



ประสิทธิภาพของ gymnemic acid สารสกัดจากผักเชียงดาที่มีต่อ
การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในไตหนูที่เป็นเบาหวาน
Efficiency of Gymnemic Acid from *Gymnema Sylvestre* Extract for Restoration
and Improvement of Microvasculature Characteristic in Diabetic Rat Kidney

รวิภา แจ้งชาติ
Rawipa Jangchart

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



ประสิทธิภาพของ gymnemic acid สารสกัดจากผักเชียงดาที่มีต่อ
การเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในไตหนูที่เป็นเบาหวาน
Efficiency of Gymnemic Acid from *Gymnema Sylvestre* Extract for Restoration
and Improvement of Microvasculature Characteristic in Diabetic Rat Kidney

รวิภา แจ้งชาติ
Rawipa Jangchart

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Anatomy
Prince of Songkla University

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ประสิทธิภาพของ gymnemic acid สารสกัดจากผักเชียงดาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลง
ของหลอดเลือดในไตหนูที่เป็นเบาหวาน

ผู้เขียน นางสาววิภา แจ่มชาติ

สาขาวิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รักษวรรณ พูนคำ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วิชานนท์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วิชานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชากายวิภาคศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้างู่งสูง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มี
ส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ

(นางสาววิภา แจ่มชาติ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาววิภา แจ่มชาติ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	ประสิทธิภาพของ gymnemic acid สารสกัดจากผักเชียงดาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในไตหนูที่เป็นเบาหวาน
ผู้เขียน	นางสาวรวิภา แจ่มชาติ
สาขาวิชา	กายวิภาคศาสตร์
ปีการศึกษา	2562

บทคัดย่อ

โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy) เป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากการมีน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานจนส่งผลให้เกิดความเสื่อมของไตและกระทบต่อการทำงานของไต และทำให้เกิดโรคไตวายเรื้อรังตามมา พยาธิสภาพต่างๆในโรคไตจากเบาหวานมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่เป็นเบาหวาน ระดับน้ำตาลในเลือด ทำให้เกิดการเพิ่มของ Vascular endothelial growth factor (VEGF) และ Transforming growth factor beta (TGF- β) ส่งผลให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดในไต โดยทำการศึกษาในหนู Wistar rat เพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการใช้ Steptozotocin (STZ) โดยแบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (Control) กลุ่มควบคุมที่ได้รับสาร gymnemic acid (400 mg/kg BW) (CGM) กลุ่มเบาหวาน กลุ่มเบาหวานที่ได้รับสาร gymnemic acid (GM) และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยา glyburide (GR) โดยทำการศึกษาเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ หลังจากนั้นจะทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดโดยใช้วิธีการย้อม H&E การย้อม immunofloirescence และศึกษาโดยการใส่กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าหลอดเลือดในไตของหนูในกลุ่มเบาหวานมีขนาดเล็กลง ผนังหลอดเลือดหนาตัวขึ้น ปริมาตรการไหลของเลือดลดลง พบการงอกใหม่ของหลอดเลือด โกลเมอรูลัสมีขนาดใหญ่ขึ้นและมีการแสดงออกของ VEGF และ TGF- β มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนหนูในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสาร gymnemic acid หลอดเลือดและเนื้อเยื่อไตมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้น มีการแสดงออกของ VEGF และ TGF- β ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเบาหวาน จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า gymnemic acid มีคุณสมบัติในการลดการเพิ่มของ VEGF และ TGF- β ซึ่งเป็นการลดการสร้างหลอดเลือดใหม่และสามารถฟื้นฟูพยาธิสภาพต่างๆที่เกิดจากโรคไตจากเบาหวานได้

Thesis Title	Efficiency of Gymnemic Acid from <i>Gymnema Sylvestre</i> Extract for Restoration and Improvement of Microvasculature Characteristic in Diabetic Rat Kidney
Author	Miss Rawipa Jangchart
Major Program	Anatomy
Academic Year	2019

ABSTRACT

Diabetic nephropathy is a complication caused by high blood sugar for a long time, resulting in kidney degeneration, affecting kidney function and leading to chronic kidney disease. Various pathologies in diabetic nephropathy are related to the duration of diabetes and level of blood glucose. Increasing of vascular endothelial growth factor (VEGF) and transforming growth factor beta (TGF- β) are the important causes of endothelial cell dysfunction. In this study, induction of diabetes in male Wistar rat by streptozotocin (STZ). Mice were divided into 5 groups as control group (C), control group was treated with gymnemic acid (400 mg/kg BW) (CGM), diabetic group (DM), diabetic group treated with gymnemic acid (400 mg/kg BW) (GM), diabetic group treated with glyburide (GR) every day for 8 weeks. At the end of 8 weeks, the kidneys were processed by H&E staining, immunofluorescence staining for study the expression of VEGF and TGF- β and vascular corrosion cast technique with scanning electron microscopy. Results were found the increasing in blood glucose, the thickening of segmental arterial walls and angiogenesis in diabetic group. The size of arteries in kidney and glomerulus were decreased in diabetic group. The expression of VEGF and TGF- β were increased in diabetic group. Administration with gymnemic acid showed the reduction of blood glucose, the recovery of blood vessels and glomerulus and decreasing of the expression of VEGF and TGF- β compared with diabetic group. These results have provided the evidence of gymnemic acid that have the potential in reducing blood glucose and attenuating endothelial cell dysfunctions.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้ความช่วยเหลือของ พันโทหญิง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิภาพรรณ ชิมมากทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วิชานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี อุดมอักษร ที่ได้ให้คำแนะนำ ถ่ายทอดความรู้ในด้านต่างๆ ให้ข้อคิดเห็นตรวจสอบ และแก้ไขร่างวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้เขียนขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.รักษวรรณ พูนคำ ที่กรุณาให้เกียรติเป็นประธานโดยในการสอบวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้กรุณาแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมถึงอาจารย์และเจ้าหน้าที่ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และอำนวยความสะดวกในการทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาและขอบคุณนักศึกษาปริญญาโทภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่านสำหรับกำลังใจที่ช่วยให้ทำวิทยานิพนธ์ของผู้เขียนครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ท้ายนี้ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ครอบครัว ตลอดจนเพื่อนพี่น้องของผู้เขียน ที่คอยรับฟัง ให้กำลังใจ ให้คำปรึกษาจนสามารถให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี

วิภา แจ้งชาติ

สารบัญ

บทที่		หน้า
1.	บทนำ	
	1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
	1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
	1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
2.	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
	2.1 โรคเบาหวาน	
	2.1.1 นิยามของโรคเบาหวาน	4
	2.1.2 ประเภทของโรคเบาหวาน	4
	2.1.3 สาเหตุและปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเบาหวาน	6
	2.1.4 อาการของโรคเบาหวาน	6
	2.1.5 เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน	7
	2.1.6 ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวาน	7
	2.1.7 การรักษาอาการโรคเบาหวาน	8
	2.2 โรคไตจากเบาหวาน	
	2.2.1 นิยามของโรคไตจากเบาหวาน	9
	2.2.2 อาการของโรคไตจากเบาหวาน	9
	2.2.3 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตจากเบาหวาน	10
	2.2.4 ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดไต	11
	2.2.5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือด	12
	2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานกับโรคไตจากเบาหวาน	
	2.3.1 โรคเบาหวานที่ทำให้กลไกที่เซลล์บุผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติ	12
	2.3.2 พยาธิสภาพของหลอดเลือดในภาวะ hyperglycemia	13
	2.4 การเกิด angiogenesis ในโรคไตจากเบาหวาน	16
	2.4.1 Growth factor ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ Angiogenesis	17
	2.5 ผักเชียงดา	23
	2.5.1 การศึกษาความเป็นพิษของผักเชียงดา	25

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3. วิธีการดำเนินการวิจัย	
3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	27
3.2 การทำให้สัตว์ทดลองมีสภาวะเบาหวานเพื่อการเก็บตัวอย่าง	28
3.3 การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อของหลอดเลือดไต โดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา	29
3.4 การศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดเชิงสามมิติระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ของโครงสร้างของหลอดเลือดที่ไตด้วยวิธี Vascular corrosion casting / Scanning electron microscope techniques เน้น Renal microvasculature ในสัตว์ที่ป่วยเป็นเบาหวาน ช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วย gymnemic acid	30
3.5 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ TGF- β โดยวิธี immunofluorescence	31
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ	32
4. ผลการวิจัย	
4.1 ผลการศึกษาระดับน้ำตาลในเลือด น้ำหนักของหนู ค่า Blood Urea Nitrogen และค่า Creatinine	33
4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อของหลอดเลือดไตโดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา	36
4.3 ผลการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) ใน segmental artery และ interlobar artery	41
4.4 ผลการศึกษำปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน Transforming growth factor beta (TGF- β) ใน segmental artery, และ interlobar artery	46

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4.5 การศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดเชิงสามมิติด้วยวิธี casting ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ของโครงสร้างของหลอดเลือดที่ไต	51
5. วิจารณ์ผลการทดลอง	65
6. สรุปผลและข้อเสนอแนะ	70
บรรณานุกรม	71
ภาคผนวก ก	77
ภาคผนวก ข	81
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	83

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 ระยะเวลาต่างๆของการเปลี่ยนแปลงของไตในผู้ป่วยเบาหวาน	10
4-1 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูในแต่ละกลุ่ม	34
4-2 แสดงค่าการทำงานของไตในหนูแต่ละกลุ่ม	34
4-3 แสดงระดับน้ำหนักตัวของหนูในแต่ละกลุ่ม	35

รายการภาพประกอบ

ภาพที่	หน้า
2-1 หลอดเลือดที่เลี้ยงส่วนต่างๆของไต	11
2-2 ภาวะ hyperglycemia ต่อการเปลี่ยนกลูโคสเป็น sorbitol โดยใช้เอนไซม์ aldose reductase และการเปลี่ยน sorbitol เป็นฟรุกโตส โดยใช้เอนไซม์ sorbitol dehydrogenase	14
2-3 การเพิ่มปริมาณของ AGEs ส่งผลให้เกิด oxidative stress, inflammation, cell apoptosis	14
2-4 การเกิด abnormal angiogenesis	16
2-5 การเกิดเบาหวานส่งผลให้เกิดการเพิ่มของ VEGF-A และ TGF- β	18
2-6 ภาวะ hyperglycemia ทำให้เกิดการเพิ่มของ TGF- β ที่ส่งผลต่อเซลล์ต่างๆในไต	21
2-7 โครงสร้างทางเคมีของ gymnemic acid	24
3-1 แผนผังแสดงการออกแบบการทดลอง	27
4-1 แสดงภาพตัดขวางของ segmental artery ในแต่ละกลุ่ม	37
4-2 แสดงการเปรียบเทียบความหนาของผนัง segmental artery ในแต่ละกลุ่ม	38
4-3 แสดงขนาดและลักษณะของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม	39
4-4 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโกลเมอรูลัสในแต่ละกลุ่ม	40
4-5 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bowman's space ในแต่ละกลุ่ม	40
4-6 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ VEGF ใน segmental artery ในแต่ละกลุ่ม	42
4-7 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ VEGF ในหลอดเลือด segmental artery	43
4-8 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ VEGF ใน interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม	44
4-9 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ VEGF ในหลอดเลือด interlobar artery	45
4-10 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ TGF- β ใน segmental artery	47
4-11 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ TGF- β ใน segmental artery	48
4-12 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ TGF- β ใน interlobar artery	49

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-13 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ TGF- β ในหลอดเลือด interlobar artery	50
4-14 ภาพแสดง vascular cast ของไตในแต่ละกลุ่ม	53
4-15 ภาพแสดง vascular cast ของไต	54
4-16 ภาพแสดงโครงหลอดเลือดในเนื้อไต (vascular cast) เซึ่งสามมิติ ระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	55
4-17 แสดงลักษณะการแตกแขนงของโครงหลอดเลือดไต ในแต่ละกลุ่ม	56
4-18 แสดงการงอกใหม่ของหลอดเลือดบริเวณ segmental artery ในกลุ่ม DM	57
4-19 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ segmental artery	57
4-20 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด segmental artery	58
4-21 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ interlobar artery	58
4-22 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด interlobar artery	59
4-23 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือด arcuate artery	59
4-24 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด arcuate artery	60
4-25 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ afferent arteriole	60
4-26 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด afferent arteriole	61
4-27 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ efferent arteriole	61
4-28 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด efferent arteriole	62
4-29 แสดงการเปรียบเทียบขนาดและลักษณะของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม	63
4-30 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม	64
4-31 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของของเส้นเลือดในโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม	64

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ในปัจจุบันวิถีชีวิตและความเป็นอยู่ของประชากรส่วนใหญ่นิยมรับประทานอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตและไขมันสูง มีการใช้ชีวิตในสภาวะที่กดดัน ส่งผลให้เกิดความเครียด และส่วนใหญ่ มักจะขาดการออกกำลังกายจึงทำให้จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานเพิ่มสูงขึ้น โรคเบาหวาน (Diabetes Mellitus) เป็นโรคที่สามารถพบได้บ่อยที่สุดโรคหนึ่งและมีแนวโน้มที่จะพบมากขึ้นเรื่อยๆ โดยโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่ติดต่อซึ่งเกิดจากความผิดปกติระบบต่อมไร้ท่อ จากการที่ตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินได้เพียงพอกับความต้องการของร่างกายหรือไม่สามารถผลิตอินซูลินได้ หรือเกิดจากภาวะดื้อต่อฤทธิ์ของอินซูลิน (insulin resistant) ทำให้ร่างกายไม่สามารถนำเอาน้ำตาลไปใช้งานได้โดยมีประสิทธิภาพจึงทำให้ร่างกายมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) อย่างต่อเนื่อง จากข้อมูลทางสถิติของ WHO ปี 2015 พบว่าทั่วโลกมีผู้ป่วยเบาหวานจำนวน 400 ล้านคนทั่วโลก มีผู้เสียชีวิตโดยมีสาเหตุจากโรคเบาหวานจำนวน 1.6 ล้านคน (WHO, 2018) และ ในปี 2015 สำนักโรคระบาดวิทยาของไทยได้รายงานว่ามีผู้ป่วยเบาหวานที่ขึ้นทะเบียนเป็นผู้ป่วยรายใหม่จำนวน 393,887 ราย โดยส่วนใหญ่เป็นผู้หญิงและมีอายุมากกว่า 60 ปี (ยงเจือ เหล่าศิริถาวร, 2015) เมื่อผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานและผู้ป่วยไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ จะส่งผลให้เกิดโรคแทรกซ้อนที่ส่งผลต่ออวัยวะอื่นๆตามมา เช่น ภาวะแทรกซ้อนที่หลอดเลือดขนาดใหญ่ ได้แก่ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคหลอดเลือดสมอง ภาวะแทรกซ้อนที่หลอดเลือดขนาดเล็ก ได้แก่ ภาวะแทรกซ้อนที่จอประสาทตา ภาวะแทรกซ้อนที่ไต ในปี 2015 สำนักโรคระบาดวิทยาของไทยได้รายงานว่ามีผู้ป่วยโรคเบาหวานที่โรคแทรกซ้อนเข้ารับการรักษาจำนวน 41,987 ราย มีโดยมีภาวะโรคแทรกซ้อนทางไตสูงสุดจำนวน 14,091 ราย รองลงมาคือภาวะโรคแทรกซ้อนทางตาจำนวน 9,112 ราย และพบโรคแทรกซ้อนทางประสาทและหลอดเลือดแดงตามลำดับ (ยงเจือ เหล่าศิริถาวร และคณะ, 2015) โดยภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นกับไตจะส่งผลให้เป็นโรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy) ซึ่งจะทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานของไตลดลงและทำให้เกิดโรคไตวายระยะเรื้อรัง

โรคไตจากเบาหวานเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญระดับประเทศ ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังในผู้ป่วยเบาหวาน ในระยะแรกนั้นผู้ป่วยจะไม่แสดงอาการ แต่จะพบโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะปริมาณเล็กน้อย ประมาณ 30 มิลลิกรัมต่อวัน ต่อมาเมื่อพบปริมาณโปรตีนอัลบูมินมากขึ้น มักจะพบว่าปัสสาวะมีลักษณะเป็นฟอง ผู้ป่วยมีอาการบวม และมักจะมีความดันโลหิตสูงร่วมด้วย ในปี 2013-2016 จากข้อมูลของ UNITED STATES RENAL DATA SYSTEM (USRDS) ได้รายงานว่ามีผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (chronic kidney disease) ที่มีสาเหตุมาจากโรคเบาหวานประมาณร้อยละ 36 (USRDS, 2018) และจากข้อมูลของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย (Thailand Renal Replacement Therapy Registry Report) ในปี 2015 พบว่า มีความชุกของผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานประมาณร้อยละ 38.57 และมีผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานรายใหม่ถึงร้อยละ 40.73 (สมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย, 2015) และจากการสำรวจภายในประเทศพบว่า มีผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีภาวะ microalbuminuria ประมาณร้อยละ 18.7-43.5 และมีภาวะ overt nephropathy ร้อยละ 1.6-5.1 (Suwanwalaikorn et al., 2013) นอกจากนี้โรคไตจากเบาหวานยังเป็นสาเหตุที่สำคัญที่ทำให้เกิดโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้าย (end-stage renal disease) ของผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาทดแทนไตในประเทศไทย (จิตตินันท์ และคณะ, 2002) ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจะมีอัตราการกรองของไตลดลงจนกระทั่งอัตราการกรองของไตน้อยกว่า 15 มิลลิตร/นาที/1.73 ตารางเมตร จะจัดว่าเป็นผู้ป่วยเป็นโรคไตวายระยะสุดท้าย จำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไต ด้วย การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) หรือการผ่าตัดปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2560) ซึ่งมีค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูงและในบางครั้งจะเกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการบำบัดทดแทนไต ดังนั้นจึงเป็นการดีกว่าที่จะมีป้องกันการเกิดโรคเบาหวานและการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวานให้ดีกว่าก่อนที่จะเกิดโรคแทรกซ้อนตามมา

การรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานมีทั้งการใช้ยาแผนปัจจุบันและการใช้ยาสมุนไพร ซึ่งในปัจจุบันสมุนไพรได้เข้ามามีบทบาทที่สำคัญในการใช้รักษาโรคต่างๆมากขึ้น เพราะสมุนไพรคือยาจากธรรมชาติ เพื่อรักษาโรคและบำรุงร่างกาย ผักเชียงดา (Gymnema Sylvestre) เป็นสมุนไพรชนิดหนึ่งในประเทศแถบเอเชีย มักจะนำมาใช้เป็นยารักษาเบาหวาน ในผักเชียงดามีสารสำคัญคือ gymnemic acid ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่สกัดได้จากรากและใบของผักเชียงดา มีสรรพคุณในการรักษาอาการของเบาหวานและลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ การทำการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ gymnemic acid จากผักเชียงดาที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดในไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

และเพื่อศึกษาผลของสาร gymnemic acid ต่อหลอดเลือดในไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ vascular endothelial growth factor (VEGF) และ transforming growth factor-Beta (TGF- β) ในไตของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยสาร gymnemic acid

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดในไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยสาร gymnemic acid เชงสองมิติในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดในไต โดยละเอียดเชิงสามมิติระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด เน้นที่ Renal microvascular architecture ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยสาร gymnemic acid ด้วยกระบวนการ Vascular corrosion casting / Scanning electron microscope techniques
3. เพื่อศึกษาผลของสาร gymnemic acid ต่อหลอดเลือดในไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานโดยเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีน ได้แก่ VEGF และ TGF- β ในไตของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยสาร gymnemic acid โดยวิธี immunofluorescence

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จากผลการทดลองที่คาดว่าจะได้รับ ทำให้ทราบถึงผลของสาร gymnemic acid จากผักเชียงดาต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดไตที่เกิดจากภาวะเบาหวาน ทำให้สามารถนำไปวิเคราะห์หาประโยชน์ของการรับประทานผักเชียงดาที่จะส่งผลต่อการป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่จะเกิดขึ้นกับหลอดเลือดไตในผู้ป่วยโรคเบาหวาน และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาผักเชียงดาให้เป็นยาสำหรับผู้ป่วยเบาหวานต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคเบาหวาน

2.1.1 นิยามโรคเบาหวาน

โรคเบาหวาน คือ โรคเรื้อรังที่มีแนวโน้มที่จะพบมากขึ้น โดยโรคเบาหวานเกิดจากการที่ตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินได้เพียงพอกับความต้องการ หรือร่างกายไม่สามารถนำเอาฮอร์โมนอินซูลินมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้น เมื่อไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้เป็นระยะเวลานานจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบต่างๆในร่างกาย เช่น ระบบประสาทระบบการไหลเวียนโลหิต และระบบการทำงานของไต เป็นต้น (WHO, 2018)

2.1.2 ประเภทของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานสามารถแบ่งเป็น 4 ชนิดตามสาเหตุของการเกิดโรคได้ดังนี้

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (type 1 diabetes mellitus) เกิดจากการที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลายโดยภูมิคุ้มกันของร่างกาย ผ่านการ cellular mediated เป็นเบาหวานชนิดที่พบบ่อยในเด็กและวัยรุ่น และในคนที่มีอายุน้อยกว่า 30 ปี โดยจะมีอาการปัสสาวะมาก กระหายน้ำ อ่อนเพลีย น้ำหนักลด บางรายอาการอาจตรวจพบสารคีโตนในปัสสาวะ หรือมีภาวะเลือดเป็นกรดจากสารคีโตน (ketoacidosis) เมื่อมีการติดเชื้อ เบาหวานชนิดนี้มีความสัมพันธ์กับการตรวจพบ autoantibody ต่างๆ ในญาติพี่น้องของผู้ป่วย ซึ่งสามารถตรวจได้ตั้งแต่มิเกิดภาวะเบาหวาน และในบางกรณีอาจพบภูมิคุ้มกันผิดปกติชนิดอื่นๆ เช่น pernicious anemia, Hashimoto's thyroiditis, Graves' disease, autoimmune hepatitis ร่วมกับโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้

2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (type 2 diabetes mellitus) เป็นชนิดที่สามารถเจอได้บ่อยในคนไทย โดยพบประมาณร้อยละ 95 ของผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศ ผู้ป่วยมักจะมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) และมีความบกพร่องในการผลิตฮอร์โมนอินซูลิน (relative insulin deficiency) ส่วนใหญ่จะพบในคนที่มีอายุมากกว่า 30 ปีขึ้นไป มีรูปร่างอ้วน ในบางรายอาจจะไม่มีอาการผิดปกติ โดยอาการของโรคเบาหวานคือ จะมีอาการปัสสาวะบ่อย (polyuria) กระหายน้ำบ่อย (polydipsia) ตื่นน้ำมาก อ่อนเพลีย น้ำหนักลด อาการมักจะค่อยเป็นค่อยไป

บางรายมีประวัติติดเชื้ทางเดินปัสสาวะหรือมีการติดเชื้อราในร่มผ้าเป็นๆหายๆร่วมด้วย นอกจากนี้อาจจะตรวจพบลักษณะของภาวะดื้อต่ออินซูลิน เช่น พบปื้นน้ำตาลรอบลำคอ รักแร้ หรือขาน้ำที่เรียกว่า acanthosis nigricans (ไชยพร เลิศวัฒนารักษ์, 2558) ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักจะมีบุคคลในครอบครัวที่มีประวัติเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 การวินิจฉัยจากอาการแสดงทางคลินิกในระยะแรกๆจะทำได้ยาก จึงใช้การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพิ่มเติมและใช้การติดตามผู้ป่วยในระยะต่อไปร่วมด้วย

3. โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (gestational diabetes mellitus) เกิดจากการที่มารดามีภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistant) มากขึ้น และเกิดจากการที่ตับอ่อนไม่สามารถผลิตฮอร์โมนอินซูลินให้เพียงพอกับความ ต้องการ ทำให้มีน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นในระหว่างตั้งครรภ์ ซึ่งมักจะหายไปหลังจากคลอดบุตร ซึ่งทำให้ผู้ป่วยกลุ่มนี้มักจะมีความเสี่ยงต่อในเกิดโรคเบาหวานในอนาคต โดยเฉพาะมารดาที่มีประวัติในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน ดังนั้นผู้ป่วยจะต้องตรวจระดับน้ำตาลในเลือดเป็นระยะๆ โดยโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์สามารถตรวจพบในการตั้งครรภ์ไตรมาสที่ 2 หรือ 3

4. โรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะ (specific types of diabetes due to other causes) เป็นโรคเบาหวานที่มีมักจะมีสาเหตุชัดเจน ผู้ป่วยจะมีอาการแสดงของโรคที่ทำให้เกิดโรคเบาหวาน โรคเบาหวานที่มีสาเหตุจำเพาะ เช่นโรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติของพันธุกรรมที่ควบคุมการทำงานของเบต้าเซลล์ คือ Maturity-onset diabetes in the young (MODY) โรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติของตับอ่อน เช่น โรคเบาหวานที่เกิดจากตับอ่อนอักเสบเรื้อรัง โรคเบาหวานที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติของโรคต่อมไร้ท่อ เช่น อะโครเมกาลี และโรคคุชชิง และ โรคเบาหวานที่เกิดจากการได้รับยาหรือสารเคมีบางชนิด (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2560)

2.1.3 สาเหตุและปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคเบาหวาน (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2560)

1. ผู้ที่มีอายุตั้งแต่ 35 ปีขึ้นไป
2. ผู้ที่รูปร่างอ้วนโดยมี BMI 25 กก./ม.² และมีประวัติของคนในครอบครัวเป็นโรคเบาหวาน
3. มีระดับไตรกลีเซอไรด์มาก 250 มก./ดล.
4. เป็นโรคความดันโลหิตสูงหรือกำลังรับประทานยาควบคุมความดันโลหิตสูง
5. มีประวัติโรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์
6. เคยได้รับการตรวจพบว่าเป็น Impaired Glucose Tolerance หรือ Impaired Fasting Glucose
7. มีอาการถุงน้ำในรังไข่ (polycystic ovarian syndrome)

2.1.4 อาการของโรคเบาหวาน

ผู้ป่วยเบาหวานมีอาการต่างๆดังนี้

1. ปัสสาวะบ่อย (polyuria) เนื่องจากท่อไตไม่สามารถดูดกลับได้หมดจึงทำให้มีน้ำตาลออกมากับปัสสาวะ (glycosuria) และน้ำตาลจะดึงน้ำออกมาด้วยทำให้ผู้ป่วยมีอาการปัสสาวะบ่อยกว่าปกติ
2. กระหายน้ำและดื่มน้ำมากขึ้น (polydipsia) เนื่องจากมีการถ่ายปัสสาวะบ่อย ร่างกายเกิดการขาดน้ำ ผู้ป่วยจึงมักจะรู้สึกกระหายน้ำมากขึ้นทำให้ต้องดื่มน้ำบ่อย
3. หิวบ่อยและรับประทานอาหารเพิ่มขึ้น (polyphagia) เมื่อร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้เซลล์ต่างๆขาดสารอาหาร ผู้ป่วยจะรู้สึกหิวบ่อยและรับประทานอาหารมากขึ้น แต่เนื่องจากร่างกายยังได้รับกลูโคสไม่เพียงพอ ทำให้ร่างกายต้องเผาผลาญพลังงานมาจากส่วนอื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อและไขมันทำให้ผู้ป่วยผอมลง และเกิดอาการเพลียได้ง่าย
4. แผลหายช้า มีการติดเชื้อบริเวณผิวหนังได้บ่อย เนื่องจากการทำงานของเม็ดเลือดขาวลดลง
5. ภาวะกรดจากคีโตน (diabetic ketonacidosis) เมื่อร่างกายสลายไขมันมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน ทำให้ไขมันกลายเป็นกรดไขมัน นอกจากนั้นยังมีการสร้างคีโตนที่ตับมากขึ้น ทำให้ในเลือดมีปริมาณคีโตนเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นร่างกายจะเพิ่มการดูดกลับคาร์บอนเนตทาง

ไตมากขึ้น และเพิ่มการจับคาร์บอนไดออกไซด์ทางการหายใจมากขึ้น จึงทำให้ผู้ป่วยหายใจน้ำขึ้น
มาก มีภาวะโปแตสเซียมในเลือดต่ำ หายใจผิดปกติ มีนงง ปัสสาวะมีคีโตน

6. ชักและหมดสติ (hyperosmolar coma) เมื่อร่างกายสูญเสียน้ำมากขึ้น ทำให้
เลือดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงส่วนต่างๆของร่างกายเช่น สมองและไตลดลง ทำ
ให้ผู้ป่วยชักและหมดสติ (ฉิวรรณ อุนนาภิรักษ์, 2005)

2.1.5 เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน เมื่อผู้ป่วยมีเกณฑ์ข้อใดข้อหนึ่ง ดังต่อไปนี้

1. ระดับกลูโคสในเลือด ≥ 200 มก./ดล. ร่วมกับมีอาการปัสสาวะมาก ดื่มน้ำ
มาก น้ำหนักตัวลดลงอย่างรวดเร็วโดยไม่ทราบสาเหตุ หรือ

2. ระดับกลูโคสในเลือดขณะอดอาหารอย่างน้อย 8 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 16 ชั่วโมง
(fasting plasma glucose) ≥ 126 มก./ดล. อย่างน้อย 2 ครั้ง หรือ

3. ระดับกลูโคสในเลือด หลังการดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม (oral glucose
tolerance test) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ≥ 200 มก./ดล. อย่างน้อย 2 ครั้ง หากผู้ป่วยมีระดับน้ำตาล
น้อย 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2560)

2.1.6 ภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากโรคเบาหวาน

เกิดจากการที่ผู้ป่วยโรคเบาหวานไม่สามารถคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ จึงทำให้
เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆตามมา โดยแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1. ภาวะแทรกซ้อนเฉียบพลัน เป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วโดยไม่
เกี่ยวข้องกับระยะเวลาที่เป็นเบาหวาน ซึ่งเป็นภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากการ metabolism (อภิชาติ
วิชญาณรัตน์, 2546) เช่น

1.1 การเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia)

1.2 การเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia)

1.3 การติดเชื้อบริเวณระบบทางเดินปัสสาวะและการติดเชื้อรา

2. ภาวะแทรกซ้อนเรื้อรัง มีการเกิดโรคแบบค่อยเป็นค่อยไปโดยมีความสัมพันธ์กับ
ระยะเวลาที่เป็นเบาหวานและการควบคุมระดับน้ำตาล ซึ่งมักจะทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนที่หลอดเลือด โดยแบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

2.1 โรคแทรกซ้อนที่หลอดเลือดขนาดใหญ่ (Macrovascular complication) เกิดจากการตีบตันและการเกิดหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) ของหลอดเลือดขนาดใหญ่ และในบางครั้งก็มัก会有ความดันโลหิตสูงร่วมด้วย เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจและโรคหลอดเลือดส่วนปลายอุดตัน โรคหลอดเลือดสมอง

2.2 โรคแทรกซ้อนที่หลอดเลือดขนาดเล็ก (Microvascular complication)

- เบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนที่จอประสาทตา (diabetic retinopathy)

- เบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนที่ไต (diabetic nephropathy)

- เบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังที่เส้นประสาท (diabetic neuropathy)

จากรายงานการสำรวจโรคปี 2558 กล่าวว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานมีภาวะแทรกซ้อน 41,897 ราย เป็นภาวะแทรกซ้อนทางไต 14,091 ราย ภาวะโรคแทรกซ้อนที่จอประสาทตา 9,112 ราย ภาวะแทรกซ้อนทางประสาท 7,200 ราย และมีภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดแดง 5,289 ราย (ยงเจือ เหล่าศิริถาวรและคณะ, 2015)

2.1.7 การรักษาอาการโรคเบาหวาน

จะต้องควบคุมระดับระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติ เพื่อเป็นการควบคุมเพื่อป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ หรือเพื่อป้องกันภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่มีอาการรุนแรงขึ้น โดยมีการรักษา 2 แบบ คือ

1. การรักษาแบบไม่ใช้ยา โดยอาศัยการเปลี่ยนรูปแบบการดำเนินชีวิต ได้แก่

1.1 การควบคุมการรับประทานอาหารโดยลดการรับประทานอาหาร เช่น ขนมหวาน ขนมเค้ก ไอศกรีม ช็อกโกแลต ผลไม้ที่มีน้ำตาลสูง เช่น ทูเรียน องุ่น และสับปะรด เป็นต้น

1.2 การเพิ่มการออกกำลังกาย ซึ่งจะช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยจะทำให้กล้ามเนื้อสามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้มากขึ้น และช่วยลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ทำให้เกิดการ metabolism ของร่างกายมากขึ้น

1.3 การลดภาวะกดดันและภาวะเครียด เนื่องจากในภาวะเครียดร่างกายจะเกิดการสลายไกลโคเจนจน ซึ่งทำให้มีการหลั่งของฮอร์โมนต่างๆ เช่น glucagon และ cortisol เมื่อมีฮอร์โมนเหล่านี้อยู่ในกระแสเลือดเป็นเวลานานจะทำให้ระดับความทนต่อกลูโคสของร่างกายลดลง

2. การรักษาแบบใช้ยา โดยจะเป็นการออกฤทธิ์กระตุ้นให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนหลัง insulin มากขึ้น ใช้ในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ยาที่ใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ ยากลุ่ม sulfonylurea โดยยาจะถูกทำลายที่ตับและถูกขับออกทางปัสสาวะและอุจจาระ

3. การรักษาแบบใช้ฮอร์โมนอินซูลิน เพื่อเป็นการให้อินซูลินทดแทนส่วนที่ร่างกายขาดไป ซึ่งการรักษาด้วยวิธีนี้จะช่วยในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมได้ดียิ่งขึ้น (ณัฐยานันท์ ประเสริฐอำไพสกุล และคณะ, 2550)

2.2 โรคไตจากเบาหวาน (Diabetic nephropathy)

2.2.1 นิยามของโรคไตจากเบาหวาน

องค์การอนามัยโรคได้ให้คำนิยามของโรคไตจากเบาหวานว่า เป็นโรคที่เกิดจากการที่เส้นเลือดในไตถูกทำลาย และนำไปสู่การเกิดการภาวะไตวาย ต้องมีการรักษาโดยการเปลี่ยนไต และทำให้อัตราการเสียชีวิตเพิ่มสูงขึ้นในหลายประเทศ (WHO, 2018)

2.2.2 อาการของโรคไตจากเบาหวาน

ในระยะแรกของโรคไตจากเบาหวาน จะมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงและมีอัตราการกรองของไต (glomerular filtration rate) สูงขึ้น เมื่อมีการดำเนินโรคเบาหวานเป็นระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ไต โดยจะมีปริมาณโปรตีนชนิดอัลบูมินในปัสสาวะมากขึ้น เรียกว่าภาวะ microalbuminuria เมื่อปริมาณอัลบูมินในปัสสาวะจะค่อยๆ เพิ่มมากขึ้นและมากกว่า 300 มิลลิกรัม/วัน ระยะนี้เรียกว่า macroproteinuria ผู้ป่วยจะมีอาการบวม และมีความดันโลหิตสูง หลังจากนั้นหน้าที่การกรองของไตจะลดลง จนในเข้าสู่ภาวะไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (end stage renal disease)

การเกิด albuminuria เกิดจากในภาวะปกติ glomerular capillary wall ซึ่งเป็น anionic macromolecules โดยใช้คุณสมบัติของขนาดและประจุในการยับยั้งการรั่วไหลของอัลบูมินทางปัสสาวะ ผู้ป่วยเบาหวานที่มีภาวะ microalbuminuria จะมีการเพิ่มจำนวนของรูซึ่งมีขนาดใหญ่บริเวณ glomerular capillary wall นอกจากนี้สาร heparan sulfate ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในการป้องกันการรั่วของอัลบูมินมีปริมาณลดลง ซึ่งความผิดปกติเหล่านี้จะรุนแรงมากขึ้นในผู้ป่วยที่เป็น overt nephropathy

พยาธิสภาพทางไตจากเบาหวาน ประกอบด้วย การเกิด mesangial matrix expansion ลักษณะ diffuse หรือ nodular glomerulosclerosis อาจจะพบลักษณะ nodular glomerulosclerosis มีชื่อเรียกเฉพาะว่า Kimmelstiel-Wilson lesion เกิดการหนาตัวของ

glomerular basement membrane และมีการสะสมของ hyaline ในผนังหลอดเลือดของ afferent และ efferent arterioles เพิ่มสูงขึ้น ในปัจจุบันได้แบ่งความรุนแรงของพยาธิสภาพตามลักษณะของ glomerulus, interstitial และ vascular lesion (เกรียง ตั้งสง่าและคณะ, 2553)

2.2.3 ปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคไตจากเบาหวาน ได้แก่

1. ระยะเวลาในการเป็นเบาหวาน
2. มีประวัติคนครอบครัวเป็นโรคไตจากเบาหวาน หรือมีประวัติไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย
3. ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลได้
4. ไม่สามารถควบคุมระดับความดันโลหิตสูงได้
5. มีโปรตีนอัลบูมินในปัสสาวะมากกว่าปกติ
6. การสูบบุหรี่ (สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย, 2560)

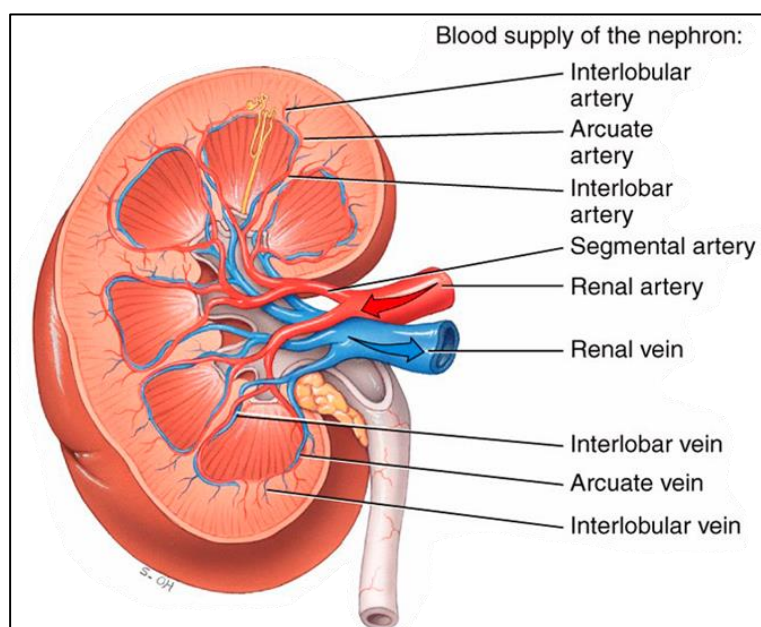
	ระยะการเปลี่ยนแปลงของไต				
	1. Acute renal hypertrophy-hyperfunction	2. Normoalbumin Uria	3. Incipient diabetic nephropathy	4. Clinical over diabetic nephropathy	5. End-stage renal failure
ระยะเวลา	แรกวินิจฉัย	ภายใน 5 ปีแรก	6-15 ปี	15-25ปี	25-30ปี
ความเปลี่ยนแปลง	ไตและGlomerulus มีขนาดใหญ่ขึ้น	Basement membrane หนาตัวขึ้น	Basement membrane หนาตัวขึ้น และ mesangial expansion	มีความผิดปกติอย่างเด่นชัด	Glomerular closure
Glomerular Filtration Rate	เพิ่มขึ้น 20-50%	เพิ่มขึ้น 20-50%	ลดลงประมาณ 3-5 ml/min ต่อปี	ลดลงประมาณ 10 ml/min ต่อปี	น้อยกว่า 10 ml/min
Albumin excretion	อาจจะเพิ่มขึ้นในช่วงแรก	< 20 µg/min	20-200 µg/min	> 200 µg/min	อาจลดลงจากการสูญเสีย nephron
ความดันโลหิต	ปกติ	ปกติ	เพิ่มขึ้นประมาณ 3 mmHg	เพิ่มขึ้นประมาณ 5 mmHg	สูง

ตารางที่ 2-1 ระยะต่างๆของการเปลี่ยนแปลงของไตในผู้ป่วยเบาหวาน

(วารงคณา พิชัยวงศ์, 2558)

2.2.4 ลักษณะทางกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือดไต

ไตแต่ละข้างจะได้รับเลือดจากหลอดเลือดแดงที่มาจากไตคือ renal artery แยกแขนงออกมาจาก abdominal aorta เมื่อ renal artery เข้าสู่บริเวณขั้วไตจะแตกออกเป็น 2 แขนง เรียกว่า segmental artery แยกไปเลี้ยงแต่ละ segment ของไตส่วนหน้าและไตส่วนหลัง หลังจากนั้นแต่ละแขนงจะกลายเป็น interlobar artery อยู่ระหว่าง renal pyramid เมื่อมาถึงรอยต่อระหว่าง renal cortex กับ renal medulla interlobar artery จะแยกออกเป็น arcuate artery จากนั้นแตกแขนงในแนวตั้งฉากเป็น interlobular artery เข้าสู่ renal cortex interlobular artery จะแตกแขนงให้เป็น afferent arteriole เข้าสู่ renal corpuscle เพื่อแตกแขนงเป็นเส้นเลือดฝอย glomerulus บริเวณระหว่างเส้นเลือดฝอย glomerulus มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียกว่า mesangium ประกอบด้วย mesangial cell ทำหน้าที่ค้ำจุนกระจุกเส้นเลือดฝอย glomerulus ทำหน้าที่เป็น phagocyte และมีบทบาทในการสลายและการสร้างใหม่ของ basal lamina แล้วออกจาก renal corpuscle ทาง efferent arteriole ซึ่งติดต่อกับ vessels ของ nephron จากนั้น Interlobular vein รับเลือดจาก nephron ไปเทเข้า arcuate vein, interlobar vein และ renal vein ตามลำดับ จากนั้นไปเทเข้า inferior vena cava (กนกธร ปิยธำรงรัตน์, 2546)



รูปที่ 2-1 แสดงหลอดเลือดที่เลี้ยงส่วนต่างๆของไต (HO-5 2018)

2.2.5 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของหลอดเลือด

ผนังของหลอดเลือดแดง ประกอบด้วย smooth muscle cells และ connective tissue เรียงตัวเป็น 3 ชั้น ได้แก่

1. ชั้น Tunica intima เป็นผนังชั้นในสุด สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 3 ชั้นคือ 1. ชั้น endothelium ซึ่งมี endothelial cell ยึดกับเซลล์ข้างเคียงด้วย tight junction 2. ชั้น subendothelial ประกอบด้วย collagen fiber เรียงตัวกันในแนวยาว ซึ่งชั้นนี้มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนรูปร่างของชั้น endothelium 3. ชั้น internal elastic lamina เป็น elastic fibers (วนิดาศรีไพโรจน์ธกุลม, 2553)

2. ชั้น Tunica media เป็นผนังชั้นกลาง ที่มีความหนามากที่สุดประกอบด้วย smooth muscle cells และ elastic lamina เรียงตัวเป็นแนวเส้นรอบวง

3. ชั้น Tunica adventitia เป็นชั้นนอกสุด ส่วนใหญ่ประกอบด้วย connective tissue ในชั้นนี้จะพบ external elastic lamina แต่มีลักษณะบางมาก (กนกธร ปิยะอำรุงรัตน์, 2546)

2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานกับโรคไตจากเบาหวาน

2.3.1 โรคเบาหวานส่งผลให้เซลล์บริเวณผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติ (Endothelial dysfunction)

หลอดเลือดแดงประกอบด้วยผนัง 3 ชั้นคือ 1. ชั้น tunica adventitia ซึ่งเป็นผนังชั้นนอกสุด 2. ชั้น tunica media เป็นผนังชั้นกลาง 3. ชั้น tunica intima ซึ่งเป็นผนังที่อยู่ชั้นในสุด โดยมีการเรียงตัวของเซลล์เป็นชั้นเดียว คือเซลล์บุผนังหลอดเลือด อยู่ระหว่างเลือดและเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของเลือด เป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนสาร โดยเซลล์บุผนังหลอดเลือดมีการสังเคราะห์และหลั่งสารโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่ม endothelial-derived contracting factor เช่น endothelin และ prostaglandins ทำให้หลอดเลือดหดตัว

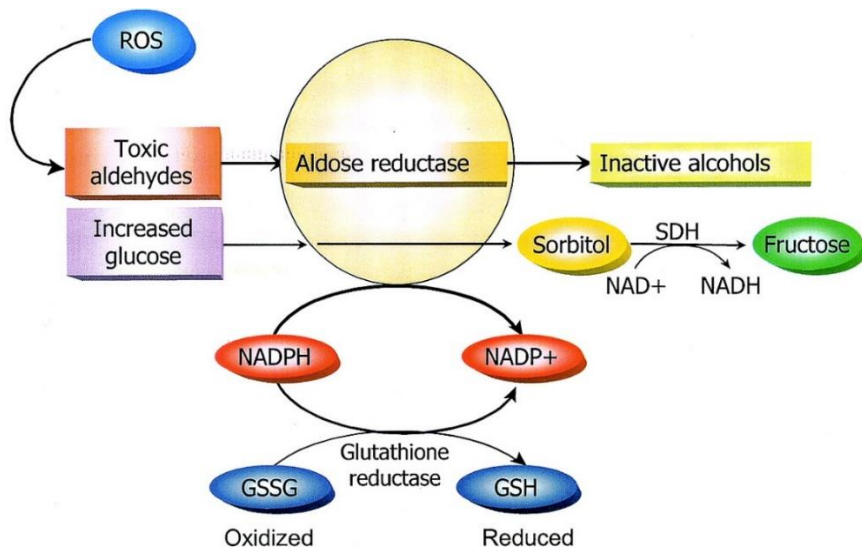
2. กลุ่ม endothelial-derived relaxing factor เช่น nitric oxide และ prostacyclin ซึ่งออกฤทธิ์ในการขยายตัวของหลอดเลือด ต้านการอักเสบและต้านการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด ในภาวะปกติจะมีการหลั่ง nitric oxide มากที่สุด

3. กลุ่ม endothelial-derived hyperpolarizing factor (EDHF) ช่วยในการขยายตัวของหลอดเลือด

นอกจากนี้เซลล์บุผนังหลอดเลือดยังหลั่ง cytokines ที่กระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่มายังบริเวณเยื่อบุผนังหลอดเลือดและผ่านเข้าไปในหลอดเลือดที่เกิดการบาดเจ็บ ทำให้เกิดการอักเสบและสร้าง transforming growth factor beta (TGF- β) ทำให้ fibroblast มีการแบ่งตัวมากขึ้น ซึ่งตรงข้ามกับ nitric oxide ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ ในภาวะเบาหวานมีการเพิ่มของสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่งทำให้ nitric oxide ทำงานลดลง ทำให้หลอดเลือดเกิดการหดตัวมากขึ้น ทำให้การขนส่งสารต่างๆทางกระแสเลือดลดลง (วชิราวดี มาลากุล, 2011)

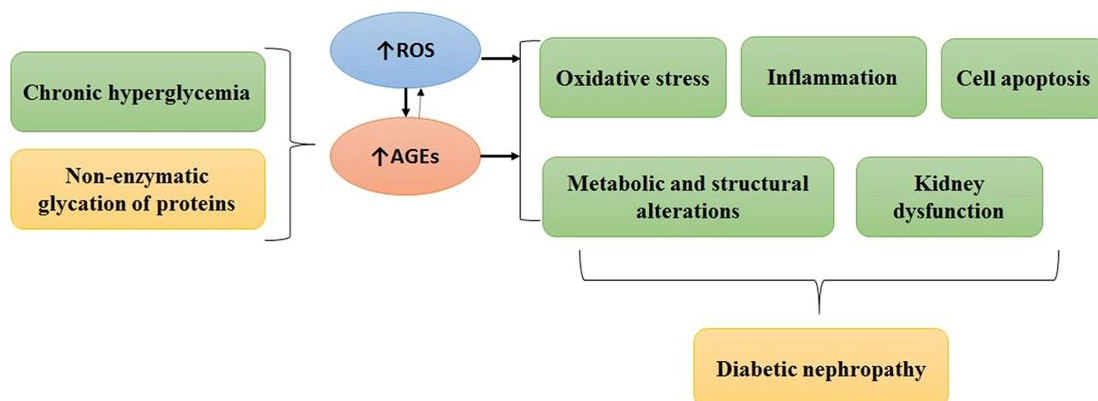
2.3.2. พยาธิสภาพของหลอดเลือดในภาวะ hyperglycemia

1. ในภาวะปกติการเมแทบอลิซึมของกลูโคสจะใช้กระบวนการ glycolytic pathway เมื่อมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูงการเมแทบอลิซึมของกลูโคสโดยใช้ polyol pathway ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ 1. การเปลี่ยนกลูโคสเป็น sorbitol โดยใช้ aldose reductase 2. การเปลี่ยน sorbitol เป็นฟรุคโตส โดยใช้ sorbitol dehydrogenase เป็นขั้นตอนที่ใช้ระยะเวลาสั้นจึงทำให้ sorbitol มีการสะสมตัวมากขึ้นส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อได้ และทั้ง 2 กระบวนการจะเกิดการเปลี่ยน NADP⁺ เป็น NADH ส่งผลให้สารต้านอนุมูลอิสระที่ซึ่งต้องใช้ NADPH ลดลง จึงเป็นการเพิ่มสารอนุมูลอิสระทำให้มีการทำลายเซลล์เพิ่มมากขึ้น (Malakul, 2011)



รูปที่ 2-2 ภาวะ hyperglycemia ต่อกการเปลี่ยนกลูโคสเป็น sorbitol โดยใช้เอนไซม์ aldose reductase และการเปลี่ยน sorbitol เป็นฟรุกโตส โดยใช้เอนไซม์ sorbitol dehydrogenase (Michael et al., 2005)

2. การเกิด advanced glycosylated end-products (AGEs) เมื่อกลูโคสจับกับโปรตีนภายในเซลล์ (non – enzymatic glycation) จะเปลี่ยนเป็น AGEs นอกจากนี้เมื่อ AGEs จับกับ receptor ทำให้เพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด และเพิ่มสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ทำให้เกิดการหนาตัวขึ้นของ basement membrane โดยมีการเพิ่มของ collagen ชนิดที่ 1 และ 4 ทำให้ความยืดหยุ่นของหลอดเลือดเสียไป



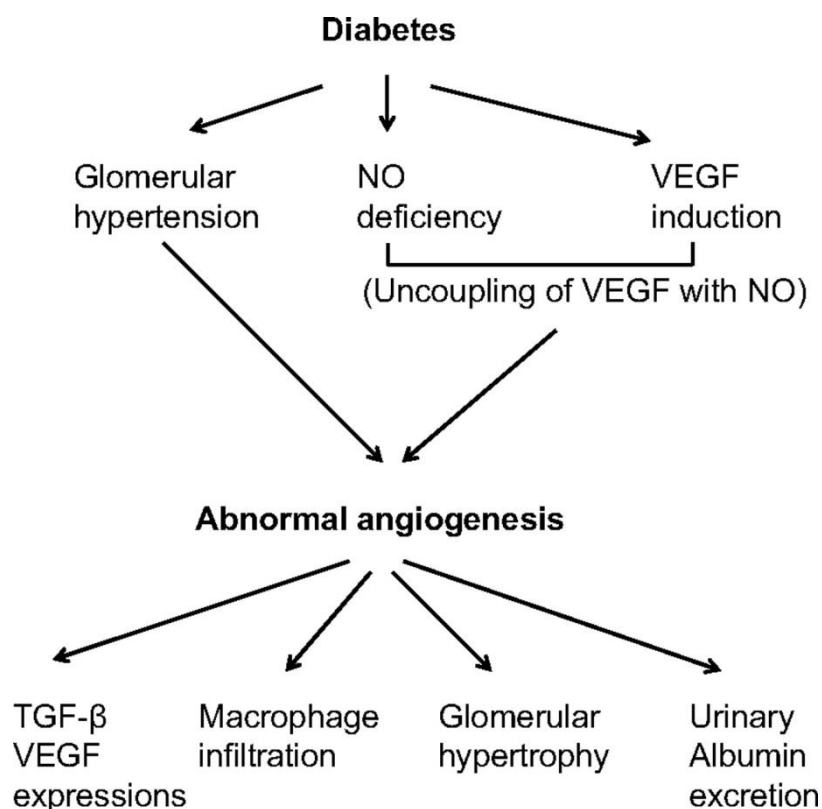
รูปที่ 2-3 การเพิ่มปริมาณของ AGEs ส่งผลให้เกิด oxidative stress, inflammation และ cell apoptosis ส่งผลให้การทำงานของไตเสียไป จึงทำให้เกิดภาวะ diabetic nephropathy (Kaur et al., 2017)

3. การเพิ่มปริมาณของสารอนุมูลอิสระ เนื่องจากในภาวะ hyperglycemia จะทำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของ eNOS และ guanylyl cyclase ทำให้หลอดเลือดลดการตอบสนองต่อ nitric oxide โดยแบ่งเป็น การเกิดสารอนุมูลอิสระแบบไม่ขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์ และการเกิดสารอนุมูลอิสระแบบขึ้นกับการทำงานของเอนไซม์

4. การเพิ่มของ protein kinase C (PKC) ซึ่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ถูกกระตุ้นจาก diacylglycerol (DAG) ซึ่งถูกสร้างจากกระบวนการ glycolysis ในภาวะ hyperglycemia จะกระตุ้นให้ PKC- β เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), transforming growth factor-Beta (TGF- β)

เมื่อมีความผิดปกติของเซลล์ที่บุผนังหลอดเลือด ทำให้มีการเพิ่มการซึมผ่านของสารที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น low density lipoprotein ไปสะสมบริเวณช่องว่างของเซลล์บุผนังหลอดเลือด และเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ นอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecules ที่ทำให้เม็ดเลือดขาวชนิด monocytes เคลื่อนที่มายึดเกาะกับเซลล์บุผนังหลอดเลือด และเคลื่อนเข้าไปในผนังหลอดเลือดเปลี่ยนเป็น macrophage ทำหน้าที่ในการจับกิน low density lipoprotein ที่เกิดการ oxidation จนกลายเป็น foam cell ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณหลอดเลือด ทำให้มีการหลั่ง growth factor เพิ่มมากขึ้น ทำให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่งผลให้หลอดเลือดหนาตัวขึ้นกลายเป็นโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) การเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง คือ การที่หลอดเลือดมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือดจากการสะสมของไขมันและ fibrous tissue ทำให้เกิด plaque และการแข็งตัวนี้ก่อให้เกิดการตีบของหลอดเลือด (Malakul, 2011) และทำให้ความหนาของผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ความสามารถในการยืดหยุ่นลดลง และการส่งผลให้มีเลือดไปยังอวัยวะส่วนปลายน้อยลงและอาจจะเกิดการตายของเนื้อเยื่อส่วนปลาย (นราวุฒิ ประเสริฐ วิทยากิจ และคณะ, 2018)

2.4 การเกิด angiogenesis ในโรคไตจากเบาหวาน



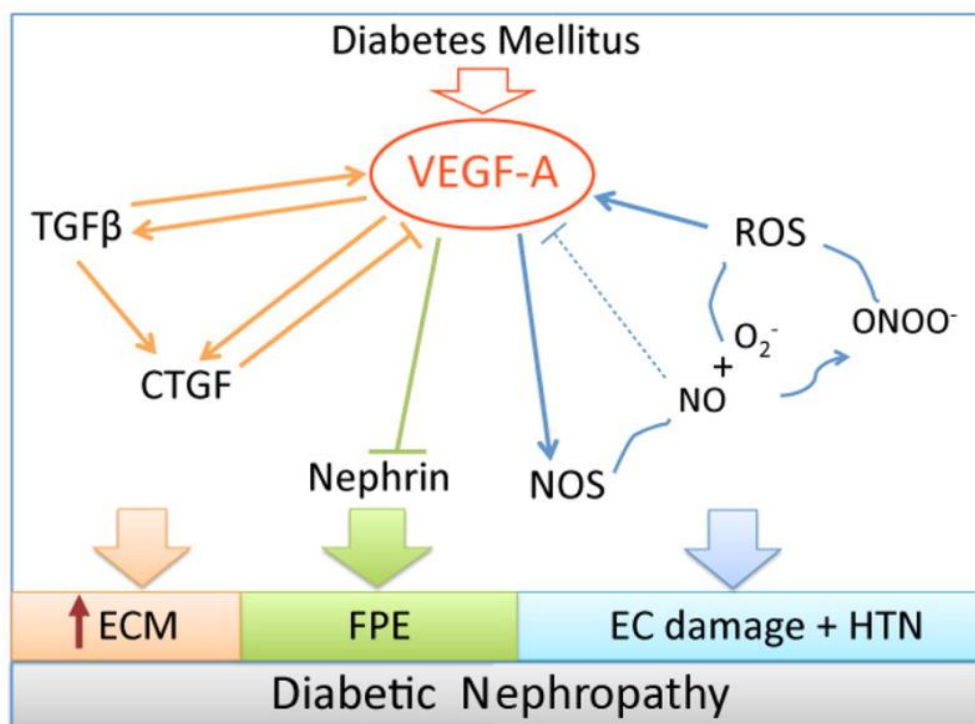
รูปที่ 2-4 การเกิด abnormal angiogenesis (Alda, 2012)

การสร้างหลอดเลือดใหม่เป็นการเกิดพยาธิสภาพที่สำคัญของโรคไตจากเบาหวาน เกิดจากความไม่สมดุลกันในการเกิดการ proliferation และการเกิด apoptosis ของเซลล์ การสร้างหลอดเลือดใหม่เกิดจากการกระตุ้นของ vascular growth factor ผ่านทาง tyrosine kinases receptor โดยเฉพาะ vascular endothelial growth factor (VEGF) โดยในภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงกระตุ้นให้มีการสร้าง VEGF เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดความผิดปกติของการสร้างหลอดเลือดใหม่บริเวณ glomerular capillary โดยหลอดเลือดจะขยายตัวมากขึ้นและบริเวณ glomerular basement membrane ที่อยู่ติดกันจะมีลักษณะแบนลง ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มการซึมผ่านของหลอดเลือด (increase vascular permeability) การเกิดความผิดปกติของการสร้างหลอดเลือดที่เจอใน Bowman's capsule หรือบริเวณ glomerular vascular pole เรียกว่า extra efferent arteriole (Osterby et al., 1987) เมื่อ endothelial cell ทำงานที่ผิดปกติและหนาตัวขึ้น (Osterby et al., 2002) ซึ่งการหนาตัวของผนังหลอดเลือดเกิดจากการสะสมของ matrix ในโรคไตจาก

เบาหวานการงอกใหม่ของหลอดเลือด การขยายตัว และการเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดบริเวณ vascular pole เกี่ยวข้องกับการเกิด glomerular hypertrophy, เพิ่มการอุดตันของ glomerular capillary, fibrinoid lesions, tubulointerstitial injury และ urinary albumin excretion การทำการยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่สามารถช่วยในการลดการสร้าง TGF- β , glomerular basement membrane thickening และ mesangial expansion ได้ (Takahiko et al., 2009)

2.4.1 Growth factor ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการ Angiogenesis

Vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็น angiogenic factor ที่สำคัญ ทำหน้าที่ในการควบคุม proliferation, differentiation และ migration ของ endothelial cell กระตุ้นให้เกิด การขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) และ เพิ่มการซึมผ่านผนังหลอดเลือด (vascular permeability) มักจะพบ VEGF ที่บริเวณเซลล์บุผนังหลอดเลือด (endothelial cell) และ podocyte โดยมี receptor ในกลุ่ม tyrosine kinases คือ VEGFR-1 and VEGFR-2 ในภาวะ heperglycemia จะเพิ่มการแสดงออกของ renin และ angiotensinogen ใน mesangial cells ทำให้ mesangial cells และ podocytes สร้าง angiotensin II เพิ่มขึ้น ส่งผลกระตุ้นการแสดงออกของ TGF- β , VEGF, connective tissue growth factor (CTGF) และ interleukin 6 ทำให้เกิดการขยายตัวของ extracellular matrix และ podocyte apoptosis ในภาวะปกติ VEGF กระตุ้นให้ endothelial nitric oxide synthase สร้าง nitric oxide เพื่อควบคุมการทำงานของผนังหลอดเลือดโดยมีหน้าที่ในการควบคุมการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) และการซึมผ่านสารของผนังหลอดเลือด (vascular permeability) แต่ในภาวะ hyperglycemia จะทำให้การสร้าง nitric oxide ลดลง ส่งผลให้เซลล์กล้ามเนื้อเรียบมีการเพิ่มจำนวน (proliferation) และมีการเคลื่อนที่ (migration) ไปยังผนังหลอดเลือดชั้นใน ทำให้เกิดการหนาตัวของผนังหลอดเลือด จึงทำให้การส่งสารผ่านทางเลือดลดลงและส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ในผนังหลอดเลือด (Katherine et al., 2015)



รูปที่ 2-5 การเกิดเบาหวานทำให้เกิดการเพิ่มของ VEGF, TGF- β และ CTGF ส่งผลให้มีการสังเคราะห์และการสะสม extracellular matrix (ECM) เพิ่มขึ้น ทำให้เกิด Glomerular Basement Membrane thickening (สีส้ม); VEGF-A ยับยั้ง nephrin ทำให้เกิด foot process effacement (FPE) (สีเขียว); นอกจากนี้ VEGF-A กระตุ้นให้ eNOS สร้าง NO ลดลง และมีการเพิ่มของ ROS ซึ่งทำให้เกิด peroxynitrite (ONOO⁻) เมื่อมี NO น้อยลง และมีปริมาณ ROS เพิ่มขึ้น ทำให้เกิดการทำลาย endothelial cells และ Hypertension (HTN) (Alda et al., 2012)

ในปี 2000 DAE RYONG CHA และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ VEGF โดยการนำ mesangial cell จากไตหนู มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีน้ำตาลสูงเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และนำมาทำ western blot พบว่ามีการเพิ่มของ VEGF ในกลุ่มเบาหวานมากกว่ากลุ่มควบคุมและทำการ renal biopsy จากผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานชนิดที่ 2 (NIDDM) วัดการแสดงออกของ VEGF โดยการย้อม immunohistochemistry พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ VEGF โดยมีมากในบริเวณ glomerulus และ proximal tubule ในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานในระยะแรก

ในปี 2008 Waichi Sato ได้ทำการศึกษาถึงความเกี่ยวข้องของ VEGF กับการซึมผ่านของ macrophage ในโรคไตจากเบาหวาน โดยพบว่าการซึมผ่านของ macrophage ใน glomerulus ของหนูเบาหวานโดยใช้ eNOS KO mice และ C57BL/6 mice และเกี่ยวข้องกั

glomerular injury เช่น mesangiolytic, glomerular microaneurysm และ nodular lesions of glomerular sclerosis การวัดการแสดงออกของ VEGF ใน podocyte เกี่ยวข้องกับการซึมผ่านของ Flt-1-positive macrophage ใน injured glomeruli ของ diabetic eNOS KO mice ทำให้เห็นว่า VEGF สามารถทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ macrophage ได้ ทั้ง nNOS และ iNOS ไม่มีการแสดงออกในไตของ eNOS KO mice และ C57BL/6 mice เพื่อที่จะทดสอบว่าถ้าไม่มี NO จะส่งผลต่อ VEGF ที่มีผลต่อ macrophage พบว่า NO ควบคุม VEGF ที่มีผลต่อการ migration ของ macrophage โดยการยับยั้งการแสดงออกของ Flt-1

ในปี 2010 Tarinee Sawatpanich และคณะได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของ vascular endothelial growth factor ในไตของหนูของที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin เป็นระยะเวลา 4 และ 8 สัปดาห์ พบว่า glomerulus มีขนาดใหญ่ขึ้น และผนังของ glomerular capillary cells หนาตัวขึ้น และเมื่อนำเนื้อเยื่อไตมาศึกษาโดยวิธี IHC หนูในกลุ่มเบาหวานมีการแสดงออกของ VEGF มากขึ้นบริเวณ podocyte และ renal tubular

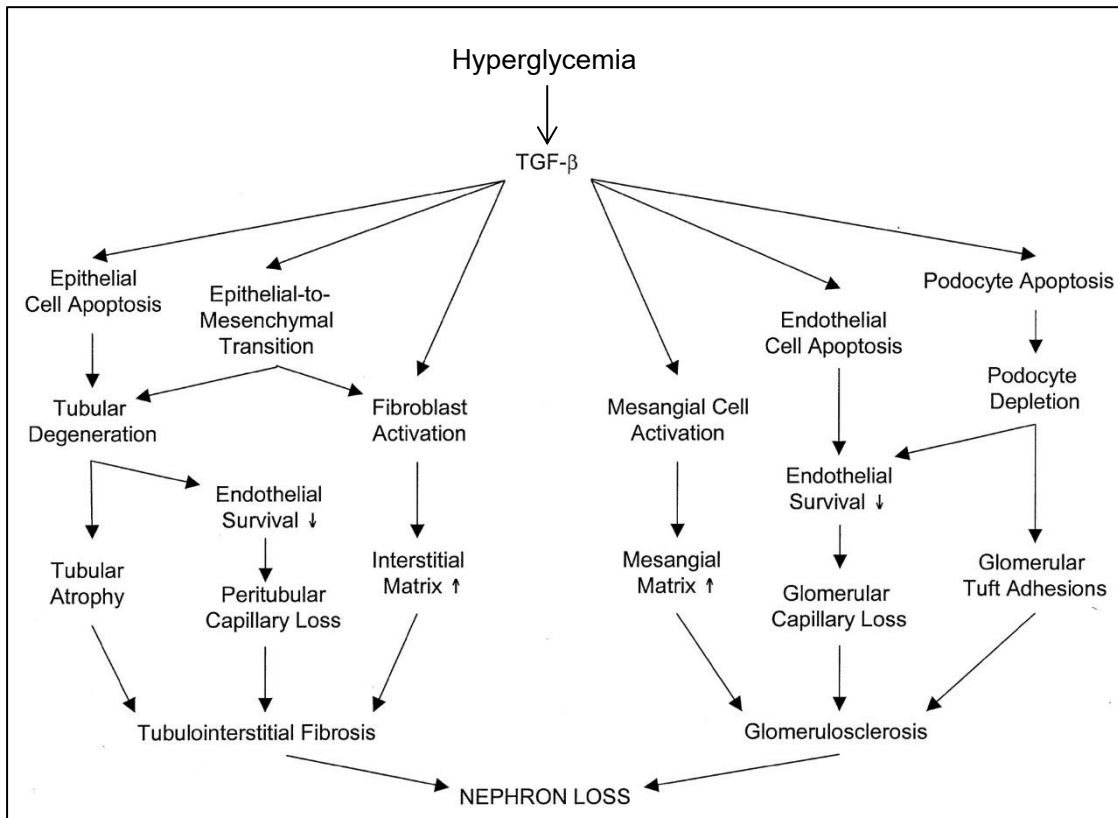
ในปี 2011 Maria Mironidou-Tzouveleki และคณะได้ทำการศึกษาพบว่า vascular endothelial growth factor (VEGF) เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้มีการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) และการเกิด mitogen ของ endothelial cells ซึ่งส่วนใหญ่ VEGF จะถูกสร้างจาก podocyte และจับกับ receptor คือ VEGFRs ซึ่งในโรคเบาหวานชนิดที่ 1 จะมีการเพิ่มการแสดงออกของ VEGF มากทำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่มากขึ้น เมื่อยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ VEGF จึงเป็นแนวทางการรักษาที่จะช่วยลดการเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้างและการทำงานของไต

ในปี 2019 Mohammad H. Aly และคณะได้ทำการศึกษาพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ Ang-2 และ VEGF และส่งผลให้มีการเพิ่มของ microalbuminuria และ macroalbuminuria ในผู้ป่วยเบาหวาน เมื่อทำการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม มีการเพิ่มของ C-reactive protein (CRP) ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งที่ร่างกายสร้างขึ้นมาเพื่อตอบสนองต่อการอักเสบสอดคล้องกับการเพิ่มของ Ang-2 และ VEGF แต่มีความสัมพันธ์แบบตรงข้ามกันของ eGFR, Ang-2 และ VEGF

Transforming growth factor-Beta (TGF- β) เป็น cytokine ที่มีหน้าที่ anti-inflammatory, proliferation, cell differentiation, apoptosis, epithelial-mesenchymal transition (EMT) (Mohammad et al., 2019) รวมถึงควบคุมการสังเคราะห์ extracellular matrix ไปจนถึงกระบวนการสร้างหลอดเลือดและการเกิด fibrosis (Bottinger et al., 2002) TGF- β มี 3 ชนิดคือ TGF- β 1, TGF- β 2 และ TGF- β 3 โดยจะพบ TGF- β 1 ใน endothelial cells, hematopoietic cells และ connective tissue cells พบ TGF- β 2 ได้ใน epithelial cells และ neuronal cells และจะพบ TGF- β 3 ได้ใน mesenchymal cell (Blobe et al., 2000) TGF- β มี receptor คือ TGF- β receptor ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณผิวเซลล์ โดย TGF- β receptor มี 3 ชนิดคือ TGF- β receptor I II และ III ซึ่งทั้ง 3 ชนิดจะทำงานร่วมกัน โดย TGF- β จะจับกับ TGF- β receptor III นำไปส่งต่อให้ TGF- β receptor II ต่อมาจะกระตุ้น protein kinase บน intracellular domain ของ TGF- β receptor II และรวมกับ TGF- β receptor I และกระตุ้นให้เกิด Smad signaling pathway โดยทำให้เกิด phosphorylation ของ Smad2/3 แล้วรวมกับ Smad4 ซึ่งเป็น transcription factor ที่ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างโปรตีนต่อไป (Bottinger et al., 2002) ในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานพบว่าใน glomerulus และ tubulointerstitial มีการเพิ่มของ TGF- β ซึ่ง เกิดจากปัจจัยกระตุ้นหลายอย่างเช่น ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงภายในเซลล์ การกระตุ้น protein kinase C- mitogen-activated protein kinase (PKC-MAPK) pathway การเกิด advance glycation end-product การสร้างและการหลั่ง angiotensin II, endothelin และ thromboxane (Blobe et al., 2000)

ภาวะ hyperglycemia ทำให้มี glucose transport-1 เพิ่มขึ้น จึงทำให้มี TGF- β เพิ่มขึ้นไปด้วย (Braga, 2014) เมื่อใดที่มีการเพิ่มของ TGF- β จะเกิดการกระตุ้นการสร้างและยับยั้งการสลาย extracellular matrix ต่างๆ ทำให้เกิด extracellular matrix expansion และ fibrosis ขึ้นในเนื้อไต นอกจากนี้ TGF- β ยังส่งผลให้เกิดการ apoptosis ของเซลล์ต่างๆในไต การเกิด epithelial-to-mesenchymal transition ของ epithelial cells มีผลทำให้เกิด glomerulosclerosis และ tubulointerstitial fibrosis ได้มากและเร็วขึ้น จึงส่งผลให้เกิดความเสื่อมของไตตามมาในที่สุด (Bottinger et al., 2002) การเพิ่มขึ้นของ extracellular matrix ที่ glomerular basement membrane และ การเกิด mesangial expansion เกิดจากการสร้างและสะสมโปรตีนต่างๆเพิ่มขึ้น ทั้งโปรตีนที่พบในภาวะปกติเช่น คอลลาเจนชนิดที่ 4 และโปรตีนที่พบในกรณีที่เป็นโรคไตจากเบาหวาน เช่น คอลลาเจนชนิดที่ 1 และชนิดที่ 3 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเกิด microalbuminuria, proteinuria และลดการทำงานของ glomerular capillaries ทำให้การทำงาน

ของไตลดลงได้ มักจะพบในระยะเวลาหลังของการเกิด glomerulosclerosis และ tubulointerstitial fibrosis ซึ่งทำให้เกิดความเสื่อมของไตในผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวาน (Caramori et al., 2003)



รูปที่ 2-6 ภาวะ hyperglycemia ทำให้เกิดการเพิ่มของ TGF- β ที่ส่งผลต่อเซลล์ต่างๆในไต (Bottinger et al., 2002)

ในปี 1993 Tatsuo Yamamoto และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยพบว่า เมื่อทำการ biopsy ที่ไต และ นำ glomerulus จากผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานมาทำการย้อม immunofluorescence และทำ mRNA & RNA Blotting พบว่ามีการเพิ่มแสดงออกของ TGF- β , fibronectin และ mRNA ของ TGF- β มากกว่าคนปกติ ซึ่ง TGF- β มีหน้าที่สำคัญในการสร้าง extracellular matrix และ matrix protein อื่นๆ เช่นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ fibronectin, tenascin, และ proteoglycan biglycan พยาธิสภาพของโรคไตจากเบาหวานเกิดจากการสะสมของ extracellular matrix ใน glomerulus ซึ่งเกิดจากการเพิ่มของ transforming growth factor beta (TGF- β) ในโรคเบาหวาน

ต่อมาในปี 2003 Hi Bah Lee และคณะได้รายงานว่าโรคไตจากเบาหวานมีลักษณะที่สำคัญคือมีการสะสมของ extracellular matrix (ECM) ซึ่ง TGF- β เป็นตัวที่ทำให้เกิดการสะสมของ extracellular matrix ในภาวะที่มีน้ำตาลสูงจะทำให้เกิดการหลั่ง TGF- β บริเวณ glomerular mesangial และ tubular epithelial cells มากขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งการสร้างและการหลั่ง TGF- β และ ECM บริเวณ glomerular mesangial และ tubular epithelial cells และช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพในโรคไตจากเบาหวาน ในภาวะที่น้ำตาลสูงกระตุ้นให้เกิดสร้างสารอนุมูลอิสระใน mesangial cell และ tubular epithelial cell การเพิ่มของสารอนุมูลอิสระเป็นผลมาจาก protein kinase C (PKC), NADPH oxidase และ mitochondrial electron transfer chain complex I ภาวะน้ำตาลสูงและการเพิ่มของ ROS ส่งผลให้เกิดการเพิ่มของ TGF- β และการเพิ่มขึ้นของ TGF- β จะทำให้เกิดการเกาะของเม็ดเลือดขาวและเกล็ดเลือดบริเวณผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้น และยังทำให้สาร albumin และ lipoprotein ผ่านเข้ามาสะสมในหลอดเลือด ส่งผลให้เกิดการหนาตัวของ basement membrane และเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Bakker et al., 2009)

TGF- β เป็น cytokine ที่สำคัญในการทำให้ด้านการอักเสบในโรคไตจากเบาหวานชนิดที่ 2 การเพิ่มของ TGF- β จะทำให้เกิดการเพิ่มของ IL-6 และ T helper17 ในระยะ pro-inflammatory และทำให้เกิด glomerulosclerosis และ fibrosis ตามมา (Braga et al., 2014)

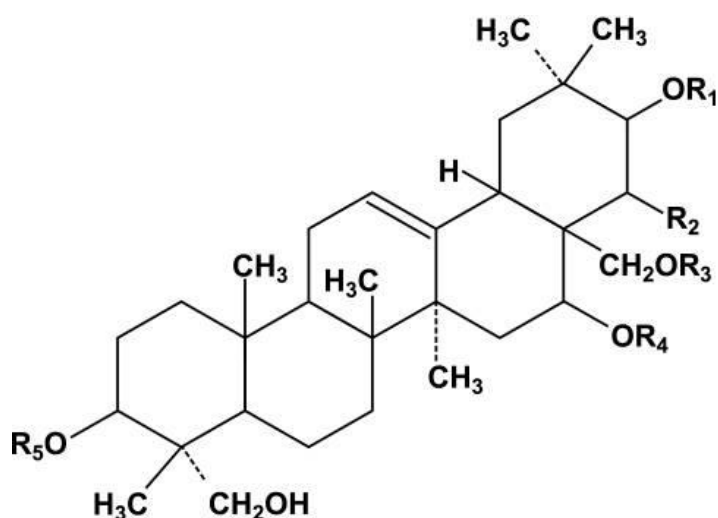
นอกจากนั้น TGF- β ยังทำให้เกิดการ hypertrophy และการสะสมของ extracellular matrix ใน mesangium ซึ่งทำให้ glomerular filtration rate ลดลงและนำไปสู่ภาวะไตวายเรื้อรัง และ TGF- β ยังควบคุมการหลั่งของ albumin ในปัสสาวะและลดการดูดกลับสารของ proximal tubules ทำให้ในปัสสาวะประกอบด้วยกลูโคสเป็นจำนวนมาก และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ TGF- β บริเวณ proximal tubule ทำให้ลดการเกิด albuminuria และการเกิด fibrosis ในทางตรงข้าม การลดการแสดงออกของ TGF- β ใน podocyte จะช่วยป้องกันการเกิดการลดลงของ GFR มากกว่าลดการเกิด albuminuria และการเกิด fibrosis (Bakker et al., 2009)

2.5 ผักเชียงดา (*Gymnema Sylvestre*)

2.5.1 ลักษณะโดยทั่วไปของผักเชียงดา

ผักเชียงดา มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Gymnema Sylvestre* เป็นสายพันธุ์หนึ่งที่เจริญเติบโตได้ดีในป่าเขตร้อนในภูมิภาคเอเชียใต้และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สำหรับประเทศไทยจะพบได้มากและเป็นที่ยอมรับในการนำมาบริโภคในภาคเหนือ (จักรพันธ์ เนรังสี, 2558) ผักเชียงดา อยู่ในวงศ์ Asclepiadaceae ผักเชียงดามีลักษณะเป็นไม้เถาเลื้อย ใบมีรูปร่างกลมรีหรือออกตรงข้ามกัน มีขนาด 1.25-2.0 นิ้ว x 0.5-1.25 นิ้ว ดอกมีขนาดเล็ก สีเหลือง ผักมีลักษณะเป็นทรงกระบอกค่อนข้างเรียวแหลม มีขนาดประมาณ 3 นิ้ว ผักเชียงดาเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในทางการแพทย์พื้นบ้าน ทางอายุรเวท และใช้ในการรักษาแบบ homeopathic โดยมีศึกษาว่าพบว่ามีสารประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ alkaloids, saponins, flavonoids และ tannins ผักเชียงดามีสรรพคุณในการรักษาอาการหอบหืด (asthma), ระบายเคืองตา (eye complaints), การอักเสบ (inflammations), งูกัด (snakebite) ต้านเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial activity), ต้านภาวะคอเลสเตอรอลสูง (antihypercholesterolemic activity), รักษาโรคที่เกี่ยวกับความผิดปกติของทางเดินอาหาร และเป็นสารยับยั้งความหวาน (sweet suppressing activity) (Anjum et al., 2013) และใช้ในการรักษาโรคเบาหวานโดยส่วนที่นิยมนำมาใช้ในการรักษาโรค คือใบและราก โดยนำมาทำเป็นแคปซูลหรือชาชง (Kanetkar et al., 2007)

สารสำคัญของผักเชียงดา คือ gymnemic acid เป็นกรดอินทรีย์ที่สกัดจากส่วนใบและราก มีโครงสร้างทางเคมีคือ tri-terpenoid, glucuronic acid และ fatty acid เนื่องจาก gymnemic acid โครงสร้างทางเคมีคล้ายกับโมเลกุลของน้ำตาล ทำให้เมื่อรับประทานผักเชียงดา gymnemic acid จะจับกับตัว receptor ที่รับรสหวาน ทำให้ไม่สามารถรับรู้ถึงความหวานของอาหารได้ นอกจากนี้บริเวณลำไส้เล็กบริเวณเนื้อเยื่อชั้นนอกที่ทำหน้าที่ดูดซึ่มกลูโคสในผนังของลำไส้เล็กก็จะพบโครงสร้างที่คล้ายกัน จึงทำให้สามารถยับยั้งการดูดซึ่มของน้ำตาลในลำไส้เล็กได้อีกทางหนึ่งด้วย (Anjum et al., 2013) เนื่องจากผักเชียงดามีคุณสมบัติในการลดระดับน้ำตาลในเลือดจึงมีนำมาใช้ในการต้านการเกิดเบาหวาน (antidiabetic activity) และเป็นสารยับยั้งสารให้ความหวาน (antisweetener activity) นอกจากนี้ gymnemic acid ยังมีสารสำคัญ เช่น flavones d-quercitol, tartaric acid, formic acid, lupeol, hentriacontane, pentatriacontane, anthraquinones และ acidic glycosides (Rani et al., 2012)



รูปที่ 2-7 โครงสร้างทางเคมีของ gymnemic acid (Anjum et al., 2013)

ในปี 2000 Yoshitaka Sugihara และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการต้านการเกิดเบาหวานของสารสกัดหยาบของ saponin และ สาร gymnemic acid IV ที่ได้จากการสกัดด้วยเมธานอลและใบของผักเชียงดาในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยใช้ streptozotocin พบว่าสาร saponin ลดระดับน้ำตาลได้ภายในเลือดภายใน 2-4 ชั่วโมง และสาร gymnemic acid IV สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด 13.5-60% ภายใน 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ glibenclamide และยังช่วยในการเพิ่มระดับ plasma insulin ในหนูกลุ่มเบาหวานได้อีกด้วย

ในปี 2010 A. Bakrudeen Ali Ahmed และคณะได้ทำการศึกษาวิจัยโดยการสกัดใบและ callus ของผักเชียงดา (*Gymnema sylvestre*) ด้วย methanol และป้อนให้หนูที่เป็นเบาหวาน พบว่าสารสกัดจากผักเชียงดาช่วยในการเพิ่มน้ำหนักตัวของหนู น้ำหนักของตับและน้ำหนักของตับอ่อน นอกจากนี้ยังช่วยในการฟื้นฟูเบต้าเซลล์ในหนูที่เป็นที่มีภาวะเบาหวาน

สอดคล้องกับงานวิจัยของ P.Srinivasan และคณะ (2014) ได้ทำการศึกษาโดยการป้อนสารสกัดของผักเชียงดาด้วยเมธานอลให้หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการให้ streptozotocin ในปริมาณ 100, 200 และ 400 mg/kg body weight พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับการป้อนสารสกัดโดยเมธานอลของผักเชียงดามีการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือด ระดับ cholesterol และระดับ triglyceride โดยมีการลดลงมากที่สุดในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับในปริมาณ 400 mg/kg body weight นอกจากนี้สารสกัดโดยเมธานอลของผักเชียงดายังช่วยในการเพิ่มน้ำหนัก

ตัวของหนูในกลุ่มที่เป็นเบาหวาน เพิ่มระดับ HDL และมีการเพิ่มของ insulin ในกระแสเลือด โดยมีการเพิ่มมากที่สุดในกลุ่มเบาหวานกลุ่มที่ได้รับการบ้วนสาร 400 mg/kg body weight

ในปี 2019 Yumeng Li และคณะได้ทำการศึกษาการประสิทธิผลของ gymnemic acid ที่มีผลต่อเพิ่มการ metabolism ของกลูโคส โดย gymnemic acid มีการเพิ่มการใช้กลูโคสใน Insulin Resistance HepG2 จาก 11.9 ± 1.09 เป็น 14.7 ± 1.38 mmol/L และลดระดับ fasting blood glucose นอกจากนี้ gymnemic acid ยังช่วยในการลดการเกิด endoplasmic reticulum (ER) stress ซึ่งทำให้เกิด insulin signal transduction proteins

2.5.2 การศึกษาความเป็นพิษของผักเชียงดา (*Gymnema Sylvestre*)

ในปี 2004 Ogawa และคณะ ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของผักเชียงดา (*Gymnema sylvestre*) โดยใช้หนู Wistar ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดนการบ้วนผสมในอาหารในอัตราส่วน ร้อยละ 0.01, 0.10 และ 1.00 เป็นเวลา 52 สัปดาห์ โดยทำการชั่งน้ำหนักหนูและวัดการรับประทานอาหารเป็นเวลา 12 สัปดาห์ 26 สัปดาห์ และ 52 สัปดาห์ หลังจากครบ 52 สัปดาห์ เมื่อทำการวัดการเพิ่มของน้ำหนักตัว การรับประทานอาหาร ผลการตรวจเลือดและการตรวจทางพยาธิวิทยาไม่พบความผิดปกติใดๆ

และในครั้งนี้ผู้ทำกรวิจัยสนใจที่จะศึกษาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดโดยใช้สมุนไพรคือ ผักเชียงดา (*Gymnema Sylvestre*) ซึ่งมีสรรพคุณในการช่วยรักษาอาการของเบาหวาน โดยสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งปัจจุบันนี้มีการใช้แพร่หลายทั่วไป แต่ยังมีงานวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์อยู่น้อยมาก ทั้งยังไม่เคยมีการรายงานถึงการนำสาร gymnemic acid ที่เป็นสารสำคัญในผักเชียงดามาใช้ในการรักษาฟื้นฟูสภาพหลอดเลือดและเนื้อเยื่อไตที่เสื่อมสภาพจากภาวะการเกิดโรคไตที่เป็นผลมาจากโรคเบาหวาน (Diabetic kidney disease) ดังนั้นในครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาว่าสาร gymnemic acid นั้นสามารถลดการเกิดความเสียหายและพยาธิสภาพของหลอดเลือดในไตที่เกิดจากภาวะเบาหวานได้หรือไม่ โดยมุ่งเน้นไปที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโครงสร้าง และการเปลี่ยนแปลงทาง morphology ของหลอดเลือดระดับ macrovasculature และ microvasculature ในไต ตลอดจนเน้นศึกษาถึงการแสดงออกของสารที่ชักนำให้เกิดความผิดปกติหรือทำให้เกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดภายในไตที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการการงอกใหม่ของหลอดเลือดจากภาวะเบาหวาน และการแสดงออกระดับโปรตีน ชนิด VEGF ซึ่งเป็น protein markers ของกระบวนการเกิดการงอกใหม่ของหลอดเลือด (angiogenesis) และโปรตีน TGF- β ที่

เกี่ยวข้องกับกระบวนการ differentiation, growth inhibition และ cell apoptosis ในไตของหนูที่
ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

การกำหนดการวางแผนวิจัย โดยใช้สัตว์ทดลองประเภทหนู Wistar rat เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม แบ่งสัตว์ทดลองเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละประมาณ 10-20 ตัว การทดลองนี้ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยภาพรณการใชั้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ MOE 0521.11/1063. Ref.47/2017

กลุ่ม 1 A กลุ่มควบคุม (C) จำนวน 10 ตัว

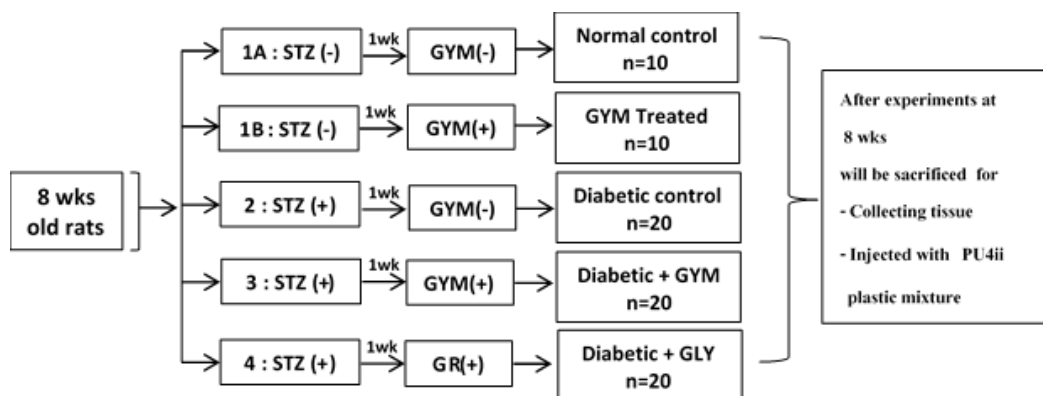
กลุ่ม 1 B กลุ่มควบคุม + gymnemic acid (CGM) จำนวน 10 ตัว

กลุ่ม 2 กลุ่มเบาหวาน (DM) จำนวน 20 ตัว

กลุ่ม 3 กลุ่มเบาหวาน+ gymnemic acid (GM) จำนวน 20 ตัว

กลุ่ม 4 กลุ่มเบาหวาน+ glyburide (GR) จำนวน 20 ตัว

เลี้ยงหนูทั้ง 5 กลุ่มในห้องสัตว์ทดลอง โดยให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอ



รูปที่ 3-1 แผนผังแสดงการออกแบบการทดลอง

3.2 การทำให้สัตว์ทดลองมีสภาวะเบาหวานเพื่อการเก็บตัวอย่าง

- กลุ่มที่ 1A กลุ่มควบคุมปกติ ใช้หนู rat ปกติสายพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ กลุ่มควบคุมนี้ได้รับการฉีด 1 dose ของ 0.1 M *citrate buffer pH 4.5* ทางหลอดเลือดดำ (intravenous injection) ที่หาง (lateral tail vein)
- กลุ่มที่ 1B กลุ่มควบคุม *gymnemic acid* ใช้หนู rat ปกติสายพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ กลุ่มควบคุมนี้ได้รับการฉีด 1 dose ของ 0.1 M *citrate buffer pH 4.5* เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง ทำการทดลองโดยให้ *gymnemic acid* (purify > 75% by HPLC analysis) Shaanxi Langrun Biotechnology Co., LTD. (Xi'an, China) ที่ความเข้มข้น 400 mg/kg (Mall, 2009) บ้วนให้สัตว์ทดลองกินทุกวัน (oral injection) เพิ่มเติมนอกเหนือจากอาหารที่กินตามปกติ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มเบาหวาน เป็นหนู rat สายพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน โดยได้รับการฉีด streptozotocin (STZ) 1 dose ที่ความเข้มข้น 60 mg/kg BW. ผสม 0.1 M *citrate buffer pH 4.5* เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง หลังจากนั้นในช่วงเวลา 3 วันถัดมาทำการเจาะเลือดที่ปลายหางเพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือด (blood sugar) โดยใช้ glucometer หากพบว่ามียกระดับน้ำตาลในเลือดเท่ากับหรือมากกว่า 250 mg/dl ขึ้นไปแสดงว่าหนูมีภาวะเบาหวาน นอกจากนี้ยังมีพฤติกรรมที่สามารถสังเกตได้คือ กินน้ำมากขึ้นและปัสสาวะบ่อย ถ้าสัตว์ได้รับการตรวจสอบว่าเกิดสภาวะเบาหวานเรียบร้อยแล้ว จะถูกเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 8 สัปดาห์
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มเบาหวาน + *gymnemic acid* เป็นหนู Rat สายพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ ที่ถูกทำให้เกิดภาวะเบาหวานเหมือนกลุ่มที่ 2 หลังจากแสดงลักษณะที่บ่งบอกสภาวะเบาหวานแล้ว ทำการทดลองต่อโดยสาร *gymnemic acid* ที่ความเข้มข้น 400 mg/kg บ้วนให้สัตว์ทดลองกินทุกวัน (oral injection) เพิ่มเติมนอกเหนือจากอาหารที่กินตามปกติเลี้ยงต่อไปเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์
- กลุ่มที่ 4 กลุ่มเบาหวาน + glyburide เป็นหนู Rat สายพันธุ์ Wistar rat เพศผู้ ที่ถูกทำให้เกิดสภาวะเบาหวานเหมือนกลุ่มที่ 2 หลังจากแสดงลักษณะทางพยาธิสภาพที่บ่งบอกสภาวะเบาหวานแล้ว ทำการทดลองต่อโดยให้ยา glyburide ที่ความเข้มข้น 4 mg/kg บ้วนให้สัตว์ทดลองกินทุกวัน (oral injection) เพิ่มเติมนอกเหนือจากอาหารที่กินตามปกติเลี้ยงต่อไป เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ในระหว่างการทดลองหนูทุกตัวจะถูกเจาะเลือดที่ปลายหางเพื่อวัดระดับน้ำตาลในเลือด (blood sugar) โดยเครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือด (glucometer) และชั่งน้ำหนักตัวสัตว์สัปดาห์ละครั้งในช่วงเช้า (Khimmakong, et al, 2012, 2014) เป็นเวลารวม 8 สัปดาห์ เมื่อครบตามครบกําหนดเวลา สัตว์ทดลองจะถูกเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อและเลือดเพื่อนำมาทำการศึกษารับต่อไป

สถานที่: สถานีสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อของหลอดเลือดโต โดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา

หลังจากครบกำหนด ทำการ sacrifice หนู ทั้ง 5 กลุ่ม โดยทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วย overdose Thiopental ขนาด 150 mg/kg ฉีดเข้าทางหน้าท้อง (intraperitoneal injection) และเก็บเนื้อเยื่อโตไปทำการศึกษา ดังต่อไปนี้

3.3.1. ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อหลอดเลือด ด้วยการย้อม Hematoxylin และ eosin (H&E staining) ศึกษาโดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา ในสัตว์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วยสาร gymnemic acid โดย

- ทำการเก็บเนื้อเยื่อโต ภายหลังจากสิ้นสุดการทดลองทันที
- เนื้อเยื่อโต จะถูกแช่ในน้ำยา fixatives ที่มี formaldehyde เป็นสารสำคัญ (Bouin's solution) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 70% ethanol ประมาณ 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- นำน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยด้วยกระบวนการ dehydration ด้วย alcohol 70%, 80%, 95% และ 100% ethanol ตามลำดับ ครั้งละประมาณ 30 นาที
- นำชิ้นเนื้อเยื่อใส่ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละประมาณ 30 นาที
- นำเนื้อเยื่อฝังลงในสารกลุ่ม paraplast
- ตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นสไลด์บางๆ ด้วยเครื่อง Microtome มีความหนา 5 ไมครอน
- นำเนื้อเยื่อแผ่นสไลด์ไปย้อม H&E เพื่อศึกษาลักษณะของของเซลล์และเนื้อเยื่อหลอดเลือดโต

3.4 การศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดเชิงสามมิติ ระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ของโครงสร้างของหลอดเลือดที่ไตด้วยวิธี vascular corrosion casting / scanning electron microscope techniques เน้น renal microvasculature ในสัตว์ที่ป่วยเป็นเบาหวาน ช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วย gymnemic acid

3.4.1 เตรียมสัตว์ทดลองทั้ง 5 กลุ่ม ตามข้อ 3.2 ภายหลังจากสิ้นสุดการทดลองตามระยะเวลา 8 สัปดาห์ ทำให้สัตว์ทดลองสลบด้วยยาสลบ และทำการเก็บอวัยวะไตเพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงอย่างละเอียดของ โครงสร้างของหลอดเลือดในระบบไหลเวียนโลหิตของไต ในสัตว์ที่ป่วยเป็นเบาหวานช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วย gymnemic acid ตามลำดับ ดังนี้

- กระบวนการศึกษาด้วยเทคนิค microvascular corrosion cast ทำการเปิดช่องอกของสัตว์ทดลอง แล้วสอดเข็มเบอร์ 18 เข้าทางหัวใจตรง ventricle ด้านซ้าย เข้าสู่ ascending aorta แล้วฉีด 0.9% NaCl เพื่อทำการขับไล่และล้างเลือดออกไป จนกระทั่งหลอดเลือดปราศจากเลือด
- ทำการฉีดพลาสติก PU4ii (vasQtec, Zurich, Switzerland) เข้าไปแทนที่เลือดในหลอดเลือด ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณครึ่งชั่วโมง แล้วแช่ในน้ำอุ่น 80 องศา ประมาณสองชั่วโมง เพื่อให้พลาสติกแข็งตัว
- ทำการผ่าตัดและเก็บอวัยวะไตที่ต้องการศึกษา เน้นการเก็บตัวอย่างที่บริเวณโครงสร้างของหลอดเลือดในระบบไหลเวียนโลหิต นำไปแช่ใน 10-40% KOH เพื่อย่อยเนื้อเยื่อต่างๆของอวัยวะนั้นออกให้หมดเหลือแต่เพียงโครงหลอดเลือด ล้างและทำการเปลี่ยนน้ำเป็นเวลาประมาณสามสัปดาห์จนโครงหลอดเลือดสะอาดปราศจากสิ่งสกปรก โดยการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์
- โครงหลอดเลือดถูกทำให้แห้งสนิทแบบ air dry แล้วจึงนำโครงหลอดเลือดของแต่ละอวัยวะติดลงบนแท่นโลหะ stub
- แล้วจึงนำไปเคลือบผิวด้วยละอองของธาตุทอง (gold coating)
- นำตัวอย่างวางลงบนแท่นตัวอย่างจากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope : SEM) เพื่อศึกษาโครงสร้างละเอียดสามมิติของโครงสร้างไต โดยเน้นไปที่การเปลี่ยนแปลงรูปร่างและโครงสร้างของหลอดเลือดในระบบไหลเวียนโลหิต เพื่อดูโครงสร้าง แขนง การเชื่อมโยง การกระจายของหลอดเลือดและหรือการเกิดพยาธิสภาพการแตกของหลอดเลือดในระบบไหลเวียนโลหิต

3.4.2 การวิเคราะห์ด้านปริมาณ (quantitative analysis) ของหลอดเลือดที่ Renal microvasculature โดยใช้ระบบโปรแกรมคอมพิวเตอร์

การใช้เทคนิคทาง PC-based - morphometry เพื่อการศึกษาและวิจัยทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ (quality and quantitative analysis) ของหลอดเลือดที่ไต โดยใช้ระบบโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ที่มีชื่อว่า SemAfore

- ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ทำการถ่ายภาพเชิงสามมิติที่บริเวณ renal microvasculature ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของโครงสร้างหลอดเลือดที่มาเลี้ยงไต ได้แก่ renal vessels แล้วทำการบันทึกข้อมูลและภาพในโปรแกรมคอมพิวเตอร์

- วิเคราะห์หาปริมาณของเลือดที่ไหลผ่านหลอดเลือด renal vessels ที่มาเลี้ยงไต

ใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ภาพในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ในด้านการแตกแขนงและขนาดของโครงสร้างของหลอดเลือดขนาดต่างๆและหลอดเลือดขนาดเล็ก วิเคราะห์และทำการเปรียบเทียบขนาด และ ปริมาณของเลือดที่ไหลผ่านหลอดเลือดของไต ที่ตำแหน่งโครงสร้างหลอดเลือด renal vessels ในสัตว์ที่ป่วยเป็นเบาหวานช่วงก่อนและช่วงที่ได้รับการรักษาแล้วด้วย gymnemic acid

3.5 ศึกษาการแสดงออกของโปรตีน VEGF และ TGF- β โดยวิธี immunofluorescence

1. นำเนื้อเยื่อแผ่นสไลด์แช่ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
2. นำเนื้อเยื่อสไลด์แช่ใน alcohol 100% 90% 70% และ 50% ตามลำดับ ครั้งละ 5 นาที
3. หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อสไลด์ไปแช่ใน distilled water เป็นเวลา 5 นาที
4. แช่ใน Triton X-100 ใน 0.1 M PBS 30 นาที
5. ล้างเนื้อเยื่อสไลด์ด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
6. แช่ tissue ใน blocking serum dilution 1:200 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 นาที
7. หยด primary antibody คือ VEGF และ TGF- β ลงบนเนื้อเยื่อสไลด์ หลังจากนั้นนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
8. ล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากขั้นตอนนี้เป็นต้นไปให้ทำในห้องมืด พร้อมท่อ eppendorf ด้วยกระดาษฟอยด์ตลอดเวลา
9. หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อสไลด์ไปแช่ใน anti-mouse fluorescence antibody อัตราส่วน 1:200 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

10. ล้างด้วย 0.1 M PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
11. หยด vectashield mounting medium ลงบนเนื้อเยื่อ แล้วปิดทับด้วย cover slit โดยไล่อากาศออกให้หมดแล้วจึงค่อยใช้น้ำยาทาเล็บ (nail polish) ทารอบ cover slit เพื่อผนึกให้คงที่และไม่มีอากาศเข้าไปภายในเนื้อเยื่อแผ่นสไลด์
12. หลังจากนั้นให้นำเนื้อเยื่อแผ่นสไลด์ใส่ในกล่องเก็บสไลด์ และห่อกล่องด้วยกระดาษฟอยด์ เพื่อป้องกันแสงเข้าทำปฏิกิริยากับ fluorescence หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำไปแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย (Mean) \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean, SEM) และเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลองโดยใช้ One-way ANOVA และ Bonferroni post test ซึ่งพิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาระดับน้ำตาลในเลือด น้ำหนักของหนู ค่า Blood Urea Nitrogen และค่า Creatinine

ภายหลังจากการทำการศึกษาทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่า หนูในกลุ่ม DM มีระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงกว่าหนูกลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และเมื่อหนูได้รับสารสกัด gymnemic acid และ ยา glyburide พบว่ามีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ค่า Blood Urea Nitrogen (BUN) และค่า Creatinine (Cr) เป็นการศึกษาเพื่อประเมินการทำงานของไต จากการศึกษาพบว่าหนูในกลุ่ม DM มีค่า BUN (49.4 ± 6.86 mg%) เพิ่มขึ้นสูงกว่าหนูในกลุ่ม C (22.85 ± 1.28 mg%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) และเมื่อหนูได้รับสารสกัด gymnemic acid พบว่ามีค่า BUN (30.03 ± 1.38 mg%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM แต่เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบค่า Cr ในแต่ละกลุ่มพบว่าค่าที่ได้ในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวของหนูในแต่ละกลุ่มพบว่าหนูในกลุ่ม DM มีน้ำหนักตัวที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนู DM ได้รับสาร gymnemic acid และ ยา glyburide พบว่ามีค่าการเพิ่มของน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

ตารางที่ 4-1 แสดงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูในแต่ละกลุ่ม

Week	C (mg/dl)	CGM (mg/dl)	DM (mg/dl)	GM (mg/dl)	GR (mg/dl)
1	109.71±5.99	109.67±2.78	461.00±45.70 ^a	362.89±49.29 ^a	182.62±38.92 ^c
2	98.57±2.57	106.00±2.21	307.33±52.08 ^b	269.22±35.60 ^e	181.00±40.81
3	102.43±1.82	96.33±2.46	386.56±51.01 ^a	188.00±41.51 ^d	166.00±38.94 ^c
4	102.71±1.96	105.17±1.81	379.67±49.46 ^a	240.89±48.70 ^d	115.75±10.49 ^c
5	110.71±2.44	110.33±2.64	338.00±45.65 ^a	289.78±50.06 ^b	119.25±10.58 ^c
6	96.14±2.02	92.67±2.40	358.89±48.92 ^a	249.78±49.68 ^e	107.00±4.77 ^c
7	88.71±3.13	89.83±1.83	333.33±44.12 ^a	259.00±45.53 ^b	102.13±7.57 ^c
8	101.43±2.22	96.67±3.01	334.67±53.02 ^a	213.44±40.73	102.12±4.60 ^c

^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^e $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C

^c $p < 0.001$, ^d $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

ตารางที่ 4-2 แสดงค่าการทำงานของไตในหนูแต่ละกลุ่ม

Parameters	C (mg%)	CGM (mg%)	DM (mg%)	GM (mg%)	GR (mg%)
BUN	22.85± 1.28	24.3±1.11	49.4±6.86 ^a	30.03±1.38 ^c	20.85±1.99 ^b
Cr	0.39±0.02	0.36±0.03	0.31±0.02	0.32±0.05	0.37±0.03

^a $p < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C; ^b $p < 0.001$, ^c $p < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

ตารางที่ 4-3 แสดงระดับน้ำหนักรีดตัวของหนูในแต่ละกลุ่ม

Week	C (g)	CGM (g)	DM (g)	GM (g)	GR (g)
1	310.28±8.40	322.16±6.68	213.33±15.56 ^a	284.37±14.34 ^d	229.67±10.11 ^a
2	327.14±9.24	336.66±5.72	212.22±19.56 ^a	294.37±35.60 ^d	233.33±10.96 ^a
3	340.71±8.41	356.67±6.28	227.56±20.22 ^a	311.25±16.89 ^d	329.44±23.32 ^a
4	351.42±8.50	369.16±7.68	230.00±20.10 ^a	317.50±18.68 ^d	267.77±12.85 ^a
5	364.14±8.13	386.33±7.45	239.56±20.96 ^a	318.00±21.12 ^e	299.44±14.39
6	382.85±9.18	352.50±6.98	245.56±21.96 ^b	346.87±19.17 ^e	286.11±14.66 ^f
7	402.14±9.18	418.33±3.80	286.11±28.68 ^b	361.25±19.49	299.44±16.75 ^b
8	409.28±9.63	432.17±7.70	255.44±24.63 ^a	367.12±18.65 ^c	303.33±17.20 ^b

^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^f $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C

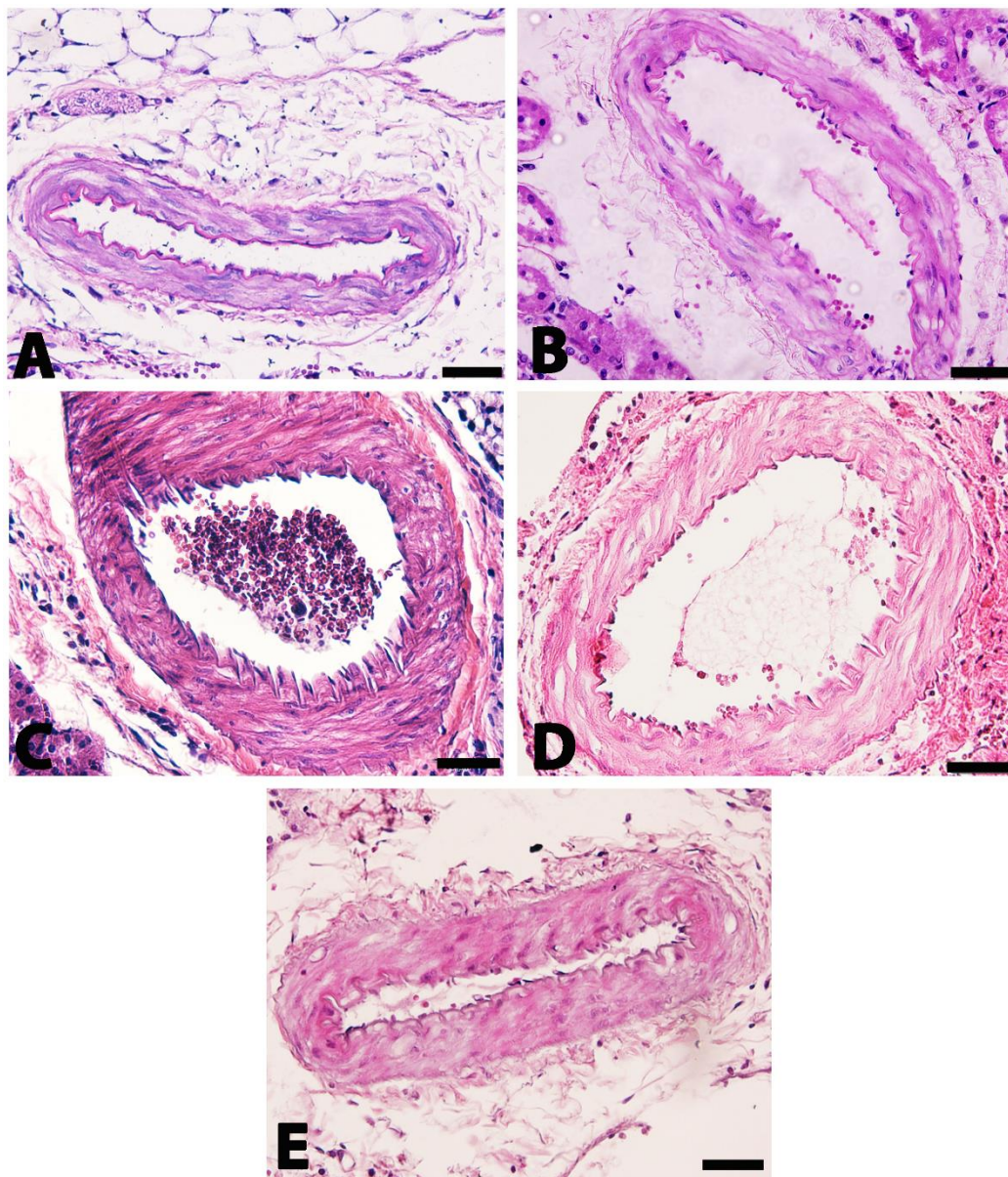
^c $p < 0.001$, ^d $p < 0.01$, ^e $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อของหลอดเลือดไต โดยละเอียดในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา

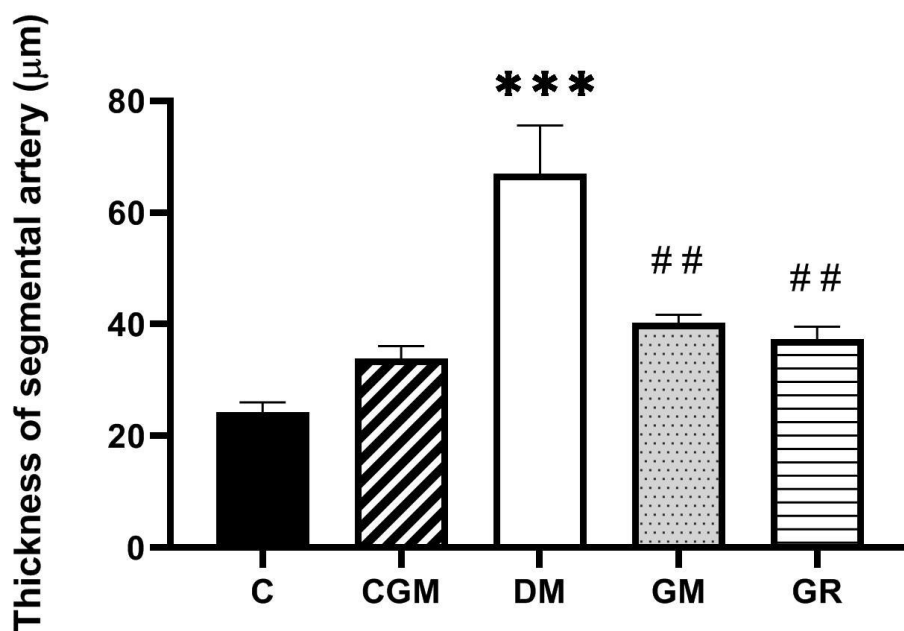
จากการศึกษาโดยการย้อม Hematoxylin และ eosin (H&E) เพื่อศึกษาความหนาของผนังหลอดเลือด ระดับ segmental artery ของหนูแต่ละกลุ่ม วัดได้ C ($24.29 \pm 1.73 \mu\text{m}$), CGM ($33.92 \pm 2.14 \mu\text{m}$), DM ($66.95 \pm 8.70 \mu\text{m}$), GM ($40.28 \pm 1.39 \mu\text{m}$) และ GR ($37.27 \pm 2.31 \mu\text{m}$) พบว่าผนังหลอดเลือดของหนูในกลุ่ม DM มีการหนาตัวขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนู DM ได้รับความ gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่าการหนาตัวของผนังหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

เมื่อทำการศึกษานาฬิกาผ่านศูนย์กลางของไกลเมอรูลัสของหนูแต่ละกลุ่ม ค่าที่วัดได้คือ C ($55.97 \pm 1.29 \mu\text{m}$), CGM ($56.40 \pm 1.27 \mu\text{m}$), DM ($79.45 \pm 3.52 \mu\text{m}$), GM ($52.73 \pm 5.00 \mu\text{m}$) และ GR ($54.80 \pm 2.65 \mu\text{m}$) พบว่าขนาดของไกลเมอรูลัสในกลุ่ม DM มีขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อได้รับความ gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่าขนาดของไกลเมอรูลัสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM นอกจากนี้ยังพบการหนาตัวของ Bowman's capsule ในกลุ่ม DM

เมื่อทำการศึกษานาฬิกาของ bowman's space ของหนูแต่ละกลุ่ม ค่าที่วัดได้คือ C ($3.53 \pm 0.47 \mu\text{m}$), CGM ($4.10 \pm 0.42 \mu\text{m}$), DM ($11.23 \pm 1.61 \mu\text{m}$), GM ($6.72 \pm 1.02 \mu\text{m}$) และ GR ($6.38 \pm 0.59 \mu\text{m}$) พบว่าขนาดของ bowman's space ในกลุ่ม DM ขนาดใหญ่ขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนู DM ได้รับความ gymnemic acid และ ยา glyburide พบว่าขนาดของ bowman's space ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM และเนื้อเยื่อไตโดยทั่วไปดีขึ้นใกล้เคียงกับกลุ่ม C



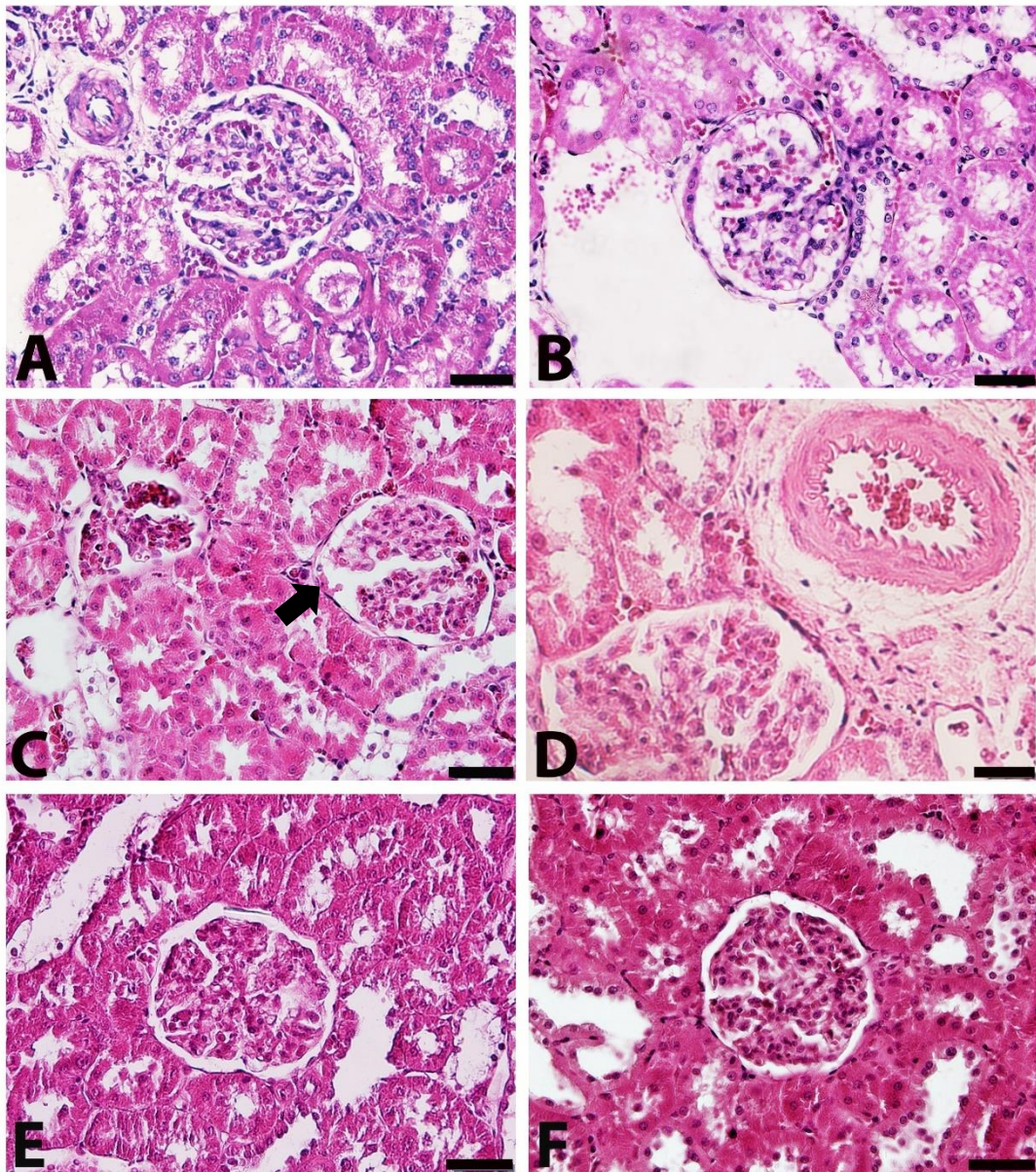
รูปที่ 4-1 แสดงภาพตัดขวางของ segmental artery ในแต่ละกลุ่ม : กลุ่ม Control (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) และ กลุ่ม GR (E) สเกลบาร์ = 20 ไมโครเมตร



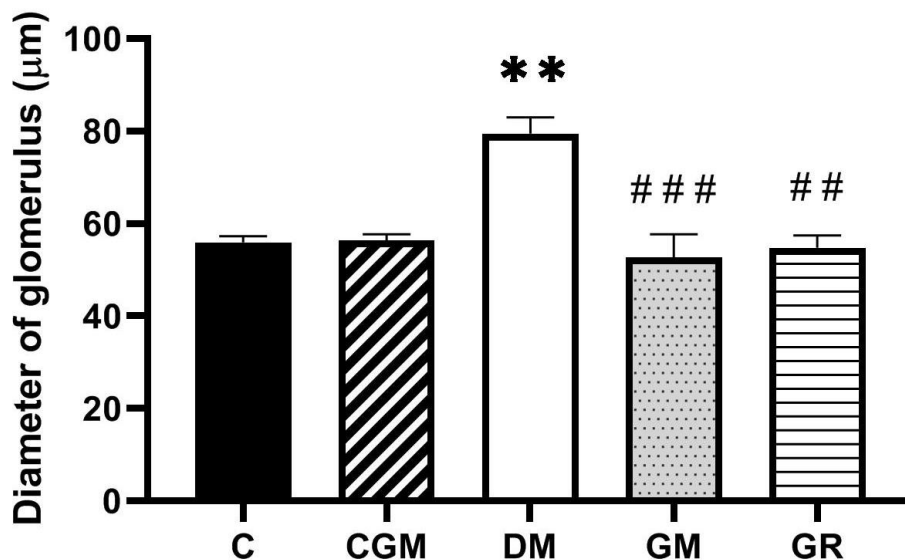
รูปที่ 4-2 แสดงการเปรียบเทียบความหนาของผนัง segmental artery ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-3 แสดงขนาดและลักษณะของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม : กลุ่มControl (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C,D) กลุ่ม GM (E) กลุ่ม GR (F) สเกลบาร์=20 ไมโครเมตร
ลูกศร แสดงการหนาตัวของ Bowman's capsule

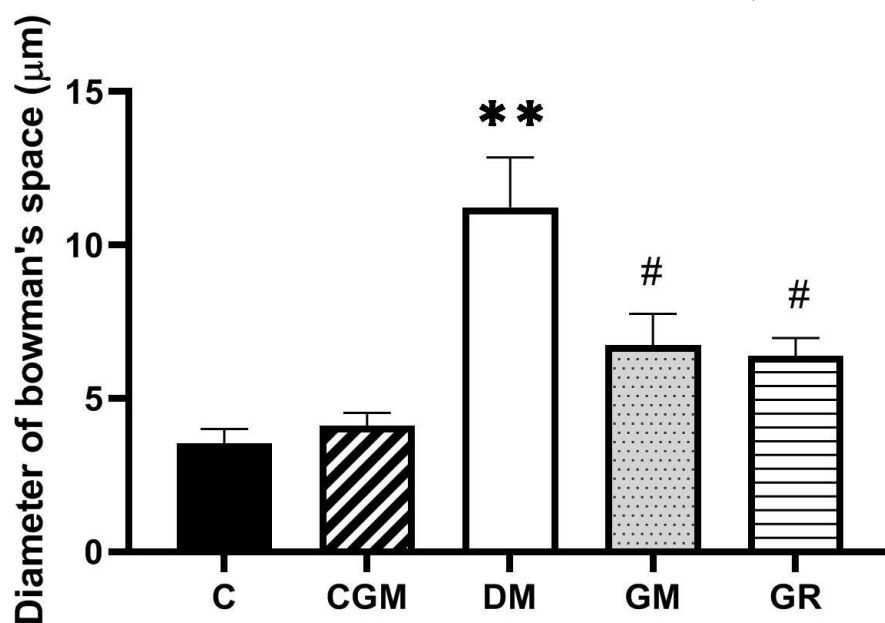


รูปที่ 4-4 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโกลเมอรูลัสในแต่ละกลุ่ม (n=5)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-5 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Bowman's space ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

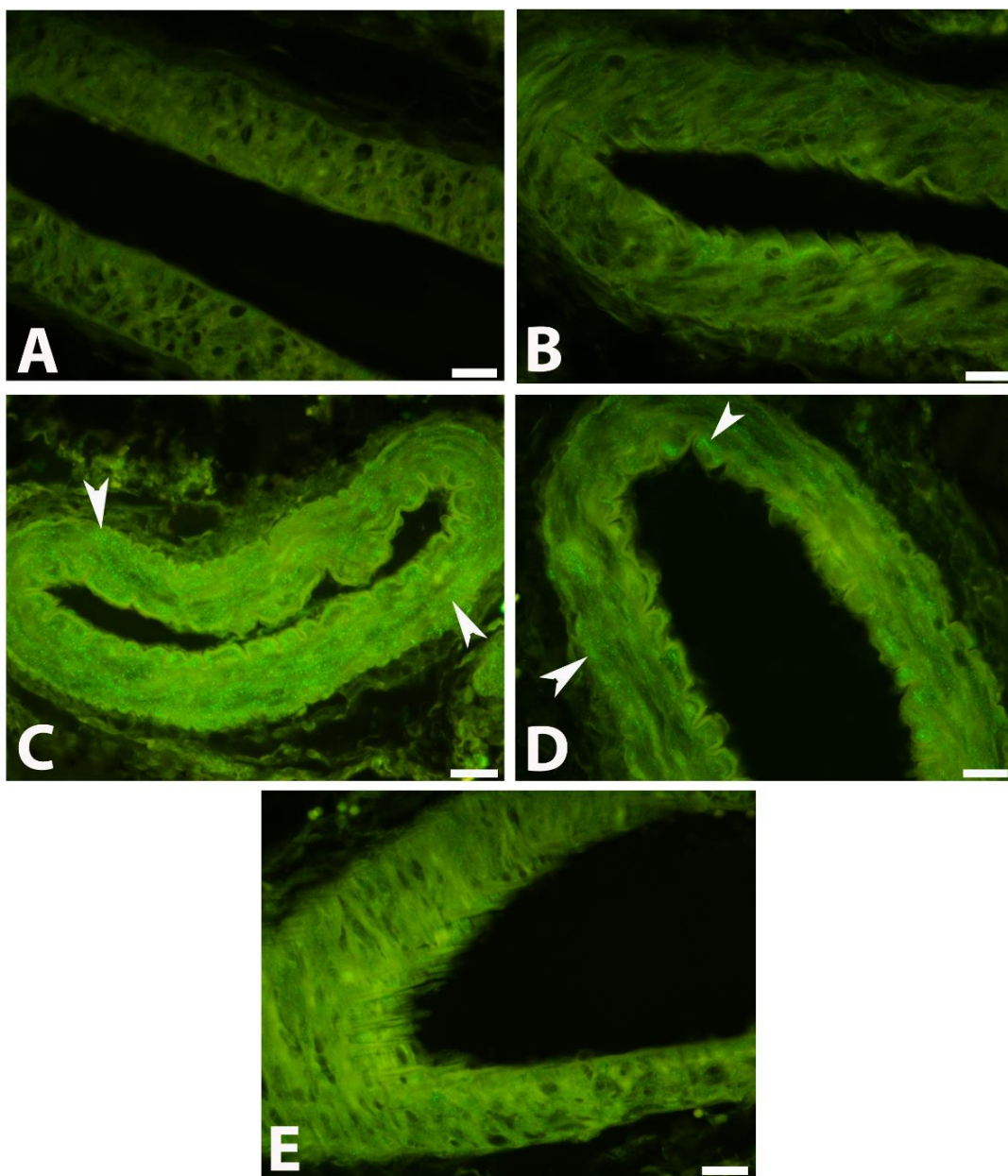
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

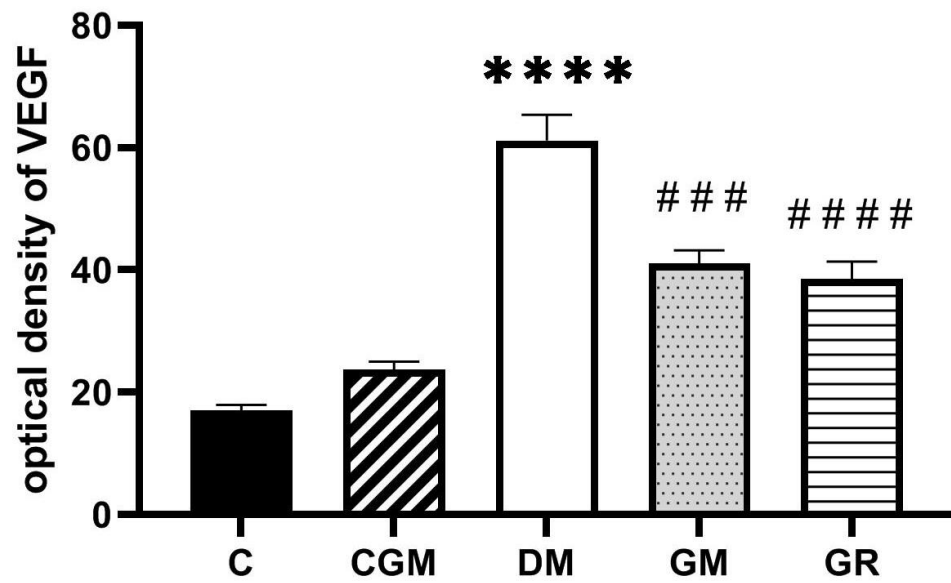
4.3 ผลการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) ใน segmental artery และ interlobar artery

ปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ต่อ Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) ในเนื้อเยื่อไตจะย้อมติดสีเขียว จากการศึกษารายการแสดงออกของ VEGF ใน segmental artery ของหนูแต่ละกลุ่ม C (17.01 ± 0.96), CGM (23.79 ± 1.24), DM (61.19 ± 4.19), GM (41.03 ± 2.15) และ GR (38.57 ± 2.77) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีการแสดงออกของ VEGF มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีการแสดงออกของ VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และ ($p < 0.0001$) ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

จากการศึกษารายการแสดงออกของ VEGF ใน interlobar artery ของหนูแต่ละกลุ่ม C (17.01 ± 0.96), CGM (23.79 ± 1.24), DM (61.19 ± 4.19), GM (41.03 ± 2.15) และ GR (38.57 ± 2.77) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีการแสดงออกของ VEGF มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีการแสดงออกของ VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-6 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ VEGF ใน segmental artery ในแต่ละกลุ่ม :
 กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) กลุ่ม GR (E) สเกลบาร์ =
 10 ไมโครเมตร



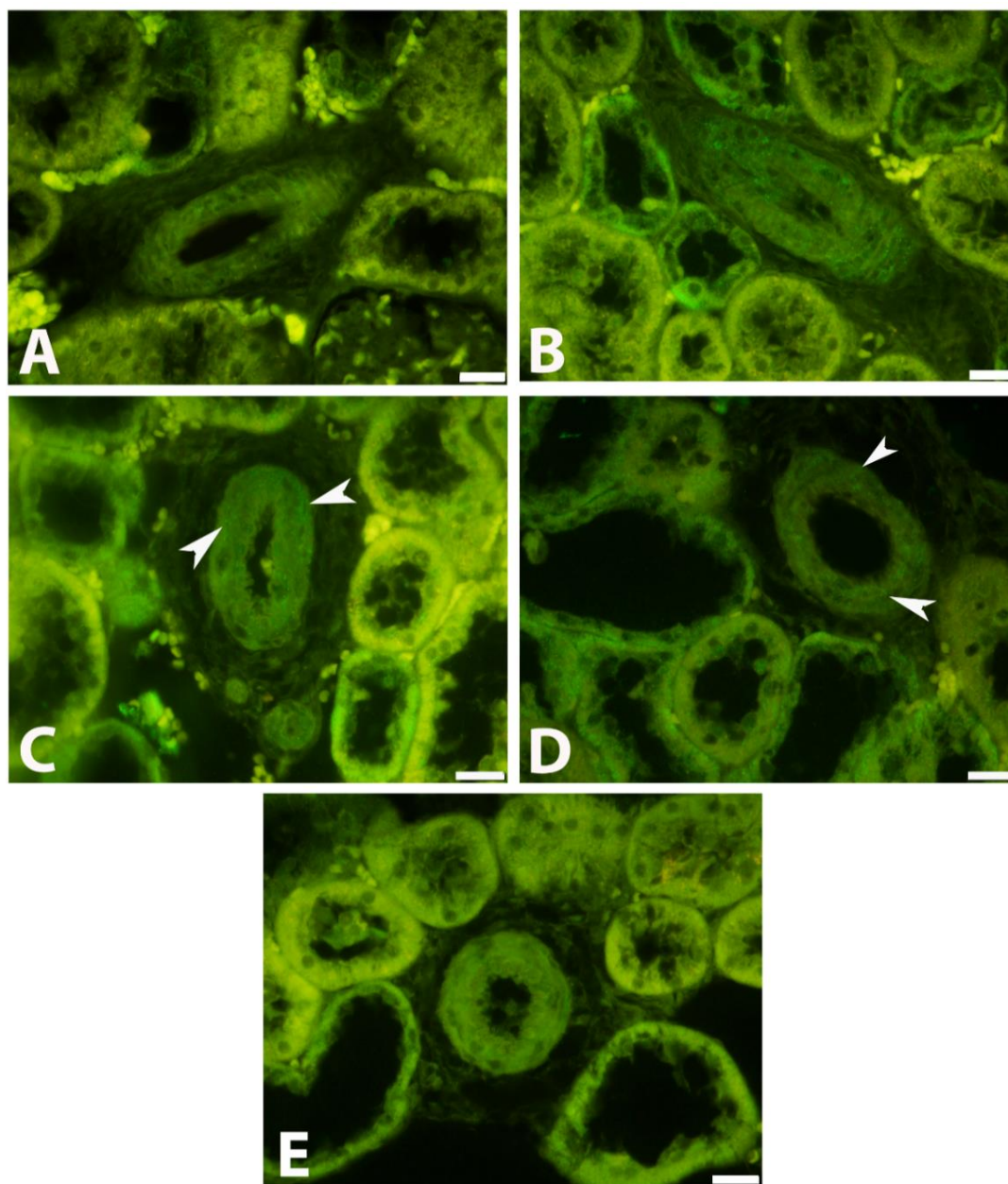
รูปที่ 4-7 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ VEGF ในหลอดเลือด segmental artery

(n=5)

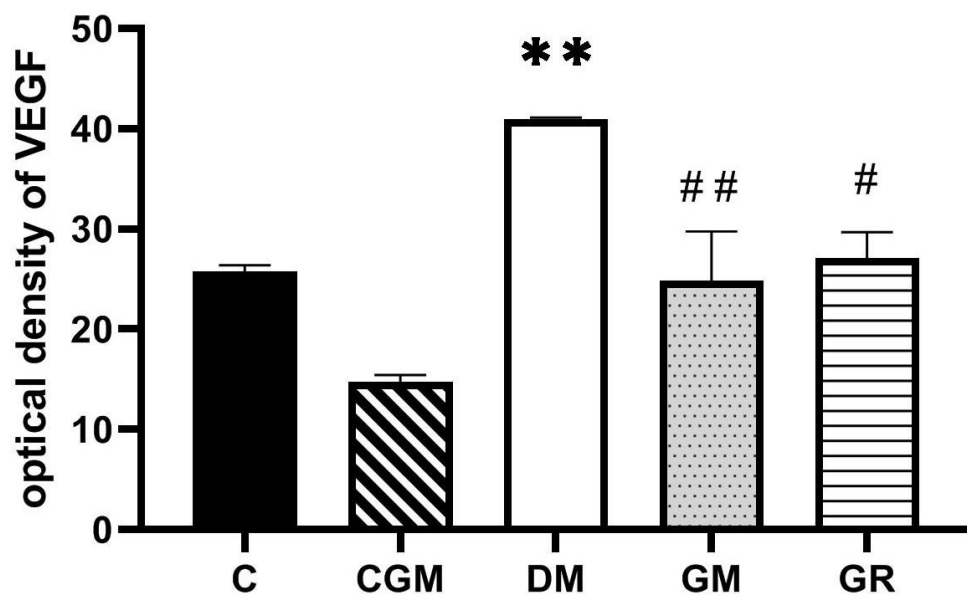
**** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-8 แสดงปฏิกิริยาภูมิคุ้มโนฟลูออเรสเซนส์ของ VEGF ใน interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม :
 กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) กลุ่ม GR (E) สเกลบาร์= 10 ไมโครเมตร



รูปที่ 4-9 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ VEGF ในหลอดเลือด interlobar artery (n=5)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

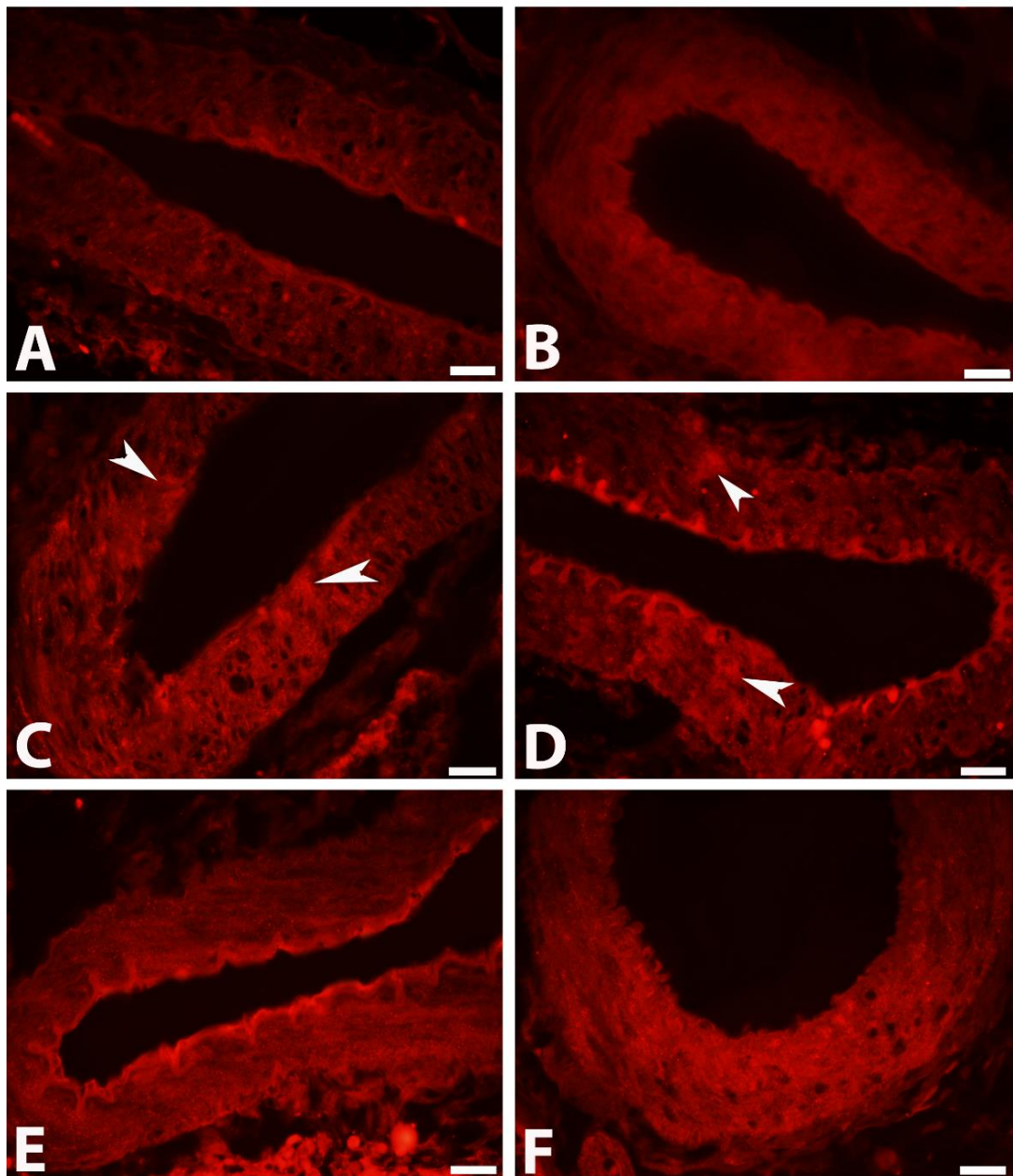
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

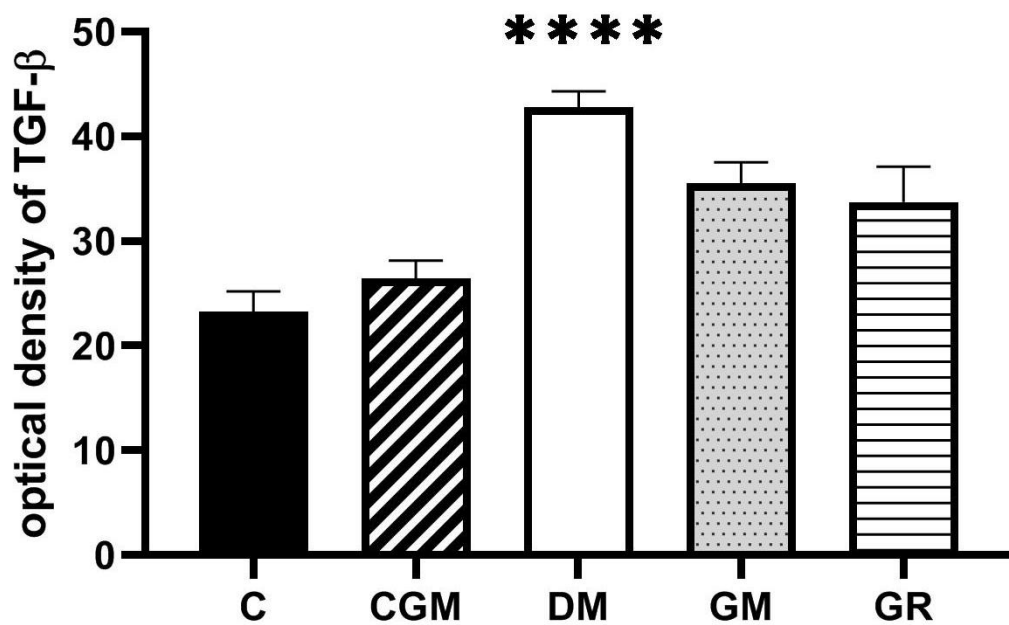
4.4 ผลการศึกษาปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันฟลูออเรสเซนต์ของโปรตีน Transforming growth factor beta (TGF- β) ใน segmental artery และ interlobar artery

ปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันในฟลูออเรสเซนต์ต่อโปรตีน Transforming growth factor beta (TGF- β) ในเนื้อเยื่อไตจะย้อมติดสีแดง จากการศึกษาการแสดงออกของ TGF- β ใน segmental artery ของหนูแต่ละกลุ่ม C (23.27 ± 1.90), CGM (26.45 ± 1.68), DM (42.80 ± 1.48), GM (35.53 ± 2.00) และ GR (33.71 ± 3.40) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีการแสดงออกของ TGF- β มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C แต่เมื่อได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR ไม่พบว่าการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อทำการศึกษาใน interlobar artery ของหนูแต่ละกลุ่ม C (18.19 ± 0.13), CGM (16.18 ± 0.56), DM (38.53 ± 0.24), GM (27.58 ± 0.74) และ GR (25.76 ± 0.44) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีการแสดงออกของ TGF- β มากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่าการแสดงออกของ TGF- β ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM



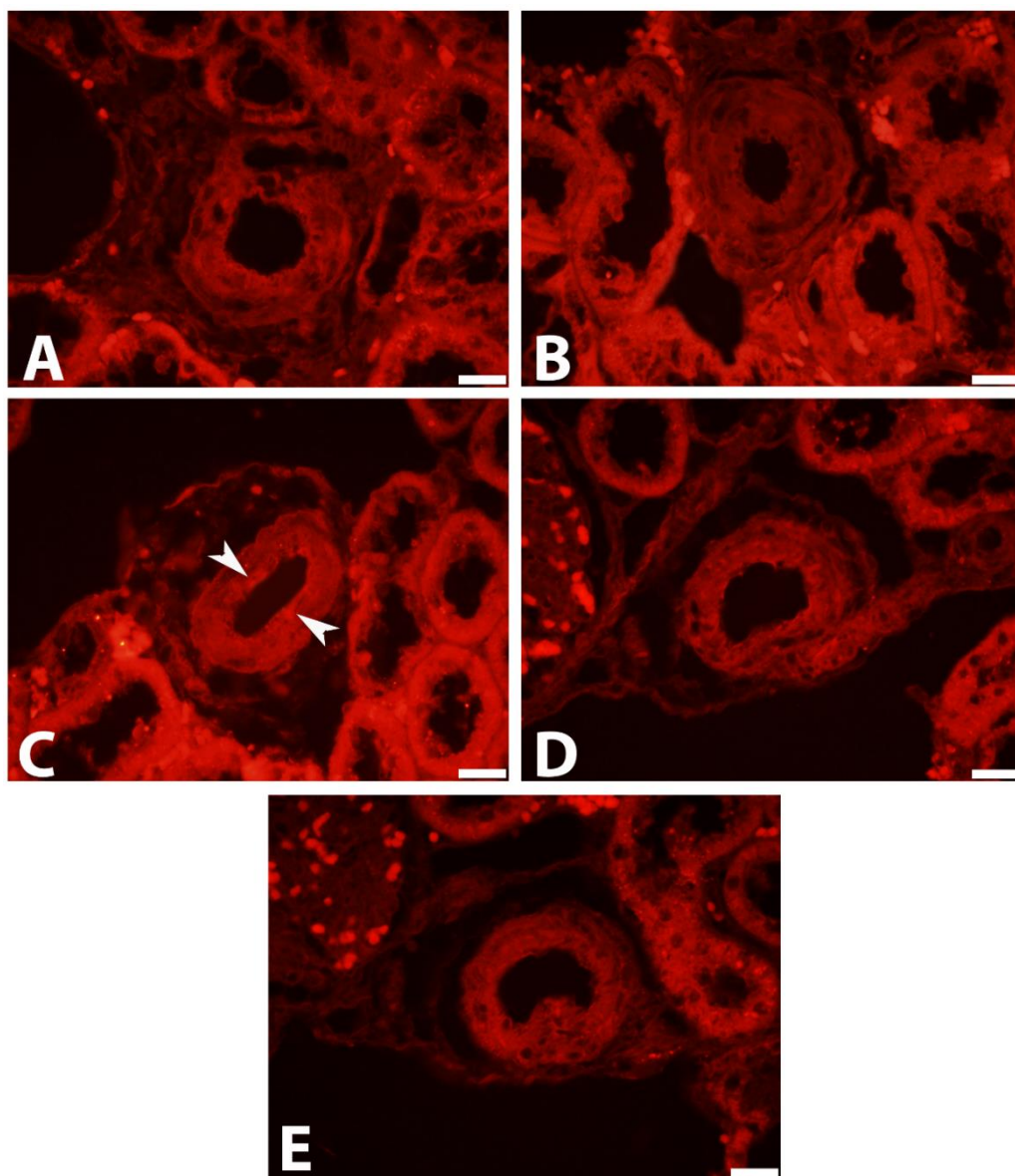
รูปที่ 4-10 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ TGF- β ใน segmental artery ในแต่ละกลุ่ม : กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C,D) กลุ่ม GM (E) กลุ่ม GR (F) สเกลบาร์ = 20 ไมโครเมตร



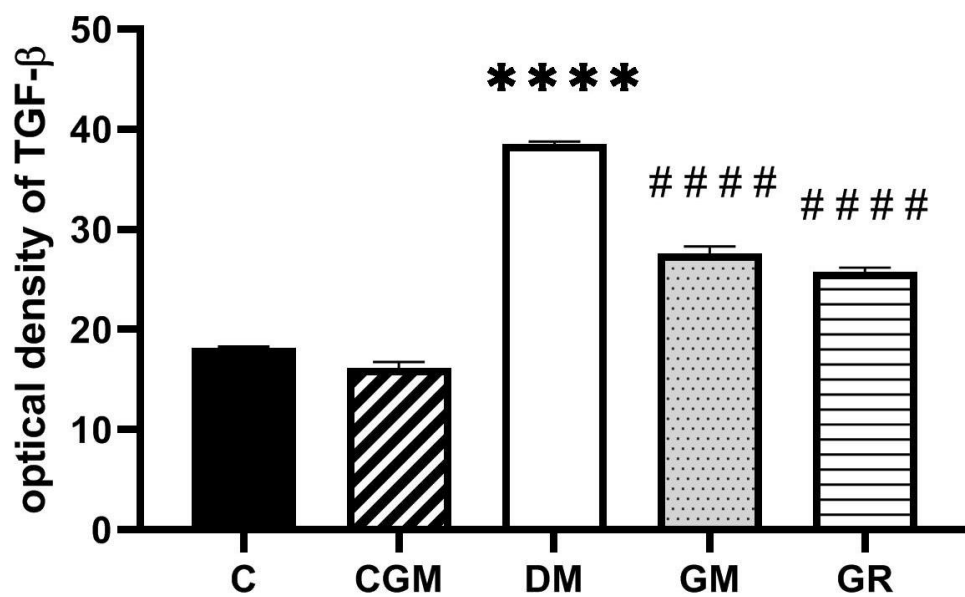
รูปที่ 4-11 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ TGF-β ในหลอดเลือด segmental artery

(n=5)

**** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C



รูปที่ 4-12 แสดงปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนส์ของ TGF- β ใน interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม
 : กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) กลุ่ม GR (E)
 สเกลบาร์=10 ไมโครเมตร



รูปที่ 4-13 แสดงการเปรียบเทียบความหนาแน่นของ TGF- β ในหลอดเลือด interlobar artery

(n=5)

**** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM

4.5 การศึกษาโครงสร้างของหลอดเลือดเชิงสามมิติด้วยวิธี Vascular corrosion casting ร่วมกับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ของโครงสร้างของหลอดเลือดที่ไต

เมื่อนำโครงหลอดเลือดไตของหนูมาศึกษาโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด พบว่า หลอดเลือด segmental artery ในหนูกลุ่ม DM มีลักษณะผิวภายนอกที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอื่น แต่พบการงอกใหม่ของหลอดเลือด (angiogenesis) เกิดเป็นตุ่มเล็กๆออกมาจากแขนงใหญ่ เมื่อทำการศึกษานขนาดของหลอดเลือด segmental artery ในแต่ละกลุ่มวัดเส้นผ่านศูนย์กลางได้ดังนี้ C (0.28 ± 0.03 mm), CGM (0.28 ± 0.01 mm), DM (0.25 ± 0.02 mm), GM (0.27 ± 0.02 mm) และ GR (0.25 ± 0.02 mm) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีขนาดของหลอดเลือดลดลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อได้รับสาร gymnemic acid และ ยา glyburide พบว่าหลอดเลือดมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรเลือดที่ไหลผ่านหลอดเลือด segmental artery ในแต่ละกลุ่มพบว่า กลุ่ม C มีค่าเท่ากับ (0.066 ± 0.01 mm³), CGM (0.064 ± 0.007 mm³), DM (0.052 ± 0.009 mm³), GM (0.056 ± 0.005 mm³) และ GR (0.059 ± 0.003 mm³) ซึ่งหนูในกลุ่ม DM มีปริมาตรของเลือดไหลผ่านลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีปริมาตรการไหลผ่านของเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อทำการศึกษานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C (0.13 ± 0.003 mm), CGM (0.16 ± 0.003 mm), DM (0.09 ± 0.002 mm), GM (0.11 ± 0.003 mm) และ GR (0.10 ± 0.01 mm) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีขนาดของหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของเลือดที่ไหลผ่าน interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม C (0.014 ± 0.001 mm³), CGM (0.016 ± 0.001 mm³), DM (0.007 ± 0.009 mm³), GM (0.010 ± 0.001 mm³) และ GR (0.009 ± 0.002 mm³) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีปริมาตรของเลือดที่ไหลผ่านลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีปริมาตรไหลผ่านของเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อทำการศึกษานขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ arcuate artery ในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C (55.67 ± 4.09 μm), CGM (56.67 ± 5.81 μm), DM (34.00 ± 5.50 μm), GM (40.00 ± 1.15 μm) และ GR (38.33 ± 2.72 μm) พบว่าหนูในกลุ่ม DM ขนาดของหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือดที่ไหลผ่าน arcuate artery ในแต่ละกลุ่ม C ($2458.88 \pm 51.97 \mu\text{m}^3$), CGM ($2573.75 \pm 58.71 \mu\text{m}^3$), DM ($1247.83 \pm 96.60 \mu\text{m}^3$), GM ($1258.09 \pm 72.52 \mu\text{m}^3$) และ GR ($1537.02 \pm 42.42 \mu\text{m}^3$) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีปริมาตรของหลอดเลือดที่ไหลผ่านลดลง แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีปริมาตรการไหลผ่านของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ในกลุ่ม DM ยังพบความผิดปกติของหลอดเลือด arcuate artery โดยมีลักษณะเป็น irregular shape มีรอยคอดเกิดขึ้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดไม่สม่ำเสมอ หลอดเลือดที่เลี้ยงเนื้อเยื่อไตขนาดเล็กมีลักษณะเหี่ยวแฟบเป็นฝอย

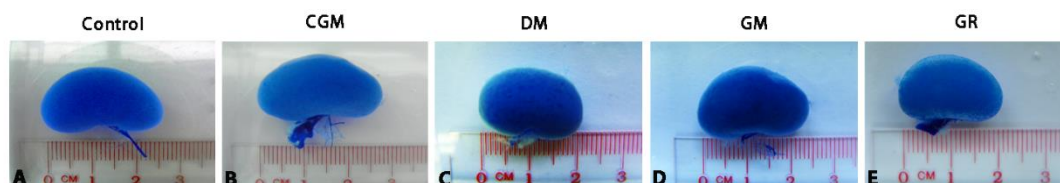
เมื่อทำการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ afferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C ($16.37 \pm 0.63 \mu\text{m}$), CGM ($12.45 \pm 1.46 \mu\text{m}$), DM ($10.49 \pm 0.40 \mu\text{m}$), GM ($13.74 \pm 0.77 \mu\text{m}$) และ GR ($14.78 \pm 0.69 \mu\text{m}$) พบว่าหนูในกลุ่ม DM ขนาดของหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนู DM ได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น โดยกลุ่ม GR พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม GM กับ DM เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือดที่ไหลผ่าน afferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C ($211.05 \pm 16.28 \mu\text{m}^3$), CGM ($139.45 \pm 21.61 \mu\text{m}^3$), DM ($86.65 \pm 6.65 \mu\text{m}^3$), GM ($149.17 \pm 17.05 \mu\text{m}^3$) และ GR ($172.36 \pm 16.11 \mu\text{m}^3$) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีปริมาตรของเลือดไหลผ่านลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีปริมาตรของเลือดไหลผ่านเพิ่มขึ้น โดยพบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในกลุ่ม GR แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม GM เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

เมื่อทำการศึกษาขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ efferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม กลุ่ม C ($12.12 \pm 0.45 \mu\text{m}$), CGM ($11.20 \pm 0.86 \mu\text{m}$), DM (8.03 ± 0.16), GM ($9.71 \pm 0.26 \mu\text{m}$) และ GR ($10.26 \pm 0.38 \mu\text{m}$) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อหนู DM ได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการ

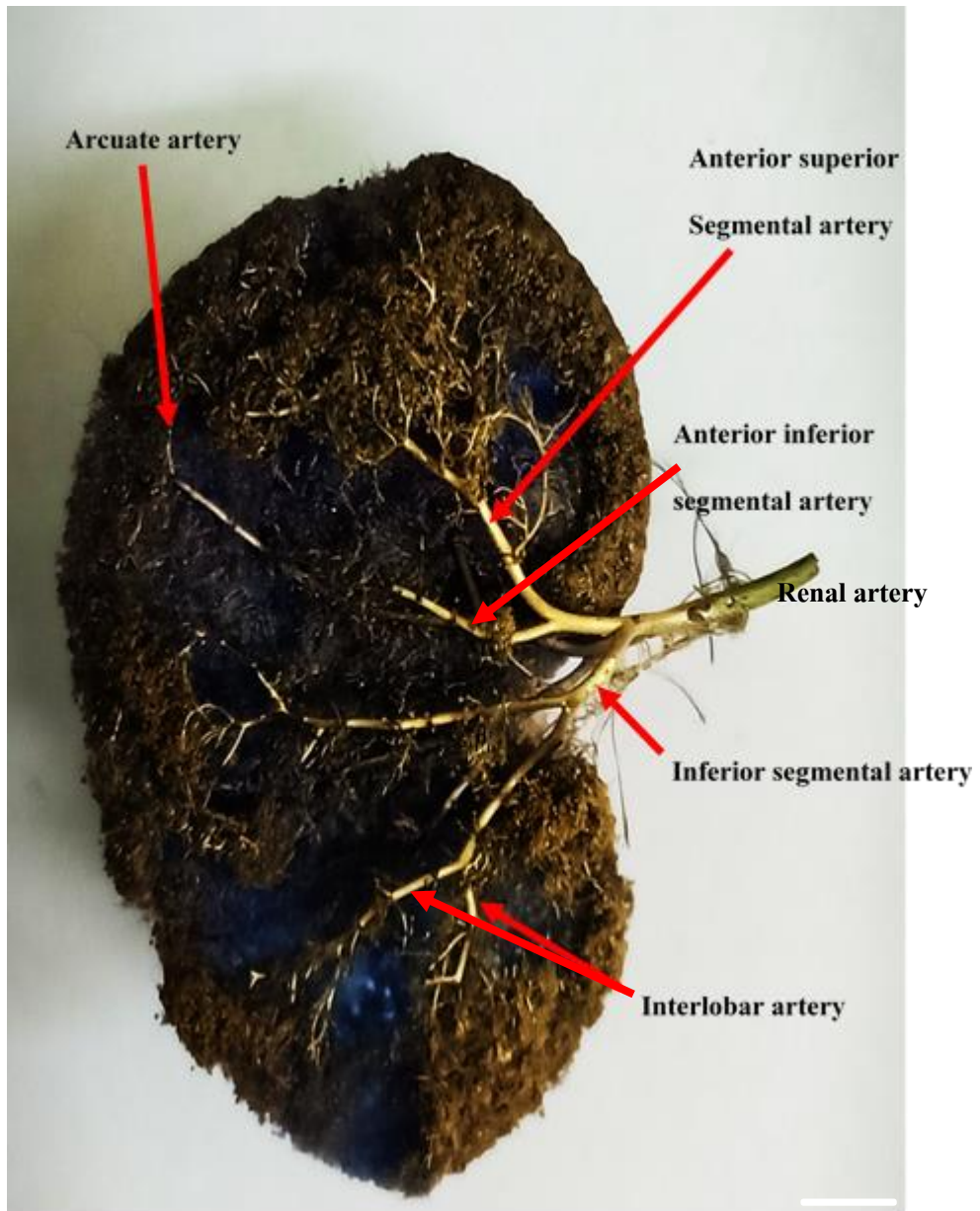
เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด efferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม C ($115.65 \pm 8.48 \mu\text{m}^3$), CGM ($85.41 \pm 8.04 \mu\text{m}^3$), DM ($50.70 \pm 2.02 \mu\text{m}^3$), GM ($74.20 \pm 4.14 \mu\text{m}^3$) และ GR ($82.90 \pm 6.09 \mu\text{m}^3$) พบว่าหนูในกลุ่ม DM มีปริมาตรของเลือดที่ไหลผ่านลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) และเมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีปริมาตรของเลือดเพิ่มขึ้น โดยพบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกลุ่ม GR แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม GM เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

เมื่อทำการศึกษาถึงขนาดของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม C ($110.65 \pm 4.86 \mu\text{m}$), CGM ($107.83 \pm 9.71 \mu\text{m}$), DM ($93.03 \pm 7.48 \mu\text{m}$), GM ($114.22 \pm 6.45 \mu\text{m}$) และ GR ($114.58 \pm 2.53 \mu\text{m}$) หนูกลุ่ม DM มีขนาดเล็กลง แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C เมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของโกลเมอรูลัสเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทั้งในกลุ่ม GM และ GR เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM

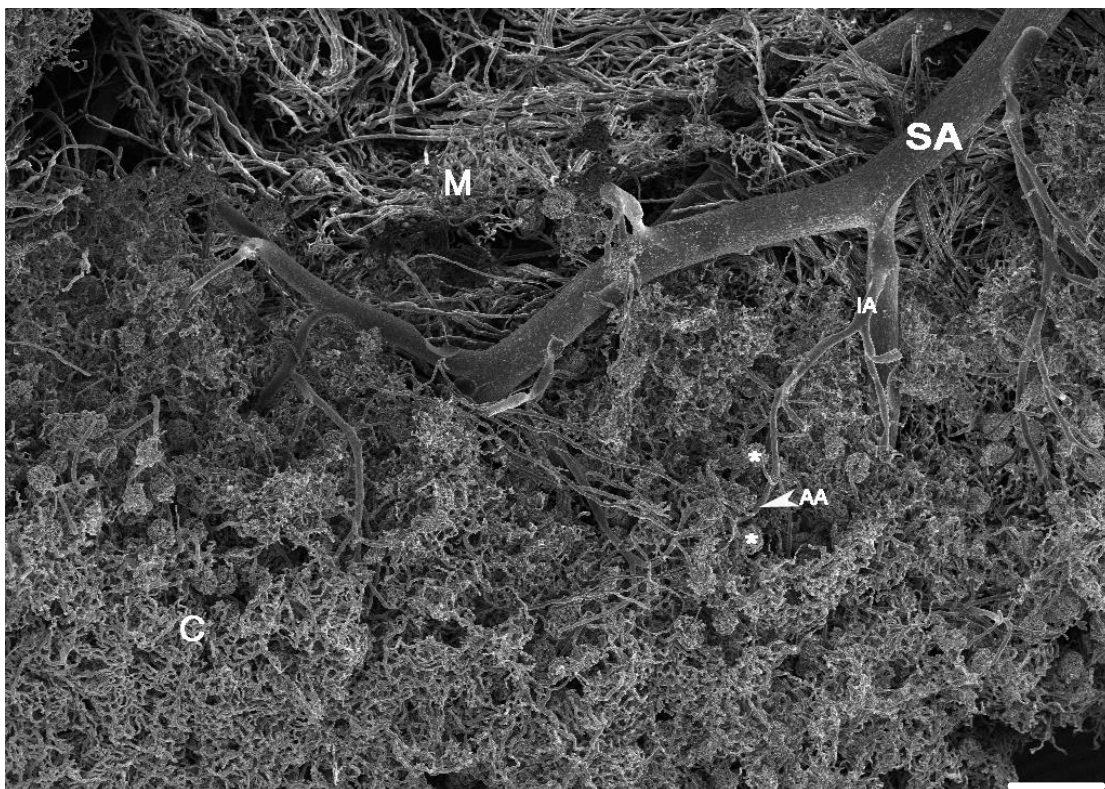
เมื่อทำการศึกษาถึงขนาดของหลอดเลือดฝอย (capillary) ในโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม C ($7.45 \pm 0.078 \mu\text{m}$), CGM ($5.86 \pm 0.186 \mu\text{m}$), DM ($5.47 \pm 0.123 \mu\text{m}$), GM ($7.083 \pm 0.41 \mu\text{m}$) และ GR ($7.57 \pm 0.831 \mu\text{m}$) หนูกลุ่ม DM มีขนาดหลอดเลือดฝอยเล็กลง แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C เมื่อหนูได้รับสาร gymnemic acid ในกลุ่ม GM และ ยา glyburide ในกลุ่ม GR พบว่ามีขนาดของหลอดเลือดเพิ่มขึ้น แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่ม GM แต่พบการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในกลุ่ม GR เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม DM และเมื่อทำการเปรียบเทียบขนาดของหลอดเลือด afferent arteriole และ efferent arteriole พบว่าขนาดของหลอดเลือดทั้งสองในกลุ่ม DM มีขนาดเล็กลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ในกลุ่ม DM ยังพบว่าขนาดหลอดเลือดฝอยมีปริมาณของหลอดเลือดลดลง



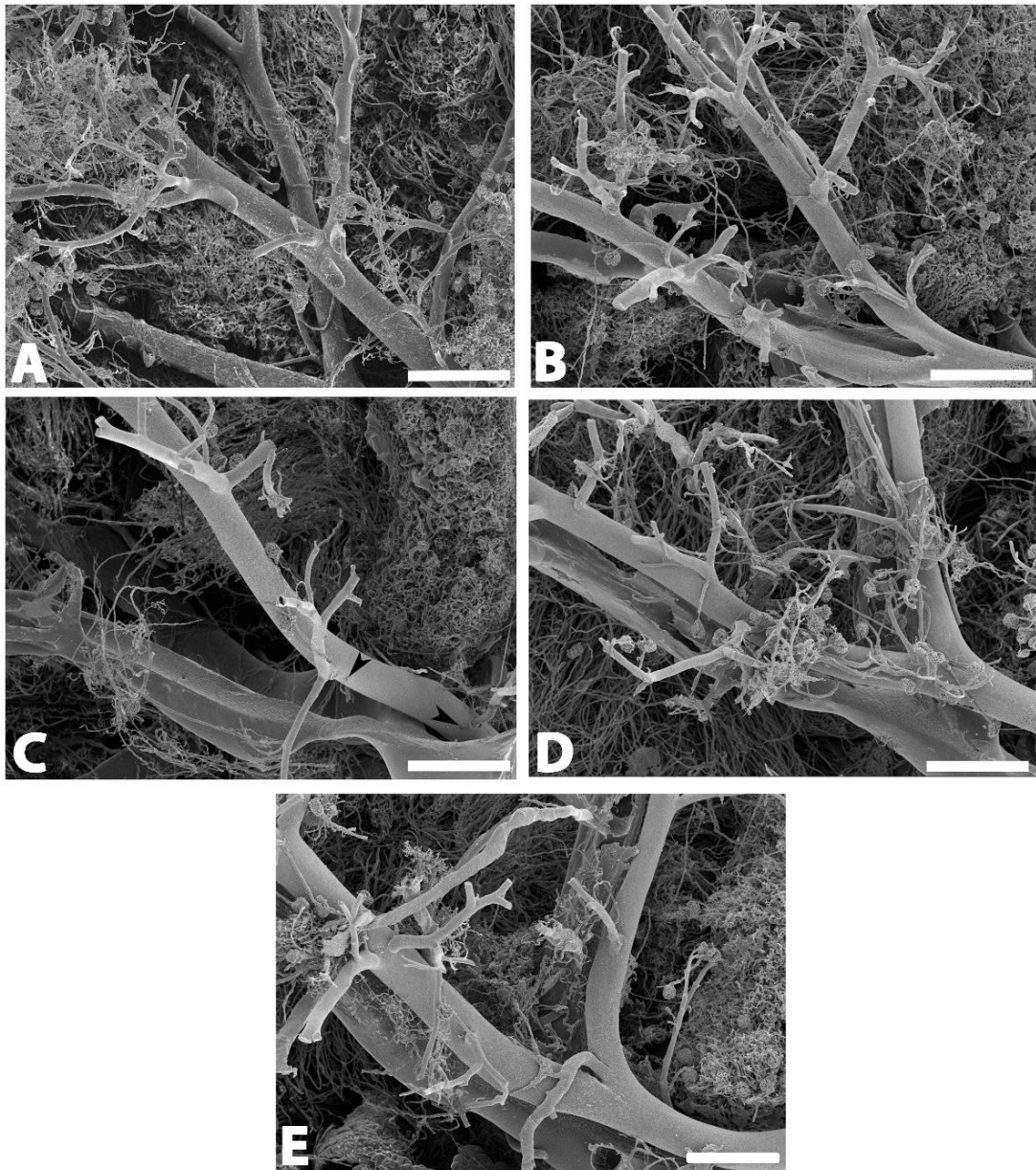
รูปที่ 4-14 ภาพแสดง vascular cast ของไตในแต่ละกลุ่ม



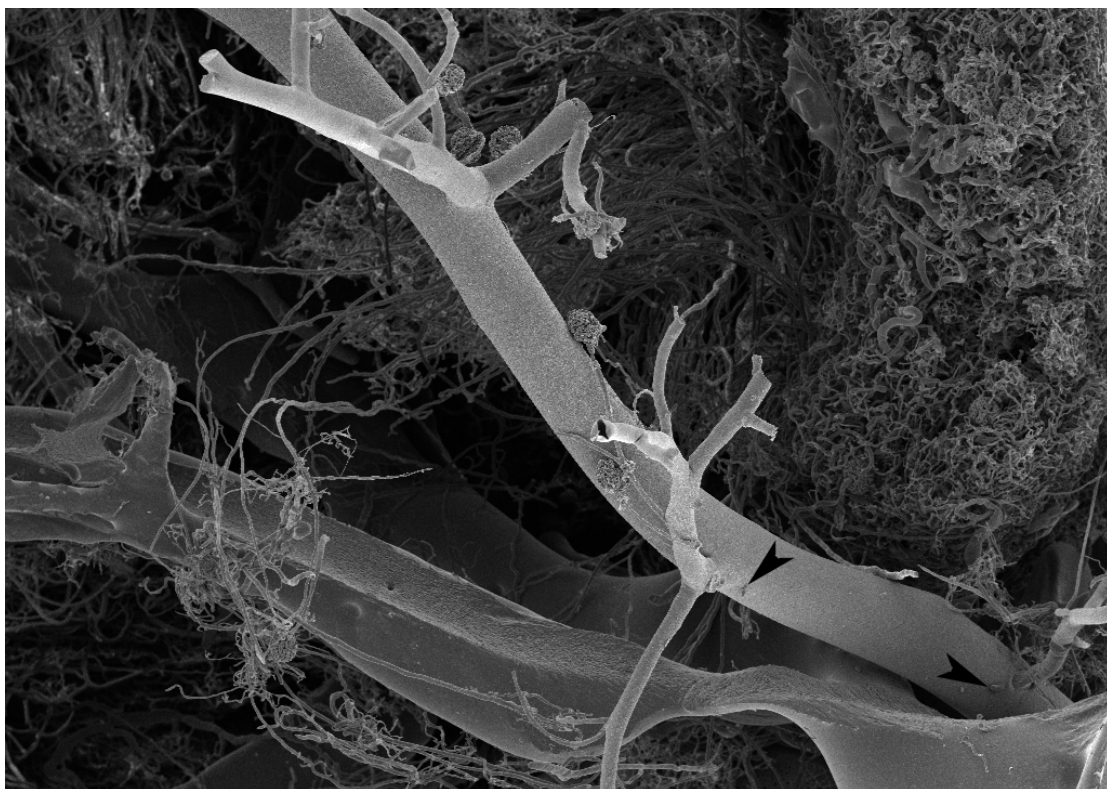
รูปที่ 4-15 ภาพแสดง vascular cast ของไต



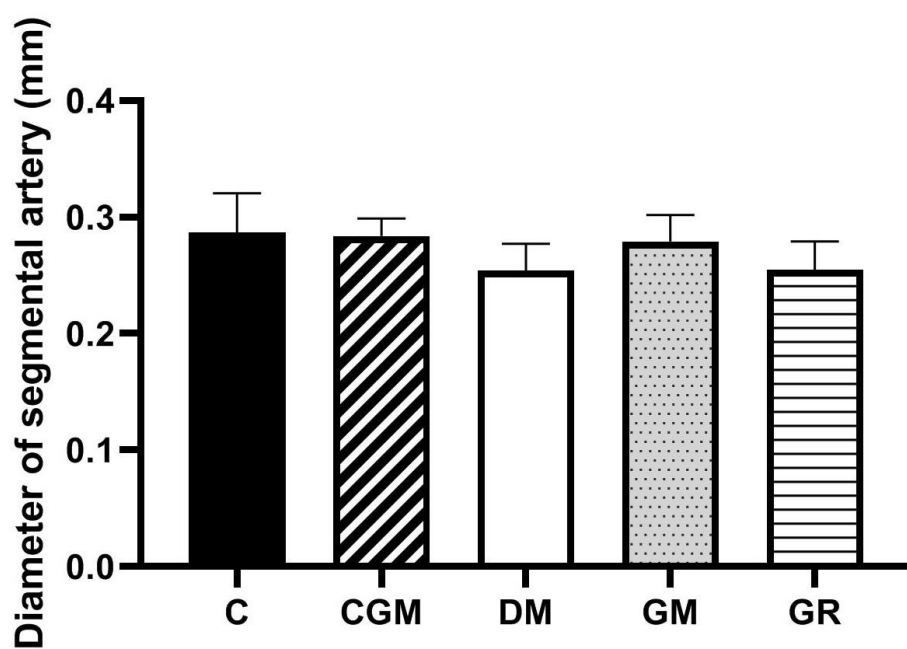
รูปที่ 4-16 ภาพแสดงโครงหลอดเลือดในเนื้อไต (vascular cast) เขิงสามมิติ ระดับจุลทรรศน์
อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด สเกลบาร์ = 1 มิลลิเมตร



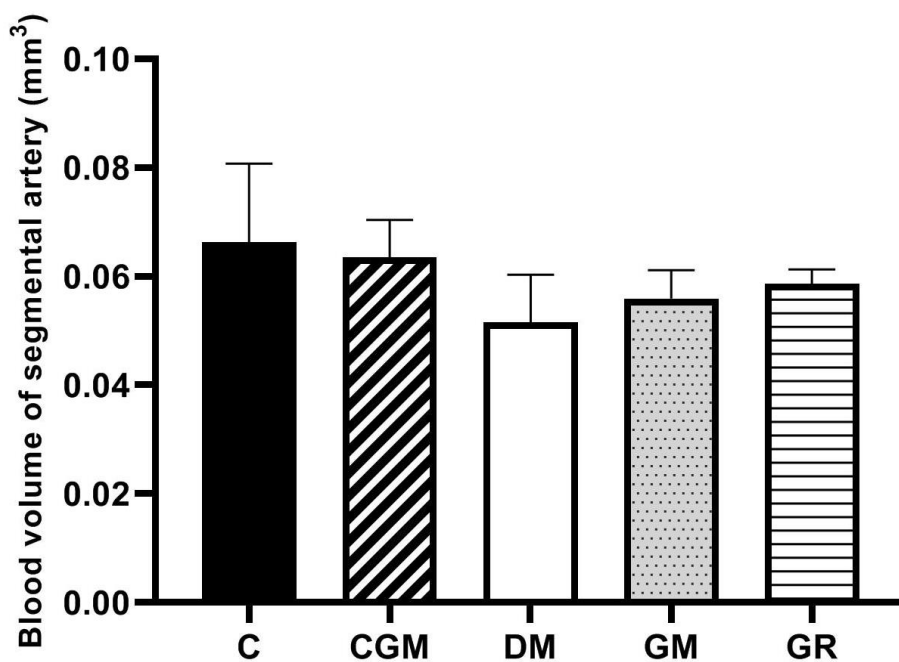
รูปที่ 4-17 แสดงลักษณะการแตกแขนงของโครงหลอดเลือดไต ในแต่ละกลุ่ม : กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) กลุ่ม GR (E) สเกลบาร์= 1 มิลลิเมตร ; ลูกศร แสดงการงอกใหม่ของหลอดเลือด



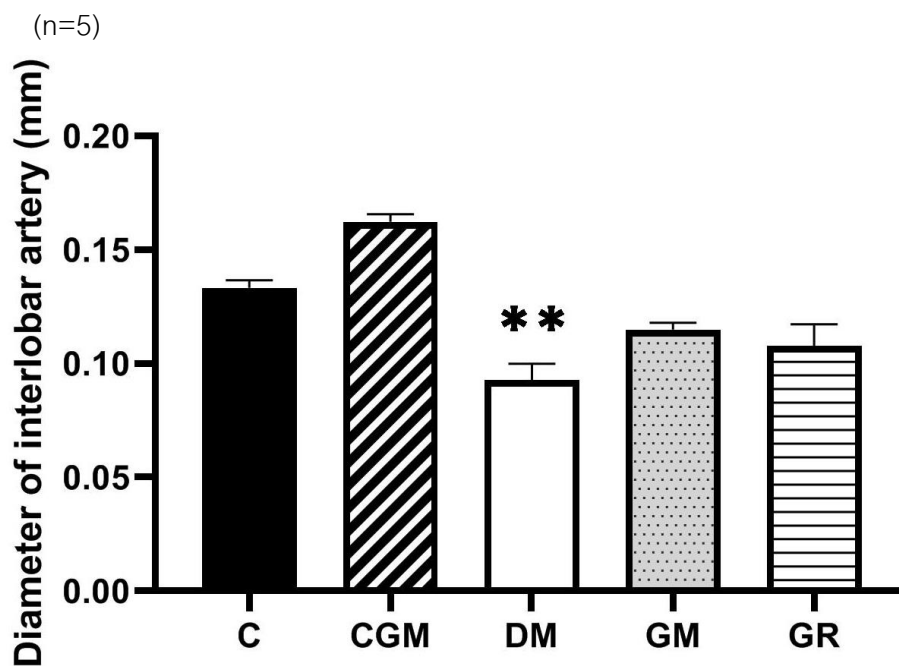
รูปที่ 4-18 แสดงการงอกใหม่ของหลอดเลือดบริเวณ segmental artery ในกลุ่ม DM



รูปที่ 4-19 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ segmental artery ในแต่ละกลุ่ม (n=5)



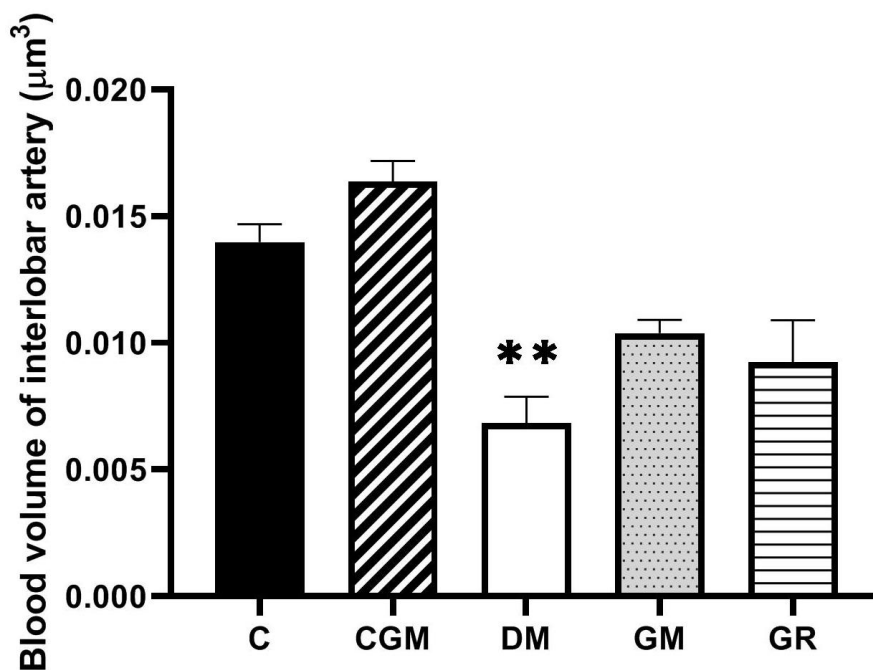
รูปที่ 4-20 แสดงการเปรียบเทียบปริมาณของหลอดเลือด segmental artery แต่ละกลุ่ม



รูปที่ 4-21 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม

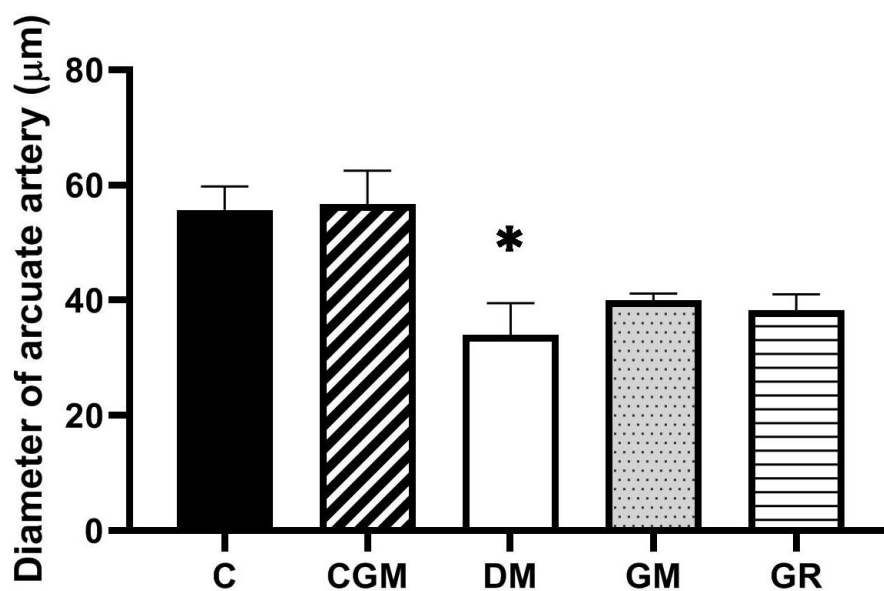
(n=5)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C



รูปที่ 4-22 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด interlobar artery ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

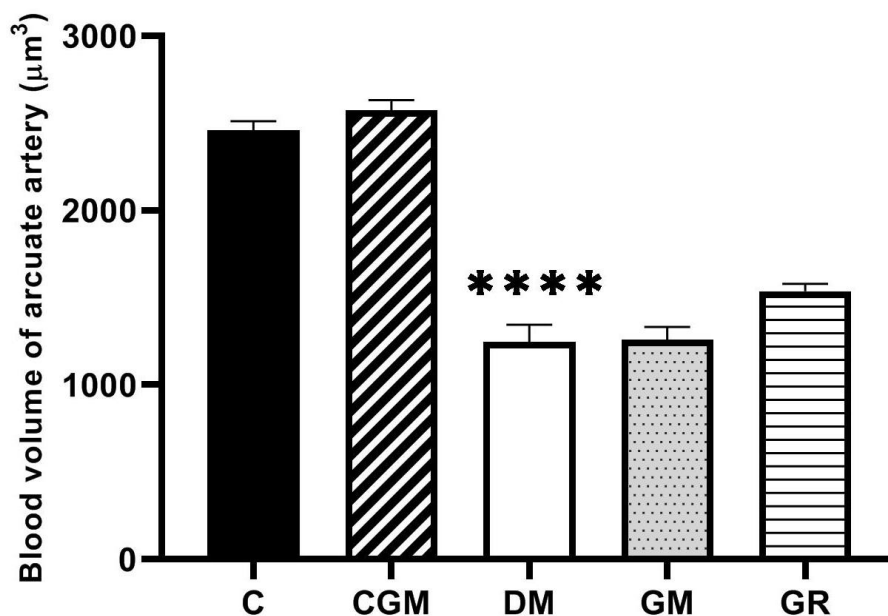
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C



รูปที่ 4-23 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือด arcuate artery

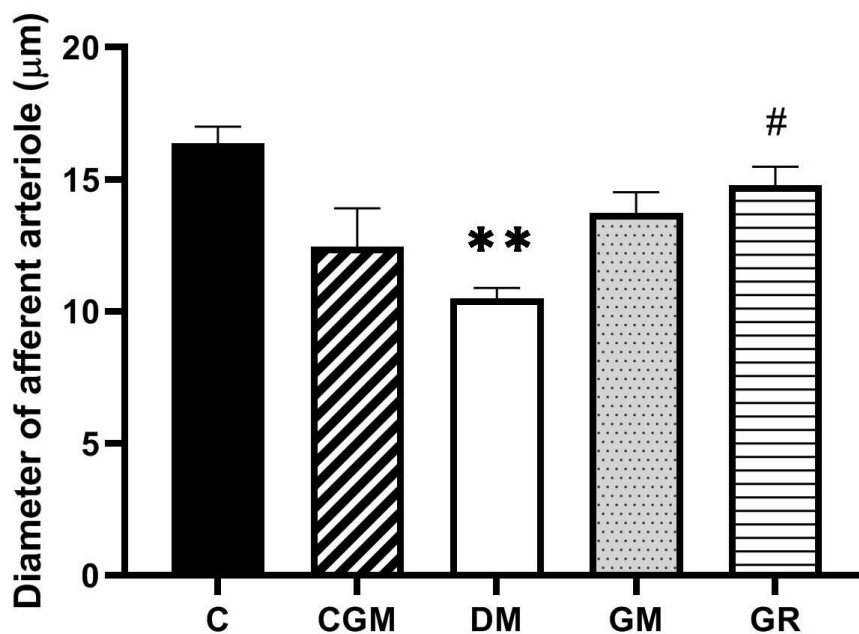
ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C



รูปที่ 4-24 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด arcuate artery ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

**** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

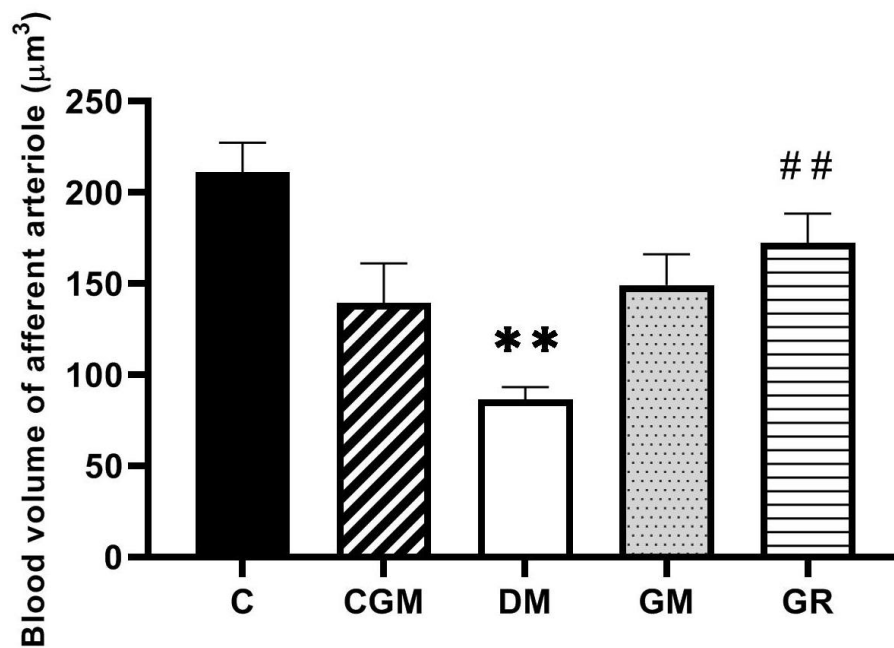


รูปที่ 4-25 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ afferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม

(n=5)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

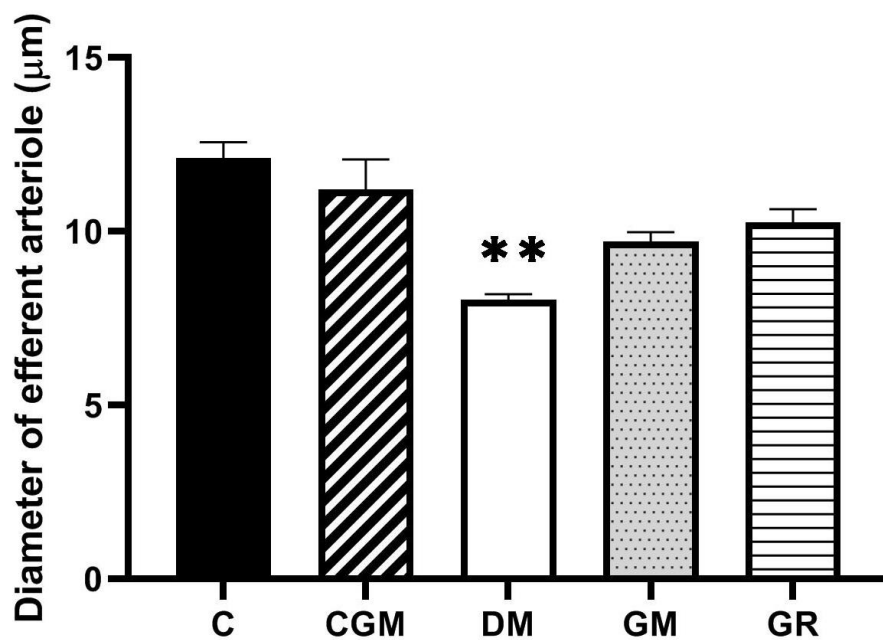
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-26 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด afferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

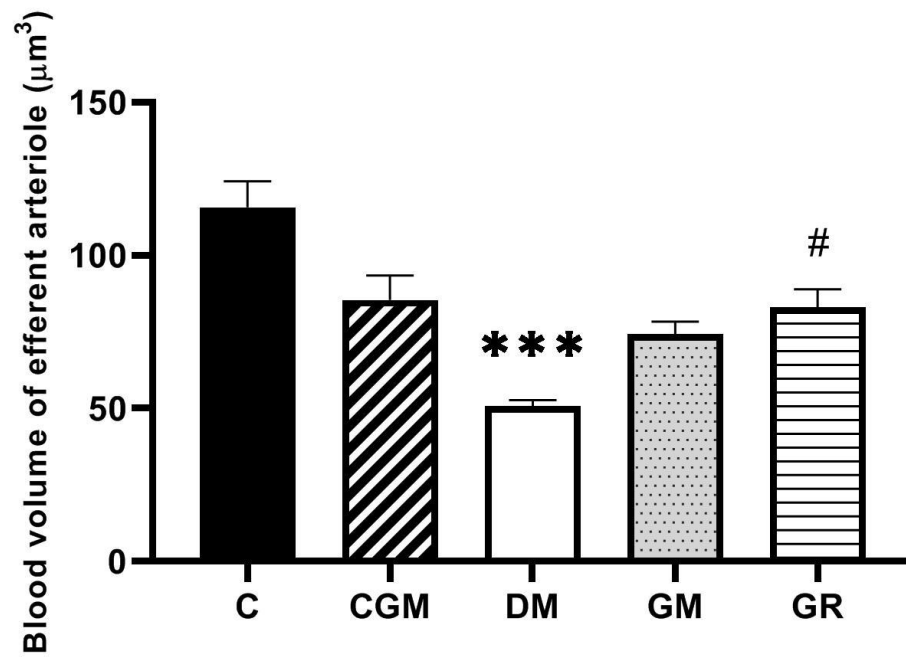
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-27 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ efferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม

(n=5)

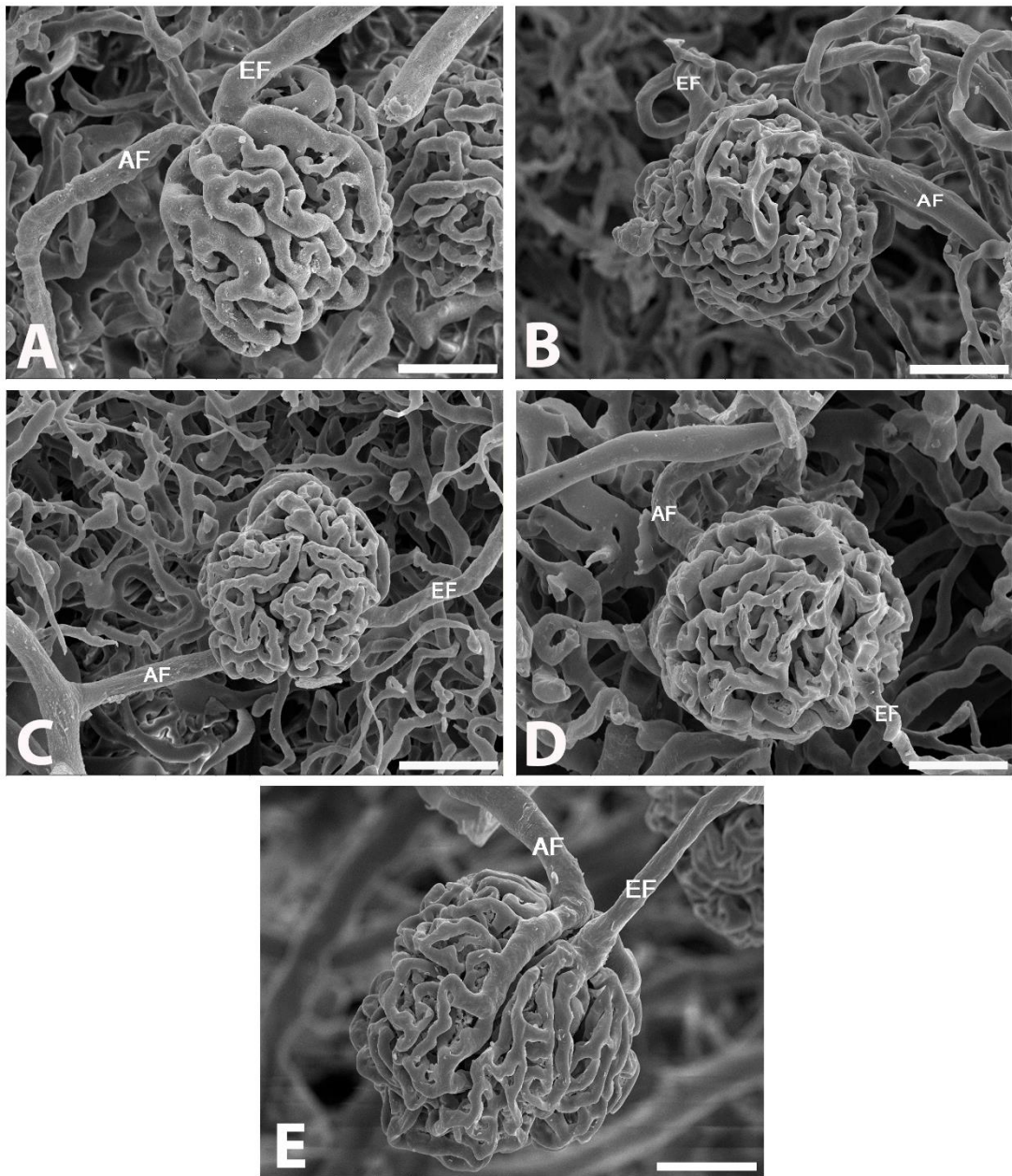
** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C



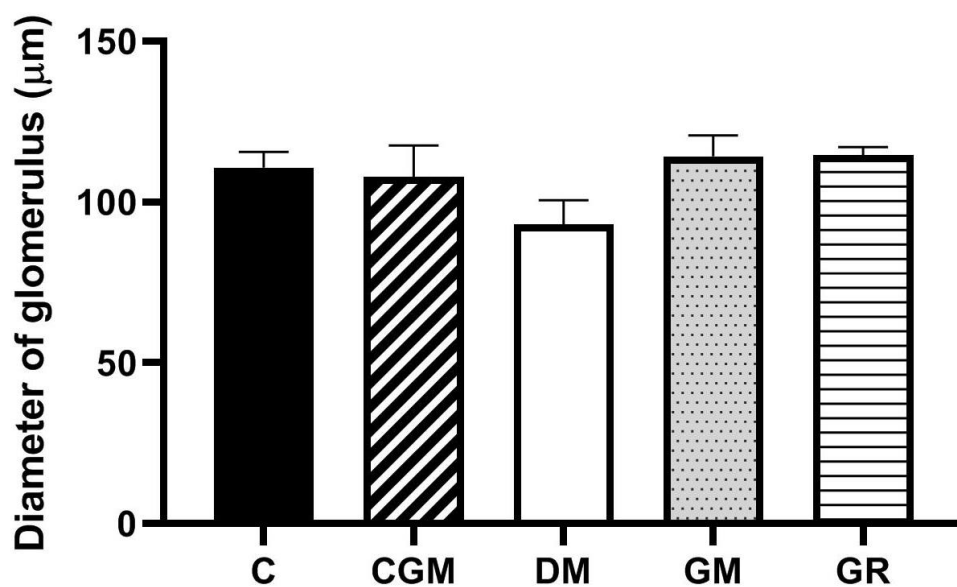
รูปที่ 4-28 แสดงการเปรียบเทียบปริมาตรของหลอดเลือด efferent arteriole ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

*** มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

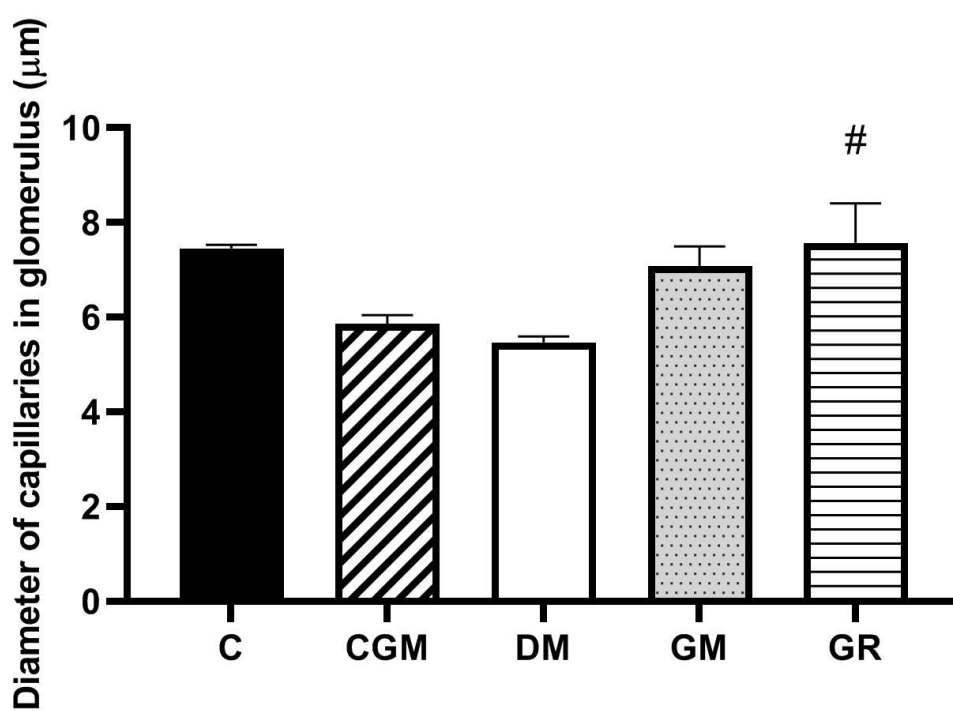
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM



รูปที่ 4-29 แสดงการเปรียบเทียบขนาดและลักษณะของโกลิเมอริสต์ ในแต่ละกลุ่ม : กลุ่ม C (A) กลุ่ม CGM (B) กลุ่ม DM (C) กลุ่ม GM (D) กลุ่ม GR (E) สเกลบาร์ = 50 ไมโครเมตร



รูปที่ 4-30 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม (n=5)



รูปที่ 4-31 แสดงการเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดฝอยในโกลเมอรูลัส ในแต่ละกลุ่ม (n=5)

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาภาวะเบาหวานในหนูทดลองในแต่ละกลุ่ม พบว่าหนูในกลุ่มเบาหวานมีภาวะเบาหวาน โดยมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น โดยมีระดับน้ำตาลในเลือด ≥ 200 mg/dl มีอาการกระหายน้ำ ดื่มน้ำมากกว่าปกติ และมีอาการปัสสาวะบ่อยร่วมด้วย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเบาหวานที่ได้สาร gymnemic acid พบว่ามีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shravan และคณะ (2014) ซึ่งพบว่าหนูในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสาร gymnemic acid ซึ่งสกัดจากใบของผักเชียงดา มีการลดของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากทำการทดลองเป็นระยะเวลา 15 วัน และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yumeng Li และคณะ (2014) พบว่าเมื่อทำการป้อนสาร gymnemic acid ให้หนูในกลุ่มเบาหวานมีการลดของระดับน้ำตาลในเลือด การลดระดับน้ำตาลในเลือดของ gymnemic acid นั้น เกิดจากการที่ gymnemic acid สามารถฟื้นฟูเบต้าเซลล์ในตับอ่อนได้ ทำให้มีการหลั่ง insulin ออกมาเพิ่มขึ้น และเนื่องจาก gymnemic acid มีการเรียงตัวของโมเลกุลคล้ายกับน้ำตาลกลูโคส ทำให้สามารถจับตัวกับ receptor ของรพหวานได้ และยับยั้งการจับตัวกันของน้ำตาลกลูโคส (Fabio et al., 2014) นอกจากนี้ gymnemic acid ยังจับตัวกับ sodium-glucose linked transporter (SGLT) ซึ่งอยู่ในบริเวณ intestinal mucosa ของลำไส้เล็ก ส่งผลให้ลดการดูดซึมกลูโคส จึงส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงตามไปด้วย (Pothuraju et al., 2014) นอกจากนี้หนูในกลุ่มที่ได้รับสาร gymnemic acid และยา glyburide ยังมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวอีกด้วย เมื่อทำการศึกษาถึงการทำงานของไต โดยใช้การตรวจระดับ Blood Urea Nitrogen (BUN) และระดับ Creatinine (Cr) พบว่าหนูในกลุ่มเบาหวานมีการเพิ่มของ BUN การเพิ่มของระดับ BUN ในหนูที่เป็นเบาหวานสอดคล้องกับงานวิจัยของ He CY และคณะ (2006) ซึ่งพบว่าเมื่อทำการศึกษาในหนูที่เป็นเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยการฉีด STZ เป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์มีการเพิ่มของระดับ BUN มากกว่าหนูในกลุ่มที่ไม่มีภาวะเบาหวาน ซึ่งการเพิ่มของระดับ BUN นั้นแสดงถึงการทำงานของไตที่มีประสิทธิภาพลดลง และเมื่อหนูที่มีภาวะเบาหวานได้รับสาร gymnemic acid และยา glyburide มีการลดของระดับ BUN ซึ่งแสดงถึงการทำงานของไตที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ในการนำเนื้อเยื่อไตมาศึกษาการเกิดพยาธิสภาพของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อไตนั้นพบว่า หนูที่มีภาวะเบาหวานมีการหนาตัวขึ้นของผนังของหลอดเลือด segmental artery ซึ่งเป็นแขนงของ renal artery ที่แตกมาจากหลอดเลือดแดง abdominal aorta ในช่องท้อง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Rupadevi Muthaian และคณะ (2016) ที่กล่าวว่า หนูในกลุ่มเบาหวานมีการหนาตัวของผนังหลอดเลือด renal artery เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบการสะสมของไขมันในผนังหลอดเลือด ซึ่งเกิดจากการที่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้เกิด advance glycosylated end-products (AGEs) เพิ่มขึ้น ซึ่ง AGEs จะกระตุ้นให้เกิดการ oxidation ของ LDL และไปสะสมตัวอยู่ในบริเวณเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของผนังหลอดเลือด เมื่อ macrophage ผ่านเข้ามายังผนังหลอดเลือด จะจับตัวกับ LDL ที่เกิดการ oxidation แล้วกลายเป็น foam cell และสะสมตัวอยู่ในบริเวณเซลล์ผนังหลอดเลือดและบริเวณชั้นกล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (วชิราวดี มาลากุล, 2553) เมื่อผนังหลอดเลือดมีการหนาตัวเพิ่มขึ้นส่งผลให้เส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดมีขนาดลดลง ทำให้อัตราการไหลผ่านของเลือดลดน้อยลงตามไปด้วย เมื่ออัตราการไหลผ่านของเลือดลดน้อยลงจะส่งผลให้เลือดไปเลี้ยงอวัยวะนั้นได้น้อยลง และเมื่อหนูในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสาร gymnemic acid และ ยา glyburide พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในสภาพที่ดีขึ้น ใกล้เคียงกับในกลุ่มควบคุม

เมื่อทำการศึกษาถึงการเกิดพยาธิสภาพบริเวณโกลเมอรูลัสพบว่าในกลุ่มที่มีภาวะเบาหวานพบว่าโกลเมอรูลัสมีการขยายใหญ่ขึ้นและมีการหนาตัวขึ้นของ bowman's capsule สอดคล้องกับงานวิจัยของ Liang และคณะ (2018) ซึ่งพบว่าในภาวะเบาหวานโกลเมอรูลัสมีขนาดใหญ่ขึ้น (glomerular hypertrophy) มากกว่าในภาวะปกติ เกิดจากการที่ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจะกระตุ้นให้เกิดหลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลัสเกิดการบาดเจ็บทำให้มีการแบ่งเซลล์ภายในโกลเมอรูลัสมากขึ้น (Wolf et al., 1998) ทำให้เกิดการหนาตัวขึ้นของเส้นเลือดฝอยโกลเมอรูลัส นอกจากนี้ภาวะน้ำตาลในเลือดสูงยังกระตุ้นให้ mesangial cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่อยู่ภายในโกลเมอรูลัสเกิดการสังเคราะห์สารต่างๆมากขึ้น ทำให้เกิดการสะสมอยู่ในบริเวณโกลเมอรูลัสทำให้เกิดการขยายขนาดของโกลเมอรูลัส แต่เมื่อหนูที่มีภาวะเบาหวานได้รับการรักษาโดยการให้สาร gymnemic acid และ ยา glyburide นั้น พบว่าโกลเมอรูลัสมีการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้น ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม

นอกจากนี้ยังพบว่าการเพิ่มของขนาด bowman's space อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มเบาหวาน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mohammad Dallak และคณะ (2018) ซึ่งพบว่า bowman's space ของหนูในกลุ่มเบาหวานมีขนาดกว้างขึ้นนั้น เป็นผลมาจากการที่มี mesangial

cell ขยายตัวขึ้นผ่านในเขตหลอดเลือดฝอยโกลเมอรูลัส ทำให้พื้นที่ผิวที่ใช้ในการกรองลดลง ทำให้ภายในโกลเมอรูลัสมีความดันน้ำเพิ่มสูงขึ้น การขยายขนาดของ Bowman's space นั้นส่งผลให้ Renal corpuscle มีขนาดใหญ่และมีปริมาตรเพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มอัตราการกรองของไต (glomerular hyperfiltration) (Tobar et al., 2013) ซึ่งเป็นพยาธิสภาพอย่างหนึ่งของการความผิดปกติในการทำงานของไต

ในการเกิดพยาธิสภาพบริเวณหลอดเลือดและ glomerulus เป็นผลมาจากการเพิ่มของระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งส่งผลให้เกิดการเพิ่มของ enzyme nitric oxide synthase (eNOS) นอกจากนี้ยังกระตุ้นให้เกิดการสารถ้านอนุมูลอิสระมากขึ้น ซึ่ง eNOS จะกระตุ้นให้เกิดการสร้าง Nitric oxide (NO) มากขึ้น เมื่อ NO ทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเช่น superoxide anion ที่เพิ่มมากขึ้นจนกลายเป็นสารอนุมูลอิสระที่รุนแรงมากขึ้น คือ peroxynitrite จะทำให้เกิดการยับยั้งการสร้าง NO (Creager et al., 2003) จึงส่งผลให้เกิดการเพิ่มของสารอนุมูลอิสระและทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เพิ่มมากขึ้น ทำให้เกิดการอักเสบบริเวณเซลล์บุผนังหลอดเลือด และทำให้เซลล์บุผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติไป ในการเกิดกระบวนการอักเสบจะเป็นการทำลายเซลล์ที่เกิดการอักเสบ ทำให้ต้องมีการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ การซ่อมแซมของเซลล์ทำได้โดยการสร้างพังผืดหรือ Fibrosis ในการสร้างพังผืดนั้นมีตัวกระตุ้นสำคัญที่ทำให้เกิดการสังเคราะห์ extracellular matrix เพิ่มมากขึ้น คือ transforming growth factor beta (TGF- β) จึงส่งผลให้เกิดการสะสมของคอลลาเจนที่บริเวณ basement membrane ของเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือด เมื่อมีการสะสมของคอลลาเจนและ extracellular matrix ต่างๆในปริมาณมากจะทำให้เกิดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือด (สุรพันธุ์ คุณอมรพงศ์ และคณะ, 2545) และเมื่อมีการสะสมของ extracellular matrix มากขึ้นส่งผลให้ glomerulus มีขนาดใหญ่ขึ้นตามไปด้วย

ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สาร gymnemic acid ขนาด 400 mg/kg BW ช่วยลดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือด และลดการเกิด glomerular hypertrophy เนื่องจากสาร gymnemic acid มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ triterpenoid และ saponins ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ (Lah et al., 2019) ทำให้ลดการกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระจึงทำให้ลดการเกิดการอักเสบจึงทำให้ลดการเกิดพยาธิสภาพต่างๆลดลง

งานวิจัยนี้จะทำการศึกษาถึงผลของสาร gymnemic acid และยา glyburide มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในไตหนูที่มีภาวะเบาหวาน ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้ปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของโปรตีน Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของหลอดเลือด และทำการศึกษาปฏิกิริยาอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ของ

โปรตีน Transforming growth factor beta (TGF- β) ซึ่งเป็นโปรตีนที่กระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ extracellular matrix และการงอกใหม่ของหลอดเลือด ซึ่งเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพในการเกิดโรคไตจากเบาหวาน

จากการศึกษาบริเวณ segmental artery และ interlobar artery พบว่าในภาวะน้ำตาลในเลือดสูงทำให้ความหนาแน่นของโปรตีน VEGF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการได้รับสาร gymnemic acid ทำให้ความหนาแน่นของโปรตีน VEGF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน TGF- β ในหลอดเลือดในเนื้อเยื่อไตพบว่า หนูในกลุ่มเบาหวานมีการเพิ่มของ TGF- β อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อหนูที่มีภาวะเบาหวานได้รับสาร gymnemic acid ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหลอดเลือด segmental artery แต่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในหลอดเลือด interlobar artery

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโปรตีน VEGF และ TGF- β ในกลุ่มเบาหวานพบว่ามีความสัมพันธ์กัน เนื่องจากเมื่อมีการเพิ่มของโปรตีน VEGF และ TGF- β จะส่งผลให้มีการเกิดพยาธิสภาพทั้งบริเวณหลอดเลือด โกลเมอรูลัส และเนื้อเยื่อไต เมื่อระดับโปรตีน VEGF และ TGF- β ลดลงจะทำให้การเกิดพยาธิสภาพของโรคไตจากเบาหวานลดน้อยลง ดังนั้นในการเกิดภาวะเบาหวานส่งผลให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และทำให้เกิดการอักเสบเป็นระยะเวลานานส่งผลให้เกิดภาวะการพร่องออกซิเจน (hypoxia) ของเนื้อเยื่อไต ทำให้มีการเพิ่มของ reactive oxygen species และ reactive nitrogen species (ROS/RNS) ซึ่งส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress มากขึ้น ทำให้กระตุ้นการสร้าง VEGF ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่กระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของหลอดเลือด และทำให้เกิดการเพิ่มการซึมผ่านของสารต่างๆสู่หลอดเลือดมากขึ้น ส่งผลให้เป็นการเพิ่มการซึมผ่านของเม็ดเลือดขาวและทำให้เกิดการอักเสบมากขึ้น และยังทำให้เกิดการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตของเซลล์บริเวณ glomerular capillary ทำให้เกิดการเพิ่มขนาดของ glomerulus (Sawatpanich et al., 2010) นอกจากนี้ยังเป็นการกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มของ TGF- β ตามไปด้วย ซึ่งการเพิ่มของ TGF- β จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ extracellular matrix เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือดทั้งใน segmental artery และ interlobar artery และยังทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของ mesangial cell ทำให้เกิด extracellular matrix expansion ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่สำคัญในการเกิดโรคไตจากเบาหวาน (Tufro et al., 2012) จากผลการศึกษาพบว่า สาร gymnemic acid สามารถช่วยลดปริมาณ VEGF และ TGF- β ได้ซึ่งจะทำให้ช่วยลดการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในโรคไตจากเบาหวานได้อีกด้วย

เมื่อทำการศึกษาถึงโครงสร้างของหลอดเลือดเชิงสามมิติพบว่ามี การเกิดพยาธิสภาพ เด่นชัดบริเวณหลอดเลือดขนาดเล็กที่เลี้ยงเนื้อเยื่อไต มีลักษณะเหี่ยวแฟบเป็นฝอย ส่วนหลอดเลือดในระดับ interlobar artery และ arcuate artery มีลักษณะ irregular shape โดยมีรอยคอด (constriction) เกิดขึ้น และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดไม่สม่ำเสมอ หลอดเลือดขนาดใหญ่ คือ segmental artery มีการงอกใหม่ของหลอดเลือดเล็กๆเป็นติ่งงอกเกิดขึ้นในกลุ่มเบาหวาน การงอกใหม่ของหลอดเลือดนั้นเกิดจากการมี Pro-angiogenic factor คือ VEGF เพิ่มมากขึ้นในภาวะน้ำตาลในเลือดสูง การที่ VEGF เพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เกิดการแบ่งตัวของ endothelial cell เพิ่มมากขึ้น หลอดเลือดที่งอกใหม่นั้นมักจะมีคุณสมบัติ โดยมีผนังของหลอดเลือดบาง และ endothelial cell มีลักษณะใหญ่ขึ้น ส่งผลให้เกิดการเพิ่มการซึมผ่านของสารต่างๆ เข้ามาในหลอดเลือดมากขึ้น (Nakagawa et al., 2009) เมื่อทำการศึกษาถึงขนาดของเส้นเลือด segmental artery, interlobar artery, arcuate artery, afferent arteriole, efferent arteriole และ glomerulus พบว่ามีขนาดเล็กลง สอดคล้องกับ Sirinush Sricharoenvej และคณะ (2007) ซึ่งพบว่าในหนูกลุ่มเบาหวานมีขนาดของหลอดเลือด afferent arteriole ,efferent arteriole และ glomerulus มีขนาดเล็กลง และเกิดความเสียหายมากขึ้น เมื่อหลอดเลือดแดงในกลุ่มเบาหวานมีขนาดของหลอดเลือดลดลง ส่งผลให้อัตราการไหลของเลือดในหลอดเลือดนั้นลดลงตามไปด้วย

เนื่องจาก gymnemic acid มีคุณสมบัติในการต้านการอักเสบ (Kanetkar et al., 2017) จึงช่วยลดการเกิดการอักเสบและการขาดออกซิเจนบริเวณหลอดเลือด และ gymnemic acid ยังมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งช่วยในการลดการเกิดสารอนุมูลอิสระต่างๆ และช่วยลดการเกิดการ oxidation ของ LDL ซึ่งเป็นกระบวนการที่สำคัญในการก่อให้เกิดความเสียหายต่อหลอดเลือด ทำให้ gymnemic acid สามารถลดการเกิดความเสียหายต่อหลอดเลือดได้

ดังนั้นผลจากการศึกษาในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการให้สาร gymnemic acid ขนาด 400 mg/kg ทำให้อัตราการน้ำตาลในเลือด ทำให้ความหนาแน่นของปริมาณ VEGF และ TGF- β ลดลง ซึ่งเป็นการช่วยในการป้องกันการเกิดการงอกใหม่ของหลอดเลือด ลดการสร้างและการสะสมของ extracellular matrix ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพบริเวณหลอดเลือดและไกลเมอรูลัส และยังช่วยในการฟื้นฟูพยาธิสภาพต่างๆที่เกิดจากเบาหวานได้อีกด้วย

บทที่ 6

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาโดยการวัดระดับน้ำตาลในเลือดและการวัดค่าการทำงานของไต โดยใช้ BUN และ Cr พบความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม โดยในกลุ่มเบาหวานจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง และมีค่า BUN สูง ซึ่งเป็นข้อบ่งชี้ในการเกิดปัญหาในการทำงานของไต เมื่อหนูเบาหวานได้รับสาร gymnemic acid ขนาด 400 mg/kg BW และยา glyburide พบว่ามีระดับน้ำตาลและค่า BUN ลดลง เนื่องจากการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มของสารอนุมูลอิสระ ซึ่งทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆ บริเวณหลอดเลือดและ glomerulus เพิ่มมากขึ้น เมื่อได้รับสาร gymnemic acid ขนาด 400 mg/kg และยา glyburide พบว่าพยาธิสภาพต่างๆมีการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้น นอกจากสารอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดพยาธิสภาพต่างๆแล้ว ยังกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มของ VEGF และ TGF- β ยังกระตุ้นให้เกิดการงอกใหม่ของหลอดเลือดและเกิดการหนาตัวขึ้นของผนังหลอดเลือดซึ่งเป็นพยาธิสภาพในการเกิดโรคไตจากเบาหวาน เมื่อได้รับสาร gymnemic acid ขนาด 400 mg/kg และยา glyburide พบว่ามีการลดลงของระดับ VEGF และ TGF- β ดังนั้นการใช้สาร gymnemic acid จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะใช้รักษาการเกิดโรคไตจากเบาหวานได้ นอกจากนี้การใช้สาร gymnemic acid ในการรักษาโรคไตที่เกิดจากเบาหวานเป็นระยะเวลานานก็เป็นสิ่งที่น่าจะทำการศึกษาต่อไป เพื่อที่จะศึกษาและนำมาใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคไตจากเบาหวานในลำดับถัดไป

บรรณานุกรม

- เกรียง ตั้งสง่า, สุมาลี นิมนานินิตย์ และคณะ. 2553. *แนวทางเวชปฏิบัติการป้องกันดูแลรักษาภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน (ตา ไต เท้า)*. กรุงเทพมหานคร: สถาบันวิจัยและประเมินเทคโนโลยีทางการแพทย์.
- กนกธร ปิยอำรงรัตน์. 2546. *เนื้อเยื่อวิทยา*. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.
- ไชยพร พลมณี และ ระวีวรรณเลิศวัฒนารักษ์. 2558. *คุณรู้จักเบาหวานดีแค่ไหน*. กรุงเทพมหานคร: คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล.
- จักรพันธ์ เนรังสี. 2558. *ผักเชียงดา พืชสมุนไพรที่ไม่ธรรมดา*. R&D Newsletter, 22(4): 12-14.
- นราวุฒิ ประเสริฐวิทยาภิจ. 2561. *Atherosclerosis Disease*.
<http://www.med.cmu.ac.th/dept/vascular/e-book%20vascular/601-fact/ARTHEROSCLEROSIS.pdf>. (สืบค้นเมื่อ 11 มิถุนายน 2562).
- ณัฐธยาน์ ประเสริฐอำไพสกุล. 2550. *ปัจจัยทำนายพฤติกรรมการป้องกันภาวะน้ำตาลในเลือดสูงของผู้สูงอายุโรคเบาหวานที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด*. กรุงเทพมหานคร. ยงเจือ เหล่าศิริถาวร, ดารินทร์ คีอริย์โชคชัย, สมาน สยมภูภูจินันท์, ประเวศน์ แย้มชื่น, จิราพร สกุลงาม. 2558. *Thailand Annual Epidemiological Surveillance Report*. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์แห่งประเทศไทย.
- ฉิววรรณ อุณนาภิรักษ์, จันทนา รณฤทธิชัย และ วิไลวรรณ ทองเจริญ. 2548. *พยาธิสรีรวิทยาทางการแพทย์พยาบาล*. กรุงเทพมหานคร: บุญศิริการพิมพ์.
- วชิราวดี มาลากุล. 2557. "Physiological role of the renin-angiotensin system in atherosclerosis." *Naresuan Phayao Journal* 4(1): 36-41.
- วนิดา ศรีไพโรจนธัญกุล. 2553. *จุลกายวิภาคศาสตร์ 2*. กรุงเทพมหานคร.
- วรางคณา พิชัยวงศ์. 2558. *โรคไตจากเบาหวาน*. กรุงเทพมหานคร.
- สมาคมโรคเบาหวานแห่งประเทศไทย. 2560. *แนวทางเวชปฏิบัติสำหรับโรคเบาหวาน 2560*. กรุงเทพมหานคร: รมย์เอ็น มีเดีย.
- สมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย. 2558. "Thailand Renal Replacement Therapy Registry Report." กรุงเทพมหานคร.

- สำนักกระบาดวิทยา. 2558. Thailand Annual Epidemiological Surveillance Report. 214-215. กรุงเทพมหานคร.
- อนุตตร จิตตินันท์. 2545. การลงทะเบียนการรักษาทดแทนไตในประเทศไทย รายงานปี 2540 – 2543. *วารสารสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย* 8: 167-179.
- อภิชาติ วิชญาณรัตน์. 2546. จุดมุ่งหมายและหลักการดูแลผู้ป่วยโรคเบาหวาน. กรุงเทพมหานคร.
- Anjum, T., Hasan, Z. 2013. *Gymnema Sylvestre*. Plant Used by Peoples of Vidisha District for the Treatment of Diabetes. *International Journal of Engineering Science Invention*. 2: 98-102.
- Ahmed, AB., Rao, AS., Rao, MV. (2010). In vitro callus and in vivo leaf extract of *Gymnema sylvestre* stimulate β -cells regeneration and anti-diabetic activity in Wistar rats. *Phytomedicine*. 17(13): 1033-1039
- Alda, T. 2012. VEGF and Podocytes in Diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology* 32(4): 385-393.
- Bakker, W., Etto, C., et al. (2009). Endothelial dysfunction and diabetes: roles of hyperglycemia, impaired insulin signaling and obesity. *Cell and Tissue Research*. 335: 165–189
- Blobe, GC., Schieman, WP., Lodish, HF. 2000. Role of transforming growth factor in human disease. *New England Journal of Medicine*. 342(18): 1350-1358
- Bondeva, T., Wolf, G. 2014. Reactive oxygen species in diabetic nephropathy: friend or foe. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 29(11):1998-2003.
- Bottinger, EP., Bitzer, M. 2002. TGF-beta signaling in renal disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 13(10): 2600-2610
- Braga, G., Kathryn, F., Ana, P. 2014. The Role of Transforming Growth Factor-Beta in Diabetic Nephropathy. *International Journal of Medical Genetics*. 1-6
- Cha, DR., Kim, NH., YOON, JW., et al. 2000. "Role of vascular endothelial growth factor in diabetic nephropathy." *Kidney International* 58(77): 104-112.
- Dallak, M., Bin-Jalial, I., Al-Hashem, F., et al. 2018. Metformin Pretreatment Ameliorates Diabetic Nephropathy Induced by a Combination of High Fat Diet and Streptozotocin in Rats. *International Journal of Morphology*. 36(3):969-974.

- Fabio, GD., Romanucci, V., De Marco, A., Zarrelli, A. 2014. Triterpenoids from *Gymnema sylvestre* and Their Pharmacological Activities. *Molecules*. 19: 10956-10981
- He, CY., Li, WD., Guo, SX., Lin, SQ., Lin, ZB. 2006. Effect of polysaccharides from *Ganoderma lucidum* on streptozotocin-induced diabetic nephropathy in mice. *Journal of Asian Natural Products Research*. 8(8): 705-711.
- HO-5. 2018. *Renal Artery*. <https://www.kisspng.com/png-principles-of-anatomy-and-physiology-kidney-renal-4836357>. (accessed June 17, 2019)
- Kanetkar, P., Singhal, R., Kamat, M. 2007. *Gymnema sylvestre*: A Memoir. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*. 41: 77-81.
- Katherine, C. 2015. "Cellular and molecular aspects of diabetic nephropathy; the role of VEGF-A." *NEFROLOGIA* 131-138.
- Kaur, N., Kishore, L., Singh, R. 2017. "Dillenia indica L. attenuates diabetic nephropathy via inhibition of advanced glycation end products accumulation in STZ-nicotinamide induced diabetic rats." *Traditional and Complementary Medicine* 8(1): 226-238.
- Laha, S., Paul, S. 2019. *Gymnema sylvestre* (Gurmar): A Potent Herb with Anti-Diabetic and Antioxidant Potential. *Pharmacognosy Journal*. 11(2): 201-206.
- Lee, HB., Mi-Ra Y., et al. 2003. Reactive Oxygen Species-Regulated Signaling Pathways in Diabetic Nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology*. 14: 241–245.
- Liang, G., Song, L., Chen, Z., Qian, Y., et al. 2018. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism. *Kidney International*. 93(1):95-109.
- Malakul, Wachirawadee . 2011. "Vascular endothelium in diabetes mellitus." *Naresuan University Journal* 19(1): 81-87.
- Mark, A., Thomas, F. 2003. Diabetes and Vascular Disease Pathophysiology, Clinical Consequences, and Medical Therapy: Part I. *Circulation*. 108: 1527–1532.

- Mason, RM., Wahab, NA. (2003). Extracellular matrix metabolism in diabetic nephropathy. *The Journal of the American Society of Nephrology*. 14(5): 1358-1373.
- Med CMU. 2018. Atherosclerosis Disease. N.p.
<http://www.med.cmu.ac.th/dept/vascular/e-book%20vascular/601-fact/ARTHEROSCLEROSIS.pdf> (accessed 11 June. 2019).
- Michael, B. 2005. The Pathobiology of Diabetic Complications. *Diabetes* 54(6): 1615-1625.
- Mironidou, T. 2011. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus. *Current Drug Targets*. 12(1): 107-114.
- Mohammad, H. 2019. Study of Angiotensin-2 and vascular endothelial growth factor as markers of diabetic nephropathy onset in Egyptians diabetic patients with non-albuminuric state. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*. 13(2): 1623-1627.
- Muthaian, R., Pakirisamy, RM., Parasuraman, S., Raveendran, R. 2016. Hypertension influences the exponential progression of inflammation and oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic kidney. *Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 7(4):159-164.
- Nakagawa, T., Tomoki, K.,¹ Masakazu, H., et al. 2009. Abnormal Angiogenesis in Diabetic Nephropathy. *Diabetes*. 58(7): 1471–1478.
- Ogawa, Y., Sekita, K., Umemura, T., Saito, M., Ono, A., et al. (2004). *Gymnema sylvestre* Leaf Extract: A 52- week Dietary Toxicity Study in Wistar Rats. *Food Hygienic Society of Japan*. 45(1): 8-18
- Osterby, R. and Nyberg, G. 1987. "New vessel formation in the renal corpuscles in advanced diabetic glomerulopathy." *Diabet Complications* 1: 122-127.
- Osterby, R., Bangstad, HJ., Nyberg, G., et al. 2001. On glomerular structural alterations in type-1 diabetes: companions of early diabetic glomerulopathy. *Virchows Arch*. 438: 129–135.

- Osterby, R., Hartmann, A., Bangstad, HJ. 2002. "Structural changes in renal arterioles in type 1 diabetic patients." *Diabetologia* 45: 542–549.
- Pothuraju, R., Sharma, RK., Chagalamarri, J., Jangra, S., Kumar Kavadi, P. 2014. A systematic review of *Gymnema sylvestre* in obesity and diabetes management. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 94: 834–840
- Rani, A., Nagamari, V., Patnaik, S., Saidulu, S. 2012. *Gymnema Sylvestre*: An Important Antidiabetic Plant of India: *Plants Sciences Feed*. 2: 174-179.
- Shravan, K., Ramakrishna, R. 2014. *In vivo* anti diabetic evaluation of gymnemic acid in streptozotocin induced rats. *The Pharma Innovation Journal*. 3(7): 82-86
- Srinivasan, P. Subramaniyan, V. 2014. Antidiabetic, hypolipidemic and histopathological analysis of *Gymnema sylvestre* (R. Br) leaves extract on streptozotocin induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4: 425-430
- Sugihara, Y., Nojima, H., Matsuda, H., Murakami, T., Yoshikawa, M., Kimura, I. 2000. Antihyperglycemic Effects of Gymnemic Acid IV, a Compound Derived from *Gymnema sylvestre* Leaves in Streptozotocin-Diabetic Mice. *Journal of Asian Natural Products Research*. 2(4): 321-327.
- Suwanwalaikorn, S, et al. 2004. High prevalence of microalbuminuria in Thai type 2 diabetes patients: Results from DEMAND Campaign (A collaborative multicenter DEMAND Study). *Abstracts of Annual Meeting of the Royal College of Physicians of Thailand 2004*.
- Suwanwalaikorn, S , et al. 2013. Vascular complications in type 2 diabetics in Thailand. *A preliminary report from a multicenter research study group*.
- Takahiko, N., Tomiki, K., Masakuza, H., et al. 2009. "Abnormal Angiogenesis in Diabetic Nephropathy." *Diabetes* 58: 1474-1478.
- Tarinee, S. 2010. Effect of Curcumin on Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Diabetic Mice Kidney Induced by Streptozotocin. *Medical Association of Thailand*. 93(2): 1-8.

- Tatsuo, Y., Takamachi, N. 1993. Expression of transforming growth factor 18 is elevated in human and experimental diabetic nephropathy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90: 1814-1818.
- Tobar, A., Ori, Y., Benchetrit, S., Milo, G., et al. 2013. Proximal tubular hypertrophy and enlarged glomerular and proximal tubular urinary space in obese subjects with proteinuria. *PLOS One*. 8(9): e75547.
- USRDS. 2018. *USRDS ANNUAL DATA REPORT | VOLUME 1: CKD IN THE UNITED STATES*. https://www.usrds.org/2018/download/v1_c01_GenPop_18_usrds.pdf. (accessed June 5, 2019)
- Waichi, S. 2008. The pivotal role of VEGF on glomerular macrophage infiltration in advanced diabetic nephropathy. *Laboratory Investigation*. 88: 949–961.
- WHO. 2018. *Complications of diabetes*. Accessed June 10, 2019. https://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index3.html.
- WHO. 2018. *Diabetes*. Accessed June 5, 2019. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diabetes>.
- Yumeng, Li., Mingzhe, S., Yaping, L., Junjie, L., Tianxin, W., Zesheng, Z. 2019. Gymnemic Acid Alleviates Type 2 Diabetes Mellitus and Suppresses Endoplasmic Reticulum Stress *in Vivo* and *in Vitro*. *Agricultural and Food Chemistry*. 67: 3662-3669

ภาคผนวก ก
สารเคมีและวัสดุอุปกรณ์

1. สารเคมี

1.1 สารเคมีสำหรับเตรียมสัต์วิตดลอง

- 1) gymnemic acid (purify > 75% by HPLC analysis) (Shaanxi Langrun Biotechnology Co., LTD., Xi'an, China)
- 2) Oestradiol benzoate injection (March Pharmaceuticals CO., LTD., Bangkok, Thailand)
- 3) 70 % Ethyl alcohol (วิทยาศาสตร์ จำกัด, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย)
- 4) ยาสลบ Thiopental Sodium (Scott-Edil Pharmacia Ltd., Solan, India)

1.2 สารเคมีสำหรับการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อไต

- 1) ยาสลบ Thiopental Sodium (Scott-Edil Pharmacia Ltd., Solan, India)
- 2) 10% formaldehyde
- 3) 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4
- 4) PU4ii (vasQtec, Zurich, Switzerland)

1.3 สารเคมีสำหรับการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

- 1) VEGF monoclonal antibody (Thermofisher, Massachusetts, USA)
- 2) TGF beta-1 Monoclonal Antibody (Thermofisher, Massachusetts, USA)
- 3) Anti-mouse Texas Red IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 4) Anti-mouse fluorescence IgG antibody (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 5) Normal horse serum (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 7) Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- 8) Triton X-100 (Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)
- 9) 0.1 M Phosphate buffer pH 7.4

2. วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือ

2.1 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ทั่วไป

- 1) กระดาษขึงสารเคมี
- 2) กระบอกตวง
- 3) กรวยกรอง
- 4) กระดาษกรอง
- 5) ขวดรูปชมพู่
- 6) ขวดแก้วเก็บสาร
- 7) ขวดเก็บตัวอย่าง
- 8) ขวดปรับปริมาตร
- 9) เครื่องเขย่าสารอัตโนมัติ
- 10) เครื่องช่วยผสม
- 11) เครื่องขึงสารเคมี
- 12) เครื่องวัดค่ากรดต่าง
- 13) คีมจับชิ้นเนื้อ
- 14) ข้อนตักสารเคมี
- 15) จานรอง
- 16) ตู้ดูดควัน
- 17) ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส
- 18) ตู้อบ
- 19) ถาดอลูมิเนียม
- 20) แท่งแม่เหล็ก
- 21) แท่นให้ความร้อน
- 22) บีกเกอร์
- 23) นาฬิกาจับเวลา
- 24) ไมโครปิเปต
- 25) ไมโครปิเปต ทิป
- 26) ไมโครทิวป์
- 27) ปิเปต

28) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ

29) หลอดทดลอง

30) หลอดหยดสาร

2.2 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับเตรียมสัตว์ทดลอง

1) เข็มฉีดยา เบอร์ 18 และ 26

2) กระบอกฉีดยา

3) โคมไฟส่องให้ความอบอุ่น

4) เข็มสำหรับป้อนอาหารสัตว์ทดลอง

2.3 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

1) ชุดสายน้ำเกลือ

2) ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด

3) เครื่องดูดอากาศ

4) ขวดเก็บตัวอย่าง

2.4 วัสดุอุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับการย้อมอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์

1) กระจกย้อมย้อม

2) กระจกขีดเลนส์

3) กระจกปิดสไลด์

4) กล้องใส่สไลด์

5) กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Light microscope Olympus, BX 50) และชนิดฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence microscope Olympus, BX 50)

6) กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (DP 73, Olympus, Japan)

7) โปรแกรม Cell scene

8) โปรแกรม image J

9) ถาดอลูมิเนียมและอลูมิเนียมฟรอยด์

10) น้ำยาทาเล็บ

ภาคผนวก ข
การเตรียมสาร

การเตรียม 0.1 M phosphate buffer saline containing 0.3% Triton X-100

สารเคมี

Phosphate buffer saline (0.1 M)	300 ml.
Triton X-100	900 μ l.

ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวงสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. เติม Triton X-100 จำนวน 900 μ l. ใส่ใน 300 ml. ของ 0.1 M Phosphate buffer saline

การเตรียม 0.1 M Phosphate buffer solution (PBS)

สารเคมี

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	11.5 g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.422 g

ขั้นตอนการเตรียม

1. ตวงสารเคมีตามปริมาณข้างต้น
2. บรรจุลงในขวด เติมน้ำกลั่นจนกระทั่งครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

การเตรียม Blocking Serum

สารเคมี

2% Horse serum	100 μ l.
0.1 M PBS	5 ml.

ขั้นตอนการเตรียม

1. ทำการตวง 0.1 M PBS มาก่อน 5 ml
2. หยด horse serum และ triton X-100 ตาม จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาววิภา แจ่มชาติ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 6110220097

วุฒิการศึกษา

วุฒิ
การแพทย์แผนไทยบัณฑิต

ชื่อสถาบัน
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ปีที่สำเร็จการศึกษา
2559

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Jangchart, R., Sandech, N., Komolkriengkrai, M., Boonyoung, P., Vongvatcharanon, U.,

Khimmaktong, W. 2019. Study of Gymnemic Acid Efficiency for Vascular Restoration on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Diabetic Rat Kidney. Proceedings of the AAT42 conference, Songkla, Thailand, May 22-24