

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาของ
ไซยานิดินและอนุพันธ์



นางสาว ศรีัญญา อัครไชยสิทธิ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ALPHA-AMYLASE INHIBITORY ACTIVITY AND ANTIHYPERGLYCEMIC EFFECTS OF
CYANIDIN AND ITS DERIVATIVES



Miss Sarinya Akkarachaiyasit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและฤทธิ์ลดระดับกลูโคสใน
พลาสมาของไชยานินดินและอนุพันธ์

โดย

นางสาวศริญญา อัครไชยสิทธิ์

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

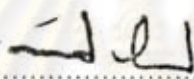
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ สพ.ญ. ดร. ศรินทร หยิบโชคอนันต์


อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

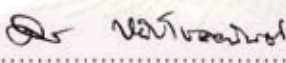
อาจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

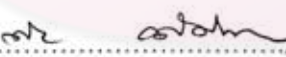
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

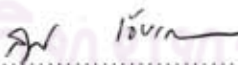

..... คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรพจน์ เปี่ยมสมบุญ)


คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอาวี)


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


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


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล)


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

ศริญญา อัครไชยสิทธิ์ : ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาของไซยานิดินและอนุพันธ์. (ALPHA-AMYLASE INHIBITORY ACTIVITY AND ANTI-HYPERGLYCEMIC EFFECTS OF CYANIDIN AND ITS DERIVATIVES)
 อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร นยิบโชคอนันต์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : อ.ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา, 100 หน้า.

ไซยานิดินและอนุพันธ์เป็นสารธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มสารแอนโธไซยานิน การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สนใจเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านภาวะระดับกลูโคสในพลาสมาสูงของไซยานิดินและอนุพันธ์ การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ในหลอดทดลองและสัตว์ทดลอง อนุพันธ์ที่ใช้ศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ ไซยานิดิน ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ และไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ จากนั้นนำมาหาค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ผลการทดลองพบว่า ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.28 \pm 0.03 \mu M$ เรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้ดังนี้ ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ > ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน > ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ \cong ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ยังมีค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสน้อยกว่าอะคาร์โบส ซึ่งมีค่า IC_{50} เท่ากับ $18.33 \pm 0.05 \mu M$ การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์เป็นแบบชนิดไม่แข่งขัน และไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ในขนาดความเข้มข้นต่ำ คือ $0.1 \mu M$ สามารถเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของอะคาร์โบสได้นอกจากนี้ในการศึกษาในหนูแรทปกติ พบว่า เมื่อให้ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ ขนาด 100 และ 300 มก./กก. สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาภายหลังให้แป้ง ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ ขนาด 30 มก./กก. ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูโคสในพลาสมา ในขณะที่เดียวกันเมื่อให้ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ ขนาด 30 มก./กก. ร่วมกับอะคาร์โบส พบว่า สามารถเสริมฤทธิ์ของอะคาร์โบส ขนาด 0.5 มก./กก. ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาภายหลังให้แป้ง ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทั้งนี้ควรทำการศึกษาเกี่ยวกับพิษวิทยาและผลทางคลินิกเพิ่มเติม เพื่อนำไปข้อมูลพื้นฐานในการป้องกันและรักษาโรคเบาหวานต่อไป

ศูนย์วิจัยทรัพยากร
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....ศริญญา อัครไชยสิทธิ์
 ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....อ.ศิรินทร นยิบโชคอนันต์
 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....อ.ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา

4989192520 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : CYANIDIN DERIVATIVES / PANCREATIC ALPHA-AMYLASE /
ACARBOSE / ANTHOCYANINS

SARINYA AKKARACHAIYASIT : ALPHA-AMYLASE INHIBITORY ACTIVITY
AND ANTI-HYPERGLYCEMIC EFFECTS OF CYANIDIN AND ITS DERIVATIVES

THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SIRINTRON YIBCHOK-ANUN, D.V.M.,
Ph.D., THESIS COADVISOR : SIRICHAJ ADISAKWATTANA, Ph.D., 100 pp.

Cyanidin and its derivatives, the natural anthocyanins, were evaluated their antihyperglycemic activities *in vitro* and *vivo*. Five compounds including cyanidin, cyanidin-3-rutinoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3,5-diglucoside were investigated the pancreatic α -amylase inhibition. The results showed that cyanidin-3-rutinoside was the most effective pancreatic α -amylase inhibitor with IC_{50} value of $21.28 \pm 0.03 \mu\text{M}$. When comparing the IC_{50} values, it was found that pancreatic α -amylase inhibitory activity increased in the order of cyanidin-3-rutinoside > cyanidin-3-glucoside > cyanidin > cyanidin-3-galactoside \cong cyanidin-3,5-diglucoside. However, they were less potent than that of acarbose ($IC_{50} = 18.33 \pm 0.05 \mu\text{M}$). A kinetic enzyme analysis revealed that cyanidin-3-rutinoside gave a noncompetitive type inhibition against pancreatic α -amylase. A low dose of cyanidin-3-rutinoside (0.1 μM) showed a synergistic inhibition when combined with acarbose. Moreover, the normal rats treated with cyanidin-3-rutinoside at dose of 100 and 300 mg/kg significantly decreased plasma glucose concentration after 30, 60 and 90 min of starch loading. However, the normal rats treated with cyanidin-3-rutinoside at dose of 30 mg/kg did not change plasma glucose concentration when compared to control group. In meanwhile, cyanidin-3-rutinoside (30 mg/kg) combined with acarbose (0.5 mg/kg) showed significantly suppressed plasma glucose concentration at 30, 60 and 90 min. These compounds were required to evaluate its toxicity and clinical efficacy for potential application in the prevention and treatment of diabetes mellitus.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of Study : Pharmacology.....

Student's Signature Sarinya Akkarachaiyasit

Academic Year : 2008.....

Advisor's Signature S. Yibchok-anun

Co-Advisor's Signature Sirichai Adisakwattana

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้ทำวิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร. ศิรินทร ทยิบโชคอนันต์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร. สิริชัย อติศักดิ์วัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ข้อเสนอแนะ ข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนกำลังใจ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการวิจัยอย่างมากมาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ไสภิต ธรรมอารี ที่ได้กรุณามาเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีย์ เจียรณมงคล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ลินดา จุฬารัตนมนตรี ที่ได้กรุณามาเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สัมฤทธิ์ วัชรสินธุ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการสังเคราะห์สารทดสอบ ซึ่งใช้ในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นางสาว กรณิศ พัฒนชัย เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ประจำภาคเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่มีความเกี่ยวข้องในการเก็บตัวอย่าง และดูแลสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักวิจัยแห่งชาติที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอขอบพระคุณบิดามารดา ครู-อาจารย์ ซึ่งให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดมาและขอขอบพระคุณทุกท่านที่ได้ให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
คำจำกัดความโรคเบาหวาน.....	5
ระบาดวิทยาโรคเบาหวาน.....	5
เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน.....	6
การจำแนกประเภทโรคเบาหวาน.....	7
สรีรวิทยาของการควบคุมระดับกลูโคสในเลือด.....	10
ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน.....	14
ระบาดวิทยาโรคแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน.....	16
ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด.....	17
ทฤษฎีของเอนไซม์.....	27
ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase enzyme).....	38
ข้อมูลเกี่ยวกับแอนโทไซยานิน (anthocyanins).....	41
ข้อมูลเกี่ยวกับไซยานินและอนุพันธ์ (cyanins and its derivatives).....	42
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	46
อุปกรณ์และสารเคมี.....	46
วิธีดำเนินการทดลอง.....	48
การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	55

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	56
ผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	56
ผลรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	63
ผลการเสริมฤทธิ์ของอะคาร์โบสในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	68
ผลฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติ.....	70
ผลการเสริมฤทธิ์ของอะคาร์โบสในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติ.....	74
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	79
รายการอ้างอิง.....	85
ภาคผนวก.....	97
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	100



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญัตินำ

ตาราง	หน้า
2.1 แสดงชนิดและตัวขนส่งกลูโคส.....	12
2.2 แสดงแหล่งที่พบเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในธรรมชาติ.....	39
4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของ IC_{50} (μM) ไชยานินดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้ง เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	56
4.2 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของไชยานินดินและอนุพันธ์ใน การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	57
4.3 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของ acarbose ต่อการ ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	58
4.4 แสดงค่าเฉลี่ยของ V_{max} ($g/L * min$) และค่า K_m (μM) ของ cyanidin-3- rutinoside.....	67
4.5 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของไชยานินดินและอนุพันธ์ใน การเสริมฤทธิ์กับ acarbose ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส.....	69
4.6 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของแต่ละ กลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 นาที.....	71
4.7 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติเมื่อให้ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 นาที.....	73

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แสดงกลไกการการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์.....	10
2.2 แสดงสรีรวิทยาของการควบคุมระดับกลูโคสในเลือด.....	14
2.3 แสดงสูตรโครงสร้างของอะคาร์โบส.....	21
2.4 แสดงพื้นที่การตายของหลอดเลือดโคโรนารี.....	24
2.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับปริมาณของสับสเตรต.....	31
2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วเริ่มต้นกับปริมาณ ปริมาณสับสเตรต.....	32
2.7 กราฟแสดง secondary plot ระหว่าง Slope กับ [I]	33
2.8 กราฟแสดง secondary plot ระหว่าง Intercept กับ [I]	34
2.9 กราฟแสดง Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบแข่งขัน.....	36
2.10 กราฟแสดง Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน..	37
2.11 กราฟแสดง Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่สามารถ แข่งขันได้โดยตรง.....	37
2.12 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและ เอนไซม์มอลเทส.....	38
2.13 แสดงสูตรโครงสร้างของแอนโธไซยานิน.....	41
2.14 แสดงสูตรโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้.....	42
3.1 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร cyanidin-3-rutinoside.....	52
4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin.....	59
4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin-3-glucoside.....	60
4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin-3-rutinoside.....	61
4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ acarbose.....	62

4.5	กราฟแสดง Lineweaver-Burk แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ และ $1/V$ ของไซยานิดิน-3-รุตินอไซด์.....	63
4.6	กราฟแสดง secondary plot แสดงค่า K_i ของ ไซยานิดิน-3-รุตินอไซด์.....	66
4.7	กราฟแสดง secondary plot แสดงค่า K_i' ของ ไซยานิดิน-3-รุตินอไซด์.....	67
4.8	แสดงค่าเฉลี่ยระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของแต่ละกลุ่ม การทดลอง.....	72
4.9	แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟของระดับน้ำตาลในพลาสมาในหนูแรทปกติของแต่ละกลุ่มการทดลอง.....	73
4.10	แสดงค่าเฉลี่ยระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของ cyanidin-3-rutinoside เมื่อให้ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180.....	77
4.11	แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติเมื่อให้ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180.....	78

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

α	=	alpha
β	=	beta
γ	=	gramma
ml	=	milliliter
dl	=	deciliter
mg	=	milligram
kg	=	kilogram
mM	=	millimolar
μ M	=	micromolar
μ l	=	microlitter
mg	=	milligram
g	=	gram
IC ₅₀	=	median inhibition concentration
V _{max}	=	velocity maximum
K _m	=	Michaelis-Menten constant
K _i	=	rate constant inhibition
>	=	มากกว่า
<	=	น้อยกว่า
\cong	=	ประมาณเท่ากัน
มก.	=	มิลลิกรัม
ดล.	=	เดซิลิตร
กก.	=	กิโลกรัม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โรคเบาหวานนับเป็นปัญหาสาธารณสุขที่ทั่วโลกต้องเผชิญ และเป็นโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบต่อมไร้ท่อที่พบได้มากที่สุด โรคเบาหวานเป็นภาวะความผิดปกติที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ส่งผลทำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติจนทำให้ร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับปกติได้ การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานเป็นสาเหตุทำให้เกิดความผิดปกติเกี่ยวกับโครงสร้างและการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆ ของร่างกายตามมา โดยเฉพาะระบบ ตา ไต หัวใจ และหลอดเลือด ซึ่งจัดเป็นภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานอันเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตที่สำคัญ (WHO, 1999; Caterson et al. 2004; Produce by International Diabetes Federation, 2006) แนวโน้มในอนาคตองค์การอนามัยโลกได้คาดการณ์ไว้ว่า จำนวนของผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลกจะเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 380 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2025 ซึ่งปัจจุบันพบจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั่วโลก 246 ล้านคน และพบจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มากถึง 90-95% ของจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานทั้งหมด (WHO, 2006) สำหรับประชากรในประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.536 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2000 และคาดว่าปี ค.ศ. 2030 จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.739 ล้านคน (WHO, 2003) จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่าแนวโน้มจำนวนผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ทุกปี เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่ไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้น สิ่งสำคัญในการดูแลรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานคือ การทำให้ผู้ป่วยสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ที่ใกล้เคียงกับภาวะปกติให้มากที่สุด เพื่อช่วยในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนที่อาจเกิดขึ้นได้ ทั้งนี้ยังช่วยทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตดีขึ้นและอายุยืนยาวขึ้น (Rohlfing et al. 2002)

การรักษาโรคเบาหวานนอกเหนือจากการควบคุมอาหาร ออกกำลังกาย ยังมีความจำเป็นที่จะต้องให้อินซูลินทดแทนในผู้ป่วยเบาหวานชนิดชนิดที่ 1 และให้ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งถ้าหากให้การรักษาเป็นระยะเวลายาวนานและไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ก็อาจมีการให้อินซูลินร่วมด้วย (ADA, 2007; Clinical Guideline Task Force, 2005; American College of Endocrinolog, 2007)

ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานในปัจจุบันพบว่ามีหลายชนิด ได้แก่ 1) sulfonylureas เช่น glibenclamide และ glipizide กลไกในการออกฤทธิ์คือ กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อน (Malaisse et al.1990) 2) Biguanide เช่น metformin กลไกในการออกฤทธิ์คือ การไปกระตุ้นการทำงานของอินซูลินโดยเพิ่มกระบวนการกลูโคส เมแทบอลิซึม (Herman et al.1979) 3) thiazolidinediones เช่น rosiglitazone กลไกในการออกฤทธิ์คือ ไปกระตุ้นการทำงานของตัวรับฮอร์โมนอินซูลินส่งผลทำให้การดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น (Fujiwara et al.,1988) 4) alpha-glucosidase inhibitors เช่น อะคาร์โบส (acarbose) กลไกในการออกฤทธิ์คือ ไปยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่ บริเวณผนังลำไส้เล็ก ช่วยชะลอกระบวนการย่อยและการดูดซึมของคาร์โบไฮเดรต ส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลง (Decrecharawong et al. 1996; Vannasaeng et al.1995) ในปัจจุบันยาในกลุ่มของ alpha-glucosidase inhibitors เช่น acarbose ส่วนหนึ่งได้ถูกนำมาใช้รักษาในกรณีผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารได้ (American Diabetes Association, 2007) ซึ่งการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารจะสามารถช่วยลดหรือชะลออัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนเรื้อรังจากโรคเบาหวานที่เกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและหัวใจได้ ซึ่งโรคดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคเบาหวาน (Apichati et al. 2001) นอกจากนี้ยังใช้รักษาผู้มีภาวะ Impaired fasting glucose ร่วมกับการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย (Chang et al., 2003) หรือใช้รักษาร่วมกันกับยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่นในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดชนิดที่ 2 (American Diabetes Association, 2007) อย่างไรก็ตามยาในกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitors ยังพบผลข้างเคียง คือ ท้องอืด แน่นอึดอัดท้อง ท้องร่วง เป็นต้น (Coniff et al. 1995) และนอกจากนี้ยังมีรายงานเพิ่มเติมพบว่า เมื่อได้รับในขนาดที่สูงและมีการดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตจะส่งผลทำให้เกิดพิษต่อตับได้ (Andrade et al. 1996)

ดังนั้น นักวิจัยจึงได้พยายามคิดค้นนำผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติมาใช้เพื่อพัฒนามาเป็นยาแผนปัจจุบัน ตัวอย่างเช่น การปรับเปลี่ยนโครงสร้างของของสารเคมีให้มีประสิทธิภาพในการรักษามากขึ้น เช่น voglibose เป็นยากกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitors ใช้สำหรับในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งปรับปรุงจากโครงสร้างของสารตั้งต้นคือ valiolamine ที่ได้จากการหมัก *Streptomyces hygroscopicus* (Chen et al. 2006) รวมทั้งการนำสารธรรมชาติในกลุ่ม alpha-amylase inhibitors มาใช้

และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส สามารถส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลงได้ (Yong-Mu et al. 2003) เนื่องจากเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในขั้นตอนแรก ก่อนที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตต่อไป (Rhabasa-Lhoret and Chiasson, 2004) ตัวอย่างสารเคมีจากธรรมชาติที่นำมาใช้ในกลุ่ม alpha-amylase inhibitors เช่น สาร pentacyclic triterpenoid acid สารเคมีที่ได้จาก *Phyllanthus amarus* (Hasenah et al. 2006) สาร (-)-3-O-galloyl catechin และ (-)-3-O-galloyl epicatechin ซึ่งเป็นสารเคมีที่ได้จาก *Bergenia ciliata* (Megh et al. 2007) เป็นต้น

แอนโทไซยานิน (Anthocyanins) เป็นสารเคมีได้จากธรรมชาติจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีคุณสมบัติละลายในน้ำได้ดี มักพบได้ในพืช ผัก ผลไม้ ดอกไม้มีสี โดยเฉพาะสีแดงและม่วงที่นำมาใช้เป็นอาหารในชีวิตประจำวัน (Wang et al. 1997) ซึ่งสารกลุ่ม cyanidin เป็นสารกลุ่มใหญ่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของแอนโทไซยานิน (Wang et al. 1999; Seeram et al. 2001) อนุพันธ์ของ cyanidin ที่พบได้มีดังนี้ cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside, และ cyanidin-3,5-diglucoside แต่ละอนุพันธ์จะมีสูตรโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบฤทธิ์ทางเภสัชวิทยามากมาย ช่วยลดเกิดโรคต่างๆ เช่น การเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) โรคหลอดเลือดและหัวใจ (cardiovascular disease) มะเร็ง (cancer) และโรคเบาหวาน (diabetes) (Jayaprakasam et al. 2004) ตัวอย่างการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านโรคเบาหวาน (diabetes) เช่น การเพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Rie et al. 2007) การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส (Adisakwattana et al. 2004) และกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อนในสัตว์ทดลอง (Bolleddula et al. 2006) เป็นต้น แต่ยังไม่พบการศึกษาถึงฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของสารกลุ่มดังกล่าว

ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้จึงสนใจศึกษาสารจากธรรมชาติในกลุ่มของ cyanidin และอนุพันธ์ทั้ง 4 ชนิด คือ cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-rutinoside และ cyanidin-3,5-diglucoside เกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส พร้อมทั้งทำการประเมินถึงโครงสร้างของอนุพันธ์แต่ละชนิดที่มีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส หลังจากนั้นนำอนุพันธ์ที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด นำมาศึกษาชนิดของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และการเสริมฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเมื่อให้ร่วมกับ acarbose ซึ่งเป็นยารักษาเบาหวานกลุ่มหนึ่งที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาและการเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรท โดยหวังว่าจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาเดิมในปัจจุบันให้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งเพื่อเป็นประโยชน์และแนวทางในการพัฒนายารักษาโรคเบาหวานในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ของไซยานิดินและอนุพันธ์
2. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
3. เพื่อศึกษารูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ของอนุพันธ์ไซยานิดิน
4. เพื่อศึกษาการเสริมฤทธิ์ของไซยานิดินและอนุพันธ์กับ acarbose ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
5. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของอนุพันธ์ไซยานิดินต่อการลดระดับกลูโคสในพลาสมาและการเสริมฤทธิ์ของ acarbose ต่อการลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติ

สมมติฐาน

อนุพันธ์ของไซยานิดินที่มีโครงสร้างแตกต่างกันสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้แตกต่างกันและสารดังกล่าวสามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมารวมทั้งเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงสารเคมีจากธรรมชาติชนิดใหม่ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส
2. เป็นการศึกษาเบื้องต้นและเป็นแนวทางสำหรับการศึกษาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับไซยานิดินและอนุพันธ์ ตลอดจนเป็นข้อมูลพื้นฐานซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดต่อไปในอนาคต หรือช่วยเสริมการรักษาให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus disease)

1. คำจำกัดความ

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus disease) คือ ภาวะที่มีความผิดปกติของระบบเมแทบอลิซึมของ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน ส่งผลให้เกิดระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติจนร่างกายไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในระดับปกติได้ (WHO, 1999)

2. . ระบาดวิทยาของโรคเบาหวาน

จากการสำรวจในปี ค.ศ. 2007 มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานทั่วโลกประมาณ 246 ล้านคน (Diabetes Atlas, 2006) และเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 380 ล้านคนในปี ค.ศ. 2025 ซึ่งผู้ได้รับการวินิจฉัยเป็นโรคเบาหวานใหม่จำนวน 7 ล้านคนหรือทุก 10 วินาที มีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานใหม่ จำนวน 2 คน โรคเบาหวานชนิดที่พบบ่อยที่สุด คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 พบมากถึง 90-95% ของผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลก ส่วนโรคเบาหวานชนิดที่ 1 พบได้ 5-10% ส่วนอีกสองชนิดพบได้น้อยมาก (WHO, 2006; American Diabetes Association, 2008) สำหรับรายงานในประเทศไทยพบว่า ประชากรในประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวาน 1.536 ล้านคน ในปี ค.ศ. 2000 และคาดว่าปี ค.ศ. 2030 จำนวนผู้ป่วยโรคเบาหวานจะเพิ่มขึ้นเป็น 2.739 ล้านคน (WHO, 2003) รวมทั้งจากรายงานเมื่อปี พ.ศ. 2538 พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ประมาณ 7.4 คนจากประชากรทุก 100,000 คน และในปี พ.ศ. 2547 เพิ่มขึ้นเป็น 12.3 คนจากประชากรทุก 100,000 คน ในขณะที่เดียวกันพบว่าอัตราจำนวนผู้ป่วยต่อประชากรแสนคนจากสถานบริการสาธารณสุขของกระทรวงสาธารณสุขในประเทศไทย ในปี 2538 อัตราผู้ป่วย 100.11 เพิ่มขึ้นเป็น 444.16 ในปี พ.ศ. 2547 (อัญชดี ศิริพิทยาคุณกิจ, 2548)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. เกณฑ์การวินิจฉัยโรคเบาหวาน

ตามเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และสมาคมโรคเบาหวานแห่งสหรัฐอเมริกา (American Diabetes Association, ADA) มีดังนี้ (ADA, 1997; Alberti and Zimmet, 1998)

1. มีอาการของโรคเบาหวานชัดเจน คือ หิวน้ำมาก ปัสสาวะบ่อยหรือน้ำหนักตัวลดโดยไม่ทราบสาเหตุ สามารถตรวจระดับพลาสมาไกลูโคสเวลาใดก็ตามมีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 200 mg/dl
2. ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำขณะอดอาหาร (fasting plasma glucose หรือ FPG) (การอดอาหาร หมายถึง การงดรับประทานอาหาร หรือเครื่องดื่มที่ให้พลังงานเป็นเวลาเป็นอย่างน้อย 8 ชม.)

FPG	< 100 mg/dl	= ปกติ
FPG	100-125 mg/dl	= Impaired fasting glucose (IFG)
FPG	≥ 126 mg/dl	= โรคเบาหวาน

(7.0 mmol/l)

3. ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม (75 g OGTT)

2h-PG	< 140 mg/dl	= ปกติ
2h-PG	140-199 mg/dl	= Impaired fasting glucose (IFG)
2h-PG	≥ 200 mg/dl	= โรคเบาหวาน

(11.0 mmol/l)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การจำแนกประเภทของโรคเบาหวาน

ตามเกณฑ์ของสมาคมโรคเบาหวานของประเทศสหรัฐอเมริกา (ADA, 2008) ได้จำแนกประเภทโรคเบาหวาน ตามกลุ่มอาการและพยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

1. โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 Diabetes Mellitus หรือ T1DM) เกิดจาก ภาวะ T-cell ทำลายเซลล์เบต้าในตับอ่อน (Berter et al. 1999; Rabinovitch, 2000) โดยเริ่มจากเซลล์ macrophage จับกับแอนติเจนของเซลล์เบต้า และ T-cell ที่มีตัวรับที่จำเพาะต่อแอนติเจนของเซลล์เบต้าไปกระตุ้น T-helper cell ให้หลั่ง cytokine เช่น interferon gamma (TFN- γ) และสามารถกระตุ้น cytotoxic T-cell สามารถหลั่ง free radical เช่น superoxide, hydrogen peroxide, nitric oxide และ cytokine ต่างๆ เช่น interleukin - 1 (IL-1), tumor necrosis factor - alpha (TNF- α) มีฤทธิ์ทำลายเซลล์เบต้า นอกเหนือจาก T-cell และ macrophage แล้ว vascular endothelial cell ของเส้นเลือดบริเวณ islet อาจมีส่วนช่วยทำลายเซลล์เบต้า โดยหลั่ง IL-1, IL-6 และ adhesion molecule ซึ่ง adhesion molecule จะทำให้ macrophage และ lymphocyte เคลื่อนย้ายมาบริเวณ islet มากขึ้น เมื่อเซลล์เบต้าถูกทำลายมากกว่า 80% และการทำลายยังดำเนินต่อไป จึงส่งผลทำให้มีระดับอินซูลินต่ำลง ระดับน้ำตาลในเลือดก็จะสูงขึ้น อัตราการทำลายเซลล์เบต้ามีได้แตกต่างกัน กล่าวคือในผู้ป่วยบางคนอาจเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว (มักพบในเด็ก) และในบางคนอาจจะช้า (มักพบในผู้ใหญ่) (Zimmet et al. 1994) ดังนั้นการเกิดความพร่องในการหลั่งอินซูลิน จึงทำให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มีการตอบสนองต่อการให้อินซูลินในการรักษา ซึ่งอินซูลินที่ให้เข้าไปจะส่งผลทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงกลับสู่ภาวะใกล้เคียงกับภาวะปกติมากที่สุด และสามารถช่วยป้องกันการเกิดภาวะ ketoacidosis เนื่องจากโรคเบาหวานชนิดนี้มีแนวโน้มในการเกิด ketoacidosis ได้ง่าย

2. โรคเบาหวานชนิดที่ 2 (Type 2 Diabetes Mellitus หรือ T2DM) เกิดจากกลไกความผิดปกติที่สำคัญคือ ภาวะการดื้ออินซูลิน (insulin resistance) และการหลั่งอินซูลิน (insulin secretion) จากเซลล์เบต้าของตับอ่อนลดลง เนื่องจากการมีภาวะดื้ออินซูลินเพียงอย่างเดียวจะไม่ทำให้เกิดระดับน้ำตาลในเลือดสูงได้ตราบดีที่เซลล์เบต้าหลั่งอินซูลินได้มากพอ ส่วนกระบวนการสร้างกลูโคสจากตับเพิ่มขึ้น (gluconeogenesis) ส่วนใหญ่เป็นผลมาจากการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อนลดลง (WHO, 1999; De Fronzo et al.1983) ภาวะดื้ออินซูลิน (insulin resistance) มีผลทำให้ความสามารถในการนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ได้ลดลง เนื้อเยื่อของอวัยวะในร่างกายที่มีความเกี่ยวข้องกับภาวะดื้ออินซูลินได้แก่ เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรักษาความสมดุลของกลูโคส ประกอบด้วย กล้ามเนื้อลาย ไขมัน และตับ แต่เนื้อเยื่อที่สำคัญที่สุดซึ่งพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ กล้ามเนื้อลาย โดยในคนปกติกล้ามเนื้อลายเป็นเนื้อเยื่อที่มีความจำเป็นต้องอาศัยอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยจับกับตัวรับของอินซูลินซึ่งเป็น trans-membrane receptor จากนั้นทำการกระตุ้นให้เกิด autophosphorylation ของ tyrosine kinase ไปกระตุ้น phospho-inositide-3 kinase และ kinase อื่นๆ ส่งผลทำให้มีการเคลื่อนย้ายของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 (GLUT-4) ไปที่ผิวเซลล์เพื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อลาย (ภาพที่ 2.1) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ความผิดปกติที่พบส่วนใหญ่ของการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 อยู่ที่กระบวนการเคลื่อนย้ายตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 ไปยังบริเวณผิวเซลล์ลดลง จึงส่งผลทำให้การขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดลง (Shepherd et al. 1999) ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้แก่ พันธุกรรม ความอ้วน ขาดการออกกำลังกาย และสภาพแวดล้อมในครอบครัวมารดา ส่วนความผิดปกติในการหลั่งอินซูลิน สาเหตุหนึ่งมาจากผู้ป่วยที่มีภาวะดื้ออินซูลินที่มากขึ้นส่งผลทำให้การหลั่งอินซูลินลดลงตามมา สำหรับการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักจะไม่จำเป็นต้องได้รับอินซูลินในระยะแรก แต่ในระยะหลังการดำเนินของโรคอาจจำเป็นต้องได้รับอินซูลินร่วมกับยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เพื่อควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในภาวะใกล้เคียงกับภาวะปกติให้มากที่สุด การวินิจฉัยของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 มักจะไม่ได้รับการวินิจฉัยตั้งแต่วัยแรกเนื่องจากภาวะน้ำตาลในเลือดจะเกิดขึ้นช้าๆและส่วนใหญ่ในระยะแรกจะไม่พบว่ามีอาการผิดปกติที่สำคัญผู้ป่วยที่ไม่มีอาการของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 แต่พบรายงานการศึกษาพบว่า การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเล็กน้อยมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อนทางหลอดเลือดทั้งชนิด macrovascular และ microvascular ได้ (Fujimoto et al. 1987)

3. โรคเบาหวานชนิดที่เกิดจากสาเหตุอื่น (other specific types of diabetes) ได้แก่

3.1) ความผิดปกติทางพันธุกรรมจากเซลล์เบต้าของตับอ่อน ซึ่งจะพบในคนอายุน้อย (มักต่ำกว่า 25 ปี) และอาการไม่รุนแรง ถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์แบบ autosomal dominant

3.2) ความผิดปกติทางพันธุกรรมของการออกฤทธิ์ของอินซูลิน ซึ่งพบได้น้อยมาก ได้แก่ การกลายพันธุ์ของตัวรับอินซูลิน ซึ่งผู้ป่วยบางรายพบร่วมกับภาวะ acanthosis nigricans, polycystic ovaries (Dunaif et al. 1992; Kahn et al. 1976)

3.3) โรคของตับอ่อน (exocrine pancreas) การทำลายตับอ่อนไม่ว่าจากการอักเสบ (pancreatitis) trauma การติดเชื้อ การผ่าตัดตับอ่อน มะเร็งตับอ่อน cystic fibrosis และ hemochromatosis สามารถก่อให้เกิดโรคเบาหวานได้

3.4) โรคทางต่อมไร้ท่อฮอร์โมนบางตัวในร่างกายมีฤทธิ์ต้านอินซูลิน ได้แก่ growth hormone, cortisol, glucagon และ epinephrine เนื่องจากที่สร้างฮอร์โมนดังกล่าว ทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ ส่วนนี้ออกที่สร้างฮอร์โมน somatostatin และ aldosterone สามารถทำให้เกิดเบาหวานได้ จากการที่ระดับไปแตสเซียมต่ำมีผลยับยั้งการหลั่งอินซูลิน

3.5) ยาหรือสารเคมีบางอย่าง อาจสามารถส่งผลทำให้เกิดโรคเบาหวานได้ โดยส่งทำให้การหลั่งอินซูลินลดลง เช่น pentamidine vacor และ α -interferon นอกจากนี้ยาบางอย่างยังมีฤทธิ์ต้านอินซูลิน ได้แก่ nicotinic acid และ glucocorticoids

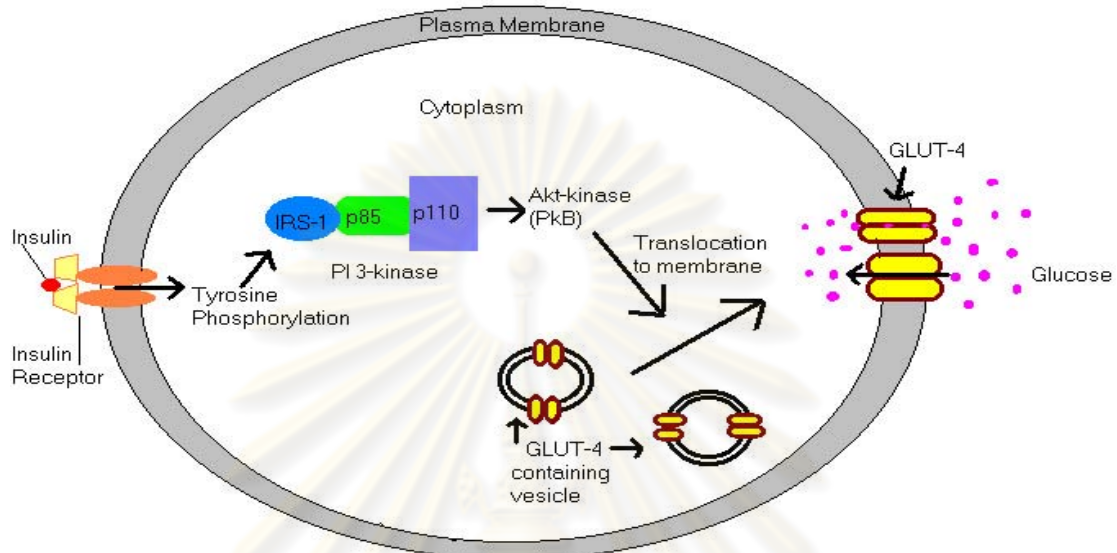
3.6) โรคติดเชื้อ หรือโรคที่พบได้น้อยมาก เช่น anti-insulin receptor antibodies

3.8) โรคทางพันธุกรรม ที่มีความสัมพันธ์กับโรคเบาหวาน เช่น down syndrome และ tumor syndrome

4. โรคเบาหวานชนิดที่เกิดขณะตั้งครรภ์ (Gestational Diabetes Mellitus, GDM)

การวินิจฉัยโรคทำได้โดยการตรวจระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาจากหลอดเลือดดำที่เวลา 2 ชั่วโมงหลังดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม (75 g OGTT) และใช้ค่าพลาสมาไกลโคสขณะอดอาหาร ผลที่ได้อยู่ในเกณฑ์ Impaired glucose tolerance (IGT) ของผู้ไม่ตั้งครรภ์ (FPG =100-125 mg/dl และ/หรือ 2h-PG =140-199 mg/dl) หรือเข้าเกณฑ์ของโรคเบาหวานสำหรับผู้ไม่ตั้งครรภ์ (FPG >126 mg/dl.และ/หรือ 2h-PG > 200 mg/dl) (Alberti et al. 1998)

Insulin Signaling Pathway for Glucose Transport Chain



ภาพที่ 2.1 แสดงกลไกการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยผ่านตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4

Available from : <http://www.student.biology.arizona.edu.html>[2009, April 10]

5. สรีรวิทยาของการควบคุมระดับกลูโคสในเลือด

1. ความเข้มข้นของระดับกลูโคสในเลือดถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนอินซูลินซึ่งมีความจำเพาะต่อตัวรับ และระบบตัวขนส่งไปยังอวัยวะเป้าหมาย

ฮอร์โมนอินซูลินที่สร้างจากเซลล์เบต้าของตับอ่อนนั้นมีอายุสั้นอยู่ในกระแสเลือดเพียงไม่กี่นาที่ ระดับอินซูลินใน portal vein และ systemic circulation จะมีค่าเปลี่ยนแปลงตามมื้ออาหาร และระดับน้ำตาลในเลือด ในภาวะอดอาหารมีการหลั่งอินซูลินขนาดน้อยๆ เรียกว่าระดับอินซูลินพื้นฐาน (basal insulin) เมื่อมีการรับประทานอาหาร ระดับอินซูลินจะสูงอย่างรวดเร็ว เรียกว่าอินซูลินมื้ออาหาร (prandial insulin) ฮอร์โมนอินซูลินมีบทบาททำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดลดลง โดยไปจับกับตัวรับอินซูลิน (insulin receptor) บริเวณผิวเซลล์ที่มีความจำเพาะต่ออินซูลินโดยเฉพาะ คือ บริเวณส่วนของ α -subunits ซึ่งมีส่วนที่ยื่นเข้าไปในเซลล์และที่ส่วนหางจะมีเอนไซม์ tyrosine kinase จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดกระบวนการ autophosphorylation โปรตีนตัวแรกที่จะถูก phosphorylate คือ insulin receptor-substrate 1 (IRS-1) และ IRS-2

การ phosphorylate IRS-1 จะกระตุ้น GTPase และ โปรตีน kinase ต่างๆ ที่มีบทบาทในการควบคุมการแบ่งตัวและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆ หลายชนิดในการทำงาน ของ tyrosine kinase หลังจากนั้นจะไปกระตุ้น phospho-inositide-3 kinase และ kinase อื่นๆ ทำให้มีการเคลื่อนย้ายของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 (GLUT-4) ไปที่ผิวเซลล์เพื่อนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยการแตกหน่อ (budding) ของ clathrin-coated vesicles ออกจาก plasma membrane และนำไปเก็บไว้ใน vesicle ใหม่ ส่วน insulin substrate complex จะถูกนำเข้าสู่เซลล์ เพื่อที่จะส่งไปยัง lysosome เพื่อทำการแยกฮอร์โมนอินซูลินออกจากตัวรับของอินซูลินและนำตัวรับของอินซูลินกลับไปใช้ใหม่ (Caro et al. 2000) จากนั้นฮอร์โมนอินซูลินจึงนำน้ำตาลกลูโคสไปใช้ประโยชน์ต่อไป หรือนำไปเก็บไว้ในอวัยวะต่างๆในร่างกาย ได้แก่ เซลล์ตับ (hepatocytes) เซลล์ไขมัน (adipocytes) และเซลล์กล้ามเนื้อ (myocytes) โดยไปกระตุ้นเอนไซม์ในเซลล์ตับให้ทำงานเพื่อที่จะทำการเปลี่ยนกลูโคสให้ไปเป็นไกลโคเจน (glycogen synthesis) หรือไปลดกระบวนการ gluconeogenesis ส่วนการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ประสาท (neurons) เซลล์เม็ดเลือดขาว (leucocytes) เซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocytes) และเกล็ดเลือด (platelets) ไม่จำเป็นต้องอาศัยอินซูลิน

2. กลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ต่างๆของร่างกายได้นั้นจำเป็นต้องอาศัยกลุ่มของโปรตีนที่เรียกว่าตัวขนส่งกลูโคส (glucose transporter; GLUT1 ถึง GLUT-7) เช่น ฮอร์โมนอินซูลินจะนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมันผ่านทาง GLUT-4 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคสแสดงไว้ดังตารางที่ 2.1

3. กลูคากอน (glucagon) ทำหน้าที่กระตุ้นทำให้เกิดกระบวนการ gluconogenesis และ glucoenolysis ทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสสูงขึ้น

4. แคทีโคลามีน (catecholamine) ในเลือด โดยผ่านกลไกดังนี้

4.1 α_1 - adrenergic ทำหน้าที่โดยไปกระตุ้นต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) ให้มีการหลั่งโกรทฮอร์โมน (growth hormone) เพิ่มมากขึ้น

4.2 α_2 - adrenergic กระตุ้นเซลล์เบต้าในตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินลดลง ดังนั้นการนำกลูโคสไปใช้ในเซลล์ตับ เซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ไขมันจึงลดลง

4.3 β_1 - adrenergic ยับยั้งเซลล์เบต้าในตับอ่อนให้หลั่งอินซูลินเพิ่มมากขึ้น

4.4 β_2 -adrenergic กระตุ้นให้เซลล์ตับเกิดกระบวนการ glucoenolysis เพิ่มขึ้น

5. โกรทฮอร์โมน (growth hormone) และ โซมาโตโทรปิน (somatotropin) ทำให้ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากทำให้กลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อและเซลล์ไขมันลดลง

6. คอร์ติซอล (cortisol) เป็นฮอร์โมนที่มีฤทธิ์ทำให้ระดับกลูโคสในเลือดเพิ่มมากขึ้น โดยกระตุ้นกระบวนการ gluconogenesis

ตารางที่ 2.1 ชนิดและหน้าที่ของตัวขนส่งกลูโคส

ชนิด	เนื้อเยื่อ	หน้าที่
GLUT-1	เนื้อเยื่อทุกชนิดโดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดแดง สมอง	นำกลูโคสผ่าน blood brain barrier
GLUT-2	เซลล์เบต้าของตับอ่อน ตับ ไต และทางเดินอาหาร	ควบคุมการหลังอินซูลิน และสมดุลของกลูโคส
GLUT-3	สมอง ไต รก และเนื้อเยื่ออื่นๆ	นำกลูโคสเข้าสู่เซลล์
GLUT-4	กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน	นำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ โดยกระตุ้นอินซูลิน
GLUT-5	ทางเดินอาหาร ไต	การดูดซึมฟรุคโตส
GLUT-7	ตับ เนื้อเยื่ออื่นๆ ที่สร้างกลูโคสได้	ควบคุมการไหลผ่านกลูโคสเข้าสู่ plasmic reticulum membrane

(อรพวรรณ มาตั้งคสมบตี, 2544)

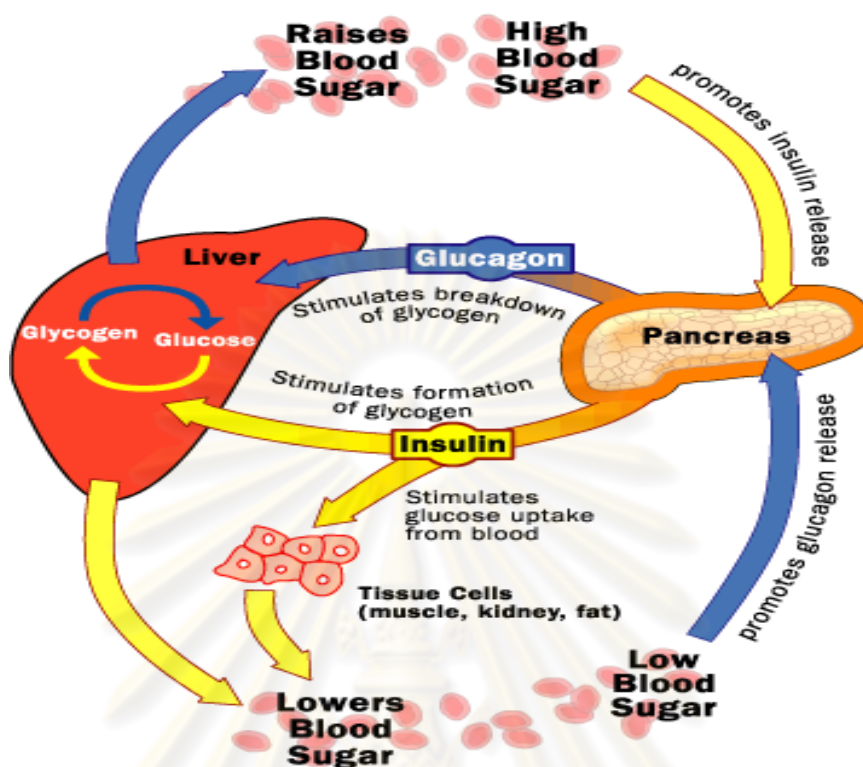
6. Glucose homeostasis ในคนปกติ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ระยะ (ภาพที่ 2.2) ดังนี้

6.1 ระยะหลังรับประทานอาหาร (fed stage) ในระยะนี้ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นรวมทั้ง gastrointestinal hormone โดยเฉพาะ gastric inhibitory polypeptide และ glucagon-like peptide-1 จะกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อน ระดับกลูโคสและระดับอินซูลินที่สูงขึ้นจะไปยับยั้งกระบวนการ gluconeogenesis และ glycogenolysis ที่ตับและขณะเดียวกันจะกระตุ้นเอนไซม์ glycogen synthase ให้มีการสะสมไกลโคเจน (glycogen) และยับยั้งกระบวนการ proteolysis และ lipolysis กลูโคสในเลือดจะถูกใช้โดยเนื้อเยื่อที่อาศัยอินซูลิน โดยเฉพาะกล้ามเนื้อลาย

6.2 ระยะอดอาหาร (fast stage) ในระยะนี้ประมาณร้อยละ 70 ของกลูโคสจะถูกใช้โดยเนื้อเยื่อที่ไม่อาศัยอินซูลิน โดยเฉพาะสมองซึ่งต้องการกลูโคสตลอดเวลา เนื่องจากร่างกายไม่ได้รับกลูโคสจากภายนอก ดังนั้นร่างกายจึงจำเป็นต้องสลายกลูโคสออกจากตับโดยอาศัยกระบวนการ glycogenolysis และ gluconeogenesis เพื่อรักษาระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในเกณฑ์ปกติ จะเห็นได้ว่าอวัยวะที่มีความสำคัญในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดมีอยู่ 3 แห่ง ได้แก่ เซลล์เบต้าของตับอ่อน กล้ามเนื้อลาย และตับ

ซึ่งถ้าหากเซลล์เบต้าจากตับอ่อนหลั่งอินซูลินไม่เพียงพอ และกล้ามเนื้อลายไม่สามารถนำกลูโคสเข้าเซลล์ได้ และตับสร้างกลูโคสออกมามากเกินไป ก็จะทำให้เกิดความผิดปกติของระดับน้ำตาลในเลือดได้

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.2 แสดงการควบคุมระดับกลูโคสในเลือด

Available from : <http://www.Kettering.edu>[2009, April 10]

7. ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงในผู้ป่วยโรคเบาหวาน แบ่งได้ดังนี้

1. ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้นในขณะช่วงที่มีการอดอาหารหรือก่อนรับประทานอาหาร (fasting hyperglycemia) ซึ่งส่วนใหญ่เกิดจากการสร้างและปลดปล่อยน้ำตาลจากตับโดยขึ้นกับระดับอินซูลินพื้นฐานในช่วงที่อดอาหารหรือขณะนอนหลับ

2. ระดับน้ำตาลในเลือดสูงภายหลังอาหาร (postprandial hyperglycemia) ซึ่งขึ้นอยู่กั ชนิดและปริมาณอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรตที่รับประทาน รวมทั้งการสร้างและการหลั่งอินซูลิน เมื่อได้รับการกระตุ้น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กัความสามารถของเซลล์ตับ กล้ามเนื้อ และไขมันในการเก็บกักน้ำตาลกลูโคส (Ceriello, 2005) ซึ่งระดับน้ำตาลหลังอาหารมีความสำคัญมากต่อการนำไปสู่ภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาจากโรคเบาหวาน และนอกจากนี้้อาจจะเป็นปัจจัยหนึ่งทีส่งผลให้ผู้ป่วยที่มีภาวะ impaired glucose tolerance พัฒนาไปเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ในที่สุด (Salmeron et al.1997)

8. ความสำคัญของภาวะน้ำตาลในเลือดสูงภายหลังการรับประทานอาหาร (postprandial hyperglycemia)

จากหลักฐานการศึกษามากมายในปัจจุบันแสดงให้เห็นว่า ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงหลังอาหารมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (atherosclerosis) ส่วนหนึ่งมีสาเหตุเกิดมาจากกลไกความผิดปกติของหลอดเลือดร่วมกับภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูงภายหลังอาหาร โดยมีการศึกษากันมากในระยะเวลาหลังเชื่อว่าการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงหลังอาหารร่วมกับการมีกรดไขมันอิสระ (free fatty acids) ที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วมีผลทำให้เกิด free radical เพิ่มมากขึ้น ส่งผลทำให้ endothelial cell ทำการผิดปกติ และเกิดการเสื่อมสภาพของหลอดเลือดในที่สุด (James, 2001)

จากรายงานการศึกษาด้านระบาดวิทยาได้แสดงให้เห็นว่า postprandial hyperglycemia เป็นปัจจัยทั้งทางตรงและทางอ้อมที่ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดและหัวใจ ดังนั้นถ้าหากควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดภายหลังการรับประทานอาหารได้ ย่อมส่งผลทำให้ชะลอหรือลดอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวได้เช่นกัน (DECODE Study Group, 2001)

การศึกษาในระยะต่อมาแสดงให้เห็นว่า การพยายามลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารสามารถลดอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ โดยได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็น impaired glucose tolerance ให้การรักษาด้วยยากกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitors (acarbose) จากการศึกษาพบว่า สามารถลดอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ 36% (Kann et al. 2006) ลดความเสี่ยงต่อการเกิดความดันโลหิตสูงได้ 34% และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ 49% จากจำนวนผู้ป่วยตัวอย่างทั้งหมด (Garber et al., 2006)

นอกจากระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงส่งผลทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ตามมาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ระดับ HbA_{1c} ในเลือดที่สูงขึ้นพบว่า ยังเป็นปัจจัยสำคัญในการส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 เช่นเดียวกัน และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมื่อระดับ HbA_{1c} สูงขึ้น 1% ส่งผลให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจประมาณ 10% (Stratton et al. 2000) และหากผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 สามารถควบคุมระดับ postprandial hyperglycemia ได้ย่อมส่งผลช่วยลดระดับ HbA_{1c} ในเลือดได้เช่นเดียวกัน

ดังนั้นผู้ป่วยโรคเบาหวานจำเป็นต้องควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติให้มากที่สุดทั้งก่อนและหลังอาหาร (Rohlfing et al. 2002; Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993) รวมทั้งยังต้องควบคุมระดับ HbA_{1c} ให้มีระดับใกล้เคียงกับภาวะปกติเช่นเดียวกัน เพื่อป้องกันการเกิดโรคแทรกซ้อนต่างๆ รวมทั้งยังส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีสุขภาพชีวิตที่ดีอายุยืนยาวยิ่งขึ้น ซึ่งในการรักษาโรคเบาหวานนอกเหนือจากการควบคุมอาหาร การออกกำลังกาย ยังมีการรักษาโดยการให้ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดร่วมด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของโรคเบาหวาน ระดับน้ำตาลในเลือด และสภาพร่างกายผู้ป่วย นำมาใช้ร่วมกันเพื่อพิจารณาเลือกวิธีที่ดีที่สุดในการรักษาผู้ป่วยแต่ละราย

9. ระบาดวิทยาภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวาน

อัตราความชุกชุมของภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ในผู้ป่วยโรคเบาหวานในประเทศไทยส่วนใหญ่ (มากกว่าร้อยละ 90) เป็นผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และการศึกษาของ Diabetes care Thailand ทั่วประเทศเมื่อปี พ.ศ 2541 ในคลินิกเบาหวาน 26 แห่งรวมจำนวนผู้ป่วยทั้งสิ้น 2,379 ราย มีการตรวจโรคแทรกซ้อนต่างๆ ของโรคเบาหวาน สรุปได้ว่า neuropathy และ retinopathy เป็นโรคแทรกซ้อนที่พบได้บ่อย รองลงมาคือ nephropathy ส่วน macroangiopathy พบได้น้อยกว่ามาก (Tandhanand et al. 2001) ผลการศึกษาของ Thai Muticenter Reseach Group on Diabetes Mellitus ปี 1994 พบว่าการควบคุมเบาหวานและระยะเวลาการเป็นโรคเบาหวานมีความสัมพันธ์กับภาวะ microvascular complication ส่วน macrovascular complication สัมพันธ์กับอายุที่มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า ภาวะระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารสูงมีความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะ macrovascular complication เพิ่มขึ้น (DECODE study group, 1999; Ceriello et al. 2003; Hoffmann et al. 1991)

ศูนย์วิทยุโทรพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

10. ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

ยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดที่ใช้ 2 กลุ่มได้แก่ ยาฉีดอินซูลินและยาเม็ดรับประทาน สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ต้องฉีดอินซูลินเป็นหลัก ในบางรายอาจจำเป็นต้องเสริมยากิน พร้อมกับให้ความรู้เกี่ยวกับโรคเบาหวาน ยาและอุปกรณ์ที่ใช้ การดูแลตนเอง รวมทั้งอาหารและการออกกำลังกายอย่างเพียงพอ สำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ส่วนหนึ่งเริ่มการรักษาด้วยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรมชีวิต คือ การควบคุมอาหาร และการออกกำลังกายก่อน หากควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดไม่ได้ตามเป้าหมายจึงเริ่มให้ยา โดยเลือกยาให้เหมาะสมกับผู้ป่วยแต่ละราย ในบางกรณีจำเป็นต้องเริ่มยาลดระดับน้ำตาลตั้งแต่แรก ซึ่งอาจเป็นยากินหรือยาฉีด ขึ้นกับระดับน้ำตาลในเลือดและสภาวะเจ็บป่วยอื่นๆ ที่อาจร่วมด้วย (ADA, 2007; Clinical Guidelines Task Force, 2005; ACE/ ACED, 2007)

ยาฉีดอินซูลิน

อินซูลินเป็นยาที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ทุกราย นอกจากนั้นยังจำเป็นต้องใช้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ไม่ตอบสนองต่อยาเม็ดรับประทานหรือเกิดการดื้อยา จึงมีความจำเป็นต้องรักษาด้วยการให้อินซูลินร่วมด้วย จุดประสงค์ของการใช้อินซูลินในผู้ป่วยเบาหวานเพื่อที่จะเลียนแบบการหลั่งอินซูลินจากเบต้าเซลล์ของตับอ่อน หวังผลที่จะควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติมากที่สุด อินซูลินที่ใช้อยู่ในปัจจุบันสังเคราะห์ขึ้นโดยอาศัยกระบวนการทางพันธุวิศวกรรมศาสตร์ มีโครงสร้างเช่นเดียวกับอินซูลินที่ร่างกายคนสร้างขึ้นมา เรียกว่า human insulin ระยะเวลาหลังได้มีการดัดแปลง human insulin ให้มีการออกฤทธิ์ตามต้องการเรียกอินซูลินที่ดัดแปลงนี้ว่า insulin analog อินซูลินแบ่งเป็น 4 ชนิด ตามระยะเวลาการออกฤทธิ์คือ

1. อินซูลินออกฤทธิ์สั้น (short acting หรือ regular human insulin, RI) เป็นอินซูลินมาตรฐาน มีส่วนผสมของซิงค์คลอไรด์ (zinc chlorides) อยู่ในรูปผลึก ใสไม่มีสี เป็นพิษต่อหัวใจ ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ กล้ามเนื้อ และใต้ผิวหนัง ตัวอย่างยา ได้แก่ Actrapid, Humulin R, Gensulin R

2. อินซูลินออกฤทธิ์ปานกลาง (intermediate acting insulin, NPH) เป็นอินซูลินมาตรฐานที่ใช้กันทั่วไป มีส่วนผสมของซิงค์คลอไรด์ และโปรตามีนซัลเฟต (protamine sulphate) เป็นผลึกรูปแท่ง สีขาว คล้ายนํ้านมอยู่ในน้ำ มีฤทธิ์เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้ฉีดเข้าใต้ผิวหนัง ตัวอย่างยา ได้แก่ Insulatard, Humulin N, Gensulin N

3. อินซูลินออกฤทธิ์เร็ว (rapid acting insulin analog, RAA) เป็นอินซูลินรุ่นใหม่ที่เกิดจากการดัดแปลงกรดอะมิโนที่สายของอินซูลิน สามารถนำมาใช้ลดระดับน้ำตาลในเลือดได้เร็วกว่าอินซูลินมาตรฐาน ลดการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ได้ 20-30 เปอร์เซ็นต์ สามารถลดระดับ HbA_{1c} ได้ 7.2-8.9 เปอร์เซ็นต์ (Hanefeld, 1998) ตัวอย่างยา ได้แก่ lispro insulin, aspart insulin

4. อินซูลินออกฤทธิ์ยาว (long acting insulin analog, LAA) เป็นอินซูลินรุ่นใหม่ที่เกิดจากการดัดแปลงกรดอะมิโนที่สายของอินซูลินเช่นกัน ได้แก่ glargine insulin หรือได้จากการเสริมแต่งสายของอินซูลินด้วยกรดไขมัน เช่น insulin detemir

อาการไม่พึงประสงค์ที่สำคัญของการให้อินซูลินคือ ความเสี่ยงต่อการเกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) ผู้ป่วยและญาติมักจะพยายามแก้ปัญหาโดยการให้รับประทานอาหารที่มากขึ้น ซึ่งทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น (Carver, 2006) และภาวะน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นที่สัมพันธ์กับอินซูลิน จะทำให้ผู้ป่วยเสี่ยงต่อโรคหลอดเลือดและหัวใจที่สืบเนื่องมาจากน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นทำให้ภาวะดื้ออินซูลินแย่งความดันโลหิตและไขมันในเลือดเพิ่มขึ้น (Prumell, 1998; Ridderstrale, 2006)

ยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทาน (oral hypoglycemic agents) ที่ได้รับอนุมัติการใช้จากคณะกรรมการอาหารและยาแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ตามกลไกการออกฤทธิ์ ได้แก่

1. กลุ่มที่กระตุ้นให้มีการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อนเพิ่มขึ้น (insulin secretagogue) แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

1.1 sulfonylurea มีกลไกการออกฤทธิ์คือ กระตุ้นให้เซลล์เบต้าของตับอ่อนมีการหลั่งอินซูลิน (Malaisse et al. 1990) ตั้งแต่เริ่มให้ยาจนถึงระหว่างการทำยา ยาจะทำให้ nutrient-stimulated-insulin หลั่งเพิ่มมากขึ้น ผลตามมามีคือ การทำงานของอินซูลินดีขึ้น

ฤทธิ์ไม่พึงประสงค์ของ sulfonylurea ปัญหาที่พบบ่อยและสำคัญที่สุดยังคงเป็นเรื่องภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ ปัจจัยที่ผลทำให้เกิดมีมากมาย ตัวอย่างเช่น อายุมาก (มากกว่า 70 ปีขึ้นไป) โรคขาดสารอาหารหรือรับประทานอาหารได้น้อย โรคตับไตพิการ ต่อมแอลกอฮอล์มากเกินไป รับประทานยาที่มีผลทำยาออกฤทธิ์ยาวขึ้นโดยไม่ได้รับยา ท้องเสีย อาเจียน รับประทานอาหารไม่เป็นเวลา ออกกำลังกายหักโหมหลังรับประทานยาโดยไม่ได้รับปริมาณอาหาร เป็นต้น

1.2 Non-sulfonylurea insulin secretagogues เป็นยาในกลุ่มใหม่ที่มีการกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อน ซึ่งมีสูตรโครงสร้างแตกต่างจาก sulfonylurea ผู้ป่วยจะตอบสนองต่อยานี้จะต้องมีเซลล์เบต้าที่ยังสามารถผลิตอินซูลินได้ จึงต้องเป็นผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และถ้าจะได้ผลดีต้องเป็นผู้ป่วยที่เพิ่งได้รับการวินิจฉัยมาไม่นาน ยาตัวแรกในกลุ่มนี้คือ repaglinide เป็น meglitinide analog กลไกในการออกฤทธิ์คือ กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์เบต้าของตับอ่อนโดยจับกับตัวรับที่ผนังเซลล์เบต้าคนละตำแหน่งกับจุดที่ยาซัลโฟนิลยูเรียออกฤทธิ์ (DeFronzo, 1999)

คุณสมบัติที่เด่นและแตกต่างจาก sulfonylurea คือ ยาจะออกฤทธิ์ได้เร็วและสั้นกว่า sulfonylurea เหมาะสำหรับใช้ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหาร จากการศึกษาที่ผ่านมาในหลอดทดลองพบว่า repaglinide มีความแตกต่างจาก glibenclamide คือ ยาจะไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เบต้าหลั่งอินซูลินได้ถ้าหากไม่มีกลูโคสอยู่ด้วย (DeFronzo, 1999; Owens et al. 2000) ในผู้ป่วยไตพิการไม่มากอาจใช้ยานี้ได้ แต่ควรเริ่มด้วยยาในขนาดต่ำที่สุดคือ 0.5 มก. ในผู้ป่วยสูงอายุก็สามารถใช้ยานี้โดยไม่มีปัญหา ข้อห้ามใช้ ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 1 ผู้ป่วยที่ตั้งครรภ์และให้นมบุตร มีภูมิไวต่อยาในกลุ่มนี้ ตับหรือไตพิการอย่างรุนแรง และภาวะ ketoacidosis

อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาในกลุ่มนี้คือ เกิดภาวะน้ำตาลต่ำ (hypoglycemia) บางรายอาจตาพร่ามัว คลื่นไส้ ท้องเสีย หรือมีระดับเฮโมโกลบินต่ำเล็กน้อยชั่วคราว

2 กลุ่มที่ลดภาวะดื้ออินซูลิน แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มได้แก่

2.1 Biguanide ปัจจุบันยาในกลุ่มนี้มีใช้กันอย่างแพร่หลายคือ metformin

metformin มีกลไกการออกฤทธิ์ สรุปลงได้ดังนี้คือ มีฤทธิ์ยับยั้งการปล่อยกลูโคสออกจากตับ โดยลดกระบวนการกลูโคเนโอเจเนซิสในคน (Hundal et al. 2000) ซึ่งเป็นกลไกสำคัญทำให้ FPG ลดลง มีฤทธิ์เพิ่ม peripheral glucose uptake ซึ่งเป็นกลไกหลักในการลดระดับกลูโคสหลังอาหาร โดยความไวของตัวรับต่ออินซูลินที่กล้ามเนื้อจะเพิ่มมากขึ้น เพิ่ม insulin receptor tyrosine kinase activity เพิ่มตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 ทั้งจำนวนและ activity รวมทั้งเพิ่มการสังเคราะห์ไกลโคเจน แต่ในขณะนี้ยังไม่พบตัวรับทั้งในกล้ามเนื้อและตับของ metformin (DeFronzo et al. 1999)

อาการไม่พึงประสงค์ของยามี 2 ประการที่สำคัญ ได้แก่ อาการเกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร พบได้ร้อยละ 20-25 ของผู้ป่วย ได้แก่ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้หยุดยา และเกิดภาวะ lactic acidosis คือ มีการสะสมของกรดแลคติก ซึ่งปัจจัยที่ทำให้เกิดภาวะนี้คือ ไตพิการขับแลคเตด (lactate) ไม่ได้ หรือผู้มีการล้มเหลวของระบบหัวใจและการไหลเวียน ระบบการหายใจ เป็นต้น

2.2 Thiazolidinedione ตัวอย่างยาเช่น pioglitazone rosiglitazone เป็นต้น ยากลุ่มนี้สามารถลดภาวะดื้ออินซูลินที่เนื้อเยื่อที่ออกฤทธิ์ คือ กล้ามเนื้อลาย ไขมัน และตับ โดยไปเพิ่ม insulin sensitivity ที่เซลล์กล้ามเนื้อ ตับและไขมัน (Fujiwara et al. 1988) โดยไปเพิ่ม activity ของตัวรับอินซูลิน (Kellerer et al. 1994) ทำให้ลดภาวะดื้ออินซูลิน และลด hepatic glucose production (Kuzuya et al. 1991)

นอกจากนี้ยากลุ่มนี้ยังมีผลลดระดับไตรกลีเซอไรด์ และเพิ่มระดับ โคเลสเตอรอล ชนิด HDL ได้เล็กน้อย (Suter et al. 1995) thiazolidinedione เป็นกลุ่มยาตัวเล็กรึ่งหนึ่งสำหรับผู้ป่วยที่ไม่สามารถใช้ยา metformin ได้ การให้ยาสามารถให้ก่อนหรือหลังอาหารได้โดยไม่ต้องทำการลดขนาดยาในผู้สูงอายุ และสามารถใช้ได้กับผู้ป่วยไตเสื่อม

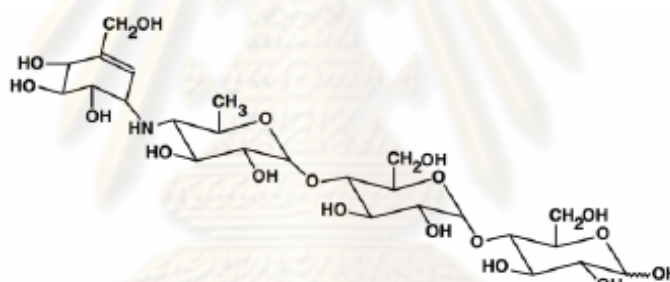
อาการไม่พึงประสงค์จากยากลุ่มนี้ พบการคั่งของสวมน้ำ เกิดภาวะบวม ร้อยละ 15.3 ในผู้ป่วย เมื่อให้ร่วมกับอินซูลิน และพบร้อยละ 7 เมื่อให้ตัวเดียว (Clinician' manual on insulin resistance, 2002) ส่งผลทำให้น้ำหนักตัวเพิ่ม 2-4 กิโลกรัมทุกราย สำหรับปริมาณไขมันที่เพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 8 (Lebovitz, 2001) ดังนั้นไม่ควรใช้ในผู้ที่มีภาวะหัวใจล้มเหลว

3. ยากลุ่มที่มีผลยับยั้งเอนไซม์การดูดซึมกลูโคสจากลำไส้ (alpha-glucosidase inhibitor)

ยาชนิดแรกที่น่าเข้ามาคือ อะคาร์โบส (acarbose) เป็น complex oligosaccharide ซึ่งเกิดจากกระบวนการ fermentation ของแบคทีเรีย *Actinoplanes utahensis* acarbose มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายคลึงกับ oligosaccharide ของแป้ง (ภาพที่ 2.3) ซึ่งอาจเรียกได้ว่าเป็น pseudotetrasaccharide ยานี้จะออกฤทธิ์โดยจะแย่งจับกับเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ที่บริเวณ brushed border ของผนังลำไส้เล็ก การยับยั้งนี้เป็นชนิดแข่งขันและผันกลับได้ (reversible and competitive inhibition) ซึ่งจะชะลอการดูดซึมคาร์โบไฮเดรต ส่งผลให้ระดับน้ำตาลหลังอาหารลดลง (Hollander, 1992; Coniff et al. 1994) เมื่อเอนไซม์ถูกยับยั้งส่งผลทำให้ไม่มีเอนไซม์ไปย่อยแป้งและ polysaccharide ไปเป็น monosaccharide ได้ภายในอณูของยา acarbose จะมีไนโตรเจนอะตอมซึ่งตัวมันเองไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์หลังจากจับกับเอนไซม์อยู่ระยะหนึ่ง

จะถูกปล่อยออกมาไปจับกับเอนไซม์อื่นๆในลำไส้ เอนไซม์ที่ถูกยับยั้งการทำงานโดยยากกลุ่มนี้ ได้แก่ pancreatic amylase, glucoamylase, maltase, sucrase และ dextrinase ยานี้จะไม่มีผลต่อ lactase จึงไม่มีผลต่อ lactose intolerance ที่สำคัญยากกลุ่มนี้ไม่มีผลต่อการดูดซึมของกลูโคส และฟรุคโตส ซึ่งเป็น monosaccharide (Clissold et al. 1995) แป้งที่ไม่ถูกดูดซึมจะถูก ferment ที่บริเวณลำไส้ใหญ่กลายเป็น short chain fatty acid ไฮโดรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และ มีเทน เนื่องจากกรดไขมันชนิด short chain สามารถถูกดูดซึมได้ที่ลำไส้ใหญ่ จึงไม่มีการสูญเสียแคลอรีโดยรวม

การออกฤทธิ์ของยา acarbose ที่บริเวณ brushed border ของผนังลำไส้เล็ก ทำให้ตัวยาถูกดูดซึมได้น้อยมาก คือ ประมาณร้อยละ 0.7 ถึง 1.6 ส่วนใหญ่ยาจะถูกขับออกทางอุจจาระโดยไม่มี การเปลี่ยนแปลง ส่วนน้อยที่ถูกดูดซึมและถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็น inactive metabolite และขับออกทางปัสสาวะ



ภาพที่ 2.3 สูตรโครงสร้างของ acarbose

Available from : <http://www.Drugs.com>[2009, April 10]

ยากกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitor อีกชนิดหนึ่งที่มีคือ voglibose ซึ่งสกัดได้มาจาก *Streptomyces hygroscopicus* เป็นยาที่ใช้กันมากในญี่ปุ่นและเกาหลี มีฤทธิ์เป็น disaccharide hydrolase inhibitors คือ ยับยั้งฤทธิ์ของ maltase dextrinase sucrase ที่บริเวณผนังลำไส้เล็ก ทำให้ disaccharide ไม่ถูกเปลี่ยนไปเป็น monosaccharide ทำให้ระดับน้ำตาลหลังอาหารประเภทแป้งเพิ่มขึ้นน้อยลง แต่ไม่มีผลยับยั้ง pancreatic amylase เป็นข้อแตกต่างจาก acarbose และยานี้ไม่มีผลต่อการดูดซึมของกลูโคสและฟรุคโตส ซึ่งจัดเป็น monosaccharide ขนาดสูงสุดที่ให้ คือ 0.2 มก. 3 เวลา พร้อมอาหาร

ขนาดยาและการใช้ยา

การรับประทานยาพร้อมกับอาหารมีความจำเป็นจึงจะทำให้การออกฤทธิ์ได้ดี แนะนำให้รับประทานพร้อมอาหารมื้อแรก ในระยะแรกควรให้ขนาดต่ำ เช่น ยา acarbose 25 mg วันละ 1-2 เวลา เพื่อป้องกันการเกิดอาการไม่พึงประสงค์เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหาร จากนั้นเพิ่มขนาดยาเมื่อผู้ป่วยทนยาได้โดยไม่เกิดอาการไม่พึงประสงค์ จนถึงขนาดสูงสุดคือ 100 mg วันละ 3 เวลา

ข้อบ่งชี้การใช้

ยากลุ่ม glucosidase inhibitor สามารถใช้ได้ทุกๆ ได้ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ 2 ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดไม่สูงมากเนื่องจากไม่สามารถที่จะควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ด้วยการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย หรืออาจให้รวมกันกับยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่นเพื่อช่วยลดระดับ postprandial hyperglycemia

อาการไม่พึงประสงค์

อาการไม่พึงประสงค์จากการใช้ยาควบคุมระดับน้ำตาลทำให้เกิดอาการท้องอืด แน่นท้อง ผายลม ท้องร่วง เป็นต้น ซึ่งมีสาเหตุเกิดมาจากการที่คาร์โบไฮเดรตถูกย่อยไม่สมบูรณ์เมื่อถึงลำไส้ส่วนล่างจะเกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรียทำให้เกิดก๊าซเกิดขึ้น และเมื่อให้ในขนาดที่สูงพบว่าจะมีการดูดซึมเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตจะส่งผลทำให้เกิดพิษต่อตับได้ (Andrade et al. 1996)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมื่อให้ยาอะคาร์โบสขนาดต่ำ คือ 75 มก./วัน ไม่พบอาการไม่พึงประสงค์ที่เกิดขึ้นจากยาดังกล่าว และสามารถลดระดับน้ำตาลได้อย่างมีนัยสำคัญ รวมทั้งระดับ HbA_{1c} ได้อย่างมีนัยสำคัญ คือจาก 10.6±1.0 % เป็น 9.4 ±1.3 % (Jenny et al. 1993)

ข้อห้ามใช้ยานี้ในหญิงตั้งครรภ์และให้นมบุตร รวมทั้งผู้ป่วยที่มีโรคระบบทางเดินอาหารและโรคตับร่วมด้วย

ผลการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ยา acarbose ในผู้ป่วย

จากการศึกษาในผู้ป่วยชาวไทยที่เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งไม่เคยได้รับยาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่นมาก่อน จำนวน 30 คน โดยคัดเลือกผู้ป่วยที่ควบคุมอาหารเพียงอย่างเดียวแต่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลขณะอดอาหารให้ลดลงต่ำกว่า 140 mg/dl โดยให้การรักษาโดยให้ยา acarbose ขนาด 100 mg วันละ 3 เวลา พร้อมอาหารเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ พบว่าระดับ HbA_{1c} ลดลงได้ 0.3% ระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหาร และระดับ postprandial hyperglycemia ที่เวลา 1 ถึง 2 ชั่วโมง ลดลงได้อย่างมีนัยสำคัญ แม้ว่าจะไม่มาก คือ ร้อยละ 3.9 (6.4 mg/dl) และ ร้อยละ 11.2 (9.8 mg/dl) ตามลำดับ นอกจากนี้สำหรับในการศึกษารั้งนี้ ในผู้ป่วยที่ได้รับ acarbose พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวและระดับไขมันในเลือดของผู้ป่วย (Deerochanawong et al.1996)

การศึกษาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งได้รับการรักษาด้วยยาลดระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่ม sulfonylurea และ metformin แต่ยังไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ หลังจากให้ยา acarbose ร่วมด้วย พบว่าสามารถลดระดับ postprandial hyperglycemia และระดับ HbA_{1c} ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังให้การรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน คือ 1.7% และ 59 mg/dl ตามลำดับ (Vannasaeng et al. 2002)

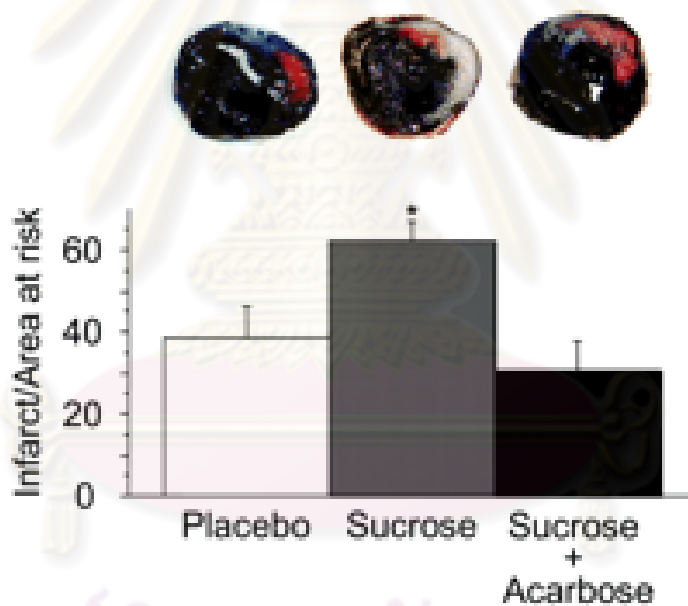
จากการศึกษาในต่างประเทศ พบว่ายา acarbose สามารถช่วยลดระดับ postprandial hyperglycemia ได้ประมาณ 40 ถึง 90 mg/dl ลดระดับน้ำตาลในเลือดขณะอดอาหารได้ 10 ถึง 40 mg/dl และลดระดับ HbA_{1c} ได้ 0.4 ถึง 1% (Tuomilehto et al. 2001; Pi-Sunyer, 1999; Vannasaeng et al. 1995; Deerochanawong et al.1996; Vichayanrat et al. 2002; Hanefeld et al. 1991)

จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ยากลุ่มนี้ดูเหมือนจะลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ไม่มากนัก แต่การศึกษาเปรียบเทียบระหว่างยาอะคาร์โบสกับยาลดระดับน้ำตาลในเลือดชนิดรับประทานกลุ่มอื่น เช่น glibenclamide และ metformin พบว่าสามารถลดระดับ HbA_{1c} ได้ใกล้เคียงกัน คือ 0.5% ถึง 1% (Hoffman et al. 1994 and 1997)

ผลการศึกษาเกี่ยวกับยาอะคาร์โบสต่อปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือด

ช่วยลดพื้นที่การตายของหลอดเลือดแดงโคโรนารีในสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยวิธีป้อน acarbose ขนาด 10 mg/kg ร่วมกับ sucrose ขนาด 4 g/kg วันละครั้ง เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่า กลุ่มให้ acarbose ร่วมกับ sucrose สามารถลดพื้นที่เสี่ยงต่อการตายของหลอดเลือดแดงโคโรนารีได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าเท่ากับ $30.7 \pm 7.2\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มให้ sucrose โดยมีค่าพื้นที่เสี่ยงต่อการตายของหลอดเลือดแดงโคโรนารีเท่ากับ $62.2 \pm 4.8\%$ (ภาพที่ 2.4) (Stefan et al. 2005)



ภาพที่ 2.4 แสดงพื้นที่เสี่ยงต่อการตายของหลอดเลือดแดงโคโรนารี (Stefan et al. 2005)

ศูนย์วิทยุทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ช่วยลดความหนาของผนังหลอดเลือดแดงในผู้ป่วยภาวะ Impaired glucose tolerance

จากการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ Impaired glucose tolerance จำนวน 132 ราย โดยให้ยา acarbose ขนาด 100 mg วันละ 3 วัน เป็นระยะเวลา 3.9 ปี พบว่ากลุ่มให้ acarbose สามารถลดความหนาของผนังหลอดเลือดแดงได้ประมาณ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มให้ยาหลอก (Markolf et al. 2004)

ช่วยลดระดับกลีเซอไรด์ในเลือด ระดับอินซูลินในพลาสมาหลังอาหาร น้ำหนักตัวในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ยา acarbose ในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ช่วยลดระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ลดระดับอินซูลินในพลาสมาหลังอาหาร และมีผลทำให้น้ำหนักตัวลดลง ซึ่งระดับระดับไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ระดับอินซูลินในพลาสมาหลังอาหาร และน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยส่งผลทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนเกี่ยวกับระบบหลอดเลือดและหัวใจได้ ดังนั้น การศึกษาดังกล่าวสามารถลดปัจจัยเหล่านั้นได้ ย่อมส่งผลทำให้การเกิดภาวะแทรกซ้อนลดลงเช่นเดียวกัน (Pi-Sunyer, 1999)

ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดความดันโลหิตสูง และโรคระบบหลอดเลือดและหัวใจ

จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับ acarbose ขนาด 100 mg 3 ครั้งต่อวัน พบว่ามีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดหัวใจลดลง (Wan Mohamad, 2005) นอกจากนี้ยังทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ Impaired glucose tolerance จำนวน 1,429 ราย ให้การรักษาด้วย acarbose ขนาด 100 mg 3 ครั้งต่อวัน จากการศึกษาพบว่า อัตราความเสี่ยงต่อการเกิดความดันโลหิตสูงได้ 34% และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ 49% จากจำนวนผู้ป่วยตัวอย่างทั้งหมด (Jean-Louis et al. 2003)

ช่วยลดความเสี่ยงการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2

จากการศึกษาโดยการให้ acarbose ขนาด 100 mg 3 ครั้งต่อวัน ในผู้ป่วยที่มีภาวะ impaired glucose tolerance พบว่าอัตราการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ลดลง 36% จากจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด (Garber et al. 2006)

จากการศึกษาในประเทศแคนาดาและในยุโรป ทำการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะ Impaired glucose tolerance จำนวนผู้ป่วยทั้งหมด 686 คน ผู้ป่วยจำนวนครึ่งหนึ่งได้รับยาหลอก และใน ส่วนที่เหลือได้รับยา acarbose ขนาด 100 mg วันละ 3 เวลา ระยะเวลาในการศึกษา 3.3 ปี พบว่า อะคาร์โบส สามารถเพิ่มจำนวนผู้ป่วยที่เปลี่ยนจากภาวะ Impaired glucose tolerance ให้เป็นปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) (Chaisson et al. 2002)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

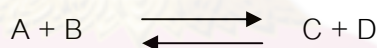
11. ทฤษฎีของเอนไซม์

การดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต ซึ่งรวมถึงกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายมนุษย์ เช่น การย่อยอาหาร การหดตัวของกล้ามเนื้อ การรับส่งความรู้สึกของกระแสประสาท เป็นต้น จะสามารถดำเนินไปได้ต้องอาศัยปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีเหล่านี้ ต้องอาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแทบทุกขั้นตอน (Stryer Biochemistry, 1988)

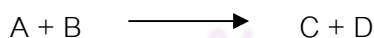
11.1 เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) หมายถึง สารที่เร่งให้ปฏิกิริยาดำเนินไปได้เร็วขึ้นโดยที่ตัวมันเองไม่เปลี่ยนแปลง ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นทั่วไปนั้น เริ่มต้นจากสารตั้งต้น (reactant) อาศัยพลังงานที่เรียกว่า พลังอิสระของการกระตุ้นของกิบส์ (Gibbs free energy of activation) จำนวนหนึ่งไปกระตุ้นให้สารตั้งต้นเปลี่ยนจากสภาวะเดิมไปเป็นผลิตภัณฑ์ (product)

ในขณะเดียวกัน ผลิตภัณฑ์เองก็จะต้องอาศัยพลังงานอิสระของการกระตุ้นอีกจำนวนหนึ่งเช่นกัน เพื่อที่จะทำให้อยู่ในสภาวะของการเปลี่ยนแปลงก่อน แล้วจึงค่อยเปลี่ยนกลับไปเป็นสารตั้งต้นสามารถเขียนออกเป็นสมการได้ดังนี้



ถ้ากำหนดให้ปฏิกิริยาข้างต้นดำเนินไปได้เฉพาะทางขวามือทางเดียว



พบว่าเมื่อต้องการทำให้สารตั้งต้นเปลี่ยนไปอยู่ในสภาวะการเปลี่ยนแปลงในกรณีที่มีตัวเร่งปฏิกิริยา จะต้องการพลังงานอิสระของการกระตุ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรณีซึ่งปฏิกิริยาเกิดขึ้นโดยไม่มีตัวเร่งปฏิกิริยา

11.2 กลไกการทำงานของเอนไซม์

Arrhenius ได้อธิบายถึงกลไกการทำงานของตัวเร่งปฏิกิริยาอนินทรีย์ทั่วไปว่า การที่ตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถเร่งปฏิกิริยาโดยลดพลังงานกระตุ้นนั้น เนื่องจากตัวเร่งปฏิกิริยาสามารถรวมกับสารตั้งต้นได้ ทำให้สารตั้งต้นเข้าสู่สภาวะการเปลี่ยนแปลงได้รวดเร็วขึ้น แต่ตัวเร่งปฏิกิริยาจะไม่เปลี่ยนแปลงไปอย่างถาวร กล่าวคือเมื่อปฏิกิริยาลิ้นสุดลง ตัวเร่งปฏิกิริยาไม่สูญหายและกลับสู่สภาพเดิมได้

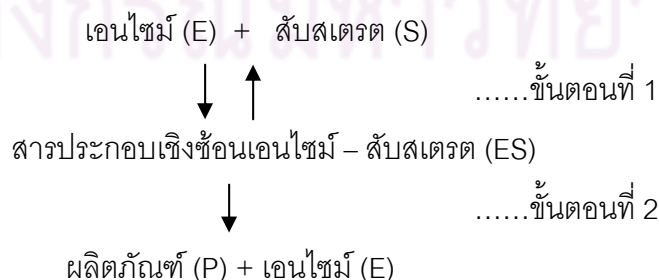
ต่อมา Brown ได้อธิบายกลไกการทำงานของเอนไซม์ว่า เอนไซม์มีการทำงาน 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการรวมตัวกันระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ (E) กับซับสเตรต (S) เกิดเป็นโมเลกุลเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต (ES) ซึ่งไม่เสถียร แล้วในขั้นตอนที่ 2 จึงเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ (P) และเอนไซม์อิสระ (E) ซึ่งสามารถกลับไปทำงานเร่งปฏิกิริยาได้อีก ดังปฏิกิริยา



โดยทั่วไปเอนไซม์มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าซับสเตรตมาก ด้วยเหตุนี้จึงมีเพียงบางส่วนภายในโครงสร้างของเอนไซม์เท่านั้นที่จับรวมกับโมเลกุลของซับสเตรตได้ บริเวณดังกล่าวนี้เรียกว่า บริเวณเร่ง (active site) ซึ่งโดยการศึกษาพบว่าพันธะเคมีที่เกิดขึ้นระหว่างที่มีการรวมตัวของเอนไซม์กับซับสเตรตส่วนใหญ่เป็นพันธะแบบอ่อน ได้แก่ พันธะไฮโดรเจน เป็นต้น

11.3 จลนศาสตร์ของปฏิกิริยาเอนไซม์

จากที่กล่าวข้างต้นว่ากลไกการทำงานของเอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการรวมตัวระหว่างโมเลกุลของเอนไซม์ (E) กับซับสเตรต (S) แล้วได้สารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งไม่เสถียร จากนั้นสารประกอบเชิงซ้อน (ES) จะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นผลิตภัณฑ์ (P)



จากปฏิกิริยาข้างต้นจะเห็นได้ว่า อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์ ขึ้นกับปริมาณสารประกอบเชิงซ้อน ES ถ้าอัตราเกิดผลิตภัณฑ์แปรผันตรงกับปริมาณซับสเตรต เมื่อปริมาณเอนไซม์คงที่จะได้กราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของซับสเตรตกับความเร็วของปฏิกิริยาเป็นเส้นตรง ซึ่ง Michaelis และ Menten ได้อธิบายว่า ปฏิกิริยาเกิดจากซับสเตรตเพียงอย่างเดียวและปริมาณซับสเตรตมีมากกว่าปริมาณเอนไซม์ และหลังจากการเกิดปฏิกิริยาได้ผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวในระบบ สามารถเขียนปฏิกิริยาอย่างง่าย ๆ ได้ดังนี้



โดยที่ K_1 , K_{-1} และ K_2 หมายถึงค่าคงที่อัตราเร็วของแต่ละปฏิกิริยาที่เกิดขึ้น

อัตราส่วนระหว่าง K_1 และ K_{-1} คือ ค่าคงที่สมดุล (K_{eq}) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบอกถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์ได้อีกด้วย

Michaelis และ Menten ได้กำหนดเงื่อนไขที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ไว้ 4 ประการและภายใต้เงื่อนไขเหล่านี้ เราสามารถเขียนเป็นสมการสรุปความสัมพันธ์ดังนี้

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

เมื่อ V_o หมายถึง อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยา

V_{max} หมายถึง อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาซึ่งเกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลทั้งหมดของเอนไซม์ทำงาน

K_m หมายถึง Michaelis – Menten constant

$[S]$ หมายถึง ความเข้มข้นของซับสเตรต

สมการนี้เรียกว่า สมการ Michaelis – Menten ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วของปฏิกิริยาและปริมาณซับสเตรตที่ใช้ในปฏิกิริยา

10.4 ความหมายและประโยชน์ของ V_{max} และ K_m

V_{max} ของปฏิกิริยาเอนไซม์ หมายถึง อัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยาของการเกิดผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเมื่อโมเลกุลทั้งหมดของเอนไซม์ทำงานและเนื่องจากค่า V_{max} แปรผันตรงกับปริมาณของเอนไซม์ ดังนั้นค่า V_{max} จึงบอกถึงความสามารถในการทำงานของเอนไซม์และปริมาณของเอนไซม์ในปฏิกิริยา

K_m หรือ Michaelis – Menten constant หมายถึง ค่าคงที่ของการจับรวมตัวระหว่างโมเลกุลของซับสเตรตกับเอนไซม์ เพื่อเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต (ES) โดยจะมีความสัมพันธ์กับค่าคงที่อัตราเร็ว (rate constant) ของปฏิกิริยา โดยเป็นอัตราส่วนระหว่างค่าคงที่อัตราเร็วของการสลายตัวของสารประกอบเชิงซ้อน กับค่าคงที่อัตราเร็วของการเกิด ES ($K_1 + K_2$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ $(K_1 + K_2) / K_1$

ค่า K_m มีลักษณะที่สำคัญ 3 ประการคือ

1. K_m จะเป็นการวัดค่า affinity ของซับสเตรตต่อเอนไซม์ ว่ามีความพอดีต่อ binding site ของเอนไซม์มากน้อยเพียงไร ซับสเตรตที่มีค่า K_m น้อย จะให้ค่า affinity ต่อเอนไซม์มาก จึงเป็นซับสเตรตที่มีความจำเพาะต่อเอนไซม์สูง

2. ค่า K_m จะมีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นของซับสเตรตเมื่ออัตราเร็วของปฏิกิริยาเป็นครึ่งหนึ่งของอัตราเร็วปฏิกิริยาสูงสุด ($1/2 V_{max}$)

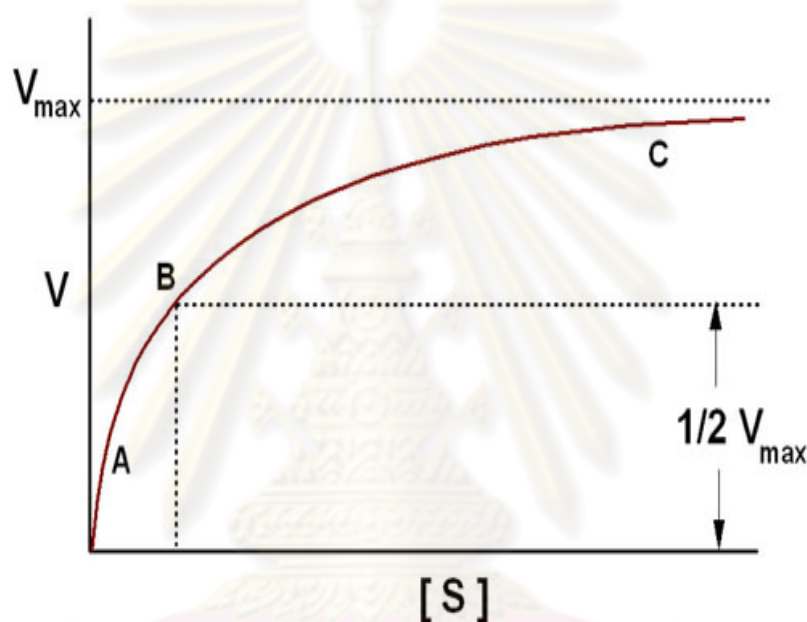
3. K_m เป็นค่าคงที่ของเอนไซม์แต่ละชนิดกับซับสเตรตซึ่งมีความจำเพาะ จึงสามารถใช้ K_m ระบุชนิดของเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตได้ K_m มีหน่วยเป็นโมลาร์ (M)

นอกจากนี้ลักษณะของการเปลี่ยนแปลงค่า V_{max} และ K_m ของปฏิกิริยาเอนไซม์ เนื่องจากตัวยับยั้ง (inhibitor) ยังใช้บอกชนิดของตัวยับยั้งหรือรูปแบบของกระบวนการยับยั้งได้ด้วย

การหาค่า V_{\max} และ K_m

การหาค่า V_{\max} และ K_m ของเอนไซม์ใดๆ โดยการทดลองนั้น สามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีที่นิยมใช้กันมีอยู่ 2 วิธี คือ

1. การหาค่า V_{\max} และ K_m โดยเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง V_0 กับ ปริมาณของสับสเตรต ได้เป็นกราฟลักษณะ rectangular hyperbola



ภาพที่ 2.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราเร็วเริ่มต้นกับปริมาณของสับสเตรต
(Lineweaver and Burk, 1934)

จากภาพที่ 2.5 จะเห็นได้ว่าขณะที่ปริมาณสับสเตรตเพียงเล็กน้อย จากนั้นแล้วค่อยๆ เพิ่มปริมาณตามลำดับ อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย นั่นคือ V_0 แปรผันตรงกับ ความเข้มข้นของสับสเตรต $[S]$ แต่เมื่อปริมาณของสับสเตรตสูงขึ้นมากๆ จนถึงระดับหนึ่งแล้ว อัตราเร็วเริ่มต้นของปฏิกิริยาจะค่อนข้างคงที่หรือเกือบเท่ากันโดยตลอดเรียกอัตราเร็วในสภาวะนี้ ว่า อัตราเร็วสูงสุด (V_{\max}) หรือเรียกสภาวะที่เอนไซม์มีการอิ่มตัวด้วยสับสเตรต (substrate saturation) การที่มีค่าของ V_{\max} เป็นเช่นนี้ก็ต่อเมื่อเอนไซม์ทุกโมเลกุลรวมตัวกับสับสเตรตเป็น สารประกอบเชิงซ้อน ES จนหมด

จากสมการ Michaelis – Menten ถ้ากำหนดให้ $V_0 = V_{\max}/2$ สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$\frac{V_{\max} [S]}{2} = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

$$K_m = [S]$$

2, การหาค่า V_{\max} และ K_m โดยวิธีของ Lineweaver และ Burk

Lineweaver และ Burk ได้ดัดแปลงและปรับปรุงจากสมการของ Michaelis – Menten โดยการกลับเศษเป็นส่วน เพื่อให้ได้เป็นกราฟเส้นตรง ซึ่งเรียกว่า double reciprocal plot หรือ Lineweaver – Burk plot และเรียกสมการนี้ว่าสมการ Lineweaver – Burk ซึ่งเขียนได้ดังนี้

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

จากสมการเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของอัตราเริ่มต้น ($1/[S]$) ได้ดังภาพที่ 2.6



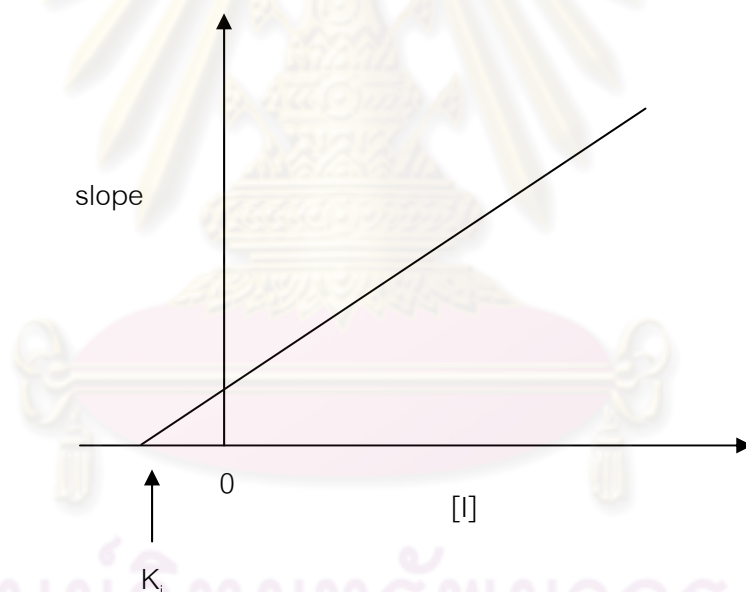
ภาพที่ 2.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างส่วนกลับของอัตราเร็วเริ่มต้นกับปริมาณสับสเตรต

(Lineweaver and Burk, 1934)

จากกราฟสามารถหาค่า V_{max} และ K_m ได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ โดยจุดตัด (intercept) บนแกน y ($1/V_0$) คือ ส่วนกลับของอัตราเร็วสูงสุดของปฏิกิริยา ($1/V_{max}$) และสามารถคำนวณหาค่า K_m จากความชันกราฟ (slope) ซึ่งมีค่าเท่ากับ K_m/V_{max}

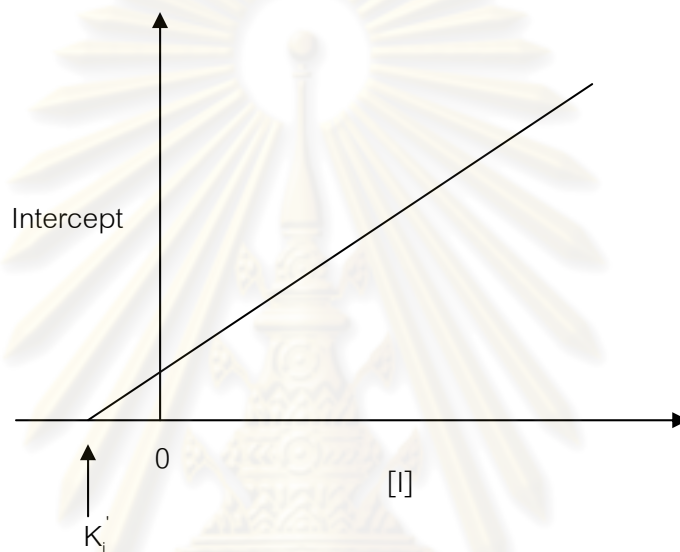
Secondary plot

- ระหว่าง slope จากกราฟ Lineweaver – Burk plot คือ $Slope = K_m/V_m$ กับความเข้มข้นของตัวยับยั้ง $[I]$ (ภาพที่ 2.7) จากการพล็อตกราฟดังกล่าวจะสามารถคำนวณหาค่าคงที่การจับตัวของเอนไซม์อิสระกับตัวยับยั้งได้ (K_i) โดยอาจหาค่าได้จากกราฟ คือ จากจุดตัดบนแกน x ดังนี้



ภาพที่ 2.7 แสดงกราฟ Secondary plot ระหว่าง slope จากกราฟ Lineweaver – Burk plot กับ $[I]$ (Lineweaver and Burk, 1934)

- ระหว่าง Intercept คือ ค่าที่ได้จากจุดตัดบนแกน y (Intercept) ของกราฟ Lineweaver – Burk plot กับ ความเข้มข้นของตัวยับยั้ง [I] (ภาพที่ 2.8) จากการพล็อตกราฟดังกล่าวจะสามารถคำนวณหาค่าคงที่การจับตัวของเอนไซม์อิสระกับสารประกอบเชิงซ้อนที่จับกับระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรตได้ (K_i') โดยจากกราฟจะหา K_i' ได้จากจุดตัดบนแกน x



ภาพที่ 2.8 แสดงกราฟ secondary plot ระหว่าง Intercept จากกราฟ Lineweaver – Burk plot กับ [I] (Lineweaver and Burk, 1934)

ค่าที่ได้จาก secondary plot สามารถบอกชนิดการยับยั้งเอนไซม์ได้ดังนี้

1. ค่าของ $K_i = K_i'$ หมายถึง full non-competitive inhibitor
2. ค่าของ $K_i = 0$ หมายถึง complete non-competitive inhibitor
3. ค่าของ $K_i = 1$ หมายถึง partial non-competitive inhibitor
4. ค่าของ $K_i > K_i'$ หมายถึง competitive inhibitor > non-competitive inhibitor
5. ค่าของ $K_i < K_i'$ หมายถึง non-competitive inhibitor > competitive inhibitor

(Lineweaver and Burk, 1934)

12. การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (enzyme inhibition) หมายถึงการทำให้เอนไซม์ทำงานให้อัตราที่ลดลงจากเดิม หรือหยุดการทำงานอย่างสิ้นเชิง การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์จำแนกออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (irreversible inhibition) และการยับยั้งแบบผันกลับ (reversible inhibition)

12.1 การยับยั้งแบบไม่ผันกลับ (irreversible inhibition)

การยับยั้งในลักษณะนี้ตัวยับยั้งจะจับกับเอนไซม์ด้วยพันธะเคมีที่แข็งแรง ส่งผลทำให้การแยกตัวระหว่างโมเลกุลของตัวยับยั้งกับเอนไซม์เป็นได้ยาก เอนไซม์จึงไม่สามารถจับกับซับสเตรตและทำงานได้ตามปกติ รวมทั้งการกลับคืนสู่สภาพเดิมจึงทำได้ยาก ถ้าความเข้มข้นของตัวยับยั้งมากกว่าของเอนไซม์จะสามารถยับยั้งหรือหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ของเอนไซม์ทั้งหมด การยึดจับระหว่างเอนไซม์เอนไซม์และตัวยับยั้งอาศัยพันธะโควาเลนต์ ซึ่งเกิดขึ้นระหว่างหมู่ฟังก์ชันของกรดอะมิโน เป็นต้น

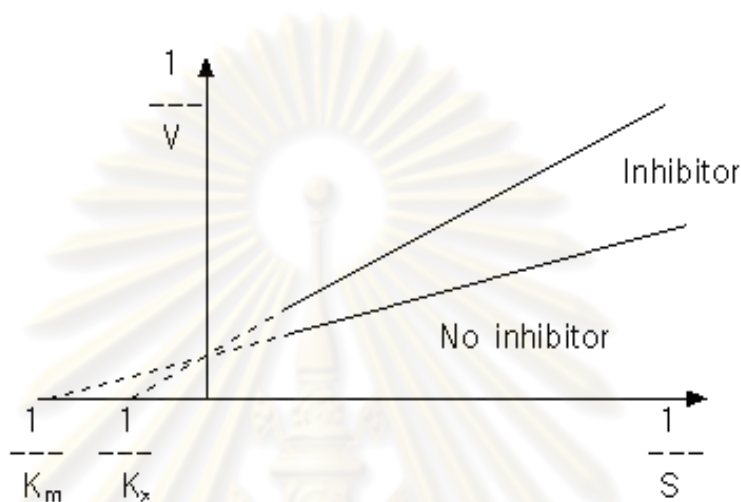
12.2 การยับยั้งแบบผันกลับ (reversible inhibition)

การยับยั้งในลักษณะนี้ ตัวยับยั้งสามารถจับกับโมเลกุลของเอนไซม์อิสระหรือสารประกอบเชิงซ้อน ES การยับยั้งประเภทนี้จำแนกออกได้เป็น 3 แบบคือ การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) และการยับยั้งแบบไม่แข่งขันโดยตรง (uncompetitive inhibitor)

12.2.1. การยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor)

การยับยั้งแบบนี้ตัวยับยั้งจะมีสมบัติที่สำคัญคือ โครงสร้างทางเคมีของตัวยับยั้งจะมีส่วนคล้ายคลึงกับของซับสเตรต ด้วยเหตุนี้ทำให้ตัวยับยั้งแบบแข่งขันเข้าไปจับโมเลกุลของเอนไซม์ตรงบริเวณเร่ง แล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้ง (ES) ทำให้ซับสเตรตไม่สามารถจับกับเอนไซม์ได้ และเมื่อทำการศึกษาสมบัติจลนศาสตร์ของระบบเอนไซม์ที่มีตัวยับยั้งแบบไม่แข่งขัน แล้วนำมาเขียนกราฟแบบ Lineweaver – Burk plot จะได้ภาพที่ 2.9

และพบว่าค่า V_{\max} ของปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้งและไม่มีตัวยับยั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่ค่า K_m ของปฏิกิริยาที่มีตัวยับยั้งจะสูงกว่าปฏิกิริยาที่ไม่มีตัวยับยั้ง

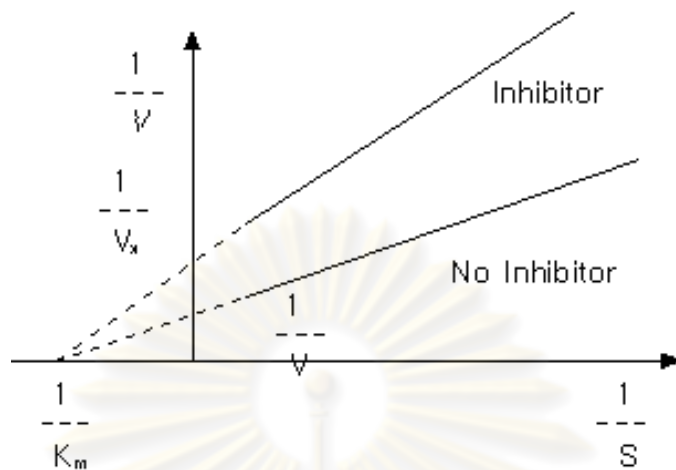


ภาพที่ 2.9 แสดงกราฟ Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบแข่งขัน (Lineweaver and Burk, 1934)

12.2.2. การยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor)

การยับยั้งแบบนี้เกิดขึ้นในกรณีที่ตัวยับยั้งมีโครงสร้างแตกต่างจากซับสเตรตโดยสิ้นเชิง จึงสามารถจับกับเอนไซม์ได้เสมอไม่ว่าเอนไซม์จะจับกับซับสเตรตอยู่หรือไม่ นั่นคือเกิดสรประกอบเชิงซ้อนทั้ง EI และ ESI ($I =$ ตัวยับยั้ง) ประเภทนี้ไม่ได้จับเอนไซม์ที่บริเวณเร่ง จึงไม่มีผลต่อค่า K_m แต่จะมีผลต่อค่า V_{\max} ซึ่งจะลดลงตามปริมาณของตัวยับยั้ง ดังภาพที่ 2.10

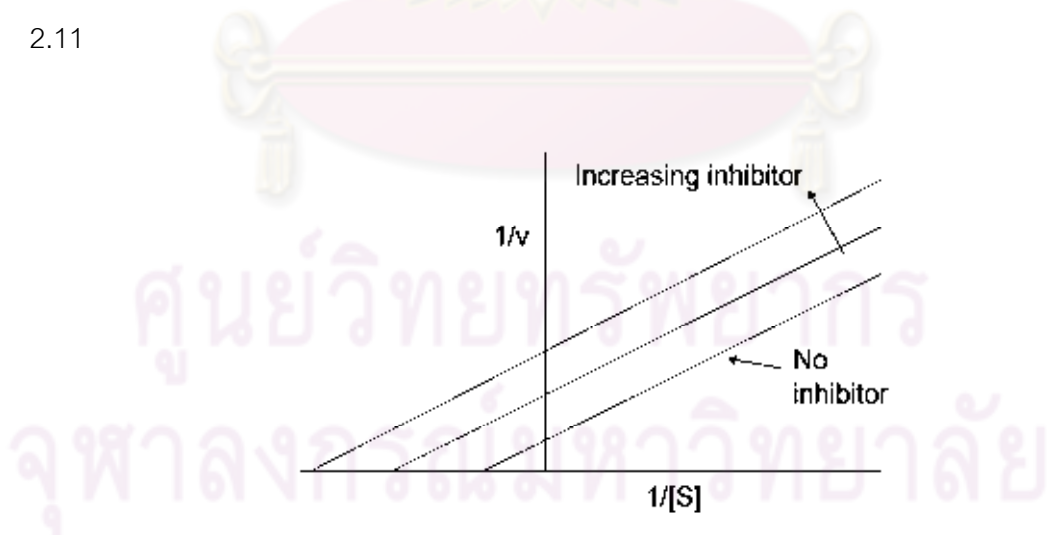
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 2.10 แสดงกราฟ Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (Lineweaver and Burk, 1934)

12.2.3. การยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันโดยตรง (uncompetitive inhibitor)

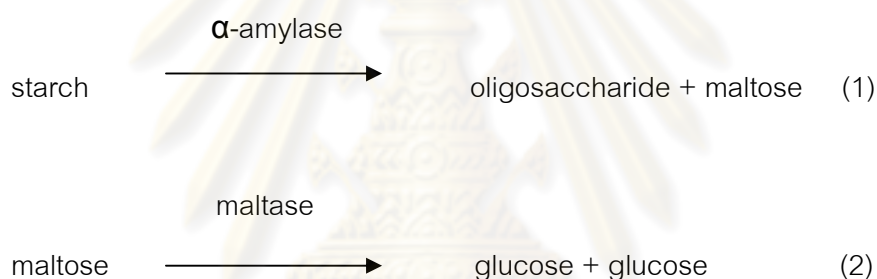
ตัวยับยั้งแบบนี้แตกต่างจากตัวยับยั้งที่กล่าวข้างต้น เนื่องจากการจับของตัวยับยั้งเกิดขึ้นได้เฉพาะกับสารประกอบเชิงซ้อน ES เท่านั้น และมักพบตัวยับยั้งประเภทนี้ในปฏิกิริยาเอนไซม์ที่ซับซ้อนมากกว่า 2 ชนิดขึ้นไป เมื่อศึกษาสมบัติจลนศาสตร์ของระบบนี้พบว่าค่า V_{max} และ K_m ลดลงตามลำดับเมื่อเพิ่มปริมาณของตัวยับยั้ง แต่ความชันของกราฟยังมีค่าเท่าเดิม ดังภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 แสดงกราฟ Lineweaver – Burk plot ของปฏิกิริยาการยับยั้งแบบไม่สามารถแข่งขันโดยตรง (Lineweaver and Burk, 1934)

13. ข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase enzyme)

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase enzyme) เป็น endoglycosidase ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของ $(1 \rightarrow 4) - \alpha$ -D-glycosidic linkages ของแป้ง (คาร์โบไฮเดรต) ให้ได้ผลิตภัณฑ์ คือ อะไมโลส (amylose) อะไมโลเพคติน (amylopectin) ไกลโคเจน (glycogen) และมอลโตเด็คซ์ทรินส์ (maltodextrins) แอลฟา-อะไมเลสพบได้จากสิ่งมีชีวิต เช่น แบคทีเรีย ฟีช และสัตว์ (ตารางที่ 2.2) แป้งจะถูกย่อยโดยในขั้นแรกได้เป็น oligosaccharides และเป็น maltose จากนั้น maltose จะถูกย่อยให้เป็น glucose โดยเอนไซม์ maltase (ภาพที่ 2.12) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จะไม่สามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโครงสร้างแบบ $(1 \rightarrow 6) - \alpha$ -D-glycosidic linkages ได้ (Windish et al. 1965)



ภาพที่ 2.12 แสดงผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์มอลเทส (Windish et al. 1965)

ระบบทางเดินอาหารจะมีเอนไซม์อะไมเลสจากตับอ่อนจะย่อยคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนจากอาหารให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลขนาด 2-10 โมเลกุลและน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่บริเวณลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม จากนั้นจะถูกย่อยเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส บริเวณ brush border membrane ของลำไส้เล็ก ก่อนที่จะดูดซึมเข้าสู่เซลล์บริเวณลำไส้ส่วนเจจูนัม โดยคาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่จะถูกย่อยและดูดซึมที่บริเวณส่วนบนเจจูนัม มีเพียงส่วนน้อยที่จะถูกย่อยและถูกดูดซึมบริเวณส่วนล่างของเจจูนัม และส่วนลำไส้โอดิเลียม ซึ่งบริเวณ 2 ส่วน จะมีเอนไซม์ค่อนข้างกล่าวปริมาณน้อย คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ถูกย่อยจะเคลื่อนย้ายไปยังลำไส้ใหญ่ หลังจากนั้นจะถูกเมแทบอลิท์ด้วยแบคทีเรีย เป็นกรดไขมันสายสั้นๆ หรือแก๊ส และ ไฮโดรเจน (Josse and Cheng. 2004)

ตารางที่ 2.2 ตารางแสดงแหล่งที่พบเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในธรรมชาติ (Windish et al.1998)

แหล่ง	ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง	1 หน่วยการทำงาน*
พืช ข้าวมอลท์	มอลโตส	350
สัตว์ น้ำลาย	เดกซ์ทรีน, มอลโตส	-
ตับอ่อน	เดกซ์ทรีน, มอลโตส	2,500
จุลินทรีย์		
<i>B. Stearothermophilus</i>	กลูโคส, เดกซ์ทรีน, มอลโตส	1,800
<i>B. subtilis</i>	เดกซ์ทรีน, มอลโตส	-
<i>Rhizopus sp.</i>	กลูโคส	200
<i>A.oryzae</i>	กลูโคส	170
<i>A.niger</i>	กลูโคส	250
<i>Endomycopsis sp.</i>	กลูโคส	20
<i>Oospora sp</i>	เดกซ์ทรีน	25

*นิยาม 1 หน่วยการทำงาน คือ ปริมาณเอนไซม์ที่ทำให้เกิดกลูโคส 1 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักของแหล่งเอนไซม์ 1 กรัมในเวลา 1 วินาที

การยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสมีประโยชน์ในทางการแพทย์ อาทิ เช่น มีผลต่อการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด ในประเทศทั่วโลกมีผู้ใช้ยา acarbose เป็นยาที่ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและแอลฟา-กลูโคซิเดสอย่างกว้างขวาง

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยหวังผลว่า การยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส จะช่วยชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดที่บริเวณลำไส้เล็ก ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลง เนื่องจากเมื่อเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ และโมเลกุลเดี่ยวช้าลง (Peng and Gang, 2007) เมื่อระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารลดลง ทำให้ระดับ HbA_{1c} ลดลงด้วย ผลดังกล่าวจะทำให้การเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ จากโรคเบาหวานลดลงได้เช่นกัน

ผลการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับสารธรรมชาติในกลุ่มของ alpha-amylase inhibitor

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดจาก *Phyllanthus amarus* นำมาสกัดในเฮกเซน (hexane) ได้สารบริสุทธิ์คือ pentacyclic triterpenoid acids สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 2.01 $\mu\text{g/ml}$ (Hasenah et al. 2006)

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดจาก *Bergenia cillata* ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรในประเทศเนปาล นำมาสกัดในเมทานอล (methanol) ได้สารบริสุทธิ์คือ (-)-3-O-galloylecatechin และ (-)-3-O-galloylepicatechin พบว่าสารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 739 และ 401 μM ตามลำดับ (Megh Raj et al. 2007)

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดจาก *Pinus densiflora* bark มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ที่ได้มาจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.69 $\mu\text{g/ml}$ จากการศึกษาจะเห็นได้ว่ามีค่าใกล้เคียงกับ acarbose ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในปัจจุบัน โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.75 $\mu\text{g/ml}$ (Yong-Mu et al. 2004)

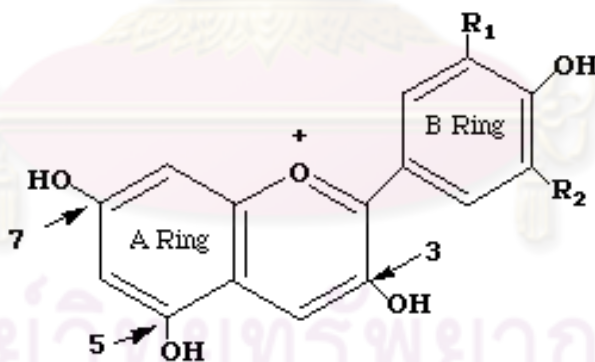
จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า การสกัดอนุพันธ์ของไซยานิดินจากดอก morning glory (SOA extract) และ sweet potato (YGM extract) พบว่า สารสกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.43 และ 0.61 mg/ml ตามลำดับ (Toshiro et al. 2001)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. ข้อมูลเกี่ยวกับแอนโทไซยานิน (anthocyanins)

แอนโทไซยานินจัดอยู่ในกลุ่มของสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นรงควัตถุที่พบในผัก ผลไม้ และดอกไม้หลายชนิด เช่น ผลองุ่น ผลสตอเบอรี่ ดอกกระเจี๊ยบแดง แอลเดอร์เบอร์รี่ (elderberries) แบลคเคอแรนท์ (black currants) ราสเบอร์รี่ (rasberries) ดอกอัญชัน เป็นต้น ซึ่งรงควัตถุนี้มีบทบาทต่อสีในพืช ผัก ผลไม้ โดยให้ช่วงสีตั้งแต่สีแดงไปจนถึงสีน้ำเงิน ละลายได้ดีในน้ำ (Matsui et al. 2006)

โครงสร้างหลักเป็น $C_6C_3C_6$ (ภาพที่ 2.13) โมเลกุลประกอบด้วย aglycone จับตัวกับพันธะน้ำตาลไกลโคซิดิก (glycosidic linkage) (Brouillard, 1982) น้ำตาลที่จับกับแอนโทไซยานินที่พบบ่อยคือ glucose นอกจากนี้ยังพบ monosaccharide เช่น xylose, galactose และ fructose เป็นต้น ส่วน disaccharide ส่วนใหญ่เป็น rutinose, sambubiose เป็นต้น โดยน้ำตาลส่วนใหญ่จะเกาะที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 บางครั้งจะพบคาร์บอนตำแหน่งที่ 5 ด้วย (Francis, 1989) ดังนั้นแอนโทไซยานินที่พบได้บ่อยจะเป็น 3-monoside ซึ่งมีน้ำตาลเกาะ 1 ตัวที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 ส่วน 3-bioside คือมีน้ำตาลมาเกาะ 2 ตัวที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และ 3,5-diglycoside คือมีน้ำตาลมาเกาะ 2 ตัว ที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 และที่ 5 น้ำตาลเหล่านี้จะช่วยทำให้แอนโทไซยานินมีความเสถียรเพิ่มมากขึ้น และละลายในน้ำได้ดีขึ้น

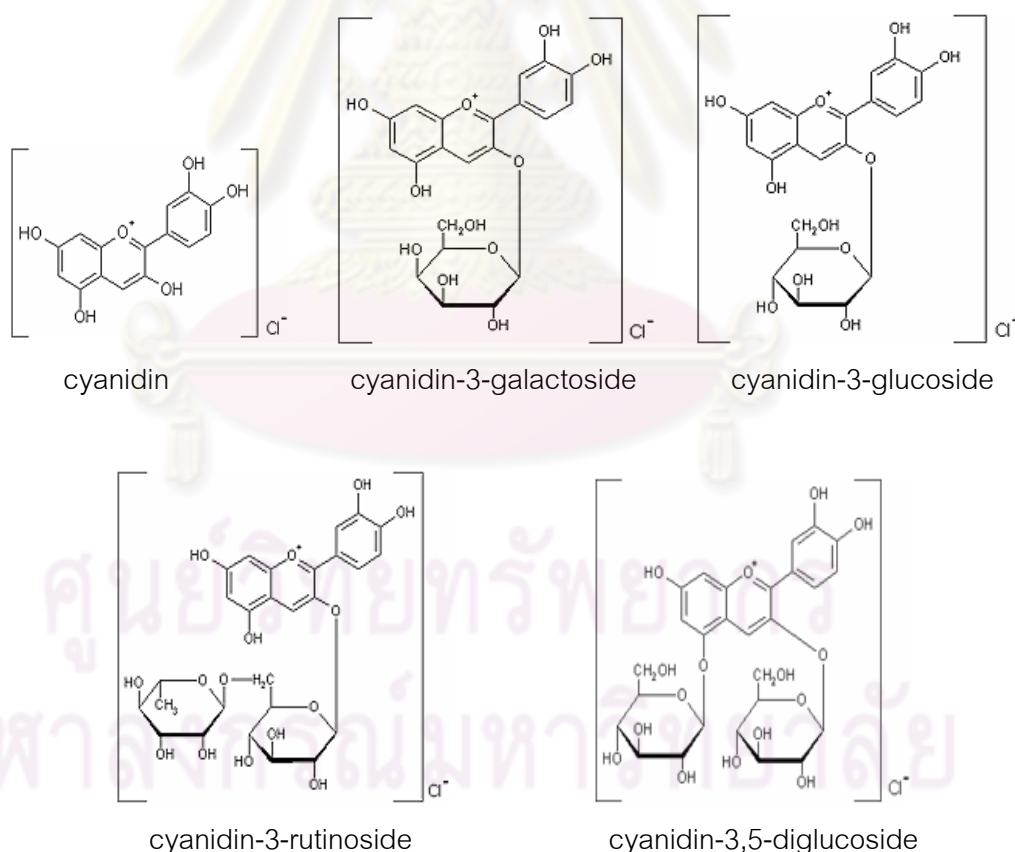


ภาพที่ 2.13 สูตรโครงสร้างของแอนโทไซยานิน (Brouillard, 1982)

15 ข้อมูลเกี่ยวกับไซยานิดินและอนุพันธ์ (cyanidin and derivatives)

ไซยานิดินเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโทไซยานิน โดยมีอนุพันธ์ที่พบได้เป็นส่วนใหญ่ เช่น ไซยานิดิน-3-กาแลกโตไซด์ (cyanidin-3-galactoside), ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ (cyanidin-3-glucoside), ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) และ ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ (cyanidin-3,5-diglucoside) ซึ่งเป็นอนุพันธ์ที่สนใจศึกษาในครั้งนี้

น้ำตาลและตำแหน่งที่น้ำตาลมาจับทำให้มีความแตกต่างในแต่ละอนุพันธ์ โดยอนุพันธ์ที่มี monosaccharide มาจับ คือ น้ำตาล galactoside และ glucose ตามลำดับ จับยังตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 คือ cyanidin-3-galactoside และ cyanidin-3-glucoside ส่วน cyanidin-3,5-diglucoside มี monosaccharide เป็นน้ำตาล glucose 2 ตัว มาจับที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 และที่ 5 อนุพันธ์ที่มี disaccharide มาจับคือน้ำตาล rutinose คือ cyanidin-3-rutinoside (ภาพที่ 2.14)



ภาพที่ 2.14 แสดงสูตรโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของไซยานิดินและอนุพันธ์

ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสจากยีสต์

จากการศึกษาเปรียบเทียบถึงโครงสร้างทางเคมีระหว่าง cyanidin-3-rutinoside กับ quercetin-3-rutinoside ที่มีความแตกต่างกันบริเวณวงแหวนเบนซีน พบว่า quercetin-3-rutinoside ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ แต่ถ้าหากมีการเปลี่ยนแปลงพันธะคู่ของออกซิเจนอะตอมในวงแหวนเบนซีนให้กลายเป็นประจุ พบว่าจะสามารถเพิ่มฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า cyanidin-3-rutinoside ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสแบบไม่แข่งขัน (non-competitive inhibition) โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $19.7 \pm 0.24 \mu\text{M}$ แต่เนื่องจากว่าเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสในยีสต์นั้นมีความแตกต่างไปจากเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลการศึกษาดังกล่าวจึงยังไม่สามารถบอกได้ว่า cyanidin-3-rutinoside นั้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ดีเท่ากับในยีสต์ได้หรือไม่ (Adisakwattana et al. 2004)

ฤทธิ์ยับยั้งการเอนไซม์มอลเทส ซูเครส และอะไมเลส รวมทั้งลดระดับกลูโคสในเลือด

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า การสกัด anthocyanin ได้สารบริสุทธิ์ ได้แก่ SOA-4 SOA-6, YGM-3 และ YGM-6 ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไซยานิดินจากดอก morning glory (SOA extract) และ sweet potato (YGM extract) พบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มอลเทสได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ซูเครสได้โดยมีค่า IC_{50} อยู่ระหว่าง 60-200 μM ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส และสารสกัดดังกล่าวยังสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ด้วย จากนั้นทำการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า สารเคมีดังกล่าวสามารถชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดในหนูขาวได้จริง ผลการศึกษาที่ได้ในหลอดทดลองมีความสอดคล้องไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาในสัตว์ทดลอง (Mutsui et al. 2001)

ฤทธิ์เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์โดยการเพิ่มปริมาณตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (KK-A^y mice) โดยให้ cyanidin-3-glucoside ขนาด 0.2% ร่วมกับอาหารที่ให้สัตว์ทดลอง เป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า สามารถลดระดับกลูโคสในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 โดยมีค่าระดับกลูโคสในเลือด เท่ากับ 300.1 ± 14.0 mg/dl และ 356.5 ± 28.0 mg/dl ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 และ 5 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 393.9 ± 15.3 mg/dl และ 454.2 ± 26.1 mg/dl ตามลำดับ จากนั้นทำการทดสอบ insulin tolerance test พบว่ากลุ่มให้ cyanidin-3-glucoside สามารถลดระดับกลูโคสในนาที่ที่ 30, 60 และ 120 หลังฉีดอินซูลินได้ 0.83, 0.67 และ 0.80 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม รวมทั้งวัดปริมาณการแสดงออกของปริมาณ retinol binding protein 4 expression (RBP4) ใน mesenteric WAT และในซีรัม พบว่า กลุ่มให้ cyanidin-3-glucoside สามารถลดปริมาณ RBP4 ได้ 53% และ 47% ตามลำดับ ในทางตรงกันข้ามเมื่อวัดปริมาณของตัวขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 (GLUT4) ใน mesenteric white adipose tissue พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณได้ 2.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Rie et al. 2007)

ฤทธิ์เพิ่มภาวะ hyperinsulinemia

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยเหนี่ยวนำโดยการให้อาหารไขมันสูง เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ และให้สารสกัดของแอนโทไซยานินซึ่งมีสารบริสุทธิ์ ได้แก่ cyanidin-3-glucoside pelargonidin-3-glucoside และ delphinidin-3-glucoside ขนาด 1 g/kg ร่วมกับอาหารให้สัตว์ทดลองเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดดังกล่าวเพิ่มปริมาณอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าระดับอินซูลินเท่ากับ 567 ± 32.36 ng/mL เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มให้อาหารไขมันสูง ซึ่งมีค่าระดับอินซูลินมีค่าเท่ากับ 0.41 ± 0.10 ng/mL ซึ่งในทางเดียวกันเมื่อทำการทดสอบ glucose oral tolerance test พบว่า สามารถลดระดับกลูโคสในเลือดในนาที่ที่ 90 หลังฉีดกลูโคส 2 g/kg โดยมีค่าระดับกลูโคสเท่ากับ 221 mg/dl เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มให้อาหารไขมันสูง ซึ่งมีค่าระดับกลูโคสเท่ากับ 363 mg/dl (Bolleddula et al. 2006)

ฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ aldose reductase

จากการศึกษาในหลอดทดลองพบว่า cyanidin-3-glucoside มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aldose reductase โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 8.7-27.5 $\mu\text{g/mL}$ จากการทดลองสารเคมีดังกล่าวอาจจะสามารถชะลอหรือป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ (Robert et al. 2007)

จากการทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง พบว่าไซยานิดินและอนุพันธ์ที่สนใจในการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งพบได้ในพืชผัก ผลไม้ ดอกไม้ ที่นำมาใช้เป็นอาหารในชีวิตประจำวัน ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการหลังอินซูลิน เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ มอลเทส ซูเครส ในสัตว์ทดลอง และยับยั้งการทำงานของแอลฟา-กลูโคซิเดสในยีสต์ แต่ยังไม่พบว่ามีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในสารกลุ่มไซยานิดิน และอนุพันธ์ ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่จะช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังอาหารได้เช่นเดียวกัน จึงเป็นแรงจูงใจในการทำวิจัยในครั้งนี้ เพื่อหวังว่าจะนำข้อมูลที่ได้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาหรือการรักษาควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดสำหรับผู้ป่วยโรคเบาหวานในอนาคตต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูแรทเพศผู้พันธุ์ Sprague-Dawley น้ำหนัก 250-300 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มทำการทดลองเพื่อปรับสภาพร่างกาย โดยควบคุมให้มีอุณหภูมิห้อง $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ โดยเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงสเตนเลส ขนาด 16 นิ้ว x 10 นิ้ว x 6 นิ้ว พร้อมด้วยวัสดุรองนอน ให้อาหารสำเร็จรูป CP082 mice feed และน้ำสะอาดอย่างเพียงพอตามความต้องการของสัตว์ทดลอง ดูแลสัตว์ทดลองตามระเบียบของสภาวิจัยแห่งชาติ ซึ่งได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณการใช้สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 สารเคมีและแหล่งที่มา

- ชุดตรวจน้ำตาล (PGO enzyme)	Chromadex, CA, USA
- Acarbose	Bayer, Germany
- Alpha amylase (Procrine)	Chromadex, CA, USA
- Cyanidin	Chromadex, CA, USA
- Cyanidin-3,5-diglucoside	Chromadex, CA, USA
- Cyanidin-3-galactoside	Chromadex, CA, USA
- Cyanidin-3-glucoside	Chromadex, CA, USA
- Cyanidin-3-rutinoside	Chromadex, CA, USA
- 3,5-Dinitrosalicylic acid	Chromadex, CA, USA
- Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Merck, Germany
- Heparin sulfate	Chromadex, CA, USA
- Hydrochloric acid	Merck, Germany
- Maltose	Chromadex, CA, USA
- Methanol	Merck, Germany

- Phenol Merck, Germany
- Quercetin-3-rutinoside Chromadex, CA, USA
- Sodium Potassium tartrate Merck, Germany
- Sodium sulfate (Na_2SO_3) Merck, Germany
- Sodium hydroxide (NaOH) Merck, Germany
- Sodium chloride (NaCl) Merck, Germany
- Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) Merck, Germany
- Starch (analytic grade) Chromadex, CA, USA
- Zinc oxide (ZnO_2) Chromadex, CA, USA

1.3. เครื่องมือ

- เข็ม (Needle) เบอร์ 27
- เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Sartorius, Germany)
- เครื่องปั่น centrifuge (Heareus, Biofuge22R, Germany)
- เครื่องมือวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
- เครื่อง Microplate Plate Reader
- เครื่อง Spectrophotometer
- เครื่อง Suction
- ล้างสีก้อน
- อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ
- Autopipets 20, 100 และ 1000 ไมโครลิตร (Gilson, France)
- Column ขนาด 500 มิลลิลิตร
- Insulin Syringe
- Micro titer plate ขนาด 8x12 หลุม
- feeding tube NO. 18 (สแตนเลส)
- Pipette tips
- Rotary evaporation
- Vortex mixer (Germmy industrial, Tiwan)

3. วิธีดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 : การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดินและอนุพันธ์

ศึกษาคัดกรองสารทดสอบอนุพันธ์ทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ cyanidin cyanidin-3-galactoside, cyanidin-3-glucoside, cyanidin-3-rutinoside และ cyanidin-3,5-diglucoside ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในหลอดทดลอง เพื่อคัดกรองหาอนุพันธ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด รวมทั้งประเมินความสัมพันธ์ของสูตรโครงสร้างทางเคมีของไซยานิดินและอนุพันธ์แต่ละชนิดต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปี วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อติดตามปฏิกิริยาการไฮโดรไลซิสสารตั้งต้น คือแป้งไปเป็นผลิตภัณฑ์ คือ reducing sugar เช่น มอลโตส จะทำปฏิกิริยากับ DNS reagent ได้ สารละลายลักษณะสีเหลืองปนส้มสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิค UV-Visible spectroscopy โดยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ถ้าการทดลองให้ค่าดูดกลืนแสงมาก หมายถึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถที่จะย่อยแป้งให้เป็นผลิตภัณฑ์จำนวนมากได้ แสดงว่าสารทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้น้อย แต่ถ้าค่าดูดกลืนแสงน้อย หมายถึงเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถย่อยแป้งได้ผลิตภัณฑ์จำนวนน้อย แสดงให้เห็นว่าสารทดสอบสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้มาก

วิธีทำการทดลอง

1. เตรียมสารละลายของอนุพันธ์ไซยานิดิน ความเข้มข้น 1000 μM ปริมาตร 1 mL โดยชั่งไซยานิดิน และอนุพันธ์ดังนี้

cyanidin	8.07	mg
cyanidin-3-glucoside	12.11	mg
cyanidin-3-rutinoside	15.77	mg
cyanidin-3-galactoside	12.12	mg
cyanidin-3,5-diglucoside	16.17	mg

ละลายด้วยน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1 ml จากนั้นเตรียมสารละลายของไซยานิดินและอนุพันธ์ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1000, 500, 250, 100, 10, 1 และ 0.1 μM จาก stock solution ความเข้มข้น 1000 μM

2. เตรียมสารละลายน้ำแบ่งความเข้มข้น 1% w/v โดยชั่งแบ่ง 0.25 g ละลายด้วยน้ำเดือด จนมีปริมาตรเป็น 25 mL เป็นสับสเตรต

3. เตรียมสารละลาย sodium phosphate buffer pH 6.9 โดยชั่ง sodium chloride 32.2 mg และ sodium phosphate 0.240 g ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 mL ปรับ pH เป็น 6.9 ด้วยสารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 M

4. เตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสความเข้มข้น 3 U/mL โดยชั่ง เอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส จำนวน 9.49 mg ละลายด้วย sodium phosphate buffer pH 6.9 จนมี ปริมาตร 50 mL จากนั้นนำสารละลายของเอนไซม์ที่ได้ใส่หลอดทดลองขนาดเล็ก นำไปปั่นแยกที่ ความเร็ว 4,000 รอบ เป็นเวลา 4 นาที ดูเฉพาะส่วนใส ไม่มีตะกอนใสในหลอดทดลองขนาดเล็ก แล้วแช่ไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -20°C

5. เตรียมสารละลาย 1% DNS โดยชั่ง 3,5-Dinitrosalicylic acid 1.0 g, sodium sulfate 0.05 g, sodium hydroxide 1.0 g, phenol 0.2 g ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 mL

6. เตรียมสารละลาย 40 % sodium potassium tartrate โดยชั่ง sodium potassium tartrate 40 g ละลายด้วยน้ำกลั่น จนมีปริมาตร 100 mL

วิธีการวิเคราะห์

ฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยใช้สารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสความเข้มข้น 3 U/mL จำนวน 150 ไมโครลิตร (μl) ผสมกับไซยานิดินและอนุพันธ์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 μl สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.9 จำนวน 180 μl และผสมกับสารละลายน้ำแบ่งความเข้มข้น 2% w/v จำนวน 150 μl แล้วนำไปป้อนที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 1% DNS จำนวน 500 μl จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อยุติปฏิกิริยาเติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรตความเข้มข้น 40% จำนวน 500 μl นำสารละลายที่ได้ นำไปวัดค่า % alpha-amylase inhibitor activity โดยวัดจากปริมาณมอลโตสที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าเป็นค่า IC_{50} รวมทั้งประเมินความสัมพันธ์ระหว่างสูตรโครงสร้างของไซยานิดินและอนุพันธ์แต่ละชนิดกับความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และจากนั้นนำอนุพันธ์ที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด ไปทำการศึกษาต่อในการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 2 : การทดสอบรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของ ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์

ศึกษารูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของอนุพันธ์ไชยานิดินที่ให้ผลยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด คือ ไชยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ จากการทดลองที่ 1 โดยอาศัย Lineweaver burk plot ซึ่งเป็นการพล็อตกราฟระหว่าง ส่วนกลับของความเข้มข้นของมอลโตสต่อเวลาการทำปฏิกิริยา ($1/v$) กับ ส่วนกลับของความเข้มข้นของน้ำแป้ง ($1/[S]$) จากนั้น พล็อตกราฟโดยอาศัย Secondary plot ระหว่าง ค่าความชันของกราฟ (Slope) จาก Lineweaver-burk plot กับค่าความเข้มข้นของอนุพันธ์ ไชยานิดิน(ตัวยับยั้ง) คำนวณหาค่าคงที่ความสามารถการจับตัวกันระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ (K_i) และ พล็อตกราฟระหว่างค่าจุดตัดบนแกน y (Intercept) ของ Lineweaver-burk plot กับค่าความเข้มข้นของอนุพันธ์ไชยานิดิน (ตัวยับยั้ง) เพื่อนำไปคำนวณหาค่าคงที่ความสามารถในการจับตัวกันระหว่างตัวยับยั้งกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต (K_i') เพื่อนำค่า V_{max} , K_m , K_i และ K_i' มาใช้ในการวิเคราะห์รูปแบบของการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของอนุพันธ์ไชยานิดิน

วิธีการทดลอง

1. คัดเลือกความเข้มข้นของอนุพันธ์ที่ผ่านการคัดกรองจากการทดลองที่ 1 มา 3 ค่าความเข้มข้น โดยมีค่าอยู่ระหว่างค่า IC_{50} ที่คำนวณได้
2. เตรียมความเข้มข้นของน้ำแป้ง 5 ความเข้มข้น ดังนี้ 0.25, 0.5, 1, 1.5 และ 2% w/v ตามลำดับ โดยเตรียมจาก จาก stock solution ความเข้มข้น 2% w/v
3. สร้างกราฟมาตรฐานมอลโตส โดยใช้สารละลายมอลโตส ความเข้มข้น 1 mg/ml จำนวน 0, 50, 100, 200, 300, 400 และ 500 μ l ผสมกับ deionized water จำนวน 500, 450, 400, 300, 200, 100 และ 0 μ l สารละลาย 1% DNS จำนวน 500 μ l และเติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ความเข้มข้น 40% จำนวน 500 μ l จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร หาสมการของกราฟมาตรฐานมอลโตส เพื่อนำค่าสมการที่ได้ไปใช้คำนวณหาค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของมอลโตสต่อเวลาการทำปฏิกิริยา($1/v$) สำหรับการสร้างกราฟ Lineweaver-burk plot

วิธีการวิเคราะห์

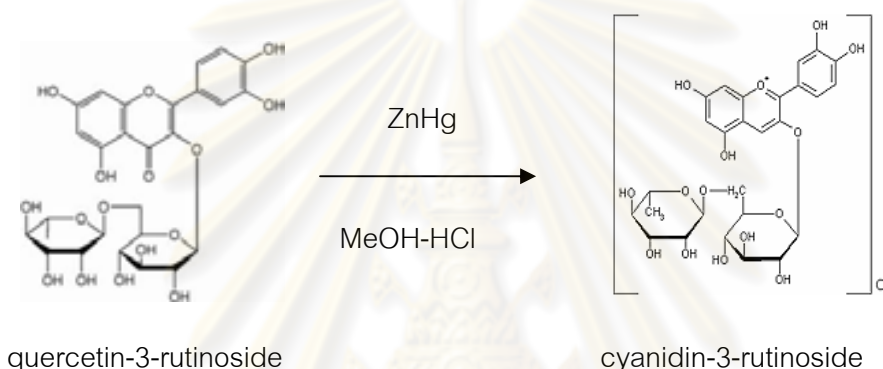
รูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสโดยใช้สารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ความเข้มข้น 3 U/mL จำนวน 150 μ l อนุพันธ์ที่ผ่านการคัดกรอง ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 20 μ l สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.9 จำนวน 180 μ l และผสมกับสารละลายน้ำแป้ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 150 μ l แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 1% DNS จำนวน 500 μ l จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อยุติปฏิกิริยา เติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรตความเข้มข้น 40% จำนวน 500 μ l นำไปวัดค่า % alpha-amylase inhibitor activity โดยทำการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น คือ มอลโตส ด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ในสารละลายน้ำแป้งแต่ละความเข้มข้นไปแทนค่าในสมการจากกราฟมาตรฐานมอลโตส เพื่อทำการคำนวณหาค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของมอลโตสต่อเวลาการทำปฏิกิริยา(1/v) สำหรับในการสร้างกราฟ Lineweaver-burk plot และ Secondary plot เพื่อประเมินรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

การทดลองที่ 3 : การทดสอบการเสริมฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน และอนุพันธ์ร่วมกับ acarbose

ศึกษาการเสริมฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดินและอนุพันธ์ร่วมกับ acarbose ซึ่งเป็นยาลดระดับน้ำตาลในเลือดตัวหนึ่งที่ใช้ในปัจจุบัน เพื่อทดสอบสารไซยานิดินและอนุพันธ์สามารถเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของ acarbose ได้หรือไม่ โดยทำการคัดเลือกสารละลายไซยานิดินและอนุพันธ์ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่มีผลยับยั้งต่อการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เตรียมสารละลาย acarbose ความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 1250, 625, 312, 156, 78.1 μ M จาก stock solution ความเข้มข้น 1250 μ M โดยใช้ acarbose ขนาด 100 mg/tablet จำนวน 1 เม็ด บดให้ละเอียดแล้วละลายด้วย DMSO 5 ml จากนั้นบีบสารละลายมา 1 ml แล้วละลายด้วย จนมีปริมาตรเป็น 25 ml ใช้สารละลาย acarbose แต่ละความเข้มข้น จำนวน 20 μ l สารละลายไซยานิดินและอนุพันธ์ความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ไม่มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จำนวน 20 μ l นำมาผสมกับสารละลายเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ความเข้มข้น 3 U/mL จำนวน 150 μ l สารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.9 จำนวน 160 μ l แล้วนำไปบ่มที่ อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย 1% DNS จำนวน 500 μ l

จากนั้นนำไปต้มเป็นเวลา 10 นาที เพื่อยุติปฏิกิริยา เติมสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 40% จำนวน 500 μ l นำไปวัดค่า % alpha-amylase inhibitor activity โดยวัด ปริมาณมอลโตสที่เกิดขึ้นด้วยวิธีสเปกโทรสโกปี วัดที่ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nM เพื่อ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของสารละลายที่มี acarbose และ สารละลายที่ไม่มี acarbose

การสังเคราะห์สาร cyanidin-3-rutinoside จากสาร quercetin-3-rutinoside



ภาพที่ 3.1 แสดงปฏิกิริยาการสังเคราะห์สาร cyanidin-3-rutinoside (Mourad et al. 1995)

จากการทดลองที่ 1 พบว่าเป็นอนุพันธ์ไซยานิดินที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดี ที่สุด คือ สารไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ (cyanidin-3-rutinoside) จึงนำสารนี้มาศึกษาต่อในหนูแรท เพื่อทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมา ซึ่งสารไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ที่นำมาใช้ในการทดลอง ที่ 4 และ 5 ได้จากการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นคือ quercetin-3-rutinoside (ภาพที่ 3.1) ได้ ผลิตภัณฑ์ เท่ากับ 40 %

วิธีการสังเคราะห์

ซึ่งสาร quercetin-3-rutinoside จำนวน 1 g ละลายใน 3% MeOH-HCl ปริมาตร 16 ml จากนั้นค่อยๆ เติมซิงค์อมัลกัม (Zn/Hg) จำนวน 1.58 g หมุนด้วยมือ ประมาณ 20 นาที จากนั้น นำสารละลายที่ได้กรอง Zn/Hg ทิ้ง ก่อนนำไปแยกสารออกด้วยคอลัมน์ที่บรรจุ Diaion สารละลาย ที่ใช้คือ MeOH นำสารที่แยกได้ไปตกผลึกด้วย 1% MeOH-HCl และ diethyl ether นำไปทำให้ แห้งด้วยเครื่อง Rotary evaporation และเครื่อง suction เก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20 °C (Mourad et al.1995)

การทดลองที่ 4: การทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาของ cyanidin-3-rutinoside ในหนูแรพปกติ

จากการทดลองที่ 1 พบว่าอนุพันธ์ไซยานิดินที่ผ่านการคัดกรองความสามารถการยับยั้ง เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด คือสาร cyanidin-3-rutinoside จากนั้นนำมาทำการศึกษาใน สัตว์ทดลองว่าสามารถมีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในหนูแรพได้หรือไม่ โดยวิธี oral carbohydrate tolerance test และเก็บเลือดตรวจระดับกลูโคสในพลาสมา ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วิธีการทดลอง

ใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แบ่งกลุ่ม การทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม โดยป้อนแป้งขนาด 5 g/kg กับหนูทุกกลุ่มตามด้วยสารทดสอบแต่ละ อนุพันธ์ ด้วยวิธีป้อนทางปากด้วย feeding tube NO. 18 ชนิดสแตนเลส ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้น้ำกลั่น 1 ml/kg
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside 30 mg/kg
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside 100 mg/kg
- กลุ่มที่ 4 กลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside 300 mg/kg
- กลุ่มที่ 5 กลุ่มให้ acarbose 5 mg/kg

เก็บเลือดจำนวน 0.5 ml จากหลอดเลือดดำที่หางของหนูแรพทดลองก่อนให้สารทดสอบ (นาที่ที่ 0) แล้วเก็บเลือดที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาที ภายหลังให้น้ำแป้งและสาร ทดสอบ นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น นำพลาสมาที่ได้ไปทดสอบหาความเข้มข้นของระดับกลูโคส ด้วยวิธี glucose oxidase test นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟ ระหว่างระยะเวลากับระดับกลูโคสในพลาสมา และคำนวณหาค่าพื้นที่ใต้ กราฟจากชั่วโมงที่ 0-3 ชั่วโมง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 5 : การทดสอบการเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาของ cyanidin-3-rutinoside ในหนูแรทปกติ

จากการทดลองที่ 1 พบว่าอนุพันธ์ของไซยานิดินที่ผ่านการคัดกรองความสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด คือ cyanidin-3-rutinoside คัดเลือกความเข้มข้นของอนุพันธ์ไซยานิดินที่มีความเข้มข้นต่ำสุดในการลดระดับกลูโคสในพลาสมา ขนาดที่ใช้คือ 30 mg/kg จากการทดลองที่ 4 โดยให้ร่วมกับ acarbose ขนาดต่างๆ เพื่อต้องการทราบว่าอนุพันธ์ไซยานิดินสามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทได้หรือไม่ โดยวิธี oral carbohydrate tolerance test และเก็บเลือดตรวจระดับกลูโคสในกระแสเลือด ณ ช่วงเวลาต่างๆ

วิธีการทดลอง

ใช้หนูกลุ่มละ 6 ตัว อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมง แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม โดยป้อนแป้งขนาด 5 g/kg กับหนูทุกกลุ่มการทดลองตามด้วยสารทดสอบแต่ละอนุพันธ์ ด้วยวิธีป้อนทางปากด้วย feeding tube NO. 18 ชนิดสแตนเลส ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้น้ำกลั่น 1 ml/kg
- กลุ่มที่ 2 กลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside 30 mg/kg+ acarbose 0.5 mg/kg
- กลุ่มที่ 3 กลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside 30 mg/kg+ acarbose 1 mg/kg
- กลุ่มที่ 4 กลุ่มให้ acarbose 1 mg/kg
- กลุ่มที่ 5 กลุ่มให้ acarbose 0.5 mg/kg

เก็บเลือดจำนวน 0.5 ml จากหลอดเลือดดำที่หางของหนูทดลองก่อนให้สารทดสอบ (นาที่ 0) แล้วเก็บเลือดที่เวลา 30, 60, 90, 120 และ 180 นาทีภายหลังให้น้ำแป้งและสารทดสอบ นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกพลาสมาที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำพลาสมาที่ได้ไปทดสอบหาความเข้มข้นของระดับกลูโคส ด้วยวิธี glucose oxidase test นำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟระหว่างระยะเวลากับระดับกลูโคสในพลาสมา และคำนวณหาค่าพื้นที่ใต้กราฟจากชั่วโมงที่ 0-3 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

รายงานผลการทดลองในรูปของค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean \pm standard error of mean, S.E.M.) วิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ และกลุ่มควบคุมโดยใช้ student's t-test และ Least Significant Difference (LSD) พิจารณาความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 % ($p < 0.05$)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองที่ 1 : การทดสอบฤทธิ์เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน และอนุพันธ์

จากตารางที่ 4.1 พบว่า อนุพันธ์ของไซยานิดินที่ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุดคือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.28 \pm 0.03 \mu M$ ซึ่งเรียงลำดับความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดังนี้ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ > ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน > ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ \cong ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ ตามลำดับ โดยที่ค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดินและอนุพันธ์แปรผันตามความเข้มข้นของอนุพันธ์ไซยานิดินที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2) แต่อย่างไรก็ตามไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของไซยานิดินที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้ดีที่สุดนั้นสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้น้อยกว่าอะคาร์โบส อยู่ 1.16 เท่า ซึ่งค่า IC_{50} ของ acarbose มีค่าเท่ากับ $18.33 \pm 0.05 \mu M$

ตารางที่ 4.1 แสดงค่าเฉลี่ยของ IC_{50} (μM) ไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

สารทดสอบ	IC_{50} (μM)
ไซยานิดิน	378.55 ± 0.02
ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	245.82 ± 0.05
ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์	> 1000
ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์	21.28 ± 0.03
ไซยานิดิน-3,5- ไดกลูโคไซด์	> 1000
อะคาร์โบส	18.33 ± 0.05

ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนกลุ่มการทดลองเท่ากับ 3

ตารางที่ 4.2 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของไซยานิดินและอนุพันธ์ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ความเข้มข้น (μM)	% enzyme inhibition				
	ไซยานิดิน	ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์	ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์	ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์	ไซยานิดิน-3,5- ไดกลูโคไซด์
1000	60.82 \pm 0.01	70.31 \pm 0.01	63.06 \pm 0.01	32.76 \pm 0.01	31.34 \pm 0.01
500	56.15 \pm 0.01	65.09 \pm 0.01	56.15 \pm 0.08	32.45 \pm 0.03	26.15 \pm 0.01
250	47.93 \pm 0.01	60.08 \pm 0.01	50.85 \pm 0.08	18.21 \pm 0.01	15.68 \pm 0.09
100	15.95 \pm 0.01	53.12 \pm 0.01	21.19 \pm 0.03	12.10 \pm 0.10	6.24 \pm 0.01
10	8.94 \pm 0.01	40.02 \pm 0.08	12.13 \pm 0.02	1.64 \pm 0.03	3.55 \pm 0.08
1	4.85 \pm 0.01	13.20 \pm 0.06	6.15 \pm 0.02	0.55 \pm 0.03	0.55 \pm 0.02
0.1	0.01 \pm 0.05	0.82 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	-3.38 \pm 0.01	-5.99 \pm 0.01

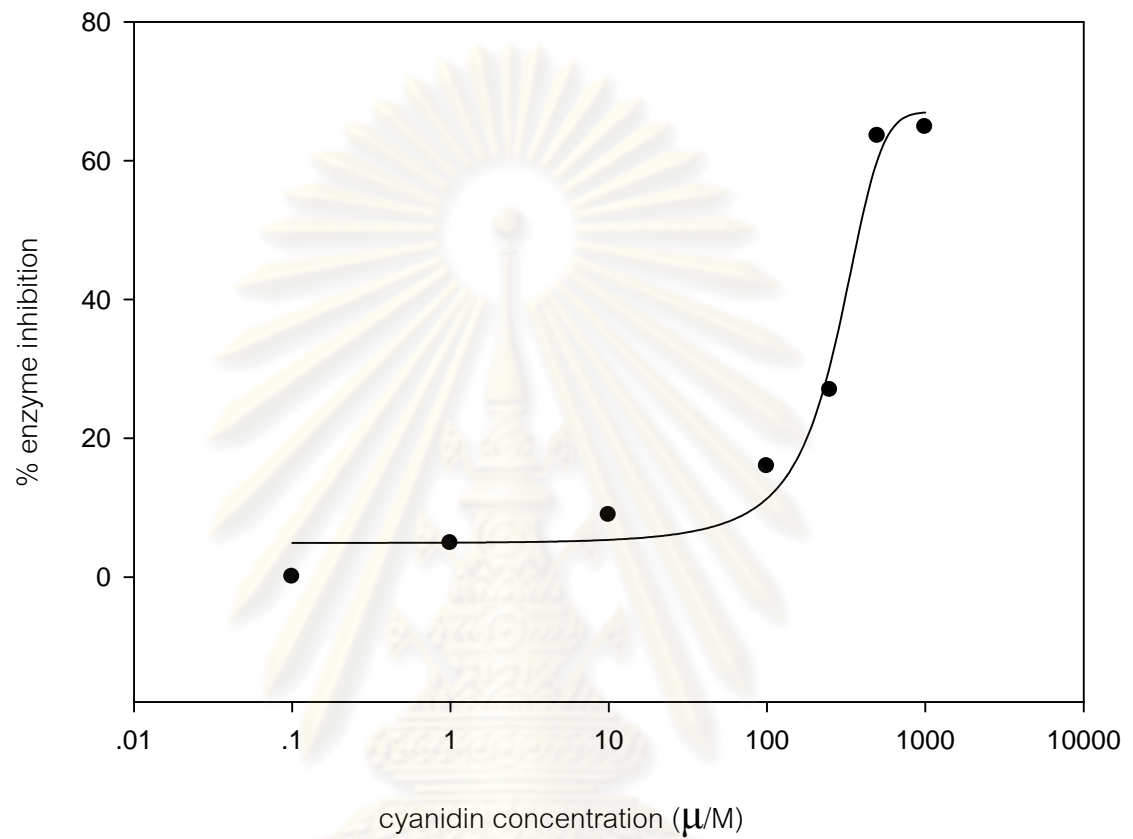
ผลการทดลองแสดงในรูปแบบการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนกลุ่มการทดลองเท่ากับ 3

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของ acarbose ต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

ความเข้มข้น acarbose (micro/M)	% enzyme inhibition
100.0	72.63 ± 0.10
50.0	69.79 ± 0.20
25.0	62.57 ± 0.10
12.5	33.41 ± 0.10
6.3	13.20 ± 0.20
3.1	4.67 ± 0.10

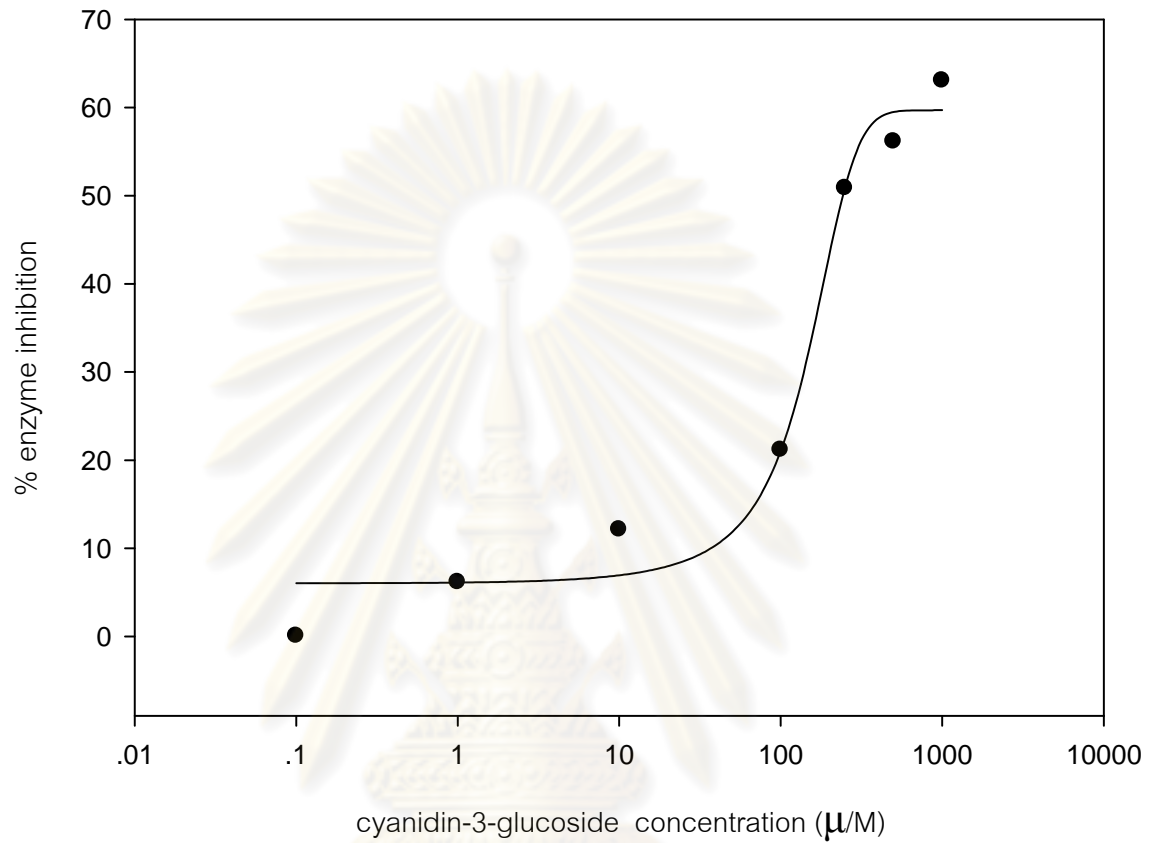
ผลการทดลองแสดงในรูปผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนกลุ่มการทดลองเท่ากับ 3

ภาพที่ 4.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin



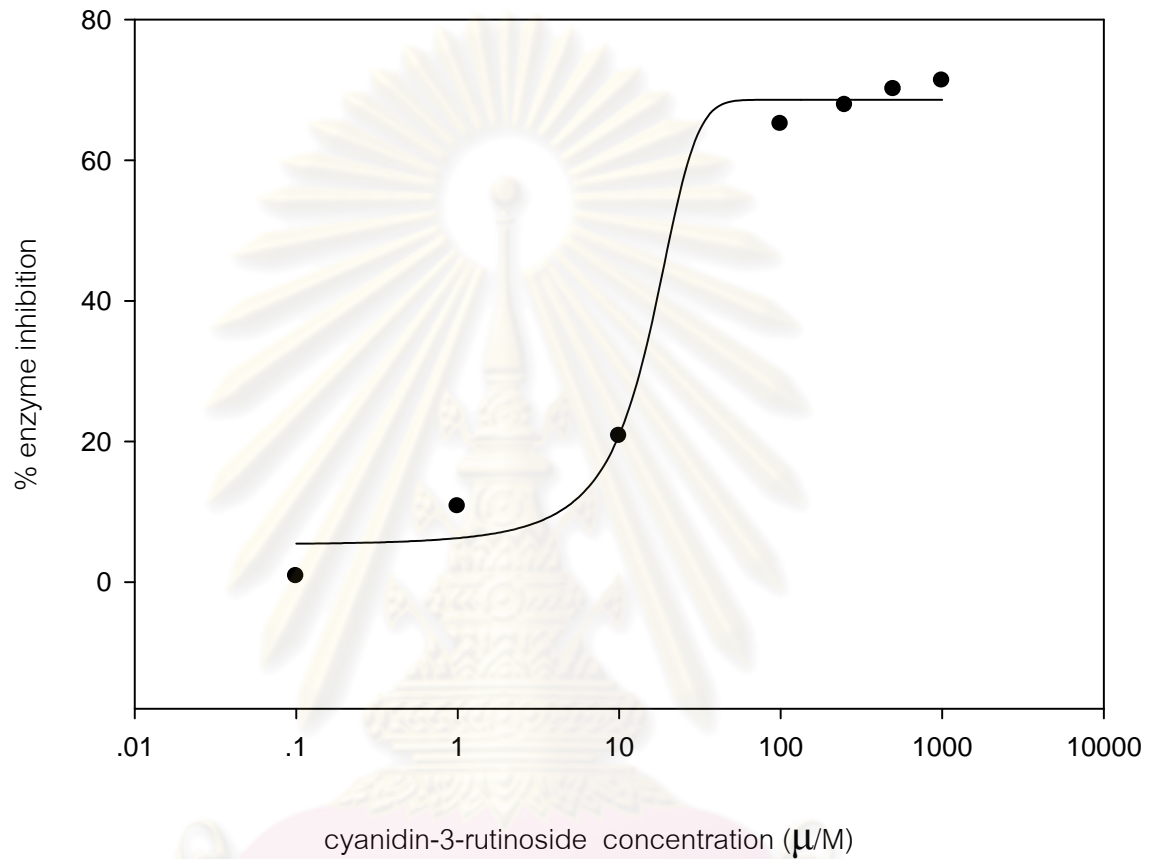
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin-3-glucoside



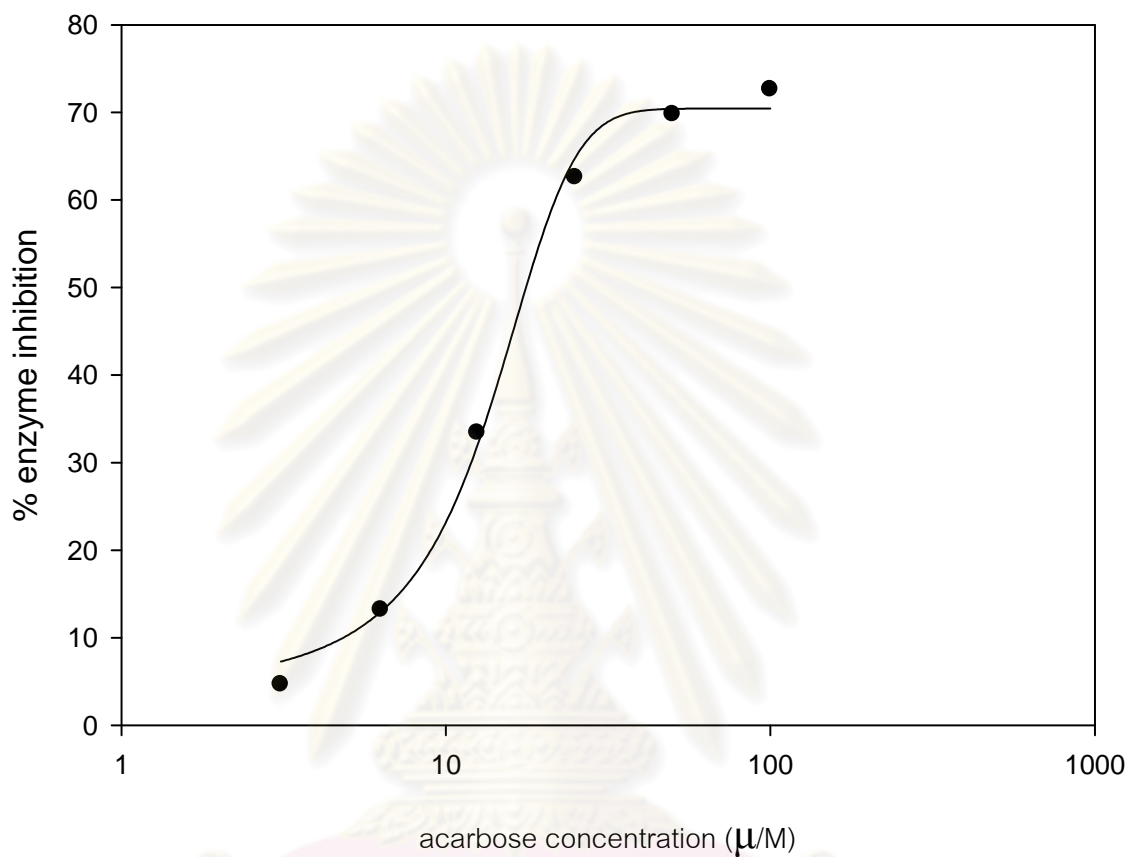
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.3 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ cyanidin-3-rutinoside



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง % enzyme inhibition กับความเข้มข้นของ acarbose



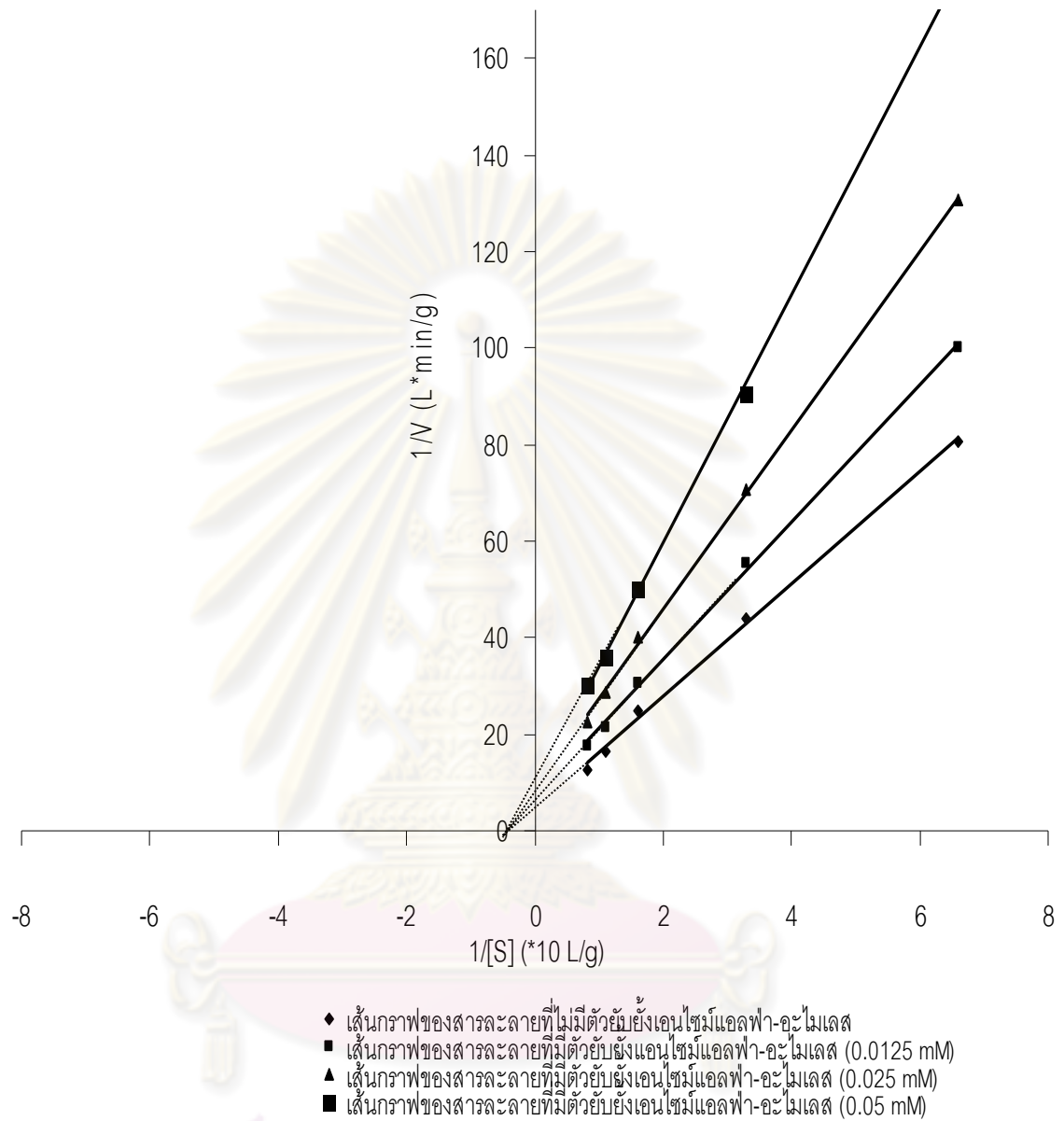
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 2 : การทดสอบรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของ cyanidin-3-rutinoside

จากการทดลองที่ 1 ผลการทดลอง พบว่า อนุพันธ์ไซยานิดินที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด คือ cyanidin-3-rutinoside จากนั้นนำอนุพันธ์ดังกล่าวมาศึกษาต่อในการทดลองนี้ เพื่อทำการวิเคราะห์ชนิดการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

จากกราฟ Lineweaver-burk plot (ภาพที่ 4.5) และตารางที่ 4.4 แสดงค่า V_{max} และ K_m พบว่า ค่าของ V_{max} ลดลง เมื่อความเข้มข้นของตัวยับยั้งเพิ่มขึ้น ซึ่งค่าที่แสดง คือ จุดตัดบนแกน y และค่า K_m คือ จุดตัดบนแกน X ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จึงสรุปได้ว่า การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของ cyanidin-3-rutinoside นั้นเป็นชนิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน และในขณะเดียวกันเมื่อทำการคำนวณหาค่า K_i และ K_i' ที่ได้จากสมการ รวมทั้งจากจุดตัดบนแกน X ของกราฟ secondary plot (ภาพที่ 4.6 และภาพที่ 4.7) พบว่า มีค่าเท่ากันคือ 0.0320 mM จึงสรุปได้ว่า ค่าความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์อิสระกับ cyanidin-3-rutinoside (K_i) ซึ่งเป็นตัวยับยั้ง มีค่าใกล้เคียงกันกับค่าความสามารถในการจับกันระหว่าง cyanidin-3-rutinoside กับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์อิสระกับสับสเตรต (K_i')

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



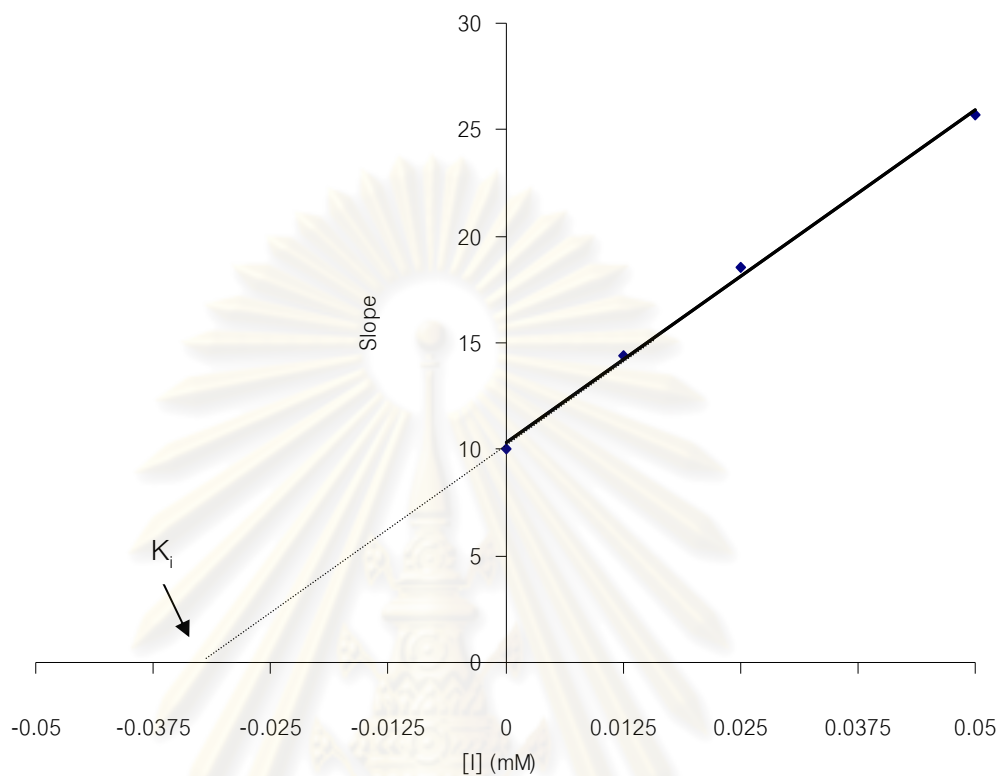
ภาพที่ 4.5 Lineweaver-burk plot แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $1/[S]$ (L/g) และ $1/V$ (L*min/g) ของ cyanidin-3-rutinoside โดยแกน x คือ ค่าส่วนกลับของความเข้มข้นของน้ำแป้ง (สารตั้งต้น) แกน y คือ ค่าส่วนกลับของความเร็วของปฏิกิริยา

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าเฉลี่ยของ V_{\max} (g/L*min) และค่า K_m (μ M) ของ cyanidin-3-rutinoside

ความเข้มข้นของตัวยับยั้งในสารละลาย (mM)	V_{\max} (g/L*min)	K_m (μ M)
0	0.11 \pm 0.02	1.30 \pm 0.01
0.0125	0.09 \pm 0.01	1.30 \pm 0.02
0.025	0.07 \pm 0.02	1.30 \pm 0.02
0.05	0.05 \pm 0.01	1.30 \pm 0.02

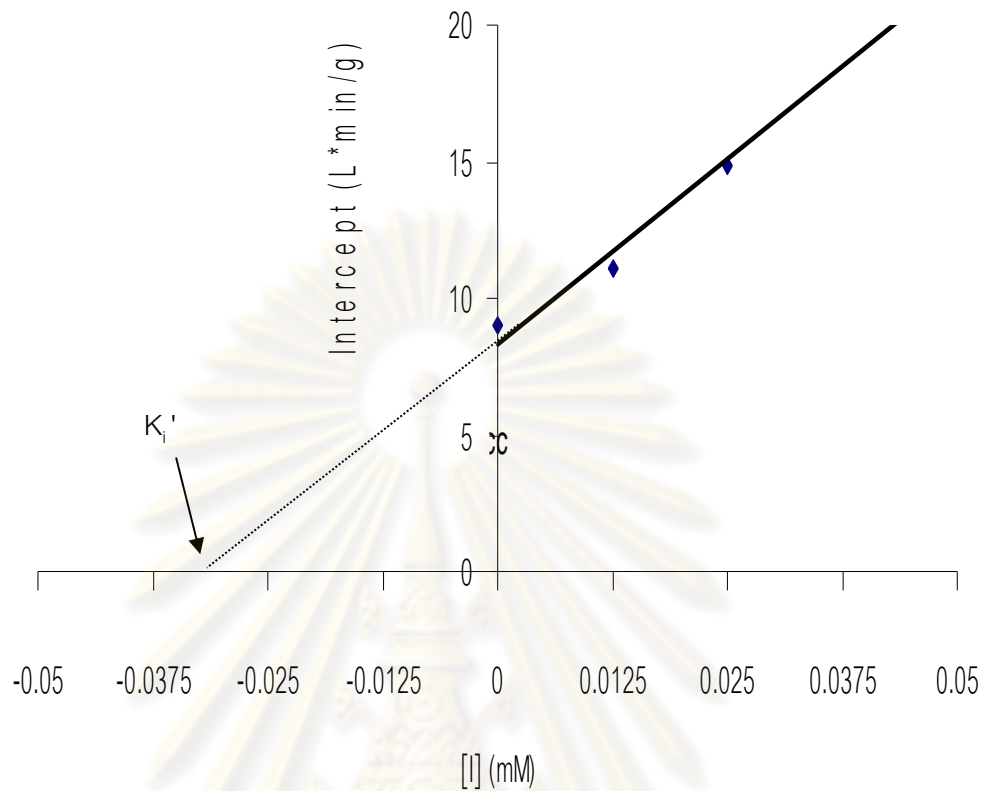
ผลการทดลองแสดงผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนกลุ่มการทดลองเท่ากับ 3

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.6 Secondary plot แสดงค่า K_i ของ cyanidin-3-rutinoside คือค่าจุดตัดบนแกน X โดยแกน x คือค่าความเข้มข้นของ cyanidin-3-rutinoside [I] และแกน y คือค่า slope ที่หาได้จาก Lineweaver-burk plot โดยมีค่า K_i เท่ากับ 0.0320 mM

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4.7 Secondary plot แสดงค่า K_i' ของ cyanidin-3-rutinoside คือค่าจุดตัดบนแกน X โดยแกน x คือค่าความเข้มข้นของ cyanidin-3-rutinoside [I] และแกน y คือค่า Intercept ที่หาได้จาก Lineweaver-burk plot โดยมีค่า K_i' เท่ากับ 0.0320 m M

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การทดลองที่ 3 : การทดสอบการเสริมฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน และอนุพันธ์ร่วมกับ acarbose

จากการทดลองที่ 1 พบว่า การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดินและอนุพันธ์แต่ละชนิด แปรผันตามความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่เพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.2) ซึ่งในการทดลองนี้คัดเลือกไซยานิดินและอนุพันธ์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดในยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ คือ $0.1 \mu\text{M}$ นำมาศึกษาโดยให้ร่วมกับ acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อทดสอบว่าไซยานิดินและอนุพันธ์สามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้หรือไม่ โดยคำนวณหาค่า % enzyme inhibition เปรียบเทียบกับกลุ่ม acarbose ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพียงชนิดเดียว

จากตารางที่ 4.5 พบว่า ไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ เป็นอนุพันธ์ของไซยานิดินที่เมื่อให้ร่วมกับ อะคาร์โบสแล้วสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นต่ำสุดของ acarbose คือ $3.1 \mu\text{M}$ โดยมีค่า % enzyme inhibition เท่ากับ 9.79 ± 0.01 หรือสามารถเพิ่มค่า % enzyme inhibition ได้ 0.58 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม acarbose เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นเดียวกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าเฉลี่ยของ % enzyme inhibition ของไซยานิดินและอนุพันธ์ในการเสริมฤทธิ์กับอะคาร์โบสในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

กลุ่ม	% enzyme inhibition				
	ความเข้มข้น acarbose (μM)				
	3.1	6.3	12.5	25	50
acarbose+cyanidin	6.45 \pm 0.01	14.50 \pm 0.08	32.62 \pm 0.01	62.31 \pm 0.01	69.77 \pm 0.01
acarbose+cyanidin-3-rutinoside	9.79 \pm 0.01*	15.77 \pm 0.02	33.10 \pm 0.01	62.37 \pm 0.01	70.08 \pm 0.01
acarbose+cyanidin-3-glucoside	6.79 \pm 0.01	14.90 \pm 0.05	32.96 \pm 0.01	62.28 \pm 0.01	69.80 \pm 0.01
acarbose+cyanidin-3-galactoside	5.70 \pm 0.05	14.20 \pm 0.04	32.48 \pm 0.01	62.06 \pm 0.01	69.99 \pm 0.01
acarbose+cyanidin-3,5-diglucoside	5.69 \pm 0.01	14.15 \pm 0.01	32.49 \pm 0.01	62.22 \pm 0.03	69.73 \pm 0.01
acarbose	5.68 \pm 0.03	14.03 \pm 0.01	32.48 \pm 0.01	62.18 \pm 0.01	69.72 \pm 0.01

ผลการทดลองแสดงในรูปผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนกลุ่มการทดลองเท่ากับ 3 ความเข้มข้นของไซยานิดินและอนุพันธ์ที่คัดเลือกนำมาทดลองคือ 0.1 μM

การทดลองที่ 4 : การทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาของอนุพันธ์ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ในหนูแรทปกติ

จากการทดลองที่ 1 พบว่า cyanidin-3-rutinoside เป็นอนุพันธ์ไซยานิดินที่สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด จึงนำอนุพันธ์ดังกล่าวมาศึกษาต่อในส่วนของการทดลองที่ 4 โดยการทำการ oral carbohydrate tolerance test เพื่อศึกษาฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาของอนุพันธ์ดังกล่าว

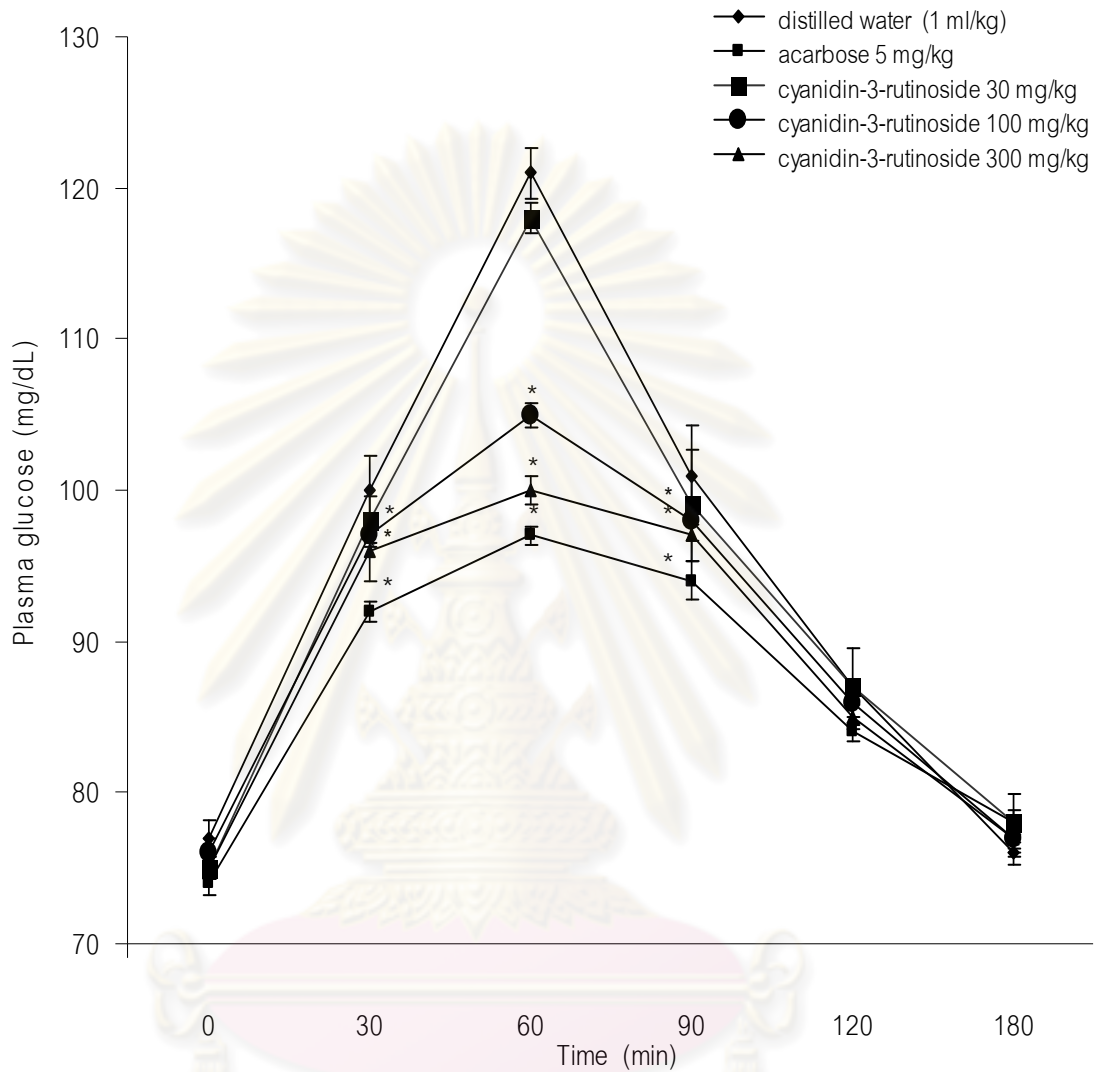
จากตารางที่ 4.6 และภาพที่ 4.8 หลังจากป้อนแป้งและ cyanidin-3-rutinoside แต่ละความเข้มข้นหรือ acarbose ขนาด 5 mg/kg ในนาที่ที่ 30, 60 และ 90 พบว่า cyanidin-3-rutinoside ขนาด 100 และ 300 mg/kg และ acarbose สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย cyanidin-3-rutinoside ขนาด 100 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้ ณ นาที่ที่ 30, 60 และ 90 หลังจากป้อนแป้ง โดยมีค่าเท่ากับ 3, 13.22% และ 2% ตามลำดับ แล cyanidin-3-rutinoside ขนาด 300 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้ ณ นาที่ที่ 30, 60 และ 90 นาที หลังจากป้อนแป้งตามลำดับ ซึ่งมีเท่ากับ 4%, 17.36% และ 3% สำหรับกลุ่มให้ acarbose สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 8%, 21.49% และ 6% ณ นาที่ที่ 30, 60 และ 90 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากภาพที่ 4.9 เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ขนาด 100 และ 300 mg/kg ณ ช่วงนาที่ที่ 0 ถึง 180 สามารถลดค่า AUC ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยมีค่าลดลงเท่ากับ 5.71% และ 8.69% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามกลุ่มให้ cyanidin-3-rutinoside ยังไม่สามารถลดค่า AUC ได้เท่ากับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ซึ่งสามารถลดค่า AUC เท่ากับ 13.87% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรพปกติของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 นาที

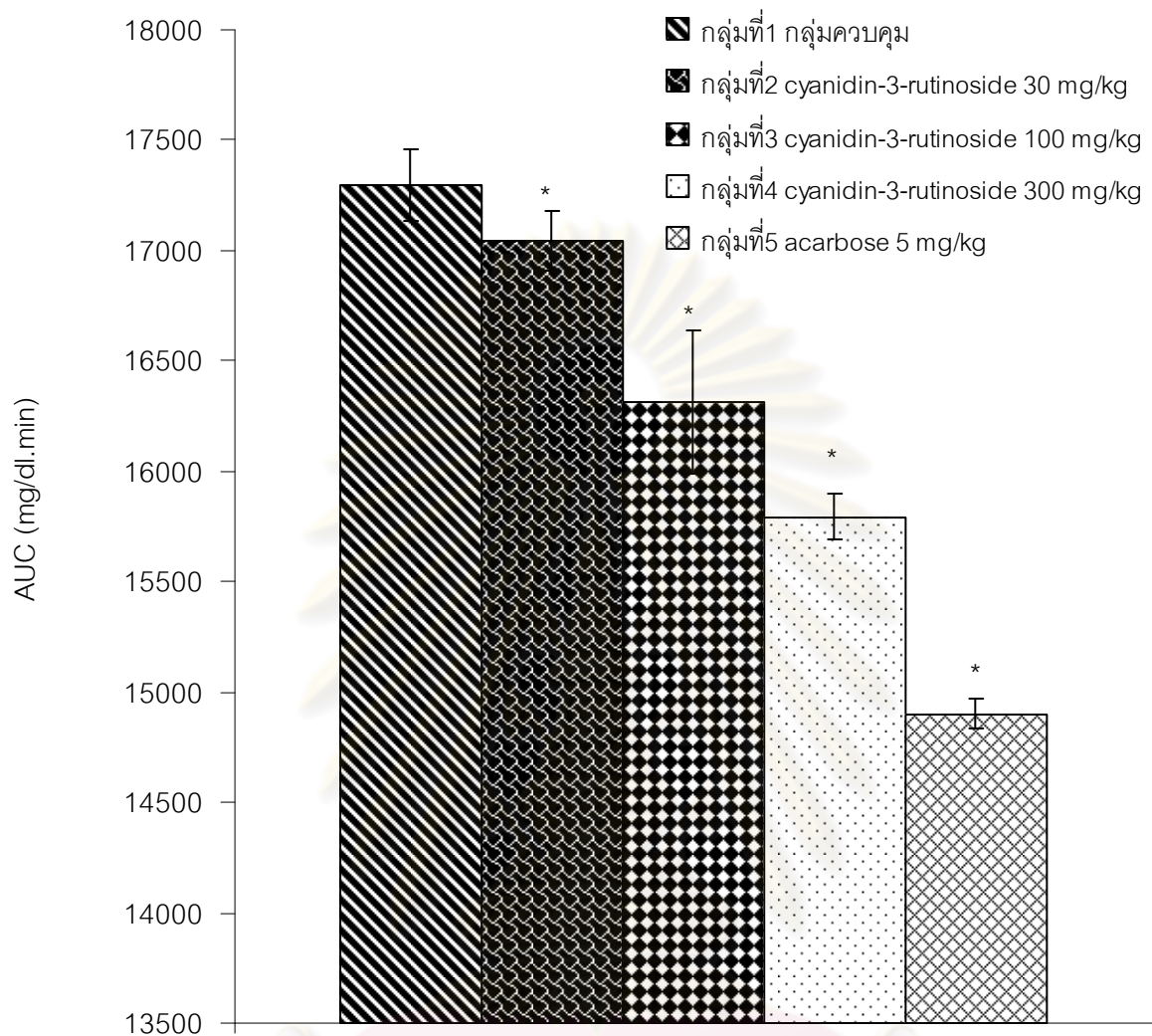
กลุ่มที่	ระดับน้ำตาลในพลาสมา (มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร)						
	เวลา (นาที)	0	30	60	90	120	180
กลุ่มที่1 แป้ง 5 g/kg+ น้ำกลั่น 1 ml/kg (control)		77.00±1.21	100.00±2.21	121.00±1.70	101.00±3.28	87.00±0.47	76.00±0.76
กลุ่มที่3 แป้ง 5 g/kg+ cyanidin-3-rutinoside 30 mg/kg		75.00±0.73	98.00±1.54	118.00±0.99	100.00±3.68	87.00±2.55	78.00±1.97
กลุ่มที่4 แป้ง 5 g/kg+ cyanidin-3-rutinoside 100 mg/kg		76.00±0.95	97.00±0.73*	105.00±0.79*	99.00±1.38*	86.00±0.95	77.00±1.20
กลุ่มที่5 แป้ง 5 g/kg+ cyanidin-3-rutinoside 300 mg/kg		75.00±0.77	96.00±2.09*	100.00±0.88*	97.00±1.73*	85.00±0.75	77.00±0.70
กลุ่มที่2 แป้ง 5 g/kg+ acarbose 5 mg/kg		76.00±0.73	92.00±0.70*	95.00±0.56*	94.00±1.25*	84.00±0.60	78.00±0.82

* เปรียบเทียบกลุ่มควบคุม โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนสัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว



ภาพที่ 4.8 แสดงค่าเฉลี่ยระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 ขนาดของแป้งที่ใช้ในการทดลองคือ 5 g/kg

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองเท่ากับ 6 ตัว * แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม



ภาพที่ 4.9 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรพปกติของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

* แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จำนวนสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองเท่ากับ 6 ตัว ขนาดของแป้งที่ใช้ในการทดลองคือ 5 g/kg

การทดลองที่ 5 : การทดสอบเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมา ของ cyanidin-3-rutinoside ในหนูแรทปกติ

จากการทดลองที่ 4 คัดเลือก cyanidin-3-rutinoside ขนาดต่ำสุดที่มีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาคือ 30 mg/kg มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 5 และจากการทดลองที่ 3 พบว่าสารดังกล่าวสามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในห้องทดลองได้หรือไม่ ดังนั้นจึงทำการศึกษาต่อเนื่องเพื่อทดสอบการเสริมฤทธิ์ของ cyanidin-3-rutinoside กับ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมา

จากตารางที่ 4.7 และภาพที่ 4.10 หลังจากป้อนแป้งและ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ อะคาร์โบสแต่ละความเข้มข้น ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 พบว่า กลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose 0.5 และ 1 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 และ 1 mg/kg เพียงอย่างเดียว สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 3.64%, 11.57% และ 3.92% ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 1 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้เท่ากับ 5.45%, 14.88% และ 3.92% ที่เวลา 30, 60 และ 90 นาทีตามลำดับ ในขณะที่เดียวกันกลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg เพียงอย่างเดียว พบว่าสามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับ acarbose เพียงอย่างเดียวที่ขนาด 0.5 mg/kg ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเท่ากับ 2.80%, 10.43% และ 3.92% ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 ตามลำดับ

จากภาพที่ 4.11 เมื่อคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (AUC) ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 นาที พบว่า กลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 0.5 และ 1 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 และ 1 mg/kg เพียงอย่างเดียว สามารถลดค่า AUC ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 และ 1 mg/kg เพียงอย่างเดียว มีค่า AUC ลดลงเท่ากับ 5.82% และ 6.98% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 0.5 และ 1 mg/kg สามารถลดค่า AUC ได้เท่ากับ 10.46% และ 7.39% ตามลำดับ

แต่ในขณะเดียวกันกลุ่มที่ได้รับ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg สามารถลดค่า AUC ได้ต่ำกว่ากลุ่มให้ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg เพียงอย่างเดียวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าลดลงเท่ากับ 3.93%

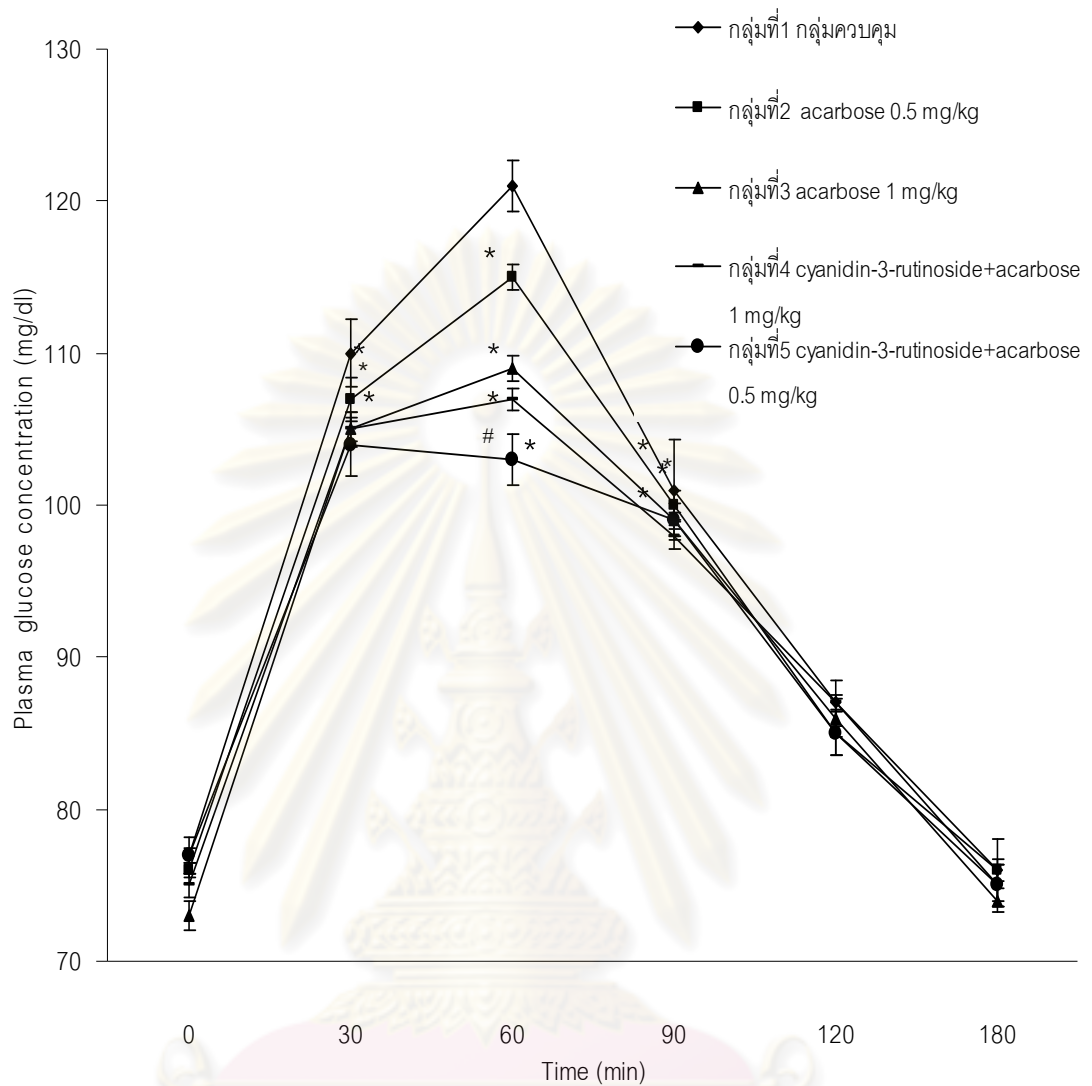


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.7 แสดงค่าเฉลี่ยของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรพปกติเมื่อให้ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180 นาที

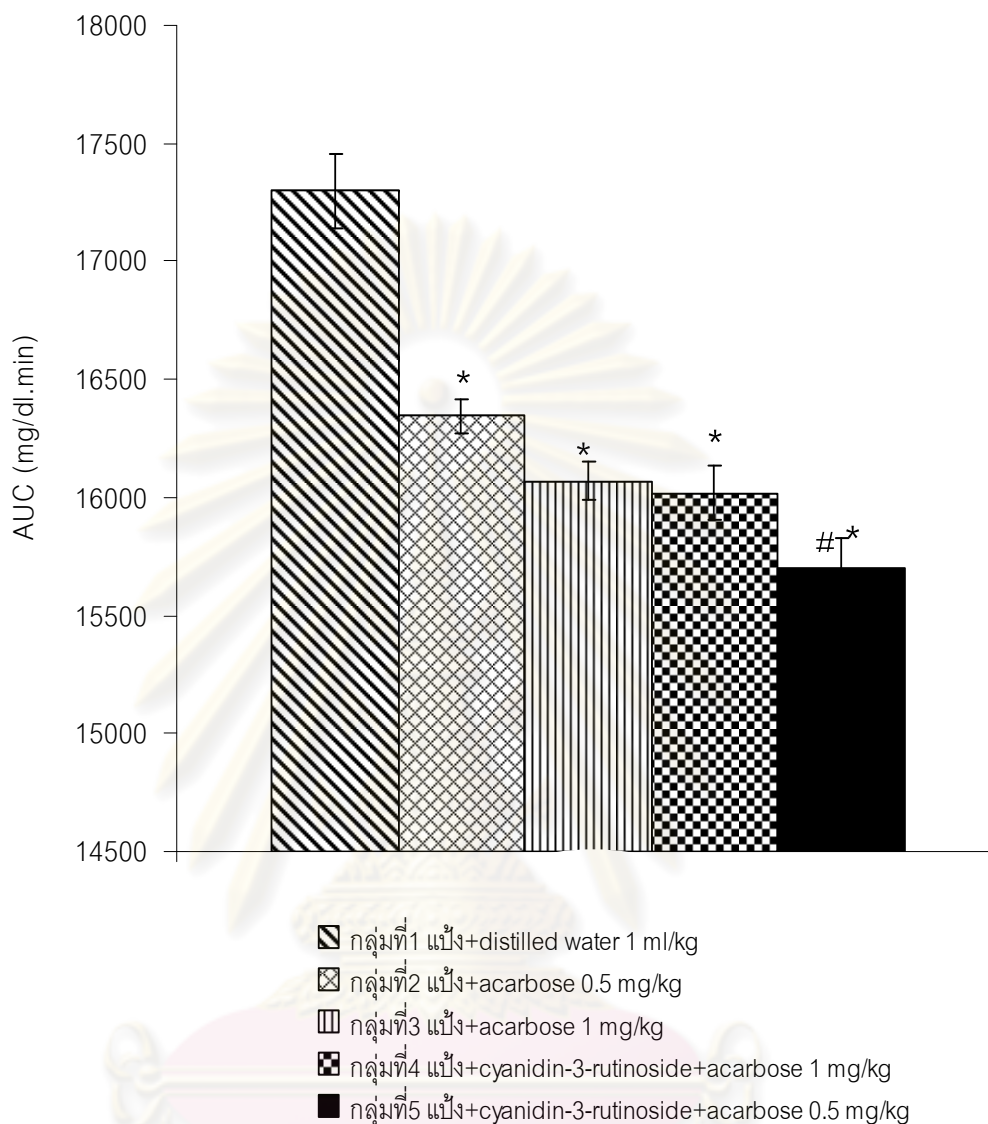
กลุ่มที่	ระดับน้ำตาลในพลาสมา (มก./ดล.) ณ เวลาต่างๆ						
	เวลา (นาที)	0	30	60	90	120	180
กลุ่มที่1 แป้ง+น้ำกลั่น 1 ml/kg		77.00±1.21	110.00±2.21	121.00±1.70	102.00±3.28	87.00±0.47	76.00±0.76
กลุ่มที่2 แป้ง+ cyanidin-3-rutinoside + acarbose 0.5 mg/kg		77.00±0.76	104.00±1.15* #	103.00±0.70* #	98.00±0.92* #	85.00±1.52	75.00±1.41
กลุ่มที่3 แป้ง+ cyanidin-3-rutinoside + acarbose 1 mg/kg		76.00±0.49	105.00±2.10*	106.00±1.72*	98.00±1.06*	86.00±1.42	74.00±1.40
กลุ่มที่4 แป้ง+ acarbose 0.5 mg/kg		76.00±0.48	107.00±1.45*	115.00±0.87*	100.00±0.92*	85.00±1.40	76.00±2.00
กลุ่มที่5 แป้ง+ acarbose 1 mg/kg		75.00±1.00	106.00±0.76*	107.00±0.79*	99.00±0.58*	87.00±1.23	75.00±0.75

* เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ # เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนสัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว ขนาดแป้งที่ให้คือ 5 g/kg และขนาดของ cyanidin-3-rutinoside เท่ากับ 30 mg/kg



ภาพที่ 4.10 แสดงค่าเฉลี่ยระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของ cyanidin-3-rutinoside เมื่อให้ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180

* เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 ได้รับน้ำกลั่น 1 ml/kg โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ และ # เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ขนาดของ cyanidin-3-rutinoside และแป้งที่ใช้ในการทดลองคือ 30 mg/kg และ 5 g/kg ผลการทดลองแสดงในรูปแบบในรูปค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองเท่ากับ 6 ตัว



ภาพที่ 4.11 แสดงค่าเฉลี่ยพื้นที่ใต้กราฟ (area under the curve, AUC) ของระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรพปกติเมื่อให้ cyanidin-3-rutinoside ร่วมกับ acarbose ของแต่ละกลุ่มการทดลอง ณ ช่วงเวลาที่ 0 ถึง 180

*เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$

#เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 โดยมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ขนาดของ cyanidin-3-rutinoside และแบริ่งที่ใช้ในการทดลองคือ 30 mg/kg และ 5 g/kg ผลการทดลองแสดงในรูปแบบค่าเฉลี่ย \pm ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จำนวนสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มการทดลองเท่ากับ 6 ตัว

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผล และข้อเสนอแนะการวิจัย

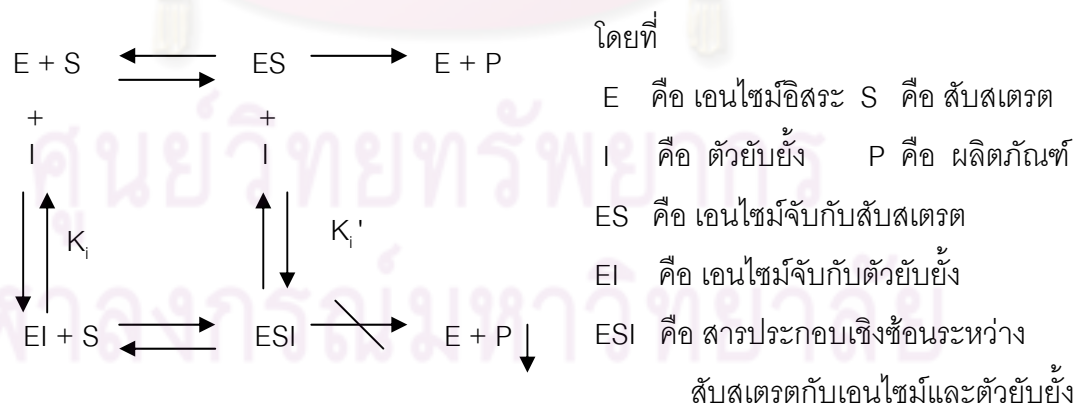
1. ผลของไซยานิดินและอนุพันธ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสจากตับอ่อนเป็นเอนไซม์ที่พบได้ในบริเวณลำไส้เล็ก ทำหน้าที่ย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ และน้ำตาลโมเลกุลคู่จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ที่บริเวณ brush border membrane ของผนังลำไส้เล็ก ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อใช้ในการดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด (Josse and Cheng, 2004) ดังนั้นหากสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสและเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ย่อมส่งผลช่วยชะลอการดูดซึมน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเข้าสู่กระแสเลือดได้เช่นเดียวกัน (Peng and Gang, 2007) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า SOA-4 SOA-6 YGM-3 และ YGM-6 สารเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่มของสารแอนโทไซยานิน มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์มอลเทสได้ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวเป็นเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส รวมทั้งสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ จากนั้นเมื่อนำสารดังกล่าวมาศึกษาในสัตว์ทดลองให้ผลสอดคล้องกันคือ ช่วยชะลอการดูดซึ่มกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดในหนูแรทได้ (Mutsui et al. 2001) และจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ (Adisakwattana et al. 2004) ซึ่งในการศึกษาในครั้งนี้ได้ข้อมูลเพิ่มเติม คือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $23.54 \pm 0.03 \mu M$ เรียงลำดับความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดังนี้ คือ ไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์ > ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน > ไซยานิดิน-3-กาแลคโตไซด์ \cong ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ ตามลำดับ และการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน-3-รูทีโนไซด์อาจจะทำงานร่วมกับกลไกการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดส ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่จะช่วยส่งผลทำให้ชะลอการดูดซึ่มกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดในหนูแรทได้สำหรับการศึกษาต่อไปในการทดลองที่ 4

จากโครงสร้างทางเคมีของไซยานิดินและอนุพันธ์ (ภาพที่ 2.14) ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ เปรียบเทียบโครงสร้างทางเคมีของไซยานิดินและอนุพันธ์ทั้ง 5 ชนิด พบว่าภายในโครงสร้างของไซยานิดินที่ไม่พบโมเลกุลของน้ำตาล ส่งผลทำให้การยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้น้อยกว่าโครงสร้างของไซยานิดินที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือ กาแลกโตไซด์ และกลูโคไซด์อยู่ในโครงสร้างที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 อนุพันธ์ดังกล่าวคือ ไซยานิดิน-3-กาแลกโตไซด์ และไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ เปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ทั้งสองชนิดพบว่า มีความแตกต่างที่ลักษณะของกลุ่มไฮดรอกซิล (hydroxyl) ในโมเลกุลของน้ำตาล กล่าวคือ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ มีลักษณะของกลุ่มไฮดรอกซิล เป็นแบบชนิดแอลฟา สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีกว่า ไซยานิดิน-3-กาแลกโตไซด์ ซึ่งมีลักษณะของกลุ่มไฮดรอกซิล เป็นแบบเบต้า จึงสรุปได้ว่า ความแตกต่างของกลุ่มไฮดรอกซิลในโมเลกุลน้ำตาลมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส โดยอาจมีผลรบกวนการจับตัวกันระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ ทั้งนี้ควรต้องทำการศึกษาให้ชัดเจนเกี่ยวกับโครงสร้างดังกล่าวโดยใช้ computer modeling เพิ่มเติม จากนั้นทำการเปรียบเทียบระหว่าง ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์กับไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสองตัวคือ กลูโคส อยู่ในโครงสร้างตำแหน่งคาร์บอนที่ต่างกัน คือตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 เช่นเดียวกับ ไซยานิดิน-3-กลูโคไซด์ แต่ต่างกันคือ เพิ่มตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 พบว่า ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ ให้ผลยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสลดลงได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า โครงสร้างของไซยานิดินที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 5 เพิ่มขึ้นนั้นอาจทำให้เกิดความยากลำบากหรือไปรบกวนการจับตัวกันระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ได้ จึงส่งผลทำให้ฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสลดลง และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างอนุพันธ์ไซยานิดินทั้ง 4 ชนิดกับโครงสร้างไซยานิดินที่มีน้ำตาลโมเลกุลคู่ คือ รูติโนส อยู่ในโครงสร้างที่ตำแหน่งคาร์บอนที่ 3 คือ ไซยานิดิน-3-รูติโนไซด์ พบว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด จากผลดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า น้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เรียงต่อกันเป็นสายยาวอยู่ในโครงสร้างของไซยานิดินมีผลต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นอย่างมาก ซึ่งควรต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในลักษณะของการเรียงตัวต่อกันเป็นสายยาวของโมเลกุลน้ำตาลโดยเพิ่มความยาวของโมเลกุลน้ำตาลมากขึ้น จากนั้นดูผลในการยับยั้งเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลสว่าสามารถยับยั้งเอนไซม์ได้เพิ่มขึ้นหรือไม่อย่างไร เพื่อเป็นการยืนยันข้อมูลดังกล่าวให้ชัดเจนยิ่งขึ้น

2. ผลการทดสอบรูปแบบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน-3-รูตินอไซด์

จากการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับอะคาร์โบส พบว่า เป็นยาในกลุ่ม alpha-glucosidase inhibitor โดยมีการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสชนิดแข่งขันแบบผันกลับได้ (reversible and competitive inhibition) (Hollander, 1992; Coniff et al. 1994) จากการทดลองที่ 2 (ภาพที่ 4.5) แสดงให้เห็นว่า ไซยานิดิน-3-รูตินอไซด์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสเป็นแบบชนิดไม่แข่งขัน ซึ่งต่างจากชนิดการยับยั้งเอนไซม์ของ acarbose โดยการยับยั้งแบบชนิดไม่แข่งขัน ตัวยับยั้งชนิดนี้จะสามารถจับกับเอนไซม์รูปอิสระและสารประกอบเชิงซ้อนได้ ดังนั้น จึงทำให้ค่า K_m ไม่เปลี่ยนแปลง แต่มีผลทำให้โครงสร้างของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป สารตั้งต้นหรือสับสเตรตที่จะเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์จึงน้อยลง ส่งผลทำให้ค่า V_{max} ลดลง เมื่อมีความเข้มข้นของสับสเตรตเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งเมื่อนำมาคำนวณหาค่า K_i กับ K_i' พบว่ามีค่าเท่ากัน แสดงให้เห็นชัดเจนว่า การยับยั้งชนิดนี้เป็นแบบ Full non-competitive inhibitor ตัวยับยั้งชนิดนี้สามารถเข้าจับกับเอนไซม์อิสระ (K_i) ได้เท่ากับค่าความสามารถในการเข้าจับกับกับสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต (K_i') (ภาพที่ 4.8) (มนตรี จุฬาวัดมนทล, 2543) ในทางตรงกันข้ามการยับยั้งชนิดแข่งขัน (competitive inhibitor) ตัวยับยั้งชนิดนี้จะแข่งขันกันกับสับสเตรตในการเข้าจับกับเอนไซม์ที่บริเวณเร่งของเอนไซม์ และหากความเข้มข้นของสารตัวหนึ่งตัวใดระหว่างสับสเตรตหรือตัวยับยั้งสูงกว่า จะสามารถเข้าจับกับเอนไซม์ได้ดีกว่า แต่สำหรับการยับยั้งชนิดไม่แข่งขัน (non-competitive inhibitor) ค่าความเข้มข้นของสับสเตรตหรือตัวยับยั้งล้วนแล้วแต่ไม่มีผลต่อค่าความสามารถในการจับกันระหว่างเอนไซม์กับตัวยับยั้ง ดังนั้นปริมาณอาหารประเภทแป้งที่ผู้ป่วยรับประทานจึงไม่มีผลรบกวนการทำงานของไซยานิดิน-3-รูตินอไซด์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (มนตรี จุฬาวัดมนทล, 2543)



ภาพที่ 4.8 ภาพแสดงสมการการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบไม่แข่งขัน

(Lineweaver and Burk, 1934)

3. ผลการทดสอบฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมา และการเสริมฤทธิ์ของ acarbose ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูแรทปกติของไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์

ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีอยู่ในธรรมชาติเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ แอลฟา- อะไมเลส โดยหวังผลว่า การยับยั้งการทำงานของแอลฟา-อะไมเลสจะช่วยชะลอการดูดซึมกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือดที่บริเวณลำไส้เล็กและส่งผลให้ระดับ Postprandial hyperglycemia ลดลงได้ เนื่องจากเอนไซม์ดังกล่าวถูกยับยั้งทำให้กระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่และโมเลกุลเดี่ยวช้าลง (Peng and Gang, 2007)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า พืช ผัก ผลไม้มีสีโดยเฉพาะสีแดง และสีม่วง ตัวอย่างเช่น องุ่นแดง ดอกกระเจี๊ยบแดง กะหล่ำปลีม่วง ผลสตอเบอรี่ มะเขือเทศ เป็นต้น มีสารที่จัดอยู่ในกลุ่มของสาร แอนโทไซยานินอยู่จำนวนมาก รวมทั้งไซยานิดินและอนุพันธ์ซึ่งเป็นสารที่เราสนใจศึกษาในครั้งนี้ พบได้ทั่วไปจากการนำมาใช้เป็นอาหารรับประทานในชีวิตประจำวัน (Wang et al. 1997) ดังนั้นหากรับประทานพืช ผัก ผลไม้ดังกล่าว อาจเป็นประโยชน์ในการช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสได้ (Adisakwattana et al. 2004) ฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินของเซลล์เบต้าจากตับอ่อน (Bolledula et al. 2006) เพิ่มการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ (Rie et al. 2007) นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ เช่น ด้านการเกิดมะเร็ง (Cooke et al. 2004) สารต้านอนุมูลอิสระ (Williams et al. 2004) เป็นต้น

ในการศึกษาในครั้งนี้พบว่า ไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์ ขนาด 100 และ 300 mg/kg สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาหลังป้อนแบ่งได้ ณ นาทีที่ 30, 60 และ 90 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อให้ ไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์ร่วมกับ acarbose ความเข้มข้น 0.5 และ 1 mg/kg พบว่าสามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูแรทปกติหลังป้อนแบ่งในนาทีที่ 30, 60 และ 90 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีกลไกยับยั้งเอนไซม์ แอลฟา-อะไมเลส แต่ในผลการทดลองที่ 3 กลับพบว่า ไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์เสริมฤทธิ์ของ acarbose ในขนาดความเข้มข้นต่ำที่สุดในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในห้องทดลอง จากข้อมูลดังกล่าวมีความขัดแย้งกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาของไซยานิดิน-3-รูตินไฮโดรคลอไรด์ร่วมกับ acarbose นั้นมีผลของกลไกยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสเข้ามาทำงานร่วมด้วย จึงทำให้เห็นผลในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาได้อย่างชัดเจน

สำหรับกลุ่มที่ได้รับไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ร่วมกับ acarbose ในขนาดความเข้มข้น 0.5 mg/kg ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดในการนำมาศึกษาครั้งนี้ สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูแรทปกติได้มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg เพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากข้อมูลดังกล่าวพบว่า ไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ช่วยเสริมฤทธิ์ของอะคาร์โบสในการลดระดับกลูโคสในพลาสมา อาจส่งผลให้สามารถลดขนาดของอะคาร์โบสที่จำเป็นต้องใช้ในทางคลินิกลงได้ และหวังผลว่าน่าจะช่วยลดอาการไม่พึงประสงค์จากยา เช่น ท้องอืด แน่นอึดอัดท้อง และผายลมบ่อย โดยเฉพาะการเกิดพิษต่อตับ (Andrade et al. 1996; Salmeron et al. 1997) ได้หรือไม่ สำหรับการศึกษานี้ครั้งนี้คงตอบไม่ได้ ควรต้องทำการศึกษาเกี่ยวกับพิษวิทยาเพิ่มเติม

นอกจากนี้พบว่า acarbose มีกลไกการออกฤทธิ์คือ ยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-กลูโคซิเดสและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (Hollande, 1992; Coniff et al. 1994) ส่งผลทำให้ระดับ Postprandial hyperglycemia ลดลงได้ไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับยาลดระดับน้ำตาลในเลือดกลุ่มอื่น เช่น glibenclamide และ metformin แต่พบว่าให้ผลในการลดระดับ HbA_{1c} ได้ใกล้เคียงกับยากกลุ่มอื่นคือ 0.5-1 % และจากการศึกษาที่ผ่านมา เมื่อระดับ Postprandial hyperglycemia ลดลง ส่งผลทำให้ระดับ HbA_{1c} ลดลงได้เช่นเดียวกัน ซึ่งไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ซึ่งเป็นสารที่เราศึกษาในครั้งนี้ อาจมีฤทธิ์ช่วยลดระดับ HbA_{1c} ได้เช่นเดียวกัน ทั้งนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยเหินยวนำให้สัตว์ทดลองเป็นโรคเบาหวานจากนั้นทำการศึกษาโดยวัดระดับ HbA_{1c} หลังจากให้สารทดสอบว่ามีผลเป็นอย่างไร และผลจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า ระดับ Postprandial hyperglycemia ลดลง จะช่วยส่งผลในการลดภาวะแทรกซ้อนต่างๆจากโรคเบาหวานได้ โดยเฉพาะโรคเกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือดที่เกิดจากโรคเบาหวาน (DECODE Study Group, 2001) ดังนั้น ไซยานิดิน-3-รูตินโนไซด์ น่าจะให้ผลในการช่วยลดหรือชะลอการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เกี่ยวกับระบบหัวใจและหลอดเลือดที่เกิดจากโรคเบาหวาน ได้เช่นเดียวกัน รวมทั้งช่วยชะลอหรือลดการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ในผู้มีภาวะ Impaired glucose tolerance (Salmeron et al. 1997) แต่ทั้งนี้ควรต้องทำการศึกษาในสวนทางคลินิกเพิ่มเติมว่าให้ผลการศึกษาไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาในสัตว์ทดลองหรือไม่ รวมทั้งการศึกษานี้เป็นการศึกษาในหนูแรทภาวะปกติที่ไม่ได้เหินยวนำให้เกิดโรคเบาหวานจึงควรที่จะต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในพลาสมาในหนูที่มีภาวะโรคเบาหวานร่วมด้วย ซึ่งเป็นการตอบคำถามได้ชัดเจนและครอบคลุมมากยิ่งขึ้นทั้งในกลุ่มหนูปกติและกลุ่มหนูที่เป็นโรคเบาหวาน ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในป้องกันและการรักษาโรคเบาหวานต่อไป

สรุปผลการวิจัย

1. ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสได้ดีที่สุด มีค่า IC_{50} เท่ากับ $21.28 \pm 0.03 \mu M$. เรียงลำดับความสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ได้ดังนี้ ไซยานิดิน-3- รุตินโนไซด์ > ไซยานิดิน-3- กลูโคไซด์ > ไซยานิดิน > ไซยานิดิน-3- กาแลคโตไซด์ \cong ไซยานิดิน-3,5-ไดกลูโคไซด์ ตามลำดับ

2. จาก ค่า V_{max} ลดลง K_m ไม่เปลี่ยนแปลง และค่า K_i กับ K_i' เท่ากัน จึงสรุปว่าการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสของไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์เป็นแบบ full non-competitive inhibitor

3. ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์เป็นอนุพันธ์ไซยานิดินที่สามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ที่ขนาดความเข้มข้นต่ำสุดคือ $3.1 \mu M$ ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสในห้องทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ acarbose เพียงอย่างเดียว

4. ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์ขนาด 100 และ 300 mg/dl สามารถลดระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูแรทปกติได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ภายหลังจากการป้อนแป้งและสารทดสอบ ณ นานาที 30, 60 และ 90

5. ไซยานิดิน-3-รุตินโนไซด์สามารถเสริมฤทธิ์ของ acarbose ได้ในการลดระดับกลูโคสในพลาสมาของหนูแรทปกติได้ใน acarbose ขนาดความเข้มข้นต่ำสุดคือ 0.5 mg/kg ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ acarbose ขนาด 0.5 mg/kg เพียงอย่างเดียว ภายหลังจากการป้อนแป้งและสารทดสอบ ณ นานาที 30, 60 และ 90

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

มนตรี จุฬาวัดมนทล และคณะ. 2543. ชีวเคมี. หน้า 125-129. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

อัญชลี ศิริพิทยาคุณกิจ. 2548. รายงานเฝ้าระวังทางระบาดวิทยาประจำสัปดาห์ 36: 40.

อรรถพรณ มาตั้งคสมบัติ. 2544. ยาที่ใช้รักษาโรคเบาหวาน. กรุงเทพมหานคร: แสงเทียนการพิมพ์.

Adisakwattana, S., Ngamrojjanvanich, N., Kalampakorn, K., et al. 2004. Inhibitory activity of cyanidin-3-rutinoside on alpha-glucosidase. J. Enzyme Inhib Med Chem 19 (4): 313-316

Alberti, K.G.M.M., and Zimmet, P.Z. 1998. Definition, diagnosis and diabetes mellitus and its complications. Part I : diagnosis and classification committee on the diagnosis of diabetes mellitus. Provision report of a WHO consultation. Diabetic Med 15: 539-553.

American College of Endocrinology/American Association of Clinical Endocrinologists Diabetes Road Map Task Force. 2007. Road Map to achieve glycemc control in type 2 diabetes mellitus. Endocr Pract 13: 261-268.

American Diabetes Association. 1997. Report of the expert committee on the diagnosis and classification committee on the diagnosis of diabetes mellitus . Provision report of a WHO consultation. Diabetic Med 24: 1187-1197.

American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. 2007. Diabetes Care 31(1): 55-60.

- American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. 2008. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Diabetes Care. 31: 55-60.
- Andrade, R.I., Lucena, M.I., and Rodriguez-Medizabal, M. 1996. Hepatic injury caused by acarbose. Ann Intern Med 124: 931.
- Apichati, V., Sirirat, P., Monchaya, T., et al. 2002. Efficacy and safety of voglibose in comparison with acarbose in type 2 diabetic patients. Diabetes Res Clin Pract 55: 99-103.
- Bertera, S., Alexander, A., Glannoukakis, N., et al. 1999. Immunology of type 1 diabetes. Intervention and prevention strategies. Endocrinol Metab Clin North Am 28: 841-864.
- Broillard, R. 1982. Chemical structure of anthocyanins. In P. Markakis (ed.), Anthocyanins as food colors, pp. 163-178, New York: Academic Press.
- Bolleddula, J., Karl, O., Robert, E., et al. 2006. Amelioration of obesity and glucose intolerance in high-fat-fed C57BL/6 mice by anthocyanins and ursolic acid in Cornelian Cherry (*Cornus mas*). J. Agric Food Chem 54: 243-248.
- Bolleddula, J., Shajuk, K., Karl, O., et al. 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanins and anthocyanidins present in fruits. J. Agric Food Chem 53: 28-31.
- Carver, C. 2006. Insulin treatment and the problem of weight gain in type 2 diabetes. Diabetes Educ 32: 910-917.

- Caro, J.F., and Stram, L.E. 2000. Biochemical defect of insulin action in human. In : L. Roith; S.I. Taylor; and J.M. Ulefsky (eds.), Diabetes mellitus. A Fundamental and Clinical text. 2nd ed. pp. 615-627. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Caterson, I., Hubbard, V., and Bray, G. 2004. Obesity, a worldwide epidemic related to heart disease and stroke: group III: worldwide comorbidities of obesity. Circulation 110: 476-483.
- Ceriello, A. 2005. Post-prandial hyperglycemic and diabetes complications : is it time to treat?. Diabetes 54: 1-7.
- Chaisson, J.L., Josse, R.G., Gomis, R., et al. 2002. Acarbose for prevention of type 2 diabetes mellitus : the STOP-NIDDM randomized trial. Lancet 359: 2072-2077.
- Chang, P., Yan, G., Jia-Wei, C., et al. 2003. Efficacy of acarbose in Chinese subjects with impaired glucose tolerance. Diabetes Res Clin Pract 61: 188-190.
- Chen, X., Zheng, Y., and Shen, Y. 2006. Voglibose (Basen, AO-128). One of the most important alpha-glucosidase inhibitors. Curr Med Chem 13: 109-116.
- Clinician's manual on insulin resistance. 2002. H.E. Lebovitz (ed.). pp. 35-54. London : Science Press
- Clissold, S.P. 1995. Edward of ifs pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. Drug 333: 550-554.
- Coniff, R.F., Shapiro, J.A., and Seaton, T.B. 1994. Long-term efficacy and safety of acarbose in the treatment of obese subjects with non-insulin dependent diabetes mellitus. Arch Intern Med 154: 2442-2448.

- DECODE Study Group, on behalf of the European Diabetes Epidemiology Group. 2001. Glucose tolerance and cardiovascular mortality : comparison of fasting and 2-hour diagnostic criteria. Arch Intern Med 161: 397-405.
- Decrecharawong, S., Serirat, S., and Kornthong, P. 1996. Efficacy of Acarbose as monotherapy in NIDDM. J. Med Assoc Thai 76: 69-75.
- De Fronzo, R.A. 1999. Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. Ann Intern Med 42: 903-919.
- De Fronzo, R.A., Barzilai, N., and Simonson, D.C. 1991. Mechanism of action in obese and lean non insulin-dependent diabetic subjects. J. Clin Endocrinol Metab 73: 1294-301
- De Fronzo, R.A., Ferrannini, E., and Koivisto, V. 1983. New concepts in the pathogenesis and treatment of non insulin-dependent diabetes mellitus. Am J. Med 74(1): 52-81.
- Dunaif, A., Segal, K.R., Sheiiey, D.R., Green, G., et al. 1992. Evidence for distinctive and intrinsic defects in insulin action in polycystic ovary syndrome. Diabetes 41: 730-739.
- Fujiwara, T., Yoshioka, T., Ushiyama, I., et al. 1988. Characterization of a new oral antidiabetic agent CS-045 : studies KK and ob/ob mice and Zucker fatty rats. Diabetes 37: 1549-1558.
- Fujimoto, W.Y., Leonetti, D.L., Kinyoun, J.L., et al. 1987. Prevalence of complications among second-generation Japanese-American men with diabetes, impaired glucose tolerance or normal glucose tolerance. Diabetes 36: 730-739.

- Fujimoto, Y., Ohhira, M., Miyokawa, N., et al. 1998. Acarbose-induce hepatic injury. Lancet 351: 340.
- Garber, A., Wahlen, J., Wha, T., et al. 2006. Attainment of glycemic goals in type 2 diabetes with one-, twice-, or thrice- daily dosing with biphasic insulin aspart 70/30 (the 1-2-3 study). Diabetes Obes Metab 8(1): 58-66.
- Harborne, J.B., and Grayer, R.J. 1988. The anthocyanins. In : Harborne J. B. (ed.), The Flavonoids. pp. 1-20, London: Chapman and Hall.
- Hasenah, A., Houghton, P.J., and Amala, S. 2006. α -Amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. J. Ethnopharmacolog 107: 448-455.
- Henefeld, M., Fischer, S., Schuizes, J., et al. 1991. Therapeutic potentials of acarbose as first-line drugs in NIDDM insufficiently treated with diet alone. Diabetes care 14: 732-739.
- Hermam, L.S. 1979. Metformin: A review of its pharmacological properties and therapeutic use. Diabetes Med 5: 233-245.
- Hoffmann, J., and Spengler, M. 1994. Efficacy of 24 week monotherapy with acarbose, glybenclamide, or placebo in NDDM patients. The Essen study. Diabetes Care 17: 561-566.
- Hoffmann, J., and Spengler, M. 1997. Efficacy of 24 week monotherapy with acarbose, metformin or placebo in dietary-treated NIDDM patients. The Essen-II study. AM J. Med 103; 483-490.
- Hollander, P. 1992. Safety profile of acarbose, an alpha-glucosidase inhibitor. Drugs 44(2): 47-53.

- Hundal, R.S., Krassak, M., Dufour, S., et al. 2000. Mechanism by which metformin reduce glucose production in type 2 diabetes. Diabetes 49: 2063-2069.
- Jame, R. 2001. Pathophysiologic Mechanisms of postprandial hyperglycemia. Am J. Cardiol 88: 4-8.
- Jenney, A., Proietto, J., O'Dea, K., et al. 1993. Low-dose acarbose improves glycemic control in NIDDM Changes in insulin sensitivity. Diabetes Care 16(2): 499-502.
- Jeyaprakasam, B., Strasburg, G.A., and Nair, M.G. 2004. Potent lipid peroxidation inhibitor from *Withania somnifera*. Tetrahedron 60: 3109-3121.
- Jeyaprakasam, B., Vareed, S.K., Oison, L.K., et al. 2005. Insulin secretion by bioactive anthocyanin and anthocyanidins present in fruits. J. Agric Food Chem 53: 28-31.
- Josse, R.G., and Cheng, A.Y.Y. 2004. Intestinal absorption inhibitor for type 2 diabetes mellitus : prevention and treatment. Drug discovery today : therapeutic strategies1: 201-206.
- Kahn, C.R., Filer, J.S., Bar, R.S., et al. 1976. The syndrome of insulin resistance and acanthosis nigricans . N Engl J. Med 294: 739-745.
- Kann, P., Wascher, T., Zackova, V., et al. 2006. Starting insulin therapy in type 2 diabetes twice-daily biphasic insulin aspart 30 plus metformin versus once insulin glargine plus glimepiride. Exp Clin Endocrinol Diabetes 114: 527-532.
- Keiln, D., and Hartree, E.F. 1952. Specificity of glucose oxidase (notain). J. Biochem 50: 331.

- Kellerer, M., Kroder, C., Tippmer, S., et al. 1994. Troglitazone prevents glucose-induced insulin receptor in rat-1 fibroblast. Diabetes 43: 1213.
- Kuhnau, J. 2006. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. World Res Nutr Act 24: 117-119.
- Kuzuya, T., Iwamoto, Y., and Kosak, K. 1991. A pilot clinical trial of a new oral hypoglycemic agent CS-045 in patients with NIDDM. Diabetic Res Clin Pract 11: 147-153
- Lebovitz, H.E. 1983. Clinical utility of oral hypoglycemic agent in management of patients in the non-insulin-dependent diabetes mellitus. Am J. Med 25 (5): 94-99.
- Lebovitz, H.E. 2001. Oral therapies for diabetic hyperglycemia. Endocrinol Metab Clin North Am 30; 909-933.
- Lineweaver, H., and Burk, D. 1934. The determination of enzyme constant inhibitor. J. Amer Chem Soc 56: 658.
- Malaisse, W.J., and Lebrun, P. 1990. Mechanism of Sulfonylurea-induced insulin release. Diabetes Care 13(3): 9-17.
- Markolf, H., Jean, L.C., Cawta, K., et al. 2004. Acarbose slow progression of intima-media thickness of the carotid arteries in subjects with impaired glucose tolerance. Strok 35: 1073-1078.
- Mazza, G., and Miniati, E. 1993. Anthocyanins in fruits, vegetables and grains Boca Raton : CRC Press.

- Megh-Raj, B., Nilubon, J.A., Gao, H., et al. 2008. α -Glucosidase and α -amylase inhibitory activities of Nepalese medicinal herb Phkhanbhed (*Bergenia ciliata*, How). Food Chem 106: 247-252.
- Mourad, E., Paulo, F., Andre, F., et al. 1995. A convenient method for conversion of flavonols in to anthocyanins. Tetrahedron Letters 36: 4611-4614.
- Mutsui, T., Ogunwande, I.A., Abesundara, K.J., et al. 2006. Anti-hyperglycemia potential of natural products Mini Rev. Med Chem 6(3): 349-356.
- Mutsui, T., Ueda, T., Oke, T., et al. 2001. Alpha-glucosidase inhibitory action of natural acylated anthocyanins. Surver of natural pigments with potent inhibitory activity. J. Agric Food Chem 49(4): 1948-1951.
- Owen, D.R., Lzio, S.D., Ismail, I., et al. 2000. Increased prandial insulin secretion after administration of a single pre-prandial oral dose of repaglinide in patients with type 2 diabetes. Diabetes Care 23: 518-523.
- Peng, G., and Gang, B. 2008. Two novel ainogligosaccharides isolate from aculture off *Streptomyces coelicoflavus* ZG0656 as potent inhibitors of alpha-amylase. Carbohydrate Res 343: 470-476.
- Pi-Sunyer, F.X. 1999. Acarbose. In : J.R. Turtle., T. Kaneko., and S. Osato (eds.), Diabetes in the new millennium. pp. 213-217, Sydney: The Plot Still Press.
- Produce by International Diabetes Federation. 2006. Diabetes Atlas. 3^{ed} ed.
- Purmell, J., Hokanson, J.E., Macrovinia, S.M., et al. 1998. Effect of excessive weight gain with intensive therapy of type 1 diabetes on lipid levels and blood pressure results from the DCCT, Diabetes Control and Complications Trial. JAMA 280(2): 140-146.

- Rabihovich, A. Role of cell-mediated immunity and cytokine in the pathogenesis of type 1 diabetes mellitus. In : D. LeRoith., S.I. Taylor., J.M. Oletaky (eds.), Diabetes mellitus. A Fundamental and Clinical text. 2nd ed, pp. 383-399, Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.
- Rhabasa-Lhoret, R., and Cllasson, J.L. 2004. α -Glucosidase inhibitors In : R.A. DeFronzo., E. Ferramnini., H. Keen., and Zimmet, P. (eds.), International Textbook of diabetes mellitus. 3nd ed, pp. 901-914: John Wiley & Sons Ltd.
- Ridderstrale, M., Gudbjornsdottir, S., Eliason, B., et al. 2006. Obesity and cardiovascular risk factor in type 2 diabetes: results from the Swedish National Diabetes Register. J. Intern Med 259: 314-322.
- Rie, S., Natsumi, N., and Hiromi, H. 2007. Cyanidin-3-glucoside ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity due to down regulation of retinol binding protein 4 express in diabetes mice. Biochem Pharmacol: 1-9.
- Robert, Y., Shinji, T., and Naofumi, M. 2007. Identification of phenolic compounds isolated from pigmented rices and their aldose reductase inhibitory activities. Food Chem 101: 1616-1625.
- Rohlfing, C.L., Wiedmeyer, H.M, Litte, R.R., et al. 2002. Defining the relationship between plasma glucose and HbA1c : analysis of glucose profiles and H in the Diabetes Control and Complications Trial. Diabetes 25: 275-278.
- Salmeron, J., Manson, J.E., Stampfer, M.J., et al. 1997. Dietary fiber, glycemic load and risk of non-insulin dependent diabetes mellitus in woman. JAM Assoc 227: 472-477.

- Seeram, N.P., Bourquin, L.D., and Nir, M.G. 2001. Degradation products of cyanidin in glycosides from tart cherries and their bioactivities. J. Agric Food Chem: 4924-4929.
- Shepherd, P.R., and Kahn, B.B. 1999. Glucose transporters and insulin action. Implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Eng J. Med 34: 248-257.
- Stratton, I.M., Adler, A.I., Neil, H.A.W., et al. 2000. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. BMJ 321; 405-412.
- Stefan, F., Laura, C., and Jochen, T., et al. 2005. Repetitive postprandial hyperglycemia increase cardiac ischemia/ reperfusion injury : prevention by the alpha-glucosidase inhibitor acarbose. FASEB 19: 591-593.
- Stryer, L. 1988. Biochemistry. 3rd ed. New York: WH Fremam and Company.
- Suter, S.L, Nolan, J.J., and Wallace, P., et al. 1995. Metabolic effect of a new oral hypoglycemic agent CS-045 in NIDD subject . Diabetes Care 15: 193-203.
- Tall, J.M., Seeram, N.P., Zhao, C.S., et al. 2004. Tart cherry anthocyanins suppress information-induce pain behavior in rat. Behav Brain Res 153: 181-192.
- Tandhanand, S., Nitiyanant, W., Chandraprasert, S., et al. 2001. Status of diabetes and complications in Thailand-Findings of a large observation study. J. Asean Fed Endocr Soc 19: 1-7.
- Thai Muticenter Research Group on Diabetes Mellitus. 1994. Vascular complications in non-insulin dependent diabetics in Thailand. Diabetes Res Clin Pract 25: 61-69.

- Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J.G., et al. 2001. Prevention of diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. N Engl J. Med 344: 1343-1350.
- Toshiro, M., Sumi, E., Mio, K., et al. 2002. Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin derived from *Ipomoea batatas* cultivar ayamurasaki can be achieved through the alpha-glucosidase inhibitory action. J. Agric Food Chem 50: 7244-7248.
- Vannasaeng S, Nitiyanant W, Vichayanrat A, et al. 1995. Effect of alpha-glucosidase inhibitor (acarbose) combined with sulfonylurea or sulphonylurea and metformin in treatment of non-insulin dependent diabetes mellitus. J. Med Assoc Thai 78: 578-585.
- Vannasaeng, S., Ploybutr, S., Nittiyant, W., et al. 2002. Effect of alpha-glycosidase inhibitor (Acarbose) combined with sulfonylurea on sulfonylurea and metformin in treatment of NIDDM patients. J. Med Assoc Thai 39: 701-709.
- Vichyanrat, A., Ploybutr, S., Tunlakit, M., et al. 2002. Efficacy and safty of voglibose in comparison with acarbose in type 2 diabetes patients. Diabetes Res Clin Pract 55; 99-103.
- Wang, H., Nair, M.G., lezzoni, A.F., et al. 1999. Quantification and characterization of anthocyanins in Balaton tart cherries. J. Agric Food Chem 45: 2556-2560.
- Wan Mohamad, W. 2005. Adding NovoLog Mix 70/30 Once or twice daily is more efficacious than optimizing oral treat in patients with type 2 diabetes mellitus. Diabetes 54(1): 510.
- Windish, W.W., and Mhatre, N.S. 1965. Microbial amylase. Adv Appl Microbiol 7: 273-304.

World Health Organization. 1999. Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Report of WHO consultation: 66.

World Health Organization. 2000. Country and regional [Online] Available From: <http://www.who.int/diabetes/facts/worldfigures/en/print/html>[2009, April 10].

World Health Organization[Online]. 2006. Available From: <http://www.who.org>[2009, April 10].

Yong-Mu, K., Youn-Kab, J., Myeong-Hyeon, W., et al. 2005. Inhibitory effect of pine extract on alpha-glucosidase activity and postprandial hyperglycemia. Nutri 21; 756-761.

Zimmet, P.Z., Tuomi, T., Mackay, R., Rowey, M.J., et al. 1994. Latent autoimmune diabetes in adults (LADA) : the role of autoantibodies to glutamic acid decarboxylase in diagnosis and prediction of insulin dependent. Diabetes Med 11: 299-303.



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

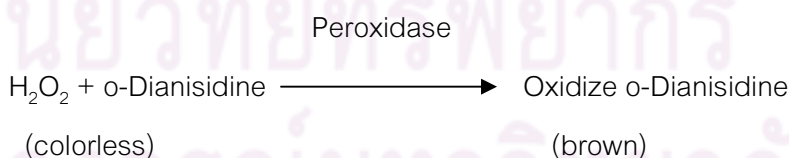
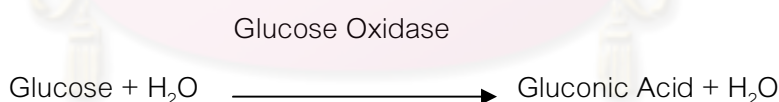


ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีการตรวจกลูโคสวัดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา (Glucose Oxidase Test)

1. เตรียม peroxidase-glucose oxidase enzyme (PGO enzyme) solution โดยนำ PGP enzyme 1 แคปซูล มาละลายในน้ำกลั่น 100 มล. ในขวดสีชา
2. เตรียม color reagent solution นำ o-dianisidine dihydrochloride 1 ขวด (50 มก.) ละลายในน้ำกลั่น 20 มล.
3. นำ color reagent solution จำนวน 1.6 มล. ผสมกับ PGP enzyme solution จำนวน 100 มล. เก็บในขวดสีชา และเรียกสารละลาย PGO reagent
4. เตรียม glucose standard ที่ 0, 50, 100, และ 200 มก./มล.
5. ใช้ไมโครปิเปตดูดพลาสมาหรือสารตัวอย่างที่จะทดสอบ 10 มคล. ใส่ในหลอดทดลองแก้ว แล้วเติม PGO reagent จำนวน 1 มล. และบ่มที่ water bath อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที
6. นำไมโครเพลทเปล่า มาวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร เพื่อเก็บเป็นข้อมูลพื้นฐาน
7. ใช้ไมโครปิเปต ดูดสารละลายในข้อที่ 4 และสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ทราบความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 200 มคล. ใส่ในไมโครเพลท หลุมละ 1 ความเข้มข้น จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องไมโครเพลท ลีดเดอร์ ที่ระดับความยาวคลื่นแสง 450 นาโนเมตร
8. สร้าง standard curve ของ glucose standard จากค่าดูดกลืนแสง
9. คำนวณหาค่าความเข้มข้นของกลูโคสจาก standard curve



ภาพแสดงขั้นตอนทำปฏิกิริยาของการตรวจ Glucose Oxidase Test

(Keiln D and Hartree EF, 1952)

การเตรียม ZnHg Amalgam เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สารไซยานิดิน-3-รูตินไฮไดรด์

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง ZnO_2 จำนวน 10.5 g ล้างใน HCl ความเข้มข้น 1 M ที่ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที
2. เทส่วนของสารละลายทิ้ง เหลือเพียงส่วนของแข็ง (Zn)
3. นำของแข็งจากข้อ 2 ไปล้างด้วย distilled water จำนวน 20 mL ประมาณ 2-3 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ใน distilled water
4. เตรียม mercuric oxide จำนวน 0.347 g ละลายใน HCl conc. จำนวน 1 mL จะได้สารละลายมีสีเหลืองจางๆ
5. นำสารละลายจากข้อ 4 ค่อยๆ เติมลงใน สารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3 คือ Zn ใน distilled water ขณะเดียวกันหมุนด้วยมือประมาณ 10 นาที
6. จากนั้นเทส่วนของสารละลายทิ้ง เหลือเพียงส่วนของแข็ง คือ ZnHg Amalgam ไปล้างด้วย distilled water จำนวน 50 mL ประมาณ 5 ครั้ง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง suction
7. เก็บไว้ในที่แห้งปราศจากความชื้น

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว ศิริญา อัครไชยสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 พฤศจิกายน 2524 จังหวัดนครราชสีมา สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาชั้นปีที่ 6 จากโรงเรียนบึงขังชัยประชานิรมิต อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ศึกษาในระดับอุดมศึกษาหลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต คณะพยาบาลศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ในปีการศึกษา 2543 สำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาตรีหลักสูตรพยาบาลศาสตรบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิตหลักสูตรสหสาขาเภสัชวิทยา คณะบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549-2551



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย