไปเอสเตอริ์กับ glycerol-3-phosphate ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์เก็บสะสมไว้ที่เซลล์ไขมัน ดังนั้น เมื่อรับประทานน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณที่สูง สามารถทำให้เกิดกระบวนการสลายไขมันที่เซลล์ไขมัน (lipolysis) ส่งผลทำให้มีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ออกสู่กระแสเลือดไปยังอวัยวะอื่น เช่น กล้ามเนื้อและตับ ซึ่งจะทำให้กล้ามเนื้อมีการส่งสัญญาณของอินซูลินบกพร่อง และทำให้เกิดขบวนการสร้างกลูโคสที่ตับ (gluconeogenesis) มากขึ้น ส่งเสริมทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อระดับน้ำตาลสูงอยู่เป็นเวลานานจะส่งผลทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) สะสมภายในเซลล์เพิ่มขึ้น

5.3 การสร้างไตรกลีเซอไรด์ในเซลล์ตับ

อาศัย glycerol-3-phosphate เป็นสารตั้งต้นของการสร้างไตรกลีเซอไรด์ ตับสามารถสังเคราะห์ glycerol-3-phosphate ได้ 2 ทาง คือ จากการเปลี่ยน dihydroxyacetone phosphate ที่ได้จากวิถีไกลโคไลซิส และผ่านทางปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันของกลีเซอรอลอิสระ (free glycerol) โดยอาศัยเอนไซม์กลีเซอรอล ไคเนส (glycerol kinase) จากนั้นกระตุ้นกรดไขมันอิสระที่สร้างขึ้นในเซลล์ตับให้พร้อม และนำไปทำปฏิกิริยาเอสเตอริ์กับ glycerol-3-phosphate ได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ ดังนั้น เมื่อรับประทานอาหารที่มีฟรุกโตสในปริมาณสูง จะทำให้ตับมีการผลิตไตรกลีเซอไรด์มากเกินไป (Mayes, 1993) และเก็บสะสมไว้ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลงได้ การสร้างไขมันที่ตับจะไม่มีการเก็บสะสม แต่จะถูกส่งออกในกระแสเลือด โดยรวมกับฟอสโฟลิปิด คลอเลสเทอรอล และอะโปโปรตีนบีหนึ่งร้อย (apo-B 100) ได้เป็นไลโปโปรตีน เรียกว่า very low density lipoprotein (VLDL) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่พาไตรกลีเซอไรด์จากการสังเคราะห์ในเซลล์ตับ (endogenous triglycerides) ไปสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อไขมัน ที่ต้องการพลังงานจากกรดไขมัน (ยกเว้นสมอง) เอนไซม์ไลโปโปรตีนไลเปส (lipoprotein lipase) ที่ผนังหลอดเลือดจะสลายกรดไขมันนำเข้าสู่เซลล์เพื่อไปออกซิไดส์ให้พลังงาน สำหรับที่

เนื้อเยื่อไขมัน กรดไขมันที่ได้จะถูกนำไปสร้างไตรกลีเซอไรด์เพื่อเก็บสะสมเป็นแหล่งพลังงานสำรอง อย่างไรก็ตาม การหลั่ง VLDL ที่มากเกินไป สามารถส่งเสริมให้เกิดการเหนี่ยวนำการเกิดภาวะดื้ออินซูลิน (Zammit et al. 2001), เกิดการเปลี่ยนแปลงการส่งสัญญาณของอินซูลิน และการเพิ่มขึ้นของ inflammatory cytokine ได้ (Carmona, 1989; Park et al. 1992)



ภาพที่ 2-4 แสดงกระบวนการเมแทบอลิซึมของฟรุกโตสในการเปลี่ยนเป็นไตรกลีเซอไรด์ในตับ

Available from: <http://www.answers.com/topic/fructose>

ฟรุกโตสและภาวะดื้ออินซูลิน

การรับประทานอาหารที่มีฟรุกโตสในปริมาณสูง พบว่า ทำให้เกิดกลุ่มความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม ได้แก่ เกิดภาวะ hyperinsulinaemia, glucose intolerance (Zavaroni et al. 1980) และ hypertension (Reaven, 1991) ในสัตว์ทดลอง

Thorburn และคณะ (1989) พบว่า เมื่อให้น้ำตาลฟรุกโตสขนาด 60 กรัม/100 กรัมของอาหารแก่หนูขาวเป็นระยะเวลา 3-4 สัปดาห์ จะทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินบกพร่อง และเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ hyperinsulinemia, insulin resistance, glucose intolerance และ dyslipidaemia โดยการเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ในพลาสมา ซึ่งมีความเชื่อมโยงกับภาวะดื้ออินซูลิน (Boden, 1997) โดยจะยับยั้งการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ และยับยั้งการเกิดออกซิเดชันในกล้ามเนื้อลายและกล้ามเนื้อหัวใจ เนื่องมาจากการส่งสัญญาณของอินซูลินบกพร่อง (Griffin et al. 1999)

จากการศึกษา พบความสัมพันธ์ของการตอบสนองของเนื้อเยื่อมีความสำคัญต่อการออกฤทธิ์ของอินซูลิน โดย Ueno และคณะ (2000) พบว่า เมื่อให้อาหารที่เป็นน้ำตาลฟรุกโตสเป็นเวลา 28 วัน กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตส เกิดความบกพร่องในการส่งสัญญาณของอินซูลินในช่วงต้น กล่าวคือ ระดับการเติมหมู่ฟอสเฟตของอินซูลินรีเซปเตอร์ (autophosphorylation) ที่เซลล์ต่ำลงถึงร้อยละ 72 นอกจากนี้ ระดับโปรตีนของ Insulin receptor substrate (IRS) ไม่เปลี่ยนแปลง แต่การเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตของ IRS ที่เซลล์ต่ำและเซลล์กล้ามเนื้อของหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

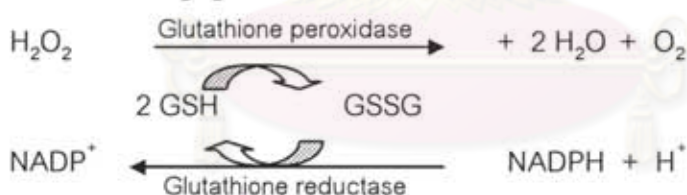
Catena และคณะ (2003) พบว่า เมื่อให้อาหารแก่หนูขาวขนาด 66% เป็นน้ำตาลฟรุกโตส ระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า มีจำนวนอินซูลินรีเซปเตอร์ในกล้ามเนื้อและต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารแบบปกติ แต่ความดันโลหิตและระดับไตรกลีเซอไรด์ในพลาสมาเพิ่มขึ้น ส่วนระดับน้ำตาลกลูโคส, อินซูลินในพลาสมา และน้ำหนักตัว พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่าการส่งสัญญาณของอินซูลินในช่วงต้นมีความสำคัญต่อผลทางเมแทบอลิซึมของอินซูลิน

6. อนุมูลอิสระและการเกิดภาวะ Oxidative stress

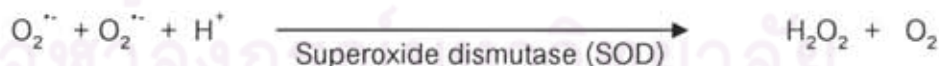
อนุมูลอิสระ (Free radicals) คือ โมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนอิสระอยู่วงโคจรรอบนอกสุด (unpaired electron) ทำให้มีความสามารถในการออกซิไดส์กับโมเลกุลอื่น อนุมูลอิสระเกิดขึ้นในร่างกายจากการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการเผาผลาญอาหารให้เกิดเป็นพลังงาน โดยใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรีย อิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจะถูกจับโดยออกซิเจน เกิดเป็นอนุมูลของออกซิเจนที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา เรียกว่า "reactive oxygen species (ROS)" นอกจากการเผาผลาญอาหารที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระแล้วแหล่งอื่นในร่างกายที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้แก่ ปฏิกิริยาทางเอนไซม์ เช่น xanthine oxidase, prostaglandin synthase, lipoxygenase, aldehyde oxidase และปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัว เป็นต้น

ในภาวะปกติ ROS ช่วยรักษาสภาวะสมดุลภายในร่างกาย (homeostasis) และมีบทบาทสำคัญในการทำงานของเซลล์ เช่น ในเซลล์เม็ดเลือดขาวจะมีการสร้าง ROS ขึ้นมา เพื่อปกป้องร่างกายจากการติดเชื้อจากแบคทีเรีย หรือทำหน้าที่ควบคุมการถอดรหัสของยีน เป็นต้น หากร่างกายมีปริมาณ ROS ที่เกิดขึ้นเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปกติร่างกายจะมีเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนอนุมูลอิสระให้เป็นสารที่ไม่ก่ออันตรายต่อเซลล์ ดังภาพที่ 2-5

1. การสลาย H_2O_2 ด้วยระบบ Glutathione peroxidase-reductase



2. การกำจัด ($O_2^{\cdot -}$) โดยอาศัย Superoxide dismutase



3. การสลาย H_2O_2 ด้วยเอนไซม์ catalase



ภาพที่ 2-5 แสดงปฏิกิริยาการกำจัดอนุมูลอิสระ โดยอาศัยเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

(Paoletti and Mocali, 1990; Wendel, 1981)

เอนไซม์ซึ่งทำหน้าที่เป็นแอนติออกซิแดนท์จำเป็นต้องอาศัยพลังงานเพื่อให้สิ่งมีชีวิตอยู่ในภาวะรีดิวซ์ นอกจากนี้ยังมีระบบของกลูตาไธโอน (glutathione) ซึ่งพบได้ในเซลล์ทั่วๆไป กลูตาไธโอนมี 2 รูป คือ กลูตาไธโอนรูปรีดิวซ์ (reduced glutathione; GSH) และ กลูตาไธโอนรูปออกซิไดซ์ (oxidized glutathione; GSSG) รูปทั้งสองสามารถเปลี่ยนกลับไปกลับมาได้โดยผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชัน-รีดักชัน และอาศัยเอนไซม์จำเพาะที่มีอยู่ในเซลล์ คือ กลูตาไธโอนรีดักเตส (glutathione reductase) ทำหน้าที่รักษาสภาพกลูตาไธโอนในเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพรีดิวซ์ โดยใช้ NADPH และ FADH ส่วนกลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) จะไปรีดิวซ์เปอร์ออกไซด์ที่ละลายและที่ติดอยู่ในเมมเบรน ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ฟอสโฟลิปิดไฮโดรเปอร์ออกไซด์ กลูตาไธโอนเปอร์ออกซิเดส (PHGPX) ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ โดยที่รีดิวซ์กลูตาไธโอน (GSH) ถูกเปลี่ยนเป็นออกซิไดซ์กลูตาไธโอน (GSSG), เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์-ดิสมิวเทส (superoxide dismutase; SOD) เร่งการเปลี่ยนซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot-}$) ไปเป็นเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) กับออกซิเจน (Paoletti and Mocali, 1990) ส่วนคะตะเลส (catalase; CAT) ทำหน้าที่เปลี่ยนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ (Wendel, 1981)

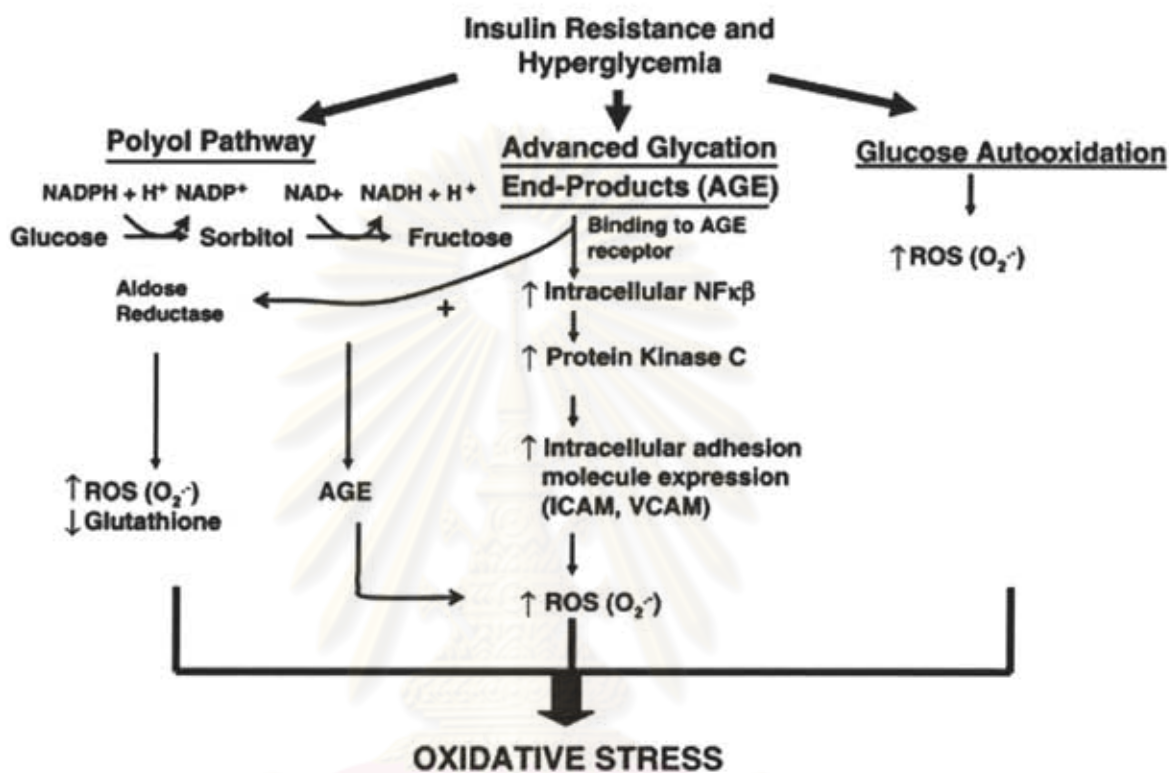
ดังที่กล่าวมา เอนไซม์ SOD, CAT และระบบของกลูตาไธโอน จะช่วยกันในการรักษาสมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ด้านการเกิด ROS เพื่อป้องกันอันตรายแก่เซลล์ แต่เมื่อเกิดการสะสมของ ROS เป็นระยะเวลาอันยาวนานและมีปริมาณมากเกินไป จะทำให้เกิดความไม่สมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระกับกระบวนการป้องกันโดยเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชันในเซลล์หรือร่างกาย ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น ส่งผลกระทบต่อสารชีวโมเลกุลในเซลล์ซึ่งจะถูกทำลายโดยอนุมูลอิสระ ทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและความเสียหาย (Abdollahi et al. 2004)

ภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกับอนุมูลอิสระ

จากการศึกษาพบความสัมพันธ์ของภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง (hyperglycaemia) กับการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) โดยเกี่ยวข้องกับกลไกหลายทาง ได้แก่ การเกิด autoxidative glycosylation เนื่องจากการสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิส จะทำให้เกิดการผลิต ROS ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น โดย NADH และ $FADH_2$ ซึ่งเป็นสารที่ได้จากวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) จะเป็นแหล่งของซัสเตรทที่ทำให้เกิด ROS และทำหน้าที่ส่งอิเล็กตรอนเข้าสู่ระบบขนส่งอิเล็กตรอน จากนั้นจะเกิดการส่งผ่านอิเล็กตรอนในระบบขนส่งอิเล็กตรอน โดย ROS จะถูกผลิตขึ้นด้วยการเกิด proton electrochemical gradient ในขบวนการนี้แหล่งที่เกิด ROS ได้แก่ ผนังชั้นในของไมโทคอนเดรีย บริเวณการขนส่งอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นจาก NADH dehydrogenase เข้าสู่สารประกอบเชิงซ้อน I และบริเวณการ

ขนส่งระหว่าง ubiquinone ไปยังสารประกอบเชิงซ้อน III (Kwong, 1998; Wallace, 1992) ROS ที่ถูกผลิตขึ้น ได้แก่ ซูเปอร์ออกไซด์ แรดิคัล ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นไฮดรอกซิล แรดิคัล (OH^{\cdot}) และไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ (H_2O_2) ได้ (Nishikawa, 2000) อนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถทำให้เกิดอันตรายต่อ DNA หรือโปรตีน และเกิดขบวนการลิพิด เปอร็อกซิเดชัน (lipid peroxidation) ได้ (Brownlee et al. 1988) เนื้อเยื่อที่ไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน เช่น เอดินา, เลนส์, เส้นประสาท และเอนโดทีเลียม กลูโคสจะถูกกำจัดผ่าน polyol pathway ซึ่ง polyol pathway นี้ประกอบด้วยสองขั้นตอนหลัก คือ ขั้นแรกเป็นการเปลี่ยนกลูโคสเป็นซอร์บิทอล (sorbitol) โดยเอนไซม์อัลโดสรีดักเทส (aldose-reductase) และขั้นตอนที่สองเปลี่ยนซอร์บิทอลเป็นฟรุกโตส (fructose) โดยเอนไซม์ sorbitol dehydrogenase ทำให้อัตราส่วน NADH/NAD⁺ เพิ่มขึ้น (Hohman and Beg, 1994) การลดลงของ NADPH อันเนื่องมาจากอัลโดสรีดักเทสอาจจะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของขบวนการที่ต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ รวมทั้งไนตริกออกไซด์ซินเทส (NO synthase) และกลูตาไรโอนรีดักเทส โดยการลดลงของไนตริกออกไซด์ จะทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัว (vasoconstriction) และเกิดการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (Lowenstein, 1994) ในขณะที่การลดลงของระดับกลูตาไรโอน จะทำให้เอนโดทีเลียมถูกทำลายจากไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ (Chari et al. 1984) นอกจากนี้ การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แรดิคัลที่เกิดขึ้น สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) ได้ (Nishikawa, 2000) ทำให้เกิดการสะสมของ GAPDH ในวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งเป็นขั้นตอนในการนำไปสู่วิถีการสังเคราะห์ diacylglycerol (DAG) โดยการกระตุ้น protein kinase C (PKC) และ NADPH oxidase และวิถีการสังเคราะห์ hexosamine โดยจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น glucosamine-6-phosphate ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) ได้ ทำให้ความสามารถในการสร้าง NADPH ลดลง โดย NADPH นั้นมีบทบาทสำคัญในการกำจัดความเป็นพิษที่เกิดจากไฮโดรเจน เปอร็อกไซด์ โดยผ่านทางระบบของรีดิวซ์-ออกซิไดซ์กลูตาไรโอน ซึ่งการยับยั้งการทำงานของ G6PD หรือการกระตุ้น NADPH oxidase สามารถเพิ่มภาวะ oxidative stress ได้ ภาวะน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ยังสามารถทำให้กลูโคสสามารถจับกับกรดอะมิโนอิสระในกระแสเลือดโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ ในระยะแรกจะเกิดเป็นสารที่ไม่เสถียรอยู่หลายชั่วโมง เรียกว่า Schiff base ต่อมา จะกลายสภาพเป็นสารที่มั่นคง เรียกว่า early glycosylation product (EGP) หรือ Amadori protein แต่ถ้ามีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน สารนี้จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น advanced glycation end products (AGEs) และทำให้ ROS เกิดขึ้น นอกจากนี้ การผลิตซูเปอร์ออกไซด์ แรดิคัล ($O_2^{\cdot-}$) มากเกินไปในภาวะน้ำตาลในเลือดสูง จะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase โดยวิถีการสังเคราะห์ hexosamine ได้ (Du et al. 2000) ดังที่กล่าวมา กลไก

เหล่านี้เป็นตัวทำให้เกิดอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้นในเซลล์ และสร้างความเสียหายแก่เซลล์ได้



ภาพที่ 2-6 แสดงกลไกการเกิด oxidative stress ในภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสสูง

(George and Mary, 2004)

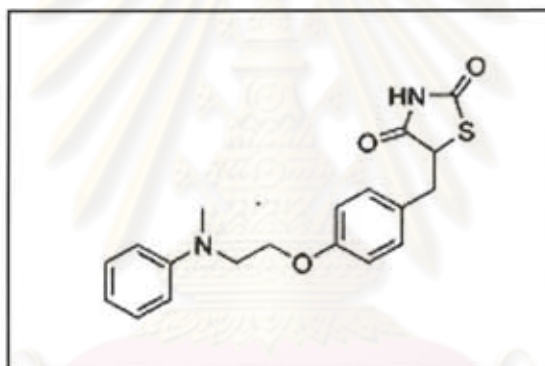
ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. Rosiglitazone

Rosiglitazone เป็นยาในกลุ่ม Thiazolidinediones ยากลุ่มนี้เป็นยาเบาหวานกลุ่มใหม่ ออกฤทธิ์แตกต่างจาก sulphonylurea คือ ไม่กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน แต่สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินที่เนื้อเยื่อที่ออกฤทธิ์ คือ กล้ามเนื้อลาย, ไขมัน และตับ เนื่องจากสาเหตุสำคัญของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คือ ภาวะดื้ออินซูลิน การรักษาโดยมุ่งที่จุดนี้ จึงทำให้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดียิ่งขึ้น

7.1 คุณสมบัติทางเคมี

สูตรโครงสร้าง คือ 5-((4-(2-(methyl-2-pyridinylamino) ethoxy)phenyl)methyl)-2,4-thiazolidinedione น้ำหนักโมเลกุลของ rosiglitazone เท่ากับ 357.428 g/mol



ภาพที่ 2-7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของยา rosiglitazone

Available from: <http://www.dalton.com/rosiglitazone.html>

7.2 เกสัชจลนศาสตร์

Rosiglitazone สามารถจับกับพลาสมาโปรตีนประมาณร้อยละ 99.8 ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอัลบูมิน และถูกเปลี่ยนแปลงโดยปฏิกิริยา N-demethylation และ hydroxylation ที่ตับเป็นสำคัญ หลังจากนั้นจะ conjugate กับ sulphate และ glucuronate ข้อมูลการศึกษา in vitro แสดงให้เห็นว่า rosiglitazone ถูกเปลี่ยนแปลงโดย cytochrome P450 isoenzyme 2C8 เป็นหลัก และ 2C9 เป็นส่วนน้อย เมตาบอไลต์ของยานี้จะไม่มีฤทธิ์เท่าตัวยาตัวจริง การให้ rosiglitazone โดยการรับประทานหรือให้ทางหลอดเลือดดำ พบว่าประมาณร้อยละ 64 ปริมาณยาจะถูกขับออกทางปัสสาวะ และร้อยละ 23 ปริมาณยาจะถูกขับออกทางอุจจาระ ระดับยาจะขึ้นสูงสุดภายใน 2-3

ชั่วโมง โดยมีค่าครึ่งชีวิตนาน 3.5-4 ชั่วโมง และจะเห็นผลการรักษาสูงสุดภายใน 8-12 สัปดาห์หลังเริ่มให้ยา

7.3 กลไกการออกฤทธิ์

ออกฤทธิ์กระตุ้นโดยการจับกับ nuclear transcription factor ที่เรียกว่า PPAR (peroxisome-proliferator-activated receptors) ซึ่งเป็น nuclear-receptor และควบคุมการทำงานโดยการแสดงออกของยีน โดยการจับกับ ligand binding PPAR ประกอบด้วย 3 subtype คือ PPAR- α , PPAR- γ และ PPAR- δ ซึ่งแต่ละ subtype จะพบในแต่ละเนื้อเยื่อและอวัยวะแตกต่างกัน thiazolidinedione จะจับกับ PPAR- γ เป็นหลัก ซึ่งพบมากที่เนื้อเยื่อไขมัน กล้ามเนื้อ และตับ โดยพบที่เนื้อเยื่อไขมันมากกว่าเนื้อเยื่ออื่นๆ กลไกการทำงานของ PPARs ที่ควบคุมโดยยีน อธิบายผ่านกลไก 2 ชนิด

7.3.1 กระบวนการ transactivation เป็นการกระตุ้นการทำงานของ DNA โดยกระตุ้นผ่าน retinoid x receptor (RXR) กระบวนการนี้เริ่มจากการกระตุ้น PPAR- γ โดย thiazolidinedione จับกับ ligand binding site ของ PPAR- γ โดยอาศัยการทำงานของ co-activator ด้วย covalent bond หลังจากนั้นจะจับกับ RXR ด้วยพันธะ heterodimer ซึ่งจะมีการกระตุ้นการทำงานของส่วน promoter region เรียกว่า PPAR response elements (PPRE) ทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของ DNA โดยขบวนการ transcription และมีการผลิตโปรตีนต่างๆ เพื่อควบคุมผลทางชีวภาพ

7.3.2 กระบวนการ transrepression โดยที่ thiazolidinediones จับกับ ligand binding site ของ PPAR- γ แล้วมีผลลดการแสดงออกของยีนต่างๆ ทำให้หยุดการทำงานของ pathways ต่างๆ เช่น nuclear factor - KB (NF-KB), STAT และ Fos-Jun signal pathway ซึ่งผลดังกล่าวข้างต้นจะลดปฏิกิริยาการเกิดกระบวนการอักเสบต่อเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกาย

ดังนั้นโดยสรุปกลไกการออกฤทธิ์ของ thiazolidinediones อธิบายผ่านกลไกสำคัญดังต่อไปนี้

1. Thiazolidinediones เมื่อจับกับ PPAR- γ มีผลให้ transcriptional activity ของ insulin-responsive genes เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลในการควบคุมการนำกลูโคสไปใช้ โดยอาศัยอินซูลินของเนื้อเยื่อต่างๆ การเจริญของเซลล์ไขมัน และกระบวนการเมแทบอลิซึมของไขมัน ซึ่งตัวรับเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมภาวะสมดุลของไขมัน การเจริญของเซลล์ไขมัน และการออกฤทธิ์ของอินซูลิน

2. Thiazolidinediones จับกับตำแหน่งที่ทับกันกับ insulin response sequences (InsRE) ทำให้เกิดการแสดงออกของยีน ที่ควบคุมการสร้างตัวนำพาพลาสมา GLUT เข้าสู่เซลล์ (GLUT) ได้แก่ GLUT1 และ GLUT4

3. Thiazolidinediones ลดการแสดงออกของยีนที่สร้าง TNF- α ของเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งจะมีผลทำให้การแสดงออกของ GLUT4 ของเนื้อเยื่อไขมันเพิ่มขึ้น ทำให้การนำกลูโคสไปใช้โดยผ่านทางอินซูลินเพิ่มมากขึ้น

4. Thiazolidinediones ลดการแสดงออกของ ob-gene ซึ่งเป็นตัวควบคุมการอยากอาหาร น้ำหนักตัว และสมดุลของพลังงานมีผลให้การแสดงออกของ leptin ลดลง

7.4 ข้อบ่งชี้การใช้ยา

7.4.1 ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

7.4.2 ใช้ rosiglitazone ควบคู่ไปกับการควบคุมอาหาร และการออกกำลังกาย เพื่อทำให้การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ดีขึ้น

7.4.3 ใช้ rosiglitazone เดี่ยวๆ (monotherapy) หรือใช้ร่วมกับยารักษาเบาหวานกลุ่ม sulphonylurea, metformin หรืออินซูลิน (combination therapy) ในกรณีที่มีการควบคุมอาหารและการออกกำลังกายร่วมกับการรักษาด้วยยาตัวใดตัวหนึ่งไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ได้เพียงพอ

7.5 ขนาดของยา

Rosiglitazone มีขนาด 2, 4 และ 8 มิลลิกรัม ขนาดที่ใช้ 2-8 มิลลิกรัมต่อวัน ขนาดยาปกติสำหรับเริ่มต้นการรักษาคือ rosiglitazone 4 มิลลิกรัมต่อวัน โดยให้รับประทานครั้งเดียวหรือแบ่งให้วันละ 2 ครั้ง ระยะเวลาในการเริ่มออกฤทธิ์ ใช้เวลาประมาณ 1-4 สัปดาห์ ถึงจะเริ่มมีผลในการลดระดับน้ำตาลและอินซูลิน การตอบสนองสูงสุดมักจะเกิดหลังใช้ยาไปแล้วประมาณ 6-8 สัปดาห์

7.6 รูปแบบทางเภสัชกรรม

Rosiglitazone เป็นเม็ดยามีลักษณะเป็นรูปห้าเหลี่ยมและเคลือบฟิล์มใน 1 เม็ด ประกอบด้วย rosiglitazone maleate ซึ่งเทียบเท่ากับ rosiglitazone 2, 4 และ 8 มิลลิกรัม

7.7 ข้อควรระวังและผลข้างเคียงจากการใช้ thiazolidinediones

7.7.1 น้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ภาวะคั่งน้ำและภาวะโลหิตจาง

ผลน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นจากการใช้ยาเป็นผลจากภาวะน้ำคั่งจากปริมาตรสารน้ำในร่างกายที่เพิ่มขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อต่างๆ บวม น้ำ ภาวะบวม น้ำพบได้ 4 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยที่ใช้ยาเมื่อเทียบกับ 1 ถึง 2 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุมหรือใช้ยาลดน้ำตาลชนิดอื่น การใช้ยา thiazolidinediones ร่วมกับยาฉีดอินซูลิน พบว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อภาวะหัวใจวายได้ 2.5 เท่า เมื่อเทียบกับใช้ยาอินซูลินฉีดอย่างเดียว อาจเป็นผลจากภาวะบวมที่เพิ่มมากขึ้น ดังนั้น การใช้ thiazolidinediones ร่วมกับยาฉีดอินซูลินต้องระวังกลุ่มเสี่ยงต่อภาวะหัวใจวายด้วย นอกจากนี้ยายังมีผลลดระดับ hemoglobin และ hematocrit เพียงเล็กน้อยมักไม่มีอาการแสดงสำคัญต่อภาวะซีด (Czoski-Murray et al. 2004)

7.7.2 ภาวะตับอักเสบ

การศึกษาแบบ placebo-blind จำนวน 13 การศึกษาได้แสดงถึงผลของยา thiazolidinediones ต่อภาวะตับอักเสบ โดยผลเอนไซม์การทำงานของตับมากกว่า 3 เท่าของค่าปกติ เป็นจำนวนเปอร์เซ็นต์ผู้ป่วยทั้งหมด ในจำนวนที่ได้รับยาแต่ละชนิดดังนี้ 1.91 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนผู้ป่วย 2,510 คน 0.26 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนผู้ป่วย 1,526 คน และ 0.17 เปอร์เซ็นต์ ในจำนวนผู้ป่วย 3,503 คน ที่ได้รับยา troglitazone, pioglitazone และ rosiglitazone ตามลำดับ (Lebovitz et al. 2002) ส่วนกรณีที่มีภาวะตับอักเสบรุนแรง โดยผลเอนไซม์การทำงานของตับมากกว่า 10 เท่าของค่าปกติพบรายงานจำนวน 0.68 เปอร์เซ็นต์ ในผู้ป่วยที่ใช้ยา troglitazone แต่ยังไม่พบรายงานในผู้ป่วยที่ใช้ยา pioglitazone หรือ rosiglitazone ดังนั้นจึงแนะนำให้ตรวจการทำหน้าที่ของตับก่อนให้ยา และติดตามการทำหน้าที่ของตับทุก 2 เดือนในปีแรก (Hussein et al. 2004)

7.7.3 ภาวะไตวาย

การใช้ยา thiazolidinediones ในผู้ป่วยที่มีการทำงานของไตเสื่อมลง ไม่จำเป็นต้องปรับขนาดยา เนื่องจากการกำจัดของ total และ unbound ของยา รวมถึงค่าครึ่งชีวิตในการกำจัดของยาเมตะบอไลส์ไม่มีความสัมพันธ์กับการกำจัดของสาร creatinine และไม่พบว่ายาทำให้การทำงานของไตแย่ลงแต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาในระยะยาวในการให้ยา thiazolidinediones ในผู้ป่วยไตวาย และยากลุ่มนี้ทำให้น้ำคั่ง ซึ่งเป็นข้อเสียในการใช้ยากลุ่มนี้ในผู้ป่วยไตวาย

8. องุ่น (*Vitis vinifera* Linn.)

องุ่นมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Vitis vinifera* Linn. ชื่อภาษาอังกฤษ คือ grape พืชชนิดนี้อยู่ในวงศ์ Vitidaceae

8.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลำต้น: ลักษณะเป็นไม้เลื้อย เนื้อแข็ง กิ่งก้านเล็ก เลื้อยเกาะด้วยมือพัน

ใบ: เป็นใบเดี่ยว ใบรูปกลม ขอบหยักเว้าลึก 3-7 พู โคนใบเหว้าหัวใจ

ดอก: ออกเป็นช่อแยกแขนง ดอกย่อยขนาดเล็กสีเขียว มีหมวก (Cap) จะหลุดออกเมื่อดอกบานกลีบดอกเมื่อดอกบานสีขาว โคนเชื่อมติดกัน ปลายแยก 5 กลีบ

ผล: เป็นผลเดี่ยวที่ออกเป็นพวง ผลย่อยรูปกลมรี ฉ่ำน้ำ ผิวมีนวลเกาะ รสหวาน มีสีเขียว ม่วงแดง และม่วงดำ แล้วแต่พันธุ์ มี 1-4 เมล็ด ปัจจุบันมีการผลิตองุ่นไร้เมล็ด แต่ผลค่อนข้างเล็ก

8.2 สรรพคุณขององุ่น

ใบสามารถรักษาแผลสด ห้ามเลือด

ส่วนเครือและรากใช้ในการรักษาโรคตับอักเสบ ตีชาน มีฤทธิ์ในการขับลม ขับปัสสาวะ รักษาโรคไขข้ออักเสบ ปวดเอ็น ปวดกระดูกและมีฤทธิ์ ระงับประสาท แก้ปวด แก้อาเจียน

ผลมีสรรพคุณเป็นยาระบายอ่อนๆ แก้ไข้ แก้ไอ

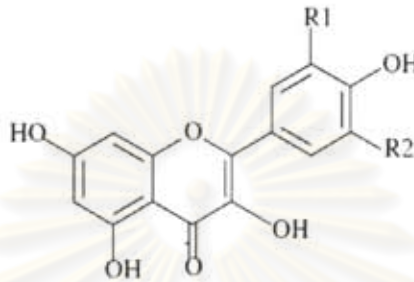
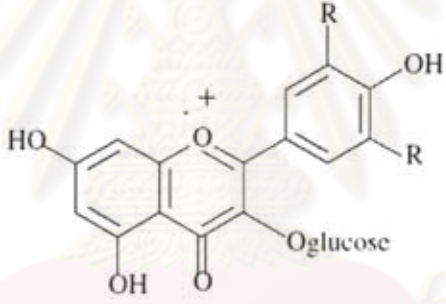
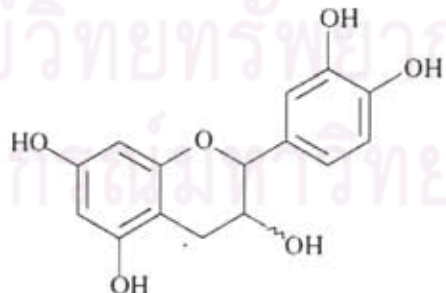
เมล็ดมีฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ (Haslam, 1989), ขยายหลอดเลือด, ด้านมะเร็ง, ด้านการอักเสบ, ลดอาการภูมิแพ้, ด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา, ป้องกันโรคหลอดเลือดหัวใจ, กระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Rice-Evans et al. 1996; Salah et al. 1995) และลดน้ำตาลในเลือด (El-Alfy et al. 2005; Pinent et al. 2004)

8.3 การศึกษาสารประกอบเคมี

ได้มีการศึกษาถึงสารประกอบทางเคมีของเมล็ดองุ่นมาเป็นเวลานาน การค้นพบสารประกอบดังแสดงในตารางที่ 2-4

ตารางที่ 2-4 แสดงโครงสร้างสารประกอบเคมีบางชนิดของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

(Amerine and Ough, 1980)

General type	General structure	Examples
Flavonoids		
Flavonols		Quercetin Kaempferol Myricetin
Anthocyanins		Cyanin Delphinin Petunin Peonin Malvin
Flavan-3-ols		Catechin Epicatechin Gallocatechin Procyanidins Condensed tannins

8.4 การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

Bagchi และคณะ (2000) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่ออนุมูลซูเปอร์ออกไซด์แอนไอออน ($O_2^{\cdot -}$) และอนุมูลไฮดรอกซี (OH^{\cdot}) ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระดีกว่าวิตามินอี และวิตามินซี นอกจากนี้ จากรายงานการศึกษาของ Sato และคณะ (1999) พบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซี (RO_2^{\cdot}) ได้ดีกว่า trolox (อนุพันธ์ของวิตามินอี)

Ahn และคณะ (2002) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น (in vitro) และทำการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน, ประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ catalase และ superoxide dismutase และผลต่อการเกิด oxidative stress ในตับ ผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระ (in vitro) สามารถเพิ่มระดับเอนไซม์ catalase และ superoxide dismutase และสามารถยับยั้งการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ (in vivo)

Pinent และคณะ (2004) ได้ทำการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเบาหวานด้วย streptozotocin และทำการศึกษานำกลูโคสกลับเข้าเซลล์ โดยใช้เซลล์ L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes ซึ่งผลการทดลองพบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นขนาด 250 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดแบบเฉียบพลันของหนูเบาหวานได้ และสามารถกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes ได้ ตามความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น ซึ่งมีการออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน

EI-Alfy และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาศักยภาพของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการป้องกันเซลล์ของตับอ่อน จากการทำลายของอนุมูลอิสระในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเบาหวานด้วย alloxan ผลการทดลองพบว่า หนูขาวเมื่อได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นขนาด 50 และ 100 มก./กก. มีฤทธิ์ป้องกันการเสียหายของตับอ่อนจากอนุมูลอิสระ สามารถเพิ่มระดับกลูตาไธโอน และสามารถยับยั้งปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชันของไขมันในตับอ่อน ซึ่งผลจากการลดการเสียหายของตับอ่อนจากอนุมูลอิสระ สามารถรักษาระดับฮอร์โมนอินซูลินให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติได้ มีผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานลดลง

Hajime และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการปกป้องการเกิดภาวะความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูง (30mM) ต่อสารสกัดจากเมล็ดองุ่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่างกัน ได้แก่ monomer, oligomer, polymer และ oligonol พบว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่น คือ oligomer มีความแรงมากกว่าชนิดอื่น ในการปกป้องการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ LLC-PK₁ ได้ โดยมี cell viability เพิ่มขึ้น สามารถลดการผลิต ROS และ NO ภายในเซลล์จากภาวะ oxidative stress ได้ ยับยั้งการเคลื่อนที่ของ nuclear factor-kappa B ออกสู่ไซโตพลาสซึม และทำให้การแสดงโปรตีนของ COX2, iNOS และ bax ลดลงได้

Xiao-pei และคณะ (2008) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในการป้องกันระบบประสาทในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ผลการทดลองพบว่า เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นขนาด 250 มก./กก./วัน แก่หนูเบาหวานระยะเวลา 24 สัปดาห์ จะทำให้ความเร็วของการนำกระแสประสาทเพิ่มขึ้น (motor nerve conductive velocity; MNCV) สามารถลด HbA_{1c}, AGEs และ malondialdehyde ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ สารสกัดจากเมล็ดองุ่นสามารถทำให้เอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานได้

8.5 การศึกษาความเป็นพิษ

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน โดยการป้อนสารสกัดจากเมล็ดองุ่นให้กับหนูขาว ทางปาก ขนาด 2 และ 4 กรัม/กิโลกรัม ครั้งเดียวแก่หนูแต่ละกลุ่ม สังเกตผลเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบอาการเป็นพิษ และไม่พบสิ่งผิดปกติใดๆที่เกิดขึ้นกับสัตว์ทดลอง (Yamakoshi et al. 2002) และการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง (3 เดือน) โดยการผสมสารสกัดจากเมล็ดองุ่นในอาหารมาตรฐาน ขนาด 0, 0.63, 1.25 หรือ 2.5% (w/w) ทุกวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 เดือน พบว่าการบริโภคอาหารและน้ำหนักตัวของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่น และกลุ่มควบคุม ไม่แตกต่างกัน ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของค่าต่างๆทางโลหิตวิทยา เช่น hemoglobin, hematocrit, erythrocyte count, platelet count และค่าทางซีรั่มชีวเคมี เช่น aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, creatinine (Bentivegna and Whitney, 2002)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

วัตถุประสงค์และอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 100-150 กรัม จำนวน 36 ตัว จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม พักสัตว์ทดลองก่อนทำการศึกษาน้อย 1 สัปดาห์ ณ ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยควบคุมอุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ความชื้น แสงสว่าง ให้เหมาะสม และมีการปรับสัดส่วนของอาหารระหว่างอาหารสำเร็จรูป (CP) ต่อาหารสูตรมาตรฐาน (normal diet) เท่ากับ 50:50, 25:75 และ 0:100 ตามลำดับ และให้น้ำไม่จำกัดปริมาณ

หลังจากสิ้นสุดระยะเวลาในการพักเลี้ยง แบ่งกลุ่มการทดลองอย่างสุ่มออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 6 ตัว เพื่อให้ได้รับอาหารสำหรับการทดลอง ตลอดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ โดยมีกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรมาตรฐาน ส่วนอีก 5 กลุ่มที่เหลือได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง อาหารจะทำการเตรียมเองและผสมอาหารตามสูตรทุกสัปดาห์ ดังส่วนประกอบของอาหารสำหรับการทดลองที่แสดงไว้ในตารางที่ 3-1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3-1 แสดงส่วนประกอบของอาหารสำหรับการทดลอง (กรัม/กิโลกรัมอาหาร)
(Honghui et al. 2007)

ส่วนประกอบ	Normal diet	High-fructose diet
Casein (vitamin free)	200	200
Cornstarch	530	-
Sucrose	100	-
Fructose	-	630
Soybean oil	70	70
Mineral mix	35	35
Vitamin mix	10	10
Fiber	50	50
Methionine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5

2. สมุนไพรและแหล่งที่มา

เมล็ดองุ่นอบแห้ง จากบริษัทสยามไวน์เนอรี่ จำกัด จังหวัดสมุทรสาคร ถูกนำมา ต้มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เพื่อล้างสิ่งสกปรกเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงบดหยาบด้วยเครื่อง บดไฟฟ้า จากนั้นสกัดด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ประมาณ 2 ชั่วโมง กรองด้วยกระดาษ กรอง Whatman เบอร์ 4 แฉะแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer เก็บที่อุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้ (Saito et al. 1998)

3. สารเคมีและแหล่งที่มา

- 2,4-dinitrophenylhydrazine (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Aluminium chloride (Ajax Finechem)
- Catalase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Fluka, Switzerland)
- Gallic acid (Fluka, Switzerland)

- Glucose (Merck, Germany)
- Glutathione assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Glutathione peroxidase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- HDL cholesterol kit (Human Gesellschaft, Germany)
- Heparin (Leo Pharmaceutical, Denmark)
- Naringenin (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- n-Butanol (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- o-Dianisidine dihydrochloride (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Pentobarbital sodium (Nembutal[®], Sanofi, France)
- PGO enzyme (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Potassium acetate (Carla erba, Italy)
- Potassium hydroxide (Merck, Germany)
- Quercetin (Chemical fine, U.S.A.)
- Rat insulin enzyme immunoassay kit (SPI-bio, U.S.A.)
- Rosiglitazone (Avandia[®])
- Sodium carbonate (Carla erba, Italy)
- Sodium chloride (Merck, Germany)
- Sodium dodecyl sulfate (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Superoxide dismutase assay kit (Cayman, U.S.A.)
- Thiobarbituric acid (TBA) reagent (Sigma Chemical Co., U.S.A.)
- Total cholesterol kit (Human Gesellschaft, Germany)
- Triglyceride kit (Human Gesellschaft, Germany)

4. เครื่องมือ

- Autopipets (Gilson, France)
- Blood glucose monitor (Advantage[®], Roche Diagnostics Co., Thailand)
- Centrifuge (Heraeus, Biofuge 22R, Germany)
- Cuvettes (Bibby sterilin)
- Hand homogenizer grinder

- Hot plate (Sangi Model4405)
- Lyophilizer
- Microtube (Costar, U.S.A.)
- pH meter (Hanna, Italy)
- Spectrophotometer (Shimadzu UV-160A, Japan)
- Vortex mixer (Gemmy industrial, Taiwan)
- Water bath shaker (Grant, England)
- Weighting machine (Sartorius, Germany)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 การตรวจหาสารประกอบเคมีของสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

- 1.1 ตรวจหาสารประกอบฟีนอลิก (Asami et al. 2003)
 - 1.1.1 นำสารสกัดมา 0.5 กรัม ละลายในน้ำกลั่นได้เป็น 0.125 กรัม/มิลลิลิตร
 - 1.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน gallic acid ที่ความเข้มข้น 0, 25, 50, 100, 250, 500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เพื่อทำเป็นกราฟมาตรฐาน
 - 1.1.3 นำสารละลายมา 0.2 มิลลิลิตร เติม Folin-Ciocalteu's phenol reagent 1 มิลลิลิตร ผสมกันในหลอดทดลอง ทิ้งไว้ 8 นาที เติม 2% sodium carbonate solution (w/v) 3 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1.5 ชั่วโมง
 - 1.1.4 นำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 760 นาโนเมตร
 - 1.1.5 คำนวณหาความเข้มข้นของสารประกอบฟีนอลิก เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน

- 1.2 ตรวจหาสารฟลาโวนอยด์ (Chang et al. 2002)
 - 1.2.1 Aluminum chloride colorimetric method
 - 1.2.1.1 นำสารสกัดมา 10 มิลลิกรัม ละลายใน 80% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
 - 1.2.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน quercetin โดยนำมา 10 ก. ละลายใน 80% ethanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
 - 1.2.1.3 นำสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร เติมสารดังต่อไปนี้
 - 95% ethanol ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร
 - 10% aluminum chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
 - 1 โมลาร์ potassium acetate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร
 - น้ำกลั่นปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร
 - 1.2.1.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที
 - 1.2.1.5 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร
 - 1.2.2 2,4-Dinitrophenylhydrazine colorimetric method

- 1.2.2.1 นำสารสกัดมา 10 mg ละลายใน 80% ethanol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร
- 1.2.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน Naringenin 20 มิลลิกรัม ละลาย ใน ethanol ให้ได้ความเข้มข้นที่ 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
- 1.2.2.3 นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร เติม ethanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และเติม 1% 2,4-Dinitrophenylhydrazine จำนวน 2 มิลลิลิตร
- 1.2.2.4 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 50 นาที
- 1.2.2.5 ปล่อยให้เย็น แล้วเติม 1% potassium hydroxide ใน 70% ethanol 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที
- 1.2.2.6 นำสารละลายมา 1 มิลลิลิตร ไปปั่นที่ 1,000 รอบ/นาที
- 1.2.2.7 แยกตะกอนออก นำส่วนใสมาเติมน้ำจนมีปริมาตร 25 มิลลิลิตร
- 1.2.2.8 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 495 นาโนเมตร

การทดลองที่ 2 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่น (grape seed extract; GSE) ต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับพลาสมาอินซูลินในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

แบ่งหนูแรทออกเป็น 6 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว

- กลุ่มที่ 1 (Normal diet) : ได้รับอาหารสูตรมาตรฐานเป็นเวลา 8 สัปดาห์
 กลุ่มที่ 2 (HF diet) : ได้รับ high-fructose diet เป็นเวลา 8 สัปดาห์
 กลุ่มที่ 3 (0.5%GSE) : ได้รับ high-fructose diet เสริมด้วย 0.5%GSE

เป็นเวลา 8 สัปดาห์

- กลุ่มที่ 4 (1%GSE) : ได้รับ high-fructose diet เสริมด้วย 1%GSE
 เป็นเวลา 8 สัปดาห์

- กลุ่มที่ 5 (2%GSE) : ได้รับ high-fructose diet เสริมด้วย 2%GSE
 เป็นเวลา 8 สัปดาห์

- กลุ่มที่ 6 (Drug-treated) : ได้รับ high-fructose diet เป็นเวลา 8 สัปดาห์ โดย
 ให้ยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน
 เริ่มต้นของสัปดาห์ที่ 5 ของระยะเวลาการทดลอง

ผสมอาหารเองตามสูตรให้หนูแต่ละกลุ่ม ติดต่อกัน 8 สัปดาห์ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดในหนูทุกกลุ่ม ทุก 2 สัปดาห์ โดยงดให้อาหารก่อนทำการเจาะเลือดอย่างน้อย 10 ชั่วโมง ทำการวัดปริมาณการกินอาหารและน้ำ และชั่งน้ำหนักหนูแรททั้ง 6 กลุ่มทุกวัน

- การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำได้โดยการเจาะเลือดจากหลอดเลือดดำที่หางโดยใช้ needle เบอร์ 26 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร เก็บเลือดไว้ใน microcentrifuge tube ที่มี heparin นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมาโดยเครื่อง centrifuge (Biofuge 22R) ที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำพลาสมาที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวัดระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับพลาสมาอินซูลินต่อไป

- การวัดระดับน้ำตาลในพลาสมา

โดยใช้วิธี Glucose Oxidase Test (Sigma, U.S.A.) (ภาคผนวก ข) และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV-160A) โดยระดับน้ำตาลมีหน่วยเป็นมิลลิกรัมในเลือด 100 มิลลิลิตร (มิลลิกรัม/เดซิลิตร)

- การวัดระดับพลาสมาอินซูลิน

โดยใช้วิธี Enzyme Immunoassay (EIA) (SPI-bio, U.S.A.) (ภาคผนวก ค) และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร โดยเครื่อง spectrophotometer (Shimadzu UV-160A) โดยพลาสมาอินซูลินมีหน่วยเป็นนาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นนำมาคำนวณค่า Homeostasis model assessment of basal insulin resistance (HOMA-IR) (ภาคผนวก ง) ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ใช้ประเมินภาวะดื้ออินซูลิน (Matthews et al. 1985) ตามสูตร ดังนี้

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL})}{22.5}$$

โดย 1 $\mu\text{IU/mL}$ = 6.945 pmol/L (SI units)

การทดลองที่ 3 ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลในพลาสมาของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยการทำให้ oral glucose tolerance test (OGTT)

ก่อนสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 1 วัน งดให้อาหารก่อนทำการเจาะเลือดอย่างน้อย 10 ชั่วโมง หลังจากนั้นป้อนสารละลายกลูโคสขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม น้ำหนักตัว โดยใช้ gavage ซึ่งเป็นสแตนเลสเบอร์ 18 ในหนูทุกกลุ่ม เก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่หาง ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้ needle เบอร์ 26 เพื่อตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสและพลาสมาอินซูลินที่เวลา 0, 15, 30, 60, 90 และ 120 นาที

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับไขมันในเลือด และการทำงานของตับและไตในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการทดลอง 8 สัปดาห์ งดให้อาหารอย่างน้อย 10 ชั่วโมง ทำการสลบหนูโดยการฉีด Sodium pentobarbital ขนาด 60 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางช่องท้อง เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจโดยวิธี cardiac puncture ของหนูทั้ง 6 กลุ่ม ปริมาตร 6 มิลลิลิตร โดยใช้ needle เบอร์ 21 และทำการเก็บตับ โดยตัวอย่างเลือดจะแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปริมาตร 3 มิลลิลิตร เก็บเลือดไว้ใน microcentrifuge tube ที่มี heparin นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมาที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำพลาสมาที่ได้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวัดระดับน้ำตาลกลูโคส, พลาสมาอินซูลิน, total cholesterol (TC), triglyceride (TG) และ high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) ต่อไป ส่วนตัวอย่างเลือดที่เหลือ นำไปปั่นแยกซีรัมที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำซีรัมที่ได้ส่งตรวจสารเคมีในเลือดที่ภาควิชาเวชศาสตร์การธนาคารเลือด คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่ blood urea nitrogen (BUN), creatinine, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) และ alkaline phosphatase (ALK)

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ

นำตับจากการทดลองที่ 4 ของหนูแรททุกกลุ่มมาศึกษาการเกิด lipid peroxidation โดยการวัดระดับ malondialdehyde ที่เกิดขึ้น และศึกษาระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total glutathione และ glutathione peroxidase (GPx)

- การสกัดโปรตีนจากตับ และวัดปริมาณโปรตีนรวม

ซึ่งตัด 0.4 กรัมต่อ Homogenizing buffer ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บดใน hand homogenizer grinder จากนั้นปั่นแยกโปรตีนด้วยความเร็ว 10,000 g 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ยกเว้นเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งใช้ความเร็ว 1,500 g 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นดูดส่วนใสเพื่อนำไปตรวจวัดระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และวัดปริมาณโปรตีนรวม

การเตรียม dye reagent

ละลาย Comassie® Brilliant Blue G-250 350 มิลลิกรัม ใน 95% ethanol ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมกับ 85% phosphoric acid ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จะได้ Bradford stock solution เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำ stock มา 30 มิลลิลิตร เติม 95% ethanol ปริมาตร 15 มิลลิลิตร กับ 85% phosphoric acid ปริมาตร 30 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 425 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ขั้นตอนการทดลอง : เติม dye reagent ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมแล้วตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (Bradford, 1976)

5.1 Lipid peroxidation

ขั้นตอนการทดลอง : ใส่ตัวอย่างปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง เติม 8.1% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร, 20% acetic acid ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร และ 0.8% (w/v) 2-thiobarbituric acid solution ปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ปิดปาก หลอดทดลองให้แน่น และต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้น เติม n-Butanol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมและนำไปปั่นที่ 3,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ที่

อุณหภูมิตั้งที่ 22 องศาเซลเซียส ดูดสารละลายส่วนใส วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 535 นาโนเมตร รายงานผลในหน่วยนาโนโมล/มก. โปรตีน (nmol/mg protein) (Ohkawa et al., 1979)

5.2 Superoxide dismutase (SOD)

ขั้นตอนการทดลอง : ใส่สารละลาย tetrazolium salt ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร บน 96 well plate จากนั้นเติมตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติม xanthine oxidase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดด้วย plate cover แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 420 นาโนเมตร รายงานผลในหน่วยยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน (U/mg protein) (Marklund, 1980)

5.3 Catalase (CAT)

ขั้นตอนการทดลอง : เติมสารละลาย 100 mM potassium phosphate, pH 7.0, ปริมาตร 100 ไมโครลิตร, methanol ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร บน 96 well plate เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติม hydrogen peroxide ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ปิดด้วย plate cover แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 20 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติม potassium hydroxide ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาจากนั้นเติมสารละลาย 4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole (purpald) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ปิดด้วย plate cover แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย potassium periodate ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ปิดด้วย plate cover แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร รายงานผลในหน่วย ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน (U/mg protein) (Johansson and Borg, 1988)

5.4 Glutathione peroxidase (GPx)

ขั้นตอนการทดลอง : เติมส่วนผสมของสารละลาย 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 5 mM EDTA ปริมาตร 100 ไมโครลิตร, co-substrate mixture (NADPH, glutathione, glutathione reductase) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร บน 96 well plate เริ่มต้นปฏิกิริยาโดยการเติม cumene hydroperoxide ปริมาตร 20 ไมโครลิตร นำไปวางบนเครื่องเขย่านาน 2-3 วินาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร รายงานผลในหน่วย ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน (U/mg protein) (Paglia and Valentine, 1967)

5.5 Total glutathione

ขั้นตอนการทดลอง : เติมตัวอย่างปริมาตร 50 ไมโครลิตร บน 96 well plate จากนั้นเติมส่วนผสมของสารละลาย 0.4 M 2-(N-morpholino)ethanesulphonic acid, 0.1 M phosphate, 2 mM EDTA, pH 6.0, GSH Co-factor, GSH enzyme mixture, DTNB และ น้ำกลั่นปริมาตร 150 ไมโครลิตร ปิดด้วย plate cover แล้วนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่านาน 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 405 นาโนเมตร รายงานผลในหน่วย นาโนโมล/มิลลิกรัมโปรตีน (nmol/mg protein) (Griffith, 1980)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลองใช้ post hoc range test โดยใช้ Least Significance Difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ โดยใช้ $\text{mean} \pm \text{standard error of mean (S.E.M.)}$ ในการนำเสนอข้อมูล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 การตรวจหาสารประกอบเคมีในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ตารางที่ 4-1 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในเมล็ดองุ่น

ครั้งที่	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก ต่อสารสกัดเมล็ดองุ่น (มก./ก.)
1	2.15
2	2.18
3	2.15

ในการตรวจหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก โดยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol colorimetric (Asami et al. 2003) ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่น 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก เท่ากับ 2.16 ± 0.01 มิลลิกรัม

ตารางที่ 4-2 แสดงปริมาณสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเมล็ดองุ่น

ครั้งที่	ปริมาณของสารฟลาโวนส์ และฟลาโวนอล (มก./ก.)	ปริมาณของสารฟลาวาโนนส์ (มก./ก.)	ปริมาณรวมของสารฟลาโวนอยด์ (มก./ก.)
1	0.722	0.048	0.770
2	0.825	0.090	0.915
3	0.670	0.048	0.718

ปริมาณของสารฟลาโวนส์ และฟลาโวนอลซึ่งเป็นสารประเภทหนึ่งในกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ ตรวจพบในสารสกัดเมล็ดองุ่น โดยวิธี Aluminum chloride colorimetric method (Chang et al. 2002) ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่าในสารสกัดเมล็ดองุ่น 1 กรัม มีปริมาณสารฟลาโวนส์และฟลาโวนอลเท่ากับ 0.739 ± 0.045 มิลลิกรัม นอกจากนี้ปริมาณของสารฟลาวาโนนส์ ซึ่งเป็นสารอีกชนิดหนึ่งในกลุ่มของสารฟลาโวนอยด์ ตรวจพบในสารสกัดเมล็ดองุ่นด้วยวิธี

2,4-Dinitrophenylhydrazine colorimetric method (Chang et al. 2002) ทำซ้ำ 3 ครั้ง พบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่น 1 กรัม มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.048 ± 0.004 มิลลิกรัม ซึ่งเมื่อนำ สารฟลาโวนอยด์ที่ตรวจพบทั้งสองวิธีมารวมกันพบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่น 1 กรัม จะมีปริมาณสาร ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 0.801 ± 0.059 มิลลิกรัม



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับพลาสมาอินซูลินในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน เหนียวนาโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์

2.1 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

ผลจากการทดลองให้สารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 4-3 และรูปที่ 4-1 โดยระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของหนูทุกกลุ่มก่อนเริ่มการทดลอง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 2 สัปดาห์ พบว่าระดับน้ำตาลในพลาสมาของหนูทุกกลุ่มเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย แต่กลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ คือ 130.63 ± 8.88 และ 130.60 ± 2.48 มก./ดล. ตามลำดับ (กลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ: 113.43 ± 3.11 มก./ดล. กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% = 128.93 ± 8.51 , 123.97 ± 5.02 และ 119.96 ± 7.89 มก./ดล. ตามลำดับ)

ระดับน้ำตาลกลูโคสในสัปดาห์ที่ 4 ของการทดลองยังคงคล้ายคลึงกับสัปดาห์ที่ 2 โดยกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาได้ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ในสัปดาห์ที่ 6 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% (115.29 ± 8.28 มก./ดล.) สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาได้ 18% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (140.92 ± 10.89 มก./ดล.)

หลังจากได้รับอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% (132.60 ± 11.43) และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน (130.47 ± 7.14 มก./ดล.) สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสได้ 20% และ 21% ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (165.44 ± 15.75 มก./ดล.)

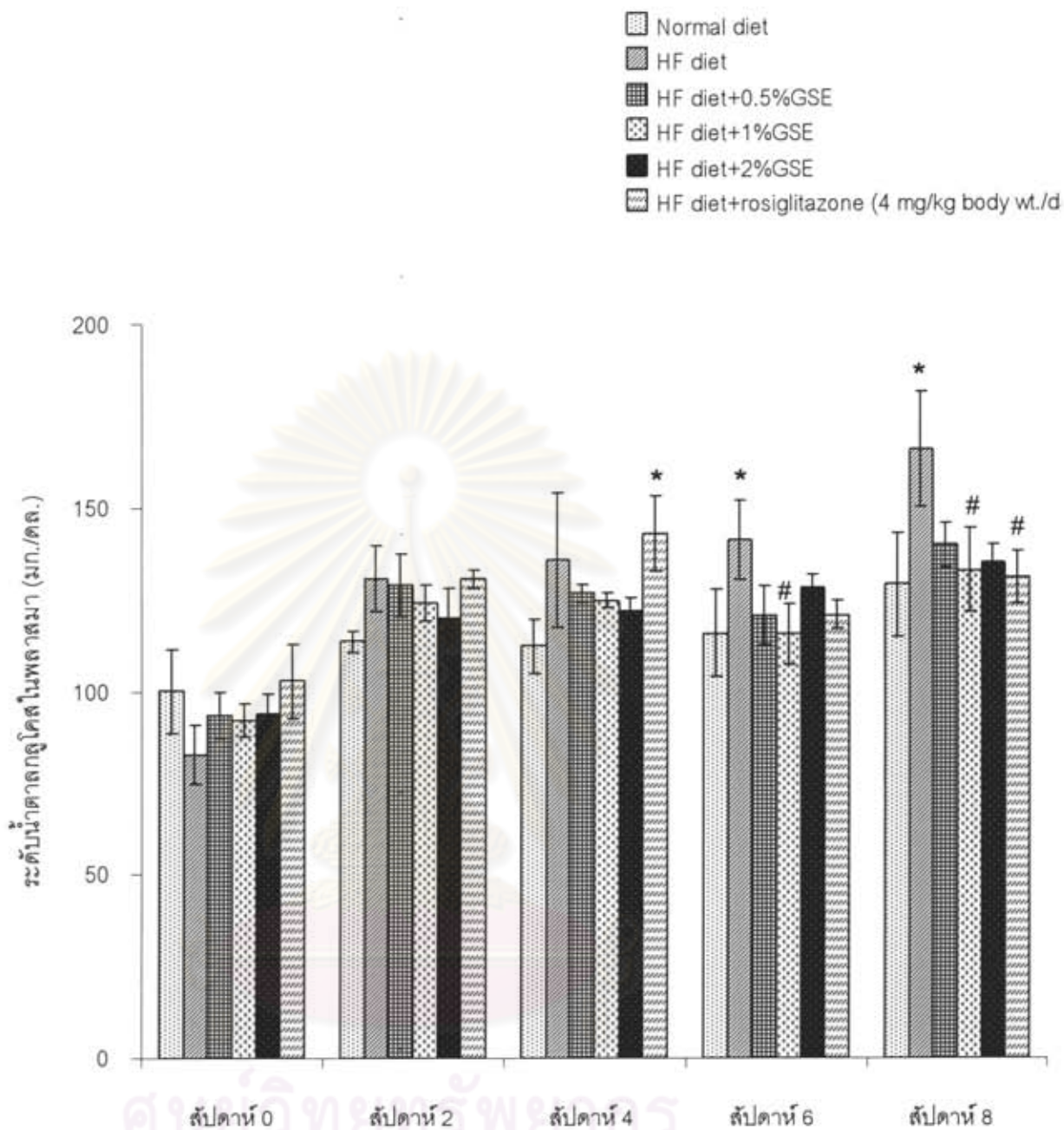
ตารางที่ 4-3 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

สัปดาห์	ระดับน้ำตาลในพลาสมาหลังอดอาหาร (มก./ดล.)					
	Control (normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			Rosiglitazone 4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน (เริ่มต้นให้ยาในสัปดาห์ที่ 5)
			0.5	1.0	2.0	
0	100.02±11.59	82.79±7.87	93.69±6.31	92.17±4.32	93.92±5.49	102.79±10.08
2	113.43±3.11	130.63±8.88	128.93±8.51	123.97±5.02	119.96±7.89	130.60±2.48
4	112.17±7.34	135.60±18.53	126.48±2.48	124.43±2.00	121.62±3.68	142.57±10.28*
6	115.58±11.82	140.92±10.89*	120.34±7.92	115.29±8.28 ^f	127.87±3.88	120.48±3.92
8	128.67±14.17	165.44±15.75*	139.39±5.86	132.60±11.43 ^f	134.52±5.19	130.47±7.14 ^f

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M.)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

^f แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF die



ภาพที่ 4-1 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน

2.2 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคีโตนูริน

ผลจากการทดลองให้สารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 4-4 และภาพที่ 4-2 โดยที่ระดับพลาสมาอินซูลินของทุกกลุ่มก่อนเริ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ในสัปดาห์ที่ 4 กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน ระดับพลาสมาอินซูลินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยพบว่ากลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone มีระดับพลาสมาอินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

หลังจากได้รับอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง จะมีระดับพลาสมาอินซูลินเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน (เริ่มต้นให้ยาในสัปดาห์ที่ 5) พบว่าระดับพลาสมาอินซูลินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-4 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อพลาสมาอินซูลินหลังอดอาหารของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

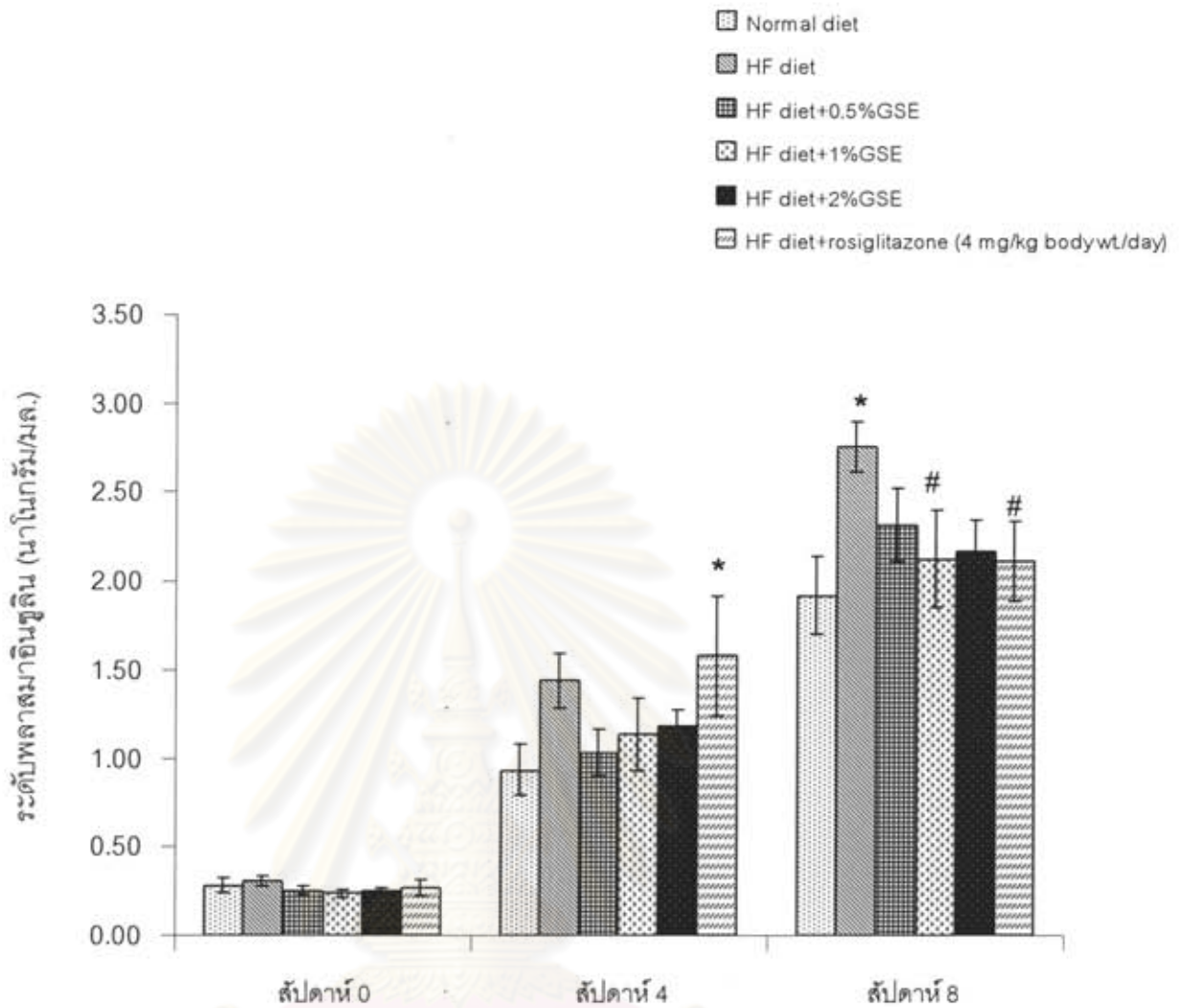
สัปดาห์	ระดับพลาสมาอินซูลิน (นาโนกรัม/มล.)					Rosiglitazone 4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน (เริ่มต้นให้ยาในสัปดาห์ที่ 5)
	Control (normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			
			0.5	1.0	2.0	
0	0.28±0.04	0.31±0.03	0.25±0.02	0.24±0.03	0.25±0.02	0.27±0.04
4	0.93±0.14	1.44±0.15	1.04±0.13	1.14±0.21	1.18±0.09	1.58±0.34*
8	1.92±0.22	2.75±0.14*	2.32±0.21	2.13±0.27 [†]	2.17±0.17	2.11±0.22 [†]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

[†] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-2 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อพลาสมาอินซูลินหลังอดอาหารของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน

2.3 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ Homeostasis model assessment of basal insulin resistance (HOMA-IR) ของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

ผลจากการคำนวณ HOMA-IR ซึ่งเป็นค่าดัชนีที่ใช้ประเมินภาวะดื้ออินซูลิน โดยการทดลองให้สารสกัดจากเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตส ปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 4-5 และภาพที่ 4-3 พบว่าค่า HOMA-IR ในสัปดาห์ที่ 4 ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่า HOMA-IR สูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในสัปดาห์ที่ 8 พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงยังคงมีค่า HOMA-IR สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน (เริ่มต้น ให้ยาในสัปดาห์ที่ 5) พบว่า HOMA-IR มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

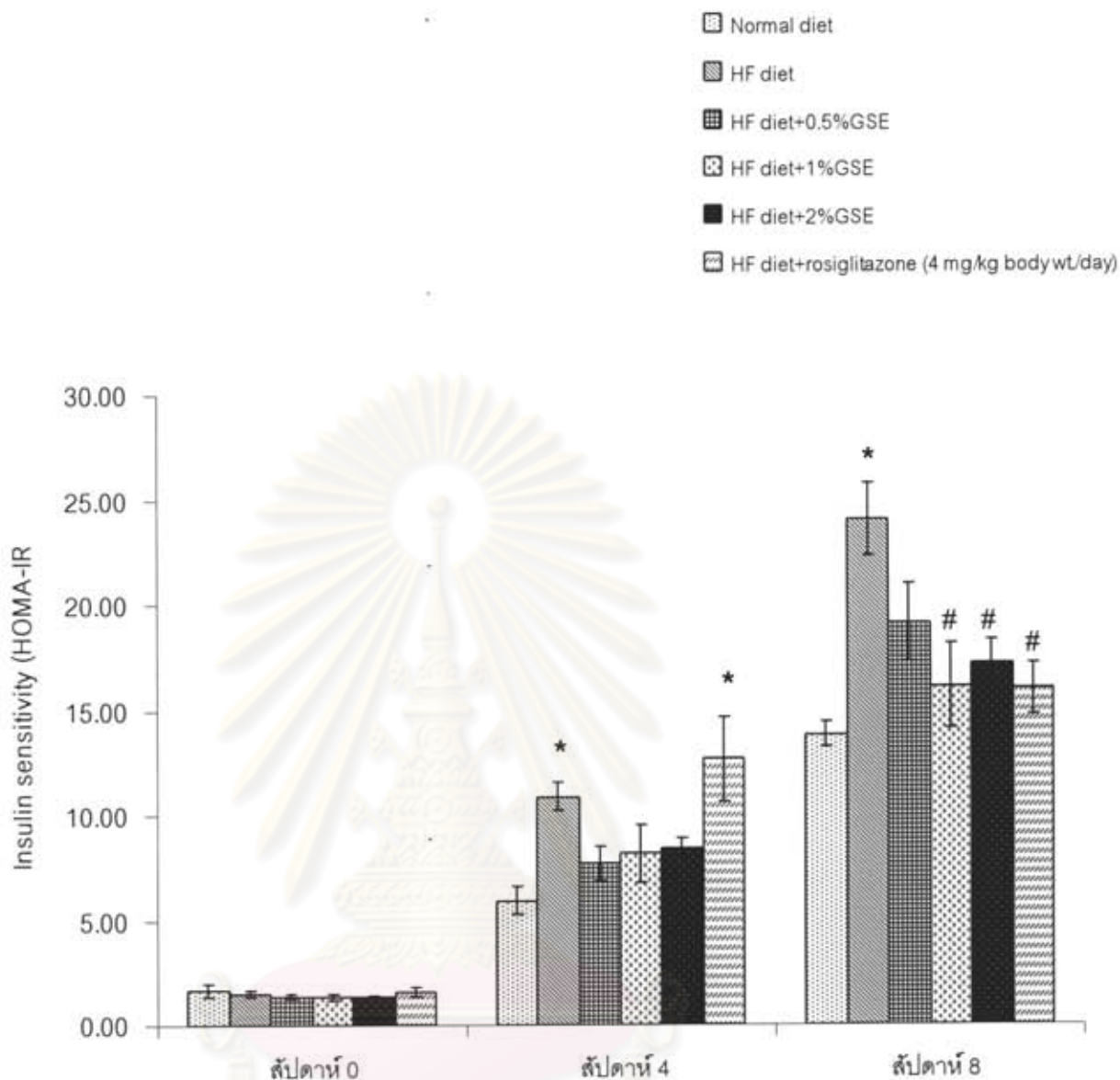
ตารางที่ 4-5 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อค่า HOMA-IR ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

กลุ่มทดลอง	ค่า HOMA-IR		
	ก่อนทดลอง	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 8
Normal diet	1.66±0.28	5.93±0.64	13.79±0.58
High-fructose diet	1.48±0.17	10.87±0.67*	24.04±1.73*
HF diet+0.5%GSE	1.38±0.12	7.69±0.84	19.08±4.83
HF diet+1.0%GSE	1.30±0.16	8.16±1.40	16.22±1.90 [‡]
HF diet+2.0%GSE	1.35±0.10	8.45±0.46	17.13±1.12 [‡]
HF diet+rosiglitazone (4mg/kg body wt./day)	1.59±0.26	12.64±2.04*	15.96±1.22 [‡]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

[‡] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน



ภาพที่ 4-3 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดตองุ่นต่อค่า HOMA-IR ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน

2.4 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อปริมาณการกินอาหาร การดื่ม น้ำ และน้ำหนักตัวของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

ผลจากการทดลองเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ เพื่อศึกษาปริมาณการกินอาหารและการดื่มน้ำ และการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว ดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยปริมาณการกินอาหารเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ของหนูในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นทุกขนาดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มอื่นๆ แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ปริมาณการดื่มน้ำของหนูแต่ละกลุ่มโดยเฉลี่ยตลอดระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสสูงมีปริมาณการดื่มน้ำสูงกว่าทุกกลุ่ม และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ส่วนกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าปริมาณการดื่มน้ำมีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

จากภาพที่ 4-4 พบว่า น้ำหนักตัวของหนูทุกกลุ่มก่อนเริ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และหลังจากได้รับอาหารสำหรับการทดลองติดต่อกัน 2 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง มีน้ำหนักตัวสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และ 1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และผลของน้ำหนักตัวในสัปดาห์ที่ 4 ยังคงคล้ายคลึงกับในสัปดาห์ที่ 2 ส่วนสัปดาห์ที่ 6 ของการทดลอง กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และ 1% ยังคงมีน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง หลังจากได้รับอาหารติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงยังคงมีน้ำหนักตัวสูงกว่าทุกกลุ่ม โดยพบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และ 1% สามารถทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน หลังจากได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ก่อนเริ่มให้ยา พบว่ามีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และ 1% ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 ของการทดลอง หรือ 1 และ 3 สัปดาห์หลังจากได้รับยา พบว่ามีน้ำหนักตัวยังคงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2%

ตารางที่ 4-6 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อปริมาณการกินอาหาร การดื่มน้ำ และน้ำหนักตัวในสัปดาห์ที่ 8 ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

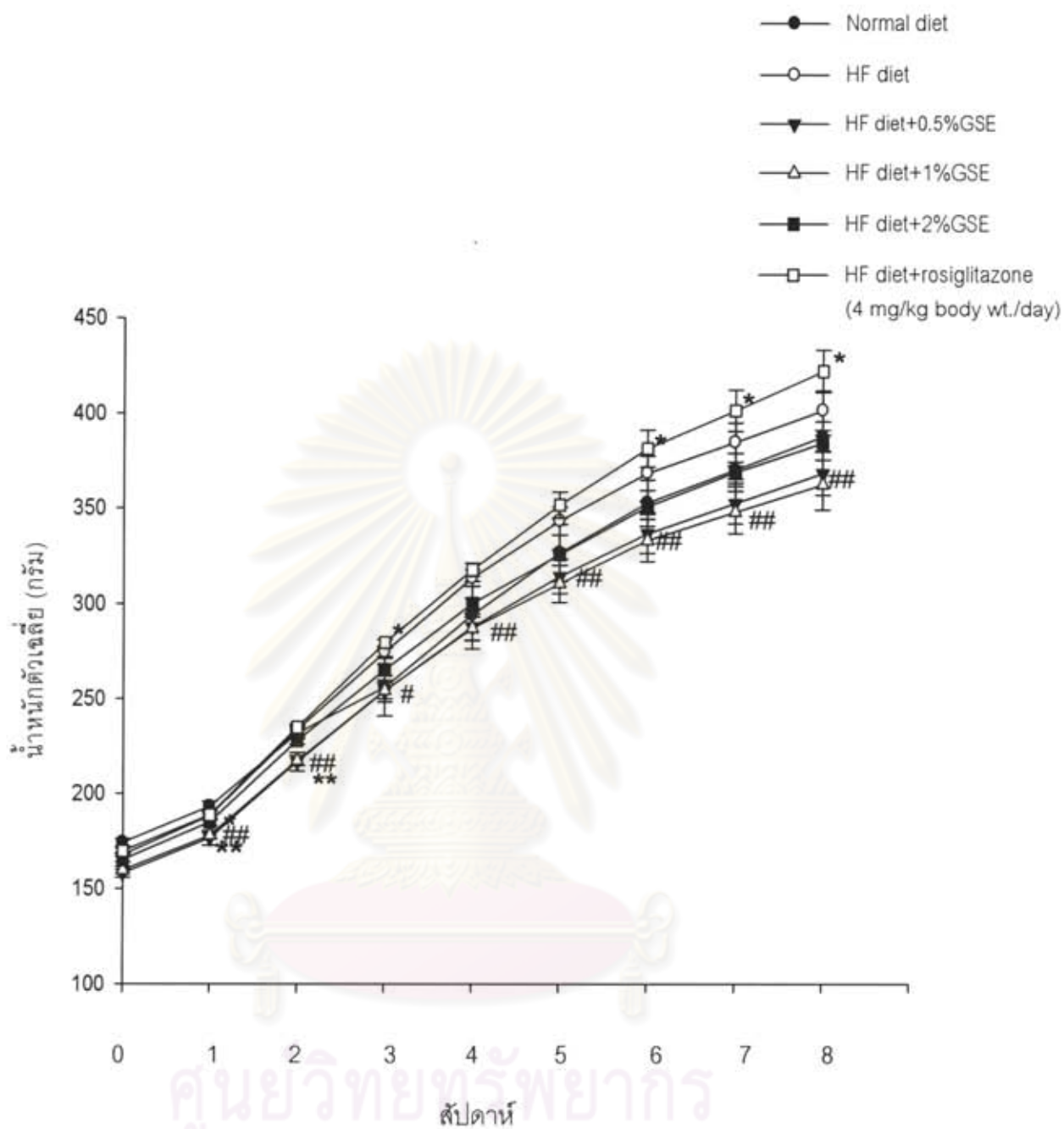
กลุ่มทดลอง	ปริมาณการกินอาหาร (กรัม/วัน)	ปริมาณการดื่มน้ำ (มิลลิลิตร/วัน)	น้ำหนักตัว (กรัม)
Normal diet	16±0.53	29±1.08	388±7.96
High-fructose diet	16±0.27	31±1.70	402±10.38
HF diet+0.5%GSE	15±0.21	28±0.86	369±11.52 [#]
HF diet+1.0%GSE	15±0.71	28±0.41	363±13.19 [#]
HF diet+2.0%GSE	15±0.32	28±2.13	385±4.17
HF diet+rosiglitazone (4mg/kg/day)	17±0.42	29±1.07	423±11.13 [*]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

[#] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4-4 แสดงน้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม) ของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในสัปดาห์เดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในสัปดาห์เดียวกัน

การทดลองที่ 3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาล
ในพลาสมาของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคีโตนูรินโดยการทำ oral glucose tolerance test
(OGTT)

**3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลัง
อดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคีโตนูรินโดยการทำ oral glucose tolerance test
(OGTT)**

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ในการขจัด
น้ำตาลกลูโคสในพลาสมาโดยการทำ OGTT ในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคีโตนูรินแสดงในตาราง
ที่ 4-7, ภาพที่ 4-5 และ 4-6 พบว่า หลังจากได้รับสารละลายกลูโคส 15 นาที ระดับน้ำตาลกลูโคส
ในพลาสมาของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone
ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ
เฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ค่าพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัด
เมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% มีค่าเท่ากับ 18,366.25±793.23, 16,197.50±1194.68 และ
15,408.13±918.71 มก./ดล. นาที ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อ
เทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงซึ่งมีค่า AUC เท่ากับ
21,115.63±551.86 มก./ดล. นาที โดยมีค่าการลดลงของ AUC เท่ากับ 13%, 23% และ 27%
ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และ 2% สามารถขจัดน้ำตาลกลูโคสใน
พลาสมาได้และให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

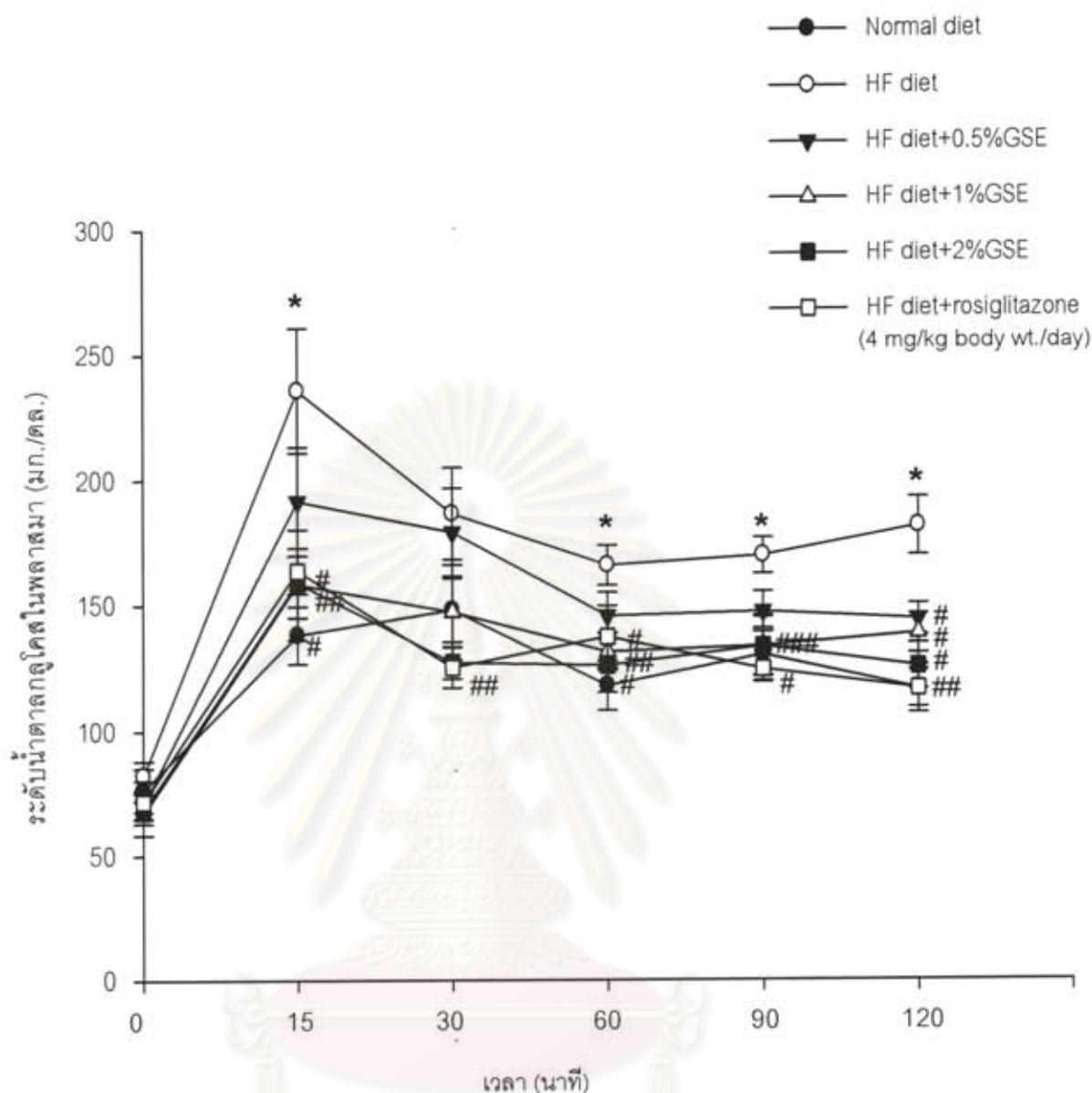
ตารางที่ 4-7 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน โดยการทำให้ oral glucose tolerance test (OGTT)

เวลา ก่อนและหลัง ให้กลูโคส (นาท)	ระดับน้ำตาลในพลาสมา (มก./ดล.)					
	Control (normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			Rosiglitazone 4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน
			0.5	1	2	
0	76.50±8.76	82.25±5.87	70.83±5.68	66.75±8.44	68.42±3.65	71.67±8.67
15	138.00±11.43 [‡]	235.75±24.84*	191.50±21.82	158.17±22.07 [‡]	158.83±13.92 [‡]	163.67±9.16 [‡]
30	147.92±12.64	186.50±18.40	179.00±17.63	147.08±18.87	127.00±6.37 [‡]	125.08±8.03 [‡]
60	117.75±9.79 [‡]	165.58±8.02*	145.42±9.36	131.25±7.35 [‡]	125.83±10.77 [‡]	137.17±12.32 [‡]
90	130.00±10.37 [‡]	169.42±7.18*	147.08±8.03	133.42±12.12 [‡]	133.33±11.61 [‡]	124.25±5.11 [‡]
120	116.33±9.55 [‡]	181.08±11.58*	144.00±6.19 [‡]	138.33±7.79 [‡]	125.33±9.05 [‡]	116.42±7.38 [‡]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในช่วงเวลาเดียวกัน

[‡] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในช่วงเวลาเดียวกัน

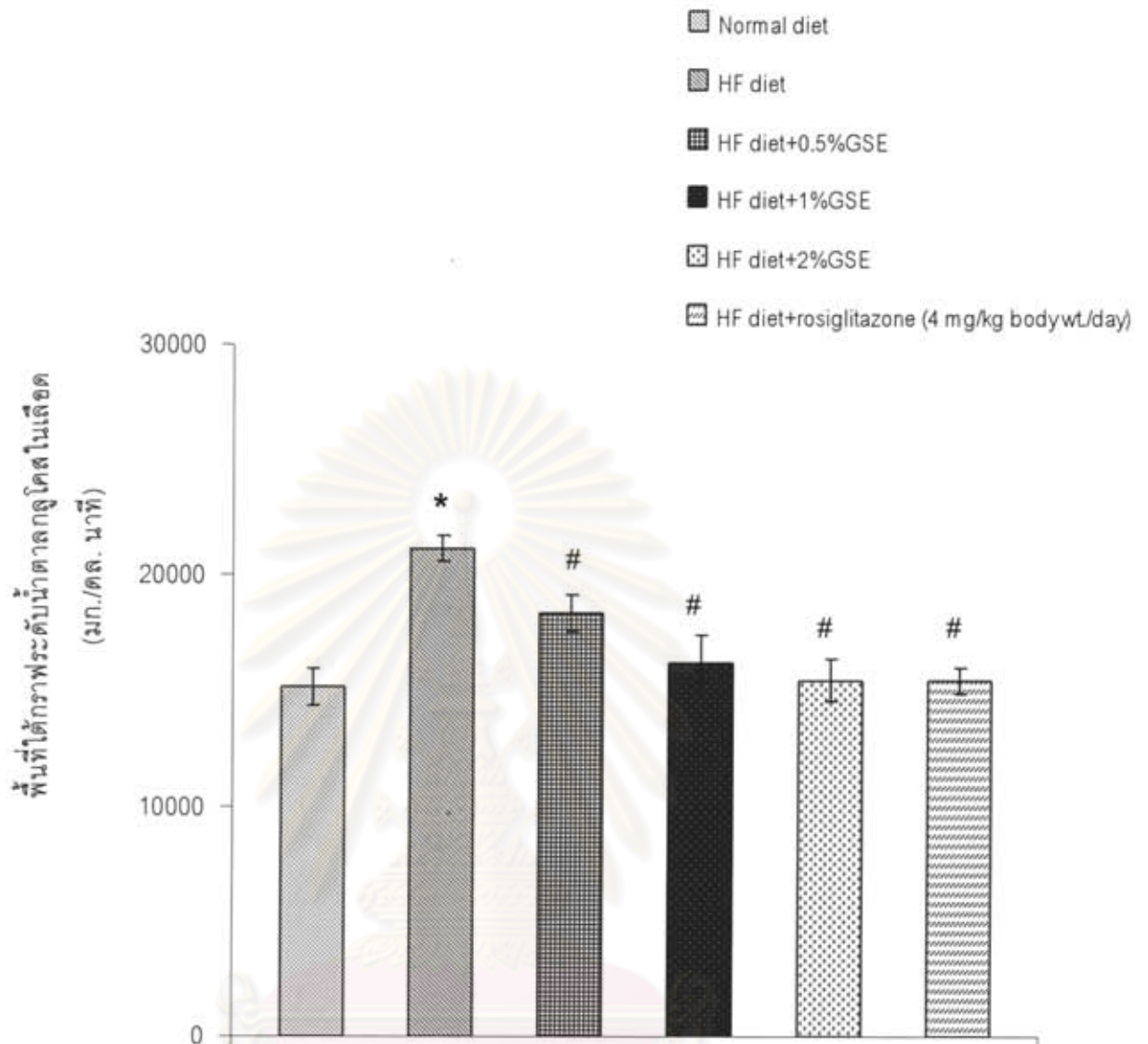


ภาพที่ 4-5 แสดงผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดคอรันในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา หลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในช่วงเวลาเดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในช่วงเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 4-6 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

3.2 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ OGTT ดังแสดงในตารางที่ 4-8, ภาพที่ 4-7 และ 4-8 พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าการเพิ่มขึ้นของระดับพลาสมาอินซูลินหลังจากได้รับการป้อนน้ำตาลที่ 15, 60, 90 และ 120 นาที ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง โดยค่า AUC ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% มีค่าเท่ากับ 216.36 ± 22.55 , 143.68 ± 15.01 และ 151.91 ± 4.41 นาโนกรัม/มล. นาที ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ซึ่งมีค่า AUC เท่ากับ 276.48 ± 32.79 นาโนกรัม/มล. นาที โดยมีค่าการลดลงของ AUC เท่ากับ 22%, 48% และ 45% ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับพลาสมาอินซูลินหลังจากได้รับการป้อนน้ำตาลได้ และให้ผลใกล้เคียงกับหนูปกติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4-8 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

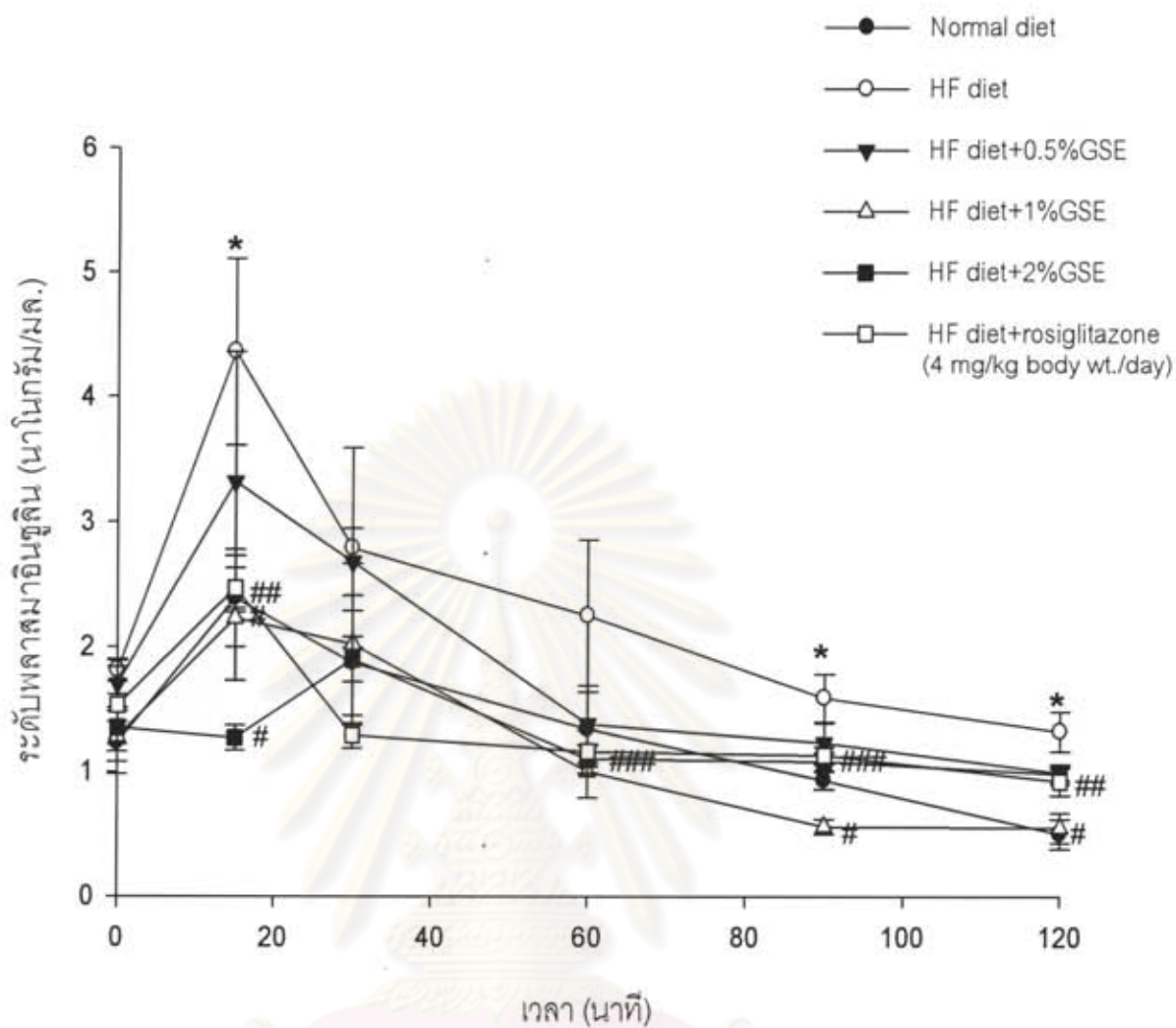
เวลา (นาที)	ระดับพลาสมาอินซูลิน (นาโนกรัม/มล.)					
	Control (Normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			Rosiglitazone 4 มก./กก./วัน
			0.5	1	2	
0	1.23±0.25	1.81±0.09	1.70±0.19	1.28±0.12	1.35±0.27	1.53±0.31
15	2.39±0.39 [#]	4.36±0.75 [*]	3.32±1.04	2.23±0.50 [#]	1.27±0.10 [#]	2.47±0.16 [#]
30	1.87±0.42	2.79±0.80	2.68±0.27	2.02±0.65	1.90±0.18	1.29±0.10
60	1.34±0.30	2.25±0.61	1.38±0.31	1.00±0.21 [#]	1.10±0.12 [#]	1.16±0.17 [#]
90	0.93±0.07	1.59±0.19 [*]	1.23±0.16 [#]	0.56±0.06 [#]	1.08±0.07 [#]	1.13±0.07 [#]
120	0.50±0.12	1.32±0.16 [*]	0.99±0.06	0.55±0.12 [#]	0.98±0.08 [#]	0.92±0.11 [#]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในช่วงเวลาเดียวกัน

[#] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในช่วงเวลาเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

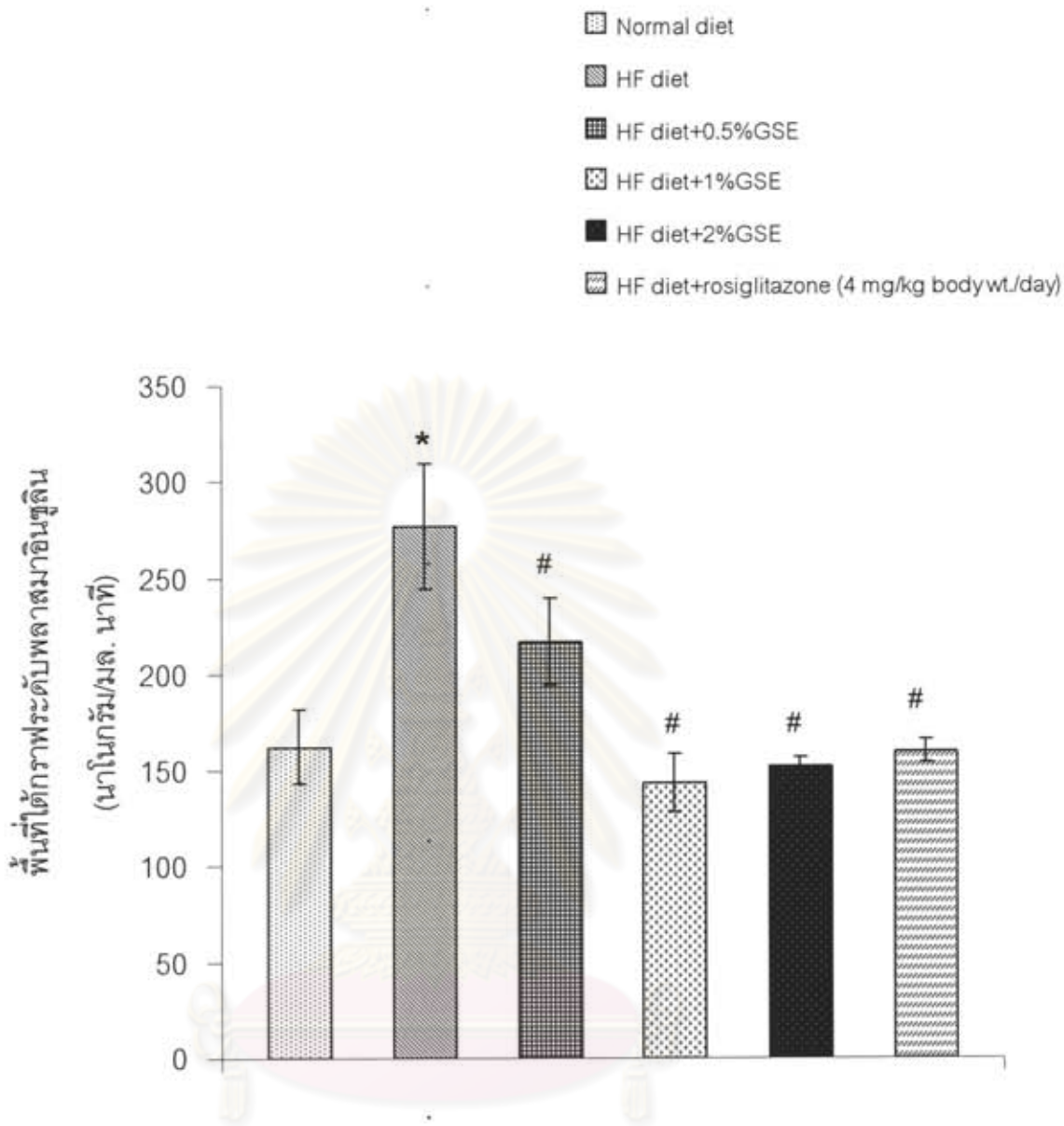


ภาพที่ 4-7 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet ในเวลาเดียวกัน

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet ในเวลาเดียวกัน



ภาพที่ 4-8 แสดงพื้นที่ใต้กราฟของระดับพลัสมาอินซูลินของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยการทำ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

การทดลองที่ 4 การศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับไขมันในเลือด และการทำงานของตับและไตในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคืออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลต่อค่าสารเคมีในเลือดเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 4-9

ระดับ blood urea nitrogen (BUN): พบว่ากลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่า BUN เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน ส่วนค่า BUN ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระดับ creatinine: พบว่าระดับ creatinine ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน

ระดับ alanine aminotransferase (ALT): พบว่าระดับ ALT ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าค่า ALT ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระดับ aspartate aminotransferase (AST): พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ AST เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ AST ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระดับ alkaline phosphatase (ALK): พบว่าค่า ALK ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ, กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน

ระดับ cholesterol: พบว่าค่า cholesterol ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ส่วนกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ cholesterol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระดับ triglycerides: พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ triglycerides เพิ่มขึ้นเท่ากับ 42% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ triglycerides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่ 23%, 25% และ 39% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระดับ HDL: พบว่าระดับ HDL ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับ HDL ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

จะเห็นได้ว่าค่าของสารเคมีในเลือดส่วนใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นค่า AST และ triglycerides ที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ตารางที่ 4-9 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการทำงานของตับและไต และระดับไขมันในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

สารเคมี ในเลือด	Control (normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			Rosiglitazone 4 มก./กก./วัน	Normal range
			0.5	1	2		
Blood urea nitrogen (มก./ดล.)	18.00±0.89	20.17±0.65*	18.83±0.60	19.67±0.62	20.33±0.82*	17.50±0.85 [‡]	6-20
Creatinine (มก./ดล.)	0.82±0.31	0.75±0.02	0.70±0.00*	0.80±0.26	0.78±0.03	0.73±0.02*	0.5-1.5
ALT (ยูนิต/ลิตร)	24.50±2.72	28.17±0.95	26.17±2.70	26.50±1.43	29.83±2.75	25.67±1.23	Up to 40
AST (ยูนิต/ลิตร)	124.00±7.68	152.17±25.92	105.83±6.85 [‡]	108.67±10.99 [‡]	102.00±10.56 [‡]	96.50±12.59 [‡]	Up to 40
ALK Phosphatase (ยูนิต/ลิตร)	90.17±3.03	85.00±2.03	90.50±5.90	87.00±4.18	87.67±1.61	82.17±3.22	26-117
Cholesterol (มก./ดล.)	86.00±2.50	99.20±2.10*	99.40±3.00	98.60±2.70	97.20±0.80	91.00±3.00 [‡]	
Triglyceride (มก./ดล.)	44.80±3.70	76.70±9.20*	59.20±4.30 [‡]	57.20±3.10 [‡]	70.20±8.00	46.80±4.50 [‡]	
HDL (มก./ดล.)	75.00±3.30	81.90±3.50	80.00±3.20	80.00±2.20	80.00±2.30	74.50±3.20	

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

[‡] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P<0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

การทดลองที่ 5 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ

ผลต่อการเกิด lipid peroxidation ในตับเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ดังแสดงในตารางที่ 4-10

พบว่าเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์ กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง มีระดับ malondialdehyde เพิ่มขึ้น 18% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่า malondialdehyde ลดลง 14%, 22% และ 14% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% สามารถลดระดับการเกิด malondialdehyde ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

ผลของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD): พบว่าระดับเอนไซม์ SOD ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง 51% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นเท่ากับ 43%, 64%, 55% และ 72% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ระดับเอนไซม์ catalase (CAT): พบว่าระดับเอนไซม์ CAT ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง 32% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ CAT เพิ่มขึ้นเท่ากับ 26%, 32% และ 16% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และ 2% สามารถเพิ่มระดับเอนไซม์ CAT ได้ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

ระดับเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx): พบว่าระดับเอนไซม์ GPx ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง 25% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับเอนไซม์ GPx มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% มีระดับเอนไซม์ GPx ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

ระดับ total glutathione: พบว่าระดับ total glutathione ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง 29% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ total glutathione เพิ่มขึ้นเท่ากับ 10% และ 22% ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และ 2% มีระดับ total glutathione ใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

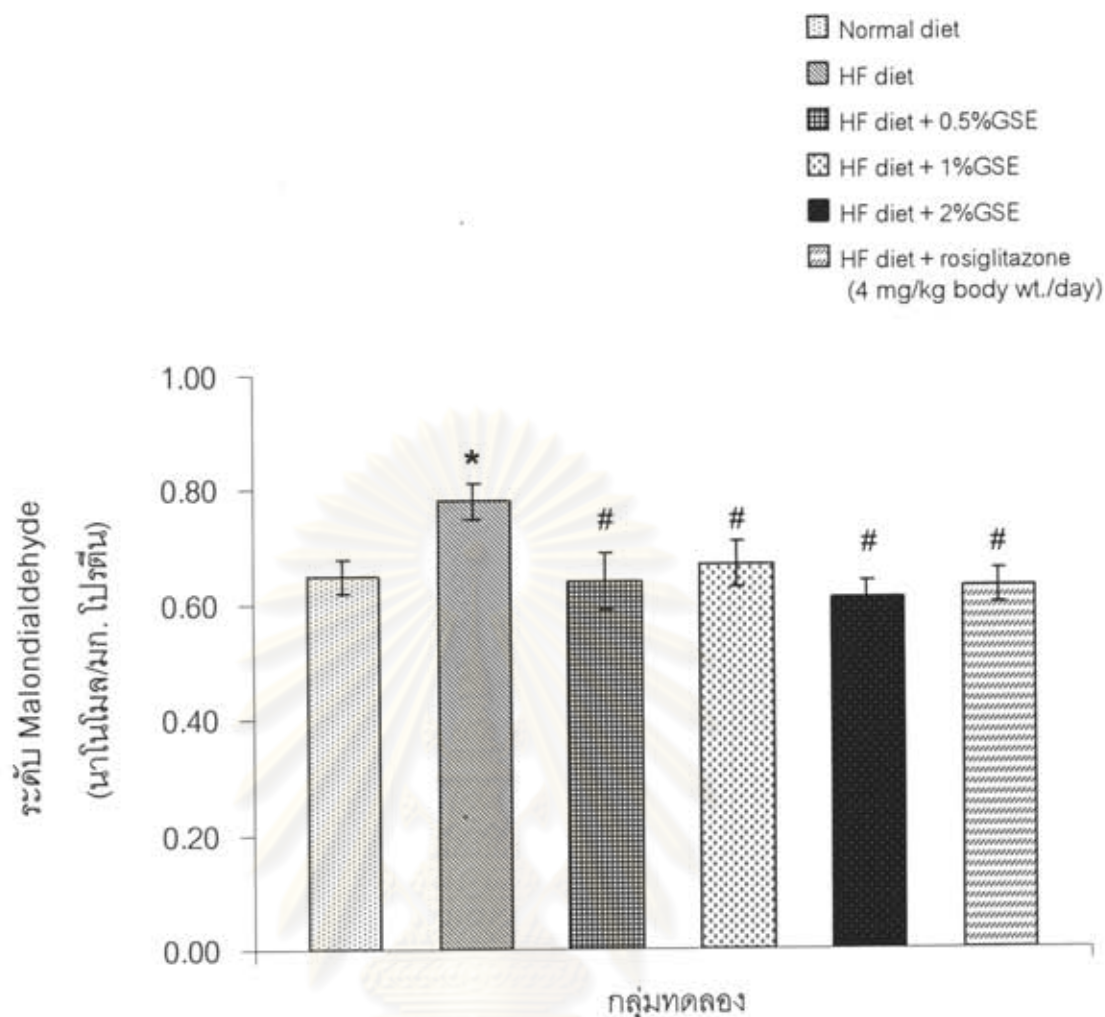
ตารางที่ 4-10 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

Parameters	Control (normal diet)	High-fructose diet (HF)	Grape seed extract (%)			Rosiglitazone 4 มก./กก. น้ำหนักตัว/วัน
			0.5	1	2	
Malondialdehyde (นาโนโมล/มก. โปรตีน)	0.66±0.03	0.78±0.03*	0.71±0.04	0.67±0.04 [†]	0.61±0.03 [†]	0.67±0.02 [†]
Superoxide dismutase (ยูนิต/มก. โปรตีน)	171.42±12.97	84.14±8.60*	120.38±9.44 [†]	138.31±11.51 [†]	130.31±10.80 [†]	145.11±13.47 [†]
Catalase (ยูนิต/มก. โปรตีน)	2.55±0.10	1.73±0.20*	1.93±0.16	2.18±0.11 [†]	2.29±0.13 [†]	2.01±0.11 [†]
Glutathione peroxidase (ไมโครโมล/นาที่/มก. โปรตีน)	1.39±0.10	1.04±0.08*	1.19±0.11	1.17±0.07	1.24±0.06	1.22±0.04
Total glutathione (นาโนโมล/มก. โปรตีน)	162.68±16.67	114.85±9.86*	126.50±7.98 [†]	139.78±12.23	137.82±9.04	140.34±10.49 [†]

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN±S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

[†] แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

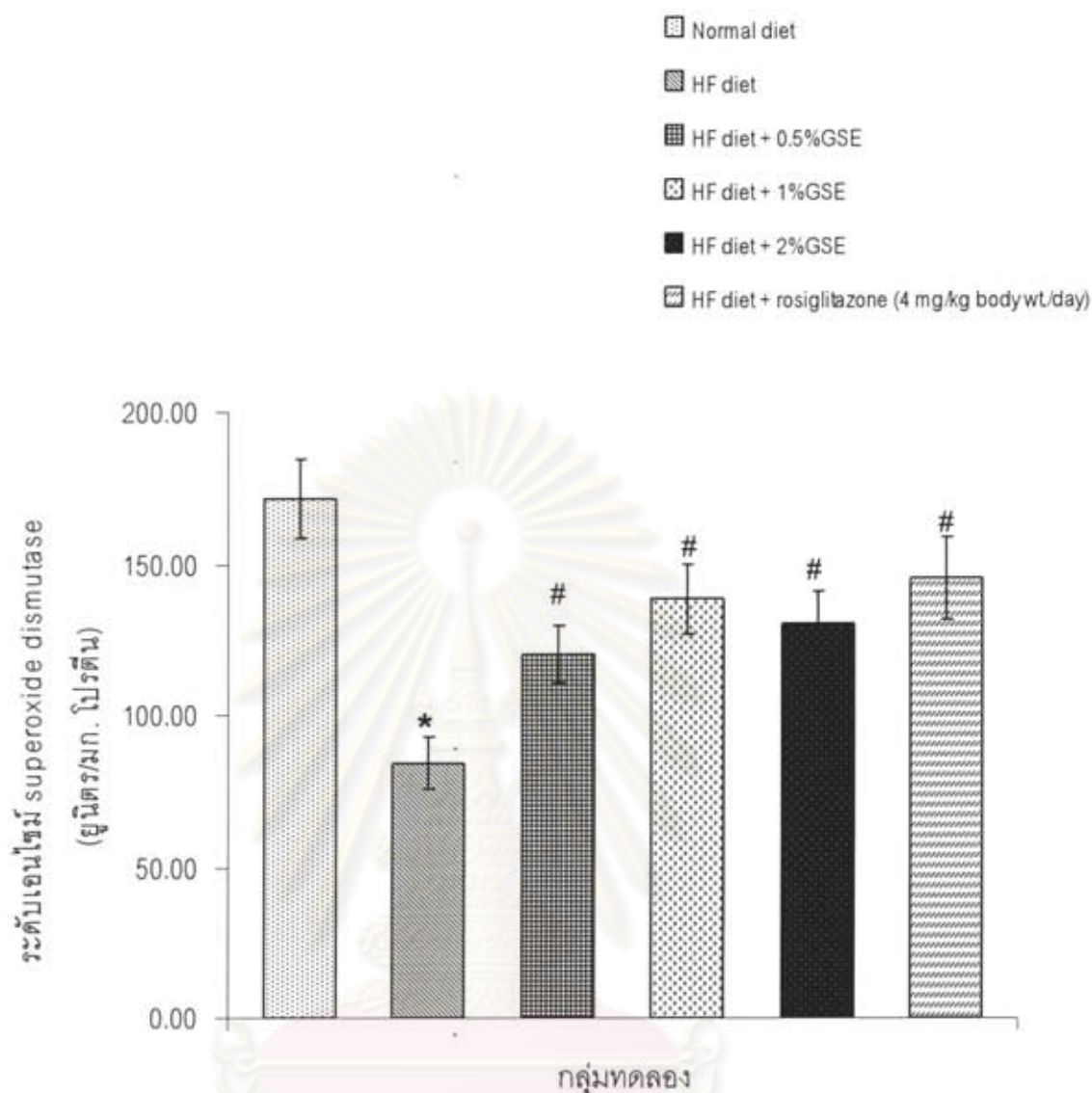


ภาพที่ 4-9 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ malondialdehyde ในตับของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

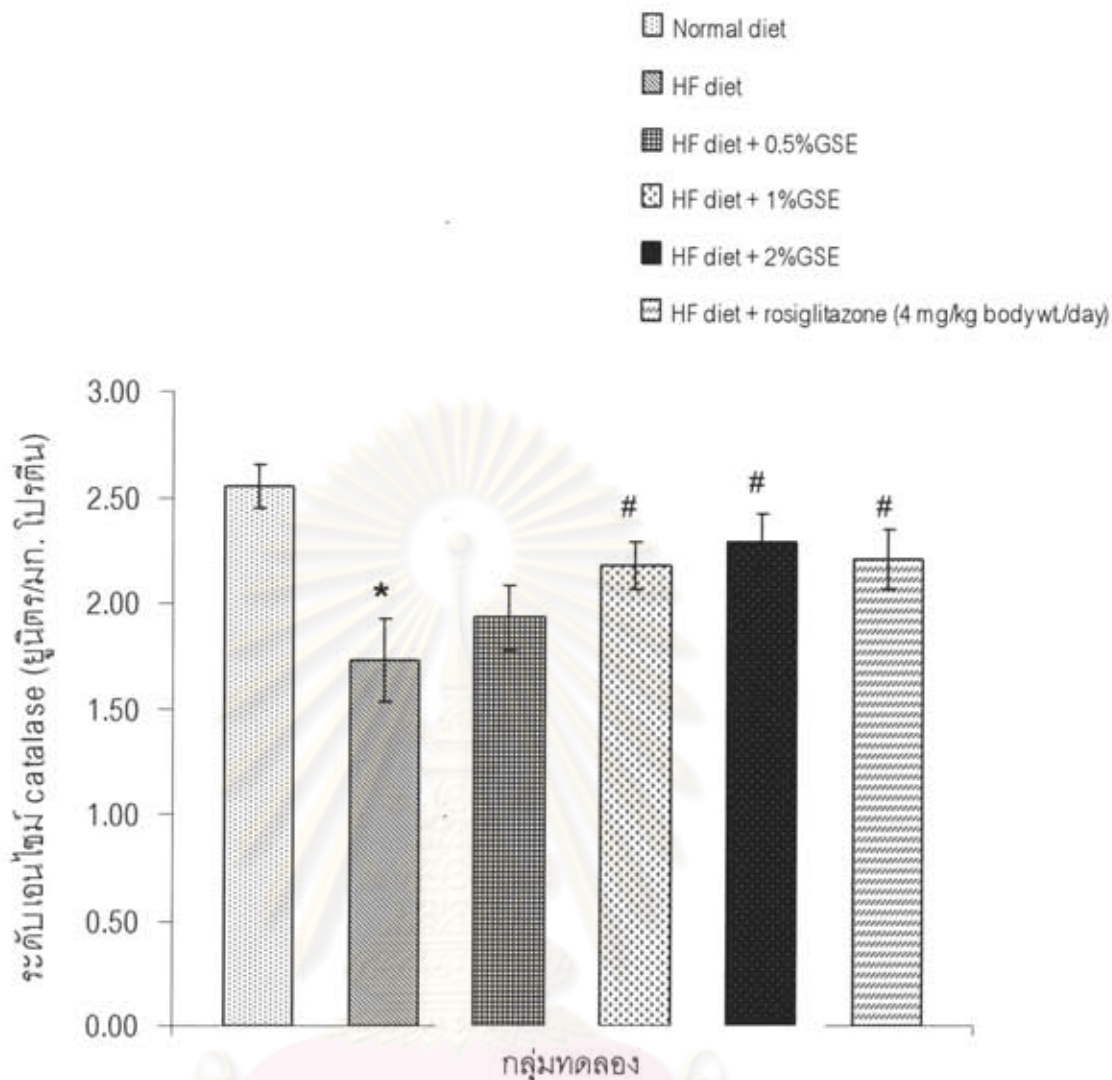


ภาพที่ 4-10 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ superoxide dismutase ในตับของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

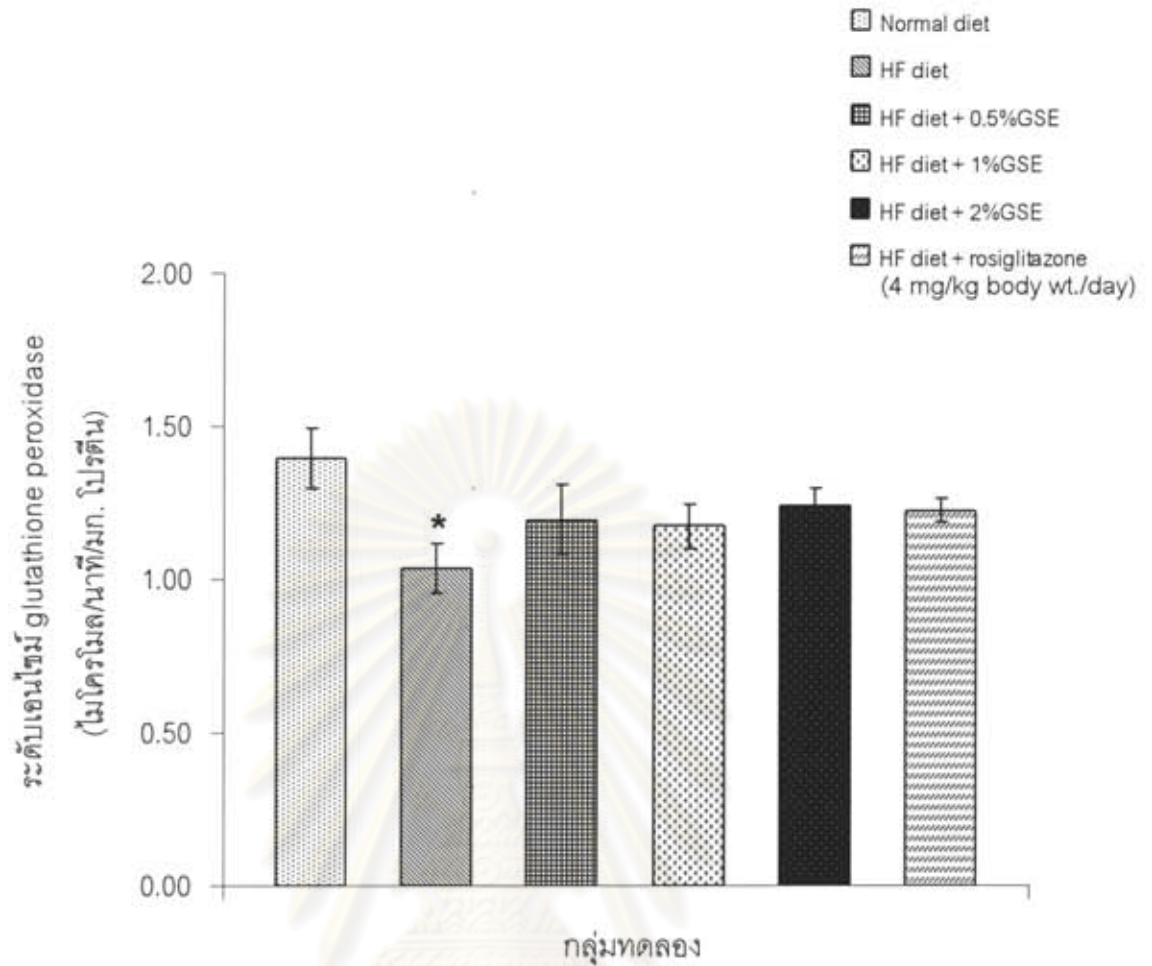


ภาพที่ 4-11 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ catalase ในตับของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

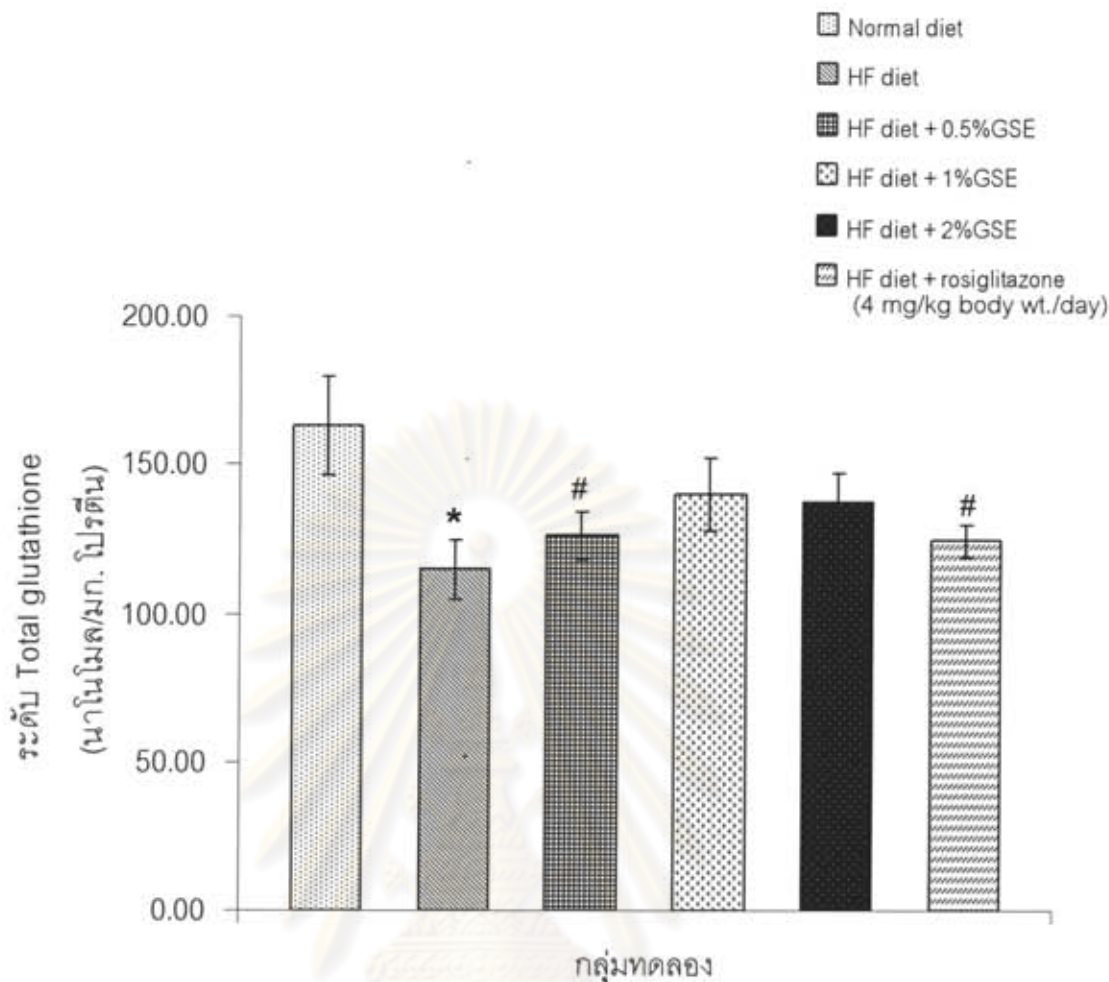
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet



ภาพที่ 4-12 แสดงผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับเอนไซม์ glutathione peroxidase ในตับของหนูปกติและหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet



ภาพที่ 4-13 แสดงผลของสารสกัดจากเมล็ดองุ่นต่อระดับ Total glutathione ในตับของหนูปกติ และหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินโดยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกัน 8 สัปดาห์

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (MEAN \pm S.E.M., n=6)

* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม normal diet

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม HF diet

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลและอภิปรายผลการวิจัย

1.1 ผลการตรวจสอบสารประกอบเคมีในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจพบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol colorimetric (Asami et al. 2003) ในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 1 กรัม เท่ากับ 2.16 ± 0.01 มิลลิกรัม และปริมาณของฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric และ 2,4-Dinitrophenylhydrazine colorimetric method (Chang et al. 2002) พบว่าในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 1 กรัม มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.801 ± 0.059 มิลลิกรัม

เมล็ดองุ่นประกอบด้วย (+)-catechins, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็น monomer และพบ procyanidins ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น dimer, trimer และ tetramer โดยสารดังกล่าวเป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่พบในเมล็ดองุ่น (Saito et al. 1998) จากการศึกษาของ Pinent และคณะ (2004) พบว่า procyanidins ในสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes ได้ ตามความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดองุ่น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน และสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 250 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ได้นอกจากนี้ยังพบว่า proanthocyanidins ของสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเบาหวานด้วย alloxan ได้ (El-Alfy et al. 2005)

ดังนั้น อาจเป็นไปได้ว่าสารฟลาโวนอยด์ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นอาจเป็นสารสำคัญในการลดระดับน้ำตาลในเลือด หรืออาจเกิดจากฤทธิ์ของสารฟลาโวนอยด์ร่วมกับสารอื่น จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อไป

1.2 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่น (grape seed extract; GSE) ต่อระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับพลาสมาอินซูลินในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

จากผลการศึกษาโดยให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาหลังอดอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 (ตารางที่ 4-3) และผลต่อระดับพลาสมาอินซูลิน พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับพลาสมาอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 4-4) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงโดยให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone

น้ำตาลฟรุกโตสสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงได้ (hyperglycemia) โดยเกิดจากการที่เมแทบอลิซึมของฟรุกโตสสามารถผ่านจุดควบคุมของปฏิกิริยา ซึ่งอยู่ที่เอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตโคเนสได้ (phosphofructokinase) จึงสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้อย่างต่อเนื่อง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากขบวนการนี้ คือ กลูโคส แลคเตท และไพรูเวท (Mayes, 1993) ซึ่งเป็นขั้วเสถียรของขบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส ทำให้มีการสร้างกลูโคสเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหารสูงได้ (fasting hyperglycemia) นอกจากนี้การรับประทานอาหารที่มีพลังงานสูง ซึ่งมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบอยู่มาก เนื้อเยื่อไขมันจะทำหน้าที่เก็บพลังงานส่วนเกินไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ส่งผลทำให้มีการเสริมสร้างเนื้อเยื่อไขมันมากขึ้น และนำไปสู่ภาวะอ้วน โดยเป็นปัจจัยเสริมทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินต่อเนื้อเยื่อที่ตอบสนองบกพร่อง พบว่า เนื้อเยื่อไขมันจะมีการผลิตและการหลั่ง adipokines ที่ผิดปกติ เช่น มีการหลั่ง TNF- α และ interleukin-6 (IL-6) เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง cytokines เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น insulin-antagonist ได้ โดยสามารถรบกวนการส่งสัญญาณของอินซูลินได้โดยตรง (Rotter, 2003) และพบว่าระดับ TNF- α และ IL-6 ที่สูงขึ้น สามารถทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาสูงได้ (Lindmark, 2006) โดย TNF- α เป็นปัจจัยส่งเสริมทำให้ร่างกายเกิดภาวะดื้ออินซูลินและยังสามารถยับยั้งการผลิต adiponectin ได้ นอกจากนี้ จะทำให้มีการกระตุ้นการสลายไตรกลีเซอไรด์ (lipolysis) ของเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้มีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ออกสู่กระแสเลือดเพิ่มขึ้นไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อและตับ (Lewis, 2002) การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระส่งผลทำให้มีการเก็บกรดไขมันอิสระดังกล่าวไปสะสมอยู่ในกล้ามเนื้อลาย ส่งผลกระทบต่อการส่งสัญญาณของ

อินซูลินกับโปรตีนต่างๆภายในเซลล์ ทำให้การเคลื่อนที่ของ glucose transporter (GLUT4) ไปยังเซลล์เมมเบรนผิดปกติ ทำให้ความสามารถของอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดน้อยลง (Watson and Pessin, 2001) ในตัวก็มีการส่งสัญญาณต่ออินซูลินผิดปกติไปเช่นกัน เนื่องจากกรดไขมันอิสระสามารถทำให้ดับกระตุ้นการสร้างกลูโคสมากขึ้นโดยขบวนการไกลโคจีโนไลซิส (glycogenolysis) และขบวนการกลูโคเนอเจเนซิส (gluconeogenesis) พบว่ากรดไขมันอิสระสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ glucose 6-phosphatase และเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxykinase ได้ในขบวนการกลูโคเนอเจเนซิส ผลลัพธ์สุดท้ายคือ ทำให้มีการสร้างกลูโคสจากตับมากขึ้น การกำจัดกลูโคสที่ตับลดลง ส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น และตับอ่อนก็จะมีการตอบสนองโดยการหลั่งอินซูลินออกมาเพิ่มขึ้น เกิดภาวะ hyperinsulinemia ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ (Garvey et al. 1986)

ภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาสูงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) โดยผ่านกลไกต่างๆ เช่น ทำให้น้ำตาลสามารถจับกับกรดอะมิโนอิสระในกระแสเลือดโดยไม่ต้องใช้เอนไซม์ ในระยะแรกจะเกิดเป็นสารที่ไม่เสถียรอยู่หลายชั่วโมง เรียกว่า Schiff base ต่อมา จะกลายสภาพเป็นสารที่มันคง เรียกว่า early glycosylation product (EGP) หรือ Amadori protein แต่ถ้ามีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน สารนี้จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น advanced glycation end products (AGEs) (Brownlee et al. 1988) โดย AGEs ที่เกิดขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ โดยทำให้การส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์กล้ามเนื้อบกพร่อง (Miele et al. 2003) จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นจะมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาลดลง อาจเนื่องมาจากสาร procyanidins ในสารสกัดเมล็ดองุ่น สามารถกระตุ้นการนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ได้ (Pinent et al. 2005) ซึ่งออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน (insulinomimetic) จึงสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาได้

จากการคำนวณ HOMA-IR สามารถบ่งบอกถึงภาวะดื้ออินซูลินได้ โดยการใช้ค่าของระดับกลูโคสในพลาสมา และระดับพลาสมาอินซูลินในการคำนวณ (American Diabetic Association, 1998) จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่า HOMA-IR มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง แสดงถึงสารสกัดเมล็ดองุ่นและยา rosiglitazone สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินได้

สำหรับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติพบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับพลาสมาอินซูลินเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้นตลอด 8 สัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4-4) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความทนต่อระบบน้ำตาล (glucose tolerance) ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Finucane, 1995; Meneilly and Tessier, 2001; Scheen, 1997) ส่งผลทำให้ระดับอินซูลินสูงขึ้นตามไปด้วย นอกจากนี้ยังเกิดจากบริเวณในการเก็บตัวอย่างเลือดแตกต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากหลอดเลือดดำที่หาง (สัปดาห์ที่ 0 และ 4) กับตัวอย่างเลือดจากหัวใจ (สัปดาห์ที่ 8) ซึ่งส่งผลทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน และอาจส่งผลทำให้มีระดับอินซูลินแตกต่างกันได้ (Matsuzawa et al. 1994; Schwabenbauer, 1991)

สำหรับกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ซึ่งเป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดในกลุ่ม Thiazolidinediones ที่ออกฤทธิ์โดยเพิ่มความไวต่อฤทธิ์ของอินซูลินที่ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำมาเป็นยามาตรฐาน (positive control) พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 สามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมา เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงในเวลาเดียวกันได้ 15% และในสัปดาห์ที่ 8 ลดลงได้ 21% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่พบว่า ระดับน้ำตาลในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 6 อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ให้ยาน้อยเกินไปซึ่งจะเห็นผลของยาต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 2-3 สัปดาห์ ส่วนฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในพลาสมาของยาต้องใช้ระยะเวลา 6-12 สัปดาห์ในการออกฤทธิ์ (Cheng and Fantus, 2005) ส่วนผลต่อระดับพลาสมาอินซูลิน พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีระดับพลาสมาอินซูลินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาถึงผลของการรับประทานฟรุกโตสในปริมาณสูง จะทำให้เกิดภาวะ hyperinsulinemia, insulin resistance, hypertriglyceridemia และ hypertension ได้ในสัตว์ทดลอง (Elliou et al. 2002; Hwang et al. 1987; Thorburn et al. 1989; Zavaroni et al. 1980) จากนั้นเริ่มต้นให้ยาในสัปดาห์ที่ 5 ของการทดลอง พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 กลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone มีระดับพลาสมาอินซูลินลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงว่า rosiglitazone สามารถเพิ่มความไวต่อฤทธิ์ของอินซูลินที่เนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่อฤทธิ์ของอินซูลินได้ (Kaplan et al. 2001; Olefsky, 2000; Saltiel and Olefsky, 1996) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งยาจะไปเพิ่มการส่งสัญญาณของอินซูลิน โดยเมื่อ PPAR- γ ถูกกระตุ้น จะมีการผลิต GLUT4 โดยการถอดรหัส (transcription) ของ GLUT4 เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ไปยังผนังเซลล์ ทำให้สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ (Saltiel and Olefsky, 1996) นอกจากนี้ยาอาจทำให้มีระดับ adiponectin เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถลดภาวะดื้ออินซูลินได้ โดย adiponectin จะเพิ่มการสลายกรดไขมันอิสระชนิด β (β -oxidation) และลดการสร้างปริมาณ

น้ำตาลกลูโคสที่ตับ (gluconeogenesis) นอกจากนี้ยังทำให้กล้ามเนื้อสามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มขึ้น (Maeda et al. 2002)

จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นมีปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักตัวน้อยลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดปริมาณการกินอาหารโดยผ่าน leptin receptor-independent appetite control pathway (Kao et al. 2000) ซึ่งส่งผลทำให้สามารถลดหรือป้องกันการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวได้ (Kao et al. 2000; Tebib et al. 1996) และสารฟลาโวนอยด์ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญไขมันของร่างกายได้ (Murase et al. 2002) โดยการควบคุม rate limiting enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมัน (เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase และ fatty acid synthase) และการออกซิเดชันของกรดไขมัน (เอนไซม์ acyl-CoA dehydrogenase) ในตับ ทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ที่ตับและในพลาสมาลดลง ซึ่งส่งผลทำให้เนื้อเยื่อไขมันในช่องท้องลดลงได้ (Hiroshi et al. 2008) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการย่อยและการดูดซึมไขมัน โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยไตรกลีเซอไรด์จากอาหาร และ lipoprotein lipase ได้ (Moreno et al. 2003) จึงส่งผลทำให้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

1.3 ประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดองุ่นในการขจัดน้ำตาลในพลาสมาของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) โดยการทำให้ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาโดยการทำให้ OGTT ในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน (ตารางที่ 4-3) พบว่า หลังจากได้รับสารละลายกลูโคส 15 นาที ระดับน้ำตาลกลูโคสของกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานโดยการทำให้ OGTT (ตารางที่ 4-3) พบว่า กลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับพลาสมาอินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ

หลังจากได้รับกลูโคสที่เวลา 15, 90 และ 120 นาที ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าระดับพลาสมาอินซูลินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในเวลาที่ 15, 60, 90 และ 120 นาที เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

จะเห็นได้ว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% และ 2% สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ภายใน 2 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง โดยอาจเกิดจากสารสกัดเมล็ดองุ่นออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและสามารถกระตุ้นการนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในหนูแรท คือ สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาได้หลังจากได้รับการป้อนกลูโคส (ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน นอกจากนี้สารสกัดเมล็ดองุ่นอาจมีกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ ได้ด้วย เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ลำไส้ โดยเอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการย่อยคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งเมื่อเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำให้กลูโคสถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ช้าลง (Vats et al. 2002) แต่เนื่องจากการทำ OGTT ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ป้อนกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยที่ไม่ได้ทำการทดลองป้อนน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโตส หรือซูโครสให้กับหนูแรท จึงไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าสารสกัดจากเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ลำไส้เล็กหรือไม่ จึงควรทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลนี้ต่อไปในอนาคต

1.4 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่น ต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไตในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะคีโตนอินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลต่อสารเคมีในเลือดเมื่อให้สารสกัดเมล็ดองุ่น 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า (ตารางที่ 4-7)

ค่าที่ใช้ประเมินการทำงานของไต คือ BUN และ creatinine ซึ่ง BUN เป็นค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนของยูเรียในซีรัมพบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่า BUN เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ แต่ค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นยังคงอยู่ในช่วงของค่าปกติซึ่งเท่ากับ 6-20 ส่วนค่า BUN ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับ

กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง และค่า creatinine เป็นค่าบ่งชี้การทำงานของไต พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนค่า creatinine ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้บ่งบอกว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นไม่มีผลต่อการทำงานของไต

สำหรับค่าเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) นั้นเป็นค่าซึ่งบ่งชี้ความเสียหายของเซลล์ตับ พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าค่า ALT ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

สำหรับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ AST เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ AST ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

AST เป็นเอนไซม์ที่พบได้ปริมาณสูงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ และเซลล์กล้ามเนื้อลาย พบได้บ้างในเนื้อเยื่ออื่น เช่น ไต สมอง ตับอ่อน และเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น ระดับ AST ที่สูงขึ้นเพียงค่าเดียว อาจบ่งบอกเฉพาะเจาะจงไม่ได้ว่าเกิดจากตับ เนื่องจาก AST มีการกระจายตัวในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่ง ALT จะบ่งชี้โรคตับได้ดีกว่า เนื่องจากมีการกระจายตัวที่จำกัด (Berk and Korenblat, 2007) โดยระดับ AST ที่เพิ่มสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการเกิด hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิด artifact ส่งผลทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้

สำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALK) พบว่าค่า ALK ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้บ่งบอกว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นไม่มีผลต่อท่อทางเดินน้ำดี

ระดับ cholesterol และ triglycerides เป็นค่าที่บ่งชี้ระดับไขมันในเลือด พบว่าค่า cholesterol ของกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีระดับ cholesterol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง และค่า triglycerides พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาล ฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ triglycerides เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ กลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ triglycerides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง นอกจากนี้ระดับ HDL ซึ่งเป็นไขมันที่มีความหนาแน่นสูง พบว่าระดับ HDL ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับ HDL ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

การรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตส ดับสามารถสร้างไตรกลีเซอไรด์ได้จากกระบวนการ re-esterification ของกรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล จากนั้นไตรกลีเซอไรด์จะถูกส่งออกในกระแสเลือด โดยรวมกับฟอสโฟลิปิด คลอเลสเทอรอล และ Apo B-100 ได้เป็นไลโปโปรตีน เรียกว่า very low density lipoprotein (VLDL) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่พาไตรกลีเซอไรด์จากการสังเคราะห์ในเซลล์ตับ (endogenous triglycerides) ไปสู่นเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อไขมัน ดังนั้น เมื่อรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง จะทำให้มีการสร้าง VLDL

เพิ่มมากขึ้น และทำให้มีไตรกลีเซอไรด์สะสมอยู่ในตับมากขึ้นไปด้วย (Mayes, 1993) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลงได้

จากผลการทดลองพบว่า ระดับไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากเกิดการรวมตัวของ glycerol-3-phosphate ในตับซึ่งอาจนำไปสู่การสังเคราะห์ VLDL ที่เพิ่มขึ้นได้ ต่อมากรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้นในพลาสมา สามารถรบกวนการส่งสัญญาณของอินซูลินได้โดยตรง ทำให้การ phosphorylation ของโปรตีนภายในเซลล์บกพร่อง และส่งผลทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินเกิดขึ้นได้ (Dresner et al. 1999; Guenther, 2004) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นพบว่า สารโพลีฟีนอลที่พบในเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ได้ (Ruzaidi et al. 2005) อาจเนื่องมาจากสารโพลีฟีนอลที่พบในเมล็ดองุ่นสามารถเปลี่ยนแปลงการเมแทบอลิซึมของไลโปโปรตีน จึงส่งผลทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ลดลงได้ (Zem et al. 2005) นอกจากนี้การลดระดับไตรกลีเซอไรด์ อาจเกิดจากการที่สารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ lipoprotein lipase ทำให้การย่อยสลายไขมันลดลง ส่งผลทำให้ระดับกรดไขมันอิสระ และโมโนกลีเซอรอล ที่จะนำไปใช้ในการสร้างไตรกลีเซอไรด์ลดลง จึงส่งผลทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ลดลงได้ (Diego et al. 2003)

1.5 ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ

ผลต่อการเกิด lipid peroxidation ในตับ พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง มีระดับ malondialdehyde เพิ่มขึ้น 18% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่า malondialdehyde ลดลง 14%, 22% และ 14% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ภาวะ oxidative stress เกิดขึ้นเนื่องจากภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระหรือ ROS ที่เพิ่มขึ้น สามารถทำอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆภายในเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์, DNA, และโปรตีน (Halliwell and Gutteridge, 1990) ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บและเกิดความเสียหายได้ (oxidative damage) จากผล

การทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ได้ ซึ่งสาร procyanidins ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นมีโครงสร้างแบบ catechol หรือ ortho-diphenolic group โดยถือเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทสำคัญสำหรับการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็น hydrogen donating แล้วยังสามารถจับหรือคีเลตโลหะหนักโดยเฉพาะทองแดง (Cu) และเหล็ก (Fe) (Cao et al. 1997) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างและเกิดปฏิกิริยาถูกโซ่ของอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โครงสร้างนี้ทำให้สารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์แรงในการต้านอนุมูลอิสระ (Havsteen, 2002) โดยมีฤทธิ์แรงกว่าวิตามินซีและอี หรือ beta-carotene (Fine, 2000; Joshi et al. 2001; Moskaug, 2005) จึงส่งผลทำให้ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการเกิด lipid peroxidation และใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะ oxidative stress ลดลงได้ (Karthikeyan et al. 2007)

สำหรับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ที่มีเหล็ก และสังกะสี เป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่กำจัดอนุมูล superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) ได้เป็น H_2O_2 และ O_2 จากผลการทดลองพบว่า ระดับเอนไซม์ SOD ที่ลดลง สาเหตุเกิดจาก lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง เนื่องจากการเกิดภาวะ oxidative stress จะก่อให้เกิด ROS ในปริมาณมาก และอาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Karthikeyan et al. 2007) นอกจากนี้ สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถกำจัดอนุมูล superoxide anion ได้ จึงทำให้มีระดับเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นได้

สำหรับเอนไซม์ catalase (CAT) พบว่าระดับเอนไซม์ catalase ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับเอนไซม์ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอนไซม์ catalase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัด H_2O_2 ได้เป็นน้ำ และ O_2 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถกำจัด H_2O_2 ได้ จึงส่งผลทำให้ระดับเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นได้

ระดับ total glutathione และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) พบว่าระดับ total glutathione ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ total glutathione เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) พบว่า ระดับเอนไซม์ GPx ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับเอนไซม์ GPx ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระบบของกลูตาไธโอน ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระและ ROS โดยเอนไซม์ GPx เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากรูปรีดิวซ์ (GSH) เป็นรูปออกซิไดซ์ (GSSG) ทำให้ H_2O_2 สลายกลายเป็นโมเลกุลของน้ำ จากนั้น GSSG ที่เกิดขึ้นก็จะเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูปรีดิวซ์ตามเดิม โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione reductase (GR) ซึ่งต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (Gerard-Monnier and Chandiere, 1996) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถเพิ่มปริมาณของ GSH ได้ ซึ่งสาร proanthocyanidin ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นมีผลต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ด้านอนุมูลอิสระ โดยทำให้ระดับ mRNA ของ GPx และ mRNA ของ GR เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้สามารถรักษาปริมาณของ GSH ได้ เนื่องจากระบบกลูตาไธโอนเป็นปฏิกิริยา redox ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GPx และ GR แต่เนื่องจากการทำวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการวัดระดับในรูปของ total glutathione จึงอาจไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ GR ดังกล่าว

2. ข้อเสนอแนะ

ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมดังต่อไปนี้ คือ

2.1 ศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ adiponectin และ leptin ของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินเหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

2.2 ศึกษาปริมาณไกลโคเจนในตับ และกล้ามเนื้อของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินเหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

2.3 ศึกษาขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นกับตัวรับอินซูลิน (insulin receptor)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

- Abdollahi, M., Ranjbar, A., Shadnia, S., Nikfar, S., and Rezaiee, A. Pesticides and oxidative stress: a review. Med Sci Monit 10 (2004): 144-147.
- Abiko, A., Eto, M., Makino, I., Araki, N., and Horiuchi, S. Increased levels of advanced glycosylation end products in the kidney and liver from spontaneously diabetic Chinese hamsters determined by immunochemical assay. Metabolism 49 (2000): 567-573.
- Alberti, K. G. M. M., Zinmet, P., and Defronzo, R. A., eds. International textbook of diabetes mellitus. 2nd ed. Chichester: John Wiley & Sons, 1997.
- American Diabetic Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. Diabetes Care 20 (1997): 1183-1197.
- American Diabetic Association. Consensus development conference on insulin resistance: 5-6 November 1997. Diabetes Care 21 (1998): 310-314.
- Amerine, M. A., and Ough, C. S. Methods for Analysis of Musts and Wines. New York: John Wiley, 1980.
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., and Mitchell, A. E. Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried mulberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. Agric Food Chem 51;5 (2003): 1237-1241.
- Beebe, M. A., Oates, D., Hammes, P. J., Giardino, H-P. I., and Brownlee, M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. Nature 404 (2000): 787-790.
- Belchetz, P., and Hammond, P. J. Diabetes and endocrinology. 1st ed. London: Mosby, 2003.
- Bell, G. I., and Polonsky, K. S. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in β -cell function. Nature 414 (2001): 788-791.

- Berk, P. D., and Korenblat, K. M. Approach to the patient with jaundice or abnormal liver test results. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd (ed.), Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier, 2007.
- Boden, G. Role of fatty acids in the pathogenesis of insulin resistance and NIDDM. Diabetes 46 (1997): 3–10.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 72 (1976): 248-254.
- Brodsky, I. G. Hormone, cytokine, and nutrient interactions. 9th ed. In Balado, D. (ed.), Modern nutrition in health and disease. Maryland: Williams and Wilkins, 1999.
- Brownlee, M., Cerami, A., and Vlassara, H. Advanced glycosylation end products in tissue and biochemical basis of diabetic complication. J. N Engl Med 318 (1988): 1315-1322.
- Brownlee, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414 (2001): 813-820.
- Cao, G., Sofic, E., and Prior, R. L. Antioxidant and prooxidants behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. Free Radical Biol Med 22 (1997): 749-776.
- Carmona, A., and Freedland, R. A. Comparison among the lipogenic potential of various substrates in rat hepatocytes: the differential effects of fructose-containing diets on hepatic lipogenesis. J. Nutr 119 (1989): 1304-1310.
- Catena, C., Giacchetti, G., Novello, M., Colussi, G., Cavarape, A., and Sechi, L. A. Cellular mechanisms of insulin resistance in rats with fructose-induced hypertension. J. Am Hypertens 16 (2003): 973-978.
- Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., and Chern, J. C. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal 10;2 (2002): 178-182.
- Chari, S. N., Noth, N., and Rothi, A. D. Glutathione and its redox system in diabetic polymorphonuclear leucocytes. J. Am Med Sci 287 (1984): 14-15.
- Cheng, A. Y. Y., and Fantus I. G. Oral antihyperglycemic therapy for type 2 diabetes mellitus. CMAJ 18 (2005): 213-226.

- Czoski-Murray, C., Warren, E., Chilcott, J., Beverley, C., Pshllaki, M. A., and Cowan, J. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of pioglitazone and rosiglitazone in the treatment of type 2 diabetes: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess* 8 (2004): 1-91.
- Dandona, P., Aljada, A., and Bandyopadhyay, A. Inflammation: The link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends in Immunology* 25 (2004): 4-7.
- Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 29 (2006): 43-48.
- Du, X. L., Edelstein, D., Rossetti, L., Fantus, I. G., Goldberg, H., Ziyadeh, F., Wu, J., and Brownlee, M. Hyperglycemia-induced mitochondrial superoxide overproduction activates the hexosamine pathway and induces plasminogen activator inhibitor-1 expression by increasing Sp1 glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000): 12222-12226.
- El-Alfy, T. Abir., Amany, A. E. Ahmed., and Amal, J. Fatani. Protective effect of red grape seeds proanthocyanidins against induction of diabetes by alloxan in rats. *Pharmacol* 52 (2005): 264-270.
- Elliou, S. S., Keim, N. L., Stern, J. S., Teff, K., and Havel, P. J. Fructose, weight gain, and the insulin resistance syndrome. *J. Am Clin Nutr* 76 (2002): 911-922.
- Evans, J. L., Goldfine, I. D., Maddux, B. A., and Grodsky, G. M. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 23 (2002): 599-622.
- Evans, J. L., Maddux, B. A., and Goldfine, I. D. The molecular basis for oxidative stress-induced insulin resistance. *Antioxid Redox Signal* 7 (2005): 1040-1052.
- Francesc, P., Niurka, L., Anna, A., Cinta, B., Arola, L., and Josepa, S. Grape seed procyanidins prevent oxidative injury by modulating the expression of antioxidant enzyme systems. *J. Agric Food Chem* 53 (2005): 6080-6086.
- Fine, A. M. Oligomeric proanthocyanidin complexes: history, structure, and phytopharmaceutical applications. *Alter Med Rev* 5 (2000): 144-151.
- Finucane, P., and Sinclair, A. J. (eds). *Diabetes in old age*. Chichester: John Wiley, 302.

- Garvey, W. T., Olefsky, J. M., and Marshall, S. Insulin induces progressive insulin resistance in cultured rat adipocytes. Sequential effects at receptor and multiple postreceptor sites. *Diabetes* 35 (1986): 258-267.
- Griffin, M. E., Marcucci, M. J., Cline, G. W., Bell, K., Barucci, N., Lee, D., Goodyear, L. J., Kraegen, E. W., White, M. F., and Shulman, G. I. Free fatty acid-induced insulin resistance is associated with activation of protein kinase C theta and alterations in the insulin-signaling cascade. *Diabetes* 48 (1999): 1270-1274.
- Griffith, O. W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* 106 (1980): 207-212.
- Hajime, F., Takako, Y., Young, A. K., Chihiro, T., and Gen-ichiro, N. Protective effect of grape seed polyphenols against high glucose-induced oxidative stress. *Biosci Biotechnol Biochem* 70:9 (2006): 2104-2111.
- Hallfrisch, J. Metabolic effects of dietary fructose. *J. Faseb* 4 (1990): 2652-2660.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. Role of free radicals and catalytical metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 186 (1990): 1-85.
- Havsteen, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 96 (2002): 67-202.
- Hiroshi, K., Kazuhisa, H., Yuji, T., Shinichi, Y., and Shin, H. Investigation of the Anti-Obesity Action of Licorice Flavonoid Oil in Diet-Induced Obese Rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 72 (2008): 3225-3231.
- Hohman, T. C., and Beg, M. A. Diabetic complication: progress in the development of treatments. *Exp Opin Invest Drugs* 3 (1994): 1041-1049.
- Honghui, G., Wenhua, L., Qing, W., Chi, L., Yan, H., Min, X., Xiang, F., and Xiaodong, X. Effect of Anthocyanin-Rich Extract from Black Rice (*Oryza sativa* L. *indica*) on Hyperlipidemia and Insulin Resistance in Fructose-Fed Rats. *J. Nutr* 62 (2007): 1-6.
- Hussein, Z., et al. Effectiveness and side effect of thiazolidinediones for type 2 diabetes: real-life experience from a tertiary hospital. *MJA* 181 (2004): 536-539.
- Houstis, N., Rosen, E. D., and Lander, E. S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440 (2006): 944-948.

- Hwang, I. S., Ho, H., Hoffman, B. B., and Reaven, G. M. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension* 10 (1987): 512-516.
- Johansson, L. H., and Borg, L. A. H. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174 (1988): 331-336.
- Joshi, S. S., Kuszynski, A., and Bagchi, D. The cellular and molecular basis of health benefits of grape seed proanthocyanidin extract. *Curr Pharm Biotech* 2 (2001): 187-200.
- Kahn, B., and Flier, J. S. Obesity and insulin resistance. *J. Clin Invest* 106 (2000): 473-481.
- Kahn, S., Andrikopovlos, S., and Verchere, C. B. Islet amyloid: a long-recognized but underappreciated pathological feature of type 2 diabetes. *Diabetes* 48 (1999): 241-253.
- Kahn, S. E. The relative contributions of insulin resistance and β -cell dysfunction to the pathophysiology of Type 2 diabetes. *Diabetes* 46 (2003): 3-19.
- Kanji, M. I., Toews, M. L., and Carper, W. R. A kinetic study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol Chem* 251 (1976): 2258-2262.
- Kao, Y. H., Hiipakka, R. A., and Liao, S. Modulation of Endocrine Systems and Food Intake by Green Tea Epigallocatechin Gallate. *Endocrinology* 141 (2000): 980-987.
- Kao, Y. H., et al. Modulation of obesity by a green tea catechin. *J. Am Clin Nutr* 72 (2000): 1232-1234.
- Kaplan, F., Al-Majali, K., and Betteridge, D. J. PPARs, insulin resistance and type 2 diabetes. *J. Cardiovasc Risk* 8 (2001): 211-217.
- Karam, J.H. *Pancreatic hormones and antidiabetic drugs*. 7th ed. In Katzung, B. G. (ed.), *Basic and clinical pharmacology*. Stamford: Simon and Schuster, 1998.
- Karthikeyan, K., Sarala Bai, B. R., and Niranjali-Devaraj, S. Cardioprotective effect of grape seed proanthocyanidins on isoproterenol-induced myocardial injury in rats. *J. Int Cardiol* 115 (2007): 326-333.
- Kwong, L. K., and Sohal, R. S. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 350 (1998): 118-126.

- Lebovitz, H. E., Kreider, M., and Freed, M. I. Evaluation of liver function in type 2 diabetic patients during clinical trials: evidence the rosiglitazone does not cause hepatic dysfunction. *Diabetes Care* 25 (2002): 815-21.
- Lewis, G. F., Carpentier, A., Adeli, K., and Giacca, A. Disordered fat storage and mobilization in the pathogenesis of insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2 (2002): 201-229.
- Lindmark, S., Buren, J., and Eriksson, J. W. Insulin resistance, endocrine function and adipokines in type 2 diabetes patients at different glycaemic levels: Potential impact for glucotoxicity in vivo. *Clin Endocrinol* 65 (2006): 301-309.
- Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L., and Snyder, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 120 (1994): 227-237.
- Maeda, N., Shimomura, I., Kishida, K., Nishizawa, H., Matsuda, M., Nagaretani, H., Furuyama, N., Kondo, H., Takahashi, M., Arita, Y., Komuro, R., Ouchi, N., Kihara, S., Tochino, Y., Okutomi, K., Horie, M., Takeda, S., Aoyama, T., Funahashi, T., and Matsuzawa, Y. Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nat Med* 8 (2002): 731-737.
- Marklund, S. Distribution of Cu-Zn superoxide dismutase and Mn superoxide dismutase in human tissues and extracellular fluids. *Acta Physiol Scand* 492 (1980): 19-23.
- Matsuzawa, T., Tabata, H., Sakazume, M., Yoshida, S., and Nakamura, S.
A Comparison of the Effect of Bleeding Site on Haematological and Plasma Chemistry Values of F344 Rats: The Inferior Vena Cava, Abdominal Aorta and Orbital Venous Plexus. *Comp Haematol Int* 4 (1994): 207-211.
- Matthews, D. R., Hosker, J. P., Rudenski, A. S., Naylor, B. A., Treacher, D. F., and Turner, R. C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetes* 28 (1985): 412-419.
- Mayes, P. A. Intermediary metabolism of fructose. *J. Am Clin Nutr* 58 (1993): 754-765.
- McClain, D. A., and Crook, E. D. Hexosamine and insulin resistance. *Diabetes* 45 (1996): 1003-1009.

- Meneilly, G. S., and Tessier, D. Diabetes in elderly adults. *J. Gerontol A Biol Sci Med Sci* 56 (2001): 5-13.
- Miele, C., Riboulet, A., Maitan, M. A., Oriente, R., Romano, C., Formisano, R., et al., Human glycated albumin affects glucose metabolism in L6 skeletal muscle cells by impairing insulin-induced insulin receptor substrate (IRS) signaling through a protein kinase C-mediated mechanism. *J. Biol Chem* 278(2003): 47376-47387.
- Moreno, D. A., Ilic, N., Poulev, A., Brasaemle D. L., Fried, S. K., and Raskin, I. Inhibitory effects of grape seed extract on lipases. *Nutrition* 19 (2003): 876-879.
- Moskang, J., Carlsen, H., Myhrstad, M. C. W., and Blomhoff, R. Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *J. Am Clin Nutr* 81 (2005): S277-S283.
- Mueckler, M. Facilitative glucose transporters. *J. Eur Biochem* 219 (1994): 713-725.
- Murase, T., Nagasawa, A., Suzuki, J., Hase, T., and Tokimitsu, I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *J. Int Obes Relat Metab Disord* 26 (2002): 1459-1464.
- Naziroglu, M., and Butterworth, P. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes. *J. Can Appl Physiol* 30;2 (2005): 172-185.
- Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S-1., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, Ohkawa, H., Ohishi, N., and Yaki, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95 (1979): 351-358.
- Olefsky, J. M. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J. Clin Invest* 106 (2000): 467-472.
- Paglia, D. E., and Valentine, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J. Lab Clin Med* 70 (1967): 158-169.
- Paoletti, F., and Mocali, A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Meth Enzymol* 186 (1990): 209-220.

- Park, O. J., Cesar, D., Faix, D., Wu, K., Shackleton, C. H., and Hellerstein, M. K. Mechanisms of fructose-induced hypertriglyceridaemia in the rat. Activation of hepatic pyruvate dehydrogenase through inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase. J. Biochem 282;3 (1992): 753-757.
- Pinent, M., Blay, M., Blade, M. C., Salvado, M. J., Arola, L., and Ardevol, A. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. Endocrinology 145 (2004): 4985-4990.
- Reaven, G. M. Relationship between glucose tolerance, insulin secretion, and insulin action in non obese individuals with varying degrees of glucose tolerance. Diabetes 32 (1989): 52-55.
- Reaven, G. M. Insulin resistance, hyperinsulinemia, hypertriglyceridemia and hypertension: parallels between human diseases and animal models. Diabetes Care 14 (1991): 195-202.
- Rice-Evans, C. A., Miller, N. J., and Paganda, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoid and phenolic acids. Free Rad Biol Med 20 (1996): 933-956.
- Rotter, V., Nagaev, I., and Smith, U. Interleukin-6 (IL-6) induces insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes and is, like IL-8 and tumor necrosis factor-alpha, overexpressed in human fat cells from insulin-resistant subjects. J. Biol Chem 278(2003): 45777-45784.
- Ruzaidi, A., Amin, I., Nawalyah, A. G., Hamid, M., Faizul, H. A. The effect of Malaysian cocoa extract on glucose levels and lipid profiles in diabetic rats. J. Ethnopharmacol 98 (2005): 55- 60.
- Saito, M., Hosoyama, H., Ariga, T., Kataoka, S., and Yamaji, N. Antiulcer activity of grape seed extract and procyanidins. J. Agric Food Chem 46;4 (1998): 1460-1464.
- Salah, N., Miller, N. J., Paganga, G., Tijburg, L., Bolwell, G. P., and Rice-Evans, C. Polyphenolicflavonals as scavengers of aqueous phase radicals and chain-breaking antioxidants. Arch Biochem Biophys 322 (1995): 339-346.

- Saltiel, A. R., and Olefsky, J. M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. Diabetes 56 (1996): 1661–1669.
- Scheen, A. J. Non-insulin-dependent diabetes mellitus in the elderly. Bailliere's Clin Endocrinol Metab 11 (1997): 389-406.
- Schwabenbauer, C. Influence of the Blood Sampling Site on Some Haematological and Clinical-Chemical Parameters in Sprague-Dawley Rats. J. Int Hemato 1 (1991): 112-116.
- Shepherd, P. R., and Kahn, B. B. Glucose transporter and insulin action. Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. J. N Eng Med 341 (1999): 248-257.
- Sherwood, L. The peripheral endocrine glands. In L. Sherwood (ed.), Human Physiology: from cell to system. USA: Brooks/Cole, 2001.
- Storgaard, H., Song, X. M., Jensen, C. B., Madsbad, S., Bjornholm, M., and Vaag, A., et al. Insulin signal transduction in skeletal muscle from glucose-intolerant retives with type 2 diabetes. Diabetes 50;12 (2001): 2770-2778.
- Tebib, K., et al. Effects of dietary grape seed tannins on rat cecal fermentation and colonic bacterial enzymes. Nutr Res 16 (1996): 105-110.
- Thorburn, A. W., Storlien, L. H., Jenkins, A. B., Khouri, S., and Kraegen, E. W. Fructose-induced in vivo insulin resistance and elevated plasma triglyceride levels in rats. J. Am Clin Nutr 49 (1989): 1155–1163.
- Ueno, M., Bezerra, R. M., Silva, M. S., Tavares, D. Q., Carvalho, C. R., and Saad, M. J. A high-fructose diet induces changes in pp185 phosphorylation in muscle and liver of rats. J. Braz Med Biol 33 (2000): 1421-1427.
- Vats, V., Grover, J. K., and Rathi, S. S. Evaluation of anti-hyperglycemic and hypoglycemic effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn, *Ocimum sanctum* Linn and *Pterocarpus marsupium* Linn in normal and alloxanized diabetic rats. J. Ethnopharmacol 79 (2002): 95-100.
- Wallace, D. C. Diseases of the mitochondrial DNA. Annu Rev Biochem 61 (1992): 1175-1212.
- Watson, R. T., Pessin, J. E. Intracellular organization of insulin signaling and GLUT4 translocation. Recent Progress in Hormone Research 56 (2001): 175–193.

- Watson, R. T., and Pessin, J. E. GLUT4 translocation: The last 200 nanometers. Cell Signal 19;11 (2007): 2209-2217.
- Wendel, A. A glutathione peroxidase. Meth Enzymol 77 (1981): 325-333.
- Xiao-pei, C., Bao-ying, L., Hai-qing, G., Na, W., Wei-ling, W., and Mei, L. Effects of grape seed proanthocyanidin extracts on peripheral nerves in streptozotocin-induced diabetic rats. J. Nutr Sci Vitaminol 54 (2008): 321-328.
- Zammit, V. A., Waterman, I. J., Topping, D., and McKay, G. Insulin stimulation of hepatic triacylglycerol secretion and the etiology of insulin resistance. J. Nutr 131 (2001): 2074-2077.
- Zavaroni, I., Sander, S., Scott, S., and Reaven, G. M. Effect of fructose feeding on insulin secretion and insulin action in the rat. Metabolism 10 (1980): 970-973.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

Table 1 Body weight of individual rat in normal diet-fed group

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	175	198	245	290	325	350	373	386	395
2	170	192	230	246	296	324	346	356	366
3	173	204	232	275	318	356	381	392	410
4	175	187	230	273	317	346	370	387	409
5	167	187	222	186	209	256	299	338	369
6	175	191	232	267	300	328	349	364	379
Mean	172.50	193.17	231.83	256.17	294.17	326.67	353.00	370.50	388.00
SD	3.33	6.68	7.44	37.22	43.20	36.83	29.85	21.37	19.49
SEM	1.36	2.73	3.04	15.20	17.64	15.03	12.18	8.72	7.96

Table 2 Body weight of individual rat in high fructose diet-fed group

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	170	195	232	266	296	311	330	343	358
2	165	185	233	279	322	355	385	408	422
3	168	182	225	269	306	339	363	377	392
4	170	192	240	277	314	345	363	375	397
5	165	184	236	276	318	349	380	399	416
6	168	191	236	281	325	362	391	408	426
Mean	167.67	188.17	233.67	274.67	313.50	343.50	368.67	385.00	401.83
SD	2.25	5.19	5.09	5.89	10.84	17.80	22.15	25.23	25.43
SEM	0.92	2.12	2.08	2.40	4.43	7.27	9.04	10.30	10.38

Table 3 Body weight of individual rat in high fructose diet-fed supplemented with 0.5% Grape seed extract

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	160	179	210	242	266	282	299	310	320
2	155	177	224	268	312	345	372	388	402
3	150	166	206	240	275	302	326	344	357
4	157	165	202	242	278	309	327	345	369
5	163	186	229	264	296	322	346	364	380
6	163	186	229	269	300	326	351	366	384
Mean	158.00	176.50	216.67	254.17	287.83	314.33	336.83	352.83	368.67
SD	5.06	9.27	12.09	14.18	17.53	21.73	25.17	26.49	28.21
SEM	2.07	3.78	4.94	5.79	7.16	8.87	10.27	10.81	11.52

Table 4 Body weight of individual rat in high fructose diet-fed supplemented with 1.0% Grape seed extract

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	165	179	216	244	270	278	295	308	319
2	165	186	222	260	291	307	329	345	358
3	155	175	215	249	278	299	319	329	332
4	158	177	224	266	308	342	367	377	398
5	155	176	221	264	300	335	362	377	393
6	160	174	206	243	276	302	328	353	376
Mean	159.67	177.83	217.33	254.33	287.17	310.50	333.33	348.17	362.67
SD	4.55	4.36	6.56	10.25	14.95	23.94	27.12	27.12	32.30
SEM	1.86	1.78	2.68	4.18	6.10	9.77	11.07	11.07	13.19

Table 5 Body weight of individual rat in high fructose diet-fed supplemented with 2.0% Grape seed extract

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	168	192	233	275	309	327	345	359	371
2	165	188	226	263	297	316	342	361	377
3	160	182	231	270	305	332	355	366	380
4	168	186	231	261	299	327	362	380	396
5	163	180	220	254	289	322	349	376	395
6	167	181	227	269	302	331	353	373	389
Mean	165.17	184.83	228.00	265.33	300.17	325.83	351.00	369.17	384.67
SD	3.19	4.67	4.73	7.50	6.94	5.98	7.24	8.47	10.21
SEM	1.30	1.90	1.93	3.06	2.83	2.44	2.96	3.46	4.17

Table 6 Body weight of individual rat in high fructose diet-fed supplemented with rosiglitazone (4 mg/kg body wt./day) started from the 5th week.

Rat number	Body weight (g)								
	Baseline	Week 1	Week 2	Week 3	Week 4	Week 5	Week 6	Week 7	Week 8
1	170	188	230	273	307	331	356	371	389
2	173	197	239	279	315	344	363	379	396
3	165	183	231	281	329	367	403	427	454
4	175	188	237	278	309	336	361	383	412
5	165	182	233	282	323	365	402	420	438
6	170	193	240	285	324	368	405	430	446
Mean	169.67	188.50	235.00	279.67	317.83	351.83	381.67	401.67	422.50
SD	4.08	5.75	4.24	4.08	8.86	16.80	23.86	26.77	27.27
SEM	1.67	2.35	1.73	1.67	3.62	6.86	9.74	10.93	11.13

ภาคผนวก ข

การวัดระดับน้ำตาลในเลือดโดย Glucose oxidase test

สาร

1. เตรียม Peroxidase-glucose oxidase enzyme (PGO enzyme) solution
โดยนำ PGO enzyme (Sigma, U.S.A.) 1 แคปซูล มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มล.

ในขวดสีชา

2. เตรียม Color reagent solution
โดยชั่ง o-dianisidine dihydrochloride (Sigma,U.S.A.) 50 มก. มาละลายในน้ำกลั่น
ปริมาตร 20 มล. ในขวดสีชา
3. นำ Color reagent solution ปริมาตร 1.6 มล. ผสมกับ PGO enzyme solution ปริมาตร
100 มล. ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา
4. เตรียม glucose standards ที่ 50, 100, 200 และ 300 มก./ดล.

วิธีการวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างพลาสมา 10 มคล. เติม PGO color reagent ปริมาตร 1 มล. ลงในหลอด
ทดลองผสมให้เข้ากัน
2. นำไปทิ้งไว้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที
3. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยเครื่อง Spectrophotometer
(Shimadzu UV-160A)
4. สร้าง standard curve ของ glucose standard จากค่าดูดกลืนแสง
คำนวณหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสจาก standard curve

ภาคผนวก ค

การวัดระดับพลาสมาอินซูลินโดย Enzyme Immunoassay

สาร

1. เตรียม EIA buffer
โดยนำ EIA buffer 1 vial มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล.
2. เตรียม Insulin standards ที่ 10, 5, 2.50, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08 นาโนกรัม/มล.
3. เตรียม Quality Control
โดยนำ Quality Control 1 vial มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1 มล.
4. เตรียม Rat insulin-AChe tracer
โดยนำ Rat insulin-AChe tracer 1 vial มาละลายกับ EIA buffer ปริมาตร 5 มล.
5. เตรียม Rat insulin antiserum
โดยนำ Rat insulin antiserum 1 vial มาละลายกับ EIA buffer ปริมาตร 5 มล.
6. เตรียม Wash buffer
นำ concentrated wash buffer 1 มล. มาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มล.
7. เตรียม Ellman's reagent
นำน้ำกลั่นปริมาตร 50 มล. เติมลงใน Ellman's reagent

วิธีการวิเคราะห์

เปิดตัวอย่าง 50 มคล. ลงใน 96 well เติม insulin-AChe tracer ปริมาตร 50 มคล. จากนั้นเติม insulin antiserum ปริมาตร 50 มคล. ปิด plate ด้วยฟิล์มพลาสติก และนำไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 16-20 ชั่วโมง จากนั้นเทสารใน plate ทิ้ง ล้างด้วย wash buffer ปริมาตร 300 มคล. ต่อหลุม จำนวน 5 ครั้ง แล้วเติม Ellman's reagent ปริมาตร 200 มคล. และนำไปตั้งทิ้งไว้บนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 25°C นาน 1.5 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 414 นาโนเมตร

คำนวณหาค่าความเข้มข้นของพลาสมาอินซูลินจาก standard curve

ภาคผนวก ง

ค่า Homeostasis Model Assessment Index (HOMA-IR)

วิธีทดสอบภาวะดื้ออินซูลินที่ถือเป็นมาตรฐาน (gold standard) คือ วิธี hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp แต่เป็นวิธีที่เปลืองค่าใช้จ่าย แรงงาน เวลา ต้องอาศัยเครื่องมือเฉพาะและเทคนิคพิเศษ ก่อให้เกิดความเจ็บปวดแก่ร่างกาย (invasive) และอาจเกิดอันตรายได้ ซึ่งการทำ oral glucose tolerance test (OGTT) มีข้อดีกว่า แต่มีข้อเสียที่ไม่สามารถทำการวัดเพียงครั้งเดียวได้จึงยากต่อการนำมาใช้ทางคลินิก ปัจจุบันพบว่าค่า HOMA-IR (homeostasis model assessment index) ซึ่งคิดค้นโดย Matthews และคณะ (1985) เป็นค่าที่ใช้แสดงถึงภาวะดื้ออินซูลินที่นิยมใช้ในการวิจัยทางคลินิกมากค่าหนึ่งโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ สร้างสมการทำนายระดับกลูโคสและอินซูลินในสภาวะสมดุลย์ของร่างกาย (homeostasis) เมื่อร่างกายเกิดภาวะดื้ออินซูลิน และเบต้าเซลล์ทำงานบกพร่อง (β -cell deficiency) ที่ระดับต่างๆกัน ซึ่งคำนวณจากระดับน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารและระดับพลาสมาอินซูลินโดยปกติระดับกลูโคสและอินซูลินขณะอดอาหารจะขึ้นอยู่กับการทำงานของตับและเบต้าเซลล์ ดังนั้นระดับกลูโคสที่สูงขึ้นเป็นผลมาจาก

1. การทำงานของเบต้าเซลล์บกพร่อง
2. ภาวะดื้ออินซูลิน และเรียกสมการที่ได้นี้ว่า homeostasis model assessment

$$\text{HOMA-IR} = \frac{\text{fasting glucose (mmol/L)} \times \text{fasting insulin } (\mu\text{IU/mL})}{22.5}$$

Fasting insulin คือ ระดับอินซูลินในเลือดหลังอดอาหาร 8 ชั่วโมง (ไมโครยูนิตต่อมิลลิลิตร)

Fasting glucose คือ ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร 8 ชั่วโมง (มิลลิโมลต่อลิตร)

ค่า HOMA-IR เป็นค่าที่มีความถูกต้อง (accuracy) และความแม่นยำ (precision) สูง นอกจากนี้ยังมีความสัมพันธ์ (correlation) กับวิธี hyperinsulinemic euglycemic glucose clamp ซึ่งเป็นวิธีทดสอบภาวะดื้ออินซูลินมาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($R_s = 0.88$)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววรรณพร สุวรรณเพชร เกิดเมื่อวันที่ 25 พฤษภาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดตาก สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมจากโรงเรียนสรรพวิทยาคม จังหวัดตาก เมื่อปีการศึกษา 2541 เข้าศึกษาที่ คณะเทคนิคการแพทย์ สาขารังสีวิทยา มหาวิทยาลัยมหิดล สำเร็จการศึกษา ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต (รังสีวิทยา) เมื่อปีการศึกษา 2546 เข้าศึกษาต่อในระดับ มหาบัณฑิตหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา) คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549-2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย