

ฤทธิ์ของกรดซึนนามิกและอนุพันธ์ ในการลดระดับกลูโคส การกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน
และ การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส



นายปรีชา มูลสาร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

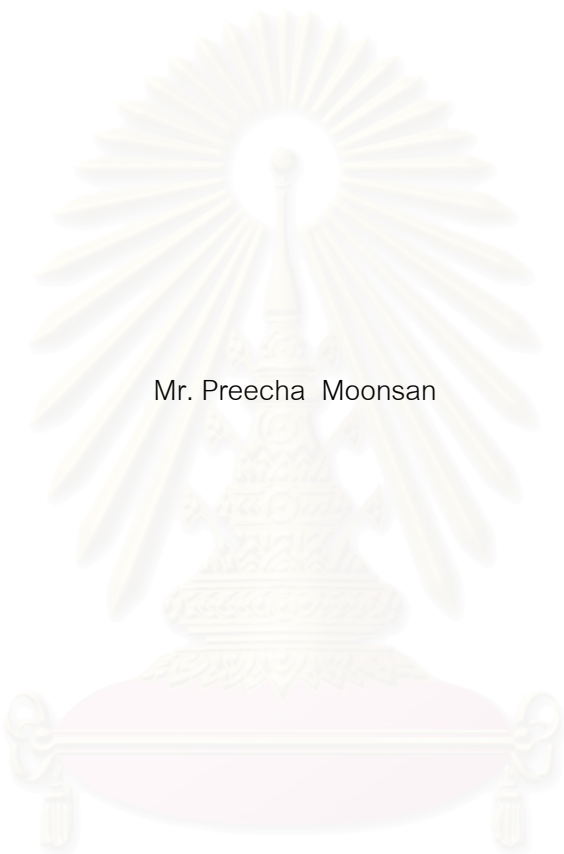
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2939-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF CINNAMIC ACID AND DERIVATIVES ON HYPOGLYCEMIC ACTIVITY,
STIMULATION OF INSULIN SECRETION AND ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION



Mr. Preecha Moonsan

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

Department of Veterinary Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2939-8

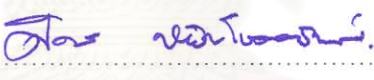
หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของกรดซึนนามิกและอนุพันธ์ ในการลดระดับกลูโคส การกระตุ้น
การหลั่งอินซูลิน และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส
โดย นายปรีชา มูลสาร
สาขาวิชา เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคอนันต์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต


..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.อรรณพ คุณาวงษ์กฤต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. วรา พานิชเกรียงไกร)


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


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ญ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)


..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร. กฤษ อังคนาพร)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. สุทธาสินี ปุญญโชติ)

ปรีชา มูลสาร : ฤทธิ์ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ ในการลดระดับกลูโคส การกระตุ้น
การหลั่งอินซูลิน และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส. (EFFECT OF CINNAMIC
ACID AND DERIVATIVES ON HYPOGLYCEMIC ACTIVITY, STIMULATION OF
INSULIN SECRETION AND ALPHA - GLUCOSIDASE INHIBITION)

อ.ที่ปรึกษา : รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หยิบโชคนันต์, 83 หน้า. ISBN 974-53-2939-8

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของกรดซินนามิก (CIN) และอนุพันธ์ 6 ชนิด
ได้แก่ กรดออโรโท-, เมทา-, พารา-ไฮดรอกซีซินนามิก และกรดออโรโท-, เมทา-, พารา-เมททอกซี
ซินนามิก ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในภาวะปกติ
และภาวะน้ำตาลสูง และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้หนูขาว
การทดลองนี้ใช้หนูขาวสายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 300-350 กรัม แบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม
กลุ่มละ 6 ตัว โดยกลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำเกลือเข้าทางหลอดเลือดดำ กลุ่มที่ 2-8 ได้รับกรดซินนามิกและ
อนุพันธ์ (5 ก./กก.) ตามลำดับ หลังจากให้สารทดสอบ 30 นาที จึงฉีดสารละลายกลูโคสขนาด
0.25 ก./กก. เข้าทางหลอดเลือดดำ และเก็บตัวอย่างพลาสมาจากหลอดเลือดดำพีเมอรอล ณ
นาทีที่ 0, 5, 10, 30, 60, 90 และ 120 เพื่อนำมาตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสด้วยวิธี glucose
oxidase test จากนั้นนำสารที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดมาศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน
ในภาวะน้ำตาลปกติ (5.5 mM) และภาวะน้ำตาลสูง (10 mM) ด้วยเทคนิค *In situ* pancreatic
perfusion และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

จากผลการทดลองพบว่า CIN, กรดออโรโท-ไฮดรอกซีซินนามิก (o-HCA) และกรดพารา-
เมททอกซีซินนามิก (p-MCA) สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญ โดย CIN และ
o-HCA ลดระดับน้ำตาลได้ ณ นาทีที่ 10 ส่วน p-MCA ได้ในนาทีที่ 5, 10 และ 90 หลังจากฉีด
น้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำ นอกจากนี้ CIN และ p-MCA สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้
สูงสุดในภาวะน้ำตาลปกติและภาวะน้ำตาลสูงเป็น 1.98, 3.41 เท่า และ 1.6, 2.41 เท่า ตามลำดับ
เมื่อเทียบกับ 0.2%DMSO อย่างไรก็ตาม o-HCA ไม่มีผลกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน แต่
สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส และมอลเตสได้ โดยมีค่า IC₅₀ ต่ำกว่าอะคาร์โบส
20.06 และ 775 เท่า ตามลำดับ สรุปได้ว่า CINและอนุพันธ์สองชนิด คือ p-MCA และ o-HCA
สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านทางกลไกที่แตกต่างกัน คือ CIN และ p-MCA กระตุ้น
ตับอ่อนให้หลั่งอินซูลิน ในขณะที่ o-HCA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

ภาควิชา...เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่อ.....

สาขาวิชา...เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์.....ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา...2548.....

4675569931 : MAJOR VETERINARY PHAMACOLOGY

KEYWORD : CINNAMIC ACID AND DERIVATIVES / DIABETES MELLITUS / INSULIN

SECRETION /ALPHA-GLUCOSIDASE

PREECHA MOONSAN : EFFECTS OF CINNAMIC ACID AND DERIVATIVES ON
HYPOGLYCEMIC ACTIVITY, STIMULATION OF INSULIN SECRETION AND
ALPHA-GLUCOSIDASE INHIBITION. THESIS ADVISOR : ASSOC.PROF.

SIRINTORN YIBCHOK – ANAN, D.V.M., Ph.D., 83 pp. ISBN 974-53-2939-8

The purposes of this study were to investigate the effects of cinnamic acid and derivatives including, ortho-, meta-, para-hydroxycinnamic acid and ortho-, meta-, para-methoxycinnamic acid, in antihyperglycemic activity, stimulation of insulin secretion from pancreas in both normal and high glucose conditions and alpha-glucosidase inhibition from rat intestine. Male Sprague-Dawley rat weighting 300-350 g were divided into 8 groups. Each group contained 6 rats. Group 1 received vehicle (iv). Group 2-8 received cinnamic acid and its derivatives (5 mg/kg; iv), respectively. The intravenous glucose tolerance test (0.25 g/kg) was performed 30 min after receiving the treatments. Blood plasma samples were collected from femoral vein to determine glucose concentration by glucose oxidase test at 0, 5, 10, 30, 60, 90 and 120 min. In addition, we investigated the effects of cinnamic acid and its derivatives, that exerted *In vivo* antihyperglycemic activity, on insulin secretion from perfused rat pancreas in the presence of both normal (5.5 mM glucose) and high glucose (10 mM glucose) conditions as well as alpha-glucosidase inhibition.

The results showed that CIN and *o*-HCA significantly reduced plasma glucose concentrations at 10 min and *p*-MCA at 5, 10 and 90 min after intravenous glucose injection. In normal and high glucose conditions, CIN and *p*-MCA stimulated insulin secretions by 1.98, 3.41 and 1.6, 2.41 folds, respectively, when compared with those of 0.2%DMSO. *o*-HCA failed to stimulate insulin secretion from rat pancreas. However, it inhibited sucrase and maltase activities with IC₅₀ lower than acarbose by 20.06 and 775 folds, respectively. In conclusion, CIN and its derivatives, *o*-HCA and *p*-MCA, exerted antihyperglycemic activities via different mechanisms. Both CIN and *p*-MCA decreased plasma glucose concentrations by stimulating insulin secretion from rat pancreas whereas *o*-HCA inhibited α -glucosidase activities.

Department.....Veterinary Pharmacology.....Student's signature.....

Field of study...Veterinary Pharmacology.....Advisor's signature.....

Academic year...2005....

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศีรินทร์ หยิบโชคนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมากมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ ดร.วีระพงษ์ อินทร์ทอง อาจารย์คณะเทคโนโลยีการเกษตรและอาหาร มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆซึ่งเป็นประโยชน์ในการเขียนวิทยานิพนธ์อย่างมาก

ขอขอบพระคุณ นายสิริชัย อติศักดิ์วัฒนา และนางสาววัลยา จิตตประสาทศิลป์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมากมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการดูแลสัตว์ทดลอง และความสะดวกในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาและครู-อาจารย์ ซึ่งให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมาและขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

บทที่	หน้า
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ

บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
1. คำจำกัดความ.....	3
2. ระบาดวิทยาของโรคเบาหวานในสัตว์.....	3
3. อาการของสัตว์ที่เป็นโรคเบาหวาน.....	4
4. สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวาน.....	4
5. การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน.....	6
6. ตับอ่อนและฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในร่างกาย.....	7
7. การควบคุมการหลังอินซูลิน.....	8
8. สรีรวิทยาของการควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด.....	9
9. อินซูลินที่ใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด.....	13
10. ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทาน.....	17
11. ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกรดซิงนามิกและอนุพันธ์.....	21
12. <i>In situ</i> pancreatic perfusion.....	23
13. Alpha-glucosidase inhibitors.....	24
3. วิธีดำเนินการทดลอง	
1. วัสดุและอุปกรณ์.....	27
2. วิธีดำเนินการทดลอง.....	29
3. การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	33

4. ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
การทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดของกรดซินนามิกและอนุพันธ์โดย	
เทคนิค Intravenous glucose tolerance test.....	34
การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของกรดซินนามิก	
และอนุพันธ์ โดยเทคนิค <i>In situ</i> pancreatic perfusion.....	37
การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของกรดซินนามิก	
และอนุพันธ์ในภาวะกระตุ้นด้วยกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ โดยเทคนิค <i>In situ</i>	
pancreatic perfusion	40
การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาวของกรด	
ซินนามิก และอนุพันธ์.....	44
5. สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ	
1. อภิปรายผล.....	45
2. สรุปผลการวิจัย.....	48
3. ข้อเสนอแนะ.....	49
รายการอ้างอิง.....	51
ภาคผนวก.....	57
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	71

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส.....	12
2 ชนิด แหล่งที่มา ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ใช้ในสุนัขและแมว ...	16
3 แสดงผลของกรดซิทริกและอนุพันธ์ ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติโดย การทำ IVGTT	35
4 แสดงค่า IC ₅₀ (μM) ของ Acarbose, CIN, o-HCA และ p-MCA ต่อการยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้ของหนูขาว	44



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
1	ขั้นตอนการกระตุ้นการหลังอินซูลินโดยกลูโคส9
2	กลไกการออกฤทธิ์ของอินซูลิน11
3	ปัจจัยทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อความเข้มข้นของกลูโคสในเลือด.....13
4	สูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้.....21
5	ผลของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ ขนาด 5 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนู ขาว (n=6) โดยการทำให้ IVGTT.....36
6	ผลของ CIN, o-HCA และ p-MCA ต่อการกระตุ้นการหลังอินซูลินจากตับอ่อน ในสภาวะที่มีกลูโคส 5.5 mM38
7	ค่าพื้นที่ใต้กราฟในการหลังอินซูลินของ CIN, o-HCA และ p-MCA ในสภาวะที่มี กลูโคส 5.5 mM ในช่วงเวลาที่ 11-20.....39
8	ผลของ CIN และ p-MCA ต่อการกระตุ้นการหลังอินซูลินในภาวะกลูโคส 10 mM.....42
9	แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟในการหลังอินซูลินของ CIN และ p-MCA ในภาวะ กลูโคส 10 mM ในช่วงเวลาที่ 11-20เปรียบเทียบกับภาวะกลูโคส 5.5 mM ในช่วงเวลาที่ 11-20.....43
10.	สูตรโครงสร้างของกรดคาเฟอิก กรดเฟอูลิก และกรดไอโซเฟอูลิกเปรียบเทียบกับ กรดซินนามิกและอนุพันธ์.....50

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

α	=	Alpha
β	=	Beta
μM	=	Micromolar
μl	=	Microlitre
akt (PKB)	=	Protein kinase B
ATP	=	Adenosine triphosphate
Ca^{2+}	=	Calcium ion
CIN	=	Cinnamic acid
FDA	=	Food and drug administration
G-6P	=	Glucose-6-phosphatate
GH	=	Growth hormone
GLUT	=	Glucose transporter
GRB2	=	Growth factor receptor binding protein2
Hb A _{1c}	=	Hemoglobin A _{1c}
IC ₅₀	=	Median inhibition concentration
IP	=	Intraperitoneal
IRS-1	=	Insulin receptor substrate -1
IRS-2	=	Insulin receptor substrate -2
IV	=	Intravenous
IVGTT	=	Intravenous glucose tolerance test
K^+	=	Potassium ion
KRB	=	Kreb-Ringer bicarbonate buffer
MAP kinase	=	Mitogen-activated protein kinase
MAP, KAP K2	=	MAP kinase-activated protein kinase-2
MEK	=	MAP kinase and ERKinase
mEq/L	=	Milliequivalence per litre
<i>m</i> -HCA	=	Meta-hydroxycinnamic acid

<i>m</i> -MCA	=	Meta-methoxycinnamic acid
mM	=	Millimolar
mSOS	=	Mammalian son of sevenless
Na ⁺	=	Sodium ion
NSS	=	Normal saline solution
<i>o</i> -HCA	=	Ortho-hydroxycinnamic acid
<i>o</i> -MCA	=	Ortho-methoxycinnamic acid
<i>p</i> -HCA	=	Para-hydroxycinnamic acid
<i>m</i> -MCA	=	Para-methoxycinnamic acid
p70 ^{S6}	=	P70 ribosomal protein S6 kinase
p90 ^{rsk}	=	P90 ribosomal protein S6 kinase
pg/ml	=	Picrogram per millilitre
PI 3-kinase	=	Phosphatidylinositol 3-kinase
pKa	=	Ionisation constant
PPAR γ	=	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
SGLT1	=	Na ⁺ - dependent glucose transporters
SE	=	Standard error of mean
SUR	=	Sulfonylurea receptor
>	=	มากกว่า
ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
ชม.	=	ชั่วโมง
ดล.	=	เดซิลิตร
นก.	=	นาโนกรัม
นม.	=	นาโนเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นโรคที่แสดงความผิดปกติของระบบเมตาบอลิซึมที่สำคัญโรคหนึ่งในมนุษย์และสัตว์ จากรายงานขององค์การอนามัยโลกพบว่า ปี ค.ศ. 2000 มีผู้ป่วยโรคเบาหวาน 171 ล้านคน และคาดว่า ปี ค.ศ. 2030 จะพบผู้ป่วยเพิ่มขึ้นเป็น 366 ล้านคน ในประเทศสหรัฐอเมริกาผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน ประมาณ 18.2 ล้านคนและมีอีก 15 ล้านคน ที่ยังไม่ได้รับการตรวจวินิจฉัย ซึ่งต้องเสียค่าใช้จ่ายทางเศรษฐกิจ (economic cost) สำหรับโรคนี้ปีละมากกว่า 100 พันล้านเหรียญสหรัฐ [1] ส่วนประชากรไทยมีผู้ป่วยเบาหวาน 1.536 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2000 และคาดว่า ปี ค.ศ. 2030 จะพบผู้ป่วยเบาหวานชาวไทยเพิ่มเป็น 2.739 ล้านคน [2] โดยคนไทยป่วยเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ประมาณ 95 - 96.3 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด และส่วนใหญ่เป็นเพศหญิงมากกว่าเพศชาย ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะอยู่ในเมืองมากกว่าในชนบท โรคนี้สามารถส่งต่อทางพันธุกรรมได้ การที่ประชากรมีอายุยืนยาวและมีประชากรที่อ้วนมากขึ้น ทำให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และเกิดเป็นโรคเบาหวาน [3]

โรคเบาหวานที่เกิดในสุนัขและแมว จะทำให้เจ้าของสัตว์เกิดความเครียด เนื่องจาก ต้องให้การดูแลสัตว์ที่ป่วยเป็นเบาหวานเหมือนการดูแลผู้ป่วยเบาหวาน เพื่อให้สัตว์เลี้ยงที่รักสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างมีความสุขมากที่สุด นั่นคือ เจ้าของสัตว์และสัตวแพทย์ที่ดูแลสัตว์เลี้ยง ต้องศึกษาหาความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวานที่เกิดขึ้นและใส่ใจแสวงหาความรู้ใหม่ในการรักษาโรค มีทุนทรัพย์ และความอดทน ถ้าหากเจ้าของสัตว์ไม่มีความเข้าใจในกระบวนการตรวจทางห้องปฏิบัติการ ขั้นตอนการรักษา การดูแลสัตว์ป่วยที่ดีพอ อาจทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายต่างๆไปโดยเปล่าประโยชน์ อาทิ เช่น ค่าการตรวจวินิจฉัยโรคและค่าใช้จ่ายอื่นๆในการรักษาโรค เป็นต้น

ปัจจุบันยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเฉพาะยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อาจมีความเป็นพิษต่อดับ ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร และเป็นปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคหัวใจ [4] จากการศึกษาพบว่า สมุนไพรไทยหลายชนิดมีสรรพคุณลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ เช่น ชิงช้าชาลี (*Tinospora cordifolia*) บอระเพ็ด (*Tinospora crispa*) นิโครธ (*Ficus bengalensis*) ตำลึง (*Coccinia indica*) มะระขี้นก (*Momordica charantia*) บัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) มะตูม (*Aegle marmelos*) กระเทียม (*Allium sativum*) กะเพรา (*Ocimum sanctum*) และ ว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis*) [5] ซึ่งกรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่จะศึกษาในครั้งนี้พบได้ในพืชสมุนไพรที่ใช้รักษาโรคเบาหวานทั้งของไทยและต่างประเทศหลายชนิด แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด การกระตุ้น

การหลังอินซูลิน และการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (α -glucosidase : AGH) มาก่อน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ต่างๆ ได้แก่ ออร์โท- เมทา- และพารา- ไฮดรอกซีซินนามิก แอซิด (*ortho*-, *meta*- and *para*-hydroxycinnamic acid) และออร์โท- เมทา- และพารา- เมททอกซีซินนามิก แอซิด (*ortho*-, *meta*- and *para*-methoxycinnamic acid) ต่อการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูขาว ด้วยเทคนิค intravenous glucose tolerance test
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลังฮอร์โมนอินซูลินของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ต่างๆ ในหนูขาว โดยใช้เทคนิค *In situ* pancreatic perfusion
3. เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่สกัดจากลำไส้หนูขาว ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ต่างๆ

สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

กรดซินนามิกและอนุพันธ์ทั้ง 6 ชนิด มีประสิทธิภาพในการลดระดับกลูโคสในเลือด กระตุ้นการหลังอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของหนูขาว และ/หรือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-กลูโคซิเดส จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ได้แตกต่างกันขึ้นกับลักษณะโครงสร้างทางเคมี ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์นั้นๆ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. คำจำกัดความ

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคของระบบเมตาบอลิซึมที่ผิดปกติ เช่น ระบบเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีน จึงทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง เนื่องจาก ความผิดปกติในการหลั่ง หรือการออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ไม่เพียงพอ และ /หรือการที่เนื้อเยื่อตอบสนองต่ออินซูลินลดลงหรือทั้งสองประการร่วมกัน การที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความผิดปกติต่อโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่างๆ ได้แก่ ตา ไต เส้นประสาท หลอดเลือด หัวใจ [5]

2. ระบาดวิทยาของโรคเบาหวานในสัตว์

อุบัติการณ์ของโรคเบาหวานในสุนัข มีประมาณ 1 ใน 2000 ถึง 1 ใน 66 ปกติพบในช่วงอายุตั้งแต่ 4 - 14 ปี แต่โดยเฉลี่ยพบในช่วงระหว่างอายุ 7 - 9 ปี [6,7] สุนัขเพศเมียมีโอกาสเป็นโรคเบาหวานมากกว่าสุนัขเพศผู้ 2 เท่า [8] สุนัขที่มีกรรมพันธุ์เป็นโรคเบาหวาน คือ สุนัขพันธุ์กีสโฮนด์ (keeshonden) ปอมเมอเรเนียน (pomeranian) และ โกลเด้น รีทริฟเวอร์ (golden - retriever) ส่วนสุนัขพันธุ์อื่นที่มีแนวโน้มเป็นโรคนี้ คือ สุนัขพันธุ์มินิเจอร์ชเนาเซอร์ (miniature schnauzers) บีเกิลเทอร์เรีย (beagle terriers) มินิเจอร์พินเชอร์ (miniature pinscher) [6] พูลิค (pulik) และ เคียน เทอร์เรีย (cairn terrier) [9] ส่วนมากสุนัขจะป่วยเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ซึ่งมีความบกพร่องในการหลั่งอินซูลิน ไม่สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ทำให้มีกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น พร้อมกับมีการสลายไกลโคเจน และ เกิดขบวนการกลูโคนีโอเจเนซิส (gluconeogenesis) ที่ตับเพิ่มขึ้น [10]

อุบัติการณ์ของโรคเบาหวานในแมว มีประมาณ 1 ใน 800 ถึง 1 ใน 400 แมวเพศผู้มีโอกาสเป็นโรคเบาหวานมากกว่าแมวเพศเมีย 1.5 เท่า [11] โดยเฉพาะแมวเพศผู้ที่ตอนแล้ว ปัจจัยเสี่ยงที่ทำให้แมวเป็นโรคนี้ คือ ความอ้วน ดังนั้นจะพบโรคนี้ในแมวที่มีน้ำหนักมากกว่า 6.8 กิโลกรัม และมีอายุมากกว่า 10 ปี โดย 50-60 เปอร์เซ็นต์ของแมวที่เป็นเบาหวาน จะเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีการตอบสนองต่ออินซูลินน้อย ทำให้กลูโคสในเลือดมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนเป็นอันตรายและก่อให้เกิดความเป็นพิษ (glucose toxicity) ดังนั้น การให้อินซูลินจากภายนอก ร่างกาย ในช่วงแรกของการรักษาจึงมีการตอบสนองที่ดีต่ออินซูลิน ทำให้กลูโคสในเลือดและ

ความเป็นพิษของกลูโคสต่อเซลล์เบต้าลดลง ดังนั้น ถ้าควบคุมระดับกลูโคสในเลือดให้ลดลงเป็นปกติก่อนที่เซลล์เบต้าจะเสื่อม แมวอาจหายป่วยจากโรคเบาหวานได้ [8]

3. อาการของสัตว์ที่เป็นโรคเบาหวาน

สัตว์ที่เป็นโรคเบาหวานจะมีอาการดังนี้

1. ปัสสาวะมากผิดปกติ (polyuria) เช่น สุนัข และแมว ต้องมีปัสสาวะมากกว่า 45 และ 40 มล./กก./วัน ตามลำดับ
2. กินน้ำมากผิดปกติ (polydipsia) เพราะ ร่างกายต้องขับระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงออกมาทางปัสสาวะทำให้สัตว์ต้องสูญเสียน้ำ กระจายน้ำมาก เช่น สุนัข และ แมว ต้องกินน้ำมากกว่า 90 และ 45 มล./กก./วัน ตามลำดับ [12]
3. กินอาหารมาก แต่น้ำหนักไม่เพิ่มขึ้น เนื่องจาก ร่างกายสูญเสียกลูโคสที่เป็นพลังงานของร่างกาย ทำให้สัตว์รู้สึกหิวและต้องการกินอาหารบ่อยมากขึ้น
4. ขาหลังอ่อนแรงและใช้หลังเท้าลงพื้น อ่อนเพลียขนมีลักษณะยุ่งเหยิง [8] ปวดท้อง [13] และ สูญเสียการมองเห็น เนื่องจาก โรคต่อกระจกที่มีโรคเบาหวานเป็นสาเหตุในม่าน
5. ติดเชื้อแบคทีเรียแทรกซ้อนบ่อยโดยเฉพาะในระบบทางเดินปัสสาวะ
6. มีภาวะเลือดเป็นกรด(ketoacidosis) ทำให้สัตว์ซึม ไม่กินอาหาร อาเจียน ท้องเสีย ร่างกายขาดน้ำและหายใจผิดปกติ [14]

4. สาเหตุของการเกิดโรคเบาหวาน

การเกิดโรคเบาหวานมีสาเหตุหลายประการ ดังนี้

1. พันธุกรรม เป็นสาเหตุหลักของโรคเบาหวาน ประมาณหนึ่งในสามของผู้ป่วยโรคเบาหวานมีประวัติคนในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน หรือนำสัตว์ที่มีแนวโน้มเป็นโรคเบาหวานมาเป็นพ่อ-แม่พันธุ์ เนื่องจาก ลักษณะยีนของการเป็นเบาหวานเป็นลักษณะทางพันธุกรรมที่สืบทอดผ่านโครโมโซมในนิวเคลียสของเซลล์ เช่นเดียวกับการสืบทอดของพันธุกรรมอื่นๆ เช่น หน้าตา รูปร่าง สีของดวงตาและการเป็นโรคต่างๆ
2. อายุ เมื่อคนหรือสัตว์มีอายุมากขึ้นตับอ่อนที่มีหน้าที่สังเคราะห์และผลิตฮอร์โมนอินซูลิน จะทำหน้าที่ได้ลดลงจึงเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานได้

3. ตับอ่อนไม่สมบูรณ์ เนื่องจาก ได้รับอุบัติเหตุที่มีผลกระทบต่อตับอ่อน รวมทั้งอาจเกิดจากโรคที่มีผลต่อตับอ่อน เช่น คนมีตับอ่อนอักเสบเรื้อรังจากการดื่มสุรามากเกินไป ซึ่งจำเป็นต้องผ่าตัดเอาบางส่วนของตับอ่อนออก หากบุคคลนั้นมีแนวโน้มว่าจะเป็นเบาหวานอยู่แล้ว เมื่อตกอยู่ในภาวะเช่นนี้จะแสดงอาการของโรคเบาหวานได้เร็วขึ้น

4. การติดเชื้อไวรัสบางชนิด โคที่ติดเชื้อ bovine viral diarrhea virus (BVDV) อาจเป็นเบาหวานได้ เพราะเชื้อไวรัสจะเข้าไปทำลายเซลล์เบต้า [15]

5. ยาบางชนิด ยาบางชนิดมีผลต่อการเกิดโรคเบาหวาน เนื่องจากทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อต้องใช้ติดต่อกันนานๆ เช่น เคทามีน (ketamine) กระตุ้นให้มีการหลั่งอิพิเนพรีน ทำให้เกิดกระบวนการไกลโคจีโนไลซิส และ ภาวะน้ำตาลสูงในเลือด ไชลาซีน และ เดโตมิดีน (xylazine and detomidine) สารนี้จะไปจับกับ α_2 -adrenergic receptors ที่อยู่ในเซลล์เบต้า จึงยับยั้งการหลั่งอินซูลินและลดการนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์ในเซลล์ตับ (hepatocytes) เซลล์กล้ามเนื้อ (myocytes) และเซลล์ไขมัน (adipocytes) โพรพรานอลอล (propranolol) และ β -adrenergic blocker จะยับยั้งการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้า และ โพรพรานอลอล อาจทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลิน มอร์ฟีน (morphines) อาจกระตุ้นการหลั่งโกรท ฮอร์โมน และฮอร์โมนอะดรีโนคอร์ติโคโทรปิกซึ่งจะทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง โดยผ่านทางกระบวนการต่างๆ มากมาย [16] กลูโคคอร์ติคอยด์ และโปรเจสเตอโรน จะเสริมฤทธิ์กันและเหนี่ยวนำให้สัตว์ที่ได้รับยา 2 ชนิดนี้เป็นโรคเบาหวานได้ [17]

6. ความอ้วน เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เซลล์ของร่างกายตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินลดลง จึงไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ ทำให้ร่างกายมีภาวะน้ำตาลสูงในเลือด

7. ภาวะการตั้งครรภ์ รกจะสังเคราะห์ฮอร์โมนหลายชนิดขึ้นมา เช่น ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone) ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) ซึ่งมีผลยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินสตรีและสัตว์เพศเมียที่ตั้งครรภ์ จึงเสี่ยงต่อการเกิดโรคเบาหวาน โดยเฉพาะรายที่มีอินซูลินอยู่ในร่างกาย และมีภาวะเบาหวานแทรกซ้อนในระหว่างตั้งครรภ์ ซึ่งเป็นอันตรายอย่างมากต่อสตรีและสัตว์ที่ตั้งครรภ์

8. ระยะเวลาเป็นสัด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่หลั่งออกมาจากคอร์ปัสลูเทียม (corpus luteum) กระตุ้นให้มีการหลั่งโกรท ฮอร์โมน จากเซลล์ในต่อมก้านสร้างน้ำนมเพิ่มขึ้น จึงทำให้การนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันลดลง เพราะ โกรท ฮอร์โมนทำให้ประสิทธิภาพของอินซูลินลดลง สัตว์จึงเป็นเบาหวานแบบชั่วคราว แต่เมื่อมีโปรเจสเตอโรนเป็นปัจจัยกระตุ้นภายในต่อเนื่องนานๆ ก็จะทำให้กลายเป็นเบาหวานแบบถาวรได้ พบได้ในสุนัขเพศเมียที่มีวงรอบการเป็นสัด

ปกติ มีอายุมาก และได้รับโปรเจสเทอโรน หรืออนุพันธ์ เพื่อควบคุมภาวะการเป็นสัดแบบชั่วคราว หรือ ถาวร ส่วนแมวเพศเมียที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 อาจเกิดจากการได้รับโปรเจสเทอโรนเพื่อควบคุมการเป็นสัด หรือรักษาโรคผิวหนัง เช่น โรค miliary dermatitis เป็นต้น [17]

9. ความเครียด ทำให้ร่างกายผลิต คีโตน (ketones) กรดไขมัน ยูเรีย และ ฮอริโมนที่เกิดจากความเครียด เช่น กลูคากอน กลูโคคอร์ติคอยด์ แคทีโคลามีนเพิ่มขึ้น ซึ่งจะต้านฤทธิ์ของ อินซูลิน [17] จึงมีส่วนทำลายกลไกการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่งผลให้เกิดกระบวนการกลูโคซิโอเจเนซิส มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน และจำนวนหรือประสิทธิภาพของ GLUT-4 ลดลง ทำให้สัตว์เพศผู้และเมียมีโอกาสเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้มากขึ้น

10. เพศ เช่น สุนัขเพศเมีย และ แมวเพศผู้ มีโอกาสเป็นโรคเบาหวานมากกว่าสุนัขและแมว ที่มีเพศตรงข้าม ตามลำดับ [13]

5. การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน

การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน ตามกลุ่มอาการและพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับกลไกการเกิดโรคและการตอบสนองต่อฮอริโมนอินซูลิน จึงแบ่งโรคเบาหวานในสัตว์ออกเป็น 2 ชนิด เหมือนในคน คือ

1.โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Insulin Dependent Diabetes Mellitus : IDDM) เกิดจาก เซลล์เบต้าถูก T-cell ทำลาย โดยเริ่มจาก macrophage จับกับแอนติเจนของเซลล์เบต้า และ T-cell ที่มีรีเซพเตอร์จำเพาะกับแอนติเจนของเซลล์เบต้าไปกระตุ้น T-helper cell ให้หลั่ง cytokine เช่น interferon gamma(IFN- γ) และสามารถกระตุ้น cytotoxic T cell ให้หลั่งสารจำพวก free radical เช่น superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide และ cytokine เช่น interleukin-1(IL-1), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) ซึ่งมีฤทธิ์ทำลายเซลล์เบต้า เมื่อเซลล์เบต้าถูกทำลายไปมากกว่า 80% และการทำลายก็ยังคงดำเนินต่อไป[18] สัตว์จึงมีระดับอินซูลินในพลาสมาต่ำ เนื่องจาก เซลล์เบต้ามีความบกพร่องในการหลั่งอินซูลินทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นเล็กน้อย (10 มิลลิโมลาร์) สัตว์จึงมีอาการกินน้ำและปัสสาวะมาก สัตว์ที่เป็นเบาหวานชนิดนี้มีการตอบสนองที่ดีต่ออินซูลินที่รักษา จึงทำให้ระดับกลูโคสในเลือดที่สูงลดต่ำลงเป็นปกติ

2.โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Non – Insulin Dependent Diabetes Mellitus : NIDDM) เกิดจากร่างกายมีภาวะดื้อต่ออินซูลินและ/หรือ มีความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน ภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้อินซูลินมีความสามารถนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ลดลง โดยเนื้อเยื่อที่เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน

ได้แก่ เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรักษาสมดุลของกลูโคสประกอบด้วย กล้ามเนื้อลาย เนื้อเยื่อไขมัน และตับ แต่เนื้อเยื่อที่สำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวาน ได้แก่ กล้ามเนื้อลาย ในคนปกติกล้ามเนื้อลายจะมีรีเซพเตอร์ของอินซูลิน เมื่ออินซูลินจับกับรีเซพเตอร์ จะกระตุ้นให้เกิด autophosphorylation ของ tyrosine kinase หลังจากนั้นจะไปกระตุ้น phospho-inositide-3 kinase และ kinase อื่นๆ ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 (GLUT-4) ไปที่ผิวเซลล์เพื่อนำกลูโคสเข้าเซลล์ได้ ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ พันธุกรรม ปริมาณและตำแหน่งของไขมันในร่างกาย อายุ การขาดการออกกำลังกาย และสภาพแวดล้อมในครรภ์มารดา ส่วนความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินนั้นเชื่อว่า พันธุกรรมจะเป็นตัวกำหนดปริมาณและการทำงานของเซลล์เบต้า หรืออาจเป็นไปได้ว่าความผิดปกติทางพันธุกรรมของเซลล์เบต้าเป็นตัวกำหนดให้เกิด apoptosis มากขึ้น จึงมีผลต่อการหลั่งและการทำงานของอินซูลิน [18] ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จึงต้องการอินซูลินในปริมาณที่มากกว่าปกติ หรือได้รับยาลดระดับน้ำตาลในเลือด หรือวิธีอื่นๆในการรักษา เพื่อให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลงมาอยู่ในเกณฑ์เป็นปกติ [10]

6. ตับอ่อนและฮอร์โมนที่ควบคุมระดับน้ำตาลในร่างกาย

จากการศึกษาของ Paul Langerhans นักศึกษาแพทย์ชาวเยอรมัน พบว่า มีกลุ่มเซลล์ชนิดพิเศษกระจายตัวอยู่ในตับอ่อน มีลักษณะคล้ายหมู่เกาะที่กระจายอยู่ จึงเรียกกลุ่มเซลล์นี้ว่า island หรือ islets แปลว่า หมู่เกาะ ต่อมาในวงการแพทย์จึงเรียกกลุ่มเซลล์นี้ตามชื่อผู้ค้นพบว่า Islets of Langerhans ในปี ค.ศ.1922 F.G.Banting และ C. H. Best นักวิทยาศาสตร์ชาวแคนาดา [19] ได้ศึกษาเรื่องของกลุ่มเซลล์ Islets of Langerhans ในตับอ่อน พบว่าเซลล์ดังกล่าวทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนบางอย่างและฮอร์โมนชนิดนั้นทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลในร่างกายให้กลายเป็นความร้อนและพลังงาน Banting และ Best เรียกฮอร์โมนที่ค้นพบว่า อินซูลิน (insulin) มาจากภาษาละตินว่า insula หมายถึง เกาะ และเป็นครั้งแรกที่วงการแพทย์รู้จัก ฮอร์โมนอินซูลิน และเป็นจุดเริ่มต้นของการหาสาเหตุของโรคเบาหวานโดยเริ่มจากตับอ่อนและอินซูลิน

ตับอ่อน เป็นต่อมขนาดใหญ่ที่อยู่หลังกระเพาะอาหาร ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์ 4 ชนิด คือ กลุ่มเซลล์อัลฟา (A-cell) ผลิตฮอร์โมนกลูคาγον มีหน้าที่สลายไกลโคเจนที่ร่างกายสะสมไว้ให้ออกมาเป็นน้ำตาล เพื่อเพิ่มปริมาณระดับน้ำตาลในเลือด ขณะที่ร่างกายขาดแคลนน้ำตาล

กลุ่มเซลล์เบต้า (B-cell) ผลิตฮอร์โมนอินซูลิน มีหน้าที่นำน้ำตาลจากกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ต่างๆ ของร่างกาย ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง โดยแบ่งเป็น 2 กรณี คือ ในกรณีปกติ ร่างกายจะหลั่งอินซูลินปริมาณเล็กน้อยในอัตราคงที่ 0.5 – 1.0 ยูนิต/ชั่วโมง เพื่อให้ร่างกายได้นำเอาพลังงานไปใช้ในกิจกรรมประจำวันต่างๆ เช่น ในกรณีหลังจากกินอาหารแล้วร่างกายจะหลั่งอินซูลินออกมาช่วยเมตาบอลิซึมคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน หรือ เมื่อตับหรือกล้ามเนื้อหลั่งกลูโคสออกมาอยู่ในกระแสเลือด โดยปกติร่างกายจะหลั่งอินซูลินออกมา 1 ยูนิต/คาร์โบไฮเดรต 10 กรัม เพื่อนำเอากลูโคสหรือสารอาหารอื่นๆ เข้าไปใช้เป็นพลังงานในเซลล์ หรือ เก็บอยู่ในรูปไขมัน ซึ่งระดับอินซูลินจะมีปริมาณสูงสุดภายใน 1 ชั่วโมงหลังจากกินอาหาร และทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นหลังกินอาหารกลับสู่ระดับปกติ ภายใน 2 ชั่วโมง และในกรณีที่ร่างกายมีความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดมากกว่า 100 มก/ดล. จะหลั่งอินซูลินออกมาเช่นกัน [9]

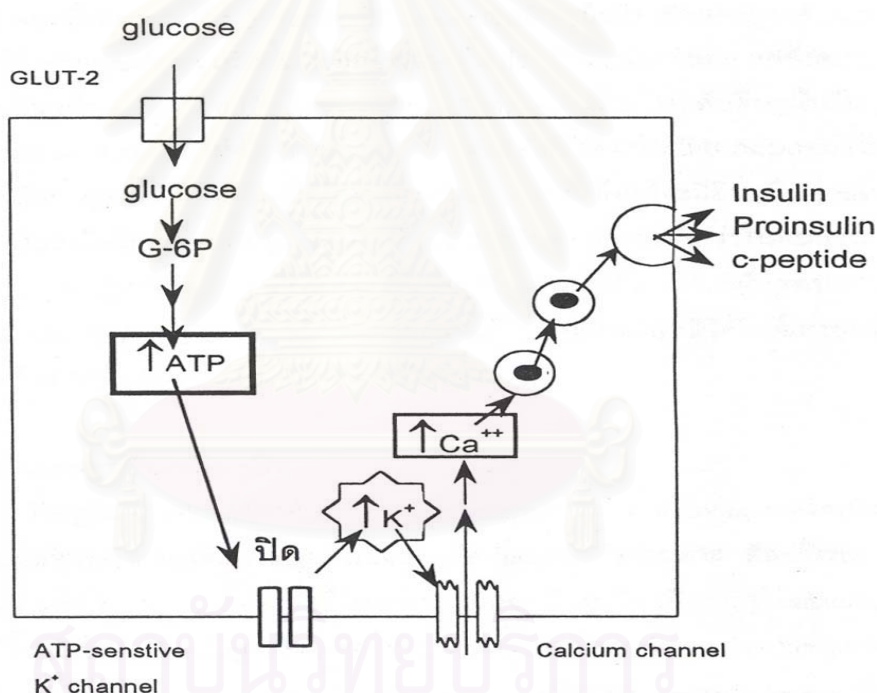
กลุ่มเซลล์เดลต้า (D-cell) ผลิตฮอร์โมนโซมาโตสแตติน (somatostatin) มีหน้าที่เป็น indirect paracrine role ในการยับยั้งการหลั่งอินซูลินและกลูคากอน

กลุ่มเซลล์เอฟ (F-cell) ผลิต pancreatic polypeptide ปัจจุบันยังไม่ทราบบทบาทและหน้าที่ [20]

7. การควบคุมการหลั่งอินซูลิน

ร่างกายมีกลไกที่จะควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ให้สูงหรือต่ำเกินไปทั้งระยะที่รับประทานอาหาร หรืออดอาหาร โดยฮอร์โมนต่างๆ และระบบประสาทอัตโนมัติร่วมกันออกฤทธิ์ปรับระดับน้ำตาลในเลือด ตัวอย่างเช่น ระยะอดอาหาร จะมีการกระตุ้นฮอร์โมนต่างๆ คือ กลูคากอน กลูโคคอร์ติคอยด์ โกรท ฮอร์โมน และแคทีโคลามีน พร้อมทั้งกระตุ้นประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติก ซึ่งร่วมกันปรับระดับน้ำตาลในเลือดให้สูงขึ้น ด้วยกลไกวิธีต่างๆ กัน กล่าวคือ ไกลโคเจน ทั้งที่ตับและกล้ามเนื้อจะถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส นอกจากนี้ยังเพิ่มการสร้างกลูโคสจากกรดอะมิโน (กลูโคนีโอเจเนซิส) และสร้างคีโตนเพิ่มขึ้นด้วย ส่วนกลูโคคอร์ติคอยด์นอกจากจะต้านฤทธิ์อินซูลินเช่นเดียวกับโกรทฮอร์โมน แล้วยังเพิ่มกลูโคนีโอเจเนซิสและเสริมฤทธิ์แคทีโคลามีน ในการสลายไกลโคเจนเป็นกลูโคสด้วย นอกจากนี้การที่ระบบประสาทอัตโนมัติซิมพาเทติกถูกกระตุ้นจะทำให้ผู้ที่อดอาหารหรือมีระดับน้ำตาลต่ำในเลือด มีอาการใจสั่น หรือหัวใจเต้นแรง เร็ว มีกลิ่นเหงื่อออกมากซึ่งเปรียบเสมือนเป็นสัญญาณเตือนว่าร่างกายขาดน้ำตาล ในทางตรงข้ามถ้ามีระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะอาศัยตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 2 (GLUT-2) นำกลูโคสจากภายนอกเซลล์เข้าสู่ภายใน

เซลล์เบต้า ทำให้ระดับ ATP ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ ATP-sensitive potassium channel ปิด ไปแต่สเต็มออกนอกเซลล์ได้น้อยลง จึงเกิดภาวะ depolarization ของเซลล์เบต้าทำให้ voltage-dependent calcium channels เปิด ยอมให้แคลเซียมเข้าเซลล์มากขึ้นและเมื่อระดับแคลเซียมภายในเซลล์สูงขึ้นมากพอจะทำให้หลั่งอินซูลินได้ (ภาพที่ 1) นอกจากนี้น้ำตาลกลูโคสแล้วยังมีน้ำตาลชนิดอื่น เช่น mannose กรดอะมิโนบางชนิด เช่น leucine, arginine, gut hormones เช่น gastrin, enteroglucagon (glucagon-like peptide-1, GLP1), secretin, cholecystokinin (CCK), vasoactive intestinal peptide (VIP), gastrin-releasing peptide เป็นต้น สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ และการกระตุ้น vagus nerve หรือ β_2 -adrenergic receptors จะเพิ่มการหลั่งอินซูลิน [3]



ภาพที่ 1 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยกลูโคส [3]

8. สรีรวิทยาของการควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในเลือดถูกควบคุมโดยฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวรับ และระบบการขนส่งไปสู่เซลล์เป้าหมาย ดังนี้

1. อินซูลินมีฤทธิ์ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลง เนื่องจากอินซูลินจะจับกับตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) ที่ผิวเซลล์ตรงบริเวณที่มีความจำเพาะเจาะจงและมีประสิทธิภาพสูงต่ออินซูลินโดยเฉพาะ คือ บริเวณ α -subunits ของตัวรับอินซูลินซึ่งยื่นออกมานอกเซลล์และเกี่ยวข้องกับ β -subunits ซึ่งมีส่วนที่ยื่นเข้าไปในเซลล์ และที่ส่วนหางจะมีเอนไซม์ tyrosine kinase อยู่เมื่ออินซูลินจับกับ α -subunits ของตัวรับอินซูลิน เอนไซม์ tyrosine kinase จะถูกกระตุ้นให้เกิด autophosphorylation ตรงส่วน β -subunits ส่งผลให้เกิดการเกาะกลุ่มของ $\alpha\beta$ -heterodimers เพิ่มขึ้น และหยุดการทำงานของ tyrosine kinase ของ β -subunits โปรตีนตัวแรกที่จะถูก phosphorylate คือ insulin receptor-substrate -1 (IRS-1) และ IRS-2 การ phosphorylate IRS-1 จะกระตุ้น GTPase และ proteins kinase ต่างๆที่มีบทบาทในการควบคุมการแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆหลายชนิดให้ทำงาน ส่วนการ phosphorylate IRS-2 จะกระตุ้น lipid kinase, PI-3 kinase และสร้าง inositol lipids ซึ่งอาจทำหน้าที่เป็น second messenger ไปกระตุ้น pathways ต่างๆ เช่น p70^{S6} kinase เช่น การเคลื่อนย้าย GLUT-4 ที่อยู่ในบริเวณที่ไม่สามารถทำงานได้ในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้ไปอยู่บริเวณขอบเซลล์ หลังจากได้รับอินซูลิน จากนั้น GLUT-4 จะถูกนำเข้าสู่เซลล์โดยการแตกหน่อ (budding) ของ clathrin-coated vesicles ออกจาก plasma membrane และนำเข้าไปเก็บใน vesicle ใหม่ ส่วน insulin-receptor complex จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อที่จะส่งไปยัง lysosome แล้วแยกอินซูลินออกจากตัวรับ และนำตัวรับกลับไปใช้ใหม่ (ภาพที่ 2) ดังนั้นอินซูลินจึงนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ประโยชน์หรือ เก็บไว้ในเซลล์ตับ (hepatocytes) เซลล์กล้ามเนื้อ (myocytes) และเซลล์ไขมัน (adipocytes) โดยการกระตุ้นเอนไซม์ในเซลล์ตับให้ทำงานเพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นไกลโคเจน (glycogen synthesis) หรือ ลดการเกิดกลูโคเนโอเจเนซิส ส่วนการขนส่งกลูโคสเข้าไปในเซลล์ประสาท (neurons) เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) และเกล็ดเลือด (platelets) ไม่จำเป็นต้องอาศัยอินซูลิน

2. กลูโคสจะเข้าสู่เซลล์โดยผ่านทางกลุ่มโปรตีน ที่เรียกว่าตัวขนส่งกลูโคส (glucose transporters, GLUT-1 ถึง GLUT-7) เช่น อินซูลินจะนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันโดยผ่านทาง GLUT-4 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคสแสดงในตารางที่ 1

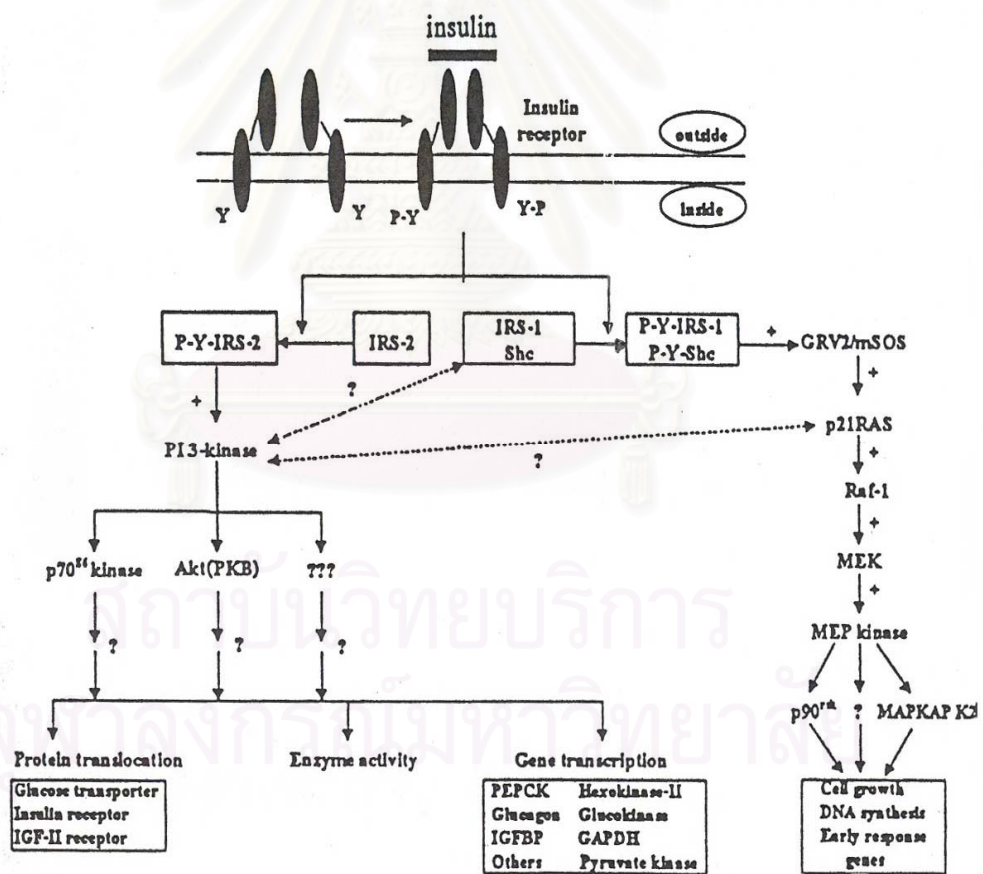
3. กลูคาγον กระตุ้นให้เกิดกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส และกลูโคซิโนไลซิส (glucogenolysis) ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น

4. แคทีโกลามีน มีผลต่อความเข้มข้นของกลูโคสในเลือด ผ่านกลไกต่าง ๆ ดังนี้

1) α_1 - adrenergic กระตุ้นต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) ให้หลั่ง

โกรทฮอร์โมน เพิ่มขึ้น

- 2) α_2 – adrenergic กระตุ้นเซลล์เบต้าในตับอ่อนทำให้การหลั่งอินซูลินลดลง
ดังนั้น การนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์ในเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันจึงลดลง
- 3) β_1 – adrenergic กระตุ้นเซลล์เบต้าในตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้น
- 4) β_2 – adrenergic กระตุ้นเซลล์ตับให้เกิดกระบวนการกลูโคจีนโไลซิสเพิ่มขึ้น
- 5) โกรทฮอร์โมน หรือ โซมาโตโทรปิน (somatotropin) ทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น เนื่องจากการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันลดลง
- 6) คอร์ติซอล (cortisol) มีฤทธิ์ทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดเพิ่มขึ้น โดยกระตุ้นให้เกิดกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิสและการดื้อต่อกลูโคส

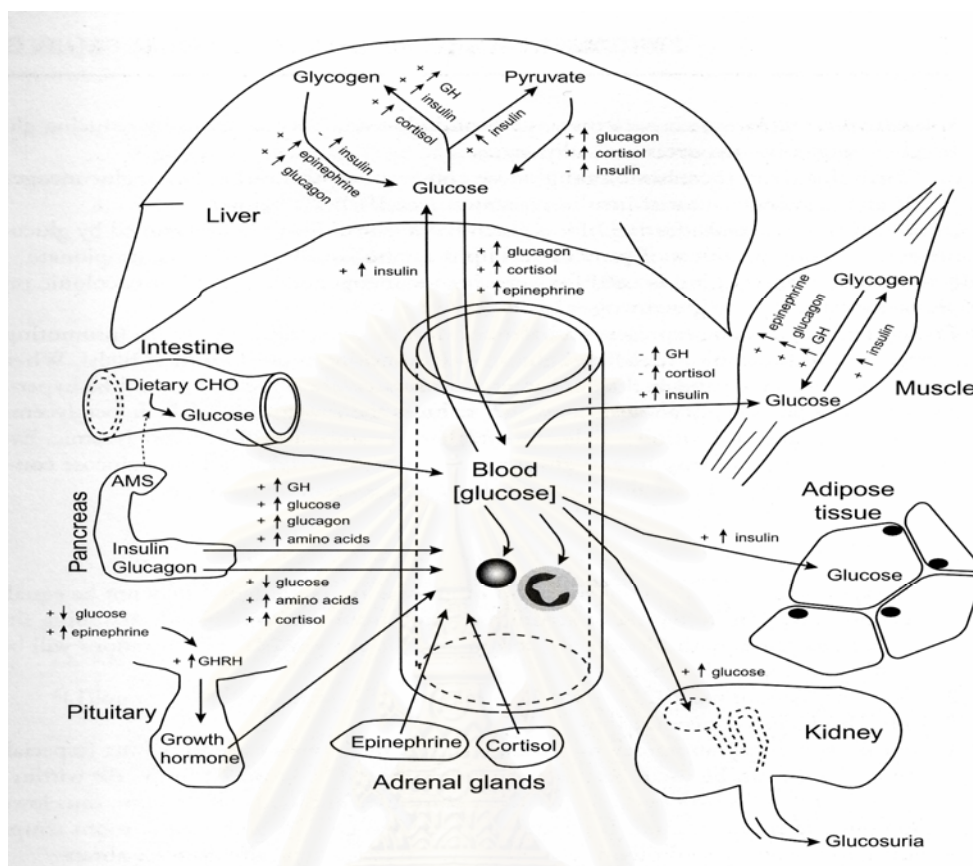


ภาพที่ 2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของอินซูลิน [3]

ตารางที่ 1 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส [3,18]

ชนิด	เนื้อเยื่อ	หน้าที่
GLUT-1	เนื้อเยื่อทุกชนิดโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดง สมอง	นำกลูโคสผ่านblood brain barrier
GLUT-2	เซลล์เบต้าของตับอ่อน ตับ ไต ทางเดิน อาหาร	ควบคุมการหลังอินซูลิน และสมดุล ของกลูโคส
GLUT-3	สมอง ไต รก เนื้อเยื่ออื่นๆ	นำกลูโคสเข้าเซลล์
GLUT-4	กล้ามเนื้อ เนื้อเยื่อไขมัน	นำกลูโคสเข้าเซลล์ โดยการกระตุ้น ของอินซูลิน
GLUT-5	ทางเดินอาหาร ไต	ดูดซึมฟรุคโตส
GLUT-7	ตับ เนื้อเยื่ออื่นๆที่สร้างกลูโคสได้	ควบคุมการไหลผ่านของกลูโคสเข้า endoplasmic reticulum membrane

ในสัตว์กระเพาะเดี่ยว ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดขณะอดอาหารจะถูกควบคุมโดยกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส ซึ่งต้องใช้ผลผลิตจากกระบวนการสลายโปรตีนและไขมัน ส่วนในสัตว์กระเพาะรวม มีการหมักอาหารในกระเพาะรูเมน และทำให้เกิดโพรพิโอเนต (propionate) ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิสในตับ แต่ในม้ามีการเกิดโพรพิโอเนตในลำไส้ใหญ่ (colonic propionate) และถูกนำไปใช้ในกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส ดังนั้นความเข้มข้นของกลูโคสปกติในช่วงอดอาหาร จะถูกควบคุมให้สมดุลโดยอาศัยฤทธิ์ของอินซูลิน (ทำหน้าที่เก็บ และนำกลูโคสไปใช้ประโยชน์) และ กลูคาγον (กระตุ้นให้มีการนำกลูโคสที่เก็บไว้มาใช้เป็นพลังงาน) ถ้าเกิดความไม่สมดุล มีการนำกลูโคสที่เก็บไว้มาใช้เป็นพลังงานมากเกินไป สัตว์จะเกิดภาวะน้ำตาลสูงในเลือด และมีการขับกลูโคสออกทางปัสสาวะ เพื่อลดความเข้มข้นของกลูโคสในเลือด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ปัจจัยทางสรีรวิทยาที่มีผลต่อความเข้มข้นของกลูโคสในเลือด [16]

9. อินซูลินที่ใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

ฮอร์โมนอินซูลินเป็นโปรตีนที่มี 2 สาย คือ สาย เอ และ บี มีกรดอะมิโน 21 และ 30 ตัวตามลำดับ เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) อินซูลินของสัตว์แต่ละชนิด จะมีกรดอะมิโนไม่เหมือนกัน เช่น อินซูลินของ สุนัข และสุกร จะมีโครงสร้างเหมือนกัน อินซูลินของแกะเหมือนกับอินซูลินของแพะ ส่วนอินซูลินของโค แกะ ม้า และสุนัข จะมีกรดอะมิโนในตำแหน่งที่ 8, 9 และ 10 ในสาย เอ ที่แตกต่างกัน อินซูลินของสุกรมีอะลานีน (alanine) อยู่ ณ ตำแหน่งที่ 30 ตรงส่วนของ carboxy terminal ในสาย บี แต่จะถูกแทนที่ด้วยทรีโอนีน (threonine) เมื่อเป็นอินซูลินของคน แต่อินซูลินของโค จะมี อะลานีน และ วาลีน (valine) เข้าไปแทนที่ ทรีโอนีน และ ไอโซลิวซีน (isoleucine) ในตำแหน่งที่ 8 และ 10 ในสาย เอ ตามลำดับ ส่วนอินซูลินของสัตว์ตระกูลแมว มีลักษณะคล้ายอินซูลินของโคแตกต่างกันที่กรดอะมิโน ณ ตำแหน่งที่ 18 ของสาย เอ

อินซูลินที่หลั่งมาจากในร่างกาย (endogenous insulin) หรือได้รับจากภายนอก (exogenous insulin) มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาโดยจะจับกับตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และเป็นฮอร์โมนตัวแรกที่ควบคุมการนำสารอาหารเข้าเซลล์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ และเก็บไว้ในเซลล์ อินซูลินกระตุ้นให้เกิดเมตะบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตที่หัวใจ กล้ามเนื้อลาย และเนื้อเยื่อไขมันเพื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ยังมีผลโดยตรงต่อเมตะบอลิซึมของไขมัน และโปรตีน กระตุ้นให้เกิดการสร้างไขมัน (lipogenesis), เพิ่มการสร้างโปรตีนยับยั้งการสลายไขมัน (lipolysis) การปล่อยกรดไขมันอิสระออกจากเนื้อเยื่อไขมัน ส่งเสริมให้เกิดการแลกเปลี่ยนของโปแตสเซียมและแมกนีเซียมภายในเซลล์ และเปลี่ยนกลูโคสเป็นไกลโคเจนในตับ อินซูลินส่วนใหญ่ถูกเมตะบอลิซึมที่ตับและไต แต่มีส่วเล็กน้อยถูกเมตะบอลิซึมที่กล้ามเนื้อและไขมัน หรือถูกเอนไซม์เปลี่ยนให้อยู่ในรูปของเปปไทด์และกรดอะมิโน อินซูลินที่ผ่านเข้าสู่ตับทางเส้นเลือดดำพอร์ทัล (portal vein) จะถูกทำลายประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์และส่วนที่เหลือไม่เกิน 50 เปอร์เซ็นต์ถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิต นอกจากนี้อินซูลินยังถูกกรองโดย renal glomeruli และถูกดูดกลับทางท่อไต ดังนั้น ถ้าไตทำงานไม่ได้จะมีผลต่ออัตราการกำจัดอินซูลินที่อยู่ในกระแสเลือดมากกว่าภาวะที่เกิดโรคตับ

อินซูลินมีค่าเภสัชจลนศาสตร์ที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดและการดำเนินชีวิตของสัตว์ในแต่ละวัน ดังนั้น สามารถจำแนกชนิดของอินซูลินตามระยะเวลาที่ออกฤทธิ์และชนิดของสัตว์ที่ผลิตหรือใช้อินซูลิน ได้ 3 ประเภท คือ (ตารางที่ 2)

1. ประเภทออกฤทธิ์เร็ว ได้แก่

- Regular insulin injection มีส่วนผสมของซิงค์คลอไรด์ (zinc chlorides) อยู่ในรูปผลึกใส ไม่มีสี เหมาะสำหรับสัตว์ที่เป็นเบาหวานแต่มีอาการคงที่ หรือ diabetic ketoacidosis หรือ diabetic coma หรืออยู่ในภาวะช็อค หรือมีภาวะหัวใจและหลอดเลือดตีบ (cardiovascular collapse) หรือมีภาวะโปแตสเซียมสูงในเลือด (life-threatening hyperkalemia; > 8.0 mEq/L) ซึ่งเป็นพิษต่อหัวใจ ใช้ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ กล้ามเนื้อ และใต้ผิวหนัง

- Insulin lispro (rapid-acting insulin) ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เร็วกว่าอินซูลินปกติ ลดการเกิดภาวะ hypoglycemia ได้ 20 – 30 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ยานานกว่า 10 ปี สามารถลดระดับของ HbA_{1c} ได้ 7.2 - 8.9 เปอร์เซ็นต์ [21]

2. ประเภทออกฤทธิ์เร็วปานกลาง ได้แก่

- Isophane insulin suspension (NPH) มีส่วนผสมของซิงค์คลอไรด์ และโปรตามีนซัลเฟต (protamine sulfate) เป็นผลึกรูปแท่ง สีขาวเหมือนนํ้านม (milky) อยู่ในน้ำที่มีฤทธิ์เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง

- Lente insulin suspension เป็นซิงค์อินซูลินที่มีอัตราส่วนผสมของ semilente ต่อ ultralente เท่ากับ 30 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เป็นผลึกสีขาวเหมือนนํ้านม ใช้ฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง อินซูลินของสูตรในกลุ่มนี้เมื่อนำมาฉีดในสุนัข จะมีความเข้มข้นของอินซูลินในซีรัมสูงสุดที่เวลาประมาณ 4 และ 11 ชั่วโมง หลังจากฉีดอินซูลิน [22]

3. ประเภทออกฤทธิ์นาน ปริมาณที่ใช้อาจมีขนาดสูงมากถึง 2 ยูนิต เพราะถูกดูดซึมช้า ประสิทธิภาพต่ำ ได้แก่

- Ultralente suspension เป็นอินซูลินที่ละลายน้ำไม่ได้ และเป็นผลึกซิงค์อินซูลินที่มีขนาดใหญ่แล้วนำมาละลายด้วยโซเดียมอะซิเตรท (sodium acetate) หรือ โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride) ใช้มากในสุนัขและแมว

- Protamine zinc suspension (PZI) เป็นอินซูลินผสมระหว่างอินซูลินของโคและสุกร ในอัตราส่วน 90 ต่อ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สีเหมือนนํ้าผสมนม ถูกดูดซึมช้าๆ ในเนื้อเยื่อ ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

- Insulin glargine injection ถูกสร้างขึ้นโดยใช้เทคนิคการรวมดีเอ็นเอของ *Escherichia coli* ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค กับ อินซูลินของคน (human insulin) ทำให้แอสพาราจีน (asparagine) ที่ตำแหน่ง 21 ของสายเอ ถูกแทนที่ด้วยไกลซีน (glycine) และเพิ่มอาร์จีนีน 2 ตัวตรงส่วนของ C-terminal ของสาย บี ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง

อินซูลินส่วนมากถูกฉีดเข้าใต้ผิวหนังบริเวณด้านข้างของลำตัวระหว่างช่องท้องและช่องอก เนื่องจาก ถูกดูดซึมได้เร็วมาก สำหรับการฉีดเข้าบริเวณขาการดูดซึมจะขึ้นกับการออกกำลังกายและการเคลื่อนไหวของขา ส่วนบริเวณคอเป็นตำแหน่งที่ฉีดอินซูลินได้สะดวกแต่ความไวต่ออินซูลินจะลดลง เพราะเป็นบริเวณที่เกิดไฟโบรซิสได้ง่าย และขาดเลือดมาเลี้ยง จึงมีผลต่อการดูดซึมของอินซูลินเข้าสู่ร่างกาย ขนาดของความเข้มข้นอินซูลินที่ใช้ในการรักษามีหน่วยเป็น ยูนิต (unit) โดย 1 ยูนิตของอินซูลิน หมายถึง ปริมาณของอินซูลินที่สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกระต่ายหลังอดอาหารได้ 45 มก./ดล. (2.5 มิลลิโมลาร์) ส่วนอินซูลินของคนที่มีจำหน่ายในสหรัฐอเมริกา จะเตรียมเป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 100 ยูนิต/มล. (มีอินซูลิน 3.6 มก./มล. ดังนั้น อินซูลิน 1 ยูนิต มีอินซูลินเท่ากับ 36 ไมโครกรัม)

ตารางที่ 2 แสดง ชนิด แหล่งที่มา ความเข้มข้น และระยะเวลาที่ออกฤทธิ์ของอินซูลินที่ใช้ในสุนัข และแมว [ดัดแปลงมาจาก 22,23]

เวลาออกฤทธิ์	แหล่งที่มา	ความเข้มข้น (ยูนิต/ มล.)	ระยะเวลา ออก ฤทธิ์ (ชม.)	เริ่ม ออก ฤทธิ์ (ชม.)	ออกฤทธิ์ มาก ที่สุด (ชม.)	หมด ฤทธิ์ ภายใน (ชม.)
ออกฤทธิ์เร็ว						
1.Regular (Humulin R)	Human recombinant	100	1-4	0.5-1	2-3	4-6
2.Regular (Iletin I)	Beef/pork	100	1-4	0.5-1	2-3	4-6
ออกฤทธิ์ปานกลาง						
1.NPH(Humulin)	Human recombinant	100	4-24	2-4	4-10	14-18
2.NPH (Iletin I)	Beef/pork	100	4-24	2-4	4-10	14-18
3.NPH (Iletin II)	Pork	100	4-24	2-4	4-10	14-18
4.NPH (Anilin)	Beef/pork	40	4-24	2-4	4-10	14-18
5.Lente(Humulin)	Human recombinant	100	6-24	3-4	4-12	16-20
6.Lente (Iletin I)	Beef/pork	100	6-24	3-4	4-12	16-20
7.Lente (Iletin II)	Pork	100	6-24	3-4	4-12	16-20
ออกฤทธิ์นาน						
1.Humulin- Ultralente	Human recombinant	100	8-28	6-10	minimal	20-30
2.Protamine zinc	Beef/pork	40	12-24	-	-	-

10. ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทาน

ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทาน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

10.1 ยากลุ่มการหลั่งอินซูลิน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

10.1.1 ซัลโฟนิลยูเรีย (sulfonylureas) เป็นยาชนิดที่ 1 ของกลุ่มนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1945 โดย Janbon พบว่า ยาปฏิชีวนะ ชื่อ sulphamide สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ และ Loubatiere เป็นผู้ค้นพบว่า sulphamide มีกลไกการออกฤทธิ์ คือ กระตุ้นเซลล์เบต้าของตับอ่อนที่ไวต่อกลูโคสให้หลั่งอินซูลิน โดยจับตัวกับบนผนังเซลล์ที่อยู่ใกล้ประตูโปแตสเซียม (potassium channels) เรียกว่า ตัวรับซัลโฟนิลยูเรีย (sulfonylurea receptor, SUR) SUR จะยับยั้ง ATP - sensitive K^+ channels ไม่ให้ปล่อยโปแตสเซียมออกไปนอกเซลล์ จึงมีโปแตสเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น จนเกิดภาวะ depolarization ทำให้ voltage-dependent calcium channels เปิด Ca^{2+} จากภายนอกเซลล์เข้ามาภายในเซลล์เพิ่มขึ้นและกระตุ้นให้แกรนูลที่มี preinsulin ปล่อยอินซูลินออกมา นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม P450 ในตับและลดการหลั่งกลูคากอน [24] ทำให้เนื้อเยื่อเป้าหมายมีความไวต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น เนื่องจาก ซัลโฟนิลยูเรียเป็นยาที่ให้โดยการกินจึงจับกับพลาสมาโปรตีนและมีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 5-10 ชั่วโมง ยกเว้น chlorpropamide และ carbutamide มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 30 ชั่วโมง ยากลุ่มนี้ถูกเมตาบอลิซึมที่ตับ ยาซัลโฟนิลยูเรียรุ่นที่ 1 ได้แก่ tolbutamide, chlorpropamide และ carbutamide ส่วนรุ่นที่ 2 ได้แก่ glipizide, glibenclamide, gliclazide, glibomuride และ glimepiride มีฤทธิ์แรงกว่ารุ่นที่ 1

Chlorpropamide, acetazolamide, tolazamide, glyburide หรือ glipizide สามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือดได้โดยกระตุ้นให้ตับอ่อนหลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้นจนอาจเกิดภาวะ pancreatic amyloidosis และลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ลดระดับของ HbA_{1c} ได้ 1 เปอร์เซ็นต์ [21] ซึ่งใช้ได้ผลดีกับผู้ป่วยหลายราย แต่ในขณะที่ผู้ป่วยได้รับยาต้องควบคุมอาหารตามที่แพทย์สั่งเพื่อหลีกเลี่ยงภาวะน้ำตาลต่ำในเลือด เพราะยานี้สามารถจับกับโปรตีนและอาจถูกแทนที่ด้วยยาอื่นตรงตำแหน่งที่จับกับโปรตีนในเลือดได้เป็นอย่างดี เช่น ยากลุ่มต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ จึงทำให้มียาซัลโฟนิลยูเรียอิสระเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยาลดการหลั่งกรดอาจทำให้ยาซัลโฟนิลยูเรียถูกดูดซึมเพิ่มขึ้น จึงเสี่ยงต่อการเกิดภาวะน้ำตาลต่ำในเลือด และอาจเกิดผลข้างเคียงต่อระบบทางเดินอาหาร เช่น ท้องเสีย ท้องผูก และท้องอืด แต่อาการข้างเคียงจะลดลงถ้ารับประทานยาร่วมกับอาหาร

Glipizide ใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือดของแมวที่เป็นโรคเบาหวาน โดยปกติไม่ค่อยเกิดผลข้างเคียง แต่อาจทำให้อาเจียน ไม่กินอาหาร และทำลายตับได้ ถ้าหลังจากใช้ยา 1-2 เดือนเกิดมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง หรือ เกิดภาวะ ketoacidosis ให้หยุดใช้ยา [14] ขนาดของ glipizide ที่แนะนำ คือ 2.5 – 5.0 มก.ต่อตัว วันละ 2 ครั้ง หรือ ให้ glimeperide ขนาด 1-2 มก.ต่อตัว วันละครั้ง เป็นเวลา 2-3 เดือน หากไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดให้ต่ำกว่า 200 มก./ดล.ได้ ให้หยุดใช้ยา

10.1.2 Non sulfonylurea secretagogue เป็นสารประกอบที่ไม่มีกลุ่ม sulphamides อยู่ร่วมด้วย เช่น nateglinide และ repaglinide มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้เร็ว และช้ากว่ายากกลุ่มซัลโฟนิลยูเรีย ตามลำดับ ต้องให้กินก่อนอาหารเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาภาวะน้ำตาลสูงในเลือดหลังรับประทานอาหาร

Nateglinide เป็นยาสำหรับเบาหวานชนิดใหม่ที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (FDA) อนุญาตให้ใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 สามารถกระตุ้นตับอ่อนให้หลั่งและหยุดหลั่งอินซูลินอย่างรวดเร็ว เพราะปริมาณอินซูลินในระดับสูงทำให้เซลล์ร่างกายได้รับปริมาณน้ำตาลมากเกินไป จึงช่วยควบคุมระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหารและลดปัญหา ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำได้

Repaglinide ทำงานคล้าย sulfonylureas คือ กระตุ้นตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้น แต่มีฤทธิ์น้อยกว่าและถูกเมตาบอไลซ์ด้วยเอนไซม์ไซโตโครม P450 3A4 [24]

10.2 ยาที่เพิ่มฤทธิ์ของอินซูลิน แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

10.2.1 ยากลุ่ม biguanide เป็นยาที่ช่วยลดการสร้างกลูโคสจากตับ และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลิน ดังนั้นร่างกายจึงนำกลูโคสไปใช้เพิ่มขึ้น ยาในกลุ่มนี้ประกอบด้วย phenformin, metformin และ buformin โดยประเทศไทยจะใช้เฉพาะยาเมทฟอร์มิน (metformin) รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เท่านั้น เนื่องจากทำให้เกิดภาวะ lacticacidosis น้อยกว่า phenformin ระดับของ HbA_{1c} ลดลง 1-2 เปอร์เซ็นต์ และในช่วง 1-2 ปีแรกที่รับประทานจะมีอาการเบื่ออาหารและน้ำหนักลดลง 1-2 กก. [21] ปกติยาจะถูกขับออกทางปัสสาวะทั้งหมด ยกเว้นเมื่อให้ร่วมกับยา cimetidine ยากลุ่มนี้จะถูกยับยั้งการขับออกทางท่อไต [24] ผลข้างเคียงที่พบคือ ท้องอืด ท้องเฟ้อ แน่นท้อง จนถึงขั้นท้องเสีย ขึ้นอยู่กับปริมาณยาที่รับประทาน ห้ามใช้ยาในผู้ป่วยโรคตับ ไต และ หัวใจล้มเหลว [21]

10.2.2 ยาในกลุ่ม thiazolidinediones derivatives ยาชนิดนี้ไม่มีฤทธิ์ต่อตับอ่อน แต่ทำหน้าที่เพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของอินซูลินที่ตับอ่อนหลั่งออกมา ลดภาวะ

ด้านอินซูลินในร่างกาย ยาตัวแรกในกลุ่มนี้คือ glitazone ที่ผลิตออกจำหน่ายรุ่นแรก ต่อมาเรียกว่า troglitazone มีผลข้างเคียงต่อดับ ถูกเมตะบอลไลซ์ด้วยเอนไซม์ไซโตโครม P450 3A4 และทำปฏิกิริยากับยา ไซโคลสปอริน (cyclosporin) และยากุมกำเนิดชนิดเม็ด [24] กระตุ้นการทำงานของตัวรับพีพีเออาร์แกมมา (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma ; PPAR γ) มีรูปร่างเป็น heterodimer กับตัวรับเรตินอล ทำให้การแปลรหัสของยีน และการสังเคราะห์โปรตีน มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งมีผลต่อการเมตะบอลิซึมของกลูโคสและกรดไขมันอิสระ กระตุ้นให้เซลล์ไขมัน (adipocytes) ปล่อยอะดิโปเนคติน (adiponectin) ออกมา ในเวลาต่อมาได้มีการพัฒนาายากลุ่มนี้เป็นรุ่นที่สอง คือ rosiglitazone และ pioglitazone ไม่มีผลข้างเคียงต่อดับแต่อย่างใด อาการข้างเคียงที่ต้องระวังของการใช้ยาในกลุ่มนี้ คือ การมีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น เพราะอาจเกิดปัญหาไขมันสะสมในร่างกาย และควรระวังเป็นพิเศษสำหรับผู้ป่วยโรคหัวใจที่มีปัญหาด้านการทำงานของหัวใจ ปกติยาในกลุ่มนี้ใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยให้ร่วมกับเมทฟอร์มิน หรือ ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มซัลโฟนิลยูเรีย

10.3 ยาที่ใช้ลดระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหาร

10.3.1 Alpha-Glucosidase inhibitors ยาในกลุ่มนี้จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่อยู่ตรงบริเวณบริชบอร์ด (brush border) ของลำไส้ ทำหน้าที่ดึงน้ำ (hydrolysis) ออกจากแป้ง น้ำตาลหลายโมเลกุล (oligosaccharides) และน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharides) จึงช่วยชะลอการย่อย การดูดซึม น้ำตาลและแป้งในลำไส้ ลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหาร (postprandial hyperglycemia ; PPHG) และลดภาวะดื้อต่อน้ำตาลกลูโคส [25] ยาในกลุ่มนี้มี 2 ตัว คือ อะคาร์โบส (acarbose) และ มิกลิตอล (miglitol) หรือ อิมิกลิเตต (emigliate)

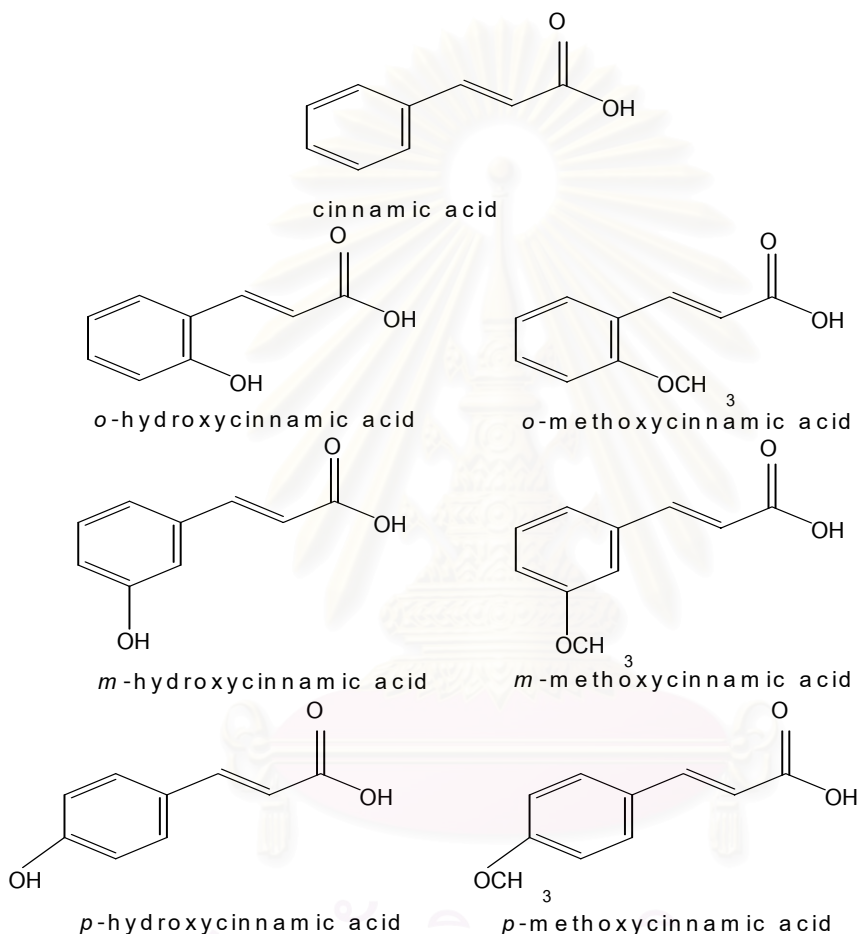
อะคาร์โบสได้มาจากขบวนการหมักเชื้อจุลินทรีย์ ชื่อ *Actinoplanes utahensis* [26] มีคุณสมบัติทางเคมีเป็นสารประกอบเชิงซ้อนโอลิโกแซคคาไรด์ เป็นผงสีขาว ละลายน้ำ มีค่า pKa เท่ากับ 5.1 [27] ถูกดูดซึมเพียงเล็กน้อยตรงทางเดินอาหาร อะคาร์โบสสามารถจับและยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและแอลฟา-กลูโคซิเดส ตรงเมมเบรนของลำไส้แบบแข่งขัน ได้แก่ เอนไซม์ glucoamylase, dextrinase, isomaltase, maltase และ sucrase แต่ไม่มีผลต่อ lactase จึงคาดว่า ทำให้เกิดภาวะดื้อต่อน้ำตาลแลคโตสและถูกยับยั้งการทำงานโดยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส (amylase) หรือเอนไซม์อื่นๆ เอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่ช่วยย่อยคาร์โบไฮเดรต น้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น ซูโครส โพลีแซคคาไรด์ขนาด 10-3,000 โมเลกุล เช่น แป้ง ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส และ ฟรุคโตส ตรงบริเวณลำไส้

ส่วนต้น แล้วถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายตรงบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum) เนื่องจาก อะคาร์โบสยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ทำให้คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดช้าลง ระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารเช้าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ภาวะอินซูลินสูงในเลือดหลังรับประทานอาหารเช้าลดลง 20-30 เปอร์เซ็นต์ ตรงข้ามกับผู้ป่วยที่ได้รับยาซัลโฟนิลยูเรียจะมีระดับไตรกลีเซอไรด์เพิ่มขึ้น เนื่องจากน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น และหลังรับประทานอาหารเช้าอินซูลินในเลือดเพิ่มขึ้นมากกว่า 100 เปอร์เซ็นต์ โดยยาไม่มีผลต่อตัวขนส่งกลูโคสผ่านทางโซเดียมอิออน (sodium ion-dependent glucose transporter) ดังนั้น จึงไม่มีผลต่อการดูดซึมกลูโคสที่ให้โดยการกิน ในสุนัขและคน อะคาร์โบสจะถูกดูดซึมตรงทางเดินอาหาร ประมาณ 4 และ 2 เปอร์เซ็นต์ของขนาดที่กิน ตามลำดับ ยาถูกดูดซึมและขับออกทางไต แต่มียาบางส่วนที่อยู่ในกระเพาะจะถูกเมตาบอลิซึมโดยแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ คนไข้ที่มีปัญหาไตวายอย่างรุนแรง จะตรวจพบยาในซีรัมประมาณ 5 เท่าของคนปกติ [27] ในสุนัขที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ได้ ให้เริ่มกินอะคาร์โบส ขนาด 25 มก.ต่อตัวก่อนอาหาร ทุก 12 ชั่วโมง ถ้าสุนัขมีน้ำหนักมากกว่า 25 กก. อาจเพิ่มขนาดเป็น 50 และ 100 มก. ร่วมกับการให้อินซูลินและการควบคุมอาหาร แต่ต้องระวังไม่ให้เกิดอาการท้องเสีย ส่วนแมวให้กินอะคาร์โบส ขนาด 12.5 มก.ต่อตัว พร้อมอาหาร วันละ 2 ครั้ง ร่วมกับการลดปริมาณของอินซูลินและยาลดน้ำตาลจากปริมาณปกติที่ใช้ แต่บางท่านอาจให้อะคาร์โบสขนาด 12.5 – 20 มก.ต่อมื้ออาหารแก่สุนัขและแมว [27] นอกจากนี้ยังพบว่าการให้อะคาร์โบสขนาด 25 และ 200 มก. วันละ 3 เวลา พร้อมอาหาร สามารถลด HbA_{1c} ได้ 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับยาอะคาร์โบส ขนาด 300 มก.ต่อวัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารเช้า 1 ชั่วโมง ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อใช้ยาวนานกว่า 3 เดือน จะมีอาการข้างเคียง คือ ทำให้ผู้ป่วยประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ มีแก๊สในกระเพาะ 16.7 เปอร์เซ็นต์ ท้องอืด [28] ท้องเสีย [29] และ ตับอักเสบ [30]

มิกลิทอลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสเหมือนอะคาร์โบสแต่จะถูกดูดซึมตรงทางเดินอาหารและมีค่า bioavailability มากถึง 90 เปอร์เซ็นต์ เมื่อถูกดูดซึมส่วนมากจะเข้าไปอยู่ในช่องว่างภายนอกเซลล์ ไม่ถูกเมตาบอลิซึม และกำจัดออกทางไต มิกลิทอลไม่มีฤทธิ์ต่อเอนไซม์ α - amylase แต่ยับยั้งเอนไซม์ α - glucosidase ที่ลำไส้ ต่างกับ อะคาร์โบสตรงที่ไม่ยับยั้งการทำงานของ pancreatic amylase และถูกดูดซึมจากลำไส้ได้เกือบทั้งหมด ยานี้ยับยั้งเอนไซม์ sucrase > glucoamylase > isomaltase > lactase > trehalase และมีฤทธิ์แรงกว่าอะคาร์โบส [3] สามารถใช้ยากลุ่มนี้ชนิดเดียวรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือให้ร่วมกับยารักษาเบาหวานชนิดอื่นๆก็ได้

11. ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับกรดซินนามิกและอนุพันธ์

11.1 สูตรโครงสร้างทางเคมี



ภาพที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ [31]

11.2 คุณลักษณะทางเคมีและฟิสิกส์

กรดซินนามิก (cinnamic acid or cinnamyllic acid ; C₉H₈CH:CHCOOH) มีชื่อเหมือนคือกรดฟีนิลอะคริลิก หรือ (*E*)-3-phenylprop-2-enoic acid หรือ กรดเบตา-ฟีนิลอะคริลิก [32] เป็นอนุพันธ์ของฟีนิลอะลานีน (phenylalanine) สกัดได้จากพืช หรือ สังเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ หรือ โรงงานเคมี น้ำหนักมวลโมเลกุล 148.064 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 133 องศาเซลเซียส จุด

เดือด 300 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นผลึกไม่มีสีและกลิ่น ละลายในแอลกอฮอล์และน้ำ แต่ละลายในน้ำได้น้อยเพียง 1 ใน 3,500 ส่วน [33]

o-hydroxycinnamic acid ($C_9H_8O_3$) มีชื่อเหมือน คือ *o*-coumaric acid มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 164.16 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 217 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 97 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นของแข็ง มีสีขาวยุติ [34]

m-hydroxycinnamic acid ($C_9H_8O_3$) มีชื่อเหมือน คือ *m*-coumaric acid มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 164.16 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 189 - 192 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 99 เปอร์เซ็นต์ เป็นของแข็ง มีสีเหลืองอมชมพู [35]

p-hydroxycinnamic acid ($C_9H_8O_3$) มีชื่อเหมือน คือ *p*-coumaric acid, *trans*-4-hydroxycinnamic acid, naringenin acid, 2 - propenoic acid มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 164.16 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 214 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 98 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นผง สีขาวบริสุทธิ์ [36]

o-methoxycinnamic acid ($C_{10}H_{10}O_3$) มีชื่อเหมือน คือ *trans*-2-methoxycinnamic acid, 2 - propenoic acid, 3-(2-methoxyphenyl) - acid มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 178.19 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 183-186 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 98 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองใส [37]

m-methoxycinnamic acid ($C_{10}H_{10}O_3$) มีลักษณะเป็นผงผลึก สีขาว-น้ำตาลอ่อน ละลายในน้ำ น้ำหนักมวลโมเลกุล 178.19 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 116-119 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 97 เปอร์เซ็นต์ [38]

p-methoxycinnamic acid ($C_{10}H_{10}O_3$) มีลักษณะเป็นผงผลึก สีขาว ละลายในน้ำ มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 178.19 กรัม จุดหลอมเหลวอยู่ที่ 173-175 องศาเซลเซียส มีความบริสุทธิ์ไม่เกิน 99 เปอร์เซ็นต์ [38]

11.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกรดซินนามิกและอนุพันธ์

11.3.1 ลดระดับน้ำตาลในเลือด

พืชสมุนไพรของไทยและต่างประเทศที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งมีกรดซินนามิกและอนุพันธ์เป็นองค์ประกอบได้แก่ ต้นอบเชย (*Cinnamomum cassia*) อบเชยจีน อบเชยชวา อบเชยเทศ กายานไทยหรือกายานญวน (*Styrax tonkinensis*) พบในแถบหลวงพระบาง ประเทศลาว ดีปลี (*Piper longum*) ต้นและดอกกาแฟ เมล็ดทานตะวัน ชะพลู (*Piper*

sarmemtosum) เรปซีด (rape seed) ต้นแฟล็ก (flax) ต้นสโนดรอป (snow drop) ต้นเบ (bay) ต้นมะระขี้นก (*Momordica charantia*) ต้นกระเพรา (*Ocimum sanctum*) ต้นเวอบาสคัม (verbascum) ต้นบลูเบอร์รี่ (blueberry) ต้นโรสแมรี่ (rosemary) ต้น *Gymnema sylvestre* ต้น *Hedychium spsicatum* ต้น *lochroma cyaneum* ต้น *Chelidonium majus* ต้น *Hypericum perforatum* ต้น *Fumaria officinalis* และต้น *Artemisia dracunculus* เป็นต้น [39]

Thiazolidinedione ที่สังเคราะห์มาจากกรดซินนามิก มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ เพราะ ทำให้เนื้อเยื่อส่วนปลาย (peripheral tissue) มีความไวต่ออินซูลิน เนื่องจากมีฤทธิ์กระตุ้น peroxisome proliferators activated receptor gamma (PPAR γ) จึงมีการศึกษาเพื่อจะพัฒนากรดซินนามิก ให้เป็นยาลดน้ำตาลในเลือดเช่นเดียวกับ thiazolidinedione [40]

กรดซินนามิก ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม ฟีนอลิก (phenolic compounds) เหมือน กรดคาเฟอิก (caffeic acid) พบในผลไม้ ชื่อ *Xanthium stramarium* กรดดังกล่าวมีผลลดระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสาร streptozotocin เนื่องจาก มีฤทธิ์ทำให้ร่างกายมีการนำกลูโคสไปใช้เพิ่มมากขึ้น [41]

11.3.2 ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส

trans - cinnamic acid และอนุพันธ์ มีฤทธิ์ยับยั้ง เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ได้จาก ยีสต์ (α - glucosidase inhibitory activity) ซึ่ง 4 - methoxy - *trans* - cinnamic acid และ 4 - methoxy - *trans* - cinnamic acid ethyl ester มีฤทธิ์มากที่สุด โดย 4 - methoxy - *trans* - cinnamic acid เป็นตัวยับยั้งแบบ non - competitive inhibitor แต่ 4 - methoxy - *trans* - cinnamic acid ethyl ester เป็นตัวยับยั้งแบบ competitive inhibitor อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ลำไส้หนูขาว (rat intestine) ซึ่งน่าจะเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ดีกว่าเอนไซม์ที่ได้จากยีสต์ [31]

12. In situ pancreatic perfusion

เป็นเทคนิคที่ผสมผสานระหว่าง *in vivo* และ *in vitro* โดยทำในสัตว์ที่หมดสติหรือถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบ (euthanized) เมื่อเตรียมการทดลองเสร็จแล้ว ในขณะที่ทำการทดลองจะให้สารทดสอบที่คาดว่าจะมีผลกระตุ้นการหลั่ง อินซูลิน กลูคากอน และฮอริโมน หรือสารอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส หรือ อะไมเลส ผ่านเข้าไปและออกจากอวัยวะ (ตับอ่อน) ด้วยอัตราเร็วคงที่(1มล./

นาที) โดยไม่ทำลายเซลล์ที่กำลังศึกษา เทคนิคนี้มีข้อดี คือ islets cell ที่อยู่ในระดับผิวและลึกของตับอ่อนได้รับออกซิเจนและมีการตอบสนองทางสรีรวิทยาเท่ากัน มีลักษณะทางกายภาพเหมือนเซลล์ปกติ ระบบประสาทภายในที่ควบคุมการทำงานของเซลล์ไม่ถูกทำลาย สามารถทำการทดลองในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบได้ในตัวเดียวกัน และสามารถบอกได้ว่าเซลล์ที่ทดสอบยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ในขณะทดลอง ด้วยกล้องอิเล็กตรอนไมโครสโคป ข้อเสียของเทคนิคนี้ คือ ต้องใช้ความชำนาญเป็นพิเศษ ในการทำและอ่านผล [42]

13. Alpha-glucosidase inhibitors

เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ ชนิดที่ 1 เป็นเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ได้จากยีสต์ เช่น baker's yeast และ ชนิดที่ 2 เป็นเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammals) เช่น หนูขาว (rat) กระต่าย และสุกร ซึ่งในการศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดมักสนใจการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นหลัก สารที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส เช่น อะคาร์โบส ปัจจุบันใช้เป็นยารักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากยีสต์ได้ [43] ซึ่งสารที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากยีสต์มักใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของการเป็น antiviral agents เช่น การต้านการติดเชื้อ HIV และ hepatitis virus เป็นต้น

เอนไซม์กลูโคซิเดส (glucosidase) ในทางเดินอาหารจะมีทำหน้าที่ย่อยแป้ง คาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนจากอาหารให้กลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาด 2-10 โมเลกุลและน้ำตาลโมเลกุลคู่ ด้วยเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนตรงบริเวณลำไส้ส่วนดูโอดีนัม แล้วถูกย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ตรง brush-border membrane ของลำไส้ ก่อนที่จะถูกดูดซึมเข้าเซลล์ตรงลำไส้ส่วนเจจูนัม โดยคาร์โบไฮเดรตส่วนมากจะถูกย่อยและดูดซึมตรงส่วนบนของเจจูนัม มีเพียงส่วนน้อยที่จะถูกย่อยและดูดซึมตรงส่วนล่างของเจจูนัม หรือ ลำไส้ส่วนไอลีียม ซึ่งบริเวณทั้ง 2 ส่วน มีเอนไซม์ดังกล่าวปริมาณน้อย คาร์โบไฮเดรตส่วนที่ไม่ถูกย่อยจะเคลื่อนเข้าไปที่ลำไส้ใหญ่และถูกเมตะบอลิซึมโดยแบคทีเรียเป็นกรดไขมันสายสั้นๆ เช่น อะซีเตต (acetate) บิวทีเรต (butyrate) และ โพรไพโอเนต (propionate) หรือ แก๊ส เช่น มีเทน (methane) และ ไฮโดรเจน (hydrogen) [44]

ตรงบริเวณ brush-border membrane ของลำไส้จะมีเอนไซม์ ที่เป็นไกลโคโปรตีนอยู่ 4 ชนิดทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ

1. Glucoamylase จะทำลายพันธะที่ตำแหน่ง α -1,4 glycosidic bond ของน้ำตาลโมเลกุลคู่ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ amylase, amylopectin, glycogen และ maltose

2. Sucrase-isomaltase complex แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ เอนไซม์กลุ่ม sucrase-maltase catalytic site จะย่อยน้ำตาล ซูโครส มอลโตส และมอลโตทริออส(maltotriose) ส่วน เอนไซม์กลุ่ม isomaltase-maltase จะทำลายพันธะ α -1,6 ของเดกตริน (dextrans) และพันธะ α -1,4 ของมอลโตส และมอลโตทริออส

3. Trehalase จะทำลายพันธะ α -1,1 ของน้ำตาลทรีฮาโลส (trehalose)

4. β -Glycosidase complex (lactase-glucosylceramidase) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ glucosyl-ceramidase catalytic site ทำลายพันธะ β -glycosidic ระหว่างน้ำตาลกลูโคส หรือ กาแลคโตส และ hydrophobic residues เช่น glycolipid, glucosylceramide และ galactosyl ceramide ส่วน lactase catalytic site จะทำลายพันธะ α -1,4 ระหว่างกลูโคสและกาแลคโตส แต่มีเพียงส่วนน้อยที่ทำลายพันธะ α -1,4 ของ cellulose disaccharides [45]

การขนส่งน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (กลูโคส ฟรุคโตส และกาแลคโตส) ผ่านผนังของลำไส้ต้องอาศัยกลไกดังนี้

1. Na^+ - dependent glucose transporters (SGLT1) กลูโคสที่อยู่ในลำไส้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ผ่านทาง Na^+ , K^+ -ATPase ที่ต้องเอา Na^+ ออกจากเซลล์เข้าไปอยู่ในกระแสเลือด

2. Facilitative glucose transporters ช่วยทำให้กลูโคสเคลื่อนที่ผ่านผนังลำไส้ฝั่งที่มีกลูโคสความเข้มข้นสูงไปยังฝั่งที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่ำ

3. การดูดซึม กาแลคโตสและฟรุคโตสผ่านทางตัวขนส่งกลูโคส กาแลคโตสถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้เหมือนกลูโคส ส่วนฟรุคโตสถูกดูดซึมผ่านผนังลำไส้โดยอาศัยการแพร่ผ่าน(diffusion) และ ตัวขนส่งกลูโคสที่ 5 (GLUT-5)

ดังนั้น การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส จึงเป็นการค้นหาสารที่ไปขัดขวางกลไกการทำงานของเอนไซม์ที่อาศัยหลักของลูกกุญแจ (substrate) กับแม่กุญแจ (enzyme) ที่ต้องมีความเหมาะสมกันทุกส่วนจึงจะสามารถเปิดแม่กุญแจที่ล็อกอยู่ หรือทำให้เกิดปฏิกิริยาย่อยคาร์โบไฮเดรต แบ่ง น้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตและเซลล์ต่อไป

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้น จะเห็นว่ากรดซึนนามิกและอนุพันธ์ พบในพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด ซึ่งอาจมีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในเลือด กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน และยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ถ้ามีการศึกษาอย่างจริงจังและมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง จะก่อให้เกิดคุณประโยชน์อย่างมหาศาลต่อประชากรและสัตว์เลี้ยงในประเทศไทย เช่น ส่งเสริมให้เกิดอาชีพเพาะปลูกและอุตสาหกรรมการสกัดสารเคมีจากพืชสมุนไพร รวมถึงการขายเคมีภัณฑ์ภายในประเทศและระหว่างประเทศในอนาคต จึงเป็นเหตุจูงใจให้เกิดแนวความคิดที่จะทำงานวิจัยในเรื่องนี้ ซึ่งยังไม่มีผู้ใดเคยวิจัยมาก่อน



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง

1. วัสดุและอุปกรณ์

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 300-350 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 1 สัปดาห์ ก่อนเริ่มการทดลอง

1.2 สารเคมีและแหล่งที่มา

- Calcium chloride (Merk, Germany)
- Cinnamic acid ; CIN (Sigma, U.S.A.)
- Dextran (Sigma, U.S.A.)
- Diethyl ether (Lab-scan, Thailand)
- Glucose (Merk, Germany)
- Heparin (Leo Pharmaceutical, Denmark)
- Hepes (Sigma, U.S.A.)
- Insulin Radioimmunoassay kit (DPC[®], U.S.A.)
- Magnesium sulphate heptahydrate (Merk, Germany)
- *meta*-hydroxycinnamic acid ; *m*-HCA (Sigma, U.S.A.)
- *meta*-methoxycinnamic acid ; *m*-MCA (Acros organic, Belgium)
- O-dianisidine (Sigma, U.S.A.)
- *ortho* - hydroxycinnamic acid ; *o*-HCA (Sigma, U.S.A.)
- *ortho* - methoxycinnamic acid ; *o*-MCA (Acros organic, Belgium)
- *para* - hydroxycinnamic acid ; *p*-HCA (Sigma, U.S.A.)
- *para* - methoxycinnamic acid ; *p*-MCA (Acros organic, Belgium)
- PGO enzyme (Sigma, U.S.A.)
- Pentobarbital sodium (Nembutal[®], Sanofi, France)
- Potassium chloride (Merk, Germany)
- Potassium phosphate (Merk, Germany)

- Rat insulin (Iowa, U.S.A.)
- Sodium chloride (Merk, Germany)
- Sodium hydrogen carbonate (Merk, Germany)
- BSA Fraction V (Sigma, U.S.A.)
- Rat intestinal acetone powder (Sigma, U.S.A.)

1.3 เครื่องมือ

- Autopipets (Gilson, France)
- Blood glucose monitor (Advance[®], Roche Diagnostic Co, Thailand)
- Centrifuge (Heraeus, Biofuge 22R, Germany)
- Gamma Counter (The nucleus, Model 600B Gamma Tech II, TN)
- Hot plate (Sangi Model 14405)
- Magnetic Stirrer
- Microplate
- Microplate Reader (Tecan A - 5082)
- Microtube
- pH meter (Hanna instruments, Microprocessor pH Meter model pH 211)
- Rotary evaporator
- Sonicator
- Tank of carbogen gas (TIG, Thailand)
- Vortex mixer (Germmy industrial, Taiwan)
- Water bath shaker (Grant, England)
- Water pump (Gilson, France)
- Weighting machine (Sartorius, Germany)

2. วิธีดำเนินการทดลอง (Experimental protocol)

การทดลองที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดของกรดซินนามิก และอนุพันธ์โดยเทคนิค Intravenous glucose tolerance test [46-47]

ศึกษาฤทธิ์ของ CIN, *o*-HCA, *m*-HCA., *p*-HCA., *o*-MCA, *m*-MCA และ *p*-MCA ต่อการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดของหนูขาว ด้วยเทคนิค Intravenous glucose tolerance test (IVGTT) ซึ่งทดสอบด้วยการฉีดกลูโคสขนาด 0.25 กรัม/น้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม เข้าหลอดเลือดดำ และเก็บเลือดเพื่อตรวจระดับกลูโคส ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วิธีการทดลอง

ใช้หนูทดลองกลุ่มละ 6 ตัว อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง ทำให้หนูสลบโดยฉีด pentobarbital sodium ขนาด 45 มก./กก. เข้าช่องท้อง และฉีดสารที่ต้องการทดสอบรวมทั้งกลูโคสเข้าทางหลอดเลือดดำ femoral vein ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control) ให้น้ำเกลือ (NSS) 1 มล./กก.+glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ทดลองให้ CIN 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ทดลองให้ *m*-HCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ทดลองให้ *o*-HCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

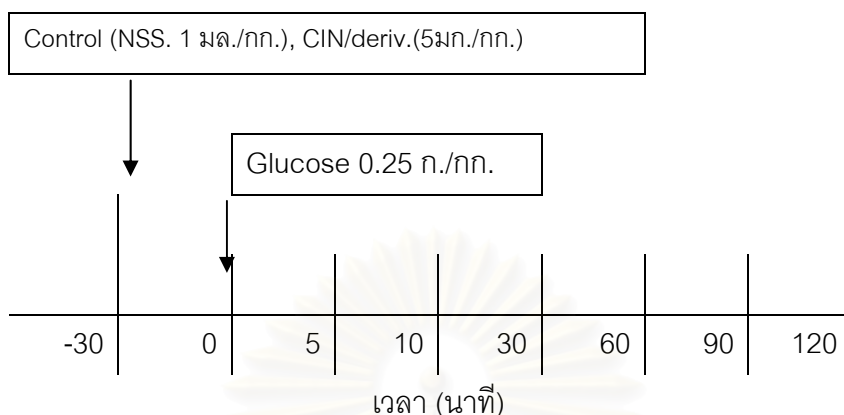
กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่ทดลองให้ *p*-HCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 6 กลุ่มที่ทดลองให้ *m*-MCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 7 กลุ่มที่ทดลองให้ *o*-MCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

กลุ่มที่ 8 กลุ่มที่ทดลองให้ *p*-MCA 5 มก./กก. + glucose 0.25 ก./กก. IV

เก็บเลือด 0.5 มล. จากหลอดเลือดดำ femoral vein ของหนูทดลองก่อนให้สารทดสอบ (นาที่ที่-30) จากนั้นฉีดสารที่ต้องการทดสอบเข้าทางหลอดเลือดดำ femoral vein แก่หนูแต่ละกลุ่มดังกล่าวข้างต้น ต่อมาอีก 30 นาที เก็บเลือด 0.5 มล.และฉีดกลูโคส(นาที่ที่ 0) เข้าทางหลอดเลือด femoral vein แล้วเก็บเลือดที่เวลา 5, 10, 30, 60, 90 และ120 นาที ภายหลังให้กลูโคส นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมา แล้วนำไปทดสอบหาความเข้มข้นของกลูโคสในพลาสมา ด้วยวิธี glucose oxidase test



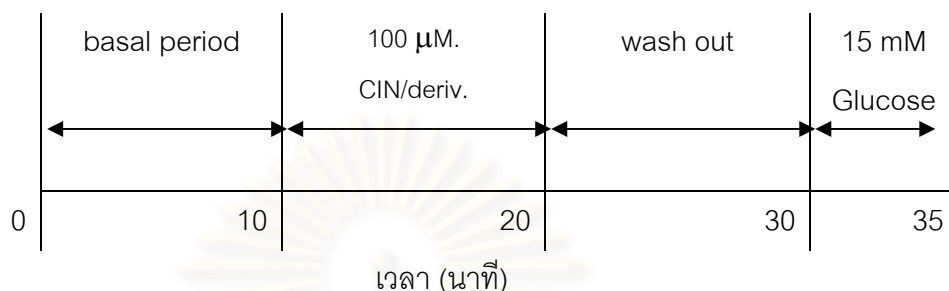
การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของกรดซิงนามิกและอนุพันธ์ในภาวะที่มีน้ำตาลปกติในเลือด โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion [42]

ศึกษาฤทธิ์ของกรดซิงนามิกและอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสจากการทดลองที่ 1 ว่ามีผลกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในหนูขาว โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion

วิธีการทดลอง

อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง ใช้หนูกลุ่มละ 4 ตัว ทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital sodium 45 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (IP) จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเพื่อหา coeliac arteries แล้วสอดสาย canula ชนิดโพลีไวนิล (polyvinyl) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.625 มม. ที่มี Krebs-Ringer Bicarbonate Buffer (KRB) และก๊าซคาร์บอนเจนผสมอยู่ ปรับให้มีอัตราการไหล 1 มล./นาที เพื่อให้มีสารอาหารและสารทดสอบแก่ตับอ่อน จากนั้นหาเส้นเลือด portal vein เพื่อสอดท่อ (canula) ชนิดโพลีไวนิล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.12 มม. เพื่อเก็บของเหลวที่หลั่งออกมาจากตับอ่อน โดยให้ 20 นาทีแรกเป็นระยะปรับสภาพของตับอ่อน (equilibration period) หลังจากนั้น เก็บของเหลวที่ผ่านออกมาจากตับอ่อนในช่วงต่างๆ ดังนี้ นาทีที่ 0-10 เป็นระยะพัก (basal period) ให้ KRB ที่มีกลูโคส 5.5 มิลลิโมลาร์ (mM) เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที ในนาทีที่ 11-20 เป็นช่วง treatment ให้สารทดสอบ (cinnamic acid /derivatives หรือ treatment) ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ (μM) และเก็บตัวอย่างทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที นาทีที่ 22-30 เป็นช่วง washout เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที และนาทีที่ 31-35 เป็น

ช่วง positive control กระตุ้นด้วยกลูโคส 15 mM เก็บทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับอินซูลิน ด้วยเทคนิค Radioimmunoassay



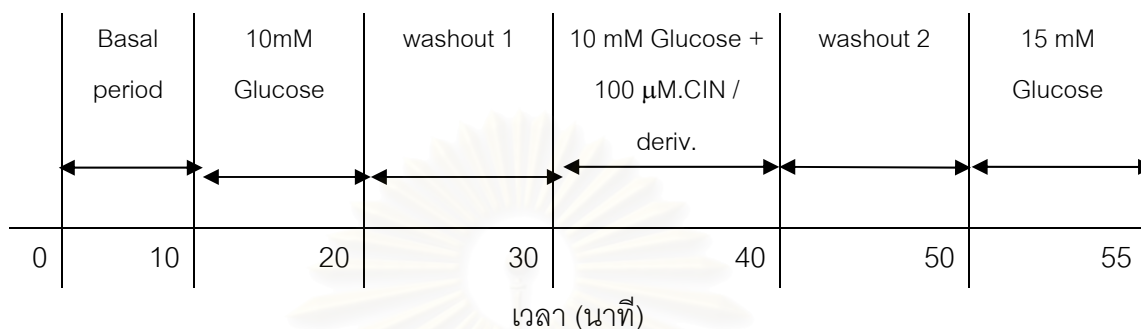
การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนของกรดซินนามิก และอนุพันธ์ในภาวะกระตุ้นด้วยกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion [42]

ศึกษาฤทธิ์ของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากการทดลองที่ 2 ว่ามีผลกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในหนูขาวได้เพิ่มสูงขึ้นในภาวะน้ำตาลสูงหรือไม่ โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion

วิธีการทดลอง

อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง 12 ชั่วโมง ใช้หนูกลุ่มละ 4 ตัว ทำให้สลบโดยฉีด pentobarbital sodium 45 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง จากนั้นเปิดผ่าช่องท้องเพื่อหา coeliac arteries แล้วสอดสาย canula ชนิดโพลีไวนิล ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.625 มม. ที่มี KRB และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ผสมอยู่ ปรับให้มีอัตราการไหล 1 มล./นาที เพื่อให้สารอาหารและสารทดสอบแก่ตับอ่อน จากนั้นหาเส้นเลือด portal vein เพื่อสอดท่อชนิดโพลีไวนิลขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.12 มม. เพื่อเก็บของเหลวที่หลั่งออกมาจากตับอ่อน โดยให้ 20 นาทีแรกเป็นระยะปรับสภาพของตับอ่อน หลังจากนั้น เก็บของเหลวที่ผ่านออกมาจากตับอ่อนในช่วงต่าง ๆ ดังนี้ นาทีที่ 0-10 เป็นระยะพัก ให้ KRB ที่มีกลูโคส 5.5 mM และเก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที นาทีที่ 12-20 เป็นช่วง high glucose ให้กลูโคส 10 mM เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที นาทีที่ 21-30 เป็นช่วง washout ที่ 1 ให้ KRB ที่มีกลูโคส 5.5 mM เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที นาทีที่ 31-40 เป็นช่วงให้สารทดสอบ 100 μ M cinnamic acid หรือ derivatives (treatment) + high glucose 10 mM เก็บตัวอย่างทุก 1 นาที เป็นเวลา 10 นาที นาทีที่ 41-50 เป็นช่วง washout ที่ 2 ให้ KRB ที่มีกลูโคส 5.5 mM เก็บตัวอย่างทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที และนาทีที่ 51-55 เป็น

ช่วง positive control กระตุ้นด้วยกลูโคส 15 mM เก็บตัวอย่างทุก 1 นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์หาระดับอินซูลิน ด้วยเทคนิค Radioimmunoassay



การทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาวของกรดซินนามิก และอนุพันธ์ [43]

ศึกษากรดซินนามิก และอนุพันธ์ที่มีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสจากการทดลองที่ 1 ว่าสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา- กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาว ทำให้มีการดูดซึมกลูโคสช้าลง

วิธีการทดลอง

เตรียม alpha-glucosidase solution (AGH solution) จาก rat intestinal acetone powder โดย ผสม rat intestinal acetone powder 30 มก. ให้เป็นเนื้อเดียวกับ 0.9 % NaCl solution 1 มล. ในน้ำแข็ง ด้วย Sonication equipment เป็นเวลา 30 วินาที 12 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นแยกที่ 4 องศาเซลเซียส 5,000 รอบ เป็นเวลา 30 นาที และนำส่วนใส (AGH solution) มาวิเคราะห์การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ α - glucosidase ซึ่งใช้ AGH solution 40 ไมโครลิตร (μ l) ผสมกับ กรดซินนามิก หรืออนุพันธ์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 20 μ l และใส่ substrate solution คือ 37 mM maltose [48] หรือ 56 mM sucrose [49] อย่างละ 340 μ l แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C 30 นาที (maltose) หรือ 60 นาที (sucrose) จากนั้นนำไปต้ม 10 นาที เพื่อยุติปฏิกิริยา นำไปวัดค่า AGH activity โดยการวัดปริมาณกลูโคสที่เกิดขึ้นด้วยวิธี Glucose Oxidase test และนำค่าที่ได้มาหาความเข้มข้นของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของ AGH ได้ 50 % ซึ่งถือเป็นค่า IC₅₀

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ (Statistic Data Analysis)

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of means) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way analysis of variance : ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้วิธี least significance difference (LSD) ในการพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$) [50-52]



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ 1 การทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดของกรดซินนามิก และอนุพันธ์โดยเทคนิค Intravenous glucose tolerance test

ผลของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว โดยการทำ Intravenous glucose tolerance test แสดงในตารางที่ 3 และภาพที่ 5 ณ เวลา -30 และ 0 นาที ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทุกกลุ่มไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ภายหลังจากให้กลูโคสร่วมกับกรดซินนามิกหรืออนุพันธ์ต่างๆ ขนาด 5 มก./กก. 5 นาที พบว่ากลุ่มที่ได้รับ *p*-MCA (235.73 ± 28.34 มก./ดล.) มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (302.76 ± 10.77 มก./ดล.) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงเท่ากับ 22.14 ในขณะที่เวลา 10 นาทีหลังให้กลูโคส พบว่า ระดับน้ำตาลของกลุ่มที่ได้รับ CIN (101.61 ± 14.56 มก./ดล.), *o*-HCA (98.12 ± 13.80 มก./ดล.) และ *p*-MCA (95.18 ± 6.53 มก./ดล.) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (142.55 ± 12.27 มก./ดล.) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดลงเท่ากับ 28.72, 31.17 และ 33.23 ตามลำดับ

ส่วนนาทีที่ 90 หลังจากให้กลูโคส พบว่า กลุ่มที่ได้รับ *p*-MCA (89.14 ± 8.40 มก./ดล.) มีระดับน้ำตาลในเลือดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (134.89 ± 17.25 มก./ดล.) อย่างมีนัยสำคัญ และนาทีที่ 120 หลังให้กลูโคส พบว่า หนูทุกกลุ่มมีระดับน้ำตาลในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

จากผลการทดลองจะพบว่า CIN และ *o*-HCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ นาทีที่ 10 ส่วน *p*-MCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวได้ ณ นาทีที่ 5, 10 และ 90 หลังจากให้กลูโคส ตามลำดับ

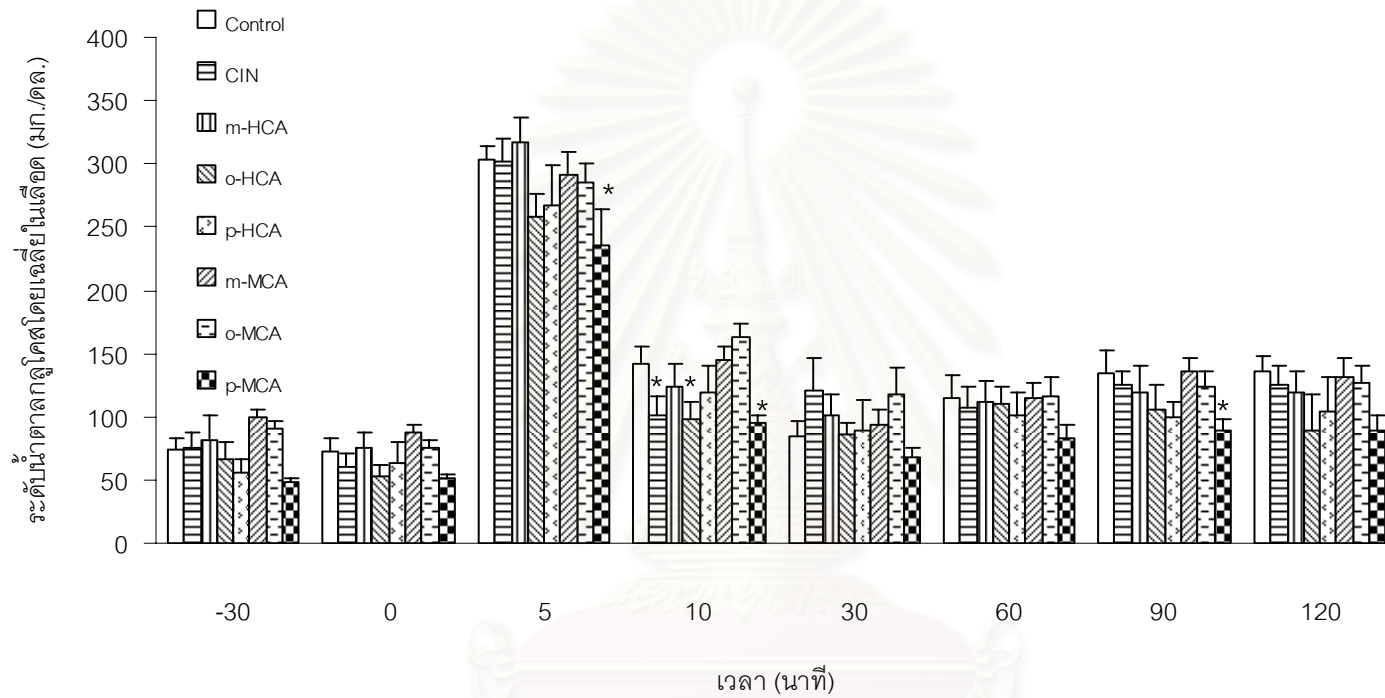
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงผลของกรดซึนนามิกและอนุพันธ์ ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวโดยการทำ IVGTT

เวลาก่อน (-) และหลังให้กลูโคส (นาที)	ค่าเฉลี่ยของระดับน้ำตาลในเลือด(มก./ดล.) ณ เวลาก่อน (-) และหลังให้กลูโคสเข้าหลอดเลือดดำ (นาที)							
	Control	CIN	<i>m</i> -HCA	<i>o</i> -HCA	<i>p</i> -HCA	<i>m</i> -MCA	<i>o</i> -MCA	<i>p</i> -MCA
-30	73.64±10.03	74.86±12.87	81.95±18.73	65.82±13.75	55.72±11.11	99.25±6.07	90.00±6.89	48.84±1.96
0	72.07±11.60	61.10±9.95	75.85±12.29	52.31±9.36	63.98±15.68	86.86±6.37	75.58±6.08	51.05±3.85
5	302.76±10.77	301.33±19.11	317.54±18.95	258.85±17.84	266.85±32.04	291.37±17.38	284.64±15.94	235.73±28.34*
10	142.55±12.27	101.61±14.56*	123.56±18.22	98.12±13.80*	118.71±22.32	144.41±10.62	162.49±11.27	95.18±6.53*
30	84.63±12.44	120.68±26.16	101.80±15.43	85.45±9.60	89.07±24.56	93.67±11.42	117.27±20.88	68.47±7.02
60	114.72±17.60	107.46±16.25	111.54±16.28	110.36±12.86	101.08±18.46	114.10±12.24	116.49±15.25	83.04±10.67
90	134.89±17.25	125.00±11.30	119.41±20.65	106.11±18.67	100.27±11.07	135.83±10.67	123.30±12.92	89.14±8.40*
120	135.10±12.39	125.43±15.23	119.57±16.70	89.58±27.62	104.56±26.79	131.39±14.29	126.70±13.71	89.36±11.44

* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการทดลองแสดงในรูป mean ± SE, n = 6



ภาพที่ 5 แสดงผลของกรดซิงนามิกและอนุพันธ์ชนิดต่างๆในขนาด 5 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาว โดยการทำให้ IVGTT

* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ เวลาเดียวกัน แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบ mean \pm SE, n = 6

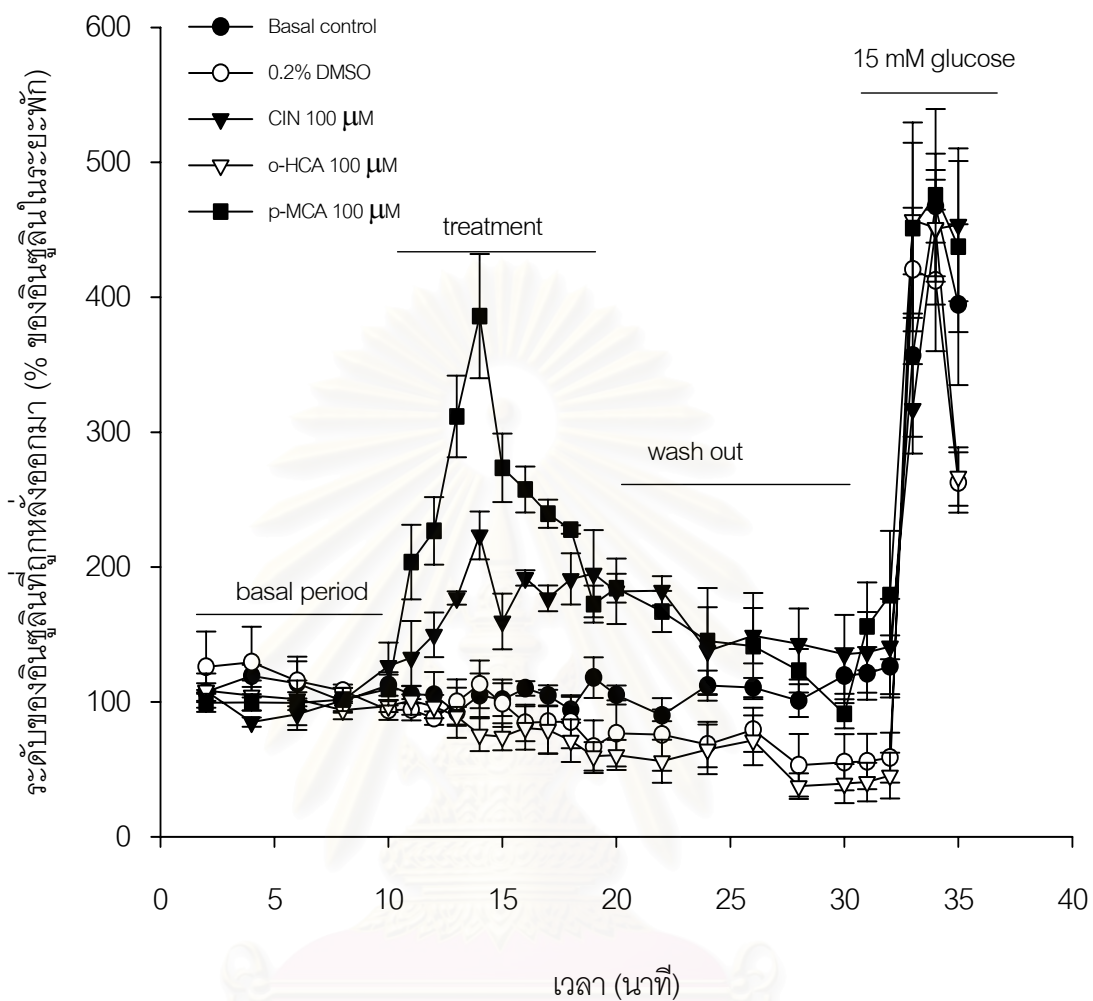
การทดลองที่ 2 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า กรดซินนามิกและอนุพันธ์ที่สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA จึงนำมาทดสอบว่า สารดังกล่าวสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนได้หรือไม่ ซึ่งการหลั่งอินซูลินเป็นกลไกหนึ่งที่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดลงได้ ดังแสดงในภาพที่ 6-7

ในภาพที่ 6 พบว่า 0.2 % DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลายของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ เมื่อให้เข้าสู่ตับอ่อนเป็นเวลา 10 นาที กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (basal control) แสดงว่า ตัวทำละลายไม่มีผลต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน และเมื่อให้ CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA ขนาด 100 μ M ผ่านเข้าสู่ตับอ่อนเป็นเวลา 10 นาที ผลปรากฏว่า CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA สามารถกระตุ้นตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินได้สูงสุด 2.23, 0.78 และ 3.85 เท่าของระยะพัก (basal period) ในแต่ละกลุ่ม ตามลำดับ ภายหลังจากล้างสารดังกล่าวออกด้วยสารละลาย KRB และ ให้กลูโคสความเข้มข้น 15 mM (positive control) เข้าสู่ตับอ่อน พบว่า กลูโคสสามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อีกครั้งโดยมีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้สูงที่สุดมากกว่า 3.97 เท่าของระยะพักในแต่ละกลุ่ม เป็นการยืนยันว่า เบต้าเซลล์ของตับอ่อนยังคงสภาพปกติอยู่ตลอดการทดลอง

ในภาพที่ 7 เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ในการหลั่งอินซูลินของกลุ่มที่ได้รับ CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA ในช่วงนาทีที่ 11-20 เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ณ กลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM พบว่า CIN และ *p*-MCA กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ และมีค่า AUC เท่ากับ 2.01 และ 2.84 เท่าของกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ตามลำดับ แต่ *o*-HCA ไม่สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 6 แสดงผลของ CIN, o-HCA และ p-MCA ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในภาวะกลูโคส 5.5 mM

ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของอินซูลินในระยะเวลาพักของแต่ละกลุ่ม

Basal control : 3.08 ± 0.35 นก./มล.

0.2 % DMSO 100 μM : 19.28 ± 2.63 นก./มล.

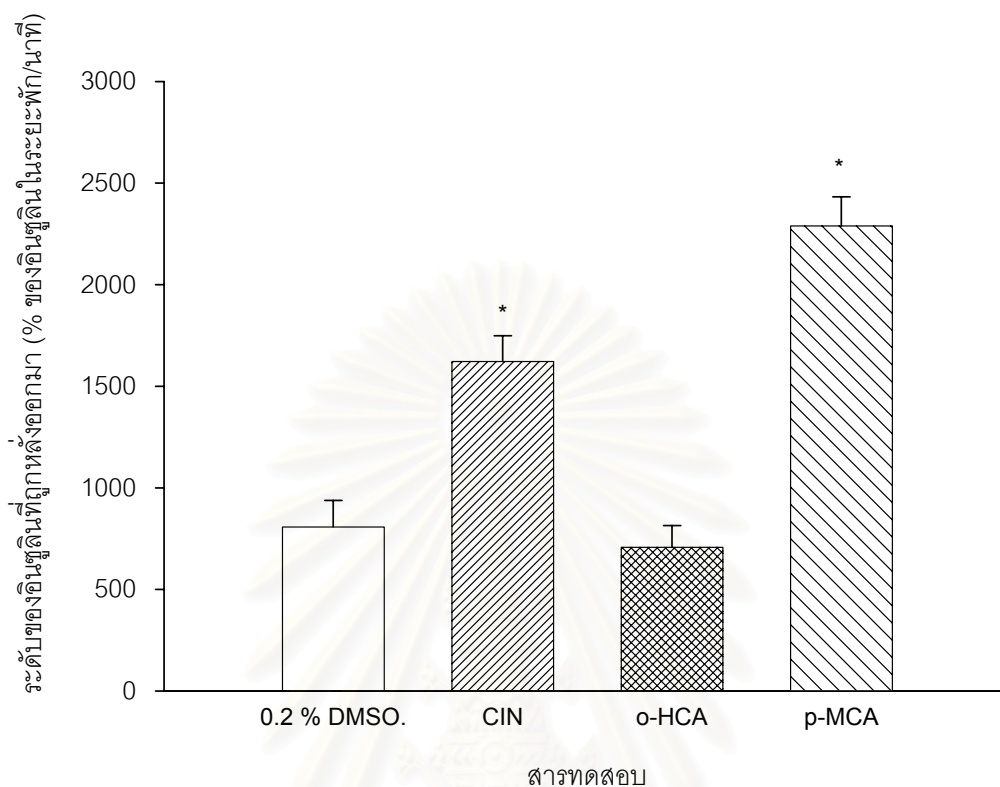
CIN 100 μM : 11.02 ± 2.22 นก./มล.

o-HCA 100 μM : 53.16 ± 3.72 นก./มล.

p-MCA 100 μM : 1.09 ± 0.17 นก./มล.

* เปรียบเทียบกับ DMSO โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการทดลองแสดงในรูป mean \pm SE, n = 3



ภาพที่ 7 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟในการหลั่งอินซูลิน ของ CIN, o-HCA และ p-MCA ในสภาวะ กลูโคส 5.5 mM ในช่วงนาทที่ 11-20
 * เปรียบเทียบกับกลุ่ม 0.2%DMSO โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับ $p < 0.05$
 ผลการทดลองแสดงในรูปแบบ mean \pm SE, n = 3

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 3 การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลังอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของกรด ซินนามิก และอนุพันธ์ในภาวะกระตุ้นด้วยกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิ โมลาร์ โดยเทคนิค In situ pancreatic perfusion

จากการทดลองที่ 2 พบว่า *o*-HCA ไม่สามารถกระตุ้นการหลังอินซูลินจากตับอ่อนได้อย่าง
มีนัยสำคัญ จึงไม่นำมาทดสอบต่อในการทดลองนี้ ดังนั้น การทดลองที่ 3 จะทำการทดสอบสาร
เพียง 2 ชนิด คือ CIN และ *p*-MCA ว่าสามารถเสริมฤทธิ์ของกลูโคสต่อการกระตุ้นการหลังอินซูลิน
เพิ่มมากขึ้นหรือไม่ แสดงในภาพที่ 8-9

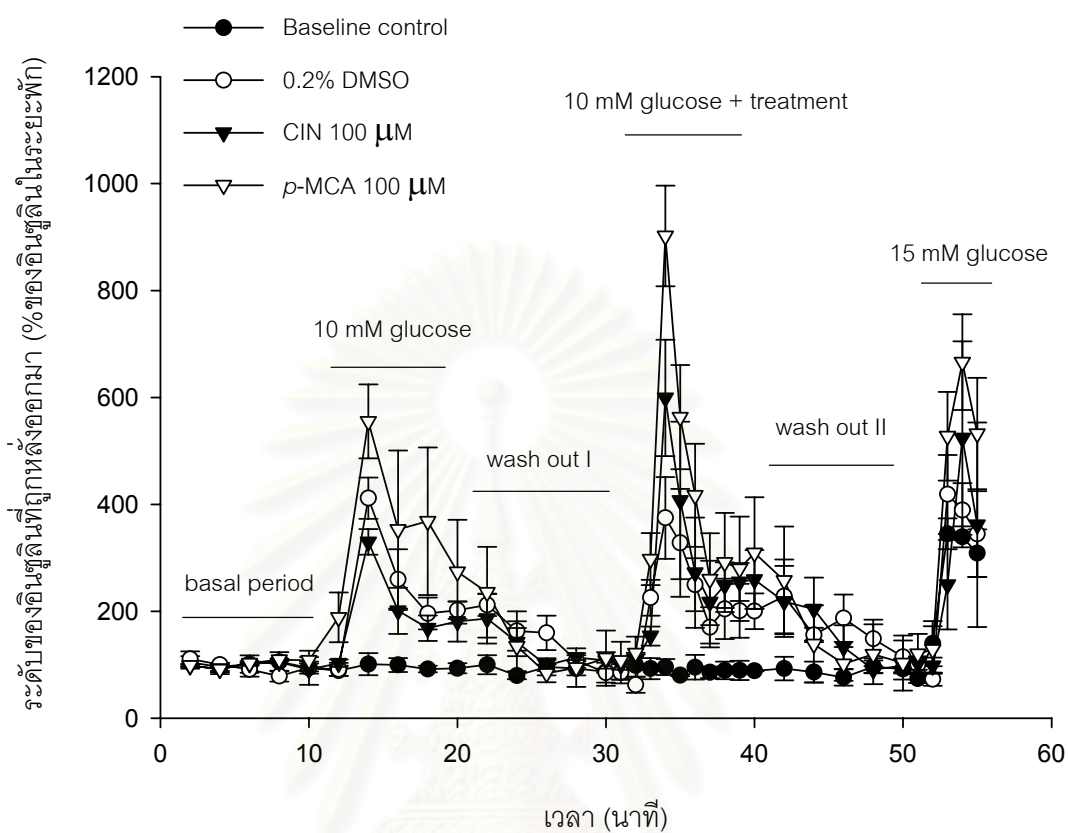
ในภาพที่ 8 เมื่อผ่านกลูโคสความเข้มข้น 10 mM เข้าสู่ตับอ่อนนาน 10 นาที ใน
กลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO หรือกลุ่มควบคุม CIN และ *p*-MCA พบว่า กลูโคส 10 mM สามารถ
กระตุ้นการหลังอินซูลินได้สูงสุดประมาณ 4.33, 3.37 และ 5.43 เท่า ตามลำดับเมื่อเทียบกับระยะ
พักในแต่ละกลุ่ม และผลการกระตุ้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อล้างกลูโคสออกด้วยสารละลาย
KRB และผ่าน 10 mM กลูโคส ร่วมกับ 0.2 % DMSO, CIN และ *p*-MCA ความเข้มข้น 100 μ M
เข้าสู่ตับอ่อนเป็นเวลา 10 นาที พบว่า CIN สามารถกระตุ้นการหลังอินซูลินได้สูงสุด 1.60 เท่าเมื่อ
เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และ *p*-MCA
สามารถกระตุ้นการหลังอินซูลินได้สูงสุด 2.41 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO
โดยมีความแตกต่างกันทางสถิติ ภายหลังจากล้างสารดังกล่าวออกด้วยสารละลาย KRB และ ผ่าน
กลูโคส ความเข้มข้น 15 mM (positive control) เข้าสู่ตับอ่อน พบว่า กลูโคสสามารถกระตุ้นการ
หลังอินซูลินได้อีกครั้งโดยกระตุ้นได้สูงสุดมากกว่า 3.44 เท่าของระยะพักในแต่ละกลุ่ม เป็นการ
ยืนยันว่า เบต้าเซลล์ของตับอ่อนยังคงสภาพปกติอยู่ตลอดการทดลอง

ในภาพที่ 9 เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟในการหลังอินซูลินของกลุ่มที่ได้รับ 0.2 %
DMSO, CIN และ *p*-MCA ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM ในช่วงเวลาที่ 11-20 และ 10 mM
ในช่วงเวลาที่ 31-40 พบว่า 0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM สามารถกระตุ้นตับ
อ่อนให้หลังอินซูลินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และมีค่า AUC เท่ากับ 2.43 เท่าของกลุ่มที่ได้รับ
0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM ส่วน CIN ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5
mM และ 10 mM สามารถกระตุ้นตับอ่อนให้หลังอินซูลินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มีค่า AUC
เท่ากับ 2.01 และ 3.02 เท่าของกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM
ตามลำดับ และ *p*-MCA ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM และ 10 mM สามารถกระตุ้นตับ
อ่อนให้หลังอินซูลินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มีค่า AUC เท่ากับ 2.84 และ 4.14 เท่าของกลุ่มที่
ได้รับ 0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM ตามลำดับ

เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟในการหลังอินซูลินของกลุ่มที่ได้รับ CIN และ *p*-MCA ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM พบว่า CIN ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของกลูโคสเพื่อกระตุ้นตับอ่อนให้หลังอินซูลินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่า AUC เท่ากับ 1.25 เท่าของกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM ในขณะที่ *p*-MCA ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM สามารถเสริมฤทธิ์ของกลูโคสเพื่อกระตุ้นตับอ่อนให้หลังอินซูลินได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีค่า AUC เท่ากับ 1.71 เท่าของกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ในภาวะกลูโคสความเข้มข้น 10 mM



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 8 แสดงผลของ CIN และ *p*-MCA ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินในภาวะกลูโคส 10 mM ระดับความเข้มข้นเฉลี่ยของอินซูลินในระยะพักของแต่ละกลุ่ม

Basal control : 7.45 ± 0.62 นก./มล.

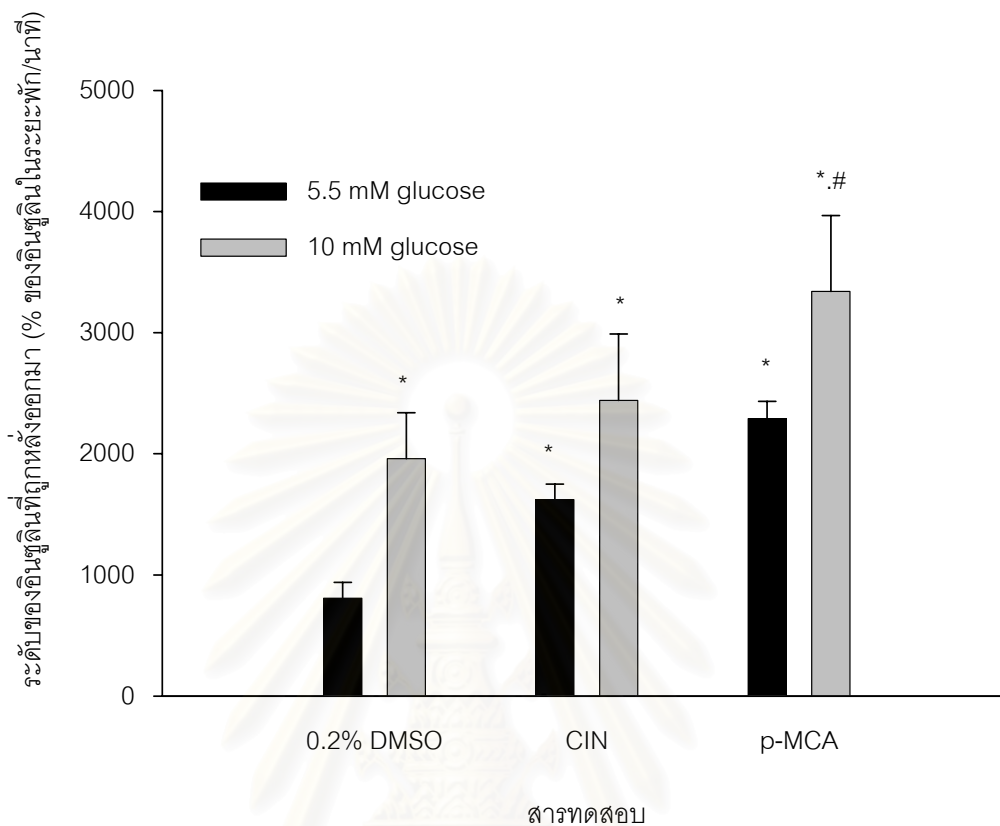
0.2% DMSO 100 μ M : 7.80 ± 2.06 นก./มล.

CIN 100 μ M : 6.68 ± 0.89 นก./มล.

p-MCA 100 μ M : 4.64 ± 0.64 นก./มล.

* เปรียบเทียบกับ DMSO โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการทดลองแสดงในรูป mean \pm SE, n = 3



ภาพที่ 9 แสดงค่าพื้นที่ใต้กราฟในการหลั่งอินซูลินของ CIN และ p-MCA ในภาวะกลูโคส 10 mM ในช่วงนาฬิกาที่ 31-40 เปรียบเทียบกับภาวะกลูโคส 5.5 mM ในช่วงนาฬิกาที่ 11-20
 *, # เปรียบเทียบกับ DMSO ในภาวะกลูโคส 5.5 และ 10 mM ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$
 ผลการทดลองแสดงในรูป mean \pm SE, n = 3

สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 4 การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กหนูขาวของกรดซินนามิก และอนุพันธ์

จากการทดลองที่ 1 พบว่า กรดซินนามิก และอนุพันธ์ ที่มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในกระแสเลือดของหนูขาวได้อย่างมีนัยสำคัญ คือ CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA จึงนำมาทดสอบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แอลฟา-กลูโคซิเดส (ซูเครส และ มอลเตส) ได้หรือไม่ ซึ่งผลของการยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าว จะชะลอการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส และฟรุคโตส ให้ช้าลง

จากค่า IC_{50} ในตารางที่ 4 พบว่า อะคาร์โบส (acarbose) สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $34.01 \pm 6.985 \mu\text{M}$ ส่วน *o*-HCA ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้น้อยกว่า acarbose 20.06 เท่า (IC_{50} เท่ากับ $682.38 \pm 85.28 \mu\text{M}$) นอกจากนี้ acarbose ยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $3.50 \pm 0.716 \mu\text{M}$ และ *o*-HCA สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเตสได้เช่นเดียวกัน แต่น้อยกว่า acarbose 775 เท่า (IC_{50} เท่ากับ $2,712.53 \pm 320.948 \mu\text{M}$) อย่างไรก็ตาม CIN และ *p*-MCA ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสและมอลเตสได้

ตารางที่ 4 แสดงค่า IC_{50} (μM) ของ acarbose, CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้ของหนูขาว

สารทดสอบ	IC_{50} (μM)	
	ซูเครส	มอลเตส
CIN	NI	NI
<i>o</i> -HCA	682.38 ± 85.277	$2,712.53 \pm 320.948$
<i>p</i> -MCA	NI	NI
Acarbose	34.01 ± 6.985	3.50 ± 0.716

NI = ไม่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสหรือมอลเตส

ผลการทดลองแสดงในรูป mean \pm SE, n = 3 independent experiment with duplicate assay

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. อภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของกรดซินนามิกและอนุพันธ์ โดยเทคนิค IVGTT พบว่า หลังจากให้น้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำ CIN และ *o*-HCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในนาทีที่ 10 และ *p*-MCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ณ นาทีที่ 5, 10 และ 90 หลังจากให้น้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำขนาด 0.25 ก./กก. ซึ่งสำหรับผลการทดลองนี้ใน *p*-MCA สอดคล้องกับการทดลองให้ *p*-MCA ขนาด 10 - 100 มก./กก. โดยการป้อนให้กินพบว่า สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูปกติและหนูเบาหวานได้เช่นกัน [53]

จากภาพที่ 10 พบว่า CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA มีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีน (benzene ring) มีหมู่ที่ออกฤทธิ์ (functional group) คือ หมู่คาร์บอกซิลิก (-CH=COOH) โดย *o*-HCA มีหมู่ไฮดรอกซี (-OH) 1 หมู่ อยู่ที่ตำแหน่งออร์โท (ortho) ของวงแหวนเบนซีน ในขณะที่ *p*-MCA มีหมู่เมทอกซี (-OCH₃) 1 หมู่ อยู่ที่ตำแหน่งพารา (para) ของวงแหวนเบนซีน และ CIN ไม่มีทั้งหมู่ไฮดรอกซี และ เมทอกซี อยู่ในสูตรโครงสร้าง จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ จึงเป็นไปได้ว่า สารในกลุ่มซินนามิกและอนุพันธ์ที่มีโครงสร้างทางเคมีประกอบด้วยวงแหวนเบนซีนและหมู่คาร์บอกซิลิก สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ นอกจากนี้เคยมีรายงานว่า กรดคาเฟอิก กรดเฟอูริก และกรดไอโซเฟอูริก ซึ่งมีสูตรโครงสร้างเป็นวงแหวนเบนซีนและหมู่คาร์บอกซิลิกเช่นเดียวกัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ [54-56] จึงเป็นการยืนยันว่า สูตรโครงสร้างทางเคมีดังกล่าว น่าจะมีผลก่อให้เกิดฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ สำหรับ *p*-MCA สามารถออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลได้ภายใน 5 นาที หลังจากฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำ และฤทธิ์ยังคงอยู่นาน 90 นาที ในขณะที่ CIN และ *o*-HCA มีผลลดระดับน้ำตาลได้เฉพาะนาทีที่ 10 หลังจากฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำ จึงเป็นไปได้ว่า การเติมหมู่เมทอกซีเข้าไปในตำแหน่งพาราของวงแหวนเบนซีน อาจมีผลทำให้ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดเกิดเร็วขึ้นและคงอยู่ได้นานขึ้น อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า การเติมหมู่ไฮดรอกซี 1 หมู่ ในตำแหน่งเมทา (meta) หรือ พารา และการเติมหมู่เมทอกซี 1 หมู่ ในตำแหน่งเมทา หรือ ออร์โท ของวงแหวนเบนซีนอาจมีผลทำให้ฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดหายไป

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า การมีสูตรโครงสร้างที่ต่างกันเพียงเล็กน้อยของสารในกลุ่มกรดซินนามิกและอนุพันธ์ต่างๆ เช่น CIN, *o*-HCA, *p*-MCA กรดเฟอูริก และกรดไอโซเฟอูริก มีผลทำให้กลไกการลดระดับน้ำตาลของสารเหล่านี้คล้ายคลึงหรือแตกต่างกันก็ได้ เช่น CIN, *p*-

MCA และกรดเพอรูริก [56] มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนได้เช่นเดียวกัน แต่ผลจากการทดลองนี้พบว่า ฤทธิ์ของ CIN ต่ำกว่า *p*-MCA ค่อนข้างมากจึงเป็นไปได้ว่า CIN อาจมีกลไกการลดระดับน้ำตาลในเลือดผ่านกลไกอื่นร่วมด้วย เช่น ทำให้เนื้อเยื่อส่วนปลายมีความไวต่ออินซูลินเพิ่มขึ้น ดังรายงานที่ว่า CIN เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ยากกลุ่ม thiazolidinedione ซึ่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยการกระตุ้นที่ตัวรับ PPAR γ ให้ทำงาน ส่งผลให้ลดการสร้างกลูโคสจากตับ และเพิ่มความไวต่ออินซูลินของเนื้อเยื่อโดยเฉพาะเนื้อเยื่อไขมัน [39=40] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า CIN ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อัลโดสรีดักเตส (aldose reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นซอร์บิตอล (sorbital) ผ่านทางกระบวนการ polyol pathway ในภาวะปกติเอนไซม์ตัวนี้จะไม่มีบทบาทมากนัก แต่ในภาวะเบาหวาน น้ำตาลกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่เนื้อเยื่อที่มีความไวต่ออินซูลิน เช่น เลนส์ตา เส้นประสาท และเรตินา เป็นจำนวนมากและถูกเปลี่ยนเป็นน้ำตาลซอร์บิตอลสะสมอยู่ในเซลล์ ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ออกมาได้ จึงเป็นสาเหตุให้เกิดโรคแทรกซ้อนตามมาหลังจากเป็นเบาหวาน เช่น ต้อกระจก การเสื่อมของเส้นประสาทและจอตา [57]

สำหรับ *p*-MCA นอกเหนือจากกลไกการลดระดับน้ำตาลผ่านทางกระตุ้นการหลั่งอินซูลินแล้ว ยังมีรายงานว่า การป้อน *p*-MCA ขนาด 40 มก./กก. วันละ 1 ครั้งติดต่อกัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาของหนูเบาหวานได้ โดย *p*-MCA มีผลลดการทำงานของเอนไซม์จากตับ ได้แก่ hexokinase, glucokinase, phosphofructokinase จึงทำให้กระบวนการ glycolysis ลดลง และยับยั้งการทำงานของ glucose-6-phosphatase (G6Pase) โดยที่ G6Pase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการ gluconeogenesis หรือ glycogenolysis ในตับ G6Pase ทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสกับ glucose-6-phosphate(G6P) ได้เป็นกลูโคสกับฟอสเฟต จากนั้นกลูโคสจะถูกนำเข้าสู่กระแสเลือด เมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งการทำงานด้วย *p*-MCA จึงมีการนำกลูโคสไปใช้ในตับเพิ่มขึ้นและมีการนำกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดลดลง [53]

กรดไฮโซเพอรูริกมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับ *p*-MCA แต่มีการเติมหมู่ไฮดรอกซีอีก 1 หมู่ ที่ตำแหน่งเมทา (ภาพที่ 10) สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้โดยการกระตุ้น α_1 -adrenoceptors ที่อยู่ใน adrenal gland ให้หลั่ง β -endorphin ออกมาและมี opioid μ -receptor เป็นสารสื่อกลางช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ GLUT-4 จึงมีการใช้กลูโคสในกล้ามเนื้อ soleus (soleus muscle) เพิ่มขึ้น และลดประสิทธิภาพของ phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) ทำให้การสร้างกลูโคสในตับลดลง [55]

o-HCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านทางกลไกการยับยั้งการทำงานของ เอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส คือ ซูเครสและมอลเตส เคยมีรายงานผลการทดสอบฤทธิ์ของ CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากยีสต์ พบว่า CIN, *o*-HCA และ *p*-MCA มีค่า IC₅₀ เท่ากับ > 5, > 5 และ 0.04 ± 0.01 mM ตามลำดับ [31] แต่การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากลำไส้เล็กของหนูขาวในครั้งนี้ พบว่า มีเฉพาะ *o*-HCA เท่านั้นที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าว โดยค่า IC₅₀ ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครส และมอลเตส เท่ากับ 0.68 ± 0.08 mM และ 2.71 ± 0.32 mM ตามลำดับ ดังนั้น จึงสรุปได้ว่า *o*-HCA น่าจะมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ โดยผ่านทางกลไกนี้ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่า IC₅₀ ของ *o*-HCA กับยาอะคาร์โบส พบว่า *o*-HCA มีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ ต่ำกว่ามาก จึงเป็นไปได้ว่า *o*-HCA อาจจะมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยผ่านทางกลไกอื่น เช่น เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความไวของเนื้อเยื่อต่ออินซูลิน เป็นต้น ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมติฐานนี้ นอกจากนี้ ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านการเสริมฤทธิ์ของ *o*-HCA กับยาอะคาร์โบสเพื่อลดปริมาณของอะคาร์โบสที่ใช้ ซึ่งอาจจะนำไปสู่การลดผลข้างเคียงที่เกิดจากอะคาร์โบส ได้แก่ อาการท้องอืด ท้องเฟ้อ มีแก๊สในกระเพาะอาหาร และท้องเสีย

จากการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนของ CIN และ *p*-MCA ในภาวะกระตุ้นด้วยกลูโคสความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion พบว่า *p*-MCA สามารถเสริมฤทธิ์ของน้ำตาลกลูโคสในการกระตุ้นตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินได้สูงสุดในนาทีที่ 34 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 0.2 % DMSO ที่ใช้เป็นตัวทำละลาย ดังนั้น *p*-MCA อาจช่วยแก้ไขภาวะเซลล์เบต้าหลังอินซูลินบกพร่องในระยะแรกของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจาก ภาวะ glucotoxicity และ lipotoxicity จะทำให้การหลั่งอินซูลินของเซลล์เบต้าเสียไป จึงทำให้เกิดความบกพร่องในการหลั่งอินซูลินในระยะแรกและการหลั่งอินซูลินในระยะที่สองต้องใช้เวลานานออกไป [58-59] นอกจากนี้ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ยังอาจเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ซึ่งเป็นภาวะที่อินซูลินมีความสามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยเนื้อเยื่อของผู้ป่วยที่สามารถเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ได้แก่ กล้ามเนื้อลาย ไขมัน และตับ ซึ่งเนื้อเยื่อเหล่านี้ทำหน้าที่ควบคุมสมดุลกลูโคสในร่างกาย กล้ามเนื้อลายเป็นเนื้อเยื่อที่สำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพราะสามารถเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และเป็นสาเหตุให้เกิด glucose intolerance ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้ เนื่องจาก กล้ามเนื้อลายเป็นเนื้อเยื่อที่จำเป็นต้องอาศัยอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ จึงจำเป็นต้องมี

ตัวรับ (receptor) ของอินซูลิน หลังจากอินซูลินจับกับตัวรับซึ่งเป็น trans-membrane receptor แล้ว จะกระตุ้นให้เกิด autophosphorylation ของ tyrosine kinase โดยผ่านทาง insulin receptor substrate (IRS) หลังจากนั้นจะไปกระตุ้น phospho - inositide - 3 kinase และ kinase อื่นๆ เพื่อให้มีการเคลื่อนย้ายของ GLUT - 4 ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ไปที่ผนังเซลล์เพื่อทำให้กลูโคสเข้ามาภายในเซลล์ หลังจากนั้น กลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น glucose -6 - phosphate โดยเอนไซม์ hexokinase และถูกเปลี่ยนเป็นไกลโคเจน โดย glycogen synthase (non-oxidative glucose metabolism) ส่วนหนึ่งของกลูโคสจะถูกเปลี่ยนเป็น lactate และส่วนหนึ่งจะเข้าสู่ Krebs cycle เพื่อสร้างพลังงานในรูปของ adenosine triphosphate หรือ ATP (oxidative glucose metabolism) นอกจากนี้ ภาวะดื้อต่ออินซูลินอาจเกิดจากความผิดปกติของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ insulin signaling pathway เช่น ความผิดปกติของตัวรับอินซูลิน, IRS, protein kinase, GLUT - 4 หรือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ glucose metabolism เช่น hexokinase, glycogen synthase เป็นต้น [6]

2. สรุปผลการวิจัย

1. CIN และ *o*-HCA สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวได้ อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ณ นาทีที่ 10 สำหรับ *p*-MCA สามารถลดได้ ณ นาทีที่ 5, 10 และ 90 ตามลำดับ หลังจากฉีดน้ำตาลกลูโคสเข้าหลอดเลือดดำในขนาด 0.25 ก./กก.

2. CIN และ *p*-MCA สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนในภาวะน้ำตาลปกติ (กลูโคสความเข้มข้น 5.5 mM) จึงเป็นไปได้ว่า กลไกที่เกี่ยวข้องในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารทั้งสอง คือ การกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน โดย *p*-MCA มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินสูงกว่า CIN

3. *p*-MCA สามารถเสริมฤทธิ์ของน้ำตาลกลูโคสในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ในขณะที่ CIN ไม่สามารถเสริมฤทธิ์ของน้ำตาลกลูโคสในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า *p*-MCA ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลได้ดีขึ้นในภาวะน้ำตาลสูงหรือภาวะเบาหวาน

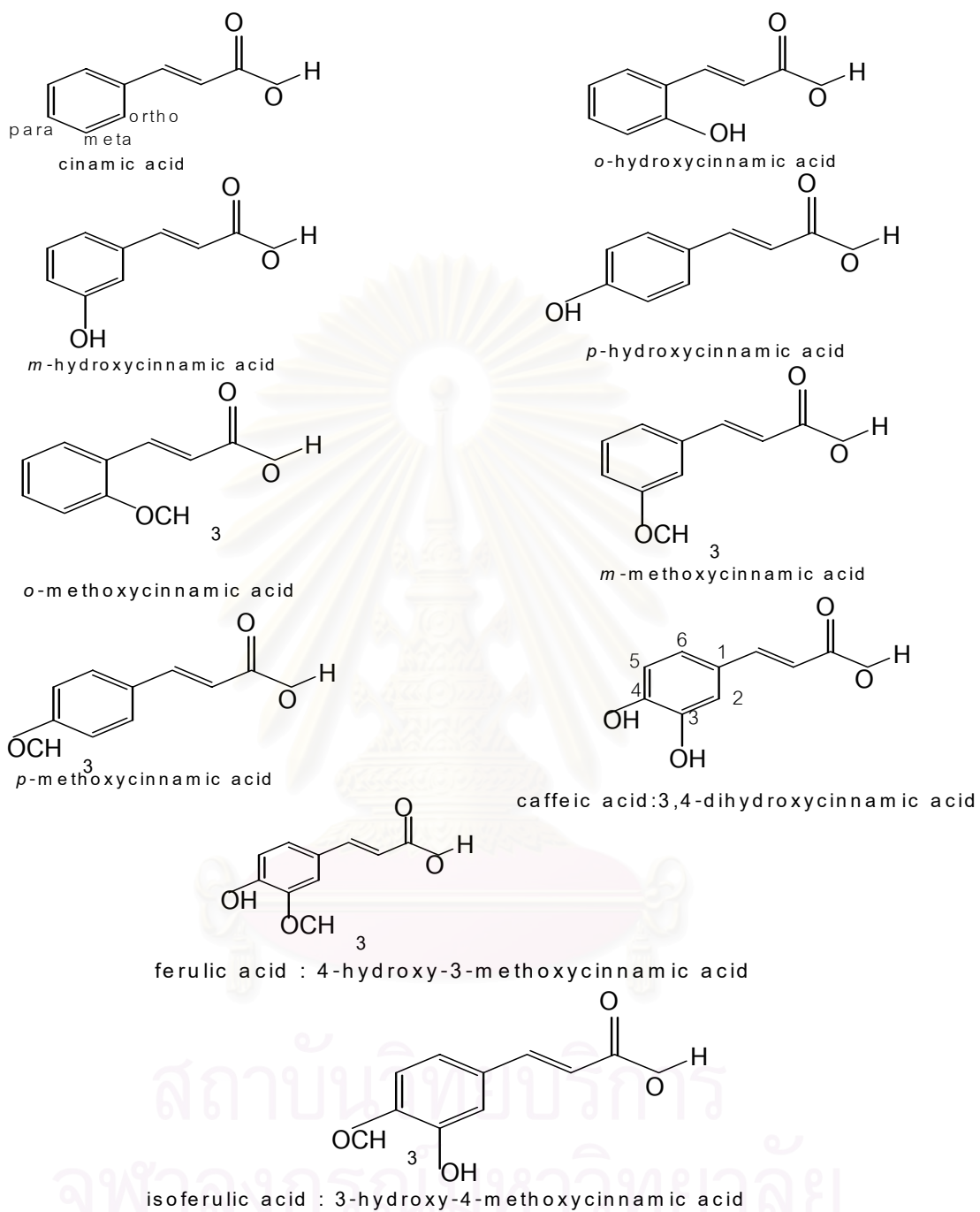
4. *o*-HCA มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสและมอลเตส โดยมีฤทธิ์ต่ำกว่าอะคาร์โบสคองข้างมาก สำหรับ CIN และ *p*-MCA ไม่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิด

3. ข้อเสนอแนะในการศึกษาเพิ่มเติม

1. ควรทดสอบฤทธิ์ของ *p*-MCA ต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินโดยตรงจากตับอ่อนในภาวะกระตุ้นด้วยกลูโคส 10 มิลลิโมลาร์ โดยเทคนิค *In situ* pancreatic perfusion เป็นเวลานานกว่า 10 นาที เพื่อตรวจสอบว่า *p*-MCA สามารถกระตุ้นการหลั่งอินซูลินในระยะที่ 2 ได้หรือไม่ ถ้าสามารถกระตุ้นตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินได้อาจช่วยเสริมฤทธิ์ของกลูโคสให้หลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้นเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดให้เป็นปกติโดยผ่านกลไกการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน และการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์

2. ควรศึกษาขนาดของ *o*-HCA ที่เหมาะสมต่อการเสริมฤทธิ์ของอะคาร์โบสให้มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดระดับน้ำตาลในสัตว์หรือผู้ป่วยเบาหวานแต่มีผลข้างเคียงน้อยที่สุด

3. ควรนำสาร CIN, *p*-MCA และ *o*-HCA มาศึกษาถึงกลไกการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ของกล้ามเนื้อลายและไขมันเพื่อลดระดับน้ำตาลในเลือดต่อไป



ภาพที่ 10 แสดงสูตรโครงสร้างของกรดคาเฟอิก กรดเฟอร์ริก และกรดไอโซเฟอร์ริกเปรียบเทียบกับกรดซินนามิกและอนุพันธ์ [55-56]

รายการอ้างอิง

1. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.techmedica.com/diabeticine.html> [2005, Aug 10]
2. World Health Organization. Country and regional data. [Online]. Available From : <http://www.who.int/diabetes/facts/worldfigures/en/print.html> [2004, Sep 28]
3. อรพรรณ มาตังคสมบัติ. 2544. ยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน. กรุงเทพฯ : แสงเทียนการพิมพ์,
4. Tewari N., Tiwari V.K., Mishra R.C., Tripathi R.P., Srivastava A.K., Ahmad R., Srivastava R. and Srivastava B.S. 2003. Synthesis and Bioevaluation of Glycosyl Ureas as α - Glucosidase Inhibitors and Their Effect on Mycobacterium. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 11 : 2911-2922.
5. อภิชาติ วิชญาณรัตน์. 2524. ตำราโรคเบาหวาน. กรุงเทพฯ : สมาคมต่อมไร้ท่อแห่งประเทศไทย,
6. Nelson, R.W. Disorders of the endocrine pancreas. In : Essentials of Small Animal Internal Medicine. Nelson, R.W. and Couto, C.G. (eds). St. Louis, Mosby – Year book, 1992, p 561 – 586. อ้างอิงโดย ชลลดา บุรณกาล. โรคเบาหวานในสุนัขและแมว. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ 14 (มกราคม- มีนาคม 2545) : 33-55.
7. Feldman E. C. and Nelson R. W. Diabetes mellitus. In : Canine and Feline Endocrinology and Reproduction. Philadelphia, WB Saunders, 1996, pp 330-391 อ้างอิงโดย ชลลดา บุรณกาล. โรคเบาหวานในสุนัขและแมว. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ 14 (มกราคม-มีนาคม 2545) : 33-55.
8. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.all-creatures.com/456036.html> [2005, July 29]
9. Nazor N. 2005. Understanding How Insulin Works. [Online]. New York Times Company. Available from : <http://www.diabetes.about.com/od/insulinpills/a/insulinaction.p.htm> [2005, Sep 21]
10. ชลลดา บุรณกาล. โรคเบาหวานในสุนัขและแมว. วารสารสัตวแพทย์ผู้ประกอบการบำบัดโรคสัตว์ 14 (มกราคม-มีนาคม 2545) : 33-55.

11. Anonymous. (n.d.). [Online]. Available from : http://www.felinediabetes.com/advances_in_the_treatment_of_Diabetes_in_Cats.html [2005, July 29]
12. Anonymous. (n.d.). [Online]. Available from : http://www.feline_diabetes.com/cat-urination-problems.htm [2005, July 29]
13. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.executec.com/diabetes.htm> [2005, Aug 10]
14. Anonymous. (n.d.). [Online]. Available from : <http://www.vet.cornell.edu/fhc/resources/brochure/diabetes/html#top>, [2005, Aug 10]
15. Zoe Clask. 2003. Diabetes mellitus in a 6-month-old Charolais heifer calf. Canada Veterinary Journal. 44 : 921-922.
16. Steven L. Stockham and Michael A. Scott. 2002. Fundamental of veterinary clinical pathology : Glucose and related regulatory hormones. U.S.A. : Blackwell Publishing Company,
17. Anonymous. (n.d.). [Online]. Available from : http://www.canine_diabetes.org/caninsulin.html [2005, Aug 10]
18. กมลวรรณ ศรีปลั่ง. 2546. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและผลต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินของสารสกัดจากใบหญ้าหนวดแมวในหนูขาวปกติและหนูเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสเตรปโตโซโตซิน. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต. เกษัตริย์วิทยา(สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
19. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.sportsci.swu.ac.th/EXP/diabete/2.htm> [2005,July 29]
20. Rang, H.p., Dale, M.M., Ritter, J.M. and Gardner P. 2001. Pharmacology. 4thed. USA. : Churchill Livingstone,
21. Hanefeld M. 1998. The role of acarbose in the treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. Journal of Diabetes and Its Complications. 12 : 228-237.
22. Anonymous. (n.d.). [Online]. Available from : <http://www.vetmed.auburn.edu/sac/mededu/diabetes/gange.html> [2005, Aug 10]
23. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.vetsulin.com> [2005,

Aug 10]

24. Shenfield G.M. 2001. Drug interaction with oral hypoglycaemic drugs. Australian Prescriber. 24 : 83-85.
25. Yasuda K., Shimowada K., Uno M., Odaka H., Adachi T., Shihara N., Suzuki N., Tamon A., Nagashima K., Hosokawa M., Tsuda K. and Seino Y. 2003. Long-term therapeutic effects of voglibose, a potent intestinal alpha-glucosidase inhibitor, in spontaneous diabetes GK rats. Diabetes research and Clinical Practice. 59 : 113-122.
26. Cherkaoui S., Daali Y., Christen P. and Veuthey J. L. 1998. Development and Validation of liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for acarbose determination in pharmaceutical tablets. Journal of Pharmaceutical and biomedical Analysis. 18 : 729-735.
27. Plumb D.C. 2005. Insulin. Plum's veterinary drug handbook. 5th ed. Iowa : Blackwell publishing professional,
28. Vichayanrat A., Ploybutr S., Tunlakit M., and Watanakejorn P. 2002. Efficacy and safety of voglibose in comparison with acarbose in type 2 diabetic patients. Diabetes Research and Clinical Practice. 55 : 99 -103.
29. Matsui T., Ueda T., Oki T., Sugita K., Terahara N. and Matsumoto K. 2001. α -Glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. 1. Survey of natural pigments with potent inhibitory activity. Journal of Agriculture Food Chemistry. 49 : 1948-1951.
30. Masumoto T., Ishikawa M., Yamauchi Y., Hiasa Y., Yamamoto K., Iuchi H., Ohkubo K., Fazle Akbar S. M., Michitaka K., Horiike N. and Onji M. 1996. Drug-induced hepatitis with severe cholestasis due to voglibose. International Hepatology Communications. 5 (1996) : 289-296.
31. Adisakwatta S., Sookkongwaree K., Roengsumran S., Petsom A., Ngamroja na vanich N., Chavasiri W., Deesamer S. and Yibchok-anun S. 2004. Structure-Activity Relationships of trans – cinnamic Acid Derivatives on α - Glucosidase Inhibition. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 14

: 2893-2896.

32. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : [http://www.eesh.kmutt.ac.th/html/emergency_detail_T.asp?PRODUCT_NAME_E=Cnamic %20Acid](http://www.eesh.kmutt.ac.th/html/emergency_detail_T.asp?PRODUCT_NAME_E=Cnamic%20Acid)
[2005, Aug 21]
33. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : [http://www.lbibli.org/herbmed/electic/bpc1911/acidum - cinn.html](http://www.lbibli.org/herbmed/electic/bpc1911/acidum-cinn.html) [2004, July 15]
34. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/44374.htm> [2006,Jan 29]
35. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/53017.htm> [2006,Jan 29]
36. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : [http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/61981 .htm](http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/61981.htm) [2006,Jan 29]
37. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : [http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/32426 .htm](http://www.coleparmer.com/catalog/Msds/32426.htm) [2006,Jan 29]
38. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.acros.be/ecommerce/specs.asp> [2005, Sep 29]
39. Anonymous.(n.d.). [Online]. Available from : <http://www.drug.pharmacy.psa.ac.th> [2004, July 15]
40. Neogi P., Lakner F. J., Medicherla S., Cheng J., Dey D., Gowri M., Nag B., Sharma S. D., Pickford L. B. and Gross C. 2003. Synthesis and Structure- Activity Relationship Studies of Cinnamic Acid-based Novel Thiazolidine dione Antihyperglycemic Agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11 : 4059-4067.
41. Feng-Lin. H., Yun-Chueh. C. and Juei-Tang. C. 2000. Caffeic acid as Active Principle from the Fruit of *Xanthium strumarium* to Lower Plasma Glucose in Diabetic Rats. Planta Medica. 66 : 228-230.
42. Yibchock-anun, S., Cheng, H., Heine, P.A, Hsu, W.H. 1999. Characterization of receptors mediating AVP- and OT- induced glucagon release from the rat pancreas. American Journal of Physiology. 277 (Endocrinol metab.40) :

E56-E62.

43. Oki, T., Mastsui, T., and Osajima, Y. 1999. Inhibition effect of alphasglucosidase inhibitors varies according to its origin. Journal of Agriculture Food Chemistry. 47 : 550-553.
44. Josse R. G. and Cheng A. Y.Y. 2004. Intestinal absorption inhibitors for type 2 diabetes mellitus : prevention and treatment. Drug discovery today : therapeutic strategies. 1 : 201-206.
45. วลัยยา จิตตประสาทศีล. 2547. ฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดแห้งต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติและหนูเบาหวาน. วิทยานิพนธ์ระดับมหาบัณฑิต. เกษตรศาสตร์ (สหสาขาวิชา) บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
46. Broca C., Gross R., Petit P., Sauvaire Y., Manteghetti M., Tournier M., Masiello P., Gomis R. and Ribes G. 1999. 4-hydroxyisoleucine : experimental evidence of its insulinotropic and antidiabetic properties. American Physiological Society. : E671-E623.
47. Noor H. and Ashcroft S. J. H. 1989. Antidiabetic effects of *Tinospora crispa* in rats. Journal of Ethnopharmacology. 27 : 149-161.
48. Yoshikawa M., Morikawa T., Matsuda H., Tanabe G. and Myraoka O. 2002. Absolute Stereostructure of Potent α - Glucosidase Inhibitor, Salacinol, with Unique Thiosugar Sulfonium Sulfate Inner Salt Structure from *Salacia reticulata*. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 10 : 1547-1554.
49. Matsura H., Asakawa C., Kurimoto M., and Mizutani J. 2002. α - Glucosidase Inhibitor from the Seeds of Balsam Pear (*Momordica charantia*) and the fruit Bodies of *Grifola frondosa*. Bioscience Biotechnological Biochemistry. 66 (7) : 1576-1578.
50. ภิญโญ กมลรัตนกุล, มนต์ชัย ชาลาประวรรตน์ และ ทวีสิน ต้นประยูร. 2545. หลักการทำให้วิจัยให้สำเร็จ. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด,
51. กัลยา วานิชย์บัญชา. 2544. การใช้ SPSS for Windows ในการวิเคราะห์ข้อมูล. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,

52. กัลยา วานิชย์บัญชา. 2545. หลักสถิติ. พิมพ์ครั้งที่ 7. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์แห่ง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย,
53. Adisakwattana S., Roengsamran S., Hsu WH., and Yibchok-anun S. 2005. Mechanism of antihyperglycemic effect of p-methoxycinnamic acid in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Life Science. 78 (4) : 406-412.
54. Hsu, FL., Chen, YC. and Cheng, JT. 2000. Caffeic acid as Active Principle from the Fruit of *Xanthium strumarium* to Lower Plasma Glucose in Diabetic Rats. Planta Medica. 66 : 228-230.
55. Liu, IM., Chen, WC. And Cheng, JT. 2003. Mediation of β -Endorphin by Isoferulic Acid to Lower Plasma Glucose in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. The Journal of Pharmacology and Experimental therapeutics. 307 (3) : 1196-1204.
56. Nomura, E., Kashiwada, A., Hosoda, A., Nakamura, K., Morishita, H., Tsuno, T. and Taniguchi, H. 2003. Synthesis of amide compounds of ferulic acid, and their stimulatory effects on insulin secretion in vitro. Bioorganic & Medicinal Chemistry 11: 3807-3813.
57. Lee Hoi-Seon. 2002. Inhibitory activity of Cinnamomum cassia bark-derived component against rat lens aldose reductase. Journal of Pharmacology Pharmaceutical Science. 5 (3) : 226-230.
58. Steppel, JH. and Hortons ES. 2004. Beta-cell failure in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. Current Diabetic Report. 4(3) : 169-75.
59. Scheen, AJ. 2004. Pathophysiology of insulin secretion. An Endocrinol (Paris). 65 (1) : 29-36.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การทดสอบความทนต่อกลูโคสทางกระแสโลหิต (Intravenous Glucose Tolerance Test : IVGTT)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความทนของร่างกายต่อน้ำตาลกลูโคสที่ได้รับทางหลอดเลือดดำ
2. เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในระดับพื้นฐานก่อนเริ่มการทดลองและหลังจากให้น้ำตาลกลูโคส ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. หลอดทดลองก้นกรวยขนาดเล็ก 0.65 มล. (ไมโครทิวบ์ 0.65 มล.)
2. หลอดทดลองก้นกรวยขนาดเล็ก (ไมโครทิวบ์ 1.5 มล.)
3. ถาดใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก ขนาด 40 หลุม
4. เครื่องปั่นความเร็วสูง (Biofuge 25)
5. เครื่องปั่นผสม (Vertex mixer)
6. เครื่องให้ความร้อน (Heat pad)
7. เครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ (Microplate leader)
8. ไมโครเพลท ขนาด 96 หลุม (Microplate)
9. ปากคีบเนื้อเยื่อ (Forceps)
10. กรรไกรตัดเนื้อเยื่อ (Tissue scissors)
11. ผ้ากอซซับเลือด (Beda pass)
12. ด้ายสำหรับมัดเส้นเลือด (Silk)
13. แผ่นรองกันเปื้อน
14. เทปกาว
15. เข็มฉีดยาพลาสติกที่มีแกนเหล็ก เบอร์ 24 G (IV catheter)
16. กระบอกฉีดยาขนาดเล็กพร้อมเข็ม (Tuberculin syringe sets)
17. เครื่องดูดสารละลายขนาดเล็ก (Micro pipete)
18. นาฬิกาจับเวลา (An alarm clock)

19. กรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง
20. วัสดุรองพื้นกรงสัตว์ทดลอง เช่น ขี้เลื่อย
21. ขวดใส่น้ำดื่มพร้อมจุกให้สัตว์ทดลอง
22. อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดสำหรับสัตว์ทดลอง (Rodent pellet food)
23. สารละลายน้ำตาลกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ (50 % glucose)
24. สารป้องกันเลือดแข็งตัว (Heparin)
25. สารละลายน้ำเกลือ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ (0.9 % normal saline)
26. ยาสลบ เพนโตบาร์บิทอลโซเดียม (Pentobarbital Sodium)

สัตว์ทดลองที่ใช้

1. หนูขาว เพศผู้ (Wistar rat) น้ำหนักประมาณ 300 – 350 กรัม / ตัว

สถานที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง

1. ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตึก 60 ปี ชั้น 8
2. ควบคุมแสงสว่างในห้องเลี้ยงสัตว์เป็น กลางวันและกลางคืน อย่างละ 12 ชั่วโมง
3. ให้กินอาหารและน้ำ อย่างเต็มที่ (Feed and water ad libitum)

วิธีการทดลอง

1. นำหนูมาเลี้ยงให้ชินกับสภาพห้องเลี้ยงสัตว์ เป็นเวลาอย่างน้อย 7 วัน
2. อดอาหารหนูที่จะนำมาทำการทดลองเป็นเวลา 12 – 18 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง
3. ชั่งน้ำหนักหนูทดลอง เพื่อนำมาคำนวณปริมาตรยาสลบที่จะฉีดให้หนูทดลองก่อนทดลอง
4. ฉีดยาสลบเข้าช่องท้องหนูทดลองและรอให้หนูสลบ จากนั้นจับหนูนอนหงายอยู่บนเครื่องให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และใช้เทปกาวยึดขาทั้ง 4 ข้างของหนู
5. ใช้ปากคีบเนื้อเยื่อ จับผิวหนังตรงบริเวณขาหนีบขึ้น (ซ้าย หรือขวาตามที่ถนัด) แล้วใช้กรรไกรตัดเป็นแนวเส้นตรงวิ่งเข้าไปหาโคนขา และใช้กรรไกรแหวก (Blunt dissection) เนื้อเยื่อออก หาเส้นเลือดฟิเมอร์อลเวน (femoral vein)
6. ใช้ เข็มพลาสติกที่มีแกนเหล็ก เจาะเข้าเส้นเลือด Femoral vein แล้วใช้เทปกาวพันเข็มให้ติดกับขาของหนูไม่ให้เลื่อนหลุด และพักหนูเอาไว้ 10 นาที

7. นำ tuberculin syringe ที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว หล่ออยู่ภายใน เก็บเลือดก่อนให้ กลูโคส ณ เวลา 30 และ 0 นาที ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ 1.5 มล. จำนวน 0.5 มล. ซึ่งมีสาร ป้องกันเลือดแข็งตัวหล่ออยู่ 10 มคล.(μL .)
8. ชีดกลูโคส ขนาด 0.25 กรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ซึ่งอยู่ใน tuberculin syringe ที่เตรียม เอาไว้ เข้าหลอดเลือดดำ ในข้อ 7 หลังจากเก็บเลือด นาทีที่ 0 ก่อนให้กลูโคส
9. นำ tuberculin syringe ที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัวหล่ออยู่ภายในมาเก็บเลือด หลังให้ กลูโคส ที่เวลา 0, 5, 10, 30, 60, 90 และ 120 นาที ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ปริมาตร 0.5 มล. ซึ่งมีสารป้องกันเลือดแข็งตัวหล่ออยู่ 10 มคล.
10. นำเลือดในข้อ 7 และ ข้อ 9 ปั่นในเครื่องปั่นความเร็วสูง ที่ความเร็ว 2,500 รอบ / นาที นาน 3 นาที
11. ใช้ไมโครปิเปตดูดพลาสมา ในข้อ 10 จำนวน 30 มคล. ใส่ในหลอดไมโครทิวบ์ 0.65 มล. เตรียมนำไปทดสอบหาความเข้มข้นของกลูโคสต่อไป
12. ใช้ไมโครปิเปตดูดพลาสมาในข้อ 11 จำนวน 10 มคล. ใส่ในหลอดทดลองแก้ว แล้วเติม PGO Reagent 1 มล. และบ่ม (Incubate) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
13. นำไมโครเพลทเปล่า มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ ที่ระดับ ความยาวคลื่นแสง 450 นม. (nm.) เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐาน (Blank)
14. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายในข้อ 12 และสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้น ต่างๆ อย่างละ 200 มคล. ใส่ในไมโครเพลท หลุมละ 1 ความเข้มข้น จากนั้นนำไปวัดค่า การดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท รีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นม.
15. นำค่าการดูดกลืนแสงในข้อ 14 ลบ ค่าการดูดกลืนแสงในข้อ 13 จึงได้ค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลายกลูโคสที่แท้จริง
16. นำข้อมูลในข้อ 15 แทนค่าในสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear Regression) ระหว่าง ค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และนำค่า ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสที่ได้ มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความ เข้มข้นของสารละลายกลูโคสกับระยะเวลาก่อนและหลังการให้สารละลายกลูโคส

ภาคผนวก ข

วิธีการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Glucose Oxidase Test)

1. เตรียม Peroxidase-glucose oxidase enzyme (PGO enzyme) solution โดยนำ PGO enzyme 1 แคปซูล มาละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ในขวดสีชา
2. เตรียม Colour reagent solution นำ o-dianisidine dihydrochloride 1 ขวด (50 มก.) ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.
3. นำ Colour reagent solution มา 1.6 มล. ผสมกับ PGO enzyme solution 100 มล. เขย่าให้เข้ากัน เก็บในขวดสีชา และเรียกสารละลายนี้ว่า PGO reagent
4. เตรียม glucose standards ที่ 0, 18.75, 37.50, 75, 150 และ 300 มก./มล.
5. ใช้ไมโครปิเปตดูดพลาสมาหรือตัวอย่างที่จะทดสอบ จำนวน 10 มคล. ใส่ในหลอดทดลองแก้ว แล้วเติม PGO reagent 1 มล. และ บ่มใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
6. นำไมโครเพลทเปล่า มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นม. เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐาน
7. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายในข้อ 4 และสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ อย่างละ 200 มคล. ใส่ในไมโครเพลท หลุมละ 1 ความเข้มข้น จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นม.
8. สร้าง standard curve ของ glucose standard จากค่าดูดกลืนแสง
9. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสจาก standard curve

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

การเตรียมความเข้มข้นของกลูโคสมาตรฐาน (Standard Glucose)

1. นำกลูโคส (D (+) – glucose monohydrate) จำนวน 0.0033 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1 มล. ใส่ใน ไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 300 มก./ มล.
2. ดูดสารละลายในข้อ 1 จำนวน 0.5 มล. ผสมกับ น้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. ใส่ในไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 150 มก./ มล.
3. ดูดสารละลายในข้อ 2 จำนวน 0.5 มล. ผสมกับ น้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. ใส่ในไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 75 มก./ มล.
4. ดูดสารละลายในข้อ 3 จำนวน 0.5 มล. ผสมกับ น้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. ใส่ในไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 37.5 มก. / มล.
5. ดูดสารละลายในข้อ 4 จำนวน 0.5 มล. ผสมกับ น้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. ใส่ในไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 18.75 มก. / มล.
6. ดูดน้ำกลั่น จำนวน 0.5 มล. ใส่ใน ไมโครทิวบ์ 1.5 มล. ทำให้สารละลายกลูโคส มีความเข้มข้น 0 มก. / มล.
7. นำไมโครเพลทเปล่า มาวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นม. เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐาน
8. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายในข้อ 1 - 6 จำนวน 200 มคล. ใส่ในไมโครเพลท จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นม. ทำให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ
9. นำค่าการดูดกลืนแสงในข้อ 8 ลบ ด้วยค่าการดูดกลืนแสงในข้อ 7 จะได้เป็นค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสที่แท้จริง
10. นำข้อมูลในข้อ 9 ไปเขียนกราฟแสดงค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และหาค่าสมการความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง (Linear regression)

ภาคผนวก ง

Insitu Pancreatic Perfusion

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาว่า สารทดสอบสามารถกระตุ้นการหลั่ง อินซูลิน กลูคากอน และ ฮอริโมนหรือสารอื่นๆ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปส หรือ อะไมเลส ผ่านเข้าและออกจากรวัยวะ(ตับอ่อน)ด้วยอัตราเร็วคงที่(1มล./นาที)ที่ไม่ทำลายเซลล์ที่กำลังศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

1. Perfusion pump (Gilson Minipuls III) เพื่อให้สารทดสอบมีอัตราการไหลคงที่
2. Perfusion pressure ต้องทำให้ Hydrostatic pressure คงที่ ประมาณ 40- 100 มิลลิเมตรปรอท (50 cmH₂O) หรือ อัตรา 1 มล./ นาที

วิธีการทดลอง

1. อดอาหารหนูขาว ก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง
2. ชั่งน้ำหนักหนูขาวเพื่อนำมาคำนวณปริมาณยาสลบ Pentobarbital sodium โดยใช้ขนาด 45 - 60 มก. / กก.
3. นำยาสลบที่คำนวณได้ฉีดเข้าช่องท้อง และรอให้หนูสลบ
4. เมื่อหนูสลบแล้วจับหนูนอนหงาย อยู่บน Heat pad เหยียดขาทั้ง 4 ข้างออก แล้วใช้เทปกาวยึดขาหนูทั้ง 4 เอาไว้
5. ใช้ปากคีบแบบมีเขี้ยวจับผิวหนังตรงบริเวณหน้าท้องขึ้นมาแล้วใช้กรรไกร ตัดผิวหนัง เปิดขึ้นไปถึง xiphoid region จากนั้นใช้ปากคีบแบบมีเขี้ยวจับกล้ามเนื้อ rectus abdominis แล้วตัดเปิดเข้าไปในช่องท้อง จนพบอวัยวะต่างๆในช่องท้อง เช่น กระเพาะอาหาร ลำไส้ ม้าม ตับ เป็นต้น ระวังอย่าทำให้อวัยวะได้รับอันตราย
6. หาบบริเวณรอยต่อระหว่าง esophagus กับ กระเพาะอาหารส่วนต้นที่ไม่มีตับอ่อนเกาะอยู่ (# 1) จากนั้นใช้ด้ายมัดเป็น 2 เปาะ และตัดตรงบริเวณระหว่างเปาะทั้ง 2
7. เอากระเพาะอาหาร ม้าม ตับอ่อน และลำไส้ส่วนดูโอไดนิ้มทั้งหมดออกมาห่อด้วยผ้าก๊อซที่ชุ่มด้วยน้ำเกลืออุ่นหล่อเลี้ยงไม่ให้อวัยวะดังกล่าวแห้ง
8. หาเส้นเลือดแดง superior mesenteric artery (# 2) และ ใช้ด้ายผูก 2 เปาะแล้วตัดตรงกลางระหว่างเปาะทั้ง 2

9. หาเส้นเลือดแดงใหญ่ aorta artery ที่อยู่ตรงกลางช่องท้องส่วนบนแล้วให้แยกส่วนที่ติดตัวออก จากนั้นใช้กรรไกรที่หนีบห้ามเลือด (artery forcep) หนีบเส้นเลือดดังกล่าว(#3) ตรงตำแหน่งที่เหนือจุดเริ่มต้นของเส้นเลือดแดง coeliac axis ที่แตกแขนงออกมา และใช้ค้ำยผูกเส้นเลือด aorta artery ตรงบริเวณต่ำกว่าจุดที่เส้นเลือด coeliac axis แยกออกมา (# 4)
10. ตัดเส้นเลือดแดง aorta artery ตรงตำแหน่งที่ต่ำกว่า # 3 และเหนือจุดที่ coeliac axis แยกออกมา แต่สูงกว่าตำแหน่ง # 4 และต่ำกว่าจุดที่ coeliac axis แยกออกมา จากนั้นใช้กรรไกรตัดเปิด เส้นเลือด aorta artery เพื่อหาจุดที่เป็นจุดเริ่มต้นของเส้นเลือด coeliac axis
11. เอาท่อ artery cannulae ที่มี medium อุ่นๆอยู่เต็มตลอดเวลา สอดเข้าไปตรงรูเปิดที่เป็นตำแหน่งเริ่มต้นของเส้นเลือด coeliac axis ควรสอดท่อให้เสถียรเร็วที่สุดไม่เกิน 4 นาที มิเช่นนั้นเซลล์ของตับอ่อนจะตาย
12. เอาท่อ venous cannulae ใส่เข้าเส้นเลือดดำ portal vein และใช้ค้ำยผูกท่อเอาไว้ การเก็บตัวอย่างให้เก็บจากท่อนี้
13. ทำให้หนูตายอย่างสงบโดยใช้กรรไกรเปิดผ่าผนังชั้นช่องอกและช่องท้องออก ให้เป็น positive pressure ภายหลังจากใส่ท่อและเริ่มให้มีการไหลของสารเรียบร้อยแล้ว
14. หาลำไส้ส่วน duodenum (# 5) และ ใช้ค้ำยผูก 2 เปาะ จากนั้นตัดตรงกลางระหว่างเปาะ ทั้ง 2 ส่วนของลำไส้ที่อยู่ต่ำกว่า duodenum ให้เอาออกจากตัวหนูเพื่อป้องกันไม่ให้มีเลือดไหลออกมา
15. เมื่อใส่ท่อเสถียรเรียบร้อยแล้ว ให้ปล่อยสาร oxygenate KRB เป็นเวลา 15- 20 นาที เพื่อให้เลือดที่อยู่ในตับอ่อนออกมาให้หมดจนเห็นเป็นน้ำสีใสๆไหลออกมา
16. ทำการเก็บของเหลวที่ไหลออกมาจากตับอ่อนก่อนให้สารใดๆ ทุก 2 นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐานในระยะเวลาพัก (basal period)
17. ทำการให้สารทดสอบ (treatment) และเก็บของเหลวที่ไหลออกมา ทุก 1 นาที ตามเวลาที่กำหนด 10 นาที เพื่อนำไปวิเคราะห์หาสิ่งที่ต้องการ ต่อไป
18. ใช้ oxygenate KRB ล้างสารทดสอบออกจากตับอ่อนให้หมด (wash out) และเก็บของเหลวมาตรวจทุก 1 นาทีเป็นเวลา 10 นาที เพื่อนำของเหลวมาวิเคราะห์ดูว่า เมื่อหยุดให้สารทดสอบ (agonist) แล้ว ตับอ่อนกลับมาทำงานตามปกติ หรือไม่ เมื่อเทียบกับ

ระยะพัก ถ้าไม่กลับมาเป็นปกติจะไม่นำสารทดสอบ มาใช้เป็นยา ถือว่า ทำให้เกิดความ เป็นพิษต่อตับอ่อน

19. ให้ กรดอะมิโน เช่น อาร์จินีน (Arginine) หรือ ตัวกระตุ้นอื่นๆ(glucose 10 mM.) เพื่อใช้ เป็น positive control หลังจากทำข้อ 18 ดูว่า ตับอ่อนถูกกระตุ้นได้หรือไม่ 5 ถ้าถูก กระตุ้นได้แสดงว่าเซลล์เบต้ายังคงสภาพปกติอยู่ตลอดการทดลอง
20. นำ ตัวอย่างของเหลว ที่เก็บได้จาก ข้อ 16 – 19 ไปตรวจหาระดับฮอร์โมน อินซูลิน ด้วยวิธี radioimmuno assay (RIA) ต่อไป

ข้อดีของ Insitu Pancreatic Perfusion

1. superficial and deep islets จะได้รับออกซิเจนเท่ากัน ในทาง สรีรวิทยา
2. islets มีความสัมพันธ์กับเซลล์อื่นๆ และ เนื้อเยื่อของอวัยวะต่างๆ เช่น เส้นเลือด และ เส้นประสาท
3. เส้นประสาทภายในที่ควบคุมการทำหน้าที่ของต่อมยังทำงานอยู่ แต่เส้นประสาทด้าน นอกที่ควบคุมเสียไป
4. ทำการทดลองได้ทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในตับอ่อนเดียวกัน
5. สามารถตรวจดูว่าเซลล์และเนื้อเยื่อยังมีชีวิตอยู่ในขณะทดลองหรือไม่ โดยการทำให้ Electron microscope หรือ ดูระดับอินซูลิน และ กลูคากอน ที่หลั่งออกมาซึ่งมีรูปแบบไม่ เหมือนกัน

ข้อเสียของ Insitu Pancreatic Perfusion

1. เป็นเทคนิคที่ยากต้องอาศัยความชำนาญทางศัลยกรรม และ ถ้าใช้เวลาทำนานๆอาจทำ ให้เกิดผลย้อนกลับได้
2. เนื้อเยื่อที่มาจากต้นกำเนิดต่างกัน เมื่อถูก perfusion จะให้ผลที่แตกต่างกันในการแปรผล การทดลอง
3. ภายในตับอ่อนจะมี islets อยู่เป็นจำนวนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักของตับอ่อน สามารถใช้เทคนิคนี้กับเนื้อเยื่อที่ไม่ใช่ตับอ่อน เช่น กระจกเพา ลำไส้ส่วนดูโอดินัม เป็นต้น

ข้อควรระวังและจุดวิกฤติ

1. หลังจากทำ perfusion แล้ว สามารถนำตับอ่อนไปทำ จุลกายวิภาคได้ภายใน 2 ชั่วโมง
2. ปริมาณออกซิเจนสะสม ที่ตับอ่อนต้องการต้องมีอัตราการไหลของออกซิเจน 1-2 มล./นาที่ หรือ 1.3 กรัม/น้ำหนักเปียก หรือ 0.3 กรัม/น้ำหนักแห้ง
3. pH ที่ตับอ่อนต้องการเมื่อมีสารผ่านเข้าออก คือ pH 7.3 ซึ่งบัฟเฟอร์เป็นตัวช่วยปรับได้

4. Insulin output ใช้ดูการตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วยกลูโคสในช่วงเวลาที่ต่างๆ ที่เราทำการ perfusion
5. Ionic composition of the medium : ถ้าความเข้มข้นของ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) ต่ำ จะมีผลไปยับยั้งการหลั่งอินซูลินได้
6. Inhibitor of protein synthesis : Puromycin จะยับยั้งการสังเคราะห์อินซูลินได้
7. Synthesis and / or release of enzyme : มีข้อมูลว่า Amylase หรือ Lipase จะคงอยู่ในระดับเส้นตรงเป็นเวลา 40 นาที แล้วจะตกลงไป เนื่องจาก การสลายของเอนไซม์ หรือ ไม่มี การสร้างเอนไซม์ ขึ้นมาใหม่
8. Tissue sampling ก่อนและในระหว่าง perfusion : ให้ทำการตัดส่วนปลายของตับอ่อน ที่ผ่านการ perfusion ตลอดเวลาดูว่า มีปัญหาหรือไม่
9. Increasing vascular resistance / interstitial edema : เป็นอาการที่แสดงให้รู้ว่า การ perfusion เกิดความล้มเหลว โดยเฉลี่ยจะเกิดขึ้นหลังทำ perfusion 2-3 ชั่วโมง
10. ลักษณะกายภาพของอวัยวะที่ผ่านการ perfusion จะมีการตอบสนองได้น้อยมาก

ภาคผนวก จ

วิธีการเตรียม Rat insulin standard(Calibration curve)

มี Rat insulin (RI) 1 μg อยู่ในไมโครทิวบ์ ขนาด 1 มล. ใส่น้ำกลั่น 1 มล. จะได้ ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g} / \text{ml}$ จากนั้นเทใส่บีกเกอร์ขนาด 10 มล. เติมน้ำกลั่นอีก 4 มล. จึงมีความเข้มข้น 200,000 pg / ml ให้ดูดใส่ไมโครทิวบ์ ขนาด 0.65 มล. จำนวน 250 มล. (Stock)

วิธีการเตรียม Serial Dilution โดย

1. เอา Stock 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 100,000 pg / ml I
2. เอา I 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 50,000 pg / ml H
3. เอา H 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 25,000 pg / ml G
4. เอา G 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 12,500 pg / ml F
5. เอา F 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 6,250 pg / ml E
6. เอา E 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 3,125 pg / ml D
7. เอา D 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 1,562.5 pg / mlC
8. เอา C 250 มล. ใส่ KRB 250 มล. จะได้ความเข้มข้น 781.25 pg / mlB
9. ใส่ KRB 500 มล. จะได้ความเข้มข้น 0.0 pg / mlA

วิธีการวัด Radioimmunoassay

1. เตรียม tracer (125 I) ผสมน้ำกลั่น 100 มล. ในขวดสีชา เขย่าให้เข้ากัน
2. เตรียม human insulin standard และตัวอย่างที่ทราบปริมาณอินซูลิน ตามคู่มือบริษัท และดูความเข้มข้นละ 200 มล. ผสมกับ tracer 1 มล. ใส่ใน Anticoat tube สีเขียว (ถ้าตัวอย่างที่ทราบค่าอยู่ในเกณฑ์ปกติ สามารถนำตัวอย่างมาตรวจกับ trace นี้ได้)
3. เตรียม rat insulin standard และใช้ความเข้มข้นละ 200 มล. ผสม tracer 1 มล.
4. นำตัวอย่างที่เตรียมไว้ ความเข้มข้นละ 200 มล. ผสมกับ tracer 1000 มล.
5. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 18-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง
6. เทน้ำใน Anticoat tube ทิ้งและเคาะออกให้หมด
7. วัดปริมาณ Antiinsulin ที่เคลือบอยู่ในหลอดด้วยเครื่อง gammar counter เป็นเวลา 1 นาที
8. นำค่าที่วัดได้มาแปลงเป็นปริมาณอินซูลิน ด้วยโปรแกรม GMS และเปรียบเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของระยะพักเพื่อรายงานผลต่อไป

ภาคผนวก จ

Krebs-Ringer bicarbonate buffer(KRB)

Stock solution 1:

- NaCl 27.7 กรัม/ลิตร

Stock solution 2:

- CaCl₂ 1.494 กรัม/ลิตร

Stock solution 3:

- KH₂PO₄ 0.648 กรัม/ลิตร

Stock solution 4:

- KCL 1.413 กรัม/ลิตร

- NaHCO₃ 8.401 กรัม/ลิตร

- MgSO₄.7H₂O 1.173 กรัม/ลิตร

นำ stock solution ทั้ง 4 ผสมในบีกเกอร์อย่างละ 50 มล. และผสมกลูโคส ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาณ 1.1 มล. จะได้ KRB 200 มล. จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 42 แล้วจึงนำ KRB ไปใช้ในการทำ *in situ* pancreatic perfusion ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

วิธีการทำ alpha- glucosidase inhibition assay แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

1. การเตรียมสารที่ใช้

1.1 การเตรียม 10 mM. phosphate buffered saline ให้เตรียมสารละลาย 4 ชนิด คือ

1. 0.2 M. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.2628 ก.) 9.5 มล.
2. 0.2 M. Na_2HPO_4 (1.15 ก.) 40.5 มล.
3. NaCl 8.0 ก.
4. KCl 200.0 มก.

เติมน้ำจนมีปริมาตรสุดท้าย 1000 มล.

1.2 การเตรียม substrate ได้แก่ maltose , sucrose ดังนี้

Maltose 37 mM. มีมวลโมเลกุล = 360.29 แทนค่าในสูตร $\text{Mol.} = \text{MV}/1,000$

(M=molarity;mol/l, V=volume;ml, Mol.=mole,MW=molecular weight, g=gram)

$$g/\text{MW} = \text{MV}/1,000$$

$$g/360.29 = (37 \cdot 10^{-3} \cdot 10)/1,000$$

$$g = 0.1333 \text{ ก.} \text{สรุปชั่ง maltose } 0.1333 \text{ g / buffer } 10 \text{ ml (ขนาดปรับปริมาตร)}$$

Sucrose 56 mM. มีมวลโมเลกุล = 342.30 แทนค่าในสูตร $\text{Mol.} = \text{MV}/1,000$

$$g/342.30 = (56 \cdot 10^{-3} \cdot 10)/1,000$$

$$g = 0.1917 \text{ ก.} \text{สรุปชั่ง sucrose } 0.1917 \text{ ก. / Buffer } 10 \text{ ml}$$

1.3 การเตรียม AGH solution ใช้ Rat Intestinal Acetone Powder 30 มก.ผสม 0.9 %

NaCl 1 มล. ให้ปั่นและแช่เย็น จนเข้ากันดี จากนั้นนำไปปั่นในเครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุม

อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที และใช้ปิเปตดูดของเหลว

ส่วนใส (AGH solution) มาใช้ในการทดลองต่อไป

1.4 การเตรียมสารทดสอบ ให้นำสารทดสอบมาละลายใน DMSO หรือตัวทำละลายอื่น เช่น

phosphate buffer pH 7.0 ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

2. การวิเคราะห์ alpha-glucosidase inhibitor มีขั้นตอนดังนี้

สารทดสอบ 20 มคล. + AGH solution 40 มคล.



Pre-incubate 5-10 นาที



เติม substrate 340 มคล.



Incubate ที่ 37° C (ชุกโครส 60 นาที และ มอลโตส 30 นาที)



หยุดปฏิกิริยาโดยต้มในน้ำเดือด 100° C เป็นเวลา 10 นาที



วัด AGH activity ด้วยวิธี Glucose oxidase test

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปรีชา มูลสาร เกิดเมื่อวันที่ 9 มีนาคม พ.ศ.2515 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนยโสธรพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดยโสธร เข้าศึกษาระดับอุดมศึกษาที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2537 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2543 และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตหลักสูตรเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 ถึง 2548



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย