



การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดชั้นน้ำของใยตาลสุก  
ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน  
**The Study of Hypoglycemic Effect of *Borassus flabellifer* Linn. Ripe Fruit  
Pulp Water Extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats**

กานต์ศศิณ เตียรอุ่น  
**Karnsasin Seanoon**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดชั้นน้ำของใยตาลสุก  
ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน  
**The Study of Hypoglycemic Effect of Borassus flabellifer Linn. Ripe Fruit  
Pulp Water Extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats**

กานต์ศศิณ เเศียรอุ่น  
**Karnsasin Seanoon**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

**2559**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดชั้นน้ำของไยตาล  
 สุกในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสเตรบิโตโซโตซิน  
 ผู้เขียน              นางสาวกานต์ศศิณ เคียรอุ่น  
 สาขาวิชา            เกษัตริวิทยา

---

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี อุดมอักษร)      (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีรวรรณ อุชายภิชาติ)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี อุดมอักษร)

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เตชอดิศจัย)      (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา เตชอดิศจัย)

.....กรรมการ  
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์)      (รองศาสตราจารย์ สมสมร ชิตตระกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้  
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชวิทยา

.....  
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณ  
บุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วันดี อุดมอักษร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวกานต์ศศิณ เตียรอุ่น)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน  
และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวกานต์ศศิน เตียรอุ่น)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดชั้นน้ำของใยตาสุกในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน
ผู้เขียน	นางสาวกานต์ศศิน เคียรอุ่น
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
ปีการศึกษา	2559

### บทคัดย่อ

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูง ซึ่งจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะสำคัญต่าง ๆ การรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบันจะใช้ยารับประทานหรือยาฉีดอินซูลิน และยังมีปัญหาเกี่ยวกับอาการไม่พึงประสงค์จากยา ทำให้การรักษาโดยใช้สมุนไพรในตำรับยาแพทย์แผนไทยได้รับความสนใจมากขึ้น ตาลเป็นพืชที่นิยมใช้ให้ความหวานในการทำขนมหรืออาหาร ขณะเดียวกันได้มีการใช้ใยตาสุกในการรักษาเบาหวานในชาวบ้านจังหวัดพระนครศรีอยุธยา นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ที่สนับสนุนว่าใยตาสุกแห้งมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ และมีสารสำคัญในการออกฤทธิ์ที่ชื่อว่า flabelliferin II และสารสกัดจากใยตาสุกยังมีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้ด้วย แต่ยังไม่มีการศึกษาในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) 2) ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากได้รับการบ่อนกลูโคสและซูโครสในหนูขาวปกติ และ 3) ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาสุกต่อระดับการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ การทดลองส่วนที่ 1 เหนี่ยวนำให้หนูขาวเป็นเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือด  $> 200$  มก./ดล. และบ่อนสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. และ glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. วันละครั้งเป็นเวลา 14 วัน วัดระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารของหนูทดลองทุกกลุ่ม หลังจากบ่อนสารสกัดครบ 3, 7, 9 และ 14 วัน ตามลำดับ พบว่าหลังจากได้รับสารสกัดครบ 3 และ 10 วัน ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดทั้ง 3 ขนาด ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน หลังจากได้รับสารสกัดครบ 7 วัน ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาสุกขนาด 1,000 มก./กก. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน และเมื่อครบ 14 วันหลังจากได้รับสารสกัด พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสาร

สกัดจากใยตาล ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีค่าเท่ากับ  $228.40 \pm 42.95$ ,  $176.00 \pm 41.53$  และ  $238.60 \pm 44.36$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ( $251.20 \pm 55.60$  มก./ดล.) ส่วนกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากได้รับยาครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือดเริ่มต้นและเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของกลุ่มควบคุมเบาหวานในเวลาเดียวกัน (หลังจากได้รับยาครบ 7 และ 14 วัน) ผลการทดลองในส่วนที่ 2 พบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที แต่ยา glipizide ขนาด 10 มก./กก. ลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ( $102.13 \pm 5.04$ ,  $102.38 \pm 5.01$ ,  $84.25 \pm 2.36$ ,  $62.25 \pm 3.59$  และ  $49.50 \pm 2.73$  มก./ดล. ตามลำดับ) และสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที แต่ยา acarbose ขนาด 50 มก./กก. ลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนซูโครสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ( $111.33 \pm 3.90$ ,  $110.17 \pm 4.59$ ,  $103.33 \pm 3.77$ ,  $107.00 \pm 4.19$  และ  $102.00 \pm 2.08$  มก./ดล. ตามลำดับ) และผลการทดลองในส่วนที่ 3 ศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ โดยการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีนด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อตับอ่อน (ยีน *Insulin*) ตับ (ยีน *GLUT2*) ไขมัน (ยีน *GLUT4*) และกล้ามเนื้อ (ยีน *GLUT4*) ของกลุ่มหนูควบคุมปกติ กลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. พบว่าการแสดงออกของยีน *Insulin* ในเนื้อเยื่อตับอ่อน และยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาล เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน ส่วนการแสดงออกของยีน *GLUT2* ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน

จากผลการศึกษาดังกล่าว การให้สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก เป็นเวลา 14 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ และ

สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Insulin* ที่เนื้อเยื่อตับอ่อนและยีน *GLUT4* ที่เนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ โดยคาดว่าสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกน่าจะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ไปกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ของตับอ่อนทดแทนส่วนที่ถูกทำลาย และ/หรือกระตุ้นให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนส่วนที่เหลือสร้างและหลั่งอินซูลินมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้น และอินซูลินที่เพิ่มขึ้นสามารถกระตุ้นยีน *GLUT4* ที่เป็นตัวรับขนส่งกลูโคสที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้มีการแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้นด้วย



<b>Thesis Title</b>	The Study of Hypoglycemic Effect of <i>Borassus flabellifer</i> Linn. Ripe Fruit Pulp Water Extract in Streptozotocin-induced Diabetic Rats
<b>Author</b>	Miss Karnsasin Seanoon
<b>Major Program</b>	Pharmacology
<b>Academic Year</b>	2016

### ABSTRACT

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by elevated blood glucose levels (hyperglycemia). The chronic hyperglycemia is associated with long-term damage, dysfunction, and failure of vital organs. Diabetes management using oral hypoglycemic drugs and insulin have produced serious adverse effects. The use of traditional herbal medicine is an alternative diabetes treatment. *Borassus flabellifer* Linn. is widely used as sweetener for dessert and food. At the same time, traditional Thai medicine has been reported that fruit fiber of *B. flabellifer* was used to treat diabetes. Recently, in type-2 diabetic patients study, the dried fruit pulp extracts of *B. flabellifer* could reduce serum glucose levels and the active compound is flabelliferin II. Moreover, the ripe fruit pulp extracts of *B. flabellifer* could inhibit intestinal  $\alpha$ -glucosidase activity. There is no scientific evidence about the effect of *B. flabellifer* fruit fiber water extract on blood glucose level in diabetic rats. This study was objected to evaluate the effect of *B. flabellifer* fruit fiber water extract on blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats (Part 1), the effect of *B. flabellifer* fruit fiber water extract on blood glucose level in normal rats after glucose and sucrose loading (Part 2) and the effect of *B. flabellifer* fruit fiber water extract on *Insulin*, *GLUT2* and *GLUT4* gene expression in streptozotocin-induced diabetic rats (Part 3). In part 1, streptozotocin-induced diabetic rats with fasting blood glucose (FBG) > 200 mg/dL were orally treated with the *B. flabellifer* fruit fiber water extract at 500, 1,000 and 2,000 mg/kg and glibenclamide at 1 mg/kg for 14 days. FBG was determined at 3, 7, 10 and 14 days after pretreated with the extracts. The results showed that FBG of all doses of the extract after 3 and 10 days administration were significantly decreased ( $p < 0.05$ ) blood glucose levels when compared to the diabetic control group. After 7 days administration of water extract at 1,000 mg/kg showed

significantly decreased ( $p < 0.05$ ) blood glucose levels and there was no significantly decreased ( $p < 0.05$ ) blood glucose levels when compared to the diabetic control group ( $251.20 \pm 55.60$  mg/dL) after 14 days administration of the *B. flabellifer* fruit fiber water extract at 500, 1,000 and 2,000 mg/kg ( $228.40 \pm 42.95$ ,  $176.00 \pm 41.53$  and  $238.60 \pm 44.36$  mg/dL, respectively). Glibenclamide treated group no significantly decreased ( $p < 0.05$ ) blood glucose levels when compared to the diabetic control group after 3, 7, 10 and 14 days administration. Moreover, the extracts treated groups were observed the increase in body weight when compared to the diabetic control group (after 7 and 14 days administration). In part 2, oral glucose tolerance test (OGTT), normal rats were orally treated with the *B. flabellifer* fruit fiber water extract at 500, 1,000 and 2,000 mg/kg and glipizide at 10 mg/kg. Oral sucrose tolerance test (SuTT), normal rats were orally treated with the *B. flabellifer* fruit fiber water extract at 1,000, 2,000 and 3,000 mg/kg and acarbose at 50 mg/kg. After 30 min of administration, all rats were fed with 3 g/kg of glucose/sucrose solution. Blood glucose level was determined at 0 and 30, 60, 90, 120 and 180 min after glucose/sucrose loading. In all water extracts of *B. flabellifer* treated groups no significantly decreased the increase of blood glucose level after glucose/sucrose loading at 60, 90, 120 and 180 min. For glipizide treated groups significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the increase of blood glucose level after glucose loading at 60, 90, 120 and 180 min ( $102.13 \pm 5.04$ ,  $102.38 \pm 5.01$ ,  $84.25 \pm 2.36$ ,  $62.25 \pm 3.59$  and  $49.50 \pm 2.73$  mg/dL, respectively) and acarbose treated groups significantly decreased ( $p < 0.05$ ) the increase of blood glucose level after sucrose loading at 60, 90, 120 and 180 min ( $111.33 \pm 3.90$ ,  $110.17 \pm 4.59$ ,  $103.33 \pm 3.77$ ,  $107.00 \pm 4.19$  and  $102.00 \pm 2.08$  mg/dL, respectively). In part 3, *Insulin*, *GLUT2* and *GLUT4* gene expression levels of normal control group, diabetic control group, the water extract at 1,000 mg/kg treated group and the glibenclamide at 1 mg/kg treated group were evaluated by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR). The level of *Insulin* gene expression in pancreatic tissue and *GLUT4* gene expression in adipose and muscle tissue were significantly increased in the water extract treated group compared to diabetic control group ( $p < 0.05$ ). The level of *GLUT2* gene expression in liver tissue was not significantly increased in the water extract treated group compared to diabetic control group.

In conclusion, there was hypoglycemic effect of *B. flabellifer* fruit fiber water extract in diabetic rats after 14 days administration and the extract increased the level of *Insulin* gene expression in pancreatic tissue and *GLUT4* gene expression in

adipose and muscle tissues. The results indicated that the possible mechanism of action of *B. flabellifer* fruit fiber water extract may caused  $\beta$ -cells of pancreas regeneration and/or induce insulin secretion from residue  $\beta$ -cells of pancreas. The increase of *insulin* gene expression can stimulate glucose uptake in lipid and muscle tissues by *GLUT4* translocation enhancing from internal membrane to the plasma membrane. Resulted from the increase of *GLUT4* gene expression.

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้คงไม่สำเร็จลุล่วงหากไม่ได้รับความช่วยเหลือและความร่วมมือจากบุคคลและหน่วยงานต่าง ๆ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วันดี อุดมอักษร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ให้โอกาสให้คำปรึกษา ตลอดจนคำแนะนำในการทำงานวิจัยและส่งเสริมให้ผู้วิจัยได้พัฒนาตนเองอย่างเต็มที่ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุกัญญา เดชอดิตย์ และ ผศ.ดร.อุราพร วงศ์วัชรานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำปรึกษา คำแนะนำในการสกัดสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขอขอบพระคุณ ผศ.สุภาภรณ์ การเสนารักษ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำในการทำงานวิจัยซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมากมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ซึ่งประกอบด้วย ผศ.ดร.วีรวรรณ อุชายภิชาติ ประธานกรรมการฯ รศ.สมสมร ชิตตระการ กรรมการฯ สำหรับความอนุเคราะห์ให้คำแนะนำในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาคเภสัชวิทยาทุกท่าน ที่ได้ถ่ายทอดความรู้ทางเภสัชวิทยา และคำแนะนำเกี่ยวกับการทำงานและประสบการณ์ต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อการทำงาน รวมทั้งคำปรึกษาตลอดการศึกษาในหลักสูตรนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้เลี้ยงดูและอำนวยความสะดวกในการใช้สัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยา ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา สถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ และภาควิชาเภสัชเวทและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการทำงานวิจัยครั้งนี้ สุดท้ายขอขอบพระคุณครอบครัวที่คอยสนับสนุนและให้กำลังใจเสมอมา

กานต์ศศิณ เตียรอุ่น

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
ABSTRACT	(8)
กิตติกรรมประกาศ	(11)
สารบัญ	(12)
รายการตาราง	(13)
รายการภาพประกอบ	(14)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(16)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการศึกษา	49
บทที่ 4 ผลการศึกษา	63
บทที่ 5 อภิปรายผลการศึกษา สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ	84
รายการเอกสารอ้างอิง	96
ภาคผนวก	107
ภาคผนวก ก	108
ภาคผนวก ข	109
ภาคผนวก ค	112
ภาคผนวก ง	114
ภาคผนวก จ	120
ประวัติผู้เขียน	121

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
<b>บทที่ 2</b>	
<b>2-1</b> สรุปรายยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2	15
<b>2-2</b> ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส	22
<b>2-3</b> ค่าปกติของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากได้รับกลูโคสในขนาด 75 และ 100 กรัม	35
<b>2-4</b> องค์ประกอบทางเคมีที่พบในใยตาล	42
<b>บทที่ 3</b>	
<b>3-1</b> ลำดับ nucleotide ของ primer ของยีน <i>Ins</i> , <i>GLUT2</i> , <i>GLUT4</i> และ $\beta$ - <i>actin</i>	58
<b>3-2</b> องค์ประกอบและสัดส่วนของ PCR reaction mixture ที่ใช้สำหรับทำ PCR	59
<b>บทที่ 4</b>	
<b>4-1</b> ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในภาวะอดอาหาร (FBG) ของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) เป็นเวลา 14 วัน	65
<b>4-2</b> ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) เป็นเวลา 14 วัน	67
<b>4-3</b> ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา glipizide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการบ่อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที	71
<b>4-4</b> ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา acarbose ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการบ่อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที	76

## รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
<b>บทที่ 2</b>	
2-1	9
2-2	12
2-3	16
2-4	17
2-5	18
2-6	19
2-7	20
2-8	22
2-9	22
2-10	28
2-11	37
2-12	38
2-13	39
2-14	40
2-15	42
<b>บทที่ 3</b>	
3-1	59
3-2	60
3-3	60
3-4	61
<b>บทที่ 4</b>	
4-1	68

## รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่ บทที่ 4	หน้า
4-2 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glipizide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย หลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ	72
4-3 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glipizide ต่อพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที ในหนูขาวปกติหลังจากการ ป้อนสารละลายกลูโคส	73
4-4 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา acarbose ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย หลังจากการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ	77
4-5 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา acarbose ต่อพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของ ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที ในหนูขาวปกติหลังจากการป้อน สารละลายซูโครส	78
4-6 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน <i>Insulin</i> ของเนื้อเยื่อตับอ่อนในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุม เบาหวาน (DM) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli)	80
4-7 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน <i>GLUT2</i> ของเนื้อเยื่อตับในในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุม เบาหวาน (DM) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli)	81
4-8 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน <i>GLUT4</i> ของเนื้อเยื่อไขมันในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุม เบาหวาน (DM) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli)	82
4-9 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน <i>GLUT4</i> ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุม เบาหวาน (DM) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli)	83



### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ก.	=	กรัม
กก.	=	กิโลกรัม
มก.	=	มิลลิกรัม
มล.	=	มิลลิลิตร
ดล.	=	เดซิลิตร
%	=	Percentage
/	=	Per
$\alpha$	=	Alpha
$\beta$	=	Beta
$\gamma$	=	Gamma
$^{\circ}\text{C}$	=	Degrees Celsius
$\mu\text{L}$	=	Microliter
g	=	Gram
dL	=	Deciliter
hr	=	Hour
Kg	=	Kilogram
M	=	Molar
mM	=	Millimolar
mg	=	Milligram
$\text{Mg}^{2+}$	=	Magnesium ion
min	=	Minute
mL	=	Milliliter
mmol/L	=	Millimole per liter
A	=	Adenine
ADA	=	American Diabetes Association
ADH	=	<i>Antidiuretic hormone</i>
ADP	=	Adenosine diphosphate
Akt	=	Protein kinase B
ALP	=	Alanine phosphatase

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

ALT	=	Alanine phosphatase
AST	=	Aspartate transaminase
AMPK	=	AMP-activated protein kinase
aPKC	=	Atypical protein kinase C
ATP	=	Adenosine triphosphate
bps	=	<i>Base pairs</i>
C	=	Cytosine
Ca <sup>2+</sup>	=	Calcium ion
cAMP	=	Cyclic adenosine monophosphate
CAP	=	Cbl-associated protein
Cbl	=	Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue
CCK	=	Cholecystokinin
cDNA	=	complementary DNA
DM	=	Diabetes mellitus
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	=	Deoxyribonucleotides
DPP-4	=	Dipeptidyl peptidase 4
<i>et al.</i>	=	et alii (and other)
F-II	=	Flabelliferin-II
FPG	=	Fasting plasma glucose
G	=	Guanine
GDM	=	Gestation diabetes mellitus
GIP	=	Glucose-dependent insulinotropic peptide
GLP-1	=	Glucagon-like peptide-1
GLUT	=	Glucose transporter
GTT	=	Glucose tolerance test
HbA <sub>1c</sub>	=	Hemoglobin A1 C
H&E	=	Hematoxylin and eosin stain
HIV	=	Human immunodeficiency virus

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

HDL	=	High density lipoprotein
HMIT	=	H <sup>+</sup> /myoinositol transporter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	=	Hydrogen peroxide
IAPP	=	Islet amyloid polypeptide
ICR	=	Institute of cancer research
IDDM	=	Insulin dependent diabetes mellitus
IDF	=	International Diabetes Federation
IgE	=	Immunoglobulin E
Glc-6-Pase	=	Glucose-6-phosphatase
IRGs	=	Insulin response genes
IRS	=	Insulin receptor substrate
K <sup>+</sup>	=	Potassium ion
K <sub>ATP</sub> channel	=	ATP-sensitive K <sup>+</sup> channel
LDL	=	Low density lipoprotein
MAP kinase	=	Mitogen-activated protein kinases
MODY	=	Maturity-onset diabetes of the young
mRNA	=	Messenger RNA
Na <sup>+</sup>	=	Sodium ion
NAD	=	Nicotinamide adenine dinucleotide
NIDDM	=	Non-insulin dependent diabetes mellitus
NO	=	Nitric oxide
NPH	=	Neutral protamine hagedron
O <sub>2</sub> <sup>·-</sup>	=	Superoxide radical
OGTT	=	Oral glucose tolerance test
OH <sup>·</sup>	=	Hydroxyl radical
ONOO <sup>·</sup>	=	Peroxynitrite
<i>p</i>	=	<i>p</i> -value
PARP	=	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCR	=	Polymerase chain reaction
PEPCK	=	Phosphoenol-pyruvate carboxykinase

### สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ (ต่อ)

PFP	=	Palmyrah fruit pulp
PFWF	=	Palmyrah fruit fiber water extract
PG	=	Preload glucose
pH	=	Potential of hydrogen ion
PI3- kinase	=	Phosphatidyl-inositol-3-phosphate-kinase
PIP <sub>3</sub>	=	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate
PKA	=	Protein kinase A
PPAR- $\gamma$	=	Proliferator activated receptor gamma
PQQ	=	pyrroloquinoline quinone
RER	=	Rough endoplasmic reticulum
RNA	=	Ribonucleic acid
rRNA	=	Ribosomal RNA
ROS	=	Reactive oxygen species
RT-PCR	=	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SD	=	Standard deviation
SEM	=	Standard error of mean
SHP	=	Small heterodimer partner
STZ	=	Streptozotocin
Shc	=	Src-homology-2-containing
T	=	Thymine
TAE	=	Tris-acetate-EDTA
<i>Taq</i>	=	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	=	Tris-borate-EDTA
T <sub>m</sub>	=	Melting-temperature
tRNA	=	Transfer RNA
WHO	=	World Health Organization
U	=	Uracil
UV	=	Ultraviolet
VLDL	=	Very low density lipoprotein
XOD	=	Xanthine oxidase

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม ซึ่งจะทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นเวลานาน โดยเป็นผลมาจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน หรือความผิดปกติในการออกฤทธิ์ของอินซูลินหรือเกิดจากทั้ง 2 สาเหตุ การที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานในผู้ป่วยโรคเบาหวานจะทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตา ไต หลอดเลือด หัวใจ และเส้นประสาท (ชัยชาญ และ กอบชัย, 2546)

จากข้อมูลทางสถิติของ International Diabetes Federation (IDF) ปี ค.ศ. 2015 พบว่าทั่วโลกมีคนเป็นเบาหวาน 415 ล้านคน และจะเพิ่มขึ้นเป็น 642 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2040 และมีคนอีกจำนวน 193 ล้านคน ที่ยังไม่ทราบว่าตนเองเป็นเบาหวาน ซึ่งจะมีการดำเนินโรคเบาหวานไปสู่ภาวะแทรกซ้อนโดยไม่รู้ตัว (IDF, 2015)

สำหรับประเทศไทย ปี พ.ศ. 2558 พบว่ามีผู้ป่วยเบาหวานทั้งประเทศในช่วงอายุ 20-79 ปี จำนวน 4,025,100 คน ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 8 ของประชากรทั้งประเทศ ผู้เสียชีวิตจากโรคเบาหวานทั้งหมด 75,994 ราย หรือเฉลี่ยวันละ 208 คน และมีประชากรอีกจำนวน 2,077,900 คน ที่ยังไม่ทราบว่าตนเองเป็นเบาหวาน ซึ่งจะมีการดำเนินโรคเบาหวานไปสู่ภาวะแทรกซ้อนโดยไม่รู้ตัว (IDF, 2015)

การรักษาโรคเบาหวานทำได้โดยการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ด้วยการควบคุมอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตและไขมัน การออกกำลังกายเป็นประจำ และการใช้ยาแผนปัจจุบันรักษาเบาหวานในรูปแบบยารับประทานหรือยาฉีดอินซูลิน แต่พบว่าการใช้ยารักษาโรคเบาหวานนั้นมีผลข้างเคียงที่ต้องพึงระวัง เช่น ภาวะ hypoglycemia น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น เกิดพิษต่อตับ แพ้ยา เป็นต้น (ทิพวรรณ และคณะ, 2551) จากการใช้ยาแผนปัจจุบัน ทำให้การรักษาอีกด้านหนึ่งคือการใช้สมุนไพรเพื่อรักษาโรคเบาหวาน ซึ่งอาศัยตำรับยาแพทย์แผนไทยได้รับความสนใจในการรักษาควบคู่กับการใช้ยาแผนปัจจุบัน

สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด เช่น กระเจี๊ยบ (*Abelmoschus esculentus* Linn.) กระเทียม (*Allium sativum* Linn.) กะเพรา (*Ocimum sanctum* Linn.) กาแฟ (*Coffea robusta* Linn.) ชะพลู (*Piper samentosus* Roxb.) ถั่วเหลือง (*Glycine max* Merr.) ทับทิม (*Punica granatum* Linn.) พริกไทย

(*Piper nigrum* Linn.) มะระ (*Momordica charantia* Linn.) เป็นต้น (จุไรรัตน์, 2548) ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้จะถูกใช้เป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการรักษาโรคเบาหวาน

ตาลเป็นพืชที่พบได้สากวณใหญ่ในภาคใต้และภาคกลาง และยังมีการใช้ตาลในการรักษาเบาหวาน โดยได้มีการบอกเล่าต่อ ๆ กันมาจากพระที่วัดใหญ่ไชยมงคลในจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยให้ชาวบ้านที่เป็นโรคเบาหวานดื่มน้ำต้มจากใยตาลเพื่อรักษาเบาหวาน พบว่าสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยไม่ต้องรับประทานยาแผนปัจจุบันและบางคนสามารถหยุดยาได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 ที่สนับสนุนว่าสารสกัดด้วยเอทานอลจากใยตาลแห้งมีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Uluwaduge *et al.*, 2007) และมีรายงานในหนูขาวสายพันธุ์ Wistar ว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากดอกเพศผู้ของตาลสามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับกลูโคสในเลือดได้หลังจากการป้อนซูโครสให้หนูขาวโดยวิธี sucrose tolerance test (Yoshikawa *et al.*, 2007) และสารสกัดด้วยเอทานอลในส่วนที่ไม่ละลายในอะซีโตนจากช่อดอกตาลหรือวงตาลสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) และมีการศึกษาการให้สารสกัดด้วยเอทานอล บีโตรีเลียมอีเธอร์ และเอทิลอะซีเตทจากใยตาลสุก พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอาหารได้ในหนูขาวปกติและหนูขาวเบาหวาน โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับ acarbose ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase โดยสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจากใยตาลสุกขนาด 300 มก./กก. สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนซูโครสได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดด้วยบีโตรีเลียมอีเธอร์ขนาด 600 มก./กก. และสารสกัดด้วยเอทานอลขนาด 1,000 มก./กก. (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งจากการศึกษาที่รวบรวมมารวมกับคำบอกเล่าจากพระที่วัดใหญ่ไชยมงคลในจังหวัดพระนครศรีอยุธยาที่ได้ใช้ในชาวบ้านที่เป็นโรคเบาหวาน ทำให้ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดด้วยน้ำของใยตาลในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน เพื่อใช้เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ในการสนับสนุนการใช้สารสกัดจากใยตาลในการรักษาโรคเบาหวานต่อไป

## บทที่ 2

### บทตรวจเอกสาร

#### 1. คำจำกัดความของโรคเบาหวาน (ชัยชาญ และ กอบชัย, 2546)

โรคเบาหวานเป็นกลุ่มโรคที่มีความผิดปกติทางเมแทบอลิซึม ซึ่งจะทำให้มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นเวลานาน โดยเป็นผลมาจากความผิดปกติในการหลั่งอินซูลินหรือความผิดปกติในการออกฤทธิ์ของอินซูลินหรือเกิดจากทั้ง 2 สาเหตุ การที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานานในผู้ป่วยโรคเบาหวานจะทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของอวัยวะต่าง ๆ เช่น ตา ไต หลอดเลือด หัวใจ และเส้นประสาท

ความผิดปกติทางเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และโปรตีนในผู้ป่วยโรคเบาหวานนั้น เป็นผลจากการออกฤทธิ์ของอินซูลินต่อเนื้อเยื่อในร่างกายลดลง ทำให้มีการหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอ หรือเกิดจากเนื้อเยื่อมีการตอบสนองต่ออินซูลินลดลง ซึ่งทั้ง 2 สาเหตุนี้มักจะพบร่วมกันบ่อยในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 จึงเป็นผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น

#### 2. เกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน

American Diabetes Association (ADA) ซึ่งเป็นสมาคมโรคเบาหวานของประเทศสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดเกณฑ์ในการวินิจฉัยโรคเบาหวานในคนไว้ โดยใช้เกณฑ์ใดเกณฑ์หนึ่งหรือมากกว่า ดังนี้ (ADA, 2015)

2.1 ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหาร (Fasting plasma glucose หรือ FPG) เท่ากับหรือมากกว่า 126 มก./ดล. (7 mmol/L) ซึ่งจะต้องอดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง

2.2 เมื่อตรวจ Oral glucose tolerance test (OGTT) โดยได้รับน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม ซึ่งละลายในน้ำ ผู้ป่วยจะมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาที่เวลา 2 ชั่วโมง (2-hr preload glucose หรือ 2-hr PG) เท่ากับหรือมากกว่า 200 มก./ดล. (11.1 mmol/L)

2.3 ผู้ป่วยมีอาการของโรคเบาหวาน เช่น ปัสสาวะมาก ดื่มน้ำมาก ร่วมกับมีค่าของระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาที่เวลาใดก็ตามจากการสุ่มเจาะเลือดเท่ากับหรือมากกว่า 200 มก./ดล. (11.1 mmol/L)

2.4 ผู้ป่วยมีระดับ Hemoglobin A1c (HbA1c) เท่ากับหรือมากกว่า 6.5%

### 3. ประเภทของโรคเบาหวาน

โรคเบาหวานสามารถจำแนกตามสาเหตุได้เป็น 4 ชนิด (ADA, 2015; ชัยชาญ และ กอบชัย, 2546) ดังนี้

3.1 โรคเบาหวานชนิดที่ 1 หรือเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (Type 1 diabetes หรือ Insulin dependent diabetes mellitus; IDDM) พบได้ร้อยละ 10 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด เกิดจากกระบวนการออโตอิมมูนชนิด cellular-mediated autoimmunity ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลาย ส่งผลให้ร่างกายขาดอินซูลิน พบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดนี้จำนวนร้อยละ 85-90 สามารถตรวจพบ autoantibodies ต่าง ๆ ภายในกระแสเลือด ซึ่งเป็นแอนติบอดีต่อเบต้าเซลล์แอนติเจน ได้แก่ islet cell autoantibodies, insulin autoantibodies, glutamic acid decarboxylase autoantibodies (GAD65), zinc transporter 8 autoantibodies (ZnT8) และ tyrosine phosphatases autoantibodies ซึ่งเป็นปัจจัยทางพันธุกรรม ทำให้โรคเบาหวานชนิดนี้ถ่ายทอดทางพันธุกรรมได้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่โดยเฉพาะเด็กและผู้ที่มีอายุน้อยกว่า 35 ปี มักจะมาพบแพทย์ครั้งแรกเนื่องจากเกิดภาวะ ketoacidosis ซึ่งเป็นภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงร่วมกับมีสารคีโตนในเลือด และผู้ป่วยมักจะมีรูปร่างผอม ในผู้ป่วยบางรายไม่ทราบสาเหตุการเกิดโรคเบาหวานชนิดนี้ (idiopathic diabetes mellitus) ซึ่งเป็นผู้ป่วยที่มีการขาดอินซูลินโดยที่ไม่มีการตรวจพบ autoantibodies ของการเกิดภูมิคุ้มกันต่อต้านตนเอง มักพบในประชากรแถบเอเชียและแอฟริกา

3.2 โรคเบาหวานชนิดที่ 2 หรือเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (Type 2 diabetes หรือ Non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM) พบได้ร้อยละ 90 ของผู้ป่วยเบาหวานทั้งหมด เกิดจากการที่ร่างกายมีภาวะดื้อต่ออินซูลินและมีความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน ทำให้มีการตอบสนองต่ออินซูลินน้อยลงและมีปริมาณของอินซูลินลดลงไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกายที่จะควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่ชัดเจนของโรคเบาหวานชนิดนี้ ผู้ป่วยส่วนใหญ่มักจะมีรูปร่างอ้วน มีไขมันสะสมที่หน้าท้องมาก และมีอายุมากกว่า 30 ปี โรคเบาหวานชนิดนี้มักจะไม่เกิดภาวะ ketoacidosis ขึ้นเอง แต่จะเกิดเมื่อมีภาวะเครียดอย่างชัดเจน และเบาหวานชนิดนี้จะไม่ได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่ระยะแรก เนื่องจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงจะเกิดอย่างช้า ๆ และไม่มีอาการผิดปกติใด ๆ ทำให้มีความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังของหลอดเลือดแดงขนาดใหญ่ (macrovascular complications) และหลอดเลือดแดงฝอย (microvascular complications) ตามมาได้

3.3 โรคเบาหวานชนิดที่เกิดจากสาเหตุอื่น ๆ (Other specific types of diabetes) ได้แก่

3.3.1 โรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมของเบต้าเซลล์ในตับอ่อน (maturity-onset diabetes of the young; MODY) เป็นเบาหวานที่มีการหลั่งอินซูลินบกพร่องร่วมกับมีภาวะดื้อต่ออินซูลินที่พบในผู้มีประวัติครอบครัวเป็นเบาหวาน จะพบใน



ผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 25 ปี มีอาการไม่รุนแรง และมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบ autosomal dominant

3.3.2 โรคเบาหวานที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมในการออกฤทธิ์ของอินซูลิน เกิดจากการกลายพันธุ์ (mutation) ที่ตัวรับของอินซูลิน (insulin receptor) ทำให้การทำงานของตัวรับของอินซูลินเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้เกิดภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ผู้ป่วยจะพบมีลักษณะผิดปกติของใบหน้า เรียกว่า leprechaunism มีความผิดปกติที่พิน เล็บ และ pineal gland hyperplasia ร่วมด้วย นอกจากนี้โรคเบาหวานชนิดนี้อาจเกิดความผิดปกติที่ postreceptor signal transduction จึงส่งผลให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินผิดปกติ

3.3.3 โรคของตับอ่อน เช่น โรคตับอ่อนอักเสบ (pancreatitis), การผ่าตัดตับอ่อนออก (pancreatectomy), มะเร็งตับอ่อน และ cystic fibrosis ก่อให้เกิดโรคเบาหวานได้

3.3.4 โรคของต่อมไร้ท่อ เกิดจากฮอร์โมนบางชนิดในร่างกายมีฤทธิ์ต้านการทำงานของอินซูลิน เช่น growth hormone, cortisol, glucagon และ epinephrine ซึ่งถูกสร้างจากเนื้องอกสามารถทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ นอกจากนี้ยังมีเนื้องอกที่สร้างฮอร์โมน somatostatin และ aldosterone ที่สามารถทำให้เกิดโรคเบาหวานได้เช่นกัน เนื่องจากการที่ระดับ  $K^+$  ในเลือดต่ำ จึงมีผลยับยั้งการหลั่งอินซูลิน ดังนั้น โรคที่มีปริมาณฮอร์โมนเหล่านี้สูงเกินไปจะทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ เช่น Acromegaly, Cushing's syndrome และ Glucagonoma

3.3.5 การได้รับยาและสารเคมีบางอย่าง สามารถทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ โดยทำให้การหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ลดลง เช่น ยาเบื่อหนู (vacor) และยาบางชนิดมีฤทธิ์ทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินลดลง เช่น glucocorticoids และ nicotinic acid

3.3.6 โรคติดเชื้อไวรัส เช่น congenital rubella และ cytomegalovirus

3.3.7 โรคทางพันธุกรรม (genetic syndromes) ที่สัมพันธ์กับโรคเบาหวาน เช่น Down's syndrome, Klinefelter's syndrome และ Turner's syndrome

3.3.8 โรคเบาหวานที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน (Immune-mediated diabetes) พบน้อยมาก เช่น anti-insulin receptor antibodies

3.4 โรคเบาหวานขณะตั้งครรภ์ (Gestation diabetes mellitus; GDM) เป็นความผิดปกติต่อความทนต่อกลูโคส (glucose tolerance) จากการเพิ่มฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ต้านอินซูลิน ในไตรมาสที่สองและไตรมาสที่สามของการตั้งครรภ์ ได้แก่ human placental lactogen, cortisol, prolactin และ insulinase จะทำให้เกิดการดื้อต่ออินซูลิน ลดความทนต่อกลูโคส มีการสะสมไกลโคเจนในตับลดลง ขณะที่ตับสร้างกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดมากขึ้น ทำให้มารดามีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเป็นกลไกที่จะช่วยให้ทารกในครรภ์ได้รับกลูโคสจากมารดาได้ ส่งผลทางคลินิกทำให้เกิดความเสี่ยงและภาวะแทรกซ้อนต่อมารดาและทารก เช่น ความดันโลหิตสูง ทารกตัวโต ความผิดปกติของการคลอด เป็นต้น

#### 4. อาการของโรคเบาหวาน

อาการของผู้ป่วยโรคเบาหวานที่พบบ่อย (สุนทรี, 2548; Okon *et al.*, 2012) คือ

4.1 ปัสสาวะบ่อยและมีปริมาณปัสสาวะมาก (polyuria) เนื่องจากระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงมาก ทำให้ไตมีการกรองน้ำตาลออกมาทางปัสสาวะและดึงน้ำออกมามาก ส่งผลให้ผู้ป่วยเบาหวานปัสสาวะบ่อยและมีปริมาณมาก

4.2 คอแห้ง กระหายน้ำ และดื่มน้ำมาก (polydipsia) เป็นผลมาจากการที่ร่างกายสูญเสียน้ำจากการปัสสาวะบ่อยและมีปริมาณปัสสาวะมาก ทำให้เกิดภาวะขาดน้ำ ผู้ป่วยเบาหวานจึงดื่มน้ำบ่อย

4.3 น้ำหนักลดและผอมลง (weight loss) เนื่องจากร่างกายของผู้ป่วยเบาหวานอยู่ในภาวะที่ขาดอินซูลิน ร่างกายจึงไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสในเลือดไปใช้เป็นพลังงานได้ จึงต้องสลายไขมันและโปรตีนที่เก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื่อไปใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำตาลกลูโคส ส่งผลให้รู้สึกอ่อนเพลียและน้ำหนักลดลงโดยไม่ทราบสาเหตุ

4.4 หิวบ่อยและรับประทานอาหารมาก (polyphagia) เนื่องจากร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลกลูโคสในเลือดไปใช้เป็นพลังงานได้ ทำให้ร่างกายขาดพลังงาน ส่งผลให้มีอาการหิวบ่อยและรับประทานอาหารมาก

#### 5. ภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน

ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงมากกว่าปกติ (hyperglycemia) เป็นระยะเวลานาน จะเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ทั่วร่างกายได้ โดยก่อให้เกิดพยาธิสภาพขึ้นช้า ๆ และการเปลี่ยนแปลงหน้าที่การทำงานตามมาภายหลัง จนมีอาการและอาการแสดงของพยาธิสภาพนั้น ๆ ออกมาชัดเจน ทำให้เป็นปัญหาหรือโรคใหม่ขึ้นมาได้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นช้า ๆ เหล่านี้เป็นที่มาของโรคแทรกซ้อนชนิดเรื้อรังของโรคเบาหวาน ซึ่งพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับอวัยวะต่าง ๆ เป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงที่หลอดเลือดหรือที่เนื้อเยื่อของอวัยวะนั้น ๆ ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 กลุ่ม (วรรณิ, 2535) คือ

5.1 Microvascular complications เป็นภาวะแทรกซ้อนที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่หลอดเลือดขนาดเล็ก มีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นค่อนข้างจำเพาะเจาะจงสำหรับโรคเบาหวาน (specific lesion) ตาและไตเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของภาวะแทรกซ้อนและมีความพิการบ่อย และภาวะไตวายเป็นสาเหตุของการตายในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ดังนั้น diabetic retinopathy และ diabetic nephropathy จึงจัดเป็นภาวะแทรกซ้อนจากหลอดเลือดขนาดเล็กที่สำคัญที่จะต้องดูแลเฝ้าระวังและรักษา

5.2 Macrovascular complications เป็นภาวะแทรกซ้อนที่มีพยาธิสภาพเกิดขึ้นที่หลอดเลือดขนาดใหญ่ โดยหลอดเลือดจะมีลักษณะตีบไม่ยืดหยุ่น (atherosclerosis) ซึ่งพยาธิสภาพนี้พบได้ในโรคอื่นที่ไม่ใช่เบาหวาน จึงจัดเป็น non-specific lesion อวัยวะที่มีการแสดงออกของ

พยาธิสภาพบ่อย คือ หัวใจโดยจะเกิดภาวะกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) ขาส่วนล่างและเท้าจะมีอาการปวดขาเป็นระยะเนื่องจากขาดเลือด (intermittent claudication) และมีเนื้อตาย (gangrene) นอกจากนี้ยังเกิดพยาธิสภาพที่ระบบประสาทส่วนกลางโดยเกิดโรคหลอดเลือดสมอง (cerebrovascular disease) ขึ้นได้

5.3 Diabetic neuropathy คือ พยาธิสภาพที่เกิดกับระบบประสาทส่วนปลาย ซึ่งจะทำให้ระบบประสาทส่วนปลายเสื่อม ส่งผลให้ผู้ป่วยสูญเสียประสาทรับความรู้สึกบริเวณเท้า เริ่มจากที่ปลายนิ้วเท้าและลุกลามขึ้นมาเรื่อย ๆ จนไม่รู้สึกรู้สึบและไม่รับความรู้สึก เช่น ความร้อน เย็นจากที่เท้าและที่ขาทั้ง 2 ข้างได้

5.4 Miscellaneous เป็นปัญหาอื่น ๆ ที่พบบ่อยในผู้ป่วยโรคเบาหวาน ได้แก่ ต้อกระจก การติดเชื้อง่าย และเกิดแผลที่เท้า (diabetic foot ulcer) ซึ่งทำให้เกิดความพิการได้บ่อย

## 6. ยารักษาโรคเบาหวาน

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่รักษาไม่หายขาด แต่สามารถควบคุมดูแลให้ดีได้โดยการรักษาอย่างต่อเนื่องและสม่ำเสมอ เป็นโรคที่มีอาการหรือไม่มีอาการก็ได้ ขึ้นอยู่กับระดับน้ำตาลในเลือดที่จะสามารถเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้ตลอดเวลา ซึ่งการรักษาจะให้ผลที่ดีที่สุดผู้ป่วยจะต้องควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ โดยรับประทานอาหารที่เหมาะสม ควบคุมน้ำหนักตัวให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ และการใช้ยาแผนปัจจุบันรักษาเบาหวานในรูปแบบยารับประทานหรือยาฉีดอินซูลิน

สำหรับยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบัน สามารถแบ่งเป็น 5 กลุ่ม (ณัฐวธ, 2555) ดังนี้

### 6.1 อินซูลิน (Insulin)

ในปัจจุบันอินซูลินที่ใช้ทางคลินิกส่วนใหญ่เป็นอินซูลินของคนซึ่งผลิตโดยเทคโนโลยีพันธุวิศวกรรมโดยการตัดยีนอินซูลินจาก DNA ของคนมาต่อเข้ากับพลาสมิดของเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เมื่อสังเคราะห์ออกมาจนได้อินซูลินก็นำมาปรับเปลี่ยนโครงสร้างของกรดอะมิโน เพื่อทำให้อินซูลินมีคุณสมบัติทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ดีขึ้น (ณัฐวธ, 2555) อินซูลินสามารถแบ่งตามระยะเวลาในการออกฤทธิ์ได้เป็น 4 กลุ่มย่อย (พงศ่อมร, 2546) คือ

**6.1.1 Rapid-acting insulin** เป็นที่อินซูลินที่ออกฤทธิ์เร็ว ได้แก่ insulin lispro และ insulin aspart ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอินซูลิน (insulin analogue) ที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสาย B ของอินซูลิน โดย insulin lispro จะมีการเปลี่ยนแปลง proline-lysine ที่ปลายสาย B ให้กลายเป็น lysine-proline และ insulin aspart จะเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 28 ของสาย B จาก proline เป็น aspartic acid (Katzung *et al.*, 2012) อินซูลินกลุ่มนี้จะเริ่ม

ออกฤทธิ์ภายใน 15-30 นาที หลังฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และฤทธิ์คงอยู่ได้นาน 3-4 ชั่วโมง และอินซูลินกลุ่มนี้ยังสามารถให้ทางหลอดเลือดดำได้ด้วย

**6.1.2 Short-acting insulin** เป็นที่อินซูลินที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์สั้น ได้แก่ regular insulin เป็นอินซูลินที่เริ่มออกฤทธิ์ภายใน 30-60 นาที หลังฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และออกฤทธิ์ได้นาน 3-6 ชั่วโมง และอินซูลินกลุ่มนี้สามารถให้ทางหลอดเลือดดำได้

**6.1.3 Intermediate-acting insulin** เป็นที่อินซูลินที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ปานกลาง เช่น neutral protamine Hagedron (NPH) หรือ isophane insulin จะใช้ protamine กับโลหะสังกะสีใน สารละลาย phosphate buffer ทำให้เกิดการตกตะกอนของอินซูลิน ส่งผลให้อินซูลินออกฤทธิ์นานขึ้น อินซูลินกลุ่มนี้จะเริ่มออกฤทธิ์ภายใน 2-4 ชั่วโมง หลังฉีดเข้าใต้ผิวหนัง และออกฤทธิ์ได้นาน 10-16 ชั่วโมง

**6.1.4 Long-acting insulin** เป็นที่อินซูลินที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์นาน เช่น insulin glargine ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของอินซูลินที่ได้จากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนในสาย A และสาย B ของอินซูลิน โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 21 ของสาย A จาก asparagine เป็น glycine และเติม arginine 2 ตัว ต่อท้าย B chain เป็นตำแหน่งที่ 31-32 (Brunton *et al.*, 2011) ทำให้การดูดซึมช้าลง และสามารถออกฤทธิ์ได้ยาวนานถึง 24 ชั่วโมง

นอกจากนี้ยังมีการผสมอินซูลินที่มีระยะเวลาในการออกฤทธิ์ต่างกัน (Premixed insulin) เพื่อให้สามารถควบคุมระดับน้ำตาลที่เวลาต่าง ๆ กันได้มากขึ้น เช่น การผสม neutral protamine Hagedron (NPH) กับ regular insulin ในอัตราส่วนที่แตกต่างกันออกไป จะยังคงเกสัชจลนศาสตร์ในการออกฤทธิ์ของอินซูลินแต่ละชนิดไว้ได้ ตัวอย่าง เช่น การผสม NPH 70% กับ regular insulin 30% ยาจะเริ่มออกฤทธิ์ภายใน 30 นาที และมีฤทธิ์นาน 16-24 ชั่วโมง

**การใช้ในทางคลินิก** จะใช้เป็นยาหลักในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่รุนแรงหลังจากที่ใช้อากินไม่ได้ผล ยังใช้ในผู้ป่วยที่มีระดับโพแทสเซียมในเลือดสูง (hyperkalemia) โดยใช้ในกรณีที่รุนแรง เพราะอินซูลินจะเพิ่มการขนส่ง  $K^+$  เข้าเซลล์ (ณัฐวธ, 2555)

#### ผลข้างเคียงของอินซูลิน

- เมื่อได้รับอินซูลินมากเกินไป จะทำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ซึ่งมีอาการเหงื่อแตก (diaphoresis) เวียนศีรษะ (vertigo) ใจสั่น (palpitation) หัวใจเต้นเร็ว (tachycardia) หน้ามืดเป็นลม ชัก ไม่รู้สึกตัว และเสียชีวิตได้

- การแพ้อินซูลิน เกิดจากปฏิกิริยาการแพ้ที่เกี่ยวกับ IgE

- เกิด antibodies ต่ออินซูลิน โดยเฉพาะอินซูลินที่ผลิตจากสัตว์

- Lipoatrophy หรือ lipohypertrophy เนื่องจากเนื้อเยื่อไขมันบริเวณที่ฉีดอินซูลินอาจฝ่อหรือหนาตัวขึ้น

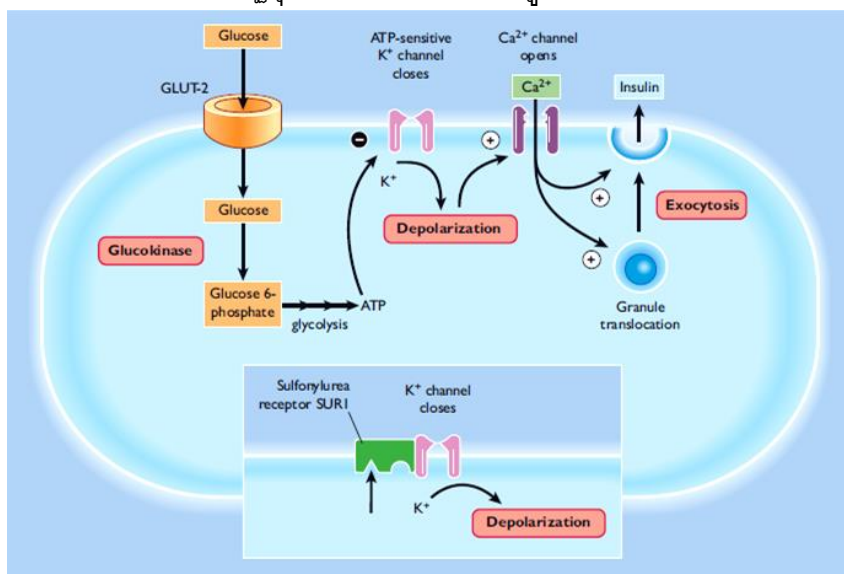
- บวมและน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยที่มีกลูโคสในเลือดสูง

**6.2 ยากระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (Insulin secretagogues)** ซึ่งยาในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

**6.2.1 Sulfonylureas** มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการจับกับ sulfonylurea receptor ที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อน จึงนำไปสู่การกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน โดยยาในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งออกเป็น 3 รุ่น (generations) คือ

- First generation ได้แก่ chlorpropamide
- Second generation ได้แก่ glibenclamide และ glipizide
- Third generation ได้แก่ glimepiride และ gliclazide

กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม **sulfonylureas** จะไปกระตุ้นให้เบต้าเซลล์เพิ่มการหลั่งอินซูลิน โดยยาจะจับกับ sulfonylurea receptor แล้วไปปิดกั้น ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้  $K_{ATP}$  channel ปิด ส่งผลให้  $K^+$  ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ  $K^+$  ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้น voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ให้เปิดออก  $Ca^{2+}$  จากนอกเซลล์จึงเข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินออกมาจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis (ณัฐวรุฑ, 2555) ดังแสดงในรูปที่ 2-1



รูปที่ 2-1 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม sulfonylureas โดยยาจะจับกับ sulfonylurea receptor ส่งผลให้กระตุ้นให้เบต้าเซลล์เพิ่มการหลั่งอินซูลิน (Holt *et al.*, 2010)

**การใช้ในทางคลินิก** จะใช้เป็นยาอันดับแรกในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แต่ห้ามใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1 เพราะเบต้าเซลล์ถูกทำลายไปแล้ว

### ผลข้างเคียงของยากลุ่ม **sulfonylureas**

- ระดับกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) โดยเฉพาะในผู้สูงอายุ
- ในระยะแรกอาจมีน้ำหนักตัวเพิ่ม (weight gain) และมีอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia)
- การแพ้ยา เนื่องจากยากลุ่มนี้มีโครงสร้างคล้ายยา sulfanamide
- ภาวะดีซ่าน เนื่องจากการอุดกั้นการไหลของน้ำดี (cholestatic jaundice)
- Disulfiram-like reaction เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ เมื่อดื่มแอลกอฮอล์ร่วม พบบ่อยเมื่อใช้ยา chlorpropamide

**6.2.2 Non-sulfonylureas** ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินเหมือนกับยากลุ่ม sulfonylureas โดยการจับกับตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ sulfonylurea receptor ที่เบต้าเซลล์ของตับอ่อน ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ repaglinide และ nateglinide

**กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม non-sulfonylureas** จะไปกระตุ้นให้เบต้าเซลล์เพิ่มการหลั่งอินซูลิน โดยยาจะจับกับตำแหน่งอื่นที่ไม่ใช่ sulfonylurea receptor แล้วไปปิดกั้น ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้  $K_{ATP}$  channel ปิด ส่งผลให้  $K^+$  ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ  $K^+$  ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้น voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ให้เปิดออก  $Ca^{2+}$  จากนอกเซลล์จึงเข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินออกจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis

#### การใช้ในทางคลินิก

- ยากลุ่มนี้มีฤทธิ์ต่างจากยากลุ่ม sulfonylureas โดยจะออกฤทธิ์เร็วและสั้น มีช่วงเวลาออกฤทธิ์ 4-5 ชั่วโมง ทำให้กระตุ้นการหลั่งอินซูลินในระยะต้นหลังอาหารได้ จึงใช้ยานี้ควบคุมระดับกลูโคสในเลือดหลังอาหาร ยากลุ่มนี้มักใช้ร่วมกับยาอื่น เช่น metformin และ thiazolidinediones

- เป็นยาตัวเลือกในกรณีผู้ป่วยใช้ยากลุ่ม sulfonylureas ไม่ได้ เช่น แพ้ยา sulfanamide

**ผลข้างเคียงของยากลุ่ม non-sulfonylureas** คือ ภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) แต่พบน้อยกว่ายากลุ่ม sulfonylureas

**6.3 ยาที่เพิ่มความไวต่ออินซูลิน (Insulin sensitizers)** ซึ่งยาในกลุ่มนี้ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ

**6.3.1 Biguanides** ทำให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง โดยยับยั้งการสร้างกลูโคสจากตับเป็นหลัก ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ เช่น metformin

กลไกการออกฤทธิ์ของยา **biguanides** ทำได้โดยยาจะไปกระตุ้น AMPK (AMP-activated protein kinase) ในเซลล์ตับ ทำให้เพิ่มการแสดงออกของโปรตีน SHP (small heterodimer partner) ซึ่งเป็น transcription factor จะไปยับยั้งการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์ PEPCCK (phosphoenol-pyruvate carboxykinase) และ Glc-6-Pase (glucose-6-phosphatase) ซึ่งเกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างกลูโคสจากสารอื่น (gluconeogenesis) ส่งผลให้ลดการสร้างกลูโคสจากตับ จึงทำให้ระดับกลูโคสในเลือดลดลง นอกจากนี้ยา biguanides ยังทำให้เซลล์กล้ามเนื้อและไขมันไวต่ออินซูลินมากขึ้น ลดการดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหาร ลดระดับ glucagon ในเลือด และเพิ่มการสลายกลูโคส (glycolysis) ที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ

#### การใช้ในทางคลินิก

- ใช้เป็นยาในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีการดื้อต่ออินซูลิน ยานี้ช่วยลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากเบาหวานทั้ง microvascular และ macrovascular complications นอกจากนี้ยา biguanides ยังใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ได้ด้วย

- ข้อดีของยานี้ คือ ไม่ทำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ไม่ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่ม และทำให้ระดับ triglyceride, LDL และ VLDL cholesterol ในเลือดลดลง และเพิ่ม HDL cholesterol

#### ผลข้างเคียงของยา biguanides

- Lactic acidosis พบในผู้ป่วยที่มีภาวะขาดออกซิเจน หรือมีความบกพร่องของไตและตับ

- ระคายเคืองทางเดินอาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง

- ขาดวิตามินบี 12 และ folate เนื่องจากการดูดซึมจากทางเดินอาหารน้อยลง พบในผู้ป่วยที่ใช้ยานี้เป็นเวลานาน

**6.3.2 Thiazolidinediones** ออกฤทธิ์โดยการกระตุ้น peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) ซึ่งอยู่ที่เซลล์ไขมันเป็นหลัก ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ rosiglitazone และ pioglitazone

กลไกการออกฤทธิ์ของยา **thiazolidinediones** จะไปจับกับ peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR- $\gamma$ ) ซึ่งเป็น intracellular receptor ที่ควบคุมการแสดงออกของยีน เช่น IRGs (insulin response genes) ทำให้เกิดการ transcription ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออินซูลิน ส่งผลให้กระตุ้นเมแทบอลิซึมของกรดไขมันและกลูโคสในเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อ จึงลดการดื้ออินซูลินของเซลล์เป้าหมาย ทำให้ลดระดับกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ในพลาสมา เพิ่มจำนวนไขมันขนาดเล็ก ลดระดับ triglyceride ในเลือดและเพิ่มการเกิด signal transduction ของอินซูลินในเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งจะทำให้ glucose

transporter 4 (GLUT4) เคลื่อนที่ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์กล้ามเนื้อ ส่งผลให้เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากขึ้น

#### การใช้ในทางคลินิก

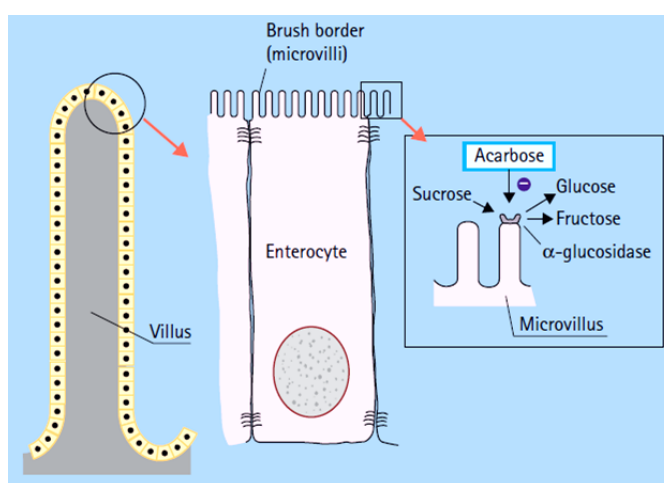
- ใช้เป็นยาอันดับ 2 (second-line) ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีระดับอินซูลินในเลือดสูง (hyperinsulinemia)

- ยานี้ไม่กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน จึงไม่ทำให้เกิดภาวะกลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia)

ผลข้างเคียงของยากลุ่ม **thiazolidinediones** คือ เป็นพิษต่อตับ น้ำหนักตัวเพิ่ม มีไขมันใต้ผิวหนังมากขึ้นเนื่องจากยาเพิ่มจำนวนเซลล์ไขมัน มีการคั่งของน้ำในร่างกายทำให้บวม มีระดับ triglyceride ในเลือดต่ำ แต่ระดับ HDL และ LDL สูง และซีด

**6.4 ยาที่ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ( $\alpha$ -glucosidase inhibitors)** ออกฤทธิ์โดยทำให้มีการดูดซึมกลูโคสจากทางเดินอาหารช้าลง ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่ acarbose, miglitol และ voglibose

กลไกการออกฤทธิ์ของยา  **$\alpha$ -glucosidase inhibitors** จะไปจับและยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase แบบแข่งขัน (competitive inhibition) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบใน brush border ของลำไส้และทำหน้าที่ย่อยสลายอาหารประเภทแป้ง โดยย่อย oligosaccharides และ disaccharides ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) เช่น กลูโคส เพื่อดูดซึม ผลของการใช้ยานี้จะทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดลดลง นอกจากนี้ยายังสามารถยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -amylase จากตับอ่อนส่งผลให้แป้งไม่ถูกย่อยเป็น oligosaccharides คาร์โบไฮเดรตจึงถูกย่อยยากขึ้น ทำให้การดูดซึมแป้งและน้ำตาลในลำไส้ช้าลง (รูปที่ 2-2)



รูปที่ 2-2 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของยา  $\alpha$ -glucosidase inhibitors โดยจับและยับยั้งเอนไซม์

$\alpha$ -glucosidase ทำให้การดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดลดลง

(Holt *et al.*, 2010)



การใช้ในทางคลินิก ใช้เป็นยาในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพื่อลดระดับกลูโคสในเลือดหลังอาหาร (postprandial glucose) โดยให้กินก่อนอาหาร

ผลข้างเคียงของยา  **$\alpha$ -glucosidase inhibitors** คือ แน่นท้อง ท้องอืด มีลมในท้องมาก (flatulence) ผายลมบ่อย และอุจจาระร่วง

### 6.5 ยาที่เพิ่มการทำงานของฮอร์โมนในทางเดินอาหาร (นภวรรณ, 2553)

Incretins เป็นกลุ่มฮอร์โมนในทางเดินอาหาร ได้แก่ glucagon like peptide 1 (GLP-1) และ glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP) ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลโดยเพิ่มการสังเคราะห์และปล่อยอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และลดการปล่อยฮอร์โมนกลูคากอนจากอัลฟาเซลล์ของตับอ่อน นอกจากนี้ยังช่วยให้เบต้าเซลล์ทำงานได้ดีขึ้น ร่างกายจะผลิต incretins เมื่อมีอาหารผ่านลำไส้เท่านั้น ขณะเดียวกันร่างกายก็จะหลั่งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลาย incretins ทำให้ incretins ที่หลั่งออกมาออกฤทธิ์ได้ไม่นาน ยาที่เพิ่มการทำงานของฮอร์โมนในทางเดินอาหารนี้จึงเป็นยาที่ต้องเพิ่มระดับ incretins ให้มากขึ้น เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ยากลุ่มนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ

**6.5.1 Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) agonists** เป็นกลุ่มยาใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้น ซึ่งออกฤทธิ์เหมือนกับ incretins แต่มีความสามารถในการทนต่อการทำลายโดยเอนไซม์ dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) มากกว่า incretins ตัวอย่างยากลุ่มนี้ เช่น exenatide และ liraglutide

**กลไกการออกฤทธิ์ของยา GLP-1 agonists** คือ ยาจะจับกับ GLP-1 receptor ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเบต้าเซลล์ที่ตับอ่อน ซึ่งเป็น  $G_s$  protein-coupled receptor ที่พบในตับอ่อน ทางเดินอาหาร และสมอง เมื่อยาจับกับ GLP-1 receptor จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตัวรับให้อยู่ในรูปถูกกระตุ้น ส่งผลให้กระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase ทำให้ระดับ cAMP ในเซลล์เพิ่ม จากนั้น cAMP จะจับกับ regulatory subunit ของเอนไซม์ protein kinase A (PKA) ทำให้ PKA ถูกกระตุ้น จากนั้น catalytic subunit ของ PKA จะไปปิดกั้น ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้  $K_{ATP}$  channel ปิด ส่งผลให้  $K^+$  ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ  $K^+$  ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้น voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ให้เปิดออก  $Ca^{2+}$  จากนอกเซลล์จึงเข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินออกจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis ส่งผลให้กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน นอกจากนี้ยายังมีผลยับยั้งการหลั่งกลูคากอน ทำให้อาหารถูกส่งผ่านจากกระเพาะสู่ลำไส้ช้าลง และลดความอยากอาหารเนื่องจากยาออกฤทธิ์กระตุ้น GLP-1 receptor ในสมองส่วนไฮโปทาลามัสซึ่งเป็นศูนย์ควบคุมความอยากอาหาร

**การใช้ในทางคลินิก** ใช้เป็นยาฉีดเข้าใต้ผิวหนังในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เพื่อลดระดับกลูโคสในเลือดหลังอาหาร (postprandial glucose) โดยให้ร่วมกับยาอื่น ๆ เช่น sulfonylurea

**ผลข้างเคียงของยา GLP-1 agonists** คือ รมกวนทางเดินอาหาร ทำให้คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วงและทำให้กลูโคสในเลือดต่ำ (hypoglycemia) เพราะยากระตุ้นการหลั่งอินซูลิน

**6.5.2 Dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) inhibitors** เป็นยาที่ยับยั้งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลาย incretins ทำให้ incretins ไม่สามารถออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ตัวอย่างยากลุ่มนี้ ได้แก่ sitagliptin และ vildagliptin

**กลไกการออกฤทธิ์ของยา DPP-4 inhibitors** คือ ยาจะจับและยับยั้งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase 4 (DPP-4) ซึ่งทำหน้าที่ทำลาย incretins เช่น GLP-1 ทำให้ GLP-1 อยู่ในเลือดได้นานขึ้น ส่งผลให้ GLP-1 ไปจับและกระตุ้น GLP-1 receptor ซึ่งเป็น G<sub>s</sub> protein-coupled receptor ที่พบในตับอ่อน ทางเดินอาหาร และสมอง เมื่อยาจับกับ GLP-1 receptor จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างตัวรับให้อยู่ในรูปถูกกระตุ้น ส่งผลให้กระตุ้นเอนไซม์ adenylate cyclase ทำให้ระดับ cAMP ในเซลล์เพิ่ม จากนั้น cAMP จะจับกับ regulatory subunit ของเอนไซม์ protein kinase A (PKA) ทำให้ PKA ถูกกระตุ้น จากนั้น catalytic subunit ของ PKA จะไปปิดกั้น ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (K<sub>ATP</sub> channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้ K<sub>ATP</sub> channel ปิด ส่งผลให้ K<sup>+</sup> ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ K<sup>+</sup> ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้น voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel ให้เปิดออก Ca<sup>2+</sup> จากนอกเซลล์จึงเข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินออกมาจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis ส่งผลให้กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน นอกจากนี้ยายังมีผลยับยั้งการหลั่งกลูคากอน ทำให้อาหารถูกส่งผ่านจากกระเพาะสู่ลำไส้ช้าลง และลดความอยากอาหารเนื่องจากยาออกฤทธิ์กระตุ้น GLP-1 receptor ในสมอง ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจึงลดลง

**การใช้ในทางคลินิก** ใช้เป็นยาอื่นในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยใช้เดี่ยว ๆ หรือให้ร่วมกับยา metformin หรือ rosiglitazone (PPAR- $\gamma$  agonist)

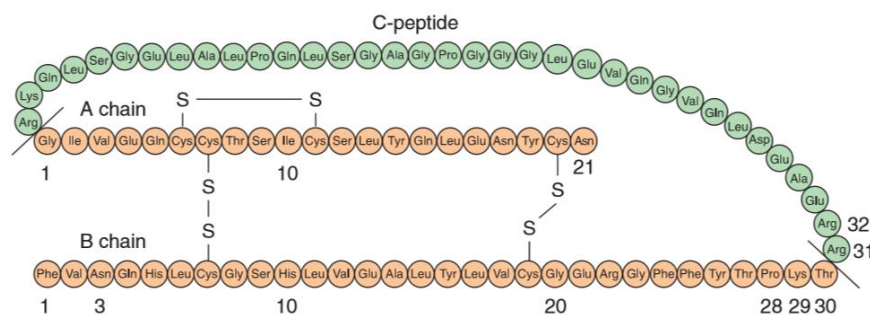
**ผลข้างเคียงของยา DPP-4 inhibitors** คือ ทำให้เบื่อจุกและลำคออักเสบ ติดเชื้อในทางเดินหายใจส่วนบนง่าย และอุจจาระร่วง

ตารางที่ 2-1 สรุปรายยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2

ชนิดของยา	กลไกการออกฤทธิ์	ผลข้างเคียงจากการใช้ยา
Insulin secretagogues Sulfonylureas (gliclazide, glimepiride, glyburide)	กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน	- Hypoglycemia - Weight gain
Insulin secretagogues Non-sulfonylureas (repaglinide, nateglinide)	กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน	- Hypoglycemia, - Weight gain
Biguanides (metformin)	- เพิ่มความไวต่ออินซูลินใน เซลล์ตับและกล้ามเนื้อ - ลดการสร้างกลูโคสในตับ	- ระบายเคืองทางเดินอาหาร - อาจเกิด lactic acidosis
Thiazolidinediones (rosiglitazone, pioglitazone)	- เพิ่มความไวต่ออินซูลินใน เซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อ	- Weight gain - Edema - Anemia
$\alpha$ -glucosidase inhibitor (acarbose)	- ชะลอการดูดซึม คาร์โบไฮเดรตในลำไส้	- ผลข้างเคียงต่อทางเดิน อาหาร (แน่นท้อง ท้องอืด มี ลมในท้องมาก ผายลมบ่อย และอุจจาระร่วง)
Glucagon like peptide 1 (GLP-1) agonists (exenatide, liraglutide)	- กระตุ้น GLP-1 receptor - เพิ่มการหลั่งอินซูลิน - ลดการหลั่งกลูคากอน - Gastric emptying ช้าลง - เพิ่มความรู้สึกอิ่ม	- อาการข้างเคียงต่อทางเดิน อาหาร (Nausea or vomiting) - hypoglycemia
Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitors (sitagliptin, vildagliptin)	- ยับยั้ง Dipeptidyl peptidase-4 activity ทำให้ incretins ไม่สามารถออกฤทธิ์ ในการลดระดับน้ำตาลใน เลือดได้ - เพิ่มความเข้มข้นของ GLP- 1 และ GIP - เพิ่มการหลั่งอินซูลิน	- เยื่อจมูกและลำคออักเสบ - ติดเชื้อในทางเดินหายใจ ส่วนบนง่าย - อุจจาระร่วง

## 7. อินซูลิน

อินซูลินของมนุษย์เป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีน้ำหนักโมเลกุล 5808 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนทั้งหมด 51 ตัว ซึ่งเรียงเป็นสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) 2 สาย คือ สาย A (A chain) และ สาย B (B chain) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) ระหว่างกรดอะมิโน cysteine โดยสาย A ประกอบด้วยกรดอะมิโน 21 ตัว และสาย B ประกอบด้วยกรดอะมิโน 30 ตัว และภายในสาย A ยังมีพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเชื่อมกันภายในสายระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ A6 กับ A11 จากรูปที่ 2-3 เป็นโครงสร้างของ proinsulin ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอินซูลินใน granules โดยการตัดสาย C-peptide ออก ด้วยเอนไซม์ prohormone convertases จนได้อินซูลิน ซึ่งเป็น active hormone ที่สามารถทำงานได้ต่อไป (Katzung *et al.*, 2012)



รูปที่ 2-3 แสดงโครงสร้างของ proinsulin (Katzung *et al.*, 2012)

อินซูลินเป็นฮอร์โมนเปปไทด์ที่ถูกสร้างจากเบต้าเซลล์ในส่วนของ Islets of Langerhans ในตับอ่อน ซึ่งในส่วนของ Islets of Langerhans นี้ ประกอบด้วยเซลล์ 5 ชนิด (Katzung *et al.*, 2012) ดังรูปที่ 2-4 คือ

**7.1 กลุ่มอัลฟาเซลล์ ( $\alpha$ -cells)** พบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมดใน Islets of Langerhans จะพบอยู่ที่บริเวณขอบของ Islets of Langerhans กลุ่มเซลล์นี้จะสร้างและหลั่งฮอร์โมนกลูคากอน (glucagon) ซึ่งมีฤทธิ์เพิ่มปริมาณระดับน้ำตาลในเลือดขณะร่างกายขาดน้ำตาล โดยการสลายไกลโคเจน (glycogen) ที่ร่างกายสะสมไว้ให้ออกมาเป็นน้ำตาลกลูโคส ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น

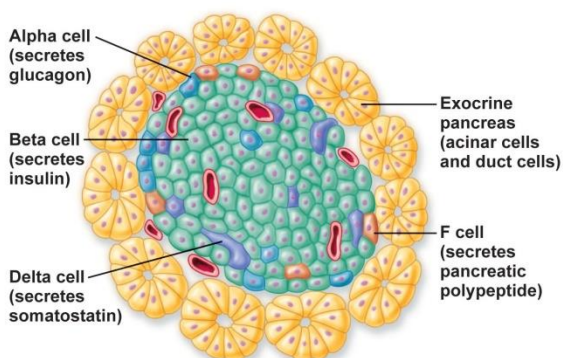
**7.2 กลุ่มเบต้าเซลล์ ( $\beta$ -cells)** พบประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมดใน Islets of Langerhans จะพบอยู่ที่บริเวณตรงกลางของ Islets of Langerhans กลุ่มเซลล์นี้จะสร้างและหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง โดยการนำน้ำตาลกลูโคสจากกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ต่าง ๆ ของ ร่างกาย ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลง นอกจากนี้เบต้าเซลล์ยังผลิตฮอร์โมนอะไมลิน (amylin) หรือ islet amyloid polypeptide (IAPP) ที่ทำ

หน้าที่ลดความอยากอาหาร ลดการส่งผ่านอาหารจากกระเพาะอาหารไปยังลำไส้ (gastric emptying) และลดการหลั่งอินซูลินและกลูคากอน

**7.3 กลุ่มเดลต้าเซลล์ (D cells)** พบประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมดใน Islets of Langerhans จะพบอยู่ที่บริเวณขอบของ Islets of Langerhans กลุ่มเซลล์นี้จะสร้างและหลั่งฮอร์โมน somatostatin ซึ่งมีหน้าที่ยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนอินซูลินและกลูคากอน

**7.4 กลุ่มจีเซลล์ (G cells)** พบประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมดใน Islets of Langerhans กลุ่มเซลล์นี้จะผลิต gastrin ซึ่งมีหน้าที่กระตุ้นการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร (gastric acid)

**7.5 กลุ่มเอฟเซลล์ (F cells)** พบประมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ของเซลล์ทั้งหมดใน Islets of Langerhans กลุ่มเซลล์นี้จะผลิต pancreatic polypeptide ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็กที่มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบทางเดินอาหาร แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่นอน



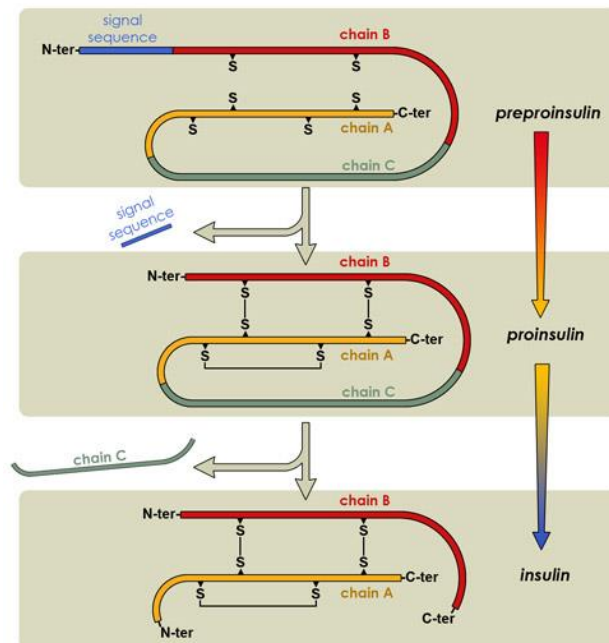
รูปที่ 2-4 แสดงชนิดของเซลล์ที่พบในส่วนของ Islets of Langerhans ในตับอ่อน

(ที่มา: <http://imgarcade.net/1/islets-of-langerhans/>)

## 8. การสังเคราะห์อินซูลิน (Synthesis of insulin)

การสังเคราะห์อินซูลินเกิดขึ้นภายใน rough endoplasmic reticulum (RER) ของเบต้าเซลล์ในตับอ่อน โดยจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในรูปแบบของ inactive hormone ก่อนเรียกว่า preproinsulin ซึ่งประกอบด้วย 110 กรดอะมิโน และแบ่งเป็น 4 ส่วน คือ signal peptide, B chain, C-peptide และ A chain จากนั้น preproinsulin จะถูกเปลี่ยนเป็น proinsulin โดยเอนไซม์ signal peptidases ซึ่งจะทำหน้าที่ตัด signal peptide ออกจากปลาย N-terminal แล้วเกิดการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) จึงทำให้เกิดการพับม้วนตัว (folding) ของ preproinsulin จะกลายเป็น proinsulin แล้วจะถูกขนส่งไปยัง golgi apparatus เพื่อนำ proinsulin ไปเก็บไว้ที่ secretory granules ต่อมา proinsulin จะถูกเปลี่ยนไปเป็นอินซูลิน ซึ่งเป็น active hormone ใน granules โดยการตัดสาย C-peptide ออก ด้วยเอนไซม์ prohormone convertases จนได้อินซูลินซึ่งประกอบด้วยสายโพลีเปปไทด์ (polypeptide chain) 2 สาย คือ สาย A (A

chain) และ สาย B (B chain) ซึ่งจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bonds) และภายในสาย A ยังมีพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งเชื่อมกันภายในสายระหว่างกรดอะมิโนตำแหน่งที่ A6 กับ A11 (รูปที่ 2-5) ทั้งอินซูลินและ C-peptide จะถูกเก็บไว้ด้วยกันภายใน secretory granules ของเบต้าเซลล์ ซึ่งอยู่ใน cytosol เมื่อมีการกระตุ้นทั้งอินซูลินและ C-peptide จะถูกหลั่งออกมาจากเซลล์พร้อมกันเข้าสู่กระแสเลือดโดยกระบวนการ exocytosis (Brunton *et al.*, 2011)

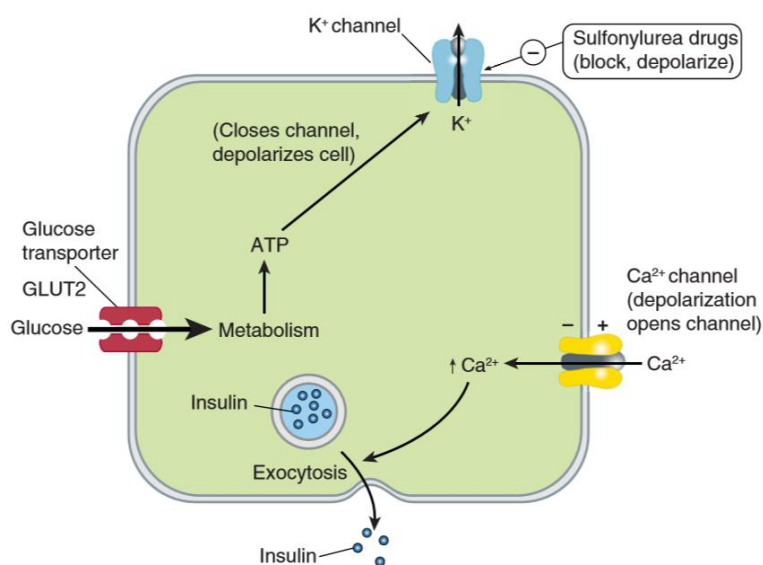


รูปที่ 2-5 แสดงการสังเคราะห์อินซูลิน โดยจะถูกสังเคราะห์ขึ้นมาในรูปของ preproinsulin ก่อน จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น proinsulin และอินซูลิน ตามลำดับ (ที่มา: [https://www.betacell.org/content/articlepanelview/article\\_id/1/panel\\_id/1](https://www.betacell.org/content/articlepanelview/article_id/1/panel_id/1))

## 9. กลไกการหลั่งของอินซูลิน

อินซูลินจะถูกหลั่งออกมาจากเบต้าเซลล์ในตับอ่อนได้ด้วยการกระตุ้นจากตัวกระตุ้นหลายชนิด ได้แก่ น้ำตาลแมนโนส (mannose), กรดอะมิโนบางชนิด เช่น leucine และ arginine, ฮอร์โมนในทางเดินอาหาร เช่น glucagon like peptide 1 (GLP-1), glucose-dependent insulinotropic peptide (GIP), glucagon, cholecystokinin (CCK) เป็นต้น และการกระตุ้น  $\beta_2$ -adrenergic receptors ซึ่งตัวกระตุ้นเหล่านี้จะเพิ่มการหลั่งอินซูลิน แต่กลูโคสจะเป็นตัวกระตุ้นหลักที่จะกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน โดยเมื่อกลูโคสผ่านเข้าไปในเบต้าเซลล์โดยอาศัย glucose transporter 2 (GLUT2) แล้วจะเข้าสู่กระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) โดยกลูโคสจะถูก phosphorylated ด้วยเอนไซม์ glucokinase ซึ่งทำหน้าที่เป็น glucose sensor ได้เป็น glucose-6-phosphate และจะผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ จนได้เมแทบอลิต์เป็น pyruvate จากนั้นจะเข้าสู่ไมโทคอนเดรียและถูกเมแทบอลิซ์ได้เป็นพลังงานในรูปของ adenosine

triphosphate (ATP) ออกมา เมื่อมีการเพิ่มขึ้นของ ATP ภายในเบต้าเซลล์ จะทำให้เกิดการปิดของ ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ส่งผลให้  $K^+$  ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ  $K^+$  ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ จากนั้นจะเกิดการกระตุ้น voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ให้เปิดออก ทำให้  $Ca^{2+}$  จากนอกเซลล์เข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินออกจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis ดังแสดงในรูปที่ 2-6 (Katzung *et al.*, 2012)

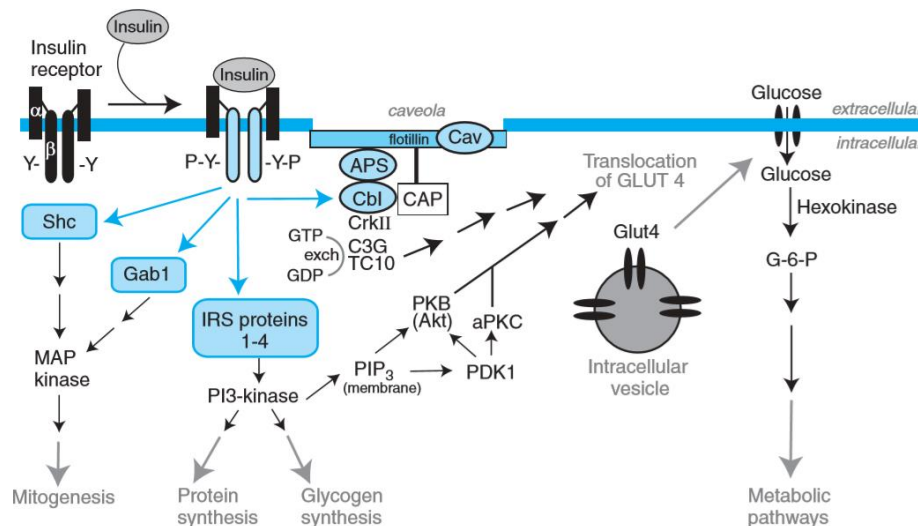


รูปที่ 2-6 แสดงกลไกการหลั่งของอินซูลิน (Katzung *et al.*, 2012)

## 10. การส่งสัญญาณของอินซูลิน (Insulin signaling pathway)

อินซูลินออกฤทธิ์ได้เมื่อจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออินซูลิน ชื่อว่า insulin receptor ซึ่งประกอบด้วย 4 subunits คือ 2  $\alpha$  subunits และ 2  $\beta$  subunits ซึ่งจับกันเองด้วย disulfide bonds อินซูลินจะจับกับ insulin receptor บริเวณ  $\alpha$  subunits ซึ่งยื่นออกมานอกเซลล์ และติดอยู่กับ  $\beta$  subunits เป็นส่วนที่ยื่นเข้าไปในเซลล์และเป็นส่วนที่มีเอนไซม์ tyrosine kinase เมื่ออินซูลินจับกับ receptor และเกิดการกระตุ้น receptor ทำให้เกิด conformational change แล้วไปกระตุ้น  $\beta$  subunits ให้เกิดกระบวนการ autophosphorylation โดยเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) บริเวณ tyrosine residues ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ซึ่งจะไปกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนต่าง ๆ (downstream signaling proteins) ได้แก่ insulin-receptor substrates (IRS) proteins, Src-homology-2-containing protein (Shc), Gab1, Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence homologue (Cbl) และ Cbl-associated protein (CAP) ตัวอย่างเช่น การเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ Shc จะกระตุ้นการรวมตัวของ Shc กับ

Gab1 เกิดเป็น complex แล้วจะไปกระตุ้น MAP kinase pathway ซึ่งจะนำไปสู่กระบวนการ mitogenesis ทำให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ ส่วนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ IRS proteins ทำให้เกิดการกระตุ้น phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้างโปรตีนและไกลโคเจนภายในเซลล์ นอกจากนี้ PI3-kinase ยังจะไปกระตุ้น  $PIP_3$  ที่เยื่อหุ้มเซลล์ แล้วไปกระตุ้น protein kinase B (Akt) และ atypical protein kinase C (aPKC) ต่อ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ยังไปเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ CAP-Cbl pathway ส่งผลให้ GTP เติมหมู่ฟอสเฟตที่บริเวณโปรตีน CrkII, C3G และ TC10 ซึ่งมีผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 2-7 (Brunton *et al.*, 2011)



รูปที่ 2-7 แสดงกลไกการออกฤทธิ์ของอินซูลิน (Brunton *et al.*, 2011)

### การควบคุมการแสดงออกของยีนอินซูลินในเบต้าเซลล์ของตับอ่อน

การสร้างและหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อนเป็นสิ่งสำคัญในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในภาวะปกติ โดยการสร้างและหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับ การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลในเลือด การสังเคราะห์ของอินซูลินจะถูกควบคุมโดยระดับน้ำตาลในเลือดและมี transcription factors ที่จำเพาะและตอบสนองต่อกลูโคสในส่วนโปรโมเตอร์ของยีนอินซูลิน ได้แก่ pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), neurogenic differentiation 1 (NeuroD1) และ V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A (MafA) ซึ่ง transcription factors เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการถอดรหัสของยีนอินซูลินโดยจะทำงานร่วมกัน เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น PDX-1 จะจับกับ A-boxes



NeuroD1 จะจับกับ E-boxes และ MafA จะจับกับ C1 element ซึ่งอยู่บนส่วนโปรโมเตอร์ของ ยีนอินซูลิน ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของยีนอินซูลินซึ่งจะกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนอินซูลินเพิ่มขึ้น (Andrali *et al.*, 2008) แต่เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง การแสดงออกของยีน *PDX-1*, *NeuroD1* และ *MafA* จะลดลงซึ่งจะส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีน *Insulin* และการหลั่งของอินซูลิน นอกจากนี้การลดลงของการแสดงออกของยีน *NeuroD1* และ *MafA* ยังมีความเกี่ยวข้องในการดำเนินโรคเบาหวานด้วย (Harmon *et al.*, 1999; Leibowitz *et al.*, 2001; Melloul *et al.*, 2002; Andrali *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2009)

## 11. ฤทธิ์ของอินซูลิน

เซลล์หรืออวัยวะเป้าหมายที่สำคัญที่อินซูลินไปออกฤทธิ์ (Katzung *et al.*, 2012; ณัฐราช, 2555) ได้แก่

**11.1 เซลล์กล้ามเนื้อ** โดยอินซูลินจะกระตุ้นการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อทาง GLUT4 และ กระตุ้นให้เซลล์กล้ามเนื้อสังเคราะห์โปรตีนและไกลโคเจนสะสมไว้ภายในเซลล์มากขึ้น

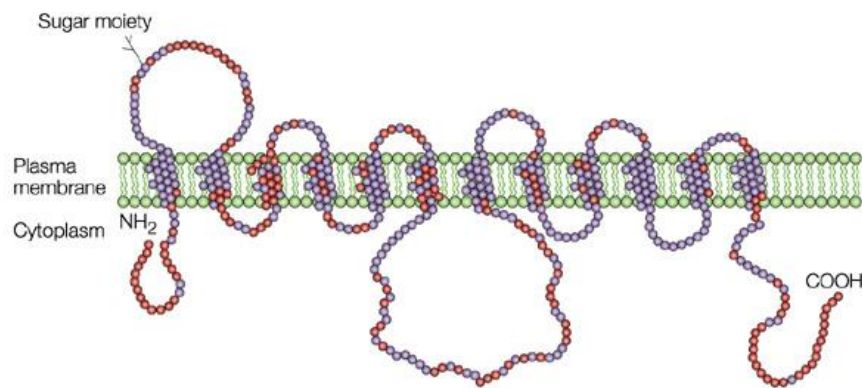
**11.2 เซลล์ไขมัน** โดยอินซูลินจะกระตุ้นการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ไขมันทาง GLUT4, กระตุ้นการสร้างไขมัน (lipogenesis) โดยอินซูลินจะทำให้เซลล์ไขมันเก็บ triglyceride มากขึ้น ด้วยการกระตุ้นเอนไซม์ lipoprotein lipase ในพลาสมา ซึ่งจะทำให้หน้าที่ย่อย lipoprotein เป็น triglyceride มาเก็บไว้ ทำให้ลดปริมาณกรดไขมันในเลือด และยับยั้งการสลายไขมัน (lipolysis) ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ lipase ภายในเซลล์

**11.3 เซลล์ตับ** โดยอินซูลินจะกระตุ้นให้เซลล์ตับเก็บกลูโคส โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็น ไกลโคเจน, ยับยั้งการสร้างกลูโคสที่ตับ โดยลดกระบวนการสร้างกลูโคสจากสารอื่น (gluconeogenesis) และลดกระบวนการสลายไกลโคเจน (glycogenolysis), เพิ่มการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ทาง GLUT2 และเพิ่มการสังเคราะห์ triglyceride

## 12. ตัวขนส่งน้ำตาลกลูโคส (Glucose transporter หรือ GLUT)

การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดขึ้นอยู่กับความสัมพันธ์ระหว่างการสร้างน้ำตาลกลูโคสที่ตับและปล่อยสู่กระแสเลือด และการนำน้ำตาลจากกระแสเลือดไปใช้งานที่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ เนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออินซูลิน (insulin-dependent) ได้แก่ ตับ กล้ามเนื้อ และไขมัน จะนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวขนส่งกลูโคส ซึ่งถูกกระตุ้นด้วยอินซูลิน และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่ไม่ตอบสนองต่ออินซูลิน (insulin-independent) เช่น สมอง เม็ดเลือดแดง ไต เป็นต้น จะมีการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยตัวขนส่งกลูโคสเช่นเดียวกัน

**12.1 ตัวขนส่งน้ำตาลกลูโคส** เป็นโปรตีนตัวพาซึ่งทำหน้าที่ขนส่งกลูโคส โครงสร้างหลักของ GLUT ประกอบด้วย hydrophobic  $\alpha$ -helix จำนวน 12 โดเมน แทรกตัวอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ปลาย NH<sub>2</sub>- และ COOH- อยู่ด้านในเซลล์ และมี loop อยู่ภายในเซลล์ระหว่างโดเมนที่ 6 และ 7 (รูปที่ 2-8) สามารถแบ่งได้เป็น 13 ชนิด โดยมีตำแหน่งของยีน, จำนวน exon และความยาวของยีน GLUT แสดงดังรูปที่ 2-9 ส่วนชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส แสดงในตารางที่ 2-2



รูปที่ 2-8 โครงสร้างหลักตัวขนส่งกลูโคส (GLUT)

(ที่มา: [http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n4/fig\\_tab/nrm782\\_F1.html](http://www.nature.com/nrm/journal/v3/n4/fig_tab/nrm782_F1.html))

Gene	Chromosome Location	Exon No.	Gene length (kb)	Exon distribution	
				■ - coding region	■ - untranslated region
GLUT1	1p35-p31.3	10	33		
GLUT2	3q26-1-q26.2	11	31		
GLUT3	12p13.3	10	17		
GLUT4	17p13	11	6		
GLUT5	1p36.2	12	33		
GLUT6	9q34	10	8		
GLUT7	1p36.22	12	23		
GLUT8	9q33.3	10	11		
GLUT9	4p16-p15.3	12-13	214		
GLUT10	20q13.1	5	27		
GLUT11	22q11.2	10-13	28		
GLUT12	6q23.2	5	65		
HMIT	12q12	10	351		

รูปที่ 2-9 แสดงตำแหน่งยีน, จำนวน exon และความยาวของยีน GLUT

(Zhao and Keating, 2007)

ตารางที่ 2-2 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส (ดัดแปลงมาจาก Wood and Trayhurn, 2003; Zhao and Keating, 2007)

ชนิด	เนื้อเยื่อที่พบ	หน้าที่
GLUT1	เนื้อเยื่อทุกชนิดโดยเฉพาะเม็ดเลือดแดงและสมอง	ขนส่งกลูโคส
GLUT2	เบต้าเซลล์ของตับอ่อน ตับ ไต และลำไส้เล็ก	ควบคุมการหลั่งอินซูลิน และสมดุลของกลูโคส ขนส่งกลูโคสและฟรุคโตส
GLUT3	สมอง และเซลล์ประสาท	ขนส่งกลูโคส
GLUT4	หัวใจ กล้ามเนื้อลาย เนื้อเยื่อไขมัน และสมอง	ขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์ โดยการกระตุ้นของอินซูลิน
GLUT5	ลำไส้เล็ก อัณฑะ และไต	ขนส่งฟรุคโตสและกลูโคส
GLUT6	สมอง ม้าม และเม็ดเลือดขาว	ขนส่งกลูโคส
GLUT7	ลำไส้เล็ก อัณฑะ และลำไส้ใหญ่	ขนส่งฟรุคโตส
GLUT8	อัณฑะ สมอง และ blastocyst	ขนส่งกลูโคส
GLUT9	ตับและไต	-
GLUT10	ตับและตับอ่อน	ขนส่งกลูโคส
GLUT11	หัวใจและกล้ามเนื้อ	ขนส่งกลูโคส
GLUT12	หัวใจ ต่อมลูกหมาก กล้ามเนื้อ ลำไส้ และไขมันสีขาว	-
H <sup>+</sup> /myoinositol transporter (HMIT)	สมอง	ขนส่ง H <sup>+</sup> -myo-inositol

**12.2 ตัวขนส่งน้ำตาลกลูโคส (GLUT) ที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่ออินซูลิน**  
ได้แก่ GLUT2 ซึ่งพบที่ตับและตับอ่อน และ GLUT4 ซึ่งพบที่ไขมันและกล้ามเนื้อ

**12.2.1 GLUT2** เป็นตัวขนส่งกลูโคสแบบสองทิศทาง โดยจะนำกลูโคสเข้าและออกจากเซลล์ขึ้นอยู่กับการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินและกลูคาγον โดยในภาวะอดอาหารระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดลดลงกระตุ้นการหลั่งกลูคาγονจากอัลฟาเซลล์ในตับอ่อนและยับยั้งการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ เพื่อเพิ่มระดับน้ำตาลในเลือด โดยกระตุ้นการสร้างกลูโคสจากสารอื่นและกระตุ้นการสลายไกลโคเจนที่ตับ (gluconeogenesis and glycogenolysis) หลังจากรับประทานอาหารคาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยและดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ทำให้อัตราของกลูโคสใน

เลือดเพิ่มสูงขึ้น กระตุ้นการหลั่งอินซูลินและยับยั้งการหลั่งกลูคากอน อินซูลินลดระดับน้ำตาลในเลือดได้โดยกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ตับ และกระตุ้นเซลล์ตับเก็บกลูโคสในรูปของไกลโคเจน เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด แต่ในผู้ป่วยเบาหวานซึ่งมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง เซลล์ตับจะมีการแสดงออกของ GLUT2 เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ตับจะเก็บกลูโคสที่มีจำนวนมากในกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์ตับมากขึ้น จึงมีการแสดงออกของ GLUT2 ในเซลล์ตับเพิ่มขึ้น (Ahmadi *et al.*, 2015)

**12.2.2 GLUT4** เป็นตัวขนส่งกลูโคสที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมัน มีหน้าที่ขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นของอินซูลิน โดยอินซูลินจะไปกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในของอินซูลิน (insulin signaling) ในกล้ามเนื้อและไขมัน ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ที่อยู่ภายในให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ แต่ในผู้ป่วยเบาหวาน เบต้าเซลล์ของตับอ่อนไม่สามารถหลั่งอินซูลินได้อย่างเพียงพอ ทำให้เกิดความผิดปกติของการส่งสัญญาณอินซูลิน (insulin signalling) ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของ GLUT4 ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์น้อยลง ทำให้ขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลง (Sunil *et al.*, 2012) จากการศึกษาของ Krook และคณะ ในปี 1998 ในระดับโมเลกุลของเซลล์กล้ามเนื้อที่ตัดจากผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าการทำงานของ Akt ลดลง และยังมีรายงานจากการศึกษาจากเซลล์ไขมันของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าระดับของ IRS-1 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ (Roncinone *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาจากเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 พบว่าการทำงานของเอนไซม์ PI3 kinase ลดลง (Bjornholm *et al.*, 1997; Goodyear *et al.*, 1995; Roncinone *et al.*, 1999) เนื่องจากเกิดความผิดปกติของ upstream ของ insulin signaling pathway ซึ่งเกิดขึ้นทั้งที่ IRS-1, PI3 kinase และ Akt ส่งผลให้การทำงานของ GLUT4 ซึ่งพากลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลงไปด้วย

### 12.3 การควบคุมการแสดงออกของยีน GLUT2 และ GLUT4

GLUT2 และ GLUT4 เป็นตัวขนส่งกลูโคสที่มีหน้าที่ขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นของอินซูลิน ซึ่ง GLUT2 พบที่ตับและตับอ่อน ส่วน GLUT4 พบที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมัน การแสดงออกของยีน GLUT2 ถูกควบคุมโดย transcription factors คือ sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), hepatocyte nuclear factors (HNFs) และ CCAAT-enhancer-binding proteins (C/EBPs) ซึ่ง transcription factors เหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการถอดรหัสของยีน GLUT2 โดยจะจับกับส่วนโปรโมเตอร์ของยีน GLUT2 และทำงานร่วมกัน ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของยีน GLUT2 ซึ่งจะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน GLUT2 เพิ่มขึ้น (David-Silva *et al.*, 2013) ส่วนการแสดงออกของยีน GLUT4 ถูกควบคุมโดย transcription factors คือ myocyte enhancer factor 2 (MEF2) และ GLUT4 enhancer factor (GEF) ซึ่งเป็น transcription factors ที่จับกับส่วนโปรโมเตอร์ของยีน GLUT4 และมี

บทบาทสำคัญในการถอดรหัสของยีน GLUT4 โดยจะถูกกระตุ้นด้วย AMP-activated protein kinase ส่งผลให้เกิดการถอดรหัสของยีน GLUT4 ซึ่งจะทำให้เกิดการแสดงออกของยีน GLUT4 เพิ่มขึ้น (Im *et al.*, 2007)

### 13. อาร์เอ็นเอ (Ribonucleic acid; RNA)

อาร์เอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเช่นเดียวกับดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลไรโบสและมีหมู่ไฮดรอกซีที่ตำแหน่ง 2' ของน้ำตาลไรโบส เบสที่แตกต่างจากดีเอ็นเอคืออาร์เอ็นเอมียูราซิล (uracil; U) แทนไทมีน (thymine; T) และอาร์เอ็นเอมีสายโพลีนิวคลีโอไทด์สายเดี่ยว (ตรีทิพย์, 2552)

อาร์เอ็นเอของโปรคาริโอตและยูคาริโอตที่ได้จากกระบวนการถอดรหัส (transcription) สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ

13.1 Messenger RNA (mRNA) ทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ (template) ของยีนซึ่งจะถูกแปลรหัส (translation) ได้ผลผลิตของยีน คือ โปรตีนหรือสายโพลีเปปไทด์ โดยทั่วไปโมเลกุลของ mRNA มีระยะเวลาและคงสภาพอยู่ภายในเซลล์ค่อนข้างสั้น

13.2 Ribosomal RNA (rRNA) เป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซม ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหรือการแปลรหัส

13.3 Transfer RNA (tRNA) เป็นโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการนำกรดอะมิโนมาส่งให้ mRNA ทั้ง rRNA และ tRNA สามารถทำงานได้ทันทีไม่ต้องผ่านกระบวนการแปลรหัสและมีบทบาทสำคัญโดยตรงกับกระบวนการแปลรหัสของ mRNA

การถอดรหัสของยีนเป็นกระบวนการสังเคราะห์ mRNA จากรหัสพันธุกรรมบนดีเอ็นเอ ซึ่ง mRNA มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีน (gene expression) การถอดรหัสของยีนภายในเซลล์หนึ่ง สามารถเปลี่ยนแปลงเพื่อตอบสนองต่อสัญญาณมากมายที่เกิดขึ้นในขณะที่เกิดการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ทางสรีรวิทยาของเซลล์ ซึ่งผลกระทบต่อการถอดรหัสของยีนดังกล่าว จะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ mRNA แต่ละชนิดจากภาวะปกติ (steady-state levels) ดังนั้นการวิเคราะห์ระดับ mRNA ของยีนหนึ่งจึงเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญต่อการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณโปรตีน

หลักการการสกัดอาร์เอ็นเอ สามารถสรุปเป็นขั้นตอนดังนี้ คือ ทำให้เซลล์แตก (cell lysis) ส่งผลให้ได้นิวเคลียสออกมาจากเซลล์ จากนั้นทำให้เยื่อหุ้มนิวเคลียสแตกส่งผลให้ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอละลายออกมาในสารละลาย แล้วทำการสลายดีเอ็นเอ ตกตะกอนอาร์เอ็นเอ และยับยั้งการทำงานของ Rnase

วิธีการสกัด RNA มีหลายวิธี แต่ละวิธีมีความเหมาะสมกับชนิดของเนื้อเยื่อหรือเซลล์ โดยเมื่อได้ RNA มาแล้วจะต้องนำมาสังเคราะห์เป็น cDNA (complementary DNA) โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase การสกัด RNA ให้ได้ปริมาณมากและสมบูรณ์นั้นต้องอาศัย

ความชำนาญของผู้ทำการทดลอง เนื่องจาก RNA จะสลายตัวได้ง่ายและเร็ว ปัญหาที่พบเสมอจากการสกัด RNA คือ ปริมาณของ RNA ที่ได้น้อยและไม่เพียงพอกับปริมาณที่ต้องการใช้ นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในการสกัด RNA ควรผ่านกระบวนการทำให้ปลอดจาก RNase รวมทั้งควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่ต้องจับอุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการสกัด RNA เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อน RNase จากผิวหนังได้

การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอภายหลังการสกัดมักตรวจสอบด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer ซึ่งสามารถทำให้ทราบความเข้มข้นของอาร์เอ็นเอรวมที่สกัดได้ การตรวจสอบคุณภาพของอาร์เอ็นเอทำได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 และ 280 นาโนเมตร ถ้าคำนวณแล้วค่า A260/A280 อยู่ในช่วง 1.7-2.0 แสดงว่าอาร์เอ็นเอที่สกัดได้บริสุทธิ์และมีคุณภาพดี

#### 14. ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR)

ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase chain reaction; PCR) เป็นวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ทางห้องปฏิบัติการที่ทำได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้ในการเพิ่มจำนวนของดีเอ็นเอโดยอาศัยหลักการจำลองตัวของสายดีเอ็นเอ (DNA replication) เลียนแบบกระบวนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่อีกหนึ่งสายจากดีเอ็นเอสายเดิม

ผู้ที่คิดค้นการทำ PCR คือ Kary B. Mullis และคณะ จากบริษัท Cetus Corporation ประเทศสหรัฐอเมริกา ในปี ค.ศ. 1983 และได้รับรางวัลโนเบลในปี ค.ศ. 1993 ซึ่งการทำ PCR เป็นวิธีทางอณูพันธุศาสตร์ทางห้องปฏิบัติการที่สามารถตรวจพบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการได้ แม้จะมีปริมาณน้อย จึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ เช่น นำมาใช้ในการตรวจหาการกลายพันธุ์ การหาลำดับการเรียงตัวของเบส (DNA sequencing) และการศึกษา genetic fingerprints (สุรางค์และคณะ, 2546; ฐเนศ, 2555)

##### 14.1 หลักการทำงานของเทคนิค PCR (ฐเนศ, 2555)

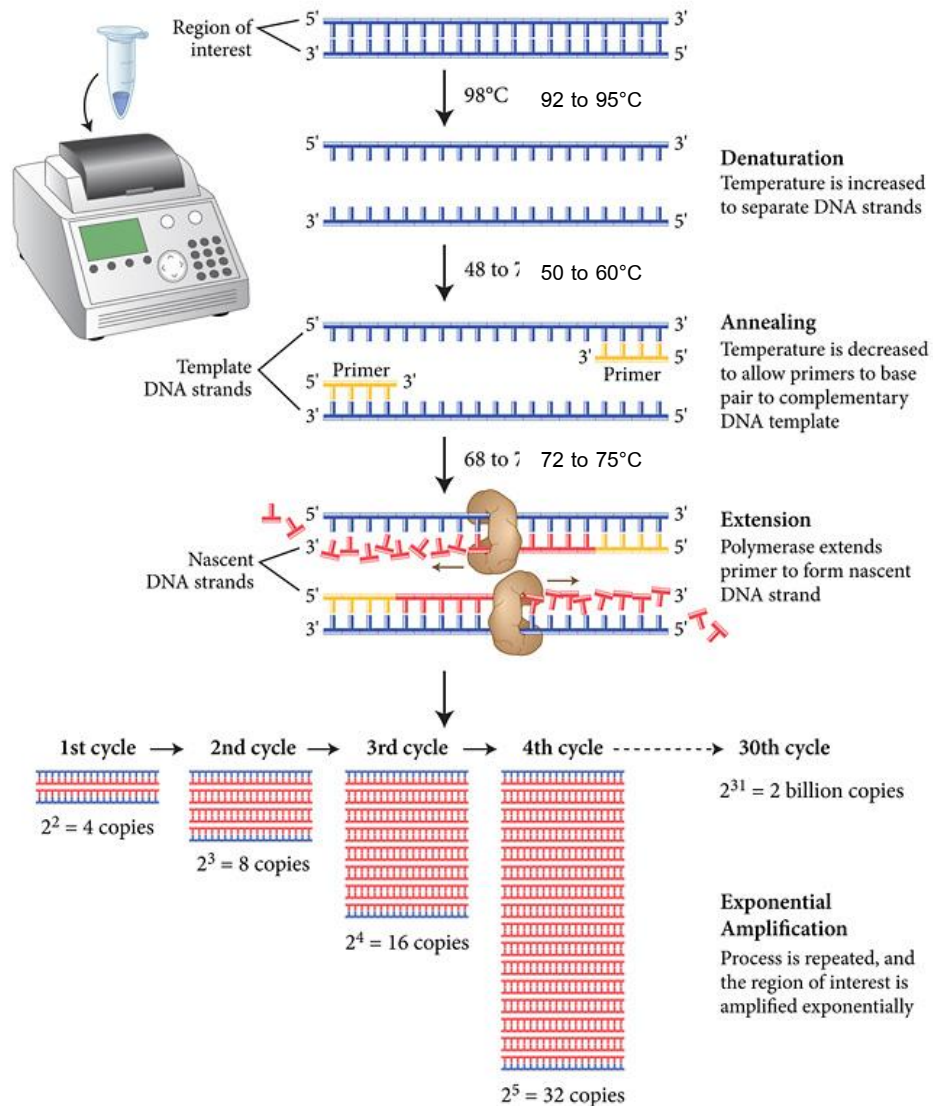
เทคนิค PCR ใช้หลักการพื้นฐานในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยการจำลองดีเอ็นเอสายใหม่จากสายดีเอ็นเอต้นแบบหนึ่งสายด้วยเอนไซม์ DNA polymerase โดยใช้ primer 1 คู่ ทำให้สังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ครั้งละ 2 สายพร้อมกัน ปฏิกริยาที่สำคัญของ PCR ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนและปฏิกริยาจะหมุนเวียนต่อเนื่องกันไปภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของแต่ละขั้นตอน ดังแสดงในรูปที่ 2-10

**ขั้นตอนที่ 1 คือ denaturation** เป็นการแยกสายดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบจากสภาพที่เป็นเส้นคู่ให้เป็นเส้นเดี่ยวโดยใช้อุณหภูมิในช่วง 92-95°C

**ขั้นตอนที่ 2 คือ annealing** เป็นขั้นตอนที่ลดอุณหภูมิจากขั้นตอนการ denaturation ลงมาถึงอุณหภูมิที่ primer จะเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบหรือ melting-temperature ( $T_m$ ) ซึ่งสามารถคำนวณจากลำดับเบสของ primer โดยใช้สูตร  $T_m = 4(G+C)+2(A+T)$  ซึ่งจะได้ค่า  $T_m$  อย่างคร่าว ๆ จากนั้นเปรียบเทียบการทำ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing ที่ต่างกันประมาณ  $2^\circ\text{C}$  หลาย ๆ อุณหภูมิ โดยใช้ค่า  $T_m$  ที่คำนวณได้  $-5^\circ\text{C}$  เป็นอุณหภูมิหลัก การใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปจะทำให้การ annealing ที่ไม่จำเพาะเกิดขึ้นได้มาก แต่ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปจะทำให้การ annealing เกิดขึ้นน้อยหรือไม่เกิดเลย ดังนั้นการเลือกอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งจะทำให้ primer คู่ที่ใส่ลงไปเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบและอุณหภูมิ annealing ที่เหมาะสมยังเป็นตัวกำหนดว่าปฏิกิริยา PCR จะได้ผลหรือไม่ได้ผลและมีความจำเพาะหรือไม่ ซึ่งโดยทั่วไปอุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้จะอยู่ในช่วง  $50-60^\circ\text{C}$

**ขั้นตอนที่ 3 คือ extension** เป็นขั้นตอนการสร้างดีเอ็นเอสายใหม่โดยสังเคราะห์ต่อจากส่วนปลายของ primer ตามลำดับ nucleotide บนดีเอ็นเอต้นแบบแต่ละสายโดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ *Taq DNA polymerase* ซึ่งเอนไซม์นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ  $72-75^\circ\text{C}$  โดยเอนไซม์จะนำเอา deoxyribonucleotides มาต่อกับ primer ทางด้านปลาย 3' ให้อาวอกไปในทิศทาง 5' ไป 3' ด้วยการสร้างพันธะ phosphodiester bond

จากขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 จะนับเป็นจำนวน 1 รอบที่ให้ผลผลิตเป็นดีเอ็นเอสายคู่ที่มีลำดับ nucleotide เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า และเมื่อทำให้เกิดปฏิกิริยา ลูกโซ่จากขั้นตอนที่ 1 ถึง 3 หมุนเวียนต่อเนื่องกันไปอีกหลาย ๆ รอบ จะทำให้ได้ปริมาณดีเอ็นเอจำนวนมากเป็นแบบ exponential คือเป็น 2 เท่าในแต่ละรอบ ซึ่งแต่ละรอบใช้เวลา 1-3 นาที ถ้าใช้เวลา 45 นาที ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มเป็นล้านเท่า ดังนั้นถึงแม้ว่าตัวอย่างที่นำมาศึกษาจะมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมาก ก็สามารถใช้เทคนิค PCR เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอได้หลายเท่าทวีคูณ โดยปริมาณผลผลิต PCR ที่ได้จากการสังเคราะห์จะมีค่าเท่ากับ  $2^n$  ( $n$ =จำนวนรอบของปฏิกิริยา PCR)



**รูปที่ 2-10** แสดงการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์สซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1. การแยกคู่สายดีเอ็นเอต้นแบบออกจากกัน (denaturation) ที่อุณหภูมิ 92-95°C 2. การจับคู่สมระหว่าง primer กับดีเอ็นเอต้นแบบ (annealing) ที่อุณหภูมิ 50-60°C 3. การสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (extension) โดยการนำเบส A, G, T และ C มาต่อ primer จากทิศทาง 5' ไป 3' ที่อุณหภูมิ 72-75°C (ตัดแปลงจาก ที่มา: <https://www.neb.com/products/pcr-polymerases-and-amplification-technologies/master-mixes/master-mixes>)



## 14.2 องค์ประกอบในการทำ PCR (ธเนศ, 2555)

เนื่องจากการทำ PCR เป็นการสร้างสายดีเอ็นเอสายใหม่ในหลอดทดลอง จึงต้องมีสารเคมีและสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา PCR เพื่อใช้ในการนำมาสร้างเป็นดีเอ็นเอสายใหม่ ซึ่งสารเคมีและเครื่องมือที่ต้องใช้ในปฏิกิริยา PCR มีดังนี้

**14.2.1 Deoxyribonucleotides (dNTPs)** ประกอบด้วย dATP, dTTP, dGTP และ dCTP ซึ่งเป็น nucleotide ที่เป็นหน่วยย่อยสำหรับนำไปสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ ถ้าขาดตัวใดตัวหนึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยา ความเข้มข้นของ dNTPs ปกติจะอยู่ระหว่าง 50-200 mM ของแต่ละ dNTPs แต่ถ้าเป็น dNTPs ทั้ง 4 ตัวจะมีส่วนประกอบรวมไม่เกิน 800 mM ถ้าหากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปจะทำให้เกิดการต่อลำดับเบสคู่สมที่ผิดพลาดได้ง่าย

**14.2.2 DNA polymerase** เป็นเอนไซม์สำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอที่ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเชื่อมต่อกับ nucleotide ใหม่เข้ากับ primer โดยเอนไซม์จะช่วยนำ nucleotide อีกรวมเข้ามาจับกับดีเอ็นเอสายเดี่ยว DNA polymerase โดยทั่วไปจะไม่สามารถทนความร้อนสูงในปฏิกิริยาได้ จึงต้องใช้ชนิด *Taq* DNA polymerase ซึ่งเป็นเอนไซม์ DNA polymerase ที่ทนความร้อนได้ดี โดยที่ *Taq* (*Thermus aquaticus*) เป็นแบคทีเรียที่อาศัยและเพิ่มจำนวนอยู่ในบ่อน้ำร้อนได้ ดังนั้น *Taq* DNA polymerase จึงสามารถทำงานได้ที่อุณหภูมิสูง

**14.2.3 Primer** เป็นดีเอ็นเอเริ่มต้นสายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับดีเอ็นเอที่เป็นต้นแบบของการสังเคราะห์ ดังนั้นการทำ PCR จึงต้องทราบลำดับ nucleotide ของดีเอ็นเอต้นแบบที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อใช้เป็นต้นแบบในการสร้าง primer ที่จำเพาะ การออกแบบ primer จะต้องออกแบบ 2 เส้น โดยที่ primer เส้นแรกออกแบบจากบริเวณปลาย 5' ของดีเอ็นเอเป้าหมาย เรียกว่า forward primer จะมีลำดับ nucleotide และทิศทางเหมือนกับดีเอ็นเอต้นแบบ ส่วนอีก primer หนึ่งที่ปลาย 3' ของดีเอ็นเอเป้าหมาย เรียกว่า reverse primer

Primer เป็นตัวกำหนดตำแหน่งของยีนที่เราต้องการจะเพิ่มจำนวนในลำดับของหัวและท้ายของดีเอ็นเอ 2 สายที่แยกออกจากกัน นอกจากนี้ primer ยังเป็นตัวกำหนดความจำเพาะของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ณ ตำแหน่งที่ถูกกำหนดให้มีการสังเคราะห์และกำหนดขนาดของผลผลิต PCR ที่เกิดขึ้น หากมีปริมาณ primer มากเกินไป จะทำให้ primer จับกันเอง เรียกว่า primer dimers ทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่เราไม่ต้องการ

การออกแบบ primer เป็นการออกแบบชิ้น nucleotide สายสั้น ๆ ประมาณ 18-25 bps เพื่อใช้เป็น primer สำหรับปฏิกิริยา PCR ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญมาก การออกแบบ primer โดยทั่วไปจะออกแบบด้วยมือหรือใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์บนอินเทอร์เน็ต ซึ่งจะมีความผิดพลาดน้อยกว่าการออกแบบด้วยมือ สำหรับหลักการการออกแบบ primer ที่ดีนั้นสามารถสรุปได้ดังนี้

- ควรจะออกแบบให้มีลำดับ nucleotide สายสั้น ๆ ไม่เกิน 18-25 nucleotide

- Primer ต้องมีความจำเพาะกับดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงควรเป็นบริเวณ conserve region ของดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา

- ต้องมี GC content ร้อยละ 40-60 และมีส่วนประกอบของ G+C เท่ากัน เพื่อให้ค่า Tm เท่ากันหรือใกล้เคียงกัน และค่า Tm ไม่ควรสูงหรือต่ำเกินไป

- ไม่ควรออกแบบ primer ที่มีลักษณะปลายทั้ง 2 ข้างเป็นเบสคู่สมกัน เพื่อหลีกเลี่ยงการจับกันเองในสาย primer

เมื่อออกแบบ primer ได้แล้วจึงนำลำดับ nucleotide ที่ได้ไปส่งบริษัทที่รับสังเคราะห์ primer และเมื่อได้รับ primer แล้วจะนำมาละลายน้ำหรือบัฟเฟอร์ จากนั้นนำ primer ที่ได้มาทดสอบในปฏิกิริยา PCR โดยใช้ดีเอ็นเอต้นแบบและตรวจสอบผลผลิตของ PCR ด้วยวิธีเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) ถ้า primer ที่ได้มีประสิทธิภาพสูงจะได้ผลผลิต PCR ของยีนนั้นเพียง 1 แถบ

**14.2.4 PCR buffer** เป็นสารละลายที่ควบคุมสภาวะของการทำปฏิกิริยา PCR ให้เหมาะสม เช่น pH เพราะ PCR buffer เป็นสารละลายที่ช่วยให้เกิดความสมดุลของค่า pH และในบัฟเฟอร์จะต้องมี  $Mg^{2+}$  อยู่ด้วย เนื่องจาก  $Mg^{2+}$  จะทำหน้าที่เป็น co-factor ของ DNA polymerase และมีผลต่อการจับของ primer โดย  $Mg^{2+}$  จะไปจับกับดีเอ็นเอซึ่งเป็นประจุลบ ช่วยให้ DNA polymerase สามารถเข้าจับกับดีเอ็นเอต้นแบบง่ายขึ้น โดยทั่วไปจะใช้  $Mg^{2+}$  ความเข้มข้นทั้งหมดเป็น 1.5 mM ความเข้มข้นของ  $Mg^{2+}$  ที่มากเกินไปทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะและพบว่าการปรับค่า  $Mg^{2+}$  ก็ช่วยให้ primer มีการจับกับดีเอ็นเอต้นแบบมีความจำเพาะขึ้นเช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

**14.2.5 ดีเอ็นเอต้นแบบ (template)** เป็นยีนส่วนที่ต้องการเพิ่มปริมาณหรือเป็นตัวอย่างดีเอ็นเอที่ต้องการนำมาตรวจหาดีเอ็นเอจำเพาะ เป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดเพราะเป็นต้นแบบของผลผลิต PCR การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเซลล์ใด ๆ มีหลักการพื้นฐานคือใช้สาร detergent (เช่น SDS) ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์แตก และทำลายเยื่อหุ้มนิวเคลียส เพื่อปลดปล่อยดีเอ็นเอออกมา จากนั้นใส่เอนไซม์ RNase เข้าไปย่อย RNA และแยกโปรตีนออกจากดีเอ็นเอโดยการสกัดด้วย phenol/chloroform ทำการตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย absolute ethanol หรือ isopropanol จะเห็นเป็นเส้นใยสีขาว นำไปปั่นล้างด้วย 80% ethanol ทิ้งให้แห้งแล้วนำดีเอ็นเอไปละลายใน Tris-EDTA (TE) buffer

ถ้าใส่ดีเอ็นเอต้นแบบน้อยเกินไปตามอัตราส่วนผสมอื่นๆ primer จะจับตัวกันเองทำให้เกิดผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะสูง แต่ถ้าดีเอ็นเอต้นแบบมากเกินไปและมากกว่าส่วนผสมอื่น จะทำให้เหลือดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งจะทำให้เกิดผลผลิตที่เราไม่ต้องการหรือทำให้จำนวนรอบที่ primer เกาะนั้นมาสามารถลดสายดีเอ็นเอต้นแบบให้เหลือแต่เฉพาะยีนที่เราต้องการได้ ทำให้มีผลผลิต PCR น้อย

**14.2.6 เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (PCR machine)** คือ เครื่อง thermal cycler เป็นอุปกรณ์ที่จำเป็นในการทำปฏิกิริยา PCR ซึ่งเครื่องนี้สามารถปรับเปลี่ยนอุณหภูมิให้เป็นขั้นตอนตามที่ตั้งไว้และทำงานหมุนเวียนกันหลาย ๆ รอบ ซึ่งระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละขั้นตอนคือ denaturation, annealing และ extension อยู่ในช่วง 15 วินาที ถึง 10 นาที ดังนั้นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR 25-40 รอบ จะใช้เวลาประมาณ 1.5-5 ชั่วโมง

### **14.3 ประโยชน์ของการทำ PCR (สุรางค์ และคณะ, 2546)**

ข้อดีของการทำ PCR สรุปได้ ดังนี้

14.3.1 PCR เป็นวิธีที่มีความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) สูง ดีเอ็นเอต้นแบบจึงไม่จำเป็นต้องมีปริมาณมากหรือมีความบริสุทธิ์มาก ทำให้สามารถนำ PCR มาตรวจหาดีเอ็นเอต้นแบบที่รวมอยู่กับดีเอ็นเออื่น ๆ หรือสารอื่นได้

14.3.2 ความรวดเร็วในการทำ PCR ทำให้สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ในเวลาสั้น ๆ ซึ่งสามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ถึงล้านเท่าโดยใช้เวลาเพียง 1-3 ชั่วโมง

14.3.3 สามารถใช้สังเคราะห์ดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 50 คู่เบส จนไปถึงขนาด 10,000 คู่เบส ทำให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณมากพอที่จะนำไปใช้ในการศึกษาด้านต่าง ๆ ต่อไปนี้โดยตรง

ด้วยความจำเพาะ (specificity) และความไว (sensitivity) ของ PCR จึงได้มีการนำ PCR มาใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์หลายด้าน เช่น การตรวจหาชิ้นส่วนของยีนที่มีความผิดปกติในโรคที่เกิดจากความผิดปกติของยีน หรือตรวจหาเชื้อต่าง ๆ เช่น เชื้อ HIV ซึ่งสามารถรู้ผลได้ภายใน 1 วัน

### **14.4 ข้อจำกัดของการทำ PCR (สุรางค์ และคณะ, 2546)**

ในปัจจุบันการทำ PCR เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายและมีประโยชน์อย่างมากในการศึกษาทางชีววิทยาระดับโมเลกุล อย่างไรก็ตามการทำ PCR ก็ยังมีข้อจำกัดซึ่งสรุปได้ ดังนี้

14.4.1 ต้องทราบลำดับเบสของดีเอ็นเอส่วนปลายหัวท้ายที่ขนาดข้างส่วนที่ต้องการเพิ่มจำนวน เพื่อนำมาออกแบบ primer

14.4.2 ต้องสังเคราะห์ primer ให้เหมาะสมกับความต้องการในการศึกษาแต่ละเรื่อง

14.4.3 อาจเกิดผลบวกปลอม (false positive) เป็นผลทำให้การวิเคราะห์นั้นผิดพลาดได้ เนื่องจาก PCR เป็นวิธีที่มีความไวสูง ถ้ามีการปนเปื้อนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างหรือปฏิกิริยาที่ทำมาก่อนหน้านี้ จะทำให้อ่านผลผิดพลาดเกิดเป็นผลบวกปลอมได้ จึงต้องมี negative control ร่วมด้วยเสมอในการทำ PCR แต่ละครั้ง

14.4.4 อาจเกิดผลลบปลอม (false negative) เพราะสภาวะที่เหมาะสมของ primer annealing แปรตามดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มจำนวนและ primer ที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR แต่ละครั้ง จึงต้องมี positive control ร่วมด้วยเสมอในการทำ PCR แต่ละครั้ง

#### 14.5 การวิเคราะห์ผลผลิตดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR (สุรางค์ และคณะ, 2546; ธเนศ, 2555)

ดีเอ็นเอที่เกิดจากปฏิกิริยา PCR ในหลอดทดลองไม่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เมื่อปฏิกิริยา PCR เสร็จสิ้น ขั้นตอนต่อไปคือการตรวจและวิเคราะห์ผลผลิตจาก PCR (PCR product) โดยการใช้วิธี agarose gel electrophoresis ซึ่งเป็นการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าบนแผ่นวุ้น และย้อมด้วยสารเรืองแสง ethidium bromide ซึ่งสารเรืองแสงนี้จะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างคู่สายดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อนำ agarose gel ที่มี DNA product ไปส่องด้วยแสงเหนือม่วง (ultraviolet; UV) จากเครื่อง ultraviolet transilluminator จะทำให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอในเจลได้ และสามารถบันทึกได้ด้วยการถ่ายภาพ โดยทั่วไปขนาดของผลผลิตจาก PCR จะทราบได้โดยการเปรียบเทียบกับ DNA marker (ดีเอ็นเอที่ทราบขนาด) โดยที่ดีเอ็นเอที่มีขนาดใกล้เคียงกันจะเคลื่อนที่ไปในเจลในระยะทางที่ใกล้เคียงกัน จึงสามารถตรวจสอบได้ว่าผลผลิตจาก PCR ที่ได้มีขนาดตามที่ต้องการหรือไม่

#### 15. การตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (ธเนศ, 2555)

เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (Gel electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารที่มีประจุโดยอาศัยการเคลื่อนที่ของโมเลกุลในสนามแม่เหล็กไฟฟ้า ซึ่งการเคลื่อนที่ของโมเลกุลขึ้นกับประจุและขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกัน ขนาด รูปร่าง ประจุต่อมวลของดีเอ็นเอ ความเข้มข้นของตัวกลางค้ำจุน ความต่างศักย์และกระแสไฟฟ้าที่ใช้ มีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านตัวกลางค้ำจุน โดยดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ช้ากว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ซึ่งระยะทางในการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะแปรผกผันกับจำนวน nucleotide ของดีเอ็นเอ นอกจากนี้ถ้าความเข้มข้นของตัวกลางค้ำจุนสูงจะมีผลทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนตัวได้ช้ากว่าความเข้มข้นของตัวกลางค้ำจุนต่ำ โดยทั่วไปจะใช้ตัวกลางค้ำจุนที่มีความเข้มข้นน้อยในการแยกดีเอ็นเอขนาดใหญ่และใช้ตัวกลางค้ำจุนที่มีความเข้มข้นมากในการแยกดีเอ็นเอขนาดเล็ก ในปัจจุบันตัวกลางค้ำจุนในงานเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสสำหรับดีเอ็นเอที่นิยมใช้ เช่น agarose หรือ acrylamide

บัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสมี 2 ชนิด คือ TAE (Tris-acetate-EDTA) และ TBE (Tris-borate-EDTA) โดยที่ pH 7.5-8.0 TAE buffer มี buffer capacity ต่ำ จึงนิยมใช้ในกรณีที่ต้องการแยกชิ้นดีเอ็นเอออกจากตัวกลางค้ำจุนเพื่อการวิเคราะห์ภายหลัง เนื่องจากดีเอ็นเอที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ ขณะที่ TBE buffer ที่ pH เดียวกัน มี buffer capacity สูงกว่าและมี

boric acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจึงไม่เหมาะกับการแยกดีเอ็นเอออกจากตัวกลางค้ำจุนภายหลัง เนื่องจากมีสารยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ติดไปด้วย

สารที่ใช้ผสมสารละลายดีเอ็นเอก่อนการวิเคราะห์มักใช้สารที่มีโมเลกุลหนัก เช่น 5-10% glycerol, 7% glucose และ 25% Ficoll เพื่อให้สารละลายดีเอ็นเอไม่ฟุ้งกระจายขณะใส่ในช่องเจลและนิยมใช้สีเพื่อติดตามการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ เช่น 0.025% bromophenol blue หรือ xylene cyanol

สารที่นิยมใช้ในการย้อมดีเอ็นเอหลังจากที่วิเคราะห์ด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส คือ ethidium bromide สารนี้จะเข้าไปแทรกอยู่ระหว่าง nucleotide ในสายดีเอ็นเอและเรืองแสงภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต (UV) ซึ่งสามารถมองเห็นเป็นสีส้มแดงเมื่อเปรียบเทียบกับระยะทางที่เคลื่อนที่จากจุดเริ่มต้นของดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบขนาด (standard DNA markers) ก็สามารถบอกขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอหรือผลผลิต PCR นั้น ๆ ได้ แต่เนื่องจาก ethidium bromide เป็นสารก่อมะเร็งจึงควรใส่ถุงมือทุกครั้งที่ใช้ปฏิบัติการ

ปัจจุบันมีสีย้อมที่เป็น fluorescence dye ในการทำให้เห็นภาพแบนของ DNA เช่น SYBR green, SYBR safe, Thiazole Orange และ SYBR gold

## 16. หลักการทำงานของเทคนิค Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

เป็นเทคนิคการเพิ่มปริมาณและตรวจสอบยีนที่สนใจจาก RNA ต้นแบบ สำหรับปฏิกิริยา reverse transcription เป็นการสังเคราะห์ complementary DNA (cDNA) จาก RNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase ที่อุณหภูมิ 50-70°C การเริ่มต้นสังเคราะห์ cDNA จาก mRNA นั้น จะสามารถใช้ primer ได้ 3 แบบ (ชเนศ, 2555) ได้แก่

**16.1 Gene specific primer** เป็น primer ที่จะเข้าไปจับเป็นคู่สมกับ mRNA แล้วต่อลำดับ nucleotide ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase โดยใช้ mRNA เป็นแม่พิมพ์สังเคราะห์ได้ cDNA

**16.2 Oligo (dT) primer** เป็น primer ที่จะเข้าไปจับกับส่วน poly A ที่ปลาย 3' ของ mRNA ทุกๆ โมเลกุล จากนั้นจะสังเคราะห์ cDNA โดยใช้เอนไซม์ reverse transcriptase

**16.3 Random primer** เป็น primer ที่จะเข้าไปจับกับหลาย ๆ ตำแหน่งบน mRNA แบบไม่จำเพาะ จากนั้นสังเคราะห์ cDNA ด้วยเอนไซม์ reverse transcriptase

เมื่อเสร็จขั้นตอน reverse transcription แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้เข้าสู่ปฏิกิริยา PCR หลังจากทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นจะต้องทำการตรวจดูผลโดยนำผลผลิต PCR มาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

สำหรับรูปแบบการทำ RT-PCR สามารถทำได้ 2 รูปแบบ (ธนศ, 2555) ได้แก่

1. การทำ RT-PCR แบบ 2 ขั้นตอน คือ ตอนแรกทำปฏิกิริยา reverse transcription เพื่อสร้าง cDNA ก่อนโดยใช้ oligo (dT) primer หรือ random primer แล้วจึงนำ cDNA ที่ได้ไปทำปฏิกิริยา PCR ในขั้นที่ 2 โดยใช้ specific primer ของยีนที่สนใจ

2. การทำ RT-PCR แบบขั้นตอนเดียว คือ ทำปฏิกิริยา reverse transcription และปฏิกิริยา PCR โดยใส่สารเคมีทุกอย่างลงในหลอดเดียวกันและต้องใช้ specific primer ของยีนที่สนใจเท่านั้น ดังนั้น cDNA ที่ได้จะไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ แต่การทำแบบขั้นตอนเดียวจะมีความรวดเร็วและประหยัดเวลามากกว่าการทำแบบ 2 ขั้นตอน แต่สารเคมีมีราคาแพงกว่า

ประโยชน์ของ RT-PCR คือสามารถบ่งบอกถึงปริมาณการแสดงออกของยีนซึ่งวัดโดยตรงได้จากปริมาณของ mRNA ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่สำคัญต่อการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนหรือปริมาณโปรตีน

## 17. การทดสอบความทนต่อกลูโคสโดยการรับประทาน (Oral glucose tolerance test หรือ OGTT) (Wiwanikit, 2006)

การทดสอบความทนต่อกลูโคส (Glucose tolerance tests หรือ GTTs) เป็นการทดสอบกลไกการควบคุมสมดุลระดับน้ำตาลในเลือดในร่างกายเมื่อได้รับกลูโคสในขนาดสูง ซึ่งวิธีการวินิจฉัยโรคเบาหวานวิธีหนึ่งนอกเหนือจากการวัด fasting blood glucose (FBG) ที่สามารถให้รายละเอียดของควบคุมสมดุลระดับน้ำตาลในเลือดได้มากกว่าการวัด FBG โดยปกติระดับน้ำตาลในเลือดจะเพิ่มขึ้นหลังจากการได้รับกลูโคสในขนาดสูงและลดลงในเวลาต่อมา เนื่องจากตับอ่อนหลั่งอินซูลินออกมาเพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ค่าระดับน้ำตาลในเลือดที่ได้หลังจากการทดสอบ GTTs จะวัดความสามารถของตับอ่อนในการหลั่งอินซูลินหลังได้รับกลูโคส และการตอบสนองของร่างกายต่อการออกฤทธิ์ของอินซูลิน แบ่งออกเป็น 2 การทดสอบ คือ การทดสอบความทนต่อกลูโคสโดยการรับประทานและการฉีดเข้าหลอดเลือดดำ

ในทางคลินิกจะนิยมใช้การทดสอบ OGTT ในการคัดกรองโรคเบาหวานในหญิงตั้งครรภ์ในช่วงสัปดาห์ที่ 24-28 ของการตั้งครรภ์ และใช้คัดกรองโรคเบาหวานในผู้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารผิดปกติ

วิธีการทดสอบ ทำได้โดยผู้ป่วยต้องอดอาหาร 10-16 ชั่วโมง (อย่างน้อย 8 ชั่วโมง) ก่อนตรวจ หลังจากนั้นให้ดื่มสารละลายกลูโคส 75 หรือ 100 กรัม ผสมในน้ำ 250 มิลลิลิตร ภายในเวลา 5 นาที วัดระดับน้ำตาลในเลือดก่อนดื่มสารละลายกลูโคสและที่เวลาทุก 30-60 นาที หลังจากดื่มสารละลายกลูโคสจนครบ 3 ชั่วโมง หรือในเวลา 2 ชั่วโมงถัดมาสำหรับการวินิจฉัยโรคเบาหวาน

การแปลผลระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการทดสอบ OGTT จะขึ้นอยู่กับขนาดของกลูโคสที่ได้รับเข้าไป (ตารางที่ 2-3)

ตารางที่ 2-3 ค่าปกติของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากได้รับกลูโคสในขนาด 75 และ 100 กรัม  
(ตัดแปลงมาจาก Wiwanikit, 2006)

ขนาดของกลูโคสที่ได้รับ	ค่าปกติ (มก./ดล.)
75 กรัม	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ในภาวะอดอาหารมีค่า 60-110 มก./ดล.</li> <li>● 1 ชั่วโมง: น้อยกว่า 200 มก./ดล.</li> <li>● 2 ชั่วโมง: น้อยกว่า 140 มก./ดล.</li> </ul>
100 กรัม	<ul style="list-style-type: none"> <li>● ในภาวะอดอาหารมีค่าน้อยกว่า 95 มก./ดล.</li> <li>● 1 ชั่วโมง: น้อยกว่า 180 มก./ดล.</li> <li>● 2 ชั่วโมง: น้อยกว่า 155 มก./ดล.</li> <li>● 3 ชั่วโมง: น้อยกว่า 140 มก./ดล.</li> </ul>

นอกจากนี้ยังมีการได้รับกลูโคสในขนาด 50 กรัม (50-gram OGTT) แล้ววัดระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 1 ชั่วโมงหลังจากการได้รับกลูโคส โดยผู้ป่วยไม่ต้องอดอาหาร และค่าปกติของน้ำตาลในเลือดที่เวลา 1 ชั่วโมงต้องน้อยกว่า 140 มก./ดล.

สำหรับการแปลผลการทดสอบ OGTT ในการวินิจฉัยโรคเบาหวาน เมื่อได้รับกลูโคสในขนาด 75 กรัม มีดังนี้

1. ค่าปกติ น้อยกว่า 140 มก./ดล. (normal glucose tolerance)
2. ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาที่เวลา 2 ชั่วโมง (2-hr preload glucose หรือ 2-hr PG) อยู่ระหว่าง 140-199 มก./ดล. จะวินิจฉัยว่าผู้ป่วยมีภาวะ impaired glucose tolerance เสี่ยงต่อการเป็นโรคเบาหวานในอนาคต (prediabetes)
3. ผู้ป่วยมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาที่เวลา 2 ชั่วโมง (2-hr preload glucose หรือ 2-hr PG) มากกว่าหรือเท่ากับ 200 มก./ดล. จะวินิจฉัยว่าผู้ป่วยเป็นโรคเบาหวาน

## 18. การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานในสัตว์ทดลอง (*In vivo* animal models of diabetes mellitus)

การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานในสัตว์ทดลองสามารถเหนี่ยวนำได้หลายวิธี เช่น การใช้สารเคมี การผ่าตัด การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม เป็นต้น ซึ่งปัจจุบันการทดลองส่วนใหญ่จะใช้สัตว์ฟันแทะ โดยเฉพาะหนู (murine) เป็นโมเดลในการศึกษาเกี่ยวกับโรคเบาหวาน เนื่องจากสัตว์ฟันแทะสามารถเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนได้ง่ายโดยใช้เทคโนโลยีการดัดแปลง

พันธุกรรม (Frode and Medeiros, 2008) สำหรับการเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเกิดโรคเบาหวาน มี 4 วิธีการ ดังนี้

### 18.1 การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานโดยใช้สารเคมี (Frode and Medeiros, 2008)

สารเคมีที่นิยมใช้ ได้แก่ streptozotocin (STZ) นิยมใช้ประมาณ 69% และ alloxan นิยมใช้ประมาณ 31% โดยสารเคมีทั้ง 2 ตัวนี้สามารถบริหารยาในสัตว์ทดลองได้หลายวิธี ได้แก่ การฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) การฉีดเข้าหลอดเลือดดำ (intravenous injection) หรือฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนัง (subcutaneous injection) และขนาดของสารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง วิธีการบริหารยา และภาวะโภชนาการของสัตว์ การเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานด้วย alloxan และ STZ นั้นจะทำให้เกิดการทำลายเบต้าเซลล์ ส่งผลให้เกิดการหลั่งของอินซูลีนออกมาในกระแสเลือดจำนวนมาก เป็นผลให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำอย่างรุนแรง (severe hypoglycemia) จนทำให้สัตว์ทดลองตายได้ ดังนั้นจึงต้องให้สารละลายกลูโคส (5%) แก่สัตว์ทดลองเป็นเวลา 12-24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันภาวะ severe hypoglycemia

### 18.2 การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานโดยการผ่าตัด (Frode and Medeiros, 2008)

การผ่าตัดเอาตับอ่อนออก (pancreatectomy) เป็นการเหนี่ยวนำเบาหวานในสัตว์ทดลองอีกวิธีหนึ่ง โดยการตัดตับอ่อนออกนั้นอาจจะตัดออกทั้งหมดหรือตัดออกบางส่วน แต่เทคนิคนี้มีข้อจำกัดอยู่หลายอย่าง เช่น ผู้ทำการทดลองต้องมีความชำนาญในการผ่าตัด มีสถานที่ในการผ่าตัดที่เหมาะสม การผ่าตัดใหญ่จะทำให้สัตว์มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อสูง และต้องเสริมด้วยเอนไซม์ของตับอ่อนเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดความผิดปกติของการดูดซึมอาหาร (malabsorption)

### 18.3 การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานโดยพันธุกรรม (Frode and Medeiros, 2008)

สัตว์ทดลองหลายชนิดสามารถเกิดโรคเบาหวานขึ้นเองตามธรรมชาติ โดยพยาธิกำเนิดของโรคเบาหวานอาจเกิดจากระบบภูมิคุ้มกันและพันธุกรรมที่ผิดปกติ ได้แก่ BB (Bio Breeding) rat, NOD (non-obese diabetic) mouse, db/db (diabetes) mouse และ Chinese hamster นอกจากนี้ยังมีการใช้เทคโนโลยีการดัดแปลงพันธุกรรมมาทำให้สามารถเพิ่มหรือลด (knockout) การแสดงออกของยีนที่สนใจได้ง่ายตามต้องการ

### 18.4 การเหนี่ยวนำโรคเบาหวานโดยใช้ไวรัส (Jun and Yoon, 2003)

ไวรัสเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 โดยไวรัสจะก่อให้เกิดกระบวนการออโตอิมมูนชนิด cellular-mediated autoimmunity ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ทำให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลาย ส่งผลให้ร่างกายขาดอินซูลิน นำไปสู่โรคเบาหวานที่มีหรือไม่มีอาการติดเชื้อ สำหรับตัวอย่างเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดเบาหวาน เช่น Kilham rat virus, Encephalomyocarditis virus, Retrovirus, Reovirus, Bovine viral diarrhoea-mucosal disease



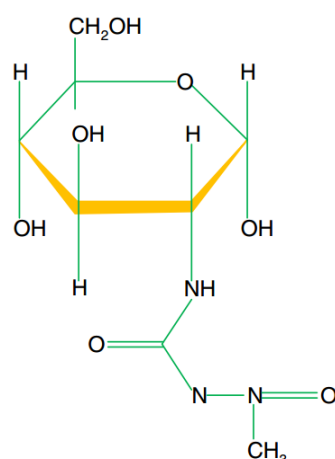
virus, Mumps virus, Rubella virus, Cytomegalovirus, Epstein-Barr virus และ Coxsackie B viruses

## 19. Streptozotocin

Streptozotocin (STZ) เป็นยาปฏิชีวนะที่มีขอบเขตในการออกฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) สังเคราะห์ได้จากเชื้อ *Streptomyces achromogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่พบได้ในดิน และถูกนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 ในสัตว์ทดลอง (Szkudelski, 2001) ขนาดของ STZ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละสายพันธุ์ เช่น หนูขาว (rat) จะใช้ขนาด 50-75 มก./กก. โดยฉีดเข้าทางช่องท้อง, หนูถีบจักร (mouse) จะใช้ขนาด 175-200 มก./กก. โดยฉีดเข้าทางช่องท้องหรือหลอดเลือดดำ และสุนัขจะใช้ขนาด 15 มก./กก. เป็นเวลา 3 วัน นอกจากสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นที่ทำให้การเหนี่ยวนำเบาหวานในสัตว์ต้องใช้น้ำหนักของ STZ ต่างกัน คือ อายุของสัตว์ วิธีการบริหารยา น้ำหนักตัวของสัตว์ และภาวะโภชนาการของสัตว์ (Eleazu, *et al.*, 2013)

### คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

Streptozotocin มีสูตรโครงสร้าง คือ 2-deoxy-2-(3-methyl-3-nitrosourea)-D-glucopyranose (รูปที่ 9) มีสูตรโมเลกุล คือ  $C_8H_{15}N_3O_7$  มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 265 g/mol โครงสร้างของ STZ ประกอบด้วย methylnitrosourea ซึ่งเกาะอยู่ที่ตำแหน่ง  $C_2$  ของ D-glucose มีความสามารถในการละลายในน้ำ คีโตน และแอลกอฮอล์ได้ดี แต่ละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ที่มีขี้ มีลักษณะเป็นผงสีเหลืองอ่อน และมีความเสถียรที่อุณหภูมิต่ำ (Eleazu, *et al.*, 2013)

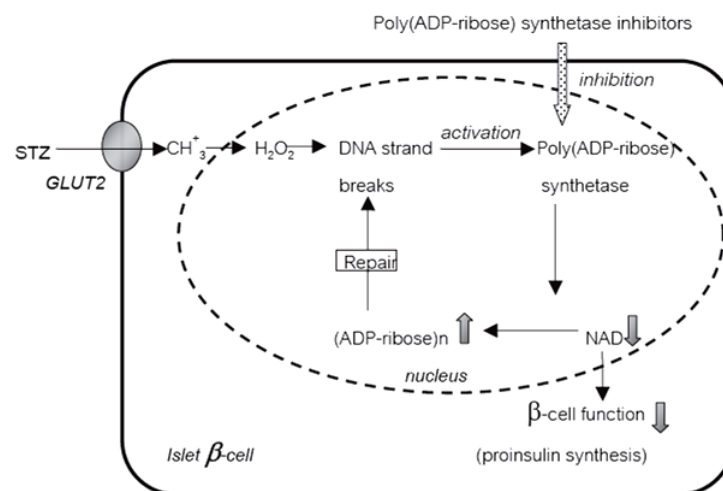


รูปที่ 2-11 สูตรโครงสร้างของ Streptozotocin (Eleazu, *et al.*, 2013)

### กลไกการออกฤทธิ์ของ Streptozotocin

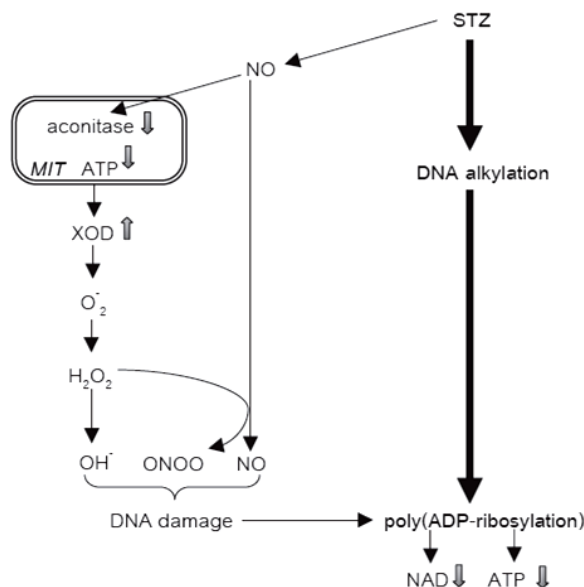
กลไกการออกฤทธิ์ของ STZ ในเบต้าเซลล์ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับอินซูลินและน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดย 2 ชั่วโมงหลังจากที่ฉีด STZ ร่างกายจะเกิดภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงและมีอินซูลินในเลือดต่ำ หลังจากนั้นอีกประมาณ 6 ชั่วโมงต่อมา จะเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำและมีระดับอินซูลินในเลือดสูง และสุดท้ายแล้วระดับน้ำตาลในเลือดก็จะกลับมาสูงและระดับอินซูลินในเลือดลดลงอีกครั้ง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลและอินซูลินในเลือดที่กล่าวมานี้ แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในการทำงานของเบต้าเซลล์ โดย STZ ทำให้เกิด DNA Methylation และการสร้าง nitric oxide (NO) และ reactive oxygen species ส่งผลให้การสังเคราะห์และการหลั่งอินซูลิน (Szkudelski, 2001)

กลุ่มของ methylnitrosourea ในโครงสร้างของ STZ เป็นส่วนที่ออกฤทธิ์ โดย STZ จะเข้าไปในเบต้าเซลล์ของตับอ่อนผ่าน GLUT2 ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วสลายตัวได้เป็น glucose และ methylnitrosourea เกิดการเติมหมู่เมทิล (methyl group) ในสาย DNA โดยเฉพาะในออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของเบส guanine ทำให้สาย DNA เกิดความเสียหาย ซึ่งส่งผลให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนเกิดการ necrosis โดยเมื่อ DNA ได้รับความเสียหายจะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ poly ADP-ribosylation โดยกระตุ้นเอนไซม์ poly (ADP-ribose) synthetase (PARP) ให้ทำงานโดยมี nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) เป็นสารตั้งต้นในการซ่อมแซมสาย DNA (DNA repair) ส่งผลให้ NAD ภายในเบต้าเซลล์ลดลง และทำให้เซลล์มีปริมาณ ATP ลดลงด้วย ซึ่งการกระตุ้นเอนไซม์ PARP การลดลงของ NAD และการลดลงของ ATP นั้นเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อที่เบต้าเซลล์ ทำให้เบต้าเซลล์ทำงานผิดปกติ และทำให้การสังเคราะห์ proinsulin ลดลง (รูปที่ 2-12) จึงส่งผลให้หลังอินซูลินน้อยลงจนเกิดโรคเบาหวาน (Eleazu, *et al.*, 2013)



รูปที่ 2-12 กลไกการออกฤทธิ์ของ Streptozotocin โดยเกิด DNA Methylation (กมลวรรณ, 2546)

นอกจากนี้ STZ ยังทำให้เกิด nitric oxide (NO) ซึ่งมีผลในการทำลายเบต้าเซลล์ได้ โดย NO จะไปยับยั้งการทำงานของ aconitase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการ Kreb's cycle ส่งผลให้การใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรียลดลงและลดการสร้างพลังงาน ATP เมื่อมีการใช้ออกซิเจนที่ไมโทคอนเดรียลดลง ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของ xanthine oxidase (XOD) จึงเกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ได้แก่ superoxide radical ( $O_2^{\cdot-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) และ hydroxyl radical ( $OH^{\cdot}$ ) ตามมา และ NO ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) กลายเป็น peroxynitrite ( $ONOO^{\cdot}$ ) ซึ่งทั้ง NO,  $OH^{\cdot}$  และ  $ONOO^{\cdot}$  จะออกฤทธิ์ทำให้สาย DNA เสียหายได้ โดยเมื่อ DNA เกิดความเสียหาย จะกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ poly ADP-ribosylation ทำให้เบต้าเซลล์ทำงานผิดปกติ และทำให้การสังเคราะห์ proinsulin ลดลง จึงส่งผลให้หลังอินซูลินน้อยลงจนเกิดโรคเบาหวาน (Eleazu, *et al.*, 2013) (รูปที่ 2-13)



รูปที่ 2-13 กลไกการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) โดยการสร้าง NO และ ROS จาก Streptozotocin (กมลวรรณ, 2546)

ระดับความรุนแรงของการเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวาน แบ่งออกเป็น 4 ระดับ โดยใช้ระดับน้ำตาลในเลือดเป็นเกณฑ์ในการแบ่งระดับ (Nakahara *et al.*, 2013) คือ

- |                           |               |
|---------------------------|---------------|
| 1. Normal level           | < 200 มก./ดล. |
| 2. Mild hyperglycemia     | > 200 มก./ดล. |
| 3. Moderate hyperglycemia | > 300 มก./ดล. |
| 4. Severe hyperglycemia   | > 400 มก./ดล. |

## 20. เครื่องตรวจระดับน้ำตาล Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, 2009)

เครื่องตรวจระดับน้ำตาลรุ่น Accu-Chek Performa เป็นเครื่องตรวจหาปริมาณระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งเหมาะสำหรับการตรวจวัดระดับน้ำตาลในเลือดด้วยตัวผู้ป่วยเอง หรือการใช้งานในโรงพยาบาลเพื่อตรวจติดตามระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโดยบุคลากรทางการแพทย์ โดยเครื่องรุ่นนี้ใช้ตรวจตัวอย่างเลือดที่เป็น whole blood เช่น เลือดจากปลายนิ้วหรือจากท้องแขน

เครื่องตรวจระดับน้ำตาลรุ่น Accu-Chek Performa ประกอบด้วย เครื่องรุ่น Accu-Chek Performa พร้อมกับแบตเตอรี่ แแถบตรวจรุ่น Accu-Chek Performa และโค้ดชิพ โดยเครื่องรุ่นนี้จะใช้ร่วมกับแถบตรวจรุ่น Accu-Chek Performa เท่านั้น การใช้แถบตรวจรุ่นอื่นอาจทำให้ผลการตรวจไม่ถูกต้อง

หลักการการทำงานของเครื่อง Accu-Chek Performa ใช้หลักการ biosensor โดยเอนไซม์กลูโคสดีไฮโดรจีเนส (glucose dehydrogenase) ในรูปของโคเอนไซม์ pyrroloquinoline quinone (PQQ) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกเคลือบอยู่บนแถบตรวจ จะเปลี่ยนกลูโคสในเลือดให้เป็นกลูโคโนแลคโตน (gluconolactone) แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลง NAD เป็น end-product คือ NADH ทำให้มีการปล่อยอิเล็กตรอนเกิดขึ้นซึ่งจะถูกจับโดย mediator (potassium ferricyanide) กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณกลูโคสในตัวอย่าง และตรวจวัดได้โดยตัวแปลงสัญญาณ เครื่องจะทำการอ่านค่าและแปลงเป็นค่าระดับน้ำตาลในเลือด



รูปที่ 2-14 เครื่องตรวจระดับน้ำตาลรุ่น Accu-Chek Performa และแถบตรวจรุ่น Accu-Chek Performa (Roche Diagnostics, 2009)

## 21. ตาล

### 21.1 ออนุกรมวิธานของตาล

ชื่อวิทยาศาสตร์ (Scientific name) คือ *Borassus flabellifer* Linn.

ชื่อภาษาอังกฤษ (English name) คือ palmyra palm

ชื่อท้องถิ่น คือ ตาลโตนต ตาลใหญ่ ตาลนา ปลีตาล ทะเนาต์ และโหนด

มีอนุกรมวิธานดังนี้

Kingdom: Plantae

Subkingdom: Tracheobionta

Superdivision: Spermatophyta

Division: Magnoliophyta

Class: Liliopsida

Subclass: Arecidae

Order: Arecales

Family: Arecaceae

Genus: *Borassus*

Species: *flabellifer* L.

(ที่มา: <http://www.thaibiodiversity.org/Life/LifeDetail.aspx?LifeID=50058>)

### 21.2 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของตาล

ตาลเป็นพืชในตระกูลของปาล์ม เป็นต้นไม้สูงประมาณ 30 เมตร เจริญเติบโตในดินทราย ลำต้นตรง เป็นเสี้ยนสีดำแข็ง และมีใบปกคลุมอยู่ยอด ใบมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9-1.5 เมตร มีลักษณะเหมือนพัดและแผ่คล้ายนิ้วมือ มีก้านใบเป็นทางยาว 1-2 เมตร ขอบของทางก้านใบทั้ง 2 ข้างมีหนามคล้ายฟันเลื่อยสีดำที่มีลักษณะแข็งและคม ตาลเป็นพืชดอกที่มีเพศแยกคนละต้น (dioecious plant) คือมีดอกเพศผู้และดอกเพศเมียอยู่คนละต้น ช่อดอกเพศผู้มีขนาดใหญ่ และเป็นแบบ spadix branched ซึ่งมีลักษณะเป็นช่อกลมทรงกระบอกยาวเป็นวง ส่วนช่อดอกเพศเมียเป็นแบบ spadix simple จะมีช่อดอกเป็นปุ่ม ๆ เมื่อดอกกลายเป็นผลจะอยู่รวมกันเป็นทะลาย ผลมีขนาดใหญ่และกลม มีเปลือกเป็นมันสีดำห่อหุ้มใยสีเหลืองไว้ ภายในผลจะมีเมล็ด 1-3 เมล็ด ดอกและผลจะออกระหว่างเดือนธันวาคมถึงสิงหาคม ตาลมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 100 ปี อัตราการเจริญเติบโตประมาณ 3 เซนติเมตรต่อปี มีการกระจายอย่างกว้างขวางในประเทศแถบเอเชียเขตร้อน เช่น ประเทศไทย บังคลาเทศ อินเดีย พม่า ศรีลังกา และมาเลเซีย (Lina *et al.*, 2013; Pramod, 2013)



รูปที่ 2-15 ต้นตาล ผลตาล และโยตาล (Alam, 2012)

### 21.3 องค์ประกอบทางเคมีของโยตาล

องค์ประกอบทางเคมีของโยตาล มีดังนี้ (Ariyasena *et al.*, 2000)

ตารางที่ 2-4 องค์ประกอบทางเคมีที่พบในโยตาล

สารที่พบ	น้ำหนักสด (กรัมต่อกิโลกรัม)
ความชื้น (moisture)	79
โปรตีน (protein)	28
น้ำตาล (sugar)	14
เกลือแร่ (minerals)	43
เพคติน (pectin)	44
เส้นใย (fibers)	3.0
ไขมัน (lipids)	2.0
กรดอะมิโน (amino acids)	3.0
แคโรทีนอยด์ (carotenoids)	0.001-0.01
วิตามินซี (vitamin C)	0.28
สเตอรอยด์ (steroids)	0.15

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Jansz และคณะ ในปี 2002 พบว่าใยตาลประกอบด้วย ความชื้น (moisture) ประมาณ 75-80% มีองค์ประกอบหลักเป็นคาร์โบไฮเดรต และมี ส่วนประกอบทั้งหมด ดังนี้

**21.3.1 กรดอะมิโน กรดไขมัน และสเตอรอล (sterols)** โดยกรดอะมิโนจะ ประกอบด้วย lysine, aspartate, glutamate และ phenylalanine สำหรับกรดไขมันที่พบ ได้แก่ oleate, palmitate และ linolate และยังพบสเตอรอล ได้แก่ stigmasterol ( $24\beta$  Et) และ lanosterol

**21.3.2 คาร์โบไฮเดรต** ส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส นอกจากนี้ยังพบ rhamnose, oligosaccharides, pectin และ glucan

**21.3.3 แคโรทีนอยด์** เป็นสารที่ทำให้เกิดสีในใยตาล ได้แก่  $\beta$ -carotene และพบเป็น สารผสมของสารกลุ่มแคโรทีนอยด์ 4 ชนิด ได้แก่  $\alpha$ -carotene และ  $\beta$ -zeacarotene (โครงสร้าง ของ provitamin A) และ lycopene และ zeta-carotene (non provitamin A)

**21.3.4 Steroidal saponins** สารที่พบเป็นพวก flabelliferins ซึ่งเป็นสารที่ให้ความขม และมีการรายงานว่าเป็นสารที่มีประโยชน์โดยออกฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial effect) ทำให้ใยตาลสามารถมีบทบาทสำคัญในการรักษาโรคได้ในอนาคต

**21.3.5 องค์ประกอบอื่น ๆ ที่พบเพียงเล็กน้อย** ได้แก่ vitamin C และแร่ธาตุต่าง ๆ ได้แก่ โพแทสเซียม (K), โซเดียม (Na), แมกนีเซียม (Mg), แคลเซียม (Ca), เหล็ก (Fe), ซิงค์ (Zn), แมงกานีส (Mn), โครเมียม (Cr), คอปเปอร์ (Cu), นิกเกิล (Ni), โบรอน (B) และตะกั่ว (Pb)

สำหรับองค์ประกอบของใยตาลที่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ คือ flabelliferin-II (F-II) ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม steroidal saponin โดยสาร F-II จะไปยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในลำไส้ ในหนู ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้ (Uluwaduge *et al.*, 2007)

## 21.4 การใช้ตาลในการรักษา (Therapeutic uses) (Pramod, 2013)

**21.4.1 ลำต้น** ใช้เป็นสารกระตุ้นประสาท (stimulants), รักษาโรคเรื้อน (anti-leprotic), ขับปัสสาวะ (diuretic) และต้านการอักเสบ (antiphlogistic)

**21.4.2 ผล** ใช้เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญอาหาร (stomachic), ยาระงับประสาท (sedative), ยาระบาย (laxative), กระตุ้นความต้องการทางเพศ (aphrodisiac), แก้ อาการกระหายน้ำ (hyperdipsia), รักษาภาวะอาหารไม่ย่อย (dyspepsia), ท้องอืด (flatulence), โรคผิวหนัง (skin diseases), ภาวะเลือดออก (hemorrhages), ไข้ (fever) และอ่อนเพลีย (debility)

**21.4.3 ราก** ใช้ต้านการอักเสบ (Anti-inflammatory)

**21.4.4** เถ้าที่ได้จากการเผาไหม้ช่อดอก ใช้เป็นยาลดกรดในกระเพาะอาหาร (antacid), รักษากรดไหลย้อน (heart burn) และม้ามโต (splenomegaly)

## 21.5 การศึกษาฤทธิ์ด้านเภสัชวิทยา (Pharmacological activity)

### 21.5.1 การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด (Hypoglycemic activity)

การศึกษาผลของสารสกัดน้ำและ flabelliferins จากไยตาลต่อการลดน้ำหนักตัวและการดูดซึมกลูโคสในลำไส้ในหนูถีบจักร (ICR mice) พบว่าการให้สารสกัดน้ำจากไยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% ของอาหารทั้งหมด เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับอาหารมาตรฐาน และการให้สกัดน้ำจากไยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% ของอาหารทั้งหมด เป็นเวลา 1 วัน แล้ววัดระดับน้ำตาลในเลือดและในลำไส้ที่เวลา 1.5 ชั่วโมงหลังจากได้รับกลูโคสขนาด 1.5 ก./กก. พบว่าสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และเพิ่มระดับกลูโคสในลำไส้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และทำการสกัดแยก flabelliferins ได้แก่ flabelliferin II (F-II), flabelliferin B (FB), flabelliferin D (FD), flabelliferin E (FE) จากนั้นนำมาป้อนแก่หนูเป็นเวลา 30 นาที ก่อนป้อนกลูโคสขนาด 1.5 ก./กก. พบว่ากลุ่มที่ได้รับ F-II ขนาด 20 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับกลูโคสในลำไส้และอุจจาระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Uluwaduge *et al.*, 2006)

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเมทานอลและ dioscin จากดอกเพศผู้และดอกเพศเมียของตาลในหนูขาวที่ถูกป้อนซูโครส ขนาด 1 ก./กก. พบว่าสารสกัดด้วยเมทานอลจากดอกเพศผู้ ขนาด 250 มก./กก. และ dioscin จากดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย ขนาด 50 มก./กก. สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับกลูโคสในเลือดได้หลังจากการป้อนซูโครสให้หนูขาว (Yoshikawa *et al.*, 2007)

การศึกษาผลของสารสกัดเอทานอลจากไยตาลแห้งต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด พบว่าไยตาลแห้งสามารถยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในลำไส้ในหนูถีบจักรได้จากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ เนื่องจากในไยตาลแห้งมีองค์ประกอบของ flabelliferin-II ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม steroidal saponin สำหรับการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวน 20 คน ซึ่งมีระดับน้ำตาลในเลือดอยู่ระหว่าง 110-200 มก./ดล. โดยให้ผู้ป่วยได้รับกลูโคส ขนาด 1.5 ก./กก. หลังจากนั้นจะทำการงดอาหาร 10 ชั่วโมง แล้ววัด fasting blood glucose (base line) หลังจากนั้น 3 วันให้ผู้ป่วยงดอาหาร 10 ชั่วโมงก่อนได้รับสารสกัดด้วยเอทานอลจากไยตาลแห้ง ขนาด 0.12 ก./กก. เมื่อครบเวลา 30 นาที ให้ทำการดื่มกลูโคส ขนาด 1.5 ก./กก. และหลังจากได้รับกลูโคสไป 1.5 ชั่วโมง ทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า สารสกัดเอทานอลจากไยตาลแห้งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย



ที่  $p < 0.01$  สามารถลดระดับน้ำตาลได้ 15-48% ดังนั้นผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ใยตาลแห้ง มีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (Uluwaduge *et al.*, 2007)

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดของสารสกัดเอทานอลจากช่อดอกตาลหรือวงตาลในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ โดยการให้สารสกัดเอทานอลขนาด 150, 300 และ 600 มก./กก. วันละครั้งทุกวัน เป็นเวลา 28 วัน แล้ววัดระดับน้ำตาลในเลือดในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ภายหลังจากวันที่ 28 ทำการเก็บเลือดเพื่อวัดระดับ total cholesterol, LDL cholesterol, VLDL cholesterol และ HDL cholesterol ซึ่งจากการทดลองพบว่า สารสกัดทุกขนาดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดตั้งแต่วันที่ 7 และลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากให้สารสกัด สำหรับระดับ total cholesterol, LDL cholesterol และ VLDL cholesterol มีการลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนระดับ HDL cholesterol มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งจากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าช่อดอกตาลมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด (Goyal *et al.*, 2013)

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลสารสกัดเอทานอลจากช่อดอกตาลหรือวงตาลในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ โดยการให้สารสกัดขนาด 150, 300 และ 600 มก./กก. พบว่าหนูขาวกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 600 มก./กก. มีการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.01$ ) โดยเฉลี่ยร้อยละ 52.52 หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัด 150 และ 300 มก./กก. มีการลดลงของระดับน้ำตาลในเลือดคิดเป็น 42.34% และ 45.11% ตามลำดับ หลังจากได้รับสารสกัดเป็นเวลา 6 ชั่วโมง (Goyal *et al.*, 2014)

การศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดเอทานอลในส่วนที่ไม่ละลายในอะซิโตนจากช่อดอกตาลหรือวงตาลในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ โดยการให้หนูได้รับสารสกัดเอทานอลจากช่อดอกตาลขนาด 150, 300 และ 600 มก./กก. พบว่าสารสกัดขนาด 600 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูที่เป็นโรคเบาหวานกลุ่มควบคุม ( $p < 0.01$ ) และจากการศึกษาเนื้อเยื่อของตับอ่อนของหนูที่เป็นโรคเบาหวานกลุ่มควบคุมพบว่าเบต้าเซลล์ใน islets of langerhans มีการหดตัวเล็กน้อย ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดพบว่าเบต้าเซลล์มีการฟื้นฟูให้กลับสู่สภาพเดิม และจะเห็นได้ชัดเจนในสารสกัดขนาด 600 มก./กก. (Goyal *et al.*, 2015)

### 21.5.2 การศึกษาฤทธิ์ลดน้ำหนักตัว (Reduction in weight gain)

การศึกษาฤทธิ์ลดน้ำหนักตัวของสารสกัดน้ำตาลจากใยตาลในหนูถีบจักร (ICR mice) พบว่าการให้สารสกัดน้ำตาลจากใยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% ของอาหารทั้งหมดที่ประกอบด้วย flabelliferin II ซึ่งเป็นสารที่ให้รสขมในใยตาลแก่หนูถีบจักร ทำให้น้ำหนักตัวของหนูลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะอาหารมาตรฐาน (WHO standard mice-breeding feed) (Ariyasena *et al.*, 2000)

### 21.5.3 การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสารสกัดน้ำและเอทานอลจากผลตาลในหลอดทดลอง (*in vitro*) ทดสอบด้วยวิธี DPPH (2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) และ ABTS (2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzo-thiazoline-6-sulfonic acid) พบว่าสารสกัดน้ำและเมทานอลจากผลตาล (100-1,000 µg/ml) มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และพบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือซาโปนิน (saponin) (Pramod *et al.*, 2013)

### 21.5.4 การศึกษาฤทธิ์ลดปวดและแก้ไข้ (Analgesic and antipyretic activities)

การศึกษาฤทธิ์ลดปวดและแก้ไข้ของสารสกัดเอทานอลจากดอกตัวผู้ตาลในหนูขาว โดยทดสอบฤทธิ์ลดปวดด้วยวิธี writhing test ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย acetic acid, hot plate test, tail clip test และ formalin test ส่วนฤทธิ์แก้ไข้ทดสอบโดยใช้ยีสต์ (yeast) เหนี่ยวนำให้เกิดไข้ พบว่าเมื่อให้สารสกัดเอทานอลจากดอกตัวผู้ตาลในขนาด 150 และ 300 มก./กก. สามารถลดจำนวนครั้งของการเกิด writhing ด้วย acetic acid เพิ่ม pain threshold ในช่วงเวลา 0-60 นาทีในการทดสอบ hot plate test ยับยั้งการปวดในการทดสอบ tail clip test ในช่วงเวลา 0-15 นาที และ 15-30 นาทีในการทดสอบ formalin test และมีผลลดอุณหภูมิร่างกายในการทดสอบฤทธิ์แก้ไข้โดยใช้ยีสต์เหนี่ยวนำให้เกิดไข้ (Paschapur *et al.*, 2009)

### 21.5.5 การศึกษาฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหาร (Antiulcer activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านแผลในกระเพาะอาหารของสกัดน้ำจากผลตาลในหนูขาว โดยเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยยาแอสไพริน (aspirin pylorus ligation) และเอทานอล (ethanol-induced ulcer) พบว่าการให้สารสกัดน้ำจากผลตาลขนาด 300 มก./กก. มีผลยับยั้งการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้เช่นเดียวกับยา ranitidine ขนาด 20 มก./กก. และพบว่าสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds) ฟลาโวนอยด์ (flavonoid) หรือซาโปนิน (saponin) (Mohite *et al.*, 2012)

### 21.5.6 การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบ (Anti-inflammatory activity)

การศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดเอทานอลจากดอกตัวผู้ตาลในหนูขาวโดยเหนี่ยวนำการอักเสบด้วยวิธีทำให้เกิดการบวมที่อุ้งเท้าเมื่อได้รับสารไนสแตติน (nystatin-induced paw oedema) พบว่าการให้สารสกัดเอทานอลจากดอกตัวผู้ในขนาด 200 และ 400 มก./กก. และยา diclofenac sodium ขนาด 100 มก./กก. ทำให้การอักเสบลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Gummadi *et al.*, 2016)

### 21.5.7 การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxic activity)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Hela cells) ด้วยสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดตาล โดยวิธี MTT assay ในช่วงความเข้มข้น 32-750 µg/ml พบว่าสารสกัดจากเปลือกหุ้มเมล็ดตาลที่ระดับความเข้มข้น ได้แก่ 32, 64, 128, 256, 500 และ 750 µg/ml มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ (% viability) เท่ากับ 87.95, 72.33, 68.22, 67.95, 58.49 และ 49.59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปากมดลูกได้อย่างมีนัยสำคัญ (Duddukuri *et al.*, 2011)

### 21.5.8 การศึกษาความเป็นพิษ (Toxicity study)

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดน้ำจากไยตาลในหนูถีบจักร โดยการให้สารสกัดน้ำจากไยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% และ 50% ของอาหารทั้งหมด เป็นเวลา 7 วัน (short term) และ 30 วัน (long term) เพื่อศึกษาผลต่อการทำงานของตับโดยวัดระดับเอนไซม์ alanine phosphatase (ALT) aspartate transaminase (AST) และ alanine aminotransferase (ALP) ในซีรัม และการทำงานของไตโดยวัดระดับ creatinine ในซีรัม และวัดค่าพารามิเตอร์ในเลือด ได้แก่ ความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ปริมาตรเม็ดเลือดอัดแน่น (packed-cell volume) และจำนวนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง และดูผลต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ที่หัวใจ ปอด ตับ ไต และลำไส้โดยย้อม H&E พบว่าการให้สารสกัดน้ำจากไยตาลเป็นเวลา 7 และ 30 วัน ไม่มีผลต่อการทำงานของตับและไต ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในเลือด และไม่มีผลต่อลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์อวัยวะต่าง ๆ นอกจากนี้ยังทำการสังเกตพฤติกรรมของหนูที่ได้รับสารสกัดเปรียบเทียบกับหนูก่อนควบคุมเพื่อศึกษาความเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity) พบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดน้ำจากไยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% และ 50% ของอาหารทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหรืออาการชัก จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่าการสารสกัดน้ำจากไยตาลจะไม่ทำให้เกิดอาการพิษใด ๆ ในหนูทดลอง (Uluwaduge *et al.*, 2005)

## 22. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากได้รับการบ่อนกลูโคสและซูโครสในหนูขาวปกติ
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin

## 23. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ได้จากกระบวนการศึกษาที่เป็นวิทยาศาสตร์ ในการยืนยันว่า สารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin เพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรตามภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทยในการรักษาโรคเบาหวาน
2. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกในการลดระดับน้ำตาลของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin

## บทที่ 3

### วิธีการศึกษา

#### 1. วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

##### 1.1 ขั้นตอนการเหี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานและการได้รับสารสกัดจากใยตาล

##### 1.1.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- เครื่องแก้ว ได้แก่ กระจกบอทวง ขนาด 10, 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
  - บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
  - กรรไกรผ่าตัด
  - ปากคีบ
  - กระจกฉีดยา ขนาด 1, 3, 5 และ 20 มิลลิลิตร
  - เข็มฉีดยา เบอร์ 18 และ 26
  - ขวด DURAN ขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (SCHOTT, Germany)
  - พาราฟิล์ม
  - ขวดน้ำกลั่น
  - เข็มป้อนสารลงกระเพาะอาหาร (gastric feeding needle)
  - ช้อนตักสาร
  - ถังมือ (บริษัท สยาม เซมเพอร์เมต จำกัด, ประเทศไทย)
  - สำลี
  - ถาดแอสตันเลส
  - เครื่องวัดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดพกพาและแผ่นตรวจ (glucometer and strips) (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics Co, Germany)
  - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Mettler Seven Easy (Mettler Toledo, Switzerland)
  - เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (Scientific industries, USA)
  - เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)
- ##### 1.1.2 สารเคมี
- Citric acid (Loba Chemie, USA)
  - Trisodium citrate (Fisher Chemical, UK)
  - Streptozotocin (Sigma, USA)
  - Glibenclamide (Sigma, USA)

- Gum acacia (Sigma, USA)
- Glucose (Sigma, USA)
- Glipizide (Pfizer, Italy)
- Sucrose (Ajax Finechem, Australia)
- Acarbose (Bayer Thai Co., Ltd., Thailand)
- 70% Ethyl alcohol (Siribuncha Co., LTD., Thailand)

## 1.2 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่าง

### 1.2.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- ชุดผ้าตัด ประกอบด้วย กรรไกรผ้าตัดปลายแหลม กรรไกรผ้าตัดปลายมน ปากคีบปลายตรงแหลม ปากคีบปลายตรงมน คีมจับหลอดเลือดแบบตรง และคีมจับหลอดเลือดแบบโค้ง

- บีกเกอร์ ขนาด 50, 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Labcon North America, USA)
- สำลีและผ้าก๊อซ
- ถาดสแตนเลส

### 1.2.2 สารเคมี

- Pentobarbital sodium (Nembutal<sup>®</sup>, France)

- PBS (phosphate buffered saline) ประกอบด้วย NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> และ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

## 1.3 ขั้นตอนการสกัด RNA

### 1.3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Pipette tips ขนาด 0.1-10 µL, 1-200 µL และ 1000 µL (Labcon North America, USA)

- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Labcon North America, USA)

- Micropipette รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 (Gilson S.A.S., France)

- ถังมือ (บริษัท สยาม เซมเพอร์เมต จำกัด, ประเทศไทย)

- เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (Scientific industries, USA)

- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Wise Spin<sup>®</sup> CF-10 (Daihan Scientific, South Korea)

- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น BioMate 3 (Thermo Electron, USA)

- ตู้แช่  $-80^{\circ}\text{C}$  รุ่น MDF-U74V (บริษัท ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชันส์ จำกัด, ประเทศไทย)

- Homogenizer รุ่น T10 Basic Ultra-Turrax® (IKA, USA)

### 1.3.2 สารเคมี

- ชุด illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit (GE Healthcare, UK) ประกอบด้วย lysis buffer, wash buffer I, wash buffer II, membrane desalting buffer, DNase reaction buffer, DNase I และ RNase-free water

- Ethyl alcohol absolute (VWR International S.A.S., France)

## 1.4 ขั้นตอนการทำ RT-PCR และ agarose gel electrophoresis

### 1.4.1 วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือ

- Pipette tips ขนาด 0.1-10  $\mu\text{L}$ , 1-200  $\mu\text{L}$  และ 1000  $\mu\text{L}$  (Labcon North America, USA)

- Microcentrifuge tubes ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Labcon North America, USA)

- PCR tubes ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Biologix Research Company, USA)

- ขวด DURAN ขนาด 500 และ 1000 mL (SCHOTT, Germany)

- Micropipette รุ่น Pipetman ขนาด P2, P20, P200 และ P1000 (Gilson S.A.S., France)

- ถุงมือ (บริษัท สยาม เซมเพอร์เมต จำกัด, ประเทศไทย)

- เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (Scientific industries, USA)

- เครื่อง MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, USA)

- เครื่อง PowerPac™ Basic และชุด Mini-Sub® Cell GE (Bio-Rad Laboratories, USA)

- เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation) รุ่น Biospectrum® Multispectral Imaging System (UVP, USA)

- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler Toledo, Switzerland)

- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Mettler Seven Easy (Mettler Toledo, Switzerland)

- ไมโครเวฟ รุ่น MS2127CW (บริษัท แอลจี อีเลคทรอนิกส์ จำกัด, ประเทศไทย)

- ตู้แช่  $-20^{\circ}\text{C}$  รุ่น SF-C1497 (GYN) (บริษัท ชันโย คอมเมอร์เชียล โซลูชันส์ จำกัด, ประเทศไทย)

### 1.4.2 สารเคมี

- Primers (forward และ reverse primers) (Integrated DNA Technologies Inc., Thailand)
- ชุด One Step RT-PCR Kit (Biotechrabbit, Germany) ประกอบด้วย One Step mix และ RT-RI Blend
- DNA ladder 100 bp (OneMARK 100) (GeneDireX<sup>®</sup>, Taiwan)
- Novel juice สำหรับทำให้เกิดภาพบน agarose gel (GeneDireX<sup>®</sup>, Taiwan)
- Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) disodium salt dihydrate (C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>Na<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O, MW=372.24) (AMRESCO Inc., USA)
- TRIS (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, MW=121.14) (AMRESCO Inc., USA)
- Glacial acetic acid (CH<sub>3</sub>COOH, MW= 60.05) (Guangdong Guanghua Chemical Factory, China)
- ผงเจล Agarose I<sup>TM</sup> (AMRESCO Inc., USA)

## 2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

ในการวิจัยนี้จะใช้หนูขาว (*Rattus norvegicus*) สายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 230-250 กรัม จากสถานสัตว์ทดลองภาคใต้ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และนำมาเลี้ยงในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส และเปิดแสงสว่างสลับกับความมืดรอบละ 12 ชั่วโมง ให้หนูขาวได้รับน้ำและอาหารตามความต้องการ หนูขาวจะต้องได้รับการพักเพื่อปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ใบรับรองการอนุมัติเลขที่ 34/2555

## 3. การเหนี่ยวนำหนูขาวให้เป็นเบาหวาน

เหนี่ยวนำหนูขาวให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) ขนาด 55 มก./กก. โดยทำละลายใน 0.1 M citrate buffer (pH 4.5) ฉีดเข้าทางช่องท้องเพียงครั้งเดียว (single intraperitoneal injection) หลังจากฉีด STZ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทำการตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด โดยการเช็ดปลายหางด้วยสำลีชุบ 70% ethanol แล้วทำการขลิบปลายหางหนูขาวประมาณ 0.1 มิลลิเมตร จากนั้นนำเลือดมาวัดระดับน้ำตาลกลูโคสด้วย glucometer โดยถ้าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร (FBG > 200 มก./ดล.) แสดงว่าหนูเป็นเบาหวาน สามารถนำมาใช้ในการทดลองต่อไปได้



#### 4. การเตรียมสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก

สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก (palmyra palm fruit fiber water extract; PFWE) ได้จาก ภาควิชาเภสัชเวชและเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งมีวิธีการเตรียมสารสกัดจากใยตาลโดยนำลูกตาลสุกมาแกะเอาเฉพาะใยตาล แล้วนำใยตาลมาล้างทำความสะอาดด้วยน้ำ หลังจากนั้นนำใยตาลที่ได้ไปอบให้แห้งสนิทที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วนำมาหมักด้วยตัวทำละลายต่าง ๆ ที่มีขั้วต่างกัน จากตัวทำละลายที่มีขั้วต่ำสุดไปยังตัวทำละลายที่มีขั้วสูงสุด คือ petroleum ether, ethyl acetate และ ethanol ตามลำดับ และในการสกัดลำดับสุดท้ายจะต้มด้วยน้ำ การสกัดด้วยตัวทำละลายแต่ละชนิดจะหมักเป็นเวลา 3 วัน และทำซ้ำ 3 ครั้ง หลังจากนั้นนำสารสกัดที่ได้มาระเหยแห้งเอาตัวทำละลายออก โดยใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายระบบสุญญากาศ (rotary vacuum evaporator) สำหรับสารสกัดที่ได้จากการต้มด้วยน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 ชั่วโมง นำมาทำให้แห้งโดยวางบนอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นจะนำสารสกัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำมาทดสอบในสัตว์ทดลองต่อไป

#### 5. วิธีดำเนินการทดลอง

5.1 การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ)

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวควบคุมปกติ ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มล./กก.

(normal control group)

กลุ่มที่ 2 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก.

(normal rats+PFWE 1,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 3 หนูขาวควบคุมเบาหวาน ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มล./กก.

(diabetic control group)

กลุ่มที่ 4 หนูขาวเบาหวาน ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 500 มก./กก.

(DM+PFWE 500 mg/kg)

กลุ่มที่ 5 หนูขาวเบาหวาน ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก.

(DM+PFWE 1,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 6 หนูขาวเบาหวาน ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก.

(DM+PFWE 2,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 7 หนูขาวเบาหวาน ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก.

(DM+Glibenclamide 1 mg/kg)

เตรียมสารสกัดจากใยตาลโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย บ้อนสารสกัดให้หนูทดลองทางปากด้วยเข็มสำหรับบ้อนสารลงกระเพาะอาหาร (gastric feeding needle) โดยปริมาตรไม่เกิน 5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม วันละ 1 ครั้ง ที่เวลา 12.00 น. เป็นเวลา 14 วัน ส่วนหนูขาวปกติและหนูขาวที่เป็นเบาหวานควบคุมให้ได้รับน้ำกลั่นแทนสารสกัดจากใยตาลในปริมาตรที่เท่ากัน วัดระดับน้ำตาลในวันที่ 0, 3, 7, 10 และ 14 หลังจากได้รับสารสกัดจากใยตาล หลังจากครบ 14 วันทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับอ่อน ตับ กล้ามเนื้อ และไขมัน เพื่อใช้ในการศึกษาการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ต่อไป

## 5.2 การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด หลังการบ้อนกลูโคสในหนูขาวปกติ (oral glucose tolerance test)

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวควบคุมปกติ ได้รับน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล./กก.

(normal control group)

กลุ่มที่ 2 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 500 มก./กก.

(normal+PFW 500 mg/kg)

กลุ่มที่ 3 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก.

(normal+PFW 1,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 4 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก.

(normal+PFW 2,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 5 หนูขาวปกติ ได้รับยา glipizide ขนาด 10 มก./กก.

(normal+gipizide 10 mg/kg)

หนูทดลองทุกกลุ่มได้รับการบ้อนสารละลายกลูโคส ขนาด 3 ก./กก.เมื่อครบ 30 นาที หลังจากได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา glipizide ทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0 (ก่อนเริ่มทดลอง), 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที (Adisakwattana *et al.*, 2011; de la Garza *et al.*, 2013) หลังจากได้รับการบ้อนกลูโคส ทำการเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลาต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมและคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve) ของระดับน้ำตาลในเลือด โดยใช้กฎสี่เหลี่ยมคางหมู (trapezoidal rule)

### 5.3 การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด หลังจากการป้อนซูโครสในหนูขาวปกติ (oral sucrose tolerance test)

แบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนูขาวควบคุมปกติ ได้รับน้ำกลั่น ปริมาตร 5 มล./กก.

(normal control group)

กลุ่มที่ 2 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก.

(normal+PFW 1,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 3 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก.

(normal+PFW 2,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 4 หนูขาวปกติ ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 3,000 มก./กก.

(normal+PFW 3,000 mg/kg)

กลุ่มที่ 5 หนูขาวปกติ ได้รับยา acarbose ขนาด 50 มก./กก.

(normal+ acarbose 50 mg/kg)

หนูขาวทดลองทุกกลุ่มได้รับการป้อนสารละลายซูโครส ขนาด 3 ก./กก. เมื่อครบ 30 นาทีหลังจากได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา acarbose ทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือด ที่เวลา 0 (ก่อนเริ่มทดลอง), 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที (Adisakwattana *et al.*, 2011; de la Garza *et al.*, 2013) หลังจากได้รับการป้อนซูโครส ทำการเปรียบเทียบระดับน้ำตาลในเลือด ที่เวลาต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมและคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve) ของระดับน้ำตาลในเลือด โดยใช้กฎสี่เหลี่ยมคางหมู (trapezoidal rule)

### 6. การวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด

การตรวจวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดในภาวะอดอาหาร (fasting blood glucose; FBG) โดยอดอาหารหนูขาวเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วทำการเซ็ดปลายหางด้วยสำลีชุบ 70% ethanol จากนั้นขลิบปลายหางหนูขาวประมาณ 0.1 มิลลิเมตร และวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดด้วย glucometer (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics Co, Germany) หลังจากวัดระดับน้ำตาล เซ็ดและหยุดเลือดที่ปลายหางด้วยสำลีแห้ง

## 7. การเก็บตัวอย่าง

เมื่อให้สารสกัดและยาครบตามเวลาที่กำหนด จะทำการสลบสัตว์ทดลองด้วย pentobarbital sodium และทำให้สัตว์ทดลองตายอย่างสงบด้วยวิธีการทำให้กระดูกข้อต่อคอเคลื่อน (cervical dislocation) เมื่อสัตว์ทดลองตายจะทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับอ่อน ตับ กล้ามเนื้อ และไขมัน ล้างทำความสะอาดด้วย PBS แล้วเก็บตัวอย่างใส่ใน microcentrifuge tube ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  เพื่อใช้ในการสกัด RNA ต่อไป

## 8. การศึกษาการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4*

นำเนื้อเยื่อตับอ่อน ตับ ไขมัน และกล้ามเนื้อมาสกัด RNA เพื่อนำไปวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* โดยวิธี reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

### 8.1 การสกัด RNA

การสกัด RNA ของตัวอย่างด้วยชุด illustra™ RNAspin Mini RNA Isolation Kit ซึ่งประกอบด้วย lysis buffer, wash buffer I, wash buffer II, membrane desalting buffer, DNase reaction buffer, DNase I และ RNase-free water มีขั้นตอนการสกัด ดังนี้

1. ชั่งเนื้อเยื่อมา 30 มิลลิกรัม จากนั้นบดเนื้อเยื่อด้วย homogenizer ที่ความเร็วระดับ 5 เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$
2. เติม lysis buffer ปริมาตร 350  $\mu\text{L}$  และ  $\beta$ -mercaptoethanol ปริมาตร 3.5  $\mu\text{L}$  แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที
3. นำตัวอย่างมาใส่ใน RNAspin Mini filter ของชุดสกัด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วทิ้ง filter
4. เติม 70% ethanol ปริมาตร 350  $\mu\text{L}$  แล้วใช้ micropipette ดูดตัวอย่างขึ้นลง 2-3 ครั้ง แล้วผสมให้เข้ากันด้วย vortex mixer 2 ครั้ง ครั้งละ 5 วินาที
5. นำตัวอย่างมาใส่ใน RNAspin Mini column ของชุดสกัด จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที แล้วเทสารใน collection tube ทิ้งและนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม
6. เติม membrane desalting buffer ปริมาตร 350  $\mu\text{L}$  จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารใน collection tube ทิ้งและนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม
7. เติม DNase reaction mixture (เตรียมจาก DNase reaction buffer 90  $\mu\text{L}$  + DNase I 10  $\mu\text{L}$ ) ปริมาตร 95  $\mu\text{L}$  ลงใน column แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที

8. เติม wash buffer I ปริมาตร 200  $\mu$ L ลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารใน collection tube ที่ตั้งและนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม

9. เติม wash buffer II ปริมาตร 600  $\mu$ L ลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที แล้วเทสารใน collection tube ที่ตั้งและนำกลับมาสวมกับ column เหมือนเดิม

10. เติม wash buffer II ปริมาตร 250  $\mu$ L ลงใน column จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที แล้วเทสารใน collection tube ที่ตั้ง

11. นำ column ไปสวมกับ microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL

12. เติม RNase-free water ปริมาตร 50  $\mu$ L แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,500 rpm เป็นเวลา 1 นาที

13. นำตัวอย่าง RNA ปริมาตร 5  $\mu$ L ผสมกับน้ำ ปริมาตร 495  $\mu$ L แล้ววัดความเข้มข้นของตัวอย่าง RNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร

14. เก็บตัวอย่าง RNA ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR

## 8.2 การออกแบบ primer

ทำการออกแบบ primer ที่จะใช้ในการทดลองทั้งในส่วนของ forward และ reverse primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน *Insulin*, *GLUT2*, *GLUT4* และ  $\beta$ -*actin* ซึ่งมีขั้นตอนในการออกแบบ ดังนี้

### 1. ยีน *Insulin*

การออกแบบ primer จะใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> โดยใช้ลำดับ nucleotide ของยีน *Insulin* ใน Genbank (NM\_019129.3) และกำหนดตำแหน่ง nucleotide ให้ครอบคลุมส่วนที่ต้องการ

### 2. ยีน *GLUT2*

ยีน *GLUT2* จะใช้ primer จากงานวิจัยของ David-Silva และคณะ (2013) โดยใช้ลำดับ nucleotide ของยีน *GLUT2* ใน Genbank (NM\_012879.2)

### 3. ยีน *GLUT4*

การออกแบบ primer จะใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ National Center for Biotechnology Information (NCBI) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> โดยใช้ลำดับ nucleotide ของยีน *GLUT4* ใน Genbank (NM\_012751.1) และกำหนดตำแหน่ง nucleotide ให้ครอบคลุมส่วนที่ต้องการ

#### 4. ยีน $\beta$ -actin

ยีน  $\beta$ -actin จะใช้ primer จากงานวิจัยของ Feshani และคณะ (2011) โดยใช้ลำดับ nucleotide ของยีน  $\beta$ -actin ใน Genbank (NM\_031144.3)

จากนั้นนำ primer ที่ได้ไปตรวจสอบค่า melting temperature ( $T_m$ ), self-complementary, %GC content และ nucleotide blast โดยใช้โปรแกรมบนเว็บไซต์ NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> มาตรวจสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบต่อยีน *Insulin*, *GLUT2*, *GLUT4* และ  $\beta$ -actin ซึ่ง primer ที่เหมาะสมและถูกนำไปใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีขนาดและมีลำดับ nucleotide ของ primer ดังนี้

ตารางที่ 3-1 ลำดับ nucleotide ของ primer ของยีน *Ins*, *GLUT2*, *GLUT4* และ  $\beta$ -actin

ยีน	ขนาด (bps)	ลำดับ nucleotide ของ primer
<i>Insulin</i>	167	Forward 5'-CAC-CCA-AGT-CCC-GTC-GTG-3'
		Reverse 5'-CTC-CAG-TTG-GTA-GAG-GGA-GCA-3'
<i>GLUT2</i>	408	Forward 5'-CAT-TGC-TGG-AAG-AAG-CGT-ATC-AG-3'
		Reverse 5'-GAG-ACC-TTC-TGC-TCA-GTC-GAC-G-3'
<i>GLUT4</i>	268	Forward 5'-GAT-CGG-CTC-TGA-AGA-TGG-GG-3'
		Reverse 5'-GGA-GGA-AAT-CAT-GCC-ACC-CA -3'
$\beta$ -actin	227	Forward 5'-AGC-CAT-GTA-CGT-AGC-CAT-CC-3'
		Reverse 5'-TCT-CAG-CTG-TGG-TGG-TGA-AG-3'

### 8.3 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR)

ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *Insulin*, *GLUT2*, *GLUT4* และ  $\beta$ -actin ที่ต้องการด้วยเทคนิค PCR ด้วยชุด Onestep RT-PCR Kit (Biotechrabbit, Germany) โดยเตรียม PCR reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย One Step mix 14.5  $\mu$ L, RT-RI Blend 1.25  $\mu$ L, forward primer 2  $\mu$ L, reverse primer 2  $\mu$ L, RNA template 1  $\mu$ L และ RNase-free water 4.25  $\mu$ L (ตารางที่ 2)

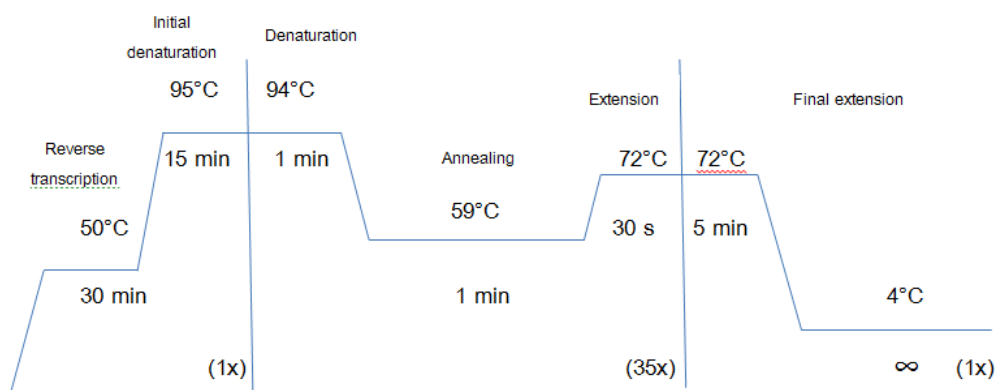
ตารางที่ 3-2 องค์ประกอบและสัดส่วนของ PCR reaction mixture ที่ใช้สำหรับทำ PCR

PCR reaction mixture	ปริมาณ (μL)
One Step mix	14.5
RT-RI Blend	1.25
Primer mixture (forward และ reverse primer)	4
RNA template	1
RNase-free water	4.25
<b>Total</b>	<b>25</b>

จากนั้นนำไปเพิ่มจำนวนด้วยเครื่อง MyCycler™ Thermal Cycler โดย PCR cycle ที่ใช้สำหรับการเพิ่มจำนวนในแต่ละชิ้นส่วนของยีนจะแตกต่างกัน ดังนี้

1. ยีน *Insulin* (รูปที่ 3-1)

- ขั้นตอน reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 59°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ทั้ง 3 ขั้นตอนตั้งจำนวนรอบเป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 4°C ไม่จำกัดเวลา จำนวน 1 รอบ



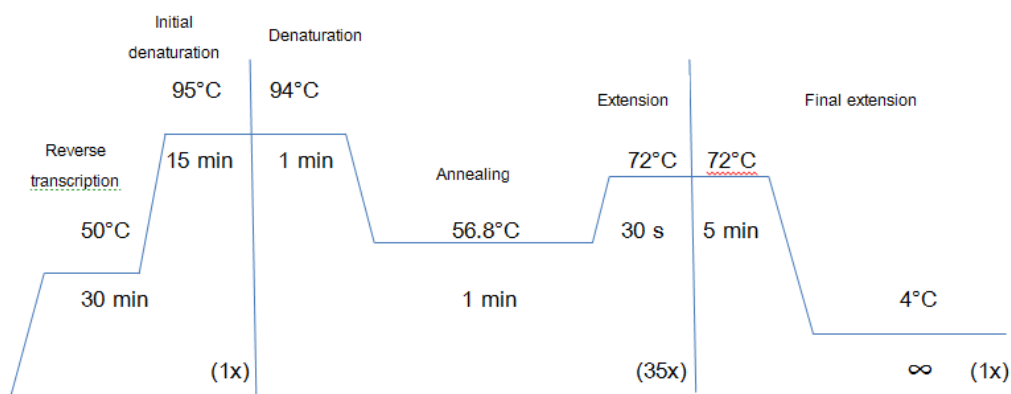
รูปที่ 3-1 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *Insulin*

2. ยีน *GLUT2* (รูปที่ 3-2)

- ขั้นตอน reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ

- ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 56.8°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ทั้ง 3 ขั้นตอนตั้งจำนวนรอบเป็นจำนวน 35 รอบ

- ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 4°C ไม่จำกัดเวลา จำนวน 1 รอบ



รูปที่ 3-2 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน GLUT2

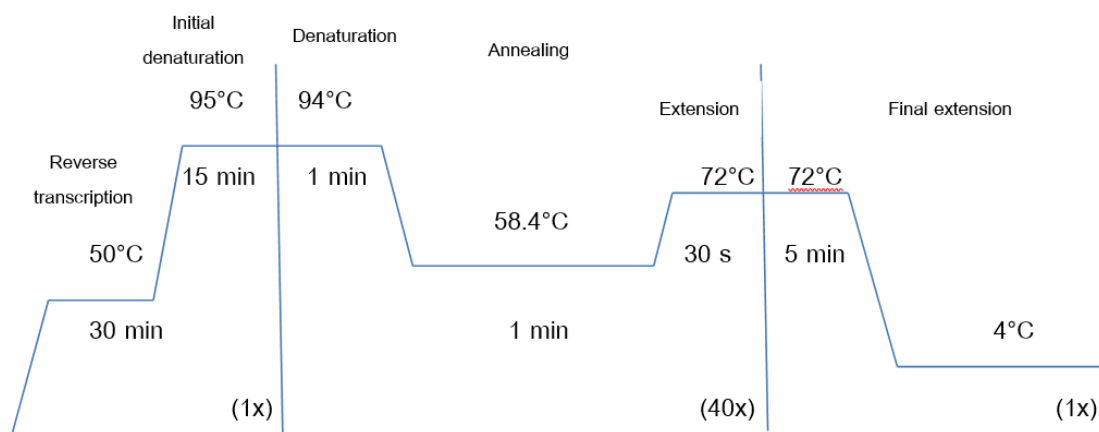
### 3. ยีน GLUT4 (รูปที่ 3-3)

- ขั้นตอน reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ

- ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ

- ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 58.4°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ทั้ง 3 ขั้นตอนตั้งจำนวนรอบเป็นจำนวน 40 รอบ

- ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 4°C ไม่จำกัดเวลา จำนวน 1 รอบ

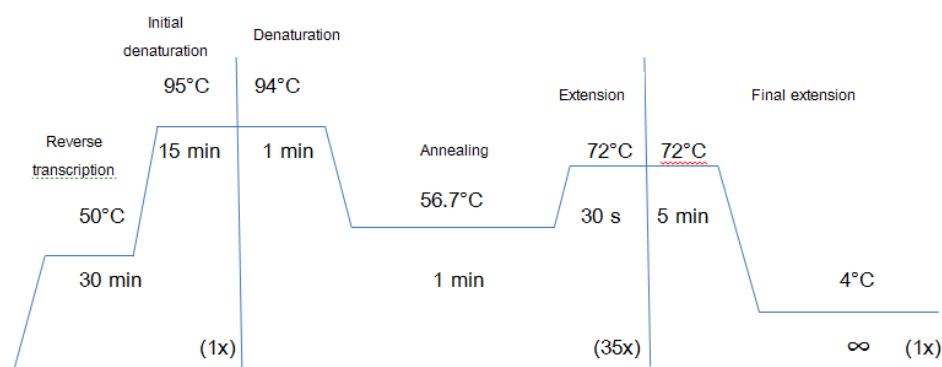


รูปที่ 3-3 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน GLUT4



#### 4. ยีน $\beta$ -actin (รูปที่ 3-4)

- ขั้นตอน reverse transcription ที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 30 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 15 นาที จำนวน 1 รอบ
- ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 1 นาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 56.7°C เป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 30 วินาที ทั้ง 3 ขั้นตอนตั้งจำนวนรอบเป็นจำนวน 35 รอบ
- ขั้นตอน final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 5 นาที และอุณหภูมิ 4°C ไม่จำกัดเวลา จำนวน 1 รอบ



รูปที่ 3-4 PCR cycle ที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน  $\beta$ -actin

จากนั้นนำ PCR product ไปตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

#### 8.4 การตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis

1. เตรียม 1X TAE buffer เพื่อใช้ในการเตรียม 1.5% (w/v) agarose gel และใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ในการทำ gel electrophoresis

2. เตรียม 1.5% (w/v) agarose gel โดยผสมผง agarose gel 1.5 กรัม เข้ากับ 1X TAE buffer 100 ml แล้วนำไปละลายด้วยไมโครเวฟ จากนั้นตั้งทิ้งไว้จนเริ่มเย็นจึงนำมาเทลงใน gel tray ตั้งทิ้งไว้จนเจลแข็งตัวดีแล้วนำไปใส่ใน electrophoresis chamber ที่มี 1X TAE buffer เพื่อเตรียม load ตัวอย่างต่อไป

3. ทำการตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธี agarose gel electrophoresis โดยนำ PCR product 5  $\mu$ l มาผสมกับ novel juice 2  $\mu$ l และเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA ladder 100 bp) จากนั้นนำไป load ลงใน 1.5% (w/v) agarose gel จึงทำการ run gel โดยใช้แรงดันไฟฟ้า 80 โวลต์ และกระแสไฟฟ้า 50 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง 30 นาที

4. นำเจลไปถ่ายรูปโดยใช้เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentation) รุ่น Biospectrum® Multispectral Imaging System จากนั้นนำมาวิเคราะห์ปริมาณความเข้มของ แถบ PCR product โดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ImageJ

#### 9. สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย (mean)  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (standard error of the mean, SEM) และใช้สถิติวิเคราะห์ One-way analysis of variance (One way ANOVA) ในโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS (Version 16.0) เพื่อทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วย post-hoc test: least significance difference (LSD) และเปรียบเทียบข้อมูลก่อนและหลังด้วย student's paired t-test โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$

## บทที่ 4

### ผลการศึกษา

#### 1. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด และน้ำหนักตัวของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ)

##### 1.1 ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ)

การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด โดยเหนี่ยวนำหนูขาวให้เป็นเบาหวานด้วย STZ ในขนาด 55 มก./กก. ฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว หลังจากฉีด STZ ครบ 4 วัน ทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือดและคัดเลือกหนูขาวที่มีระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหาร (fasting blood glucose; FBG) มากกว่า 200 มก./ดล. พิจารณาเป็นหนูขาวเบาหวานและนำมาใช้ในการทดลอง แบ่งหนูขาวทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว (n=5) ประกอบด้วย กลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. หนูขาวทุกกลุ่มได้รับสารสกัดและยา วันละครั้งทุกวัน เป็นเวลา 14 วัน วัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวทดลองทุกกลุ่มก่อนถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ หลังเหนี่ยวนำเบาหวานครบ 4 วัน (วันที่ 1) และหลังจากป้อนสารสกัดครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15) ตามลำดับ

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ แสดงในตารางที่ 4-1 พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูขาวก่อนถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ อยู่ในช่วง  $105.20 \pm 2.40$  ถึง  $124.20 \pm 2.35$  มก./ดล. กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยมีค่าอยู่ในช่วง  $93.80 \pm 4.73$  ถึง  $106.60 \pm 5.46$  มก./ดล. ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

กลุ่มหนูขาวที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด STZ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูขาวทุกกลุ่มหลังจากฉีด STZ มีค่าอยู่ในช่วง  $208.60 \pm 8.05$  ถึง  $366.00 \pm 30.74$  มก./ดล. ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ (ตารางที่ 4-1)

กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าหลังจากได้รับสารสกัดครบ 3 วัน (วันที่ 4) ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ  $136.80 \pm 31.54$ ,  $122.00 \pm 23.87$  และ  $116.40 \pm 22.94$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ( $325.20 \pm 57.79$  มก./ดล.) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรก (% reducton) เท่ากับ 34.01, 44.06 และ 54.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากได้รับสารสกัดครบ 7 วัน (วันที่ 8) ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. มีค่าเท่ากับ  $116.40 \pm 23.92$  มก./ดล. ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ( $217.80 \pm 35.48$  มก./ดล.) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรกเท่ากับ 46.12 เปอร์เซ็นต์ แต่ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 500 และ 2,000 มก./กก. มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน เมื่อครบ 10 วัน (วันที่ 11) หลังจากได้รับสารสกัด พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีค่าเท่ากับ  $105.60 \pm 12.71$ ,  $108.40 \pm 14.54$  และ  $94.80 \pm 4.53$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ( $240.20 \pm 60.88$  มก./ดล.) และคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรกเท่ากับ 49.38, 49.95 และ 62.48 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อครบ 14 วัน (วันที่ 15) หลังจากได้รับสารสกัด พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีค่าเท่ากับ  $228.40 \pm 42.95$ ,  $176.00 \pm 41.53$  และ  $238.60 \pm 44.36$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ( $251.20 \pm 55.60$  มก./ดล.) และเห็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรกในหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 และ 2,000 มก./กก. ซึ่งมีค่าเท่ากับ 19.13 และ 7.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากได้รับยาครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15) มีค่าเท่ากับ  $325.00 \pm 58.73$ ,  $294.60 \pm 32.49$ ,  $228.40 \pm 50.25$  และ  $212.00 \pm 37.61$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน และเห็นเปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรกในวันที่ 11 และ 15 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 18.26 และ 26.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 ผลของสารสกัดชันนำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในภาวะอดอาหาร (FBG) ของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) เป็นเวลา 14 วัน (mean  $\pm$  SEM, n=5)

กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย (มก./ดล.)					
	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
Normal control	111.20 $\pm$ 5.04	88.80 $\pm$ 3.04	117.60 $\pm$ 7.17	101.40 $\pm$ 5.20	99.20 $\pm$ 3.81	89.60 $\pm$ 3.49
Normal rats+PFWE 1,000 mg/kg	124.20 $\pm$ 2.35	103.00 $\pm$ 2.92	106.60 $\pm$ 5.46	106.20 $\pm$ 3.54	93.80 $\pm$ 4.73	96.00 $\pm$ 5.33
Diabetic control	105.20 $\pm$ 3.99	366.00 $\pm$ 30.74 <sup>#</sup>	325.20 $\pm$ 57.79 <sup>#</sup>	217.80 $\pm$ 35.48 <sup>#</sup>	240.20 $\pm$ 60.88 <sup>#</sup>	251.20 $\pm$ 55.60 <sup>#</sup>
DM+PFWE 500 mg/kg	115.20 $\pm$ 4.76	208.60 $\pm$ 8.05	136.80 $\pm$ 31.54*	218.40 $\pm$ 26.85	105.60 $\pm$ 12.71*	228.40 $\pm$ 42.95
% Reduction	-	-	34.01	-5.32	49.38	-8.08
DM+PFWE 1,000 mg/kg	105.20 $\pm$ 2.40	221.60 $\pm$ 11.64	122.00 $\pm$ 23.87*	116.40 $\pm$ 23.92*	108.40 $\pm$ 14.54*	176.00 $\pm$ 41.53
% Reduction	-	-	44.06	46.12	49.95	19.13
DM+PFWE 2,000 mg/kg	105.60 $\pm$ 2.60	264.40 $\pm$ 27.30	116.40 $\pm$ 22.94*	194.40 $\pm$ 36.61	94.80 $\pm$ 4.53*	238.60 $\pm$ 44.36
% Reduction	-	-	54.75	24.76	62.48	7.47
DM+Glibenclamide 1 mg/kg	114.20 $\pm$ 4.57	287.40 $\pm$ 25.22	325.00 $\pm$ 58.73	294.60 $\pm$ 32.49	228.40 $\pm$ 50.25	212.00 $\pm$ 37.61
% Reduction	-	-	-14.97	-3.88	18.26	26.14

แสดงค่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูทดลองทุกกลุ่มก่อนถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ หลังเหนี่ยวนำเบาหวานครบ 4 วัน (วันที่ 1) และหลังจากป้อนสารสกัดครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15), % reduction คือ เปอร์เซ็นต์ของระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงจากวันที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานวันแรก, # คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน, \* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวานที่เวลาเดียวกัน

## 1.2 ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ)

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยเมื่อเทียบกับก่อนฉีด STZ ของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ แสดงในตารางที่ 4-2 และรูปที่ 4-1 พบว่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวเบาหวานทุกกลุ่ม หลังจากฉีด STZ ครบ 4 วัน (วันที่ 1) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวก่อนฉีด STZ นอกจากนี้กลุ่มควบคุมเบาหวานและกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide เป็นเวลา 14 วัน พบว่ามีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ในวันที่ 1, 4, 8, 11 และ 15 หลังจากที่ได้รับยา ลดลงอย่างต่อเนื่องเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของกลุ่มควบคุมเบาหวานที่เวลาเดียวกัน (วันที่ 8 และ 15) ดังแสดงในรูปที่ 4-1

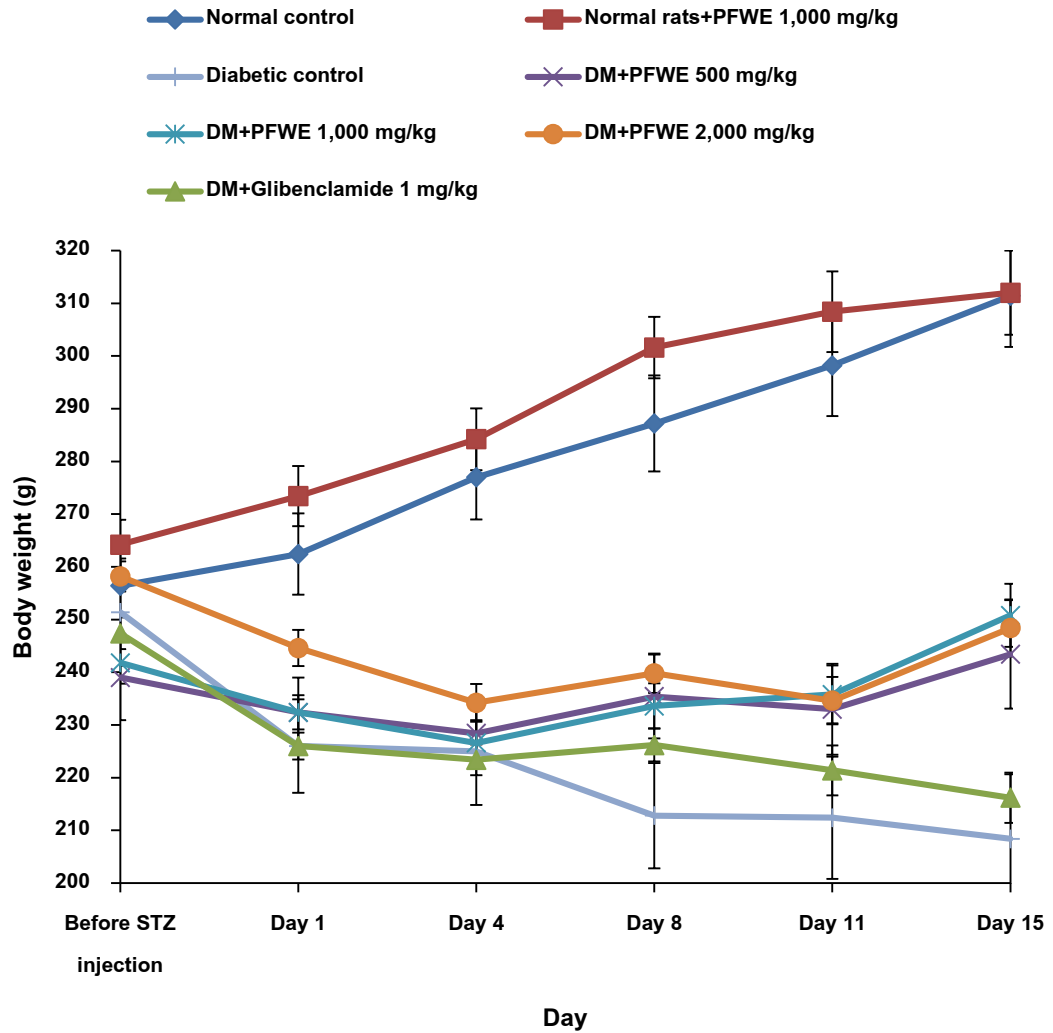
ตารางที่ 4-2 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) เป็นเวลา 14 วัน (mean ± SEM, n=5)

กลุ่มทดลอง	น้ำหนักตัวเฉลี่ย (กรัม)					
	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
Normal control	256.40±9.07	262.40±7.71	277.00±8.04	287.20±9.12	298.20±9.59	311.40±9.71
Normal rats+PFW 1,000 mg/kg	264.20±4.73	273.40±5.71	284.20±5.83	301.60±5.82	308.40±7.66	312.00±7.98
Diabetic control	251.40±10.15	226.00±8.85*	225.00±10.18*	212.80±10.00*	212.40±11.62*	208.40±12.25*
DM+PFW 500 mg/kg	239.00±8.10	232.40±6.62	228.40±6.31	235.40±7.95 <sup>#</sup>	233.00±8.62	243.40±10.29 <sup>#</sup>
DM+PFW 1,000 mg/kg	241.80±3.94	232.40±3.23	226.60±4.34	233.60±4.28 <sup>#</sup>	235.80±5.51 <sup>#</sup>	250.80±5.96 <sup>#</sup>
DM+PFW 2,000 mg/kg	258.20±2.85	244.60±3.41	234.20±3.60	239.80±3.73 <sup>#</sup>	234.60±4.49	248.40±5.39 <sup>#</sup>
DM+Glibenclamide 1 mg/kg	247.40±3.03	226.00±2.55	223.40±2.93	226.20±3.14	221.40±4.74	216.20±4.76

แสดงค่าน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทดลองทุกกลุ่มก่อนถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ หลังเหนี่ยวนำเบาหวานครบ 4 วัน (วันที่ 1) และหลังจากป้อนสารสกัดครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15)

# คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมเบาหวานที่เวลาเดียวกัน

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวเฉลี่ยก่อนฉีด STZ



รูปที่ 4-1 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อน้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูขาวปกติและหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin (STZ) เป็นเวลา 14 วัน (mean  $\pm$  SEM, n=5)



## 2. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ (oral glucose tolerance test)

การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวปกติ โดยวัดระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารที่เวลา 0 (ก่อนเริ่มทดลอง) หลังจากนั้นป้อนสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. และยา glipizide ขนาด 10 มก./กก. ให้กับหนูขาวปกติ เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนการป้อนสารละลายกลูโคส ขนาด 3 ก./กก. และวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที หลังจากได้รับสารละลายกลูโคส

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติแสดงในตารางที่ 4-3 และรูปที่ 4-2 พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยที่เวลา 0 ของหนูขาวปกติทุกกลุ่ม มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $86.38 \pm 5.75$  ถึง  $131.38 \pm 3.44$  มก./ดล. หลังการป้อนสารละลายกลูโคสให้กลุ่มควบคุมปกติ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที มีค่าเท่ากับ  $165.88 \pm 16.53$ ,  $173.50 \pm 14.44$ ,  $159.00 \pm 9.44$ ,  $133.13 \pm 5.03$  และ  $94.88 \pm 10.35$  มก./ดล. ตามลำดับ หลังการป้อนสารละลายกลูโคสให้กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน ซึ่งระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500 มก./กก. เท่ากับ  $168.25 \pm 4.47$ ,  $182.25 \pm 6.75$ ,  $162.75 \pm 5.69$ ,  $133.75 \pm 4.44$  และ  $102 \pm 2.08$  มก./ดล. ตามลำดับ ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. เท่ากับ  $163.63 \pm 4.44$ ,  $169.13 \pm 4.10$ ,  $153.63 \pm 7.50$ ,  $127.13 \pm 5.73$  และ  $96.25 \pm 3.10$  มก./ดล. ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก. เท่ากับ  $171.88 \pm 6.00$ ,  $172.88 \pm 5.74$ ,  $161.00 \pm 7.01$ ,  $145.63 \pm 6.92$  และ  $111.50 \pm 5.01$  มก./ดล. ตามลำดับ

ส่วนระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาทีของหนูขาวปกติที่ได้รับยา glipizide ขนาด 10 มก./กก. เท่ากับ  $102.13 \pm 5.04$ ,  $102.38 \pm 5.01$ ,  $84.25 \pm 2.36$ ,  $62.25 \pm 3.59$  และ  $49.50 \pm 2.73$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสทุกช่วงเวลา ตั้งแต่ 30-180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000

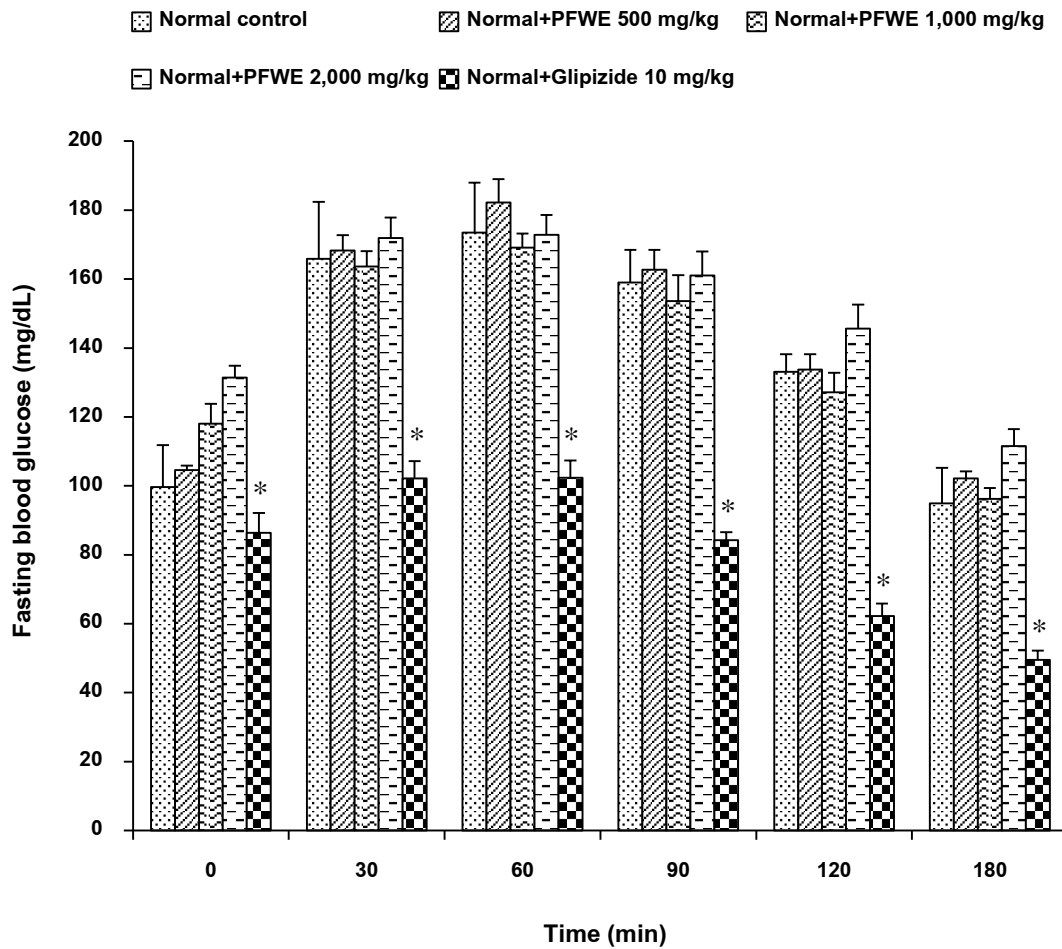
มก./กก. ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการบ่อนสารละลาย กลูโคสในหนูขาวปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

เมื่อคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที ของหนูทดลองทุกกลุ่ม แสดงในตารางที่ 4-3 และรูปที่ 4-3 พบว่าค่า AUC ของกลุ่มควบคุมปกติมีค่า เท่ากับ  $25,282.50 \pm 520.24$  มก./นาที่/ดล. และหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้น น้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีค่า AUC เท่ากับ  $26,049.38 \pm 296.81$ ,  $24,969.38 \pm 561.58$  และ  $27,041.25 \pm 730.77$  มก./นาที่/ดล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่าง นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ แต่กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับยา glipizide ขนาด 10 มก./กก. มีค่า AUC ( $14,244.38 \pm 412.63$  มก./นาที่/ดล.) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

ตารางที่ 4-3 ผลของสารสกัดชิ้นน้ำจากไยตาลสุกและยา glipizide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที (mean ± SEM, n=8)

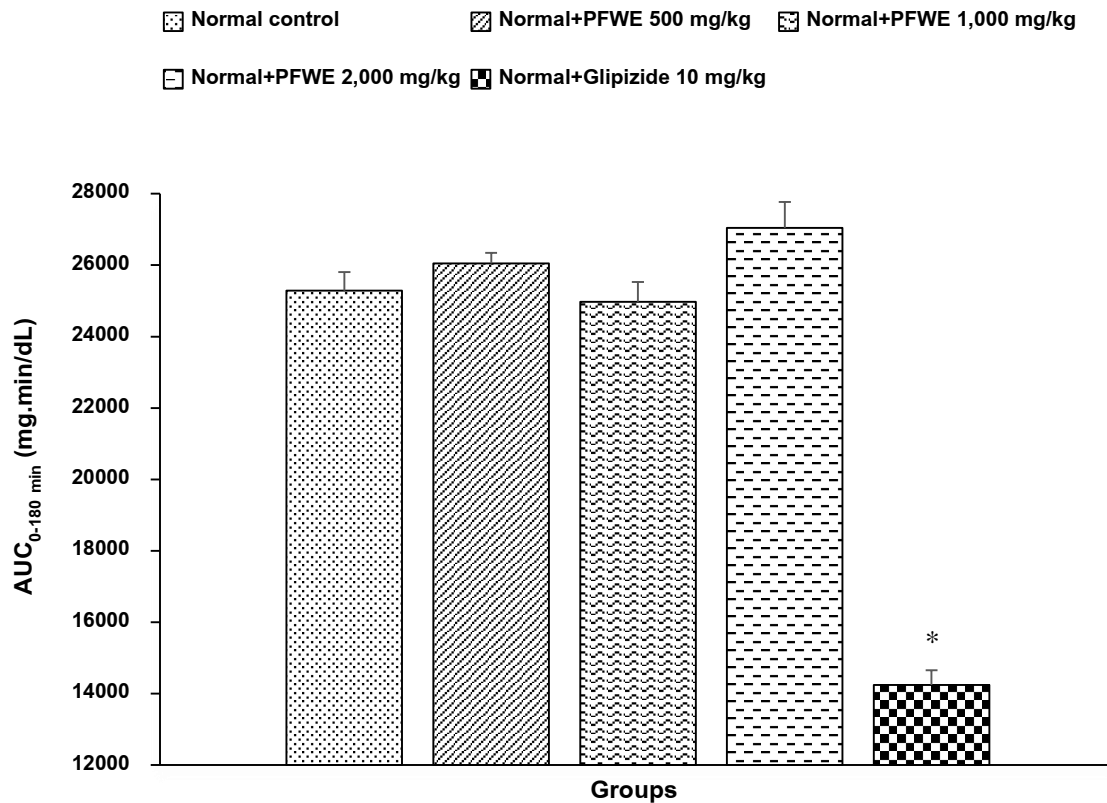
กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย (มก./ดล.)						AUC <sub>0-180</sub> นาที (มก./นาที/ดล.)
	เวลา (นาที)						
	0	30	60	90	120	180	
Normal control	99.63±12.21	165.88±16.53	173.50±14.44	159.00±9.44	133.13±5.03	94.88±10.35	25,282.50±520.24
Normal+PFWE 500 mg/kg	104.63±1.22	168.25±4.47	182.25±6.75	162.75±5.69	133.75±4.44	102.13±2.08	26,049.38±296.81
Normal+PFWE 1,000 mg/kg	118.00±5.82	163.63±4.44	169.13±4.10	153.63±7.50	127.13±5.73	96.25±3.10	24,969.38±561.58
Normal+PFWE 2,000 mg/kg	131.38±3.44	171.88±6.00	172.88±5.74	161.00±7.01	145.63±6.92	111.50±5.01	27,041.25±730.77
Normal+Glipizide 10 mg/kg	86.38±5.75	102.13±5.04*	102.38±5.01*	84.25±2.36*	62.25±3.59*	49.50±2.73*	14,244.38±412.63*

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน



รูปที่ 4-2 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glipizide ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย หลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ (mean  $\pm$  SEM, n=8)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลาเดียวกัน



รูปที่ 4-3 ผลของสารสกัดชันน้ำจากโอยตาลสุกและยา glipizide ต่อพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที ในหนูขาวปกติหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคส (mean  $\pm$  SEM, n=8)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

### 3. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ (oral sucrose tolerance test)

การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวปกติ โดยวัดระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารที่เวลา 0 (ก่อนเริ่มทดลอง) หลังจากนั้นป้อนสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. และยา acarbose ขนาด 50 มก./กก. ให้กับหนูขาวปกติ เป็นระยะเวลา 30 นาที ก่อนการป้อนสารละลายซูโครส ขนาด 3 ก./กก. และวัดระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที หลังจากได้รับสารละลายซูโครส

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนซูโครสในหนูขาวปกติแสดงในตารางที่ 4-3 และรูปที่ 4-2 พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยที่เวลา 0 ของหนูขาวปกติทุกกลุ่ม มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง  $104.17 \pm 4.34$  ถึง  $130.33 \pm 1.98$  มก./ดล. หลังการป้อนสารละลายซูโครสให้กลุ่มควบคุมปกติ พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที มีค่าเท่ากับ  $165.33 \pm 3.97$ ,  $136.83 \pm 3.33$ ,  $122.33 \pm 3.14$ ,  $118.33 \pm 2.73$  และ  $120.17 \pm 3.80$  มก./ดล. ตามลำดับ หลังการป้อนสารละลายซูโครสให้กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสเวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน ซึ่งระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. เท่ากับ  $156.33 \pm 5.47$ ,  $129.50 \pm 7.11$ ,  $131.50 \pm 4.79$ ,  $122.17 \pm 6.22$  และ  $117.00 \pm 1.65$  มก./ดล. ตามลำดับ ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก. เท่ากับ  $154.00 \pm 3.94$ ,  $127.00 \pm 7.07$ ,  $124.83 \pm 6.39$ ,  $128.83 \pm 5.63$  และ  $128.83 \pm 3.59$  มก./ดล. ตามลำดับ และระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ของหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 3,000 มก./กก. เท่ากับ  $160.00 \pm 8.35$ ,  $139.50 \pm 6.90$ ,  $130.33 \pm 1.43$ ,  $119.83 \pm 3.06$  และ  $119.83 \pm 4.43$  มก./ดล. ตามลำดับ

ส่วนระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาทีของหนูขาวปกติที่ได้รับยา acarbose ขนาด 50 มก./กก. เท่ากับ  $111.33 \pm 3.90$ ,  $110.17 \pm 4.59$ ,  $103.33 \pm 3.77$ ,  $107.00 \pm 4.19$  และ  $102.00 \pm 2.08$  มก./ดล. ตามลำดับ ซึ่งลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสทุกช่วงเวลา ตั้งแต่ 30-180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000

มก./กก. ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการบ่อนสารละลายซูโครส ในหนูขาวปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

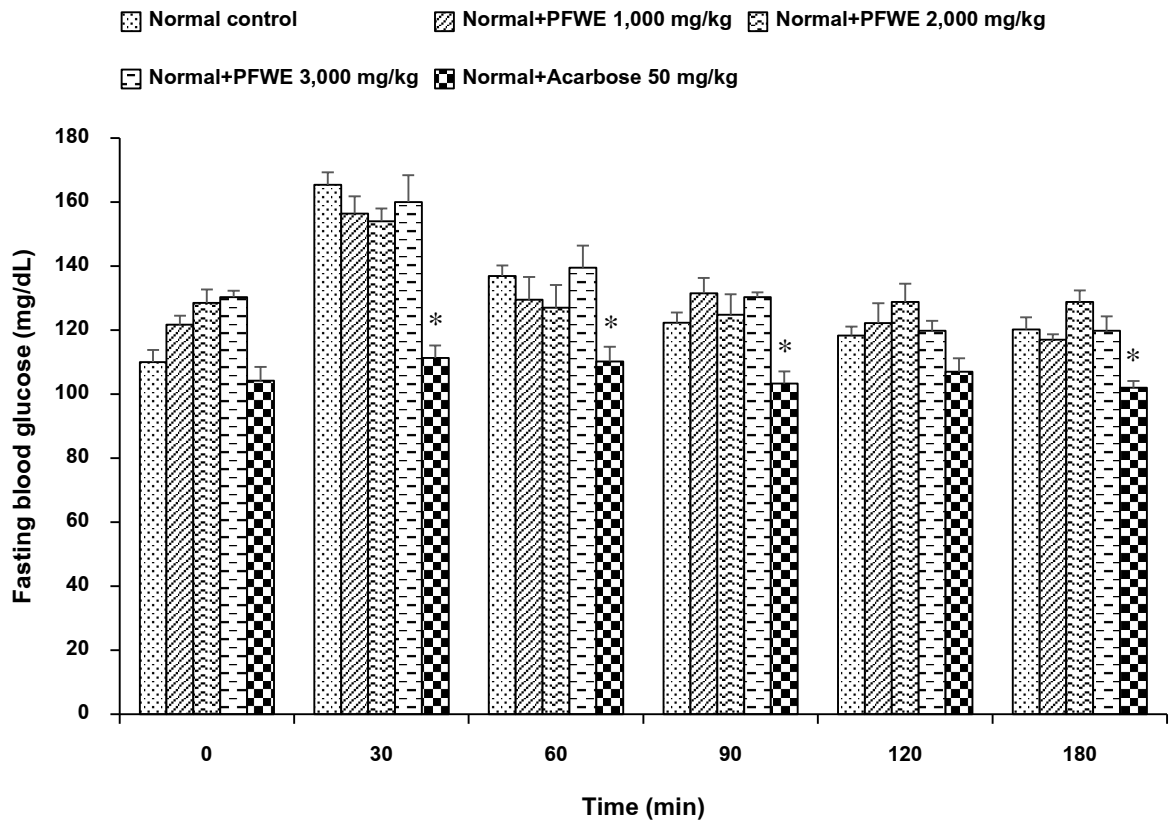
เมื่อคำนวณพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดในช่วงเวลา 0-180 นาที ของหนูทดลองทุกกลุ่ม แสดงในตารางที่ 4-3 และรูปที่ 4-3 พบว่าค่า AUC ของกลุ่มควบคุม ปกติ มีค่าเท่ากับ  $19,737.50 \pm 208.65$  มก./นาที/ดล. และหนูขาวปกติที่ได้รับสารสกัดชันน้ำจาก ไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. มีค่า AUC เท่ากับ  $19,765.00 \pm 598.98$ ,  $19,900.00 \pm 402.32$  และ  $20,242.50 \pm 271.85$  มก./นาที/ดล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ กลุ่มหนูขาวปกติที่ได้รับยา acarbose ขนาด 50 มก./กก. มีค่า AUC ( $16,047.50 \pm 481.85$  มก./นาที/ดล.) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติ

ตารางที่ 4-4 ผลของสารสกัดขึ้นน้ำจากไยตาลสุกและยา acarbose ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติและพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที (mean ± SEM, n=6)

กลุ่มทดลอง	ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย (มก./ดล.)						AUC <sub>0-180</sub> นาที (มก./นาที/ดล.)
	เวลา (นาที)						
	0	30	60	90	120	180	
Normal control	110.00±3.79	165.33±3.97	136.83±3.33	122.33±3.14	118.33±2.73	120.17±3.80	19,737.50±208.65
Normal+PFWE 1,000 mg/kg	121.67±2.86	156.33±5.47	129.50±7.11	131.50±4.79	122.17±6.22	117.00±1.65	19,765.00±598.98
Normal+PFWE 2,000 mg/kg	128.50±4.15	154.00±3.94	127.00±7.07	124.83±6.39	128.83±5.63	128.83±3.59	19,900.00±402.32
Normal+PFWE 3,000 mg/kg	130.33±1.98	160.00±8.35	139.50±6.90	130.33±1.43	119.83±3.06	119.83±4.43	20,242.50±271.85
Normal+Acarbose 50 mg/kg	104.17±4.34	111.33±3.90*	110.17±4.59*	103.33±3.77*	107.00±4.19	102.00±2.08*	16,047.50±481.85*

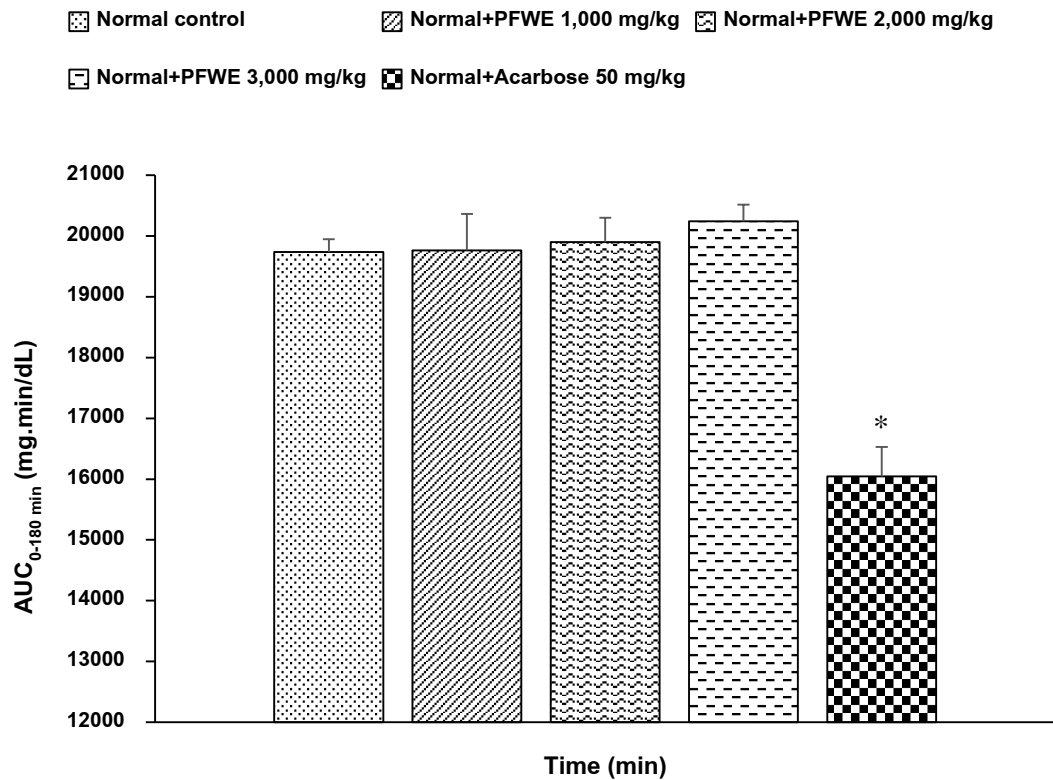
\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน





รูปที่ 4-4 ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกและยา acarbose ต่อระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย หลังจากการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ (mean  $\pm$  SEM, n=6)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ที่เวลาเดียวกัน



รูปที่ 4-5 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา acarbose ต่อพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-180 นาที ในหนูขาวปกติหลังจากการป้อนสารละลายซูโครส (mean  $\pm$  SEM, n=6)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลาเดียวกัน

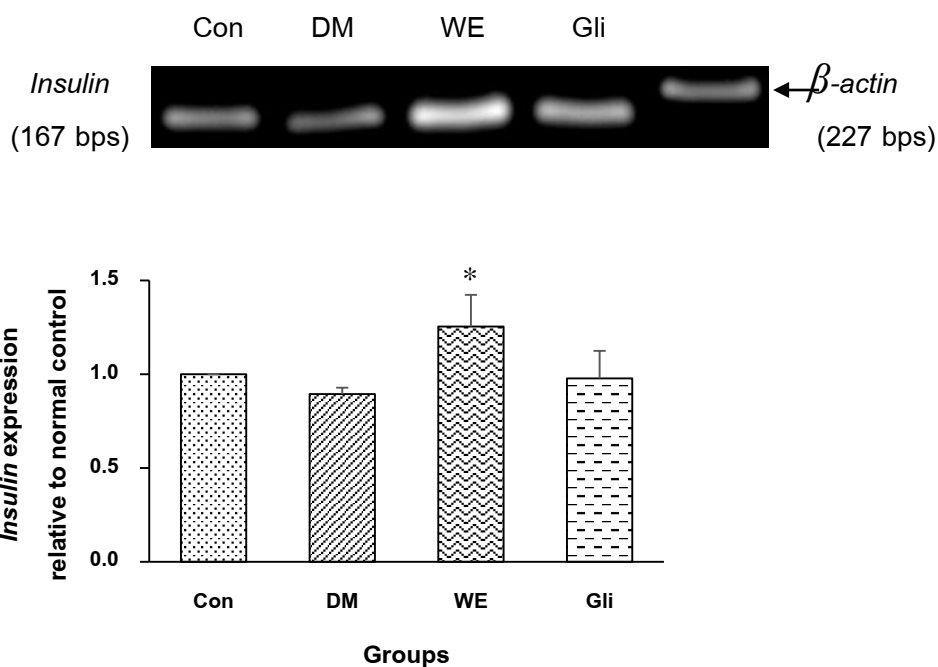
#### 4. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาสูกต่อการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4*

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* ด้วยเทคนิค reverse transcription-PCR ในเนื้อเยื่อตับอ่อน (*Insulin*) ตับ (*GLUT2*) ไขมัน (*GLUT4*) และกล้ามเนื้อ (*GLUT4*) ของกลุ่มหนูควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาสูกขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli)

ผลการทดลองพบว่า การแสดงออกของยีน *Insulin* ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมปกติ กลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาสูกมีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน ส่วนกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide มีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน (รูปที่ 4-6)

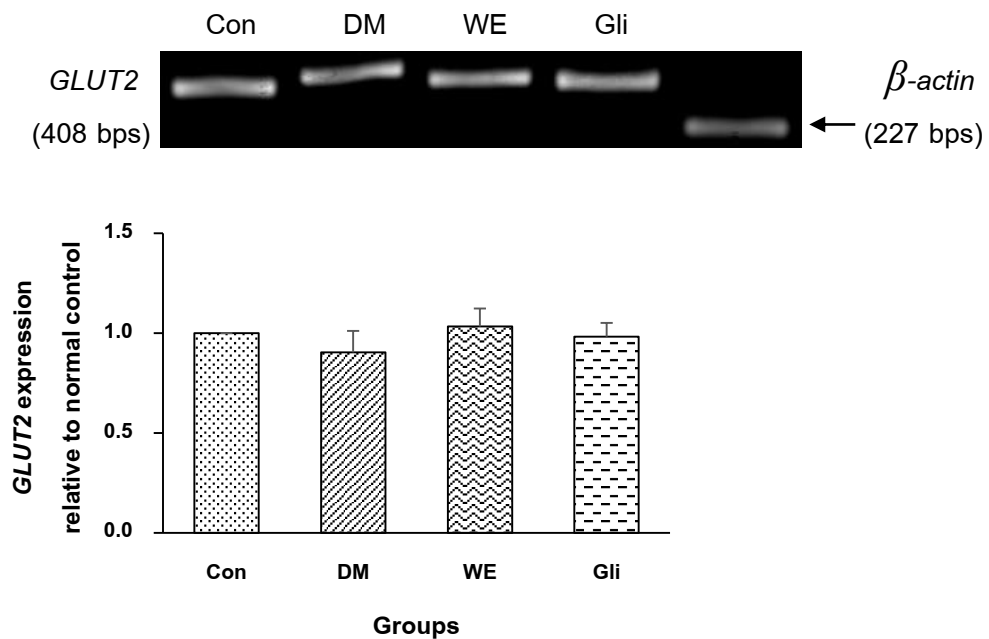
การแสดงออกของยีน *GLUT2* ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาสูกและกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน (รูปที่ 4-7)

การแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อไขมันของกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมปกติ ส่วนการแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมปกติ สำหรับกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาสูกพบว่าการแสดงออกของยีน *GLUT4* ทั้งในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน ส่วนกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide มีการแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้นแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน (รูปที่ 4-8 และ 4-9)



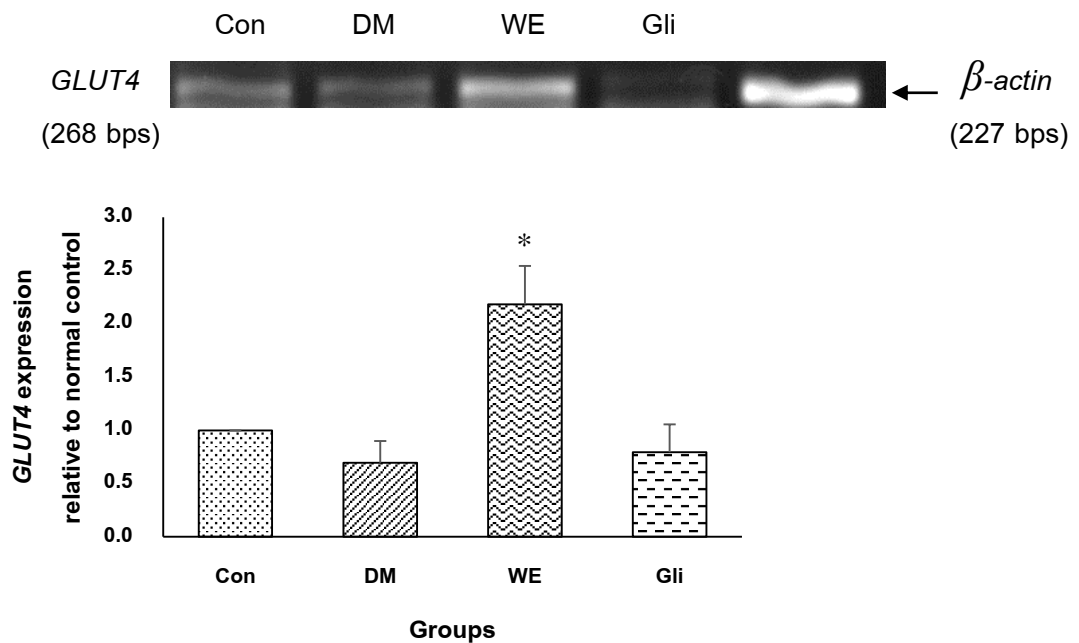
**รูปที่ 4-6** ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน *Insulin* ของเนื้อเยื่อตับอ่อนในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) (mean  $\pm$  SEM, n=3)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน



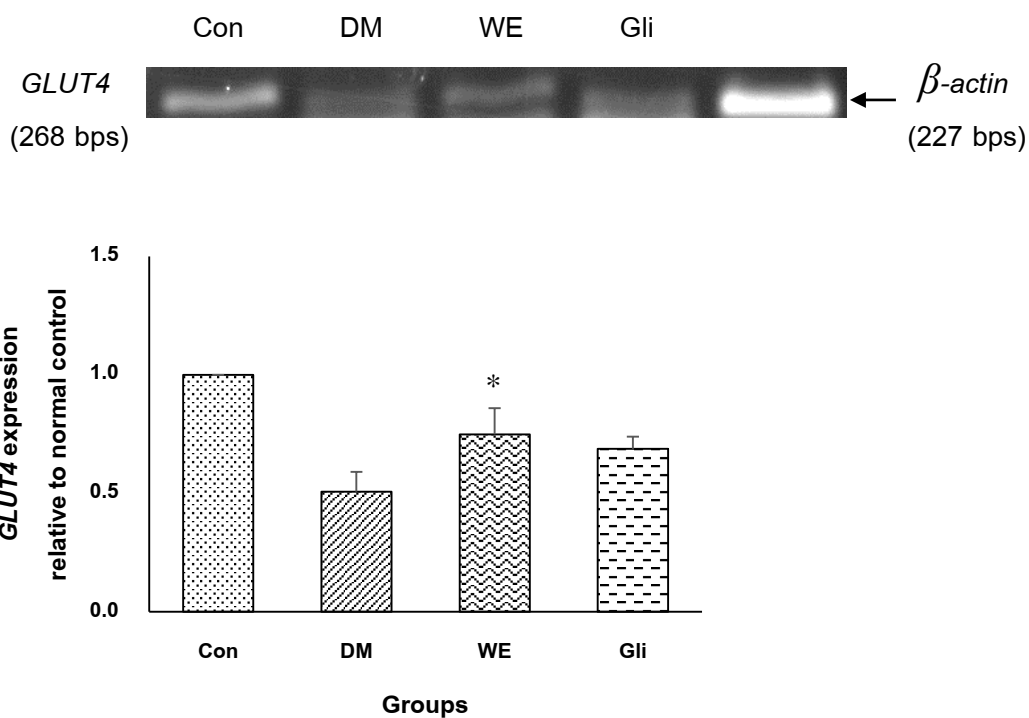
รูปที่ 4-7 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน GLUT2 ของเนื้อเยื่อตับในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) (mean  $\pm$  SEM, n=3)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน



รูปที่ 4-8 ผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน *GLUT4* ของเนื้อเยื่อไขมันในกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) (mean  $\pm$  SEM, n=3)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน



รูปที่ 4-9 ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกและยา glibenclamide ต่อการแสดงออกของยีน *GLUT4* ของเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อในกลุ่มหนูควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) (mean  $\pm$  SEM, n=3)

\* คือ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน

## บทที่ 5

### อภิปรายผล สรุปผลการศึกษา และข้อเสนอแนะ

#### อภิปรายผลการศึกษา

#### 1. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดและน้ำหนักตัวของหนูขาวเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin (STZ)

STZ เป็นยาปฏิชีวนะที่ผลิตโดย *Streptomyces achromogenes* ซึ่งในสัตว์ทดลองมักจะใช้เหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวาน โดย STZ จะทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน จึงทำให้สัตว์ทดลองเป็นโรคเบาหวานได้ (Ahmad *et al.*, 2014) STZ เป็นสารที่ออกฤทธิ์จำเพาะเจาะจงต่อเบต้าเซลล์ในตับอ่อน ทำให้เกิดการเติมหมู่เมทิล (methyl group) ในสาย DNA (DNA Methylation) สร้าง nitric oxide (NO) และอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) ส่งผลให้การสังเคราะห์และการหลั่งอินซูลิน จนทำให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น (Szkudelski, 2001)

ผลของการเหนี่ยวนำหนูขาวให้เป็นเบาหวานด้วย STZ ขนาด 55 มก./กก. โดยฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว ทำให้เบต้าเซลล์ถูกทำลาย เป็นผลให้หนูขาวทดลองมีระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารมากกว่า 200 มก./ดล. จากการศึกษาพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูขาวเบาหวานทุกกลุ่มหลังจากฉีด STZ ครบ 4 วัน (วันที่ 1) มีค่าอยู่ในช่วง  $208.60 \pm 8.05$  ถึง  $366.00 \pm 30.74$  มก./ดล. (ตารางที่ 4-1) และพบว่าระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองกลุ่มควบคุมเบาหวานยังคงสูงตลอดการทดลอง ซึ่งถ้าหากระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหาร 200-300 มก./ดล. พิจารณาให้เป็นเบาหวานขั้นปานกลาง (moderate diabetes) (Kumar *et al.*, 2010) และหากมีระดับน้ำตาลในเลือดในภาวะอดอาหารมากกว่า 300 มก./ดล. พิจารณาให้เป็นเบาหวานขั้นรุนแรง (severe diabetes) (Bagherzade *et al.*, 2014) ตลอดการศึกษายังสังเกตพบอาการต่าง ๆ ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ได้แก่ ปัสสาวะมาก (polyuria) กินน้ำมาก (polydipsia) น้ำหนักตัวลดและผอมลง (weight loss) (ตารางที่ 4-2 และรูปที่ 4-1) ซึ่งเป็นอาการที่คล้ายกับอาการที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยโรคเบาหวาน (สุนทรี, 2548; Okon *et al.*, 2012) นอกจากนี้พบว่าขนของหนูขาวเบาหวานมีลักษณะขนหยาบมากกว่าหนูขาวปกติ และเมื่อสิ้นสุดการทดลองได้ผ่าซากหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน พบว่ามีไขมันภายในช่องท้องและกล้ามเนื้อ (gastrocnemius muscle) น้อยกว่าหนูขาวปกติ ซึ่งคล้ายกับการศึกษาสารสกัดจากใบของต้นรัก (*Calotropis procera*) ต่อระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย streptozotocin พบว่าน้ำหนักของเนื้อเยื่อไขมันและ



กล้ามเนื้อในหนูขาวเบาหวานลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวกลุ่มควบคุมปกติ (Neto *et al.*, 2013)

หลังจากการให้สารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. วันละครั้ง เป็นเวลา 14 วัน ผลการทดลองพบว่าหนูขาวเบาหวานได้รับสารสกัดครบ 3 วัน (วันที่ 4) และครบ 10 วัน (วันที่ 11) ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน หลังจากได้รับสารสกัดครบ 7 วัน (วันที่ 8) ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน และเมื่อครบ 14 วัน (วันที่ 15) พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยของหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน จากการรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของไยตาลพบคาร์โบไฮเดรต โดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส (Ariyaseena *et al.*, 2000; Jansz *et al.*, 2002; Vengaiyah *et al.*, 2015) น้ำตาลเหล่านี้อาจจะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงไม่ได้ขึ้นกับขนาดของสารสกัด (non-dose dependent) โดยพบว่าสารสกัดที่ขนาด 2,000 มก./กก. ซึ่งเป็นสารสกัดขนาดสูงสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้น้อยกว่าสารสกัดขนาด 1,000 มก./กก. ซึ่งคล้ายกับผลของสารสกัดด้วยเมทานอลจากใบของ *Bridelia micrantha* ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดที่พบว่าหลังจากการให้สารสกัด ขนาด 125, 250 และ 500 มก./กก. เป็นเวลา 14 วัน สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ 75, 68 และ 63% ตามลำดับ (Omeh *et al.*, 2014) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้หนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากไยตาลขนาด 1,000 มก./กก. สามารถเห็นผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากได้รับสารสกัดครบ 3, 7 และ 10 วัน (วันที่ 4, 8 และ 11) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่พบในไยตาลเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์อลซาโปนิน (steroidal saponins) มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน (Bhusan *et al.*, 2010) จึงเป็นไปได้ว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกอาจมีผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูขาวที่เป็นเบาหวานขั้นปานกลาง (moderate diabetes)

Glibenclamide เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานกลุ่ม sulfonylureas ซึ่งใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยยามีกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (ณัฐวธ, 2555) และใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) ในการศึกษานี้การให้ glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. เป็นเวลา 14 วัน พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากได้รับยาครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15) มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน (ตารางที่ 4-1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหนูขาวที่เป็นเบาหวานขั้นปานกลาง ตับอ่อนของหนูเบาหวานยังไม่ได้เสียหาย

ทั้งหมด ทำให้เบต้าเซลล์ที่เหลืออยู่อาจยังสามารถหลั่งอินซูลินได้ จึงยังเห็นผลในการลดระดับน้ำตาลในเลือดจากยา glibenclamide แต่ในหนูขาวเบาหวานขั้นรุนแรงจะไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Sharma *et al.*, 1997) อีกทั้ง glibenclamide เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดยุคที่ 1 ของกลุ่ม sulfonylureas ซึ่งมีการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดช้า (Ikenoue *et al.*, 1997) อาจทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ยหลังจากได้รับยาครบ 3, 7, 10 และ 14 วัน (วันที่ 4, 8, 11 และ 15) มีแนวโน้มลดลงแต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาพบว่าหนูขาวกลุ่มควบคุมเบาหวานและหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide เป็นเวลา 14 วัน มีน้ำหนักตัวลดลงตลอดการทดลอง เนื่องจากในภาวะเบาหวานที่มีการขาดอินซูลิน ร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสในเลือดไปใช้เป็นพลังงานได้ จึงต้องสลายไขมันและโปรตีนที่เก็บสะสมไว้ในเนื้อเยื่อไปใช้เป็นพลังงานทดแทนกลูโคส (สุนทรื, 2548) แต่กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. มีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำหนักตัวของกลุ่มควบคุมเบาหวานในเวลาเดียวกัน (วันที่ 8 และ 15) ดังแสดงในรูปที่ 4-1 อาจเนื่องมาจากสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ทำให้การเผาผลาญไขมันและโปรตีนกลับมาปกติ จึงส่งผลให้น้ำหนักตัวของหนูเพิ่มขึ้นด้วย (Ghazanfar *et al.*, 2014)

## 2. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด หลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ (Oral glucose tolerance test)

การทดสอบความทนต่อกลูโคส (Glucose tolerance tests หรือ GTTs) เป็นการทดสอบความไวในการตอบสนองของตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) เมื่อได้รับกลูโคสในขนาดสูง เพื่อควบคุมสมดุระดับน้ำตาลในเลือดของร่างกาย (Megalli *et al.*, 2006)

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาสารสกัดด้วยเอทานอลจากเมล็ด *Caesalpinia bonducella* และใบ *Stevia rebaudiana* ขนาด 200 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนกลูโคสในหนูขาวปกติ พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน (Shukla *et al.*, 2011) แต่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำและ flabelliferins จากไยตาล (palmyrah fruit pulp) ต่อการดูดซึมกลูโคสในลำไส้ในหนูถีบจักร (ICR mice) โดยหนูที่ได้รับสารสกัดน้ำจากไยตาลผสมในอาหารเป็นสัดส่วน 10% เป็นเวลา 1 วัน แล้ววัดระดับน้ำตาลในเลือดและในลำไส้ที่เวลา 1.5 ชั่วโมงหลังจากได้รับสารละลายกลูโคสขนาด 1.5 ก./กก. พบว่าสารสกัดสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) และเพิ่มระดับกลูโคสในลำไส้แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มหนูที่ได้รับ flabelliferin II (F-II) ขนาด 20 มก./กก. เป็นเวลา 30 นาที ก่อนป้อนสารละลายกลูโคสขนาด 1.5 ก./กก. พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และเพิ่มระดับกลูโคสในลำไส้และอุจจาระอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.001$ ) (Uluwaduge *et al.*, 2006) จากผลการทดลองข้างต้น สรุปได้ว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อาจเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของไยตาลประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส (Ariyasena *et al.*, 2000; Jansz *et al.*, 2002; Vengaiyah *et al.*, 2015) โดยน้ำตาลเหล่านี้จะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น

Glipizide เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานกลุ่ม sulfonylureas ซึ่งใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยยามีกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน (ณัฐฐ, 2555) และใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) ในการศึกษา นี้ จากการศึกษาพบว่า glipizide สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อน

สารละลายกลูโคสได้ตั้งแต่ 30 ถึง 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) จากผลการทดลองข้างต้น คาดว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกอาจจะมีศักยภาพต่ำในการนำไปใช้ป้องกันการเกิดเบาหวาน หรือชะลอการเกิดภาวะแทรกซ้อนในประชากรกลุ่มเสี่ยงที่มีภาวะอ้วน หรือผู้มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติที่สูงสูญเสียความทนต่อกลูโคส (impaired glucose tolerance) และ/หรือ มีภาวะ impaired fasting glucose ซึ่งมีโอกาสพัฒนาเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจากสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายกลูโคสได้

### 3. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด หลังการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ (Oral sucrose tolerance test)

การทดสอบฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดโดยการป้อนสารละลายซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) แสดงให้เห็นถึงภาวะน้ำตาลสูงหลังรับประทานอาหาร ซึ่งจะมีการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase บริเวณลำไส้เล็กที่ทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ ส่งผลต่อการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด การรักษาโรคเบาหวานกลไกหนึ่งที่สามารถทำได้คือ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ซึ่งจะทำให้น้ำตาลโมเลกุลคู่ไม่เปลี่ยนเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ส่งผลให้กลูโคสถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ช้าลง (Kim *et al.*, 2005)

Acarbose เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานในกลุ่ม  $\alpha$ -glucosidase inhibitors ที่ใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ในทางเดินอาหาร (ณัฐวร, 2555) และใช้เป็นยามาตรฐาน (positive control) ในการศึกษา นี้ จากการศึกษาพบว่า acarbose สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายซูโครสได้ตั้งแต่ 30 ถึง 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

ผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายซูโครสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน ซึ่งคล้ายกับการศึกษาสารสกัดด้วย 50% เอทานอลจากใบหญ้าหนวดแมว (*Orthosiphon stamineus* Benth) ขนาด 200 และ 250 มก./กก. ต่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ พบว่าไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังการป้อนสารละลายซูโครสที่เวลา 30, 60 และ 120 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมปกติที่เวลาเดียวกัน (Mohamed *et al.*, 2015) แต่ไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Pitakbut และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 ได้ทำการทดลองในหลอดทดลอง

พบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ที่สกัดจากยีสต์ได้ 29.93% (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งสาเหตุที่สารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000, 2,000 และ 3,000 มก./กก. ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที อาจเนื่องจากองค์ประกอบทางเคมีของไยตาลประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยว ได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส (Ariyasena *et al.*, 2000; Jansz *et al.*, 2002; Vengaiyah *et al.*, 2015) โดยน้ำตาลเหล่านี้อาจจะทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังมีการรายงานการศึกษาของพัชรินทร์ สิงห์ดำ ในปี พ.ศ. 2557 พบว่าการให้สารสกัดด้วยเอทานอล ปีโตรเลียมอีเธอร์ และเอทิลอะซีเตทจากไยตาล สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดหลังอาหารได้ในหนูขาวปกติและหนูขาวเบาหวาน โดยอาจมีกลไกการออกฤทธิ์คล้ายกับ acarbose ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase โดยสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตทจากไยตาลขนาด 300 มก./กก. สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนซูโครสได้ดีที่สุด รองลงมาเป็นสารสกัดด้วยปีโตรเลียมอีเธอร์ขนาด 600 มก./กก. และสารสกัดด้วยเอทานอลขนาด 1,000 มก./กก. (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ Pitakbut และคณะ ในปี ค.ศ. 2014 พบว่าสารสกัดด้วยเอทิลอะซีเตท ปีโตรเลียมอีเธอร์ และเอทานอลจากไยตาลมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ที่สกัดจากยีสต์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 98.73, 94.20 และ 40.13% ตามลำดับ ในขณะที่ acarbose มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเท่ากับ 89.05% (ข้อมูลที่ยังไม่ได้เผยแพร่) จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกน่าจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์  $\alpha$ -glucosidase ได้น้อยจึงไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนซูโครสได้เหมือนยา acarbose และสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกอาจจะมีศักยภาพต่ำที่จะนำไปใช้ในการป้องกันการเกิดเบาหวานหรือชะลอการเกิดภาวะแทรกซ้อนในประชากรกลุ่มเสี่ยงที่มีภาวะอ้วน หรือผู้มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติที่สูญเสียความทนต่อกลูโคส (impaired glucose tolerance) และ/หรือ มีภาวะ impaired fasting glucose ซึ่งมีโอกาสพัฒนาเป็นเบาหวานชนิดที่ 2 เนื่องจากสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนซูโครสได้

#### 4. การศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกต่อการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4*

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *Insulin* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) พบว่าการแสดงออกของยีน *Insulin* ในเนื้อเยื่อตับอ่อนของกลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวานลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ ซึ่งการแสดงออกของยีน *Insulin* ที่ลดลงอาจจะเกี่ยวข้องกับ transcription factors ที่ตอบสนองต่อกลูโคสในส่วนโปรโมเตอร์ของยีนนี้ ได้แก่ pancreatic duodenal homeobox-1 (*PDX-1*), neurogenic differentiation 1 (*NeuroD1*) และ V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homologue A (*MafA*) โดยในภาวะปกติ *PDX-1*, *NeuroD1* และ *MafA* ในเนื้อเยื่อตับอ่อนจะทำหน้าที่กระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีนอินซูลินเพิ่มขึ้น เพื่อรักษาสมดุลของน้ำตาลกลูโคสและตอบสนองต่อกลูโคสเพิ่มขึ้น (Naya *et al.*, 1997; Andrali *et al.*, 2008) แต่เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรัง การแสดงออกของยีน *PDX-1*, *NeuroD1* และ *MafA* จะลดลง ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีน *Insulin* และการหลั่งของอินซูลิน นอกจากนี้การลดลงของยีน *NeuroD1* และ *MafA* ยังมีความเกี่ยวข้องในการดำเนินโรคเบาหวานด้วย (Harmon *et al.*, 1999; Leibowitz *et al.*, 2001; Melloul *et al.*, 2002; Andrali *et al.*, 2008; Sachdeva *et al.*, 2009) ผลการศึกษาในกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุกพบว่าการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากองค์ประกอบทางเคมีที่พบในใยตาลเป็นสารกลุ่มสเตียรอยด์ซาโปนิน (steroidal saponins) มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน (Bhusan *et al.*, 2010) จึงส่งผลทำให้มีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้น ส่วนกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide มีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหนูขาวที่เป็นเบาหวานขั้นปานกลาง ตับอ่อนของหนูเบาหวานยังไม่ได้เสียหายทั้งหมด ทำให้เบต้าเซลล์ที่เหลืออยู่อาจยังสามารถสร้างและหลั่งอินซูลินได้ และเนื่องจาก glibenclamide เป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานกลุ่ม sulfonylureas ซึ่งใช้รักษาโรคเบาหวานชนิดที่ 2 โดยยามีกกลไกการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน โดยยาจะจับกับ sulfonylurea receptor แล้วไปปิดกั้น ATP-sensitive  $K^+$  channel ( $K_{ATP}$  channel) บนเยื่อหุ้มเบต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้  $K_{ATP}$  channel ปิด ส่งผลให้  $K^+$  ไม่สามารถออกนอกเซลล์ได้ ระดับ  $K^+$  ในเบต้าเซลล์จึงเพิ่มขึ้น ทำให้เกิด depolarization ของเยื่อหุ้มเซลล์ แล้วเกิดการกระตุ้น voltage-dependent  $Ca^{2+}$  channel ให้เปิดออก  $Ca^{2+}$  จากนอกเซลล์จึงเข้าสู่เซลล์มากขึ้น จึงส่งผลให้เกิดการกระตุ้น

การหลั่งอินซูลินออกมาจาก vesicles โดยกระบวนการ exocytosis (ณัฐรุช, 2555) จึงส่งผลทำให้มีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้น

*GLUT2* เป็นตัวขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ตับ เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Narasimhan *et al.*, 2015) จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *GLUT2* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูขาวเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) ผลการศึกษาพบว่าการแสดงออกของยีน *GLUT2* ในเนื้อเยื่อตับของกลุ่มหนูขาวควบคุมเบาหวานลดลงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูขาวควบคุมปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ว่ามีการแสดงออกของยีน *GLUT2* ลดลงในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 2 (Solimana *et al.*, 2016) การศึกษากลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสรุปพบว่าการแสดงออกของยีน *GLUT2* เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน อาจเป็นไปได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้มีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้น ซึ่งทำให้ยีน *GLUT2* ที่เป็นตัวขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ตับขึ้นอยู่กับการทำงานของอินซูลิน โดยอินซูลินที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ตับ เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด ส่งผลให้มีการแสดงออกของยีน *GLUT2* เพิ่มขึ้นด้วย และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide พบว่าการแสดงออกของยีน *GLUT2* เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน เนื่องจาก glibenclamide มีการออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย (effectors) อื่น ๆ นอกเหนือจากตับอ่อน จึงสามารถเพิ่มการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสที่เซลล์เป้าหมายด้วย (Ojewole, 2002)

*GLUT4* เป็นตัวขนส่งกลูโคสที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมัน มีหน้าที่ขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้นของอินซูลิน โดยอินซูลินจะไปกระตุ้นการส่งสัญญาณภายในของอินซูลิน (insulin signaling) ในกล้ามเนื้อและไขมัน ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของ *GLUT4* ที่อยู่ภายในให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Sunil *et al.*, 2012) โดยเมื่ออินซูลินจับกับตัวรับที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่ออินซูลิน ชื่อว่า insulin receptor ทำให้เกิดกระบวนการ autophosphorylation โดยเกิดการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) บริเวณ tyrosine residues ส่งผลให้กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ tyrosine kinase ซึ่งจะไปกระตุ้นโดยการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีนต่าง ๆ (downstream signaling proteins) เช่น insulin-receptor substrates (IRS) proteins ทำให้เกิดการกระตุ้น phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) pathway จากนั้นจะไปกระตุ้น PIP<sub>3</sub> ที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้วไปกระตุ้น protein kinase B (Akt) และ atypical protein kinase C (aPKC) ต่อ ซึ่งมีผลทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของ *GLUT4* ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Brunton *et al.*, 2011) ดังแสดงในรูปที่ 2-7

จากการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของยีน *GLUT4* ด้วยเทคนิค RT-PCR ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อของกลุ่มหนูควบคุมปกติ (Con) กลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน (DM) กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดจากใยตาลขนาด 1,000 มก./กก. (WE) และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. (Gli) ผลการศึกษาการแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อของกลุ่มหนูควบคุมเบาหวานลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมปกติ ซึ่งในภาวะที่เป็นเบาหวาน เบต้าเซลล์ของตับอ่อนไม่สามารถหลั่งอินซูลินได้อย่างเพียงพอ เนื่องจากเกิดความผิดปกติของ insulin signaling pathway ส่งผลให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของ *GLUT4* ที่อยู่ภายในเซลล์กล้ามเนื้อและไขมันไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์น้อยลง ทำให้ขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้น้อยลงด้วย (Sunil *et al.*, 2012) และยังมีรายงานว่า การเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวานด้วย STZ ทำให้การแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อลดลง (Liang, *et al.*, 2012) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Krook และคณะ ในปี ค.ศ. 1998 ในระดับโมเลกุลของเซลล์กล้ามเนื้อที่ตัดจากผู้ป่วยเบาหวาน พบว่าการทำงานของ Akt ลดลง และยังมีรายงานว่า การศึกษาจากเซลล์ไขมันของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่าระดับของ IRS-1 ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มคนปกติ (Roncinone *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาจากเซลล์ไขมันและกล้ามเนื้อในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 พบว่าการทำงานของเอนไซม์ PI3 kinase ลดลง (Bjornholm *et al.*, 1997; Goodyear *et al.*, 1995; Roncinone *et al.*, 1999) เนื่องจากเกิดความผิดปกติของ upstream ของ insulin signaling pathway ซึ่งเกิดขึ้นทั้งที่ IRS-1, PI3 kinase และ Akt ส่งผลให้การทำงานของ *GLUT4* ซึ่งพากลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลงไปด้วย

สำหรับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสูงพบว่ามีการแสดงออกของยีน *GLUT4* ในเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูควบคุมเบาหวาน เป็นไปได้ว่าจากการศึกษาครั้งนี้ สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสูงไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *Insulin* ทำให้มีระดับของอินซูลินมากขึ้น ส่งผลให้ไปกระตุ้นยีน *GLUT4* แล้วทำให้การแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้น โดยที่ *GLUT4* เป็นตัวขนส่งกลูโคสที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมันซึ่งสามารถเพิ่มหรือลดจำนวนการแสดงออกของยีนได้ขึ้นอยู่กับการทำงานของอินซูลิน โดยอินซูลินที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการเคลื่อนที่ของ *GLUT4* ที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมให้ไปยังเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสที่กล้ามเนื้อและไขมัน เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด (Feshani, *et al.*, 2011; Liang, *et al.*, 2012; Sunil *et al.*, 2012) ดังนั้นการที่ระดับน้ำตาลในเลือดของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสูงลดลงได้ อาจเนื่องมาจากฤทธิ์ของสารสกัดดังกล่าวไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *Insulin* และ *Insulin* ไปเพิ่มการแสดงออกของยีน *GLUT4* ทำให้กลูโคสสามารถ uptake เข้าสู่เซลล์ไขมันและเซลล์กล้ามเนื้อได้มากขึ้น ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงได้ ส่วนกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide มีการแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญ



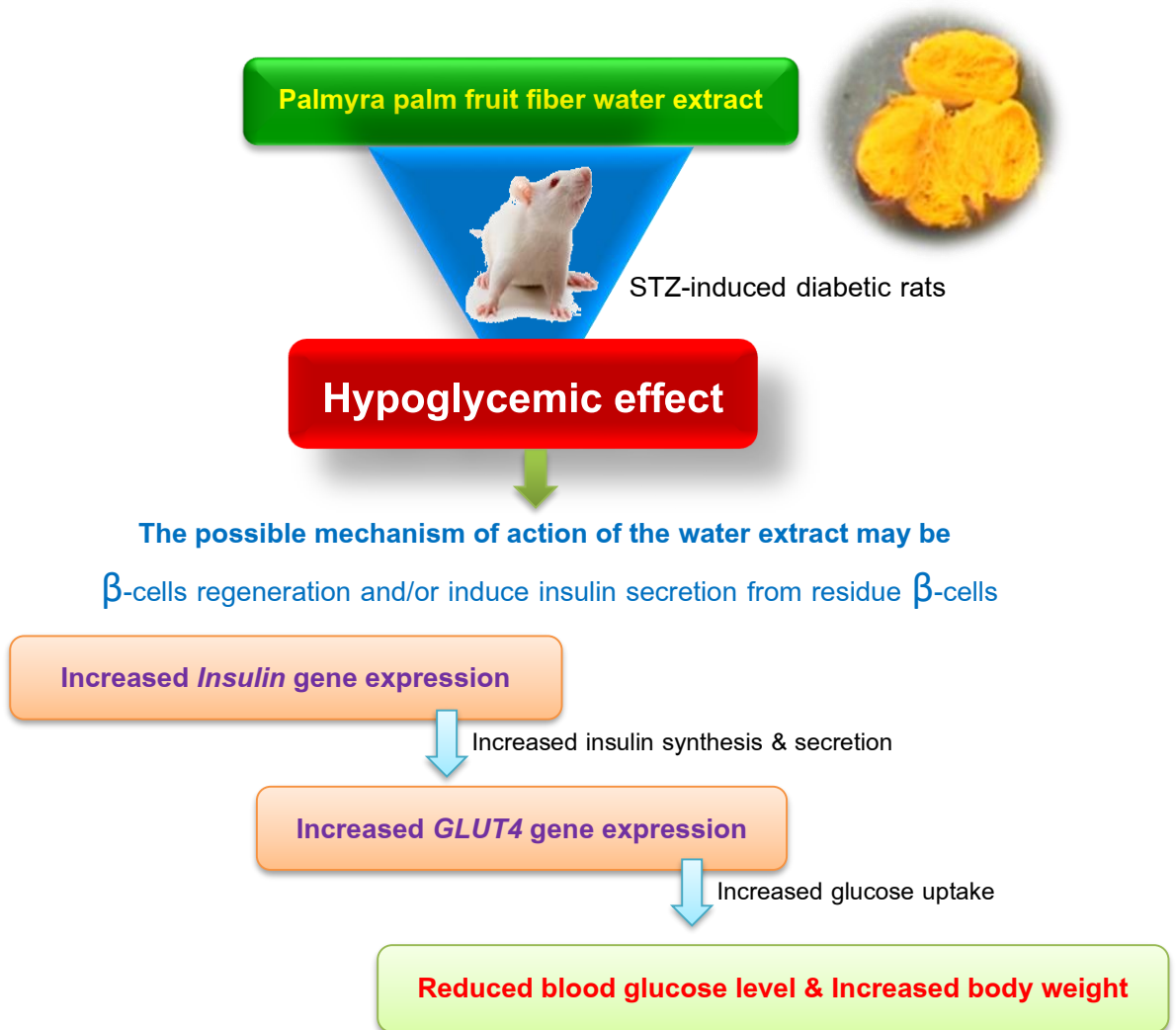
ทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเบาหวาน เนื่องจาก glibenclamide มีการออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย (effectors) อื่น ๆ นอกเหนือจากตับอ่อน จึงสามารถเพิ่มการนำกลูโคสเข้าเซลล์และเพิ่มการใช้กลูโคสที่เซลล์เป้าหมายด้วย (Ojewole, 2002)

### สรุปผลการศึกษา

1. การให้สารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500, 1,000 และ 2,000 มก./กก. เป็นเวลา 14 วัน พบว่า สารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ หลังจากได้รับสารสกัดครบ 3, 7 และ 10 วัน ส่วนสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 500 และ 2,000 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ หลังจากได้รับสารสกัดครบ 3 และ 10 วัน และเมื่อศึกษาผลของสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกต่อการแสดงออกของยีน *Insulin*, *GLUT2* และ *GLUT4* หลังจากให้สารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ เป็นเวลา 14 วัน สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน *Insulin* ที่เนื้อเยื่อตับอ่อนและ *GLUT4* ที่เนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อ แต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีน *GLUT2* ที่เนื้อเยื่อตับ โดยคาดว่าสารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกน่าจะมียากลไกการออกฤทธิ์ที่ไปกระตุ้นให้มีการสร้างเซลล์ของตับอ่อนทดแทนส่วนที่ถูกทำลาย และ/หรือกระตุ้นให้เบต้าเซลล์ของตับอ่อนส่วนที่เหลือสร้างและหลั่งอินซูลินมากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากมีการแสดงออกของยีน *Insulin* เพิ่มขึ้น และอินซูลินที่เพิ่มขึ้นสามารถกระตุ้นยีน *GLUT4* ที่เป็นตัวรับขนส่งกลูโคสที่เซลล์กล้ามเนื้อและไขมันให้มีการแสดงออกของยีน *GLUT4* เพิ่มขึ้นด้วย ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย STZ ลดลง (รูปที่ 5-1)

2. การให้สารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกก่อนการป้อนสารละลายกลูโคสในหนูขาวปกติ (oral glucose tolerance test) ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายกลูโคสหรือซูโครสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที

3. การให้สารสกัดชันน้ำจากไยตาลสุกก่อนการป้อนสารละลายซูโครสในหนูขาวปกติ (oral sucrose tolerance test) ไม่สามารถลดการเพิ่มขึ้นของระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการป้อนสารละลายซูโครสที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที



รูปที่ 5-1 แผนภาพสรุปผลการศึกษาระดับน้ำตาลในเลือดและสมมติฐานของกลไกการออกฤทธิ์ที่อธิบายฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด

## ข้อเสนอแนะในการศึกษา

1. ควรมีการศึกษาองค์ประกอบสารสำคัญออกฤทธิ์และโครงสร้างทางเคมี (active compounds and chemical structure) ของสารสกัดจากไยตาล เพื่อแยกและจำแนกสารที่ออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดต่อไป
2. ควรทำการศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือด หลังจากการบ่อนกลูโคส/ซูโครส (Oral glucose/sucrose tolerance test) ในหนูขาวเบาหวาน เพื่อที่จะได้เห็นระดับน้ำตาลในเลือดที่ลดลงและกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้ชัดเจนขึ้น
3. ควรทำการศึกษาผลของสารสกัดชั้นน้ำจากไยตาลสุกต่อลักษณะเซลล์ของตับอ่อน ด้วยเทคนิค H&E และ immunohistochemistry ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน
4. ควรทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณอินซูลิน (insulin signalling) ในระดับโมเลกุล เช่น insulin receptor substrate (IRS), protein kinase B (PKB/Akt) และ PI3 kinase เพื่อที่จะได้ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดได้ชัดเจนขึ้น

## รายการเอกสารอ้างอิง

- กมลวรรณ ศรีปลั่ง. 2546. ฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและผลต่อการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินของสารสกัดจากใบหญ้าหนวดแมวในหนูขาวปกติและหนูขาวเบาหวานที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสเตรปโตโซโตซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร.
- จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. 2548. สมุนไพรบำบัดเบาหวาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ เซเว่น พรินติ้ง กรุ๊ป จำกัด: กรุงเทพฯ.
- ชัยชาญ ดีโรจนวงศ์ และ กอบชัย พัววิไล. 2546. การวินิจฉัยและจำแนกโรคเบาหวาน (Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus). ใน ตำราโรคเบาหวาน. อภิชาติ วิชาญธนรัตน์, บรรณาธิการ. โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ. หน้า 1-14.
- ณัฐรุช สิบหมู่. 2555. อินซูลินและยากินลดกลูโคสในเลือด (Insulin and oral hypoglycemic drugs). ใน เภสัชวิทยา: เนื้อหาสำคัญและแบบฝึกหัด. ณัฐรุช สิบหมู่, บรรณาธิการ. โฮลิสติก พับลิชชิ่ง: กรุงเทพฯ. หน้า 473-488.
- ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. 2552. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้น: มหัตถรรยของดีเอ็นเอ. สำนักพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ทิพวรรณ พิลลา, ชูศรี ตลับมุข และ สนอง จอมเกาะ. 2551. ผลของสารสกัดจากใบชะพลู ใบอินทนิลน้ำ และใบบัวบกต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือด เคมีของปัสสาวะ ลักษณะเนื้อเยื่อลำไส้เล็ก และค่าทางโลหิตวิทยาในหนูเบาหวาน. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 27(1): 33-44.
- ธเนศ พงศ์ธีรรัตน์. 2555. ชีวโมเลกุลของโรคมะเร็ง. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรังสิต: ปทุมธานี.
- นภาพรณ เจียรพีรพงศ์. 2553. DPP-4 inhibitors และ GLP-1 agonists: ยากลุ่มใหม่ในการรักษาโรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลิน. พุทธชินราชเวชสาร. 27(ฉบับเพิ่มเติม1): 413-419.

ปิยากร บุญยัง. 2551. คู่มือการเตรียมสไลด์เนื้อเยื่อ. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ดิจิทัล คณะวิทยาศาสตร์: สงขลา.

พัชรินทร์ สิงห์ดำ. 2557. การศึกษาผลของสารสกัดจากใยตาลสุกต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสเตรปโตโซโตซิน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

พงศ์อมร บุณนาค. 2546. การรักษาโรคเบาหวานด้วยอินซูลิน (Insulin therapy). ใน ตำราโรคเบาหวาน. อภิชาติ วิชาญธรัตน์, บรรณาธิการ. โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ. หน้า 133-152.

วรรณิ นิธิยานันท์. 2535. การรักษาโรคเบาหวานและภาวะแทรกซ้อน (Management of Diabetes and Its Complications). พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์เรือนแก้วการพิมพ์: กรุงเทพฯ.

สุนทรี นาคะเสถียร. 2548. เบาหวานคืออะไร. ใน ความรู้เรื่องเบาหวาน ฉบับสมบูรณ์. รัชตะ รัชตะนาวิณ และ ชิตา นิงสานนท์, บรรณาธิการ. บริษัทจูนพับลิชชิ่ง จำกัด: กรุงเทพฯ. หน้า 27-36.

สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรภาวะ และ ณัฐฐิยา หิรัญกาญจน์. 2546. เวชศาสตร์เมเลกุล. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น จำกัด: กรุงเทพฯ.

Adisakwattana, S., Yibchok-Anun, S., Charoenlertkul, P. and Wongsasiripat, N. 2011. Cyanidin-3-rutinoside alleviates postprandial hyperglycemia and its synergism with acarbose by inhibition of intestinal alpha-glucosidase. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 49(1): 36-41.

Ahmadi, S., Awliaei, H., Haidarizadeh, M. and Rostamzadeh, J. 2015. The effect of ethanolic extract of *Urtica dioica* leaves on high levels of blood glucose and gene expression of glucose transporter 2 (Glut2) in liver of alloxan-induced diabetic mice. *Gene Cell and Tissue* 2(3): e30355.

- Ahmad, W., Khan, I., Khan, M.A., Ahmad, M., Subhan, F. and Karim, N. 2014. Evaluation of antidiabetic and antihyperlipidemic activity of *Artemisia indica* Linn. (aerial parts) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 151(1): 618–623.
- Alam, J. 2012. Analgesic, anti-inflammatory, antioxidant, and cytotoxic potential of the ethanolic extract from *Borassus flabellifer* L. (Root). Bachelor of Pharmacy (Honours), Department of Pharmacy, Jahangirnagar University, Bangladesh.
- Andrali, S.S., Sampley, M.L., Vanderford, N.L. and Ozcan, S. 2008. Glucose regulation of insulin gene expression in pancreatic beta-cells. *Biochemical Journal* 415(1): 1-10.
- American Diabetes Association (ADA). 2015. Standards of Medical Care in Diabetes-2015. *Diabetic care* 38(supplement 1): S1-S94.
- Ariyasena, D.D., Jansz, E.R., Jayasekera, S. and Abeysekera, A.M. 2000. Inhibitory effect of the bitter principle of palmyrah (*Borassus flabellifer* L.) fruit pulp on the growth of mice: evidence using bitter and non-bitter fruit pulp. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80: 1763-1766.
- Bagherzade, G., Dourandishan, M. and Malekaneh, M. 2014. Antidiabetic effects of *Otostegia persica* root in alloxan-induced diabetic rats. *Pure and Applied Chemical Sciences* 2(1): 1-9.
- Bhusan, M.S., Rao, V.C., Ojha, S.K., Vijakumar, M. and Verma, A. 2010. An analytical review of plants for anti diabetic activity with their phytoconstituents and mechanism of action. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 1(1): 29-46.

- Bjornholm, M. , Kawano, Y. , Lehtihet, M. and Zierath, J. R. 1997. Insulin receptor substrate- 1 phosphorylation and phosphatidylinositol 3- kinase activity in skeletal muscle from NIDDM subjects after *in vivo* insulin stimulation. *Diabetes* 46: 524-527.
- Brunton, L. L. , Chabner, B.A. and Knollmann, B. C. 2011. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 12<sup>th</sup>ed. The McGraw- Hill Companies, Inc.: New York.
- David-Silva, A. , Freitas, H. S. , Okamoto, M. M. , Sabino-Silva, R. , Schaan, B. D. and Machado, U. F. 2013. Hepatocyte nuclear factors 1 $\alpha$ /4 $\alpha$  and forkhead box A2 regulate the solute carrier 2A2 (Slc2a2) gene expression in the liver and kidney of diabetic rats. *Life Sciences* 93(22): 805-813.
- de la Garza, A. L. , Etxeberria, U. , Lostao, M. P. , San Roman, B. , Barrenetxe, J. , Martinez, J.A. and Milagro, F.I. 2013. Helichrysum and grapefruit extracts inhibit carbohydrate digestion and absorption, improving postprandial glucose levels and hyperinsulinemia in rats. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61(49): 12012-12019.
- Duddukuri, G.R., Sastry Y.S., Kaladhar, D.S.V.G.K., Babu, P.A., Rao, K.K. and Chaitanya K.K. 2011. Preliminary studies on *in vitro* anti-tumor activity of tender seed coat extract of *Borassus flabellifer* L. on hela cell line. *International Journal of Current Research* 3(7): 75-77.
- Eleazu, C. O. , Eleazu K. C. , Chukwuma S. and Essien U. N. 2013. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12(1): 60-66.

- Feshani, A. M. , Kouhsari, S. M. and Mohammadi S. 2011. *Vaccinium arctostaphylos*, a common herbal medicine in Iran: Molecular and biochemical study of its antidiabetic effects on alloxan- diabetic Wistar rats. *Journal of Ethnopharmacology* 133(1): 67-74.
- Frode, T. S. and Medeiros, Y. S. 2008. Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. *Journal of Ethnopharmacology* 115(2): 173-183.
- Ghazanfar, K. , Ganai, B. A. , Akbar, S. , Mubashir, K. , Dar, S. A. , Dar, M. Y. and Tantry, M. A. 2014. Antidiabetic activity of *Artemisia amygdalina* Decne in streptozotocin induced diabetic rats. *BioMed Research International* 2: 1-10.
- Goodyear, L. J. , Giorgino, F. , Sherman, L. A. , Carey, J. , Smith, R. J. and Dohm, G. L. 1995. Insulin receptor phosphorylation, insulin receptor substrate- 1 phosphorylation, and phosphatidylinositol 3- kinase activity are decreased in intact skeletal muscle strips from obese subjects. *Journal of Clinical Investigation* 95(5): 2195-2204.
- Goyal, P. , Agarwal, A. K. , Lakashminarasimhaiah and Singh, G. K. 2014. Hypoglycemic activity of inflorescence of *Borassus flabellifer* extracts on blood glucose levels of streptozocin- induced diabetic rats. *Journal of Pharmacy Research* 8( 11): 1738-1742.
- Goyal, P. , Agarwal, A. K. , Lakashminarasimhaiah and Singh, G. K. 2015. Antidiabetic and antihyperlipidemic effect of *Borassus flabellifer* in streptozotocin ( STZ) induced diabetic rats. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science* 4( 1): 1172-1184.
- Goyal, P. , Mee, R. K. , Sigh, G. K. and Nagori, B. P. 2013. Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of influorescence of *Borassus flabellifer* extracts on streptozotocin induced diabetic rats. *International Journal of Advances in Pharmaceutical Science* 4(4): 691-699.



- Gummadi, V.P., Battu, G.R., Diyya, K. and Manda, K. 2016. A review on palmyra palm (*Borassus flabellifer*). International Journal of Current Pharmaceutical Research 8(2): 17-20.
- Harmon, J. S. , Gleason, C. E. , Tanaka, Y. , Oseid, E. A. , Hunter-Berger, K. K. and Robertson, R. P. 1999. *In vivo* prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression. Diabetes 48(10): 1995-2000.
- Holt, R. I. G. , Cockram, C. S. , Flyvbjerg, A. and Goldstein, B. J. 2010. Textbook of Diabetes, 4<sup>th</sup>ed. Blackwell Publishing Ltd.: UK.
- Ikenoue, T., Okazaki, K., Fujitani, S., Tsuchiya, Y., Akiyoshi, M., Maki, T. and Kondo, N. 1997. Effect of a new hypoglycemic agent, A-4166 [(-)-N-(trans-4-isopropyl cyclohexanecarbonyl) - D- phenylalanine] , on postprandial blood glucose excursion: comparison with voglibose and glibenclamide. Biological and Pharmaceutical Bulletin 20: 354-359.
- Im, S. S. , Kwon, S. K. , Kim, T. H. , Kim, H. I. and Ahn, Y. H. 2007. Regulation of glucose transporter type 4 isoform gene expression in muscle and adipocytes. International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life 59(3): 134-145.
- International Diabetes Federation ( IDF ) . 2015. IDF Diabetes Atlas, 7<sup>th</sup>ed. [www.idf.org/diabetesatlas](http://www.idf.org/diabetesatlas) (accessed 02/09/2015).
- Jansz, E. R. , Wickremasekara, N. T. and Sumuduni, K. A. V. 2002. A review of the chemistry and biochemistry of seed shoot flour and fruit pulp of the palmyrah palm (*Borassus flabellifer* L.). Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka 30(1&2): 61-87.
- Jun, H. S. and Yoon, J. W. 2003. A new look at viruses in type 1 diabetes. Diabetes/Metabolism Research and Reviews 19(1): 8-31.

- Katzung, B. G. , Masters, S. B. and Trevor, A. J. 2012. Basic & Clinical Pharmacology, 12<sup>th</sup> ed. The McGraw-Hill Companies, Inc.: San Francisco.
- Kim, Y.M., Jeong, Y.K., Wang, M.H., Lee, W.Y. and Rhee, H.I. 2005. Inhibitory effect of pine extract on alpha- glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. *Nutrition* 21(6): 756-761.
- Krook, A. , Roth, R. A. , Jiang, X. J. , Zierath, J. R. and Wallberg-Henriksson, H. 1998. Insulin-stimulated Akt kinase activity is reduced in skeletal muscle from NIDDM subjects. *Diabetes* 47: 1281–1286.
- Kumar, R.P., Sujatha, D., Saleem, T.S.M., Chetty, C.M. and Ranganayakulu, D. 2010. Potential antidiabetic and antioxidant activities of *Morus indica* and *Asystasia gangetica* in alloxan- induced diabetes mellitus. *Journal of Experimental Pharmacology* 2: 29–36.
- Leibowitz, G. , Ferber, S. , Apelqvist, A. , Edlund, H. , Gross, D. J. , Cerasi, E. , Melloul, D. and Kaiser, N. 2001. IPF1/ PDX1 deficiency and beta- cell dysfunction in *Psammomys obesus*, an animal with type 2 diabetes. *Diabetes* 50(8): 1799-1806.
- Liang, Y., Sheng, S., Fang, P., Ma, Y., Li, J., Shi, Q., Sui, Y. and Shi, M. 2012. Exercise-induced galanin release facilitated GLUT4 translocation in adipocytes of type 2 diabetic rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 100(3): 554-559.
- Lina, S.M.M. , Muhsinin Mahbub, K. M. , Ashab, I. , Al-Faruk, Atanu, S. H. , Alam, J. and Sahriar, M. 2013. Antioxidant and cytotoxicity potential of alcohol and petroleum ether extract of *Borassus flabellifer* Linn. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 4(5): 1852-1857.
- Megalli, S. , Davies, N. M. and Roufogalis, B. D. 2006. Anti- hyperlipidemic and hypoglycemic effects of *Gynostemma pentaphyllum* in the Zucker fatty rat. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 9(3): 281-291.

- Melloul, D., Marshak, S. and Cerasi, E. 2002. Regulation of pdx-1 gene expression. *Diabetes* 51(Suppl 3): S320-S325.
- Mohite, M., Pramod, H.J., Yadav, A.V., Raje, V.N. and Wadkar, G.H. 2012. Evaluation of antiulcer activity of aqueous extract of *Borassus flabellifer* (Linn.) fruits. *Journal of Pharmacy Research* 5(7): 3782-3786.
- Mohamed, E.A., Ahmad, M., Ang, L.F., Asmawi, M.Z. and Yam, M.F. 2015. Evaluation of  $\alpha$ -glucosidase inhibitory effect of 50% ethanolic standardized extract of *Orthosiphon stamineus* Benth in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015: 1-6.
- Nakahara, Y., Sano, T., Kodama, Y., Ozaki, K., and Matsuura, T. 2013. Glycemic control with insulin prevents progression of dental caries and caries-related periodontitis in diabetic WBN/KobSlc rats. *Toxicologic Pathology* 41(5): 761-769.
- Narasimhan, A., Chinnaiyan, M. and Karundevi, B. 2015. Ferulic acid regulates hepatic GLUT2 gene expression in high fat and fructose-induced type-2 diabetic adult male rat. *European Journal of Pharmacology* 761: 391-397.
- Naya, F.J., Huang, H.P., Qiu, Y., Mutoh, H., Demayo, F.J., Leiter A.B. and Tsai, M.J. 1997. Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in beta2 2svgmk/neurod-deficient mice. *Genes and Development* 11(18): 2323-2334.
- Neto, M.C.L., de Vasconcelos, C.F.B., Thijan, V.N., Caldas, G.F.R., Araújo, A.V., Costa-Silva, J.H., Amorim, E.L.C., Ferreira, F., de Oliveirad, A.F.M. and Wanderley A.G. 2013. Evaluation of antihyperglycaemic activity of *Calotropis procera* leaves extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23(6): 913-919.
- Ojewole, J.A.O. 2002. Hypoglycemic effect of *Clausena anisata* (Willd) Hook methanolic root extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 81(2): 231-237.

- Okon, U.A., Owo, D.U., Udokang, N.E., Udobang, J.A. and Ekpenyong, C.E. 2012. Oral administration of aqueous leaf extract of *Ocimum Gratissimum* ameliorates polyphagia, polydipsia and weight loss in streptozotocin-induced diabetic rats. *The American Journal of the Medical Sciences* 2(3): 45–49.
- Omeh, Y.N., Onoja, S.O., Ezeja, M.I. and Okwor, P.O. 2014. Subacute antidiabetic and *in vivo* antioxidant effects of methanolic extract of *Bridelia micrantha* (Hochst Baill) leaf on alloxan-induced hyperglycaemic rats. *Journal of Complementary and Integrative Medicine* 11(2): 99-105.
- Paschapur, M.S., Patil, S., Patil, S.R., Kumar, R. and Patil, M.B. 2009c. Evaluation of the analgesic and antipyretic activities of ethanolic extract of male flowers (inflorescences) of *Borassus flabellifer* L. (Arecaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 1(2): 98-106.
- Pitakbut, T., Wattanapiromsakul, C. and Dej-adisai, S. 2014. Screening of selected Thai medicinal plants in anti- $\alpha$ -glucosidase activity. *Proceeding of the 3<sup>rd</sup> current drug development international conference*. Ao Nang beach, Krabi, Thailand, May 1-3, 2014. pp.165-166.
- Pramod, H.J., Yadav, A.V., Raje, V.N., Mohite, M. and Wadkar, G. 2013. Antioxidant activity of *Borassus flabellifer* (Linn.) fruits. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation* 3(1): 16-19.
- Roche Diagnostics. 2009. *Accu-Check Performa Manual*. [www.accu-check.com.au](http://www.accu-check.com.au) (accessed 02/09/2015).
- Rondinone, C.M., Carvalho, E., Wesslau, C. and Smith, U. 1999. Impaired glucose transport and protein kinase B activation by insulin, but not okadaic acid, in adipocytes from NIDDM subjects. *Diabetologia* 42: 819-825.

- Rondinone, C.M., Wang, L.M., Lonroth, P., Wesslau, C., Pierce, J. and Smith, U. 1997. IRS-1 is reduced and IRS-2 is the main docking protein for PI 3-kinase in adipocytes from subjects with non- insulin dependent diabetes mellitus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94: 4171-4175.
- Sachdeva, M.M., Claiborn, K.C., Khoo, C., Yang, J., Groff, D.N., Mirmira, R.G. and Stoffers, D.A. 2009. Pdx1 (MODY4) regulates pancreatic beta cell susceptibility to ER stress. Proceedings of the National Academy of Sciences 106(45): 19090-19095.
- Sharma, S.R., Dwivedi, S.K. and Swarup, D. 1997. Hypoglycaemic, antihyperglycaemic and hypolipidemic activities of *Caesalpinia bonducella* seeds in rats. Journal of Ethnopharmacology 58 (1): 39-44.
- Shukla, S., Mehta, A., Mehta, P. and Bajpai, V.K. 2011. Evaluation of comparative antidiabetic effects of ethanolic extracts of *Caesalpinia bonducella* and *Stevia rebaudiana* in normal and alloxaninduced experimental rats. Romanian Biotechnological Letters 16(3): 6187- 6199.
- Solimana, M.M., Nassan, M.A. and Ismail, T.A. 2016 *Origanum majoranum* extract modulates gene expression, hepatic and renal changes in a rat model of type 2 diabetes. Iranian Journal of Pharmaceutical Research 15(Special issue): 45-54.
- Sunil, C., Duraipandiyan, V., Agastian, P. and Ignacimuthu, S. 2012. Antidiabetic effect of plumbagin isolated from *Plumbago zeylanica* L. root and its effect on GLUT4 translocation in streptozotocin- induced diabetic rats. Food and Chemical Toxicology 50: 4356–4363.
- Szkudelski, T. 2001. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in  $\beta$  cells of the rat pancreas. Physiological Research 50(6): 536-546.

- Uluwaduge, L., Perera, A., Jansz, E. and Thabrew I. 2007. A pilot study on palmyrah pinattu (dried fruit pulp) as an anti-diabetic food component. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 1(3): 250-254.
- Uluwaduge, D.I., Thabrew, M.I. and Jansz, E.R. 2005. Preliminary report on the absence of toxicity of the fruit pulp palmyrah (*Borassus flabellifer*) in ICR mice. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 33(1): 37-41.
- Uluwaduge, L., Thabrew, M.I. and Jansz, E.R. 2006. The effect of flabelliferins of palmyrah fruit pulp on intestinal glucose uptake in mice. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka* 34(1): 37-41.
- Vengaiah, P.C., Vijayakumara, B., Murthy, G.N. and Prasad, K.R. 2015. Physico-chemical properties of palmyrah fruit pulp (*Borassus flabellifer* L.). *Nutrition and Food Sciences* 5(5): 1-4.
- Wiwanikit, V. 2006. Glucose tolerance test: A brief summary of basic principles and important considerations. *Chulalongkorn Medical Journal* 50(12): 825-830.
- Wood, I.S. and Trayhurn, P. 2003. Glucose transporters (GLUT and SGLT): expanded families of sugar transport proteins. *British Journal of Nutrition* 89(1): 3-9.
- Yoshikawa, M., Xu, F., Morikawa, Y., Pongpiriyadacha, Y., Nakamura, S., Asao, Y., Kumahara, A. and Matsuda, H. 2007. Medicinal flower (XII.1) new spirostane-type steroid saponins with antidiabetic activity from *Borassus flabellifer*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55(2): 308-316.
- Zhao, F.Q. and Keating, A.F. 2007. Functional properties and genomics of glucose transporters. *Current Genomics* 8: 113-128.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก ก

## หนังสือรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

ที่ ศธ 0521.11/ 1046



สำนักวิจัยและพัฒนา  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์  
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

Ref. 34/55

## หนังสือรับรอง

โครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาพฤษเคมีและฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดของยี่ตาลสุก (*Borassus flabellifer* Linn.)  
ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.)

หัวหน้าโครงการ ดร.สุกัญญา เดชอดิษฐ์ คณะเภสัชศาสตร์

ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจาก คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ให้ไว้ ณ วันที่ 24 ตุลาคม 2555

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิจจา สว่างเจริญ)

ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



## ภาคผนวก ข

### วิธีการเตรียมสาร

#### 1. การเตรียม Citrate buffer pH 4.5

การเตรียม Citrate buffer 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย 0.1 M Citric acid 44.5 มิลลิลิตร และ 0.1 M Trisodium citrate 55.5 มิลลิลิตร

เตรียม 0.1 M Citric acid 1 ลิตร โดยชั่งสาร Citric acid (MW 210.14) 21.014 กรัม ละลายใน deionized water 1 ลิตร และเตรียม 0.1 M Tri-sodium citrate 1 ลิตร โดยชั่งสาร Tri-sodium citrate (MW 294.1) 29.41 กรัม ละลายใน deionized water 1 ลิตร หลังจากนั้นผสม 0.1 M Citric acid 44.5 มิลลิลิตร และ 0.1 M Tri-sodium 55.5 มิลลิลิตร และตรวจวัดค่า pH ด้วย pH meter จนได้ pH 4.5

#### 2. การเตรียม Streptozotocin (STZ)

การเตรียม Streptozotocin (STZ) เพื่อเหนี่ยวนำหนูขาวให้เป็นเบาหวาน

STZ ขนาด 55 มก./กก. เตรียมใน Citrate buffer pH 4.5 โดยชั่ง STZ 0.055 กรัม ละลายใน citrate buffer pH 4.5 1 มิลลิลิตร โดยฉีดเข้าทางช่องท้องของหนูขาวขนาด 1 มล./กก.

#### 3. การเตรียม Glibenclamide

Glibenclamide ขนาด 1 มก./กก. โดยชั่ง glibenclamide 0.2 มิลลิกรัม ละลายใน 30% gum acacia 1 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

#### 4. การเตรียม Glipizide

Glipizide ขนาด 10 มก./กก. โดยนำ glipizide 10 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียด แล้วละลายใน 30% gum acacia 5 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

#### 5. การเตรียม Acarbose

Acarbose ขนาด 50 มก./กก. โดยนำ acarbose 100 มิลลิกรัม มาบดให้ละเอียด แล้วละลายใน 30% gum acacia 10 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

## 6. การเตรียมสารละลายกลูโคส

เตรียมสารละลายซูโครส 30% (w/v) ชั่งกลูโคส 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้สารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

## 7. การเตรียมสารละลายซูโครส

เตรียมสารละลายซูโครส 30% (w/v) ชั่งซูโครส 30 กรัม ละลายในน้ำกลั่น คนให้สารละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร

## 8. การเตรียมสารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก

สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 500 มก./กก. โดยชั่งสารสกัด 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 1,000 มก./กก. โดยชั่งสารสกัด 0.2 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 2,000 มก./กก. โดยชั่งสารสกัด 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

สารสกัดชั้นน้ำจากใยตาลสุก ขนาด 3,000 มก./กก. โดยชั่งสารสกัด 0.6 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ป้อนแก่หนูทดลองในปริมาตร 5 มล./กก.

## 9. การเตรียมสารละลาย Phosphate buffer saline (PBS)

การเตรียมสารละลาย PBS ปริมาตร 1 ลิตร ประกอบด้วย 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> และ 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> โดยชั่ง

NaCl	8	กรัม
KCl	0.2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24	กรัม

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้ได้ 7.4 แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

## 10. การเตรียมสารละลาย EDTA (0.5 M, pH 8.0)

ชั่ง Disodium EDTA·2H<sub>2</sub>O 186.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้ได้ 8.0 โดยใช้ NaOH

### 11. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50X Tris-acetate-EDTA (TAE buffer)

การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ 50X TAE ปริมาตร 1 ลิตร โดยชั่ง

Trisma base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA pH 8.0	100	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 1 ลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการใช้งานต้องเจือจางจาก 50X เป็น 1X โดยการผสม 50X TAE 20 มิลลิลิตร เข้ากับน้ำกลั่น 980 มิลลิลิตร

### 12. การเตรียม 1.5% agarose gel

ชั่งผง agarose gel 1.5 กรัม จากนั้นเติม 1X TAE buffer 100 มิลลิลิตร นำไปใส่เตาอบไมโครเวฟ 3-4 นาที ที่ระดับความร้อนปานกลาง จนเจลละลายหมดได้เป็นสารละลายใส

## ภาคผนวก ค

## ตารางแสดงผลน้ำหนักตัว

Group	No.	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
Normal control	1	255	267	276	291	306	255
	2	248	263	275	281	296	248
	3	272	287	289	301	315	272
	4	288	304	322	334	347	288
	5	249	264	274	284	293	249
	X	<b>262.40</b>	<b>277.00</b>	<b>287.20</b>	<b>298.20</b>	<b>311.40</b>	<b>262.40</b>
	SD	<b>17.24</b>	<b>17.99</b>	<b>20.39</b>	<b>21.44</b>	<b>21.71</b>	<b>17.24</b>
Normal rats+PFWE 1,000 mg/kg	1	275	290	309	313	325	275
	2	281	296	312	324	291	281
	3	279	285	308	314	324	279
	4	251	262	280	279	294	251
	5	281	288	299	312	326	281
	X	<b>273.40</b>	<b>284.20</b>	<b>301.60</b>	<b>308.40</b>	<b>312.00</b>	<b>273.40</b>
	SD	<b>12.76</b>	<b>13.05</b>	<b>13.01</b>	<b>17.13</b>	<b>17.85</b>	<b>12.76</b>
Diabetic control	1	213	211	205	200	199	213
	2	208	202	187	183	179	208
	3	214	213	200	200	190	214
	4	246	251	240	245	243	246
	5	249	248	232	234	231	249
	X	<b>226.00</b>	<b>225.00</b>	<b>212.80</b>	<b>212.40</b>	<b>208.40</b>	<b>226.00</b>
	SD	<b>19.79</b>	<b>22.77</b>	<b>22.35</b>	<b>25.99</b>	<b>27.38</b>	<b>19.79</b>
DM+ PFWE 500 mg/kg	1	208	204	205	207	215	208
	2	234	229	234	231	242	234
	3	232	234	247	259	276	232
	4	242	236	245	242	253	242
	5	246	239	246	226	231	246
	X	<b>232.40</b>	<b>228.40</b>	<b>235.40</b>	<b>233.00</b>	<b>243.40</b>	<b>232.40</b>
	SD	<b>14.79</b>	<b>14.12</b>	<b>17.78</b>	<b>19.27</b>	<b>23.01</b>	<b>14.79</b>

## ภาคผนวก ค (ต่อ)

ตารางแสดงผลน้ำหนักตัว (ต่อ)

Group	No.	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
DM+PFW 1,000 mg/kg	1	239	233	241	241	258	239
	2	238	238	245	252	263	238
	3	228	222	229	237	256	228
	4	222	213	221	219	229	222
	5	235	227	232	230	248	235
	X	232.40	226.60	233.60	235.80	250.80	232.40
	SD	7.23	9.71	9.58	12.32	13.33	7.23
DM+PFW 2,000 mg/kg	1	243	229	235	234	248	243
	2	237	228	231	236	248	237
	3	251	243	246	242	258	251
	4	254	243	251	243	259	254
	5	238	228	236	218	229	238
	X	244.60	234.20	239.80	234.60	248.40	244.60
	SD	7.64	8.04	8.35	10.04	12.05	7.64
DM+Glibenclamide 1 mg/kg	1	230	228	236	236	230	230
	2	217	212	218	211	207	217
	3	231	227	222	211	204	231
	4	224	224	225	225	220	224
	5	228	226	230	224	220	228
	X	226.00	223.40	226.20	221.40	216.20	226.00
	SD	5.70	6.54	7.01	10.60	10.64	5.70

## ภาคผนวก ง

## ตารางแสดงผลน้ำตาลในเลือด

Group	No.	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
Normal control	1	111	88	128	121	108	98
	2	99	87	140	93	99	77
	3	122	93	107	96	94	89
	4	123	97	112	103	107	93
	5	101	79	101	94	88	91
	X	111.20	88.80	117.60	101.40	99.20	89.60
	SD	11.28	6.80	16.04	11.63	8.53	7.80
Normal rats+PFWE 1,000 mg/kg	1	128	112	123	110	110	110
	2	125	94	105	99	87	78
	3	115	103	92	98	88	92
	4	126	105	99	117	85	100
	5	127	101	114	107	99	100
	X	124.20	103.00	106.60	106.20	93.80	96.00
	SD	5.26	6.52	12.22	7.92	10.57	11.92
Diabetic control	1	92	411	184	307	247	217
	2	110	386	294	257	271	107
	3	100	344	229	239	447	233
	4	113	239	443	98	102	249
	5	111	300	476	188	134	450
	X	105.20	336.00	325.20	217.80	240.20	251.20
	SD	8.93	68.73	129.21	79.35	136.14	124.32
DM+ PFWE 500 mg/kg	1	130	220	118	224	91	278
	2	104	227	107	222	115	348
	3	108	210	94	134	91	106
	4	122	180	103	209	80	160
	5	112	206	262	303	151	250
	X	115.20	208.60	136.80	218.40	105.60	228.40
	SD	10.64	17.99	70.52	60.03	28.42	96.04

## ภาคผนวก ง (ต่อ)

## ตารางแสดงผลน้ำตาลในเลือด (ต่อ)

Group	No.	ก่อนฉีด STZ	วันที่ 1	วันที่ 4	วันที่ 8	วันที่ 11	วันที่ 15
DM+PFWWE 1,000 mg/kg	1	110	247	103	110	97	147
	2	102	204	95	103	85	141
	3	101	201	77	80	114	90
	4	101	253	122	80	83	168
	5	112	203	213	209	162	334
	X	105.20	221.60	122.00	116.40	108.20	176.00
	SD	5.36	26.03	53.38	53.49	32.51	92.86
DM+PFWWE 2,000 mg/kg	1	113	233	73	169	85	208
	2	108	291	76	139	100	162
	3	105	236	89	105	89	138
	4	105	358	178	297	90	363
	5	97	204	166	262	110	322
	X	105.60	264.40	116.40	194.40	94.80	238.60
	SD	5.81	61.05	51.29	81.86	10.13	99.19
DM+Glibenclamide 1 mg/kg	1	130	259	239	229	120	142
	2	111	332	473	391	310	302
	3	118	346	412	345	319	294
	4	104	293	148	225	92	120
	5	108	207	353	283	301	202
	X	114.20	287.40	325.00	294.60	228.40	212.00
	SD	10.21	56.40	131.32	72.66	112.35	84.10

## ภาคผนวก ง (ต่อ)

ตารางแสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดและค่า AUC (OGTT)

Groups	No.	T0	T30	T60	T90	T120	T180	AUC <sub>0-180 min</sub> (mg.min/dL)
Normal control	1	99	172	168	167	132	91	25,365
	2	110	169	208	188	161	96	28,725
	3	96	161	181	153	122	90	24,480
	4	114	142	167	150	135	107	24,765
	5	108	173	160	161	128	89	24,870
	6	85	172	163	161	138	106	25,545
	7	90	156	159	153	138	93	24,390
	8	95	182	182	139	111	87	24,120
	X	<b>99.63</b>	<b>165.88</b>	<b>173.50</b>	<b>159.00</b>	<b>133.13</b>	<b>94.88</b>	<b>25,282.50</b>
SD	<b>34.55</b>	<b>46.77</b>	<b>40.84</b>	<b>26.69</b>	<b>14.24</b>	<b>29.27</b>	<b>1,471.46</b>	
Normal+PFWE 500 mg/kg	1	108	169	217	172	126	96	26,910
	2	102	172	185	180	118	106	26,130
	3	103	159	181	165	138	99	25,875
	4	106	159	161	165	157	113	26,595
	5	107	165	191	165	124	99	25,785
	6	98	170	169	137	137	102	24,975
	7	105	196	194	178	127	96	27,210
	8	108	156	160	140	143	106	24,915
	X	<b>104.63</b>	<b>168.25</b>	<b>182.25</b>	<b>162.75</b>	<b>133.75</b>	<b>102.13</b>	<b>26,049.38</b>
SD	<b>3.46</b>	<b>12.65</b>	<b>19.10</b>	<b>16.09</b>	<b>12.56</b>	<b>5.89</b>	<b>839.50</b>	
Normal+PFWE 1,000 mg/kg	1	126	164	161	128	111	93	23,265
	2	149	168	178	174	145	104	27,480
	3	125	179	170	147	104	95	24,285
	4	114	168	155	157	134	111	25,470
	5	97	146	184	145	117	83	23,460
	6	123	175	183	194	126	101	27,105
	7	106	144	156	147	151	93	24,585
	8	104	165	166	137	129	90	24,105
	X	<b>118.00</b>	<b>163.63</b>	<b>169.13</b>	<b>153.63</b>	<b>127.13</b>	<b>96.25</b>	<b>24,969.38</b>
SD	<b>16.46</b>	<b>12.55</b>	<b>11.59</b>	<b>21.22</b>	<b>16.21</b>	<b>8.76</b>	<b>1,588.40</b>	



## ภาคผนวก ง (ต่อ)

ตารางแสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดและค่า AUC (OGTT) (ต่อ)

Groups	No.	T0	T30	T60	T90	T120	T180	AUC <sub>0-180 min</sub> (mg.min/dL)
Normal+PFWE 2,000 mg/kg	1	138	182	179	168	128	100	26,700
	2	122	149	170	135	139	100	24,705
	3	147	188	201	181	181	133	31,440
	4	134	144	151	171	162	131	27,210
	5	138	186	169	189	135	110	27,765
	6	127	169	153	139	130	117	25,095
	7	117	173	177	160	160	97	27,165
	8	128	184	183	145	130	104	26,250
	X	<b>131.38</b>	<b>171.88</b>	<b>172.88</b>	<b>161.00</b>	<b>145.63</b>	<b>111.50</b>	<b>27,041.25</b>
	SD	<b>9.74</b>	<b>16.98</b>	<b>16.23</b>	<b>19.82</b>	<b>19.57</b>	<b>14.17</b>	<b>2,066.92</b>
Normal+Glipizide 10 mg/kg	1	67	83	87	85	78	52	13,725
	2	101	112	109	96	57	55	15,240
	3	72	99	94	79	53	39	12,795
	4	83	127	125	88	57	47	15,420
	5	68	95	91	74	53	39	12,375
	6	95	113	114	85	56	48	14,745
	7	95	98	88	87	69	56	14,400
	8	110	90	111	80	75	60	15,255
	X	<b>86.38</b>	<b>102.13</b>	<b>102.38</b>	<b>84.25</b>	<b>62.25</b>	<b>49.50</b>	<b>14,244.38</b>
	SD	<b>16.27</b>	<b>14.27</b>	<b>14.18</b>	<b>6.67</b>	<b>10.15</b>	<b>7.73</b>	<b>1,167.08</b>

## ภาคผนวก ง (ต่อ)

ตารางแสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดและค่า AUC (SuTT)

Groups	No.	T0	T30	T60	T90	T120	T180	AUC <sub>0-180 min</sub> (mg.min/dL)
Normal control	1	96	179	147	131	122	111	20,475
	2	109	161	139	126	113	121	19,620
	3	117	176	141	111	109	126	19,755
	4	112	155	123	115	119	125	18,915
	5	104	160	138	124	128	107	19,665
	6	122	161	133	127	119	131	19,995
	X	110.00	165.33	136.83	122.33	118.33	120.17	19,737.50
SD	9.27	9.73	8.16	7.69	6.68	9.30	511.09	
Normal+PFWE 1,000 mg/kg	1	121	166	129	119	124	117	19,710
	2	129	159	149	134	116	110	20,325
	3	127	155	129	141	151	119	20,970
	4	123	174	147	143	121	120	21,195
	5	121	148	121	137	113	121	19,200
	6	109	136	102	115	108	115	17,190
	X	121.67	156.33	129.50	131.50	122.17	117.00	19,765.00
SD	7.00	13.40	17.41	11.73	15.22	4.05	1,467.20	
Normal+PFWE 2,000 mg/kg	1	113	143	118	116	117	140	18,615
	2	124	142	110	129	150	122	19,620
	3	128	162	121	104	140	128	19,650
	4	130	158	128	133	115	125	19,845
	5	144	154	125	118	129	139	20,025
	6	132	165	160	149	122	119	21,645
	X	128.50	154.00	127.00	124.83	128.83	128.83	19,900.00
SD	10.15	9.65	17.32	15.66	13.79	8.80	985.47	

## ภาคผนวก ง (ต่อ)

ตารางแสดงผลระดับน้ำตาลในเลือดและค่า AUC (SuTT) (ต่อ)

Groups	No.	T0	T30	T60	T90	T120	T180	AUC <sub>0-180 min</sub> (mg.min/dL)
<b>Normal+PFWE</b> <b>3,000 mg/kg</b>	1	125	151	136	132	119	141	20,130
	2	130	156	173	129	118	113	20,925
	3	124	171	134	131	129	121	20,625
	4	135	126	133	132	121	117	19,140
	5	134	184	125	124	107	112	19,890
	6	134	172	136	134	125	115	20,745
	<b>X</b>	<b>130.33</b>	<b>160.00</b>	<b>139.50</b>	<b>130.33</b>	<b>119.83</b>	<b>119.83</b>	<b>20,242.50</b>
	<b>SD</b>	<b>4.84</b>	<b>20.46</b>	<b>16.91</b>	<b>3.50</b>	<b>7.49</b>	<b>10.85</b>	<b>665.89</b>
	<b>Normal+Acarbose</b> <b>50 mg/kg</b>	1	104	106	103	91	92	100
2		124	128	122	118	124	108	18,240
3		98	102	96	106	109	98	15,330
4		106	111	102	99	105	106	15,690
5		94	105	122	107	107	95	16,065
6		99	116	116	99	105	105	16,140
<b>X</b>		<b>104.17</b>	<b>111.33</b>	<b>110.17</b>	<b>103.33</b>	<b>107.00</b>	<b>102.00</b>	<b>16,047.50</b>
<b>SD</b>		<b>10.63</b>	<b>9.54</b>	<b>11.25</b>	<b>9.22</b>	<b>10.26</b>	<b>5.10</b>	<b>1,180.28</b>

## ภาคผนวก จ

ตารางแสดงพื้นที่แถบ PCR product และค่า gene expression relative to normal control

(Z)

Groups	No.	Insulin (pancreas)		GLUT2 (liver)		GLUT4 (fat)		GLUT4 (muscle)	
		Area	Z	Area	Z	Area	Z	Area	Z
Normal control	1	21,846.80	1.000	27,847.60	1.000	9,790.28	1.000	26,089.10	1.000
	2	30,807.36	1.000	31,256.65	1.000	17,184.28	1.000	28,464.69	1.000
	3	28,677.80	1.000	31,221.34	1.000	16,554.11	1.000	29,914.97	1.000
	X	-	<b>1.000</b>	-	<b>1.000</b>	-	<b>1.000</b>	-	<b>1.000</b>
	SD	-	<b>0.000</b>	-	<b>0.000</b>	-	<b>0.000</b>	-	<b>0.000</b>
Diabetic control	1	19,966.95	0.914	30,662.19	1.101	3,222.56	0.329	15,051.31	0.577
	2	29,015.47	0.942	27,448.29	0.878	17,791.67	1.035	17,150.67	0.603
	3	23,729.95	0.827	22,858.10	0.732	12,021.17	0.726	10,196.36	0.341
	X	-	<b>0.894</b>	-	<b>0.904</b>	-	<b>0.697</b>	-	<b>0.507</b>
	SD	-	<b>0.060</b>	-	<b>0.186</b>	-	<b>0.354</b>	-	<b>0.144</b>
DM+PFW 1,000 mg/kg	1	34,623.19	1.585	33,332.53	1.197	27,846.71	2.844	24,912.61	0.955
	2	31,971.02	1.038	31,789.14	1.017	27,388.99	1.594	20,341.48	0.715
	3	32,684.59	1.140	27,720.97	0.888	34,908.62	2.109	17,195.64	0.575
	X	-	<b>1.254</b>	-	<b>1.034</b>	-	<b>2.182</b>	-	<b>0.748</b>
	SD	-	<b>0.291</b>	-	<b>0.155</b>	-	<b>0.628</b>	-	<b>0.192</b>
DM+glibenclamide 1 mg/kg	1	27,794.43	1.272	31,202.77	1.120	6,400.41	0.654	20,611.33	0.790
	2	25,484.24	0.827	28,867.12	0.924	22,331.14	1.300	17,758.97	0.624
	3	23,864.31	0.832	28,225.12	0.904	7,203.63	0.435	19,467.23	0.651
	X	-	<b>0.977</b>	-	<b>0.983</b>	-	<b>0.796</b>	-	<b>0.688</b>
	SD	-	<b>0.256</b>	-	<b>0.120</b>	-	<b>0.449</b>	-	<b>0.089</b>

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	กานต์ศศิน เตียรอุ่น	
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5710220016	
วุฒิการศึกษา		
วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สาขาชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2556

## ทุนการศึกษา

- โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- เงินทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2559 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

## การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Seanoon, K., Kansenalak, S., Vongvatcharanon, U., Dej-adisai, S. and Udomuksorn, W., 2016. Preliminary study of hypoglycemic effect of palmyra palm fruit fiber water extract on fasting blood glucose level in streptozotocin-induced diabetic rats. Conference Proceedings of the 13<sup>th</sup> Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting. The Berkeley Hotel Pratunam, Bangkok, Thailand. February 1<sup>st</sup>-3<sup>rd</sup>, 2016.