

รหัสโครงการ SUT1-104-58-24-12



รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ
(Study of Antidiabetic Activity of *Derris reticulata* Craib. Stem Extract)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ
(Study of Antidiabetic Activity of *Derris reticulata* Craib. Stem Extract)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ. ภาณุ. ดร. นवलน้อย จุฑะพงษ์

สาขาวิชาปรีคลินิก

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

พฤศจิกายน 2562

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวเปการัง คำไกร นักศึกษาปริญญาเอกในฐานะผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยทำให้ งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดีและราบรื่น และขอขอบคุณ ดร. พอล โกรติ อดีตอาจารย์ประจำ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้อง ในการระบุชนิดของพืช สุดท้ายผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารีสำหรับการให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้



บทคัดย่อภาษาไทย

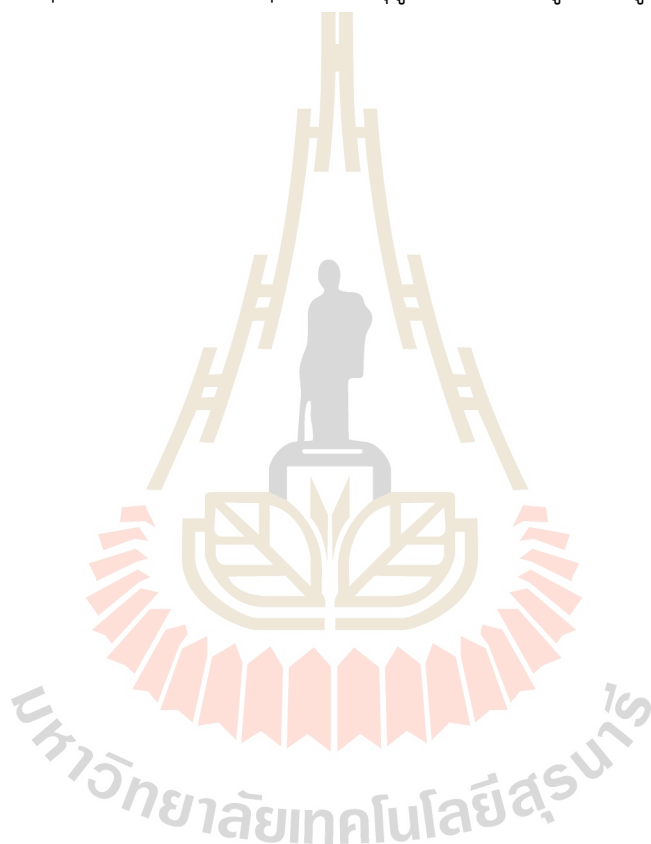
Derris reticulata Craib. (ชะเอมเหนือ) เป็นพืชสมุนไพรในวงศ์ Leguminosae ในประเทศไทยมีการใช้ชะเอมเหนือเพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคเบาหวาน หากแต่ยังไม่มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์รายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเบาหวานของชะเอมเหนือมาก่อน การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดน้ำจากลำต้นชะเอมเหนือ รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ของพืชนี้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้ทำการตรวจสอบพิษเฉียบเบื้องต้น ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ รวมทั้งศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดดังกล่าว

การตรวจสอบพิษเฉียบเบื้องต้นของสารสกัดน้ำจากต้นชะเอมเหนือ พบว่าประกอบด้วยสารเทอร์ปีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน และสารประกอบพวกฟีนอลิก สารสกัดชะเอมเหนือและสารมาตรฐาน butylated hydroxytoluene มีฤทธิ์กำจัดอนุมูลอิสระ ABTS โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ $515.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ และ $83.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ในการทดสอบโดยใช้วิธี DPPH พบว่าสารสกัดชะเอมเหนือมีค่า IC_{50} เท่ากับ $239.85 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ ในขณะที่ ascorbic acid ที่ใช้เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบมีค่า IC_{50} เท่ากับ $1.23 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$ ค่า FRAP ของสารสกัดชะเอมเหนือจากได้เท่ากับ $0.23 \pm 0.05 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg dried extract}$ สำหรับการศึกษาโดยใช้เซลล์ RINm5F (เซลล์ตับอ่อนหนูขาวที่สามารถหลั่งอินซูลินได้) เพื่อตรวจสอบฤทธิ์การปกป้องเซลล์ที่ถูกทำลายให้เสียหายด้วยสาร alloxan พบว่าก่อนและหลังการให้สารสกัดชะเอมเหนือขนาด 250 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดชะเอมเหนือในหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร alloxan พบว่า หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชะเอมเหนือ 250 mg/kg เป็นระยะเวลา 15 วัน มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงและน้ำหนักของหนูเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อีกทั้งค่า aspartate transaminase (AST) และ alanine transaminase (ALT) ก็มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาด้านจุลพยาธิวิทยาแสดงให้เห็นว่าตับอ่อนของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดชะเอมเหนือมีความเสียหายน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเหนือต่อการดูดซึมกลูโคสโดยใช้วิธีกลีบลำไส้ส่วนเจจุน้ำของหนู ทำให้ทราบว่าสารสกัดชะเอมเหนือสามารถยับยั้งการดูดซึมกลูโคสได้ กลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดชะเอมเหนือมีความแตกต่างจากยา glybenclamide ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน โดยสารสกัดชะเอมเหนือไม่ทำให้การหลั่งอินซูลินเพิ่มขึ้น และจากการทดสอบพิษเฉียบพลันโดยการป้อนสารสกัดเพียงครั้งเดียวให้กับหนูเพศผู้และเพศเมียไม่พบทั้งอาการพิษและการตายแม้ในขนาดสูง ค่า LD_{50} ของสารสกัดมีค่ามากกว่า 2000 mg/kg ส่วนการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังด้วยการป้อนสารในขนาด 2000 mg/kg เป็นระยะเวลา 42 วัน ผล

การศึกษาพบว่าไม่เกิดความเป็นพิษต่อการเจริญเติบโต พฤติกรรม ค่าทางโลหิตวิทยา ตับและไตของสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสารสกัดชะเอมเหนือมีฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดและค่อนข้างมีความปลอดภัยสูง ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์นั้นเป็นไปได้ว่าเกิดจากสารสกัดชะเอมเหนือมีฤทธิ์ปกป้องความเสียหายของเซลล์ตับอ่อนและมีฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดซึมกลูโคส สารสกัดไม่มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน สำหรับสารออกฤทธิ์นั้นมีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป

คำสำคัญ: ชะเอมเหนือ, ฤทธิ์ต้านเบาหวาน, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ, การดูดซึมกลูโคส, Alloxan, หนูขาว, เซลล์ RINm5F



Abstract

Derris reticulata Craib. (Cha-em-nuea) is a medicinal plant in the Leguminosae family. In Thailand, *D. reticulata* has been employed as alternative diabetes treatment. However, the scientific data for antidiabetic activity of *D. reticulata* have never been reported. The objectives of this study were to investigate an antihyperglycemic activity of the aqueous extract of *D. reticulata* stems and its mechanisms of action. Furthermore, phytochemical screening, antioxidant activity, acute and sub-chronic toxicities were examined as well.

The phytochemical screening of *D. reticulata* extract showed the presence of terpenoids, flavonoids, saponins, tannins, and phenolic compounds. *D. reticulata* extract and the standard butylated hydroxytoluene exhibited ABTS radical scavenging activity with IC_{50} values $515.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ and $83.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$, respectively. In DPPH assay, the IC_{50} values of *D. reticulata* extract was $239.85 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$, whereas the IC_{50} values of ascorbic acid was $1.23 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$. The FRAP value of *D. reticulata* extract was $0.23 \pm 0.05 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ dried extract. The insulin-secreting cell lines RINm5F was used to examine cytoprotective effect on alloxan-induced cell damage. Both pre- and post-treatments with *D. reticulata* extract at the doses of 250 and 500 $\mu\text{g/ml}$ were found to have significant protective actions *in vitro*. The antihyperglycemic activity of *D. reticulata* extract was further studied in alloxan-induced diabetic rats. A significant reduction in blood glucose level and an increase in body weight were observed in diabetic rats treated with *D. reticulata* extract at daily dose of 250 mg/kg during 15 days. Aspartate transaminase (AST) and alanine transaminase (ALT) levels were also significantly decreased compared to diabetic control group. Histopathological examination revealed that pancreatic cells of the extract-treated diabetic rat were less damage than those of diabetic control group. The effect of the *D. reticulata* extract on glucose absorption was studied using everted sac of rat jejunum. The result showed that *D. reticulata* extract suppressed glucose absorption. The result showed that unlike the insulin secretagogue glibenclamide, *D. reticulata* extract did not stimulate insulin secretion. In the acute toxicity, single dose oral administration of *D. reticulata* extract to male and female rats

did not induce signs of toxicity or mortality with LD₅₀ greater than 2000 mg/kg. Sub-chronic toxicity at the doses up to 2000 mg/kg were examined for 42 days. The result showed that the repeated oral administration of *D. reticulata* extract did not produce any toxicities on animal growth, behavior, hematology, liver and kidney.

In conclusion, the present study demonstrated that *D. reticulata* extract possessed antihyperglycemic activity with relatively wide margin of safety. The possible underlying mechanisms were cytoprotective effect on pancreatic cells and inhibition of intestinal glucose absorption. The extract did not possess a stimulatory effect on insulin secretion. The active ingredients need further investigation.

Keywords: *Derris reticulata*, Antidiabetes, Antioxidant, Glucose absorption, Alloxan, Rat, RINm5F cells



สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญรูป	ช
สารบัญตาราง	ซ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 วรรณกรรมทบทวน	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	18
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	49
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	64

งานวิจัยจากโครงการที่ได้รับการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติจำนวน 2 เรื่อง



สารบัญรูป

รูปที่ 2.1	ต้นชะเอมเหนือ (<i>Derris reticulata</i> Craib.).....	4
รูปที่ 2.2	ส่วนประกอบของต้นชะเอมเหนือ	5
รูปที่ 2.3	โครงสร้างของ pyranoflavanones 2 ชนิดที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือ	6
รูปที่ 2.4	โครงสร้างของสารประกอบที่ถูกรับในพืช <i>Derris indica</i> Lam.....	7
รูปที่ 2.5	การควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด	10
รูปที่ 2.6	กลไกการหลังอินซูลินจากเซลล์ของตับอ่อน.....	12
รูปที่ 2.7	กลไกการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ของตับอ่อนของ alloxan.....	17
รูปที่ 4.1	ความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือและ alloxan	28
รูปที่ 4.2	ฤทธิ์ปกป้องของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือก่อนการทำลายเซลล์ RINm5F ด้วยสาร alloxan	29
รูปที่ 4.3	ฤทธิ์ปกป้องของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือหลังการทำลายเซลล์ RINm5F ด้วยสาร alloxan.....	30
รูปที่ 4.4	รูปถ่ายตับของหนูเพศผู้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด.....	40
รูปที่ 4.5	รูปถ่ายตับของหนูเพศเมียจากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด	41
รูปที่ 4.6	รูปถ่ายไตของหนูเพศผู้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด.....	42
รูปที่ 4.7	รูปถ่ายไตของหนูเพศเมียจากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด	43
รูปที่ 4.8	รูปถ่ายตับอ่อนของหนูทดลอง	46
รูปที่ 4.9	ผลของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือต่อการหลังอินซูลินเซลล์ RINm5F.....	48

สารบัญตาราง

ตารางที่ 3.1	รายชื่อสารเคมี.....	6
ตารางที่ 3.2	เครื่องมือและอุปกรณ์.....	9
ตารางที่ 4.1	พิกษเคมีที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ.....	26
ตารางที่ 4.2	ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ.....	27
ตารางที่ 4.3	น้ำหนักหนูที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ ในการทดสอบพิษเฉียบพลัน.....	32
ตารางที่ 4.4	น้ำหนักหนูที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ ในการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง.....	33
ตารางที่ 4.5	ค่าเลือด (Haematological parameter) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาด ต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน.....	34
ตารางที่ 4.6	ค่าเลือด (Haematological parameter) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดที่ขนาด ต่างๆเป็นเวลา 42 วัน.....	35
ตารางที่ 4.7	ค่าทางชีวเคมี (Biochemical parameter) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาด ต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน.....	36
ตารางที่ 4.8	ค่าทางชีวเคมี (Biochemical parameter) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดที่ขนาด ต่างๆเป็นเวลา 42 วัน.....	37
ตารางที่ 4.9	น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน (Relative organ weight) ของหนูเพศผู้ ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน.....	38
ตารางที่ 4.10	น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน (Relative organ weight) ของหนูเพศเมีย ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน.....	39
ตารางที่ 4.11	ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักหนูและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร.....	44
ตารางที่ 4.12	ผลของสารสกัดต่อค่าทางชีวเคมี.....	45
ตารางที่ 4.13	ฤทธิ์ต้านการดูดซึมกลูโคสของสารสกัด.....	47

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

โรคเบาหวานจัดเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางเมตาโบลิซึมทำให้ผู้ป่วยมีภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ซึ่งเป็นผลมาจากการหลั่งอินซูลินลดลง และ/หรือการดื้อต่ออินซูลิน (American Diabetes Association, 2010) มีการประมาณการไว้ว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานจำนวน 285 ล้านคนในปี พ.ศ. 2553 จะเพิ่มจำนวนเป็น 439 ล้านคนในปี พ.ศ. 2573 โดยจะพบมากในผู้ป่วยอายุมากกว่า 60 ปีในประเทศที่พัฒนาแล้ว ขณะที่ในประเทศกำลังพัฒนาจะพบผู้ป่วยเบาหวานในช่วงอายุที่ต่ำกว่าคือ 40-60 ปี (Shaw et al., 2010) นอกจากนี้ยังพบว่าความชุกของผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มขึ้น 2-3 เท่าในประชากรที่อาศัยอยู่ในทวีปเอเชียและแอฟริกา (Shabeer et al., 2009) ปัญหาที่กล่าวมานี้เกิดขึ้นมากกว่าในประชากรที่อาศัยอยู่ในเขตชนบทที่มีการเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจแบบก้าวกระโดด เช่นประเทศไทย ประชากรกลุ่มดังกล่าวนี้มักมีปัญหาในด้านการเงินและความสะดวกในการเข้าถึงสถานพยาบาล (Aekplakorn et al., 2007; Wild et al., 2004) มีผู้ประมาณค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคเบาหวานของผู้ป่วยทั่วโลกว่าเป็นจำนวนเงินถึง 376 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี พ.ศ. 2553 และจะเพิ่มขึ้นเป็น 490 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี พ.ศ. 2573 (Zhang et al., 2010)

ในภาวะที่ระดับน้ำตาลในเลือดสูงเกินปกติของผู้ป่วยเบาหวานจะก่อให้เกิดอาการแทรกซ้อนต่อเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย ได้แก่ ตา ไต เส้นประสาท และหลอดเลือด เป็นต้น (Pandikumar et al., 2009) เห็นได้จากการที่มีรายงานว่า 50% ของผู้ป่วยโรคเบาหวานเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดและหัวใจ นอกจากนี้ยังพบว่า 50% ของผู้ป่วยเบาหวานจะป่วยเป็นโรคไตร่วมด้วย พบว่า 20% ของผู้ป่วยเบาหวานเสียชีวิตด้วยโรคไต (WHO, 2010) ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับกันทั่วไปว่าการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดให้อยู่ในระดับปกติจะสามารถลดได้ทั้งอัตราการตายและอัตราการเกิดโรคแทรกซ้อนให้กับผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ (Stratton et al., 2000)

ในปัจจุบันมียารักษาโรคเบาหวานหลายกลุ่มที่ออกฤทธิ์ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยลดลงที่นิยมใช้กันมาก ได้แก่ ยากลุ่ม sulfonylureas, biguanides, ยายับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase และยากลุ่ม thiazolidinediones อย่างไรก็ตามพบว่า ยาดังกล่าวสามารถทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ เช่นระดับน้ำตาลในเลือดต่ำเกินไป รบกวนระบบทางเดินอาหาร หรือทำให้เกิดตับอักเสบ เป็นต้น (Patil et al., 2011) ดังนั้นการค้นหายาที่มีความปลอดภัยและไม่ทำให้เกิดระดับน้ำตาลในเลือดต่ำยังคงเป็นหัวข้อ

วิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยในสาขาที่เกี่ยวข้องอยู่ องค์การอนามัยโลกได้แนะนำให้ทำมีการสืบค้นเพื่อหายาใหม่ๆ จากพืชสมุนไพร (WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus, 1980) เนื่องจากพืชหลายชนิดมีการรายงานให้เห็นว่าสามารถนำมาใช้ลดน้ำตาลในเลือดได้ อันได้แก่ พืชในวงศ์ Leguminosae, Lamiaceae, Liliaceae, Cucurbitaceae, Asteraceae, Moraceae, Rosaceae, Euphorbiaceae และ Araliaceae (Patel et al., 2012; Fatima et al., 2010) นักวิจัยหลายคนได้ทำการค้นคว้าและรายงานกลไกการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรต่างๆ เช่น การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน การยับยั้งการดูดซึมกลูโคสจากลำไส้ กลไกเพิ่มการนำน้ำตาลไปใช้ของอวัยวะส่วนปลาย การเพิ่มการสังเคราะห์ไกลโคเจนในตับ หรือการลดกระบวนการ glycolysis (Patel et al., 2012) เป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่าสมุนไพรเข้ามามีบทบาทในการดูแลสุขภาพและรักษาโรคของประชากรในประเทศไทยมาช้านาน และการนำสมุนไพรไปใช้ควบคู่กับยาแผนปัจจุบันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดของประชากร (Wiwanitkit, 2011) เป็นที่ทราบกันดีว่าองค์ความรู้ในการใช้สมุนไพรรักษาโรคมกมายหลายชนิดนั้นได้รับการสืบทอดมาจากบรรพบุรุษผ่านการแพทย์แผนโบราณ (Smirin et al., 2010)

ต้นชะเอมเหนือซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris reticulata* Craib. อยู่ในสกุล Leguminosae เป็นหนึ่งในสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้รักษาโรคเบาหวานในชนบทแถบจังหวัดปราจีนบุรี มีรายงานการศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของพืชในวงศ์ *Derris* อื่นๆ เช่น *D. indica* Lam. และ *D. scandens* Benth. โดยพบว่าพืชทั้งสองชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase ของทางเดินอาหาร (Rao et al., 2009; Rao et al., 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าพืชในวงศ์ *Derris* มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น *D. trifoliata* มีฤทธิ์ต้านการอักเสบรูมาตัสซึม แก้ปวดประจำเดือนและช่วยบรรเทาอาการหอบหืด (Jiang et al., 2012) *D. scandens* ถูกนำมาใช้รักษาผู้ป่วยข้ออักเสบ (Laupattarakasem et al., 2003) ในกรณีของชะเอมเหนือถูกนำมาใช้ระงับอาการไอ (Vongnam et al., 2013) มีนักวิจัยได้ทำการศึกษาเพื่อจะอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ต้านอักเสบโดยพบว่าสารสกัดจากต้น *D. scandens* ยับยั้งการสร้างสารสื่อกลางของกระบวนการอักเสบ leukotriene B₄ (Laupattarakasem et al., 2003) นอกจากนี้นักวิจัยไทยยังพบว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ *D. reticulata* สามารถลดการสร้างสาร nitric oxide จาก macrophage ผลการทดลองนี้สนับสนุนฤทธิ์ต้านอักเสบของพืชชะเอมเหนือ (Vongnam et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ต้านจุลชีพของพืชในวงศ์ *Derris* ทุกชนิดที่กล่าวมาข้างต้น (Chivapat et al., 2009; Khan et al., 2006; Sittiwet and Puangpronpitag, 2009) แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีเคยมีรายงานถึงหลักฐานเชิงวิทยาศาสตร์ต่อฤทธิ์ต้านเบาหวานของต้นชะเอมเหนือมาก่อน ดังนั้นการหาหลักฐานทางวิทยาศาสตร์เพื่อสนับสนุนการใช้สมุนไพรชนิดนี้จึงมีความสำคัญ เป็นการเพิ่มโอกาสในการค้นพบยารักษาเบาหวานชนิดใหม่ๆ ในอนาคตได้อีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อหาฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดน้ำจากต้นชะเอมเหนือ โดยทำการทดสอบในหนูขาว จากนั้นจึงทำการทดสอบเพื่ออธิบายกลไกการออกฤทธิ์ด้านเบาหวาน 3 ประการ คือ 1) ความสามารถในการกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน 2) ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและปกป้องการทำลายเซลล์ และ 3) ฤทธิ์ต้านการดูดซึมกลูโคสที่ลำไส้ นอกจากนี้ในการศึกษานี้ได้ทำการทดสอบพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดในหนูทดลองด้วย

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาในสัตว์หลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง สามารถนำไปอธิบายผลที่จะเกิดในมนุษย์ได้ระดับหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามหากต้องการยืนยันผลที่แน่ชัดจะต้องทำการทดสอบในระดับคลินิกต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะช่วยสนับสนุนให้การใช้พืชชะเอมเหนือเป็นการรักษาทางเลือกเพื่อรักษาโรคเบาหวาน การอธิบายกลไกการออกฤทธิ์จากงานวิจัยนี้ก่อให้เกิดการใช้พืชสมุนไพรอย่างมีเหตุผล

บทที่ 2

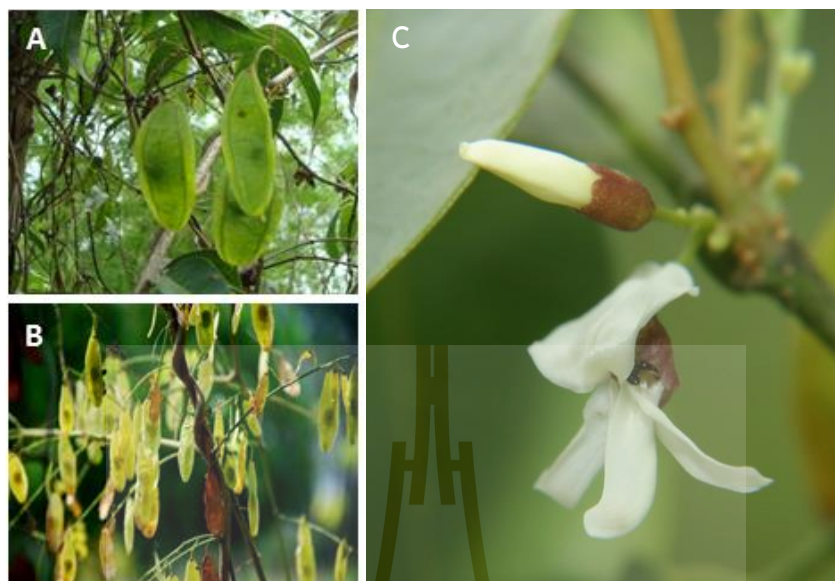
วรรณกรรมทบทวน

2.1 *Derris reticulata* Craib.

ต้นชะเอมเหนือซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Derris reticulata* Craib. จัดอยู่ในสกุล Leguminosae ที่ถิ่นกำเนิดอยู่ในทวีปเอเชียและแอฟริกาตะวันออก (Tewtrakul et. al, 2009) รูปที่ 2.1 เป็นภาพถ่าย ต้นชะเอมเหนือซึ่งขึ้นอยู่ตามธรรมชาติในจังหวัดปราจีนบุรี ชะเอมเหนือเป็นไม้เถาขนาดใหญ่ เปลือกเถาหนา สีน้ำตาลอ่อน เนื้อสีนวลขาว ใบประกอบแบบขนนก รูปใบหอก 3-5 คู่ ปลายแหลม เรียงสลับกัน ดอกช่อ แบบช่อแยกแขนงกลีบดอกรูปดอกถั่วมีสีขาวยิ่งขาวแกมม่วงอ่อน ฝักแบนรูปใบหอกกลับ (Songsak, 1995; Bangkok Herbarium, 2009; Siri Ruckhachati Nature Park, 2010) ฝักอ่อนและแก่มีลักษณะดังรูปที่ 2.2 (A) และ 2.2 (B) ดอกออกเป็นช่อ กลีบดอกแต่ละกลีบมีลักษณะคล้ายผีเสื้อ (papilionaceous corolla) ดังรูป 2.2 (C)



รูปที่ 2.1 ต้นชะเอมเหนือ (*Derris reticulata* Craib.) ลูกศรชี้คือลำต้นที่เลื้อยพันอยู่กับต้นไม้ใหญ่



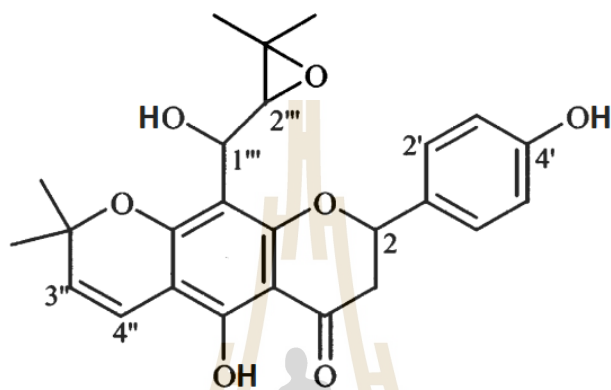
รูปที่ 2.2 ส่วนประกอบของต้นชะเอมเหนือ (A) ฝักอ่อน (B) ฝักแก่ และ (C) ช่อดอก (ที่มา: Siri Ruckhachati Nature Park, 2010)

2.2 พฤกษเคมีของพืชวงศ์ *Derris*

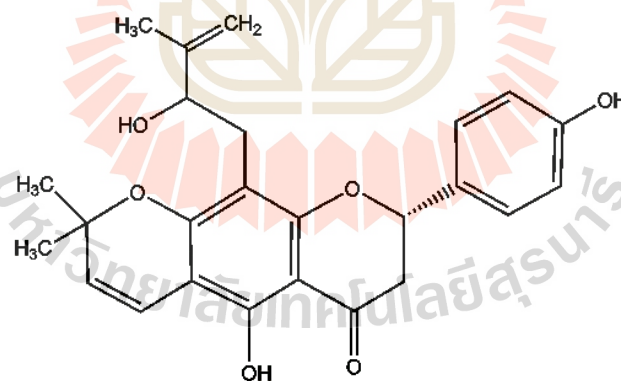
มีการศึกษาสารประกอบของพืชสกุล *Derris* หลายชนิด สำหรับชะเอมเหนือพบสารประกอบกลุ่ม pyranoflavanones 2 ชนิด (รูป 2.3) คือ 2''', 3''' - epoxy lupinifolin และ dereticulatin อยู่ในส่วนที่เป็นลำต้น (Mahidol et al., 1997) และมีการค้นพบสารประกอบใหม่ในกลุ่ม furanoflavanoids จำนวน 2 ชนิดในพืช *D. indica* Lam. (ชื่อไทย: หยัทะเล) และสารอื่นอีก 13 ชนิด ดังรูปที่ 4 (Rao et al., 2009) มีรายงานการพบสาร Scandenin A, scandenin B และ 4',5',7'-trihydroxybiprenylisoflavone ในต้นเถาวัลย์เปรียงซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *D. scandens* Benth. อีกด้วย (Rao et al., 2007) นอกจากนั้นนักวิจัยชาวไทย (Mahabusarakam, et al., 2004) ยังพบสารที่เป็นอนุพันธ์ใหม่ 3 ชนิดจากต้นเถาวัลย์เปรียง ได้แก่ scandione (2',2"-dihydroxy-4'-methoxy-4",5"-methylenedioxybenzil), scandenal, (3'-formyl-4',5-dihydroxy-2",2"-dimethylchromeno-[6,7:5",6"]isoflavone) และ scanderone (4',5-dihydroxy-3'-prenyl-2",2"-dimethylchromeno-[7,8:6",5"]isoflavone) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาพืชอื่นๆ ในสกุลนี้ เช่น *D. laxiflora* พบสารประกอบ triterpenoids และ aromatics จำนวน 7 ชนิดโดยนักวิจัยชาวจีน ได้แก่ *O*-trans-cinnamoylglutanol, 22 β -hydroxy-12-oleanen-3-one, 15 α ,16 α -epoxy-12-oleanen-3-one, 29-hydroxy-12-oleanene-3,22-dione,

22 β ,29-dihydroxy-12-oleanen-3-one, 2,3-(methylenedioxy)-4-methoxy-5-methylphenol, and 2,3,6-trimethoxy-5-methylphenol และสารประกอบชนิดใหม่อีก 2 ชนิดคือ 25-cycloartene-3,24-dione และ 24 ξ -hydroxy-25-cycloarten-3-one (Chiu et al., 2008)

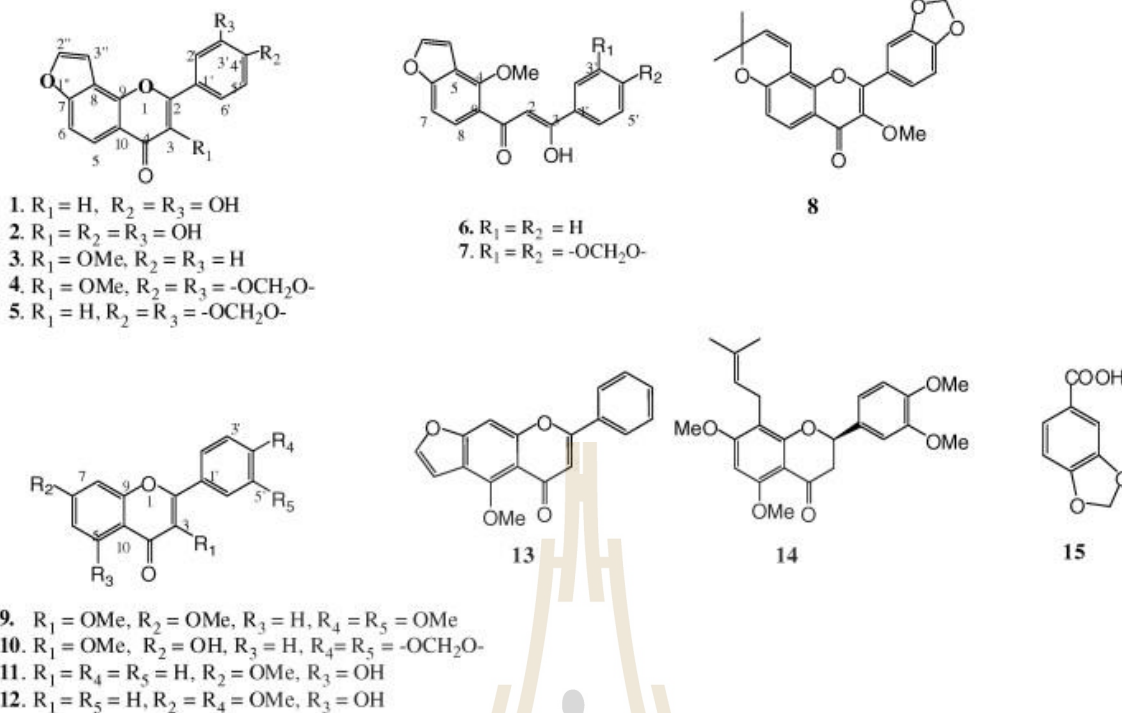
(A)



(B)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของ pyranoflavanones 2 ชนิดที่สกัดได้จากลำต้นชะเอมเหนือที่ (A) 2''', 3'''-epoxylupinifolin และ (B) dereticulatin (Mahidol et al.,1997)



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของสารประกอบที่ถูกรับในพืช *Derris indica* Lam. (Rao et al., 2009)

2.3 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพืชวงศ์ *Derris*

มีการงานวิจัยที่ทำการศึกษากฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากพืชในจีนัส *Derris* อยู่หลายการศึกษา ตัวอย่างเช่น สารประกอบ derrisisoflavone จากต้น *D. ferruginea* มีฤทธิ์ยับยั้ง glycation ในกระบวนการการสร้างโปรตีนขั้นตอนสุดท้าย ขณะที่ prenylated flavanone ที่สกัดได้จากพืชนี้ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* และเชื้อปรสิต *Leishmania major* ในหลอดทดลอง (Morel et al., 2013) ได้มีนักวิจัยทำการศึกษาสารประกอบ Lupinifolin ซึ่งสกัดได้จากฝักของ *D. trifoliata* แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อกลุ่ม plasmodium พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อมาลาเรีย *Plasmodium falciparum* ทั้งสายพันธุ์ที่ไวและดื้อต่อยา chloroquine ในหลอดทดลอง (Yenesew et al., 2009)

ในกรณีของชะเอมเหนือ ก็พบว่า lupinifolin เป็นสารประกอบในลำต้นเช่นกัน กลุ่มนักวิทยาศาสตร์ชาวไทย (Wisetsutthichai et al., 2005) ได้ทำการสกัด lupinifolin และนำไปทดสอบพบว่ามฤทธิ์ต้านไวรัสเริม (herpes simplex virus type 1) มีการจดบันทึกว่าชะเอมเหนือถูกใช้เป็นยาสมุนไพรรักษาอาการไอ ขับเสมหะ (Siri Ruckhachati Nature Park, 2010) และมีแพทย์แผนโบราณใน

จังหวัดปราจีนบุรีนำลำต้นของชะเอมเหนือมาใช้เป็นยารักษาเบาหวาน อย่างไรก็ตามยังไม่เคยมีการศึกษาฤทธิ์ดังกล่าวนี้เพื่อนำข้อมูลเชิงวิทยาศาสตร์มาสนับสนุนฤทธิ์ด้านเบาหวานของพืชชนิดนี้มาก่อน

2.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในพืชสมุนไพร

ภาวะ oxidative stress มีสาเหตุจากการเกิดอนุมูลอิสระ อนุมูลอิสระหมายถึงโมเลกุลที่บางอะตอมที่อิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่เป็นส่วนประกอบ จึงไม่มีความเสถียรและสามารถไปทำอันตรายต่อโมเลกุลอื่น เช่น ดีเอ็นเอ ไขมัน และโปรตีน (Ali et al., 2008) อนุมูลอิสระมักจะประกอบด้วยอนุมูลอิสระของออกซิเจนหรืออนุมูลอิสระของไนโตรเจนก็ได้ อนุมูลอิสระของออกซิเจนได้แก่ ($O_2^{\cdot-}$), hydroxyl radical (OH^{\cdot}), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydrochlorous acid ($HOCl$) peroxy radical (ROO^{\cdot}) hydroperoxy radical (HOO^{\cdot})

เป็นที่ทราบกันดีว่าโมเลกุลของออกซิเจนใช้ในการสร้างพลังงานในระบบหายใจแบบใช้ออกซิเจน ในระหว่างกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน อิเล็กตรอนสามารถรั่วไหลออกจากไมโทคอนเดรียและเกิดเป็น superoxide (Ohnishi et al., 2005) Hydrogen peroxide สามารถข้ามผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อทำปฏิกิริยากับเหล็กและทองแดงเพื่อสร้าง hydroxyl radical (Hazra et al., 2008) จากนั้นจะสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นได้และทำลายชีวโมเลกุลในสิ่งมีชีวิต อนุมูลอิสระของไนโตรเจน ได้แก่ nitric oxide (NO^{\cdot}), nitrogen dioxide (NO_2) and peroxy nitrite ($ONOO^{\cdot}$) (Wang et al., 2011) Nitric oxide มีความเกี่ยวข้องภาวะการอักเสบของผู้ป่วยเบาหวานประเภทที่หนึ่ง พืชของ nitric oxide จะมีความรุนแรงมากขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับ superoxide radical เพื่อสร้างเป็น peroxy nitrite anion (Hazra et al., 2008) ปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมเช่น รังสี คิวบุนุหรี สารเคมี มลภาวะ เป็นแหล่งที่ก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้ (Wang et al., 2011)

ความหมายของภาวะ oxidative stress คือ ภาวะที่ไม่สมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและการต้านอนุมูลอิสระ ภาวะความไม่สมดุลนี้ก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดอุดตัน เส้นเลือดในสมองแตก เบาหวาน และโรคมะเร็ง (Valko et al., 2007) ระบบต้านอนุมูลอิสระจากโมเลกุลออกซิเจนและไนโตรเจนประกอบด้วยระบบต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ในร่างกาย เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione reductase ระบบต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ประกอบด้วย วิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ และสารประกอบโพลีฟีนอล (Young and Woodside, 2001) องค์การอนามัยโลกคาดการณ์ว่าประชากร 80% ทั่วโลกมีการใช้พืชเพื่อรักษาภาวะ oxidative stress (Craig, 1999)

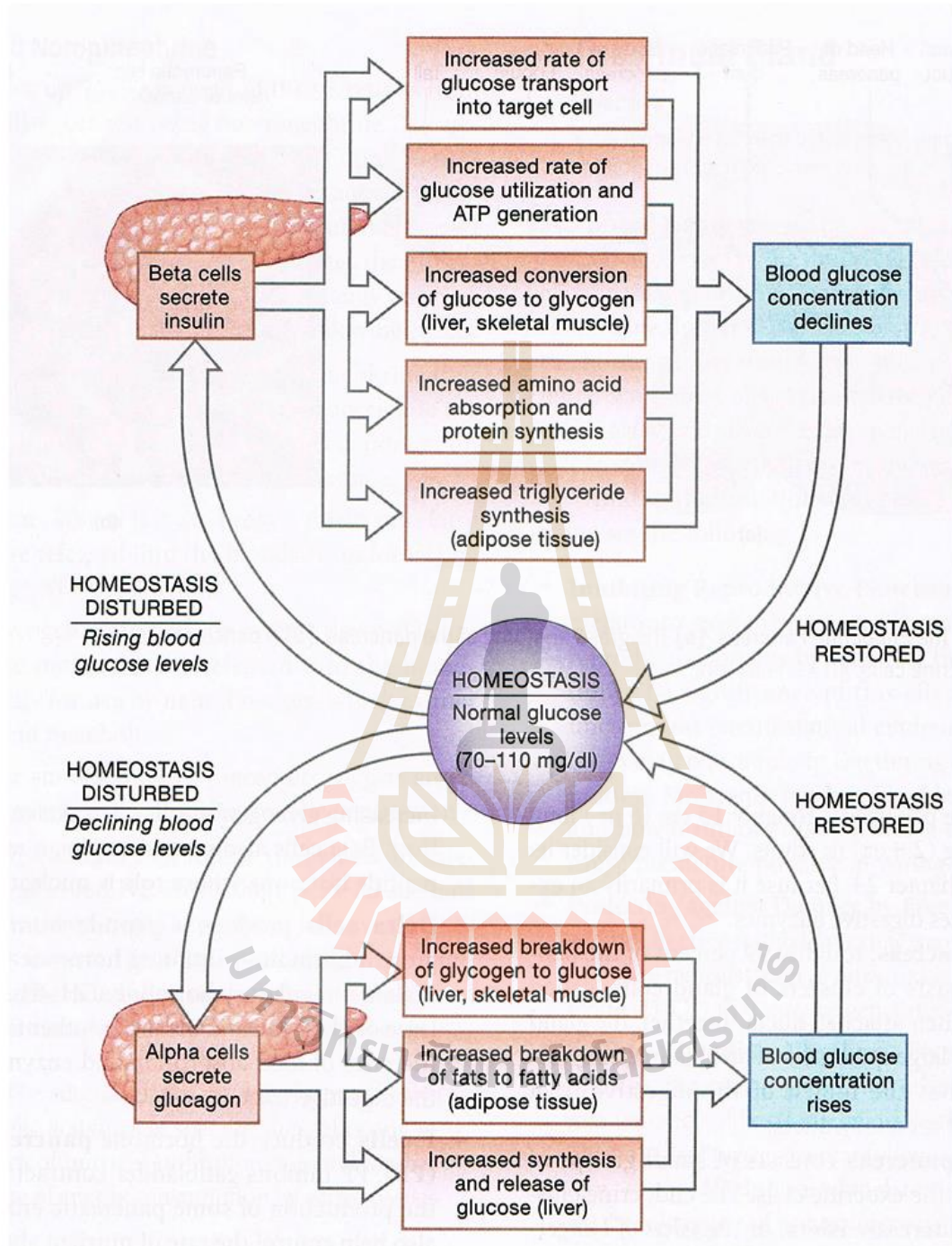
สารประกอบฟีนอลิกประกอบด้วยวงแหวนที่มีหมู่ของไฮดรอกซิลอย่างน้อย 1 หมู่ โครงสร้างของสารประกอบฟีนอลิกมีทั้งโครงสร้างแบบง่ายและโครงสร้างแบบพอลิเมอร์ซึ่งเรียกว่า polyphenol (Balasundram et al., 2006) Polyphenol มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ (Patel et al., 2011) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถรบกวนปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระโดยไป

กำจัดอนุมูลอิสระและป้องกันการแย่งไฮโดรเจนอะตอมจากสารอื่น สารต้านอนุมูลอิสระยังสามารถไปจับกับเหล็กซึ่งทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาให้เกิดอนุมูลอิสระ และช่วยสลายผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาให้ไม่มีฤทธิ์เป็นอนุมูลอิสระ (Tepe et al., 2011) พืชจากตระกูล Leguminosae มีสารประกอบฟีนอลิก, ฟลาโวนอยด์ และแอนโทไซยานิน ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระอยู่เป็นจำนวนมาก (Chew et al., 2009)

2.5 การควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด

กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของร่างกาย โดยในเด็กแรกเกิดและเด็กเล็กจะต้องการพลังงานจากน้ำตาลกลูโคสมากกว่าผู้ใหญ่ สมอ, กระจงตา, เยื่อหุ้มอวัยวะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น รังไข่ อัณฑะ เป็นอวัยวะใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงานเพียงอย่างเดียว ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดถึงมีความสำคัญต่ออวัยวะสำคัญเหล่านี้เป็นอย่างมาก (Beardsall et al., 2006) ความเข้มข้นของกลูโคสในเลือดนั้นขึ้นอยู่กับฮอร์โมนหลัก 2 ชนิดร่วมกัน คือ อินซูลินและกลูคากอน ตับอ่อนจึงเป็นอวัยวะหลักที่มีผลต่อการรักษาระดับกลูโคสในเลือด เนื่องจากตับอ่อนประกอบด้วย islets of Langerhans ที่มีบีตาเซลล์และแอลฟาเซลล์ซึ่งทำหน้าที่หลั่งอินซูลินและกลูคากอนตามลำดับ หลังจากรับประทานอาหารระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจะสูงขึ้น กลูโคสซึ่งถูกดูดซึมจากทางเดินอาหารส่งผลไปกระตุ้นให้บีตาเซลล์ของตับอ่อนหลั่งฮอร์โมนอินซูลิน (รูปที่ 2.5) อินซูลินทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลงโดยไปเพิ่มจำนวนของโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งกลูโคสที่เยื่อหุ้มเซลล์ กลไกนี้จะมีผลเร่งให้เซลล์นำกลูโคสไปใช้สร้างโมเลกุล ATP ได้นอกจากนั้นอินซูลินยังกระตุ้นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์ไกลโคเจนจากน้ำตาลกลูโคส นำไปเก็บไว้สะสมไว้ที่กล้ามเนื้อและตับ อินซูลินจะเพิ่มการแปลรหัส mRNA เพื่อสังเคราะห์โปรตีนและป้องกันการสลายโปรตีน และอินซูลินยังมีผลต่อการเมตาบอลิซึมของไขมันโดยช่วยนำกรดไขมันในเลือดไปเก็บสะสมไว้ในรูปไตรกลีเซอไรด์ในเนื้อเยื่อไขมัน ในทางตรงกันข้าม เมื่อระดับกลูโคสในเลือดลดลง แอลฟาเซลล์ของตับอ่อนจะหลั่งฮอร์โมนกลูคากอน ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการสลายไกลโคเจนไปเป็นน้ำตาลกลูโคส นอกจากนั้นกลูคากอนยังมีผลทำให้เกิดการสลายไขมันเป็นกรดไขมัน กลูคากอนมีผลกระตุ้นการสร้างกลูโคสในตับจากกรดอะมิโนอีกด้วย (Martini et al., 2006)

การรักษากระดับกลูโคสในเลือดให้สมดุลนั้นมีความเกี่ยวข้องกับทั้งฮอร์โมนอินซูลินและกลูคากอน โดยที่ฮอร์โมนอินซูลินจะกระตุ้นกำจัดกลูโคสออกจากเลือด และกลูคากอนกระตุ้นการหลั่งกลูโคสเข้าสู่กระแสเลือด ดังนั้นเมื่อการควบคุมระดับกลูโคสในเลือดเกิดความผิดปกติขึ้น ความผิดปกตินี้จะส่งผลต่อสุขภาพ หากรุนแรงอาจทำให้ผู้ป่วยเสียชีวิตได้ในที่สุด (Yeo and Sawdon, 2007)



รูปที่ 2.5 การควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Martini et al., 2006)

อินซูลินจะถูกสร้างออกมาในรูปของ preproinsulin ก่อนโดยมีเอ็นที่ควบคุมการสร้างที่ประกอบด้วย 4 exon และ 2 intron preproinsulin มีขนาดมวลโมเลกุล ประมาณ 11,500 โครสร้างของ preproinsulin ประกอบด้วย N-terminal signal peptides, B-chain of insulin, C-peptide, A chain of insulin ต่อมา N-terminal จะถูกตัดออกเปลี่ยนเป็น proinsulin โครสร้างของ proinsulin ประกอบด้วย A และ B chain และ C-peptide ต่อมา proinsulin จะถูกขนส่งไปยัง golgi apparatus ซึ่ง C-peptide จะถูกตัดออกด้วย converting enzyme และในที่สุดก็จะเหลือเป็นฮอร์โมนอินซูลินซึ่งมีโครงสร้างที่ประกอบด้วย A chain ในขนาด 21 กรดอะมิโน และ B chain ในขนาด 30 กรดอะมิโน ทั้งสองสายเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ มวลโมเลกุลของอินซูลินมีขนาดประมาณ 6000 ดาลตัน (Genuth, 2008)

อินซูลินมีครึ่งชีวิตประมาณ 4-6 นาที ถูกกำจัดออกจากกระแสเลือดด้วยเอนไซม์ insulinase ซึ่งอยู่ที่ตับ กล้ามเนื้อ ไต (Goodman, 2003) จากการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองพบว่าการหลั่งอินซูลินจะแบ่งออกได้เป็น 2 ช่วง ช่วงแรกอินซูลินจะหลั่งประมาณ 1 – 3 นาที หลังถูกกระตุ้นด้วยกลูโคสและกลับมาเป็นปกติ ต่อมาช่วงที่สองอินซูลินจะหลั่งเป็นระยะเวลานานหลายชั่วโมง (Genuth, 2008) อินซูลินจะจับกับตัวรับ (receptor) ประเภท protien tyrosine kinase receptor โครสร้างของตัวรับอินซูลินประกอบด้วย แอลฟา subunit และ บีตา subunit ทั้งสองเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ในส่วนของเบตา subunit จะมี tyrosine kinase activity อยู่ (Goodman, 2003)

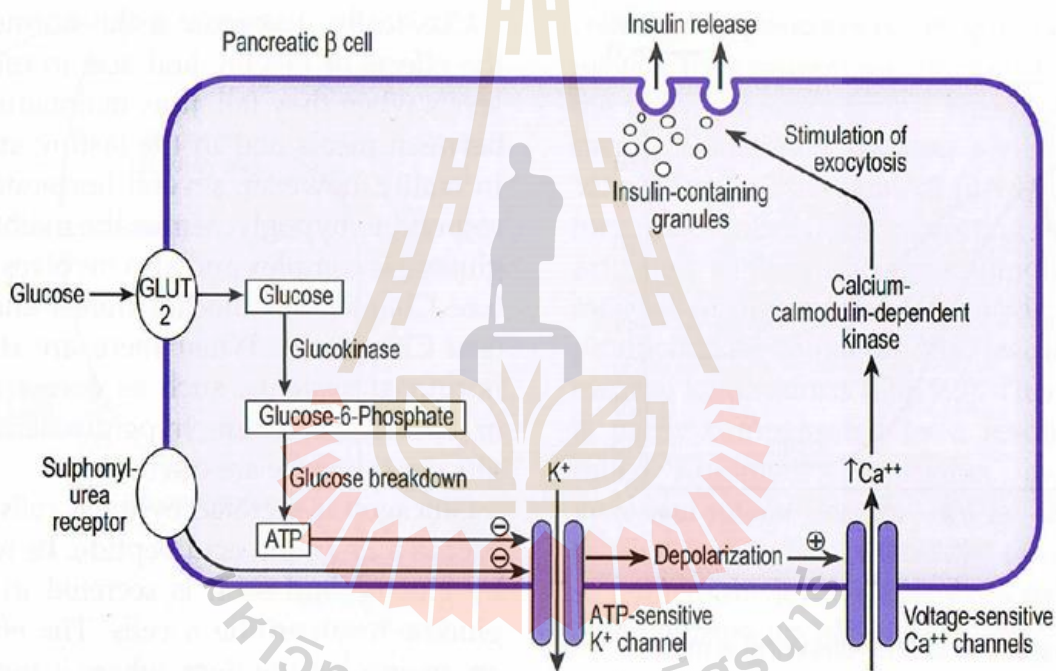
การกระตุ้นการหลั่งอินซูลินด้วยกลูโคสนั้นมีกลไกดังรูปที่ 2.6 โดยกลูโคสจะถูกขนส่งด้วยโปรตีนที่เรียกว่า glucose transporter 2 (GLUT2) เข้าสู่บีตาเซลล์ เมื่อกลูโคสสลายได้ ATP ATP จะทำให้ประตูโพแทสเซียมปิด เกิดภาวะ depolarization เป็นเหตุให้ประตูแคลเซียมเปิดออก แคลเซียมในเซลล์จึงมีมากขึ้น แล้วไปกระตุ้นกระบวนการ exocytosis ของ insulin granules (Goodman, 2003; Hinson, 2007)

2.6 โรคเบาหวาน

โรคเบาหวานเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของกระบวนการเมตาบอลิซึมโดยผู้ป่วยจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง หากระดับน้ำตาลในเลือดสูงมากๆ จะมีผลให้มีน้ำตาลบ่นอกมากับปัสสาวะ น้ำตาลมีคุณสมบัติที่เป็น osmotic agent ทำให้ดึงน้ำเข้าสู่ปัสสาวะมาก ทำให้ผู้ป่วยต้องปัสสาวะบ่อย และเกิดการสูญเสียน้ำ ร่างกายจึงกระหายน้ำมากผู้ป่วยจึงต้องดื่มน้ำเข้าไปชดเชย นอกจากนี้การหลั่งอินซูลินที่ไม่เพียงพอจะทำให้ผู้ป่วยเบาหวานไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นพลังงานได้ ร่างกายจึงต้องใช้ไขมันและโปรตีนเป็นแหล่งพลังงานแทน การสลายไขมันจะทำให้เกิดภาวะ ketoacidosis โดยที่ร่างกาย

จะมีระดับคีโตนสูงขึ้นและกำจัดออกได้ยาก การสลายโปรตีนจะทำให้มีร่างกายมีปริมาณไนโตรเจนมากขึ้น (Karch, 2011)

โรคเบาหวานแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทหลัก คือ (1) เบาหวานประเภทที่ 1 (Type 1 diabetes) หรือ เบาหวานที่ต้องพึ่งอินซูลิน (Insulin-dependent diabetes mellitus) (2) เบาหวานประเภทที่ 2 (Type 2 diabetes) หรือ เบาหวานที่ต้องไม่พึ่งอินซูลิน (Non-insulin-dependent diabetes mellitus) (Notkin, 2002) นอกจากนี้ยังมีโรคเบาหวานชนิดอื่นๆ ที่เกิดจากสาเหตุเฉพาะ เช่น จากการได้รับยาหรือสารเคมีบางชนิด เรียกโรคเบาหวานประเภทนี้ว่า maturity-onset diabetes of the young (MODY) นอกจากนี้อาจพบผู้ป่วยเป็นเบาหวานขณะตั้งครรภ์เรียกว่า Gestational diabetes (GDM) ซึ่งการทบทวนวรรณกรรมนี้จะกล่าวถึงเฉพาะ 2 ประเภทแรกที่พบได้บ่อยกว่าเท่านั้น



รูปที่ 2.6 กลไกการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ของตับอ่อน (Hinson et al., 2007)

เบาหวานประเภทที่ 1

ความชุกของเบาหวานประเภทที่ 1 เกิดขึ้นประมาณ 5-10% โดยมีสาเหตุจากโครงสร้างของตับอ่อนถูกทำลายทำให้ไม่สามารถหลั่งอินซูลินได้ เบาหวานประเภทนี้มีความเกี่ยวข้องกับต่อมไร้ท่อและพันธุกรรมซึ่งจะไปกระตุ้นการทำลายภูมิคุ้มกันในเบตาเซลล์ major histocompatibility complex (MHC) antigen มีส่วนทำให้เกิดเบาหวานประเภทที่ 1 ได้ Autoantibodies ที่พบในเบาหวานประเภท

ที่ 1 นั้นอาจจะต่อต้าน islet cell หรือต่อต้านโมเลกุลของ insulin ก็ได้ ความเสี่ยงของการเป็นเบาหวานประเภทที่ 1 จะมียากขึ้นหากครอบครัวมีประวัติการป่วยเป็นเบาหวานประเภทนี้ ในบางครั้งผู้ป่วยเบาหวานก็เป็นเบาหวานแบบที่ไม่ทราบสาเหตุและไม่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางพันธุกรรม

เบาหวานประเภทที่ 2

ความชุกของการเป็นเบาหวานประเภทที่ 2 ประมาณ 90-95% โดยมีสาเหตุจากการหลั่งอินซูลินที่ลดลง และ/หรืออวัยวะไม่ตอบสนองต่อการหลั่งอินซูลิน (ภาวะดื้ออินซูลิน) โดยคนไข้ในกลุ่มนี้มักเป็นคนอ้วน เนื่องจากตัวรับอินซูลินลดจำนวนลง เมื่อตัวรับอินซูลินลดจำนวนลงมีผลให้การตอบสนองต่ออินซูลินลดลง (American Diabetes association, 2010)

ในผู้ป่วยที่มีภาวะที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานและเกิดความผิดปกติของระบบเมตาบอลิซึมของไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนสามารถทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ ในระยะยาวจะมีผลทำให้ basement membrane หนาและทำให้ collagen filament บางลง โครงสร้างของหลอดเลือดจะเสียหายทำให้หลอดเลือดแคบลง การไหลของเลือดภายในหลอดเลือดลดลงไม่สามารถขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ได้เช่นเดียวกับคนปกติ สิ่งเหล่านี้ก่อให้เกิดโรคแทรกซ้อนได้ในหลายๆระบบ เช่น โรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทเนื่องจากระบบประสาทขาเข้าและออกที่ใช้ในการรับรู้ความรู้สึกมีความผิดปกติ หลอดเลือดแข็งตัวเป็นสาเหตุให้เกิดกล้ามเนื้อหัวใจตายเนื่องจากขาดเลือดไปเลี้ยงและเกิดภาวะหลอดเลือดในสมองแตก นอกจากนี้หลอดเลือดในตาที่แคบลงอาจนำไปสู่ภาวะตาบอด เมื่อ basement membrane ของเส้นเลือดที่ไตมีการเปลี่ยนแปลงจะทำให้เกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับไตมีผลให้อัตราการกรองลดลง ส่งผลต่อเนื้อทำให้เกิดโรคความดันโลหิตสูง (Clayton, 2009; Karch, 2011)

การวินิจฉัยโรคเบาหวานจะทำได้โดยการประเมินค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังการอดอาหาร หรืออาจจะประเมินจากการวัดความทนต่อน้ำตาล และค่าฮีโมโกลบินเอวันซี โดยมีหลักเกณฑ์ในการวินิจฉัยผู้ป่วยโรคเบาหวานดังต่อไปนี้ (American Diabetes Association, 2010)

1. Hemoglobin A1C \geq 6.5 %
2. Fasting blood glucose (FBG) \geq 126 mg/dl (7.0 mmol/L) ค่า FBG ได้จากการวัดน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารเป็นระยะเวลาอย่างน้อย 8 ชั่วโมง
3. Oral glucose tolerance test (OGTT) \geq 200 mg/dl (11.1 mmol/L) OGTT ทำโดยการวัดค่าระดับน้ำตาลในเลือดหลังดื่มน้ำตาลกลูโคส 75 กรัม เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. Random plasma glucose (RPG) \geq 200 mg/dl (11.1mmol/L) ซึ่งเป็นการวัดระดับกลูโคสในเลือดจากการสุ่มวัดโดยไม่กำหนดเวลาอดอาหาร แต่เนื่องจากมีความแม่นยำต่ำจำเป็นต้องตรวจยืนยันด้วย 3 วิธีแรกข้างต้น

2.7 ยารักษาเบาหวาน

วัตถุประสงค์ในการรักษาเบาหวานประเภทที่ 1 และ 2 คือ การรักษาระดับน้ำตาลให้เป็นปกติ องค์การอนามัยโลกแบ่งประเภทของโรคเบาหวานเพื่อเป็นประโยชน์ในการรักษา การรักษาเบาหวานประเภทที่ 1 คือการฉีดอินซูลินเนื่องจากบีตาเซลล์ของตับอ่อนไม่สามารถผลิตอินซูลินได้เพียงพอ ยาเตรียมอินซูลินแบ่งได้ตามระยะเวลาในการออกฤทธิ์ได้ดังนี้

อินซูลินออกฤทธิ์เร็วและสั้น

อินซูลินที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ regular insulin, insulin lispro, insulin aspart, insulin glulisine โดยที่ regular insulin มีโครงสร้างเหมือน insulin ของมนุษย์ ทำให้อยู่ในรูปของ soluble crystalized zinc insulin ซึ่งโมเลกุลของ regular insulin จะจับกันเป็น dimer แล้วล้อมรอบ Zn^{2+} ในลักษณะของ hexamer ทำให้เริ่มออกฤทธิ์ช้าและมีฤทธิ์นานขึ้นกว่าอินซูลินที่ร่างกายผลิตขึ้นเอง ส่วน insulin lispro, aspart และ glulisine เป็น human insulin analog โดยมีการเปลี่ยนแปลง sequence ของ amino acid บางตัว ทำให้ monomer ไม่จับกันเอง เข้าสู่ร่างกายแล้วจึงสามารถออกฤทธิ์ได้ทันที จึงออกฤทธิ์ได้เร็วกว่า regular insulin

อินซูลินออกฤทธิ์เร็วปานกลาง

Neutral protamine Hagedorn insulin (NPH) จะออกฤทธิ์เร็วในระดับปานกลาง เป็นอินซูลินที่จับตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ protamine โดยเมื่อฉีดเข้าใต้ผิวหนังหรือเข้ากล้ามเนื้อ protamine จะถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ในเนื้อเยื่อ จากนั้นอินซูลินจึงค่อย ๆ ถูกปล่อยออกแล้วดูดซึมได้เข้าสู่กระแสเลือด ทำให้ออกฤทธิ์ได้ยาวขึ้น

อินซูลินแบบผสม

เนื่องจาก NPH ต้องใช้เวลานานหลายชั่วโมงในการขึ้นถึงระดับที่ให้ผลลดน้ำตาลในเลือดได้ ดังนั้นในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 จำเป็นจะต้องให้ rapid-acting หรือ short-acting ก่อนอาหาร เพื่อความสะดวกจึงได้มีการผสมยาไว้ในหลอดเดียวกันก่อนฉีด ซึ่งบริษัทผู้ผลิตได้พัฒนาสูตร เพื่อให้ยาผสมดังกล่าวมีความคงตัว

อินซูลินออกฤทธิ์ระยะยาว

อินซูลินกลุ่มนี้ได้แก่ insulin glargine, insulin detemir และ insulin degludec เป็น long-acting insulin analog ที่ปรับปรุงโมเลกุลให้สามารถออกฤทธิ์ยาว หลังการให้อินซูลินประเภทระดับอินซูลินในกระแสเลือดจะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น คงอยู่ และลดลงอย่างช้า ๆ ไม่มี peak เกิดขึ้นเหมือนกลุ่มที่กล่าวไปแล้วข้างต้น เรียกผลของอินซูลินประเภทนี้ว่า “peakless” การใช้อินซูลินประเภทนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรักษาระดับ basal insulin ในเลือด

นอกจากอินซูลินแล้วยังมียาที่ให้โดยทางการรับประทาน โดยสามารถแบ่งยารักษาเบาหวานตามกลไกการออกฤทธิ์ได้ดังต่อไปนี้

กลุ่มออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน

ยาที่มีกลไกการออกฤทธิ์โดยการหลั่งอินซูลินได้แก่ ยากลุ่ม sulphonylureas จะมีผลต่อประตูโพแทสเซียมที่เยื่อหุ้มเซลล์ของตับอ่อน ทำให้ภายในเซลล์มีภาวะเป็น depolarization ทำให้ประตูแคลเซียมเปิดออก แคลเซียมไหลจากภายนอกเข้ามาภายในเซลล์ ไปกระตุ้นกระบวนการ exocytosis และอินซูลินหลั่งจากเซลล์ มีการคิดค้นยาใหม่ๆ ที่มีกลไกการออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ sulphonylureas ได้แก่ กลุ่ม Meglitinide และ D-phenylalanine

กลุ่ม Biguanide

Metformin เป็นยาในกลุ่มนี้เพียงตัวเดียวที่นิยมใช้ในปัจจุบัน มีการออกฤทธิ์ไปกระตุ้นกระบวนการไกลโคไลซิสเพื่อเร่งกำจัดกลูโคสออกจากเลือด ลดการหลั่งกลูโคสจากตับ ลดการดูดซึมกลูโคสที่ลำไส้เล็ก ช่วยให้นำกลูโคสไปเก็บที่กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อไขมันเพิ่มขึ้น

ยากลุ่ม Thiazolidinedione

Pioglitazone เป็นตัวอย่างยาที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ กลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่ม Thiazolidinedione คือการภาวะคืออินซูลิน โดยยาจะไปกระตุ้น peroxisome proliferator activated receptor gamma nuclear receptor การกระตุ้นตัวรับในกลุ่มนี้จะเพิ่มการนำกลูโคสไปใช้และทำให้เนื้อเยื่อไขมัน ตับ และกล้ามเนื้อมีการตอบสนองต่ออินซูลินได้ดีขึ้น

กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ α -glucosidase

Acarbose และ Migitol จะไปแย่ง substrate ในการจับกับเอนไซม์ α -glucosidase เพื่อยับยั้งไม่ให้เอนไซม์นี้ย่อยพวคาร์โบไฮเดรตได้ ดังนั้นจึงสามารถช่วยลดระดับน้ำตาลในเลือดหลังจากการรับประทานอาหาร

กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ dipeptidyl peptidase IV

Incretin เป็น peptide ที่สร้างจากระบบทางเดินอาหาร peptide ที่มีชื่อว่า glucagon like polypeptide (GLP-1) จัดอยู่ในกลุ่มของ incretin โดยที่ GLP-1 จะไปเพิ่มการหลั่งของอินซูลิน ลดการหลั่งของกลูคากอน GLP-1 จะมีครึ่งชีวิตที่สั้นถูกสลายได้ด้วย dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) ดังนั้น DPP-IV inhibitor นั้นจะช่วยให้ GLP-1 สลายช้าลง อินซูลินจะหลั่งได้นานขึ้นหลังจากการรับประทานอาหาร (Clayton, 2009; Finkel, 2009; Nolte, 2009)

กลุ่มยาที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง Sodium-Glucose Co-transporter 2 (SGLT2)

โดยปกติกลูโคสในร่างกายจะถูกกรองออกโดย glomerulus ของไตแต่จะทั้งหมดจะถูกดูดซึมกลับโดย proximal tubules ผ่านการทำงานของตัวขนส่งที่ชื่อว่า sodium-glucose transporters (SGLTs) การยับยั้งโปรตีนชนิดนี้จึงทำให้กลูโคสของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ถูกขับออกทางปัสสาวะได้มากขึ้น ยาในกลุ่มนี้ได้แก่ Canagliflozin, Dapagliflozin และ Empagliflozin

2.8 สารเคมีที่ใช้เพื่อการเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานในสัตว์ทดลอง

การทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวานในสัตว์ทดลองมักจะใช้การเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่สามารถทำลายตับอ่อน ได้แก่ streptozotocin และ alloxan เป็นต้น streptozotocin เป็นสารที่สกัดได้จากเชื้อ *Streptomyces achromogenes* สารชนิดนี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์จากปฏิกิริยา alkylation กับสาย DNA ทำให้เกิดการตายของบีต้าเซลล์ของตับอ่อน อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ผู้วิจัยเลือกใช้ alloxan เป็นสารเคมีที่ใช้เพื่อเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวาน เนื่องจากมีราคาถูกกว่า streptozotocin ค่อนข้างมาก alloxan ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า 2,4,6-tetraoxypyrimidine; 5,6-dioxyuracil ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1818 โดย Brugnatelli และสังเคราะห์ได้สำเร็จในปี ค.ศ. 1838 โดย Wohler and Leibig กระทั่งในปี ค.ศ. 1943 Dunn และคณะได้รายงานถึงผลต่อการตายที่เฉพาะเจาะจงต่อบีต้าเซลล์ของตับอ่อน (Szkudelski, 2001)

Alloxan เป็นสารที่มีขี้ ถูกขนส่งโดยโปรตีน glucose transporter type 2 (GLUT2) เช่นเดียวกับการขนส่งกลูโคสเข้าสู่เซลล์ alloxan เป็นสารเคมีที่ไม่ค่อยเสถียร สลายตัวง่าย มีค่าครึ่งชีวิตประมาณ 1.5 นาที ที่ pH 7 และอุณหภูมิ 37 °C อย่างไรก็ตามอาจมีค่าครึ่งชีวิตที่ยาวนานขึ้นหากเก็บรักษาไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ ในการทำการทดลอง สามารถใช้ 0.9 % NaCl ที่เย็นในการละลาย alloxan และควรทำการฉีดเข้าในสัตว์ทดลองหลังจากเตรียมเสร็จอย่างรวดเร็ว โดยที่สามารถฉีด alloxan เข้าทางหลอดเลือดดำ ใต้ผิวหนัง หรือทางกล้ามเนื้อก็ได้ ความเข้มข้นของ alloxan ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ทดลอง การฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำใช้ความเข้มข้น 65 mg/kg เมื่อฉีดเข้าทางกล้ามเนื้อและใต้ผิวหนังต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่านี้ ความเข้มข้นของ alloxan ที่ต่ำกว่า 150 mg/kg จะไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอหากต้องฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง

ระยะตอบสนองหลังจากการที่ฉีด alloxan แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ (Lenzen, 2008) ดังต่อไปนี้

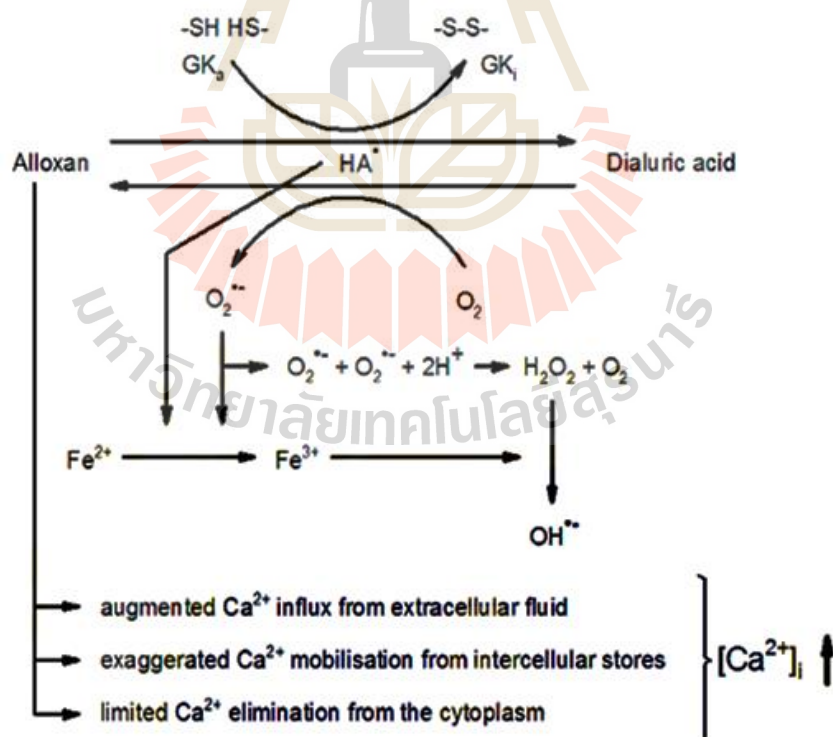
ระยะที่ 1 ระดับน้ำตาลในเลือดต่ำ หลังจากฉีด alloxan ไป 30 นาที ระยะนี้จะเกิดขึ้นชั่วคราวเนื่องจากการไปกระตุ้นการหลั่งอินซูลิน

ระยะที่ 2 ระดับน้ำตาลในเลือดสูง หลังจากฉีด alloxan ไปประมาณ 1 ชั่วโมง จะมีการบวมของแวคคิวโอล rough endoplasmic reticulum ขยายออก จำนวน golgi body และ insulin granules ลดลง มีการบวมของไมโทคอนเดรีย

ระยะที่ 3 ระดับน้ำตาลในเลือดจะต่ำอีกครั้ง ในช่วงนี้เป็นระยะวิกฤติที่สัตว์ทดลองอาจตายได้ เนื่องจาก alloxan เริ่มทำลายเยื่อหุ้มบีตาเซลล์ อินซูลินยังหลั่งออกมาได้ทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ระยะนี้จำเป็นต้องให้สัตว์ทดลองได้รับน้ำตาลกลูโคสได้อย่างอิสระเท่าที่ต้องการ

ระยะที่ 4 ในที่สุดเมื่อบีตาเซลล์ถูกทำลายไปจนหมด อินซูลินไม่สามารถหลั่งออกมาได้ ระดับน้ำตาลในเลือดจะสูงอย่างต่อเนื่อง

กลไกการทำลายตับอ่อนของ alloxan แสดงไว้ในรูปที่ 2.7 โดย alloxan สามารถจับกับ SH group ในน้ำตาลที่ตำแหน่งของเอนไซม์ glucokinase การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ glucokinase จะลดการสลายกลูโคสและลดการสร้าง ATP มีผลยับยั้งการหลั่งอินซูลิน Dialuric acid เป็นผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาของ alloxan alloxan radical และ unidentified compound 305 (สารประกอบที่สามารถดูดกลืนแสงที่ 305 nm) จะเกิดขึ้นระหว่างการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ alloxan และ dialuric acid และเกิดอนุมูลอิสระ superoxide ขึ้นจากการทำปฏิกิริยาการ ferric ions จาก ferritin อนุมูลอิสระ hydroxyl มีฤทธิ์ทำลายสูง นอกจากนั้น alloxan ยังทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์สูงผิดปกติ ฤทธิ์ที่กล่าวมาทั้งหมดส่งผลทำให้บีตาเซลล์เกิดการตายขึ้น (Fröde and Medeiros, 2008; Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001)



รูปที่ 2.7 กลไกการออกฤทธิ์ทำลายเซลล์ของตับอ่อนของ alloxan (Hinson et al., 2007)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมีและเครื่องมือ

สารเคมีและแหล่งที่มาซึ่งใช้ในการศึกษานี้ได้สรุปไว้ในตารางที่ 3.1 ส่วนเครื่องมือและอุปกรณ์ที่เกี่ยวข้องสรุปไว้ในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.1 รายชื่อสารเคมี

ชื่อสาร	แหล่งที่มา
2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) (ABTS)	Sigma
2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical	Sigma
2,4,6-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)	Sigma
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)	Sigma
Acetone	Carlo
Alloxan	Sigma
Aluminum chloride hexahydrate ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Antibiotic-antimycotic solution	Gibco
Ascorbic acid	Carlo
Butylated hydroxytoluene (BHT)	Sigma
Capture antibody (Anti-Insulin antibody)	Abcam
Catechin	Fluka
Chloroform	Carlo
Detection antibody	Abcam
Anti-Insulin + Proinsulin antibody labeled with biotin	
D-Glucose	Himedia
Dimethylsulphoxide (DMSO)	Carlo

ตารางที่ 3.1 รายชื่อสารเคมี (ต่อ)

ชื่อสาร	แหล่งที่มา
Eosin	Bio-Optica
Ethyl alcohol	Carlo
Ferric chloride (FeCl ₃)	Sigma
Ferrous sulfate (FeSO ₄)	Sigma
Fetal bovine serum	Gibco
Folin-Ciocalteu reagent	Carlo
Formaldehyde	Carlo
Gallic acid	Fluka
Glibenclamide	Sigma
Glibenclamide ตารางts	Daonil
Haematoxylin	Bio-Optica
Insulin	Sigma
Potassium persulphate (K ₂ S ₂ O ₈)	Carlo
RPMI-1640 medium	Gibco
Sodium carbonate (Na ₂ CO ₃)	Carlo
Sodium nitrite (NaNO ₂)	Sigma
Streptavidin peroxidase	Sigma
3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB)	Invitrogen
Trypsin (0.25 % EDTA)	Gibco
Tween 20	Bio-rad
Xylene	Carlo

3.2 การเก็บพืช

ลำต้นชะเอมเหนือเก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี การพิสูจน์เพื่อยืนยันชนิดของพืชทำโดย ดร. พอล โกรติ อดีตอาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตัวอย่างพืชเก็บไว้ที่ห้องปฏิบัติการเภสัชวิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

(หมายเลขตัวอย่าง: Pharm-Chu-006) ลำต้นถูกตัดให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 50 °C แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้องในภาชนะปิดสนิทจนกระทั่งนำไปสกัด

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่อสาร	แหล่งที่มา
96-well plate	Nunc
A15 Analyzer Automatic Clinical Chemistry	Biosystems
Blood autoanalyzer coulter	Beckman Coulter Inc
Centrifuge machine	Hettich
ELISA plate	Nunc
ELISA plate reader	Bio-rad
Glucometer Accu-Chek Performa glucose test strips	Roche Diagnostics
Haemocytometer	Fisher Scientific
Hot air oven	Memmert
Lyophilizer	Labconco
Peroxidase-glucose oxidase (PGO) enzyme	Sigma
Rotary evaporator	Buchi
Rotary microtome	Shandon Finesse
Spectrophotometer	Cecil
Tissue embedding console system	Shandon Finesse
Tissue processor automated	Shandon Finesse

3.3 การสกัดพืช

นำพืชที่เตรียมได้ไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 10 นาที (100 กรัม/500 มิลลิลิตร) ซ้ำ 2 ครั้ง นำสารสกัดที่ได้ทั้งหมดไปกรองด้วยผ้าก๊อซ จากนั้นนำไปปั่นที่ 2,500 × g นาน 10 นาที แล้วเก็บส่วนใสข้างบนไประเหยด้วยเครื่อง rotary evaporator ให้ปริมาตรลดลงเหลือ 1 ใน 10 จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง lyophilizer เก็บสารสกัดผงแห้งที่ได้ในอุณหภูมิ -20 °C จนกว่าจะนำไปทำการทดลอง พบว่าได้ % yield = 16.73% w/w

3.4 การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้น

การตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดจากลำต้นชะเอมเหนือทำตามวิธีที่ได้มีรายงานมาแล้ว (Ayoola et al., 2008; Yadav and Agarwala, 2011) โดยได้ทำการตรวจสอบสารกลุ่มต่อไปนี้ คือ anthraquinones, terpenoids, flavonoids, saponins, tannins และ cardiac glycosides

3.4 การตรวจหาปริมาณ total phenolic content

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกของสารสกัดถูกใส่ไปในการศึกษานี้ ใช้วิธีที่กล่าวไว้ในการศึกษาของ Matthäus (2002) ดังต่อไปนี้คือ ละลายสารสกัดในน้ำให้มีความเข้มข้น 1 mg/ml จากนั้นนำ 100 μ l เติมลงใน 2 ml ของ 2% Na_2CO_3 แล้วจึงเติม 100 μ l ของสารละลาย Folin-ciocalteu หลังจากตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 750 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ค่า total phenolic content ของสารสกัดได้จากการเปรียบเทียบกับ gallic acid มีหน่วยเป็น mg/g gallic acid equivalents (GAE)

3.6 การตรวจหาปริมาณ total flavonoid content

การวัดปริมาณ total flavonoid content ใช้วิธีที่มีรายงานมาแล้ว (Liu et al., 2002) โดยนำสารสกัดที่มีความเข้มข้น 5 mg/ml จำนวน 150 μ l ใส่ลงในน้ำกลั่นจำนวน 1250 μ l แล้วเติม 5% NaNO_2 จำนวน 75 μ l ทิ้งไว้เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นเติมสารละลาย 10% AlCl_3 จำนวน 150 μ l แล้วตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จึงเติม 1 M NaOH จำนวน 500 μ l แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 2500 μ l นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 510 nm ค่า total flavonoid content ของสารสกัดได้จากการเปรียบเทียบกับ catechin มีหน่วยเป็น mg catechin per gram extract.

3.7 การวิเคราะห์หาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

3.7.1 ABTS assay

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ใช้ในการวิจัยนี้ ทำโดยวัดความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2'-azino-bis[3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate) ซึ่งมีรายงานมาก่อนแล้ว โดย Re และคณะ (1999) ด้วยการเตรียมสารละลาย $\text{ABTS}^{\bullet+}$ radical cation ความเข้มข้น 14 mM จำนวน 5 ml ผสมกับ 5 ml ของ 4.9 mM potassium persulphate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$) ทิ้งไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ก่อนนำมาใช้ต้องเจือจางด้วย 95% ethanol จนกระทั่งมีค่า absorbance ที่ 734 nm อยู่ระหว่าง 0.70 ± 0.02 จากนั้นผสมสารสกัดกับสารละลายดังกล่าวในอัตราส่วน 50:950 (μ l) ทิ้งไว้ในที่มืดนาน 6 นาที นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 734 nm เทียบกับ Butylated hydroxytoluene (BHT) ซึ่ง

ใช้เป็นสารมาตรฐาน ความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของตัวอย่างแต่ละความเข้มข้นคิดเป็น % radical scavenging activity โดยใช้สูตรคำนวณด้านล่าง ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดแสดงผลเป็นค่า IC₅₀ ซึ่งหมายถึงความเข้มข้นของสารสกัดที่สามารถลดปริมาณอนุมูลอิสระ ABTS^{•+} ได้ครึ่งหนึ่ง

$$\text{ABTS}^{\bullet+} \text{ radical scavenging activity (\%)} = [A_0 - A_1] / A_0 \times 100$$

โดย A_0 = ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุม

A_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของสารสกัด

3.7.2 DPPH free radical scavenging activity

ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดอีกวิธีหนึ่งที่ใช้ในการวิจัยนี้ ทำโดยวัดความสามารถในการกำจัด 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว โดยทำตามที่เคยมีรายงานไว้แล้ว (Bor et al., 2006) วิธีที่ใช้หลักการดังต่อไปนี้คือ DPPH (สีม่วง) สามารถไปทำปฏิกิริยารeduction กับสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระโดยจะรับ electron หรือ hydrogen radical จากสารต้านอนุมูลอิสระ เกิดเป็นโมเลกุลใหม่ที่คงตัวขึ้น (reduced form มีสีเหลืองอ่อน) ทำให้การดูดกลืนแสงที่ 517 nm เปลี่ยนไป วิธีทำมีรายละเอียดดังต่อไปนี้ คือ เติมสารสกัดหรือสารมาตรฐาน (ascorbic acid) ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 1 ml ลงใน สารละลาย 200 mM DPPH ที่ละลายใน methanol จำนวน 4.0 ml ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 5.0 ml ด้วยน้ำ เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 30 นาทีในที่มืด เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ด้วยเครื่อง spectrophotometer ฤทธิ์ในการกำจัดอนุมูลอิสระคำนวณได้เป็น % โดยสมการข้างล่าง

$$\text{DPPH Radical scavenging activity (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

โดยที่ A_{control} และ A_{sample} คือ ค่าการดูดกลืนแสงของหลอดควบคุมและสารสกัดหรือสารมาตรฐานตามลำดับ

3.7.3 FRAP assay

Ferric reducing antioxidant power (FRAP) assay สามารถตรวจสอบได้จากการรีดิวซ์ ferric-TPTZ (2,4,6-tri-(2-pyridyl)-1,3,5-triazine) ไปเป็น ferrous-TPTZ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 593 นาโนเมตร FRAP reagent ประกอบด้วย acetate buffer (pH 3.6), 10 mmol TPTZ solution ใน 40 mmol HCl และ 20 mmol iron(III) chloride solution ในอัตราส่วน 10:1:1 (โดยปริมาตร) บ่ม FRAP reagent ไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ใน water bath จนกว่าจะใช้ สารละลายที่จะนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงประกอบด้วยสารสกัด จำนวน 50 µl ผสมกับ FRAP reagent จำนวน 1.5 ml ทิ้งไว้ 4 นาที ความสามารถในการรีดิวซ์ของสารสกัดทำโดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของ iron (II)

sulfate (ความเข้มข้น 100-200 μM) โดย FRAP value แสดงค่าเป็น $\mu\text{M Fe (II)/mg}$ ของน้ำหนักสารสกัดแห้ง

3.8 การทดสอบผลของสารสกัดในการปกป้องเซลล์

3.8.1 เซลล์และการเลี้ยงเซลล์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษาทดลองนี้เป็นเซลล์ต้นอ่อนของหนูชนิด RINm5F ซึ่งจาก American Type Culture Collection (ATCC) นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยง RPMI-1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum, สารละลาย 1% antibiotic-antimycotic บ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 °C ในบรรยากาศที่มีไอน้ำและ 5% CO_2

3.8.2 การศึกษาฤทธิ์ปกป้องของสารสกัด

การวิเคราะห์หาฤทธิ์ในการปกป้องของสารสกัดจากการทำลายเซลล์ด้วย alloxan ทำตามวิธีที่ได้มีรายงานมาแล้ว (Ramkumar et al., 2009) และมีการปรับปรุงเล็กน้อยในแง่ของความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดสอบ

3.8.2.1 การประเมินผลของสารสกัดต่อความอยู่รอดของเซลล์

เบื้องต้นได้ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดต่อการอยู่รอดของเซลล์ RINm5F โดยนำเซลล์จำนวน 2×10^5 cells/well ใส่ลงในจานเลี้ยงแบบ 96 หลุม ที่งัวข้ามคืนเพื่อให้เซลล์เกาะกับจาน หลังจากเปลี่ยนอาหารเลี้ยงแล้วเติมสารสกัดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0 - 3,500 $\mu\text{g/ml}$ บ่มต่อเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงดูดเอาอาหารเลี้ยงออกแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT ดังรายละเอียดต่อไปนี้คือ เติมสารละลายความเข้มข้น 5 mg/ml ของ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) จำนวน 100 μl ลงในจานหลุม จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์ formazan หลังจากนั้น เติม DMSO จำนวน 50 μl ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm การอยู่รอดของเซลล์คำนวณโดยคิดเป็นร้อยละของเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ

3.8.2.2 การประเมินผลของ alloxan ต่อความอยู่รอดของเซลล์

การทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ alloxan ที่จะใช้ในการทดลองต่อไป ทำในทำนองเดียวการทดลองในหัวข้อ 3.8.2.1 โดยใช้ ความเข้มข้นของ alloxan ระหว่าง 0-15 mM จาก stock solution ที่ละลายใน 50 mM citrated buffer (pH 3.0) รอให้เซลล์สัมผัสสารเป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง จึงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงใหม่ แล้วบ่มเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ไม่มี alloxan ต่อไปอีกจนครบเวลา 23 ชั่วโมง นำไปตรวจวัดความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ตามที่อธิบายไปแล้วในหัวข้อ 3.8.2.1

3.8.2.3 การตรวจสอบผลของสารสกัดต่อความเสียหายของเซลล์ที่ถูกชักนำด้วย alloxan

การทดสอบแบ่งเป็นการทดสอบผลของสารสกัดต่อเซลล์ที่ได้รับก่อนและหลังการชักนำให้เกิดการตายด้วย alloxan โดยนำเซลล์ RINm5F จำนวน 2×10^5 เซลล์ มาบ่มด้วยสารสกัดที่มีความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 50-500 $\mu\text{g/ml}$ ก่อนเป็นเวลา 23 ชั่วโมง ก่อนจะบ่มต่อด้วย alloxan ที่มีความเข้มข้น 9 mM ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ความอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ตามที่ได้กล่าวไปแล้ว

ในกรณีของการทดสอบหาฤทธิ์ปกป้องของสารสกัดหลังได้รับ alloxan เซลล์จะถูกให้สัมผัสกับ 9 mM alloxan เป็นเวลา 1 ชั่วโมงก่อนจะเปลี่ยนอาหารเลี้ยงที่มีสารสกัดความเข้มข้นต่างๆ ระหว่าง 50-500 $\mu\text{g/ml}$ บ่มต่อไปอีกจนครบ 23 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี MTT การอยู่รอดของเซลล์คำนวณโดยคิดเป็นร้อยละของกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ

3.9 การประเมินฤทธิ์การลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัด

3.9.1 สัตว์ทดลอง

ระเบียบวิธีการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้รับการรับรองและทำตามขั้นตอนของคณะกรรมการควบคุมดูแลสัตว์ทดลองมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา ประเทศไทย

การทดลองครั้งนี้ใช้หนูขาวตัวผู้น้ำหนัก 200-250 กรัม ให้สัตว์ทดลองอยู่ในอุณหภูมิที่ 25 °C เปิด-ปิดไฟสลับกันเพื่อให้มีระยะเวลากลางวันและกลางคืนอย่างละ 12 ชั่วโมง หนูสามารถเข้าถึงอาหารและน้ำได้ตลอดเวลา

3.9.2 การเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

การเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองเป็นเบาหวานโดยใช้สารละลาย alloxan ที่ละลายด้วย 0.9% NaCl แข็งเย็น ความเข้มข้นที่ใช้ในการฉีดเข้าใต้ผิวหนังคือ 150 mg/kg โดยให้หนูงดอาหารข้ามคืนก่อนฉีดหลังจากที่ฉีด alloxan แล้วให้ 5% glucose solution แทนน้ำเพื่อป้องกันไม่ให้ระดับน้ำตาลในเลือดของสัตว์ทดลองต่ำ หลังจากนั้น 3 วัน หนูที่วัดค่า FBG ได้ ≥ 250 mg/dl เท่านั้นที่นำมาใช้ในการทดลอง

3.9.3 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ทำการแบ่งหนูกลุ่มละ 6 ตัว เพื่อทำการป้อนสารสกัดและยาเป็นระยะเวลา 15 วัน

กลุ่มที่ 1 หนูปกติ

กลุ่มที่ 2 หนูเบาหวาน

กลุ่มที่ 3 หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัด 250 mg/kg

กลุ่มที่ 4 หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัด 500 mg/kg

กลุ่มที่ 5 หนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide 20 mg/kg

3.9.4 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปลายหางหนูในวันที่ 0, 5, 10 และ 15 โดยใช้เครื่องวัดระดับน้ำตาล Accu-Check ในวันสุดท้ายของการทำการทดลองทำการเมตาฆาตสัตว์ทดลอง โดยเคลื่อนกระดูกคอ เก็บตับอ่อนแช่ไว้ที่ formaldehyde buffer (10 %)

3.9.5 การตรวจสอบทางพยาธิสภาพ

ทำการดึงเอาน้ำออกจากตับอ่อนด้วย 95 %, 100% ethanol, acetone และ xylene ตามลำดับ จากนั้นทำการ embed เนื้อเยื่อลงในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนาประมาณ 5 μ m วางเนื้อเยื่อลงบนสไลด์ ล้างพาราฟินออกด้วย จากนั้นทำการ hydrate เนื้อเยื่อด้วย ethanol 100, 95 และ 70% ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำเปล่าแล้วย้อมด้วยสี haematoxylin และ eosin ก่อนทำการ dehydrate ด้วย 95 %, 100% ethanol, acetone และ xylene ตากให้แห้งก่อนตรวจดูพยาธิสภาพ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.9.6 ตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการดูดซึมกลูโคสที่ลำไส้เล็กของหนู

การตรวจสอบฤทธิ์การยับยั้งการดูดซึมกลูโคสในการศึกษานี้ทำตามวิธีที่เคยรายงานไว้ (Krisanapun et al., 2009) หลังจากทำการเมตาฆาตสัตว์ทดลองด้วยการเคลื่อนกระดูกคอแล้ว ทำการแยกเอาลำไส้ส่วนเจจูนัมแล้วนำไปแช่ไว้ใน Krebs-Henseleit solution ที่พ่นด้วยออกซิเจนไว้ แบ่งลำไส้เป็นท่อนความยาวท่อนละ 3 เซนติเมตร ทำการกลับลำไส้ให้ด้านในออกด้านนอกด้วยแท่งแก้วขนาดเล็ก ผูกปลายด้านหนึ่งไว้เพื่อให้มีลักษณะเป็นถุง จากนั้นเติม Krebs-Henseleit solution ที่มีกลูโคสอยู่ 140 mg/dl ลงไป ผูกปลายอีกด้านหนึ่งของลำไส้ บ่มถุงลำไส้ตั้งสภาวะต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ลำไส้ส่วนเจจูนัมบ่มใน Krebs-Henseleit solution with glucose 140 mg/dl

กลุ่มที่ 2 – 5 กลุ่มทดลอง ลำไส้ส่วนเจจูนัมบ่มใน Krebs-Henseleit solution with glucose 140 mg/dl ผสมกับสารสกัดความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.25, 0.5, 1.5, 2.5 mg/ml

กลุ่มที่ 6 – 8 กลุ่ม positive control ลำไส้ส่วนเจจูนัมบ่มใน Krebs-Henseleit solution with glucose 140 mg/dl ผสมกับ sodium fluoride 0.2 M ความเข้มข้นสุดท้ายคือ 0.025, 0.05, 0.075 M

ทำการบ่มและเขย่าที่ 90 oscillation/min 37 °C หลังบ่มนานเป็นเวลา 30 นาที ตัดด้วยที่ผูกถุง ออก นำสารละลายที่อยู่ในถุงไปวัดความเข้มข้นของน้ำกลูโคสด้วย peroxidase-glucose oxidase (PGO) enzyme commercial kit

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 พฤษเคมี

ผลการตรวจสอบพฤษเคมีเบื้องต้นพบว่าสารสกัดประกอบด้วย สารกลุ่มเทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน และแทนนิน แต่ไม่พบสารกลุ่มแอนทราควิโนนและคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ ผลการทดสอบแสดงไว้ในตาราง 4.1

ตารางที่ 4.1 พฤษเคมีที่เป็นส่วนประกอบในสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ

กลุ่มของสารประกอบ	ผลการทดสอบ
Anthraquinones	-
Terpenoids	+
Flavonoids	+
Saponins	+
Tannins	+
Cardiac glycosides	-

(+) พบ, (-) ไม่พบ

4.2 ปริมาณ total phenolic content ในสารสกัด

ปริมาณสารประกอบพวก phenolic ที่ทำการทดสอบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu ในการศึกษานี้ มีหน่วยเทียบกับจำนวนมิลลิกรัมของ gallic acid (gallic acid equivalent) ซึ่งสารสกัดที่ได้ มีปริมาณสารประกอบพวก phenolic เท่ากับ 78.84 ± 0.01 mg GAE/g ของสารสกัด

4.3 ปริมาณ total flavonoid content ในสารสกัด

ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ใช้วิธี aluminium chloride colorimetric method ในการวิเคราะห์โดยใช้สาร catechin เป็นสารมาตรฐานในการเปรียบเทียบ พบว่าปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดมีค่าเท่ากับ 54.72 ± 1.81 mg catechin/g ของสารสกัด

4.4 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดได้รับการตรวจสอบด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี ได้แก่ ABTS DPPH และ FRAP โดยผลวิเคราะห์จากวิธี ABTS ได้ค่า IC_{50} ของสารสกัดเท่ากับ $515.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ โดยมีค่ามากกว่าสารมาตรฐาน BHT ซึ่งมีค่า = $83.05 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$

ในการตรวจวัดด้วยวิธี DPPH ได้ค่า IC_{50} เท่ากับ $239.85 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ (เทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid ซึ่งมีค่า $1.23 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$) ขณะที่เมื่อวัดด้วยวิธี FRAP โดยใช้ FeSO_4 เป็นสารเปรียบเทียบ พบว่าได้ค่าเท่ากับ $0.23 \pm 0.05 \mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ของสารสกัด ผลการทดสอบทั้งสามวิธีสรุปไว้ในตาราง 4.2

ตารางที่ 4.2 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ

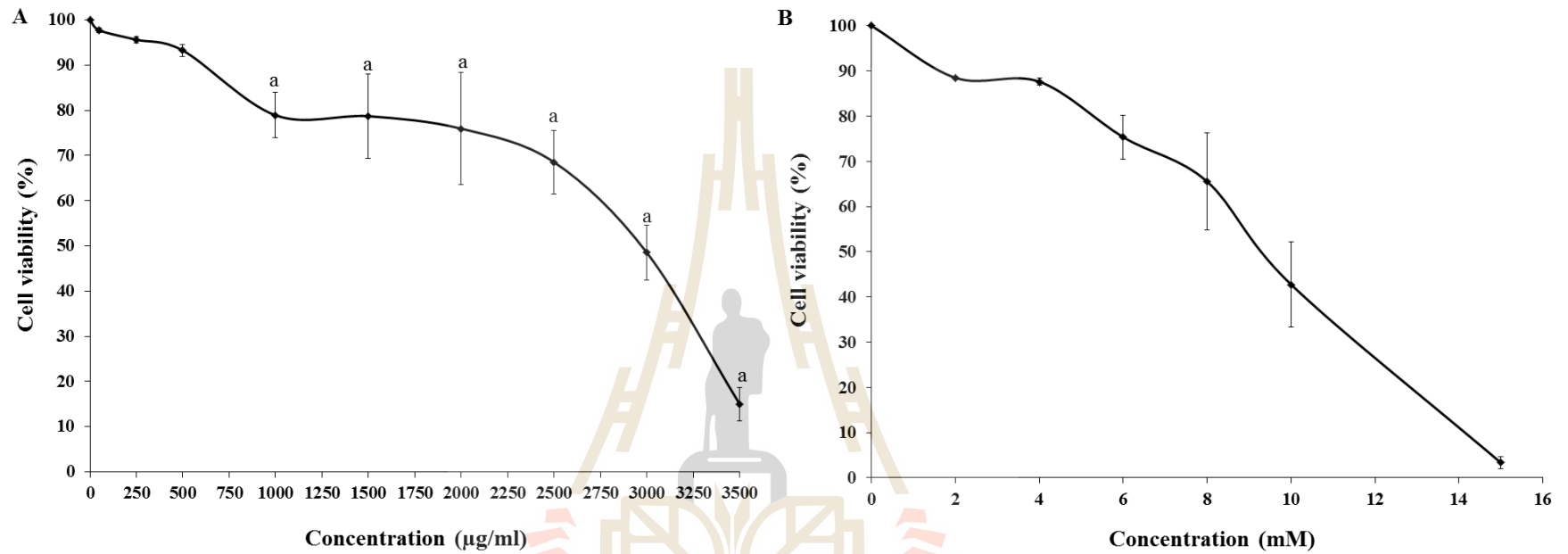
	วิธีที่ใช้ทดสอบ		
	ABTS (IC_{50} : $\mu\text{g/ml}$)	DPPH (IC_{50} : $\mu\text{g/ml}$)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ dried extract)
สารสกัด	515.05 ± 0.13	239.85 ± 0.13	0.23 ± 0.05
Ascorbic acid	-	1.23 ± 0.18	-
Butylated hydroxytoluene (BHT)	83.05 ± 0.13	-	-

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. (n=3)

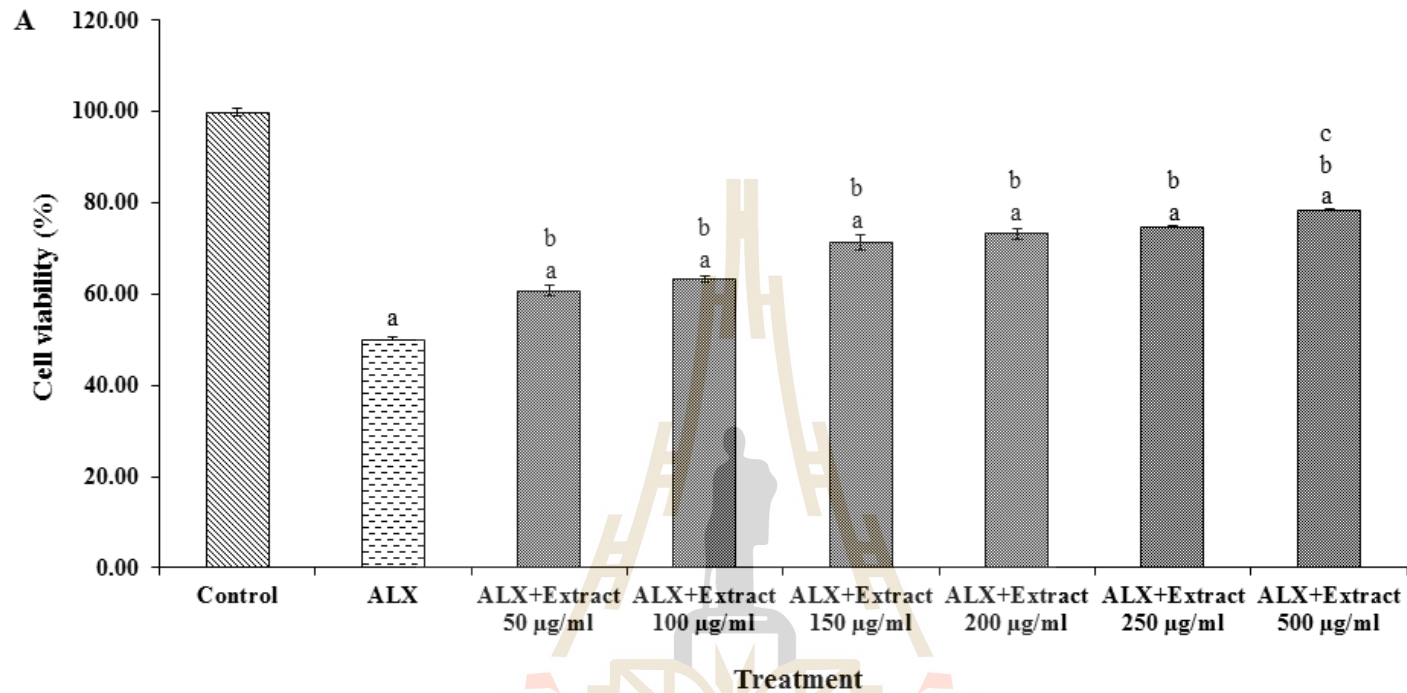
4.5 ฤทธิ์ปกป้องเซลล์ของสารสกัด

จากรูปที่ 4.1A หลังการบ่มเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงพบว่าสารสกัดที่มีความเข้มข้นมากกว่า $500 \mu\text{g/ml}$ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ RINm5F เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนรูปที่ 4.1B แสดงผลการทดลองทดสอบความเป็นพิษของสาร alloxan ต่อการอยู่รอดของเซลล์ พบว่าค่า IC_{50} มีค่าเท่ากับ 9 mM ดังนั้นดังนั้นความเข้มข้นของสารสกัดที่ $\leq 500 \mu\text{g/ml}$ และ alloxan 9 mM ความเข้มข้นที่ได้นี้จะนำไปใช้ในการศึกษาฤทธิ์ปกป้องเซลล์ในการทดลองลำดับต่อไป

ในการศึกษานี้พบว่าสารสกัดจากลำต้นชะเอมเหนือ มีฤทธิ์ปกป้องการตายของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่ว่าจะให้ก่อนหรือหลังการชักนำให้เซลล์ตายด้วย alloxan โดยเมื่อให้สารสกัดในขนาด $50\text{-}500 \mu\text{g/ml}$ ก่อนการชักนำ จะสามารถเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์จาก 50.26% เป็น 78.51% (รูปที่ 4.2)



รูปที่ 4.1 ความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือและ alloxan รูป A และ B แสดงการอยู่รอดของเซลล์ RINm5F หลังการบ่มด้วยสารสกัดและ alloxan ตามลำดับที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ค่าที่แสดงในกราฟคือ mean \pm S.E.M. (n = 3)
^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม

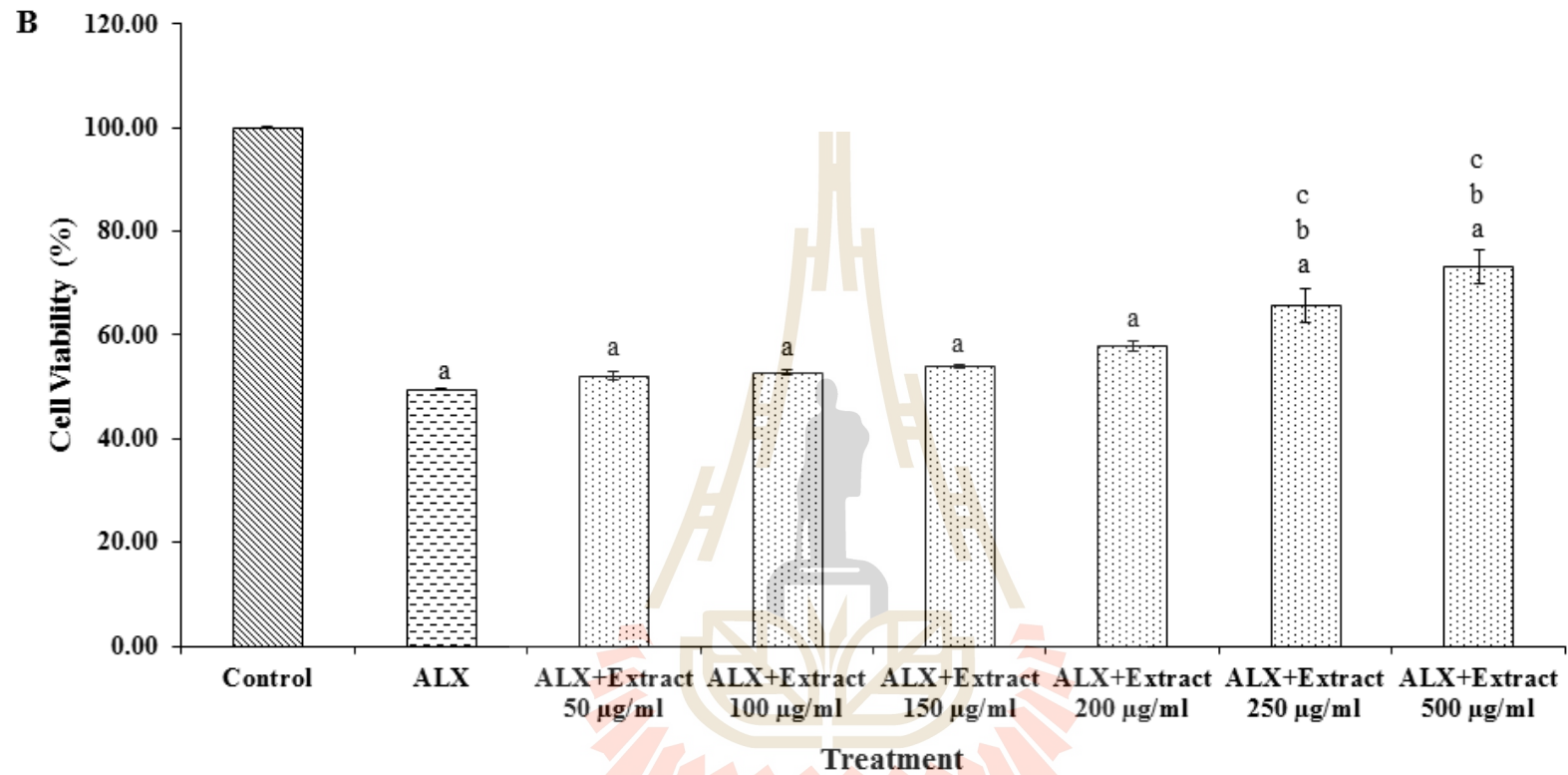


รูปที่ 4.2ฤทธิ์ปกป้องของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือก่อนการทำลายเซลล์ RINm5F ด้วยสาร alloxan เซลล์ถูกบ่มด้วยสารสกัดเป็นเวลา 23 ชั่วโมงก่อนการสัมผัสกับสาร alloxan เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ค่าที่แสดงในกราฟคือ mean \pm S.E.M. (n = 3)

^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม,

^b $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่ม alloxan

^c $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดถัดไปที่ต่ำกว่า



รูปที่ 4.3 ฤทธิ์ปกป้องของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือภายหลังจากทำลายเซลล์ RINm5F ด้วยสาร alloxan เซลล์ถูกบ่มด้วย alloxan เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนได้รับสารสกัดต่อเป็นเวลา 23 ชั่วโมง ก่อนนำไปวิเคราะห์การอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT ค่าที่แสดงในกราฟคือ mean \pm S.E.M. (n = 3).

^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม,

^b $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่ม alloxan

^c $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดถัดไปที่ต่ำกว่า

อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการปกป้องจะลดลงเล็กน้อยหากเซลล์ได้รับสารสกัดหลังจากที่ได้มีการสัมผัสกับ alloxan แล้ว โดยจะเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์จาก $52.11 \pm 0.23\%$ เป็น 73.25% (รูปที่ 4.3)

4.6 พิษเฉียบพลันของสารสกัด

การให้สารสกัดโดยการกินครั้งเดียวในขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรมต่อหนูขาวทั้งสองเพศ สัตว์ทดลองมีน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นในอัตราที่ปกติดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 4.3 เมื่อสิ้นสุดการทดลองในวันที่ 14 ไม่พบการตายของสัตว์ทดลองในทุกกลุ่ม และไม่พบว่ามีอวัยวะภายในอวัยวะใดของสัตว์ทดลองเกิดความผิดปกติขึ้นจากการสังเกตด้วยตา ดังนั้นขนาดที่ทำให้สัตว์ทดลองตายครั้งหนึ่ง (LD_{50}) จะมีขนาดสูงกว่า 2000 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้

4.7 พิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัด

เมื่อให้สัตว์ทดลองได้รับสารสกัดในขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg เป็นเวลานาน 42 วัน ไม่พบความผิดปกติเกินกว่าค่าปกติที่มีรายงานไว้ ไม่ว่าจะเป็นน้ำหนักตัว น้ำหนักอวัยวะภายใน ค่าเม็ดเลือด และตัวชี้วัดต่างๆ ทางชีวเคมี ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.4-4.10 นอกจากนั้นเมื่อตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะของตับและไตก็ไม่พบความผิดปกติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังรูปที่ 4.4-4.7

4.7 ฤทธิ์ต้านเบาหวานในสัตว์ทดลอง

4.7.1 ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักตัวและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักตัวของหนูปกติเพิ่มขึ้นเป็นปกติเมื่อเวลาผ่านไป ส่วนหนูที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวานด้วย alloxan และไม่ได้รับยาใดๆ จะมีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่หนูกลุ่มได้รับสารสกัด (250 mg/kg) และกลุ่มที่ได้รับยาต้านเบาหวาน glibenclamide (20 mg/kg) มีน้ำหนักมากกว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับสารใดๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 4.11 นอกจากนั้นทั้งสารสกัดและยา glibenclamide สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เป็นเบาหวาน

4.7.2 ผลของสารสกัดต่อตัวชี้วัดต่างๆ ทางชีวเคมี

ผลของสารสกัดต่อค่าตัวชี้วัดทางชีวเคมีของสัตว์ทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.12 จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ตับ AST และ ALT ในหนูที่เป็นเบาหวานและไม่ได้รับยาจะมีระดับสูงขึ้น แต่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดและยา glibenclamide จะมีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตาราง 4.3 น้ำหนักหนูที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ ในการทดสอบพิษเฉียบพลัน

Treatment (mg/kg)	Body weight (g)		
	Day 1	Day 7	Day 14
<i>Male</i>			
0	220.00 ± 9.13	237.50 ± 8.54	260.00 ± 14.72
250	220.00 ± 2.50	230.00 ± 4.08	247.50 ± 2.50
500	222.50 ± 11.75	235.00 ± 10.21	255.00 ± 13.98
1000	232.50 ± 7.50	262.50 ± 10.31	270.00 ± 10.80
2000	227.50 ± 7.50	260.00 ± 9.31	270.00 ± 12.91
<i>Female</i>			
0	180.00 ± 5.77	192.50 ± 7.50	202.50 ± 6.29
250	187.50 ± 4.79	200.00 ± 7.07	202.50 ± 8.54
500	177.50 ± 2.50	192.50 ± 7.50	192.50 ± 7.50
1000	187.50 ± 7.50	200.00 ± 8.16	210.00 ± 7.07
2000	190.00 ± 5.77	202.50 ± 2.50	210.00 ± 4.08

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)

ตาราง 4.4 น้ำหนักหนูที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ ในการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรัง

Treatment (mg/kg)	Body weight (g)						
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28	Day 35	Day 42
<i>Male</i>							
0	220.00 ± 9.13	227.50 ± 12.5	275.00 ± 12.58	280.00 ± 14.72	302.50 ± 14.93	325.00 ± 15.54	347.50 ± 16.00
250	202.50 ± 4.79	227.50 ± 7.50	237.50 ± 8.53	280.00 ± 9.12	287.50 ± 11.08	282.50 ± 17.01	285.00 ± 15.54
500	217.50 ± 4.79	237.50 ± 4.78	250.00 ± 4.08	282.50 ± 6.29	297.50 ± 7.50	327.50 ± 13.15	325.00 ± 14.43
1000	207.50 ± 17.02	227.50 ± 17.01	242.50 ± 18.87	275.00 ± 18.48	300.00 ± 22.73	302.50 ± 22.86	305.00 ± 23.27
2000	205.00 ± 12.58	220.00 ± 7.07	232.50 ± 9.46	267.50 ± 11.81	282.50 ± 14.36	300.00 ± 21.21	302.50 ± 21.36
<i>Female</i>							
0	175.00 ± 2.89	190.00 ± 5.77	207.50 ± 4.78	212.50 ± 6.29	227.50 ± 4.78	237.50 ± 10.38	242.50 ± 7.50
250	175.00 ± 5.00	180.00 ± 4.08	192.50 ± 4.79	217.50 ± 4.79	222.50 ± 2.50	235.00 ± 5.00	235.00 ± 5.00
500	175.00 ± 5.00	182.50 ± 4.78	192.50 ± 4.79	212.50 ± 4.79	222.50 ± 4.79	227.50 ± 6.29	230.00 ± 7.07
1000	170.00 ± 9.13	182.50 ± 8.53	187.50 ± 7.50	207.50 ± 6.29	215.00 ± 5.00	227.50 ± 6.29	232.50 ± 8.53
2000	167.50 ± 4.79	177.50 ± 6.29	180.00 ± 5.77	202.50 ± 10.30	212.50 ± 10.31	227.50 ± 13.76	230.00 ± 14.72

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)

ตาราง 4.5 ค่าเลือด (Haematological parameter) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Parameters	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Male</i>					
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	9.15 \pm 0.21	9.55 \pm 0.11	8.56 \pm 0.24 ^b	8.82 \pm 0.28	8.80 \pm 0.16
HGB (g/dl)	17.75 \pm 0.25	17.50 \pm 0.29	16.50 \pm 0.50	17.25 \pm 0.63	16.75 \pm 0.25
HCT (%)	52.50 \pm 1.56	50.25 \pm 0.63	47.00 \pm 1.68	48.00 \pm 2.12	47.00 \pm 0.91
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.48 \pm 0.28	5.58 \pm 1.84	4.50 \pm 1.43	3.80 \pm 0.38	2.15 \pm 0.70
LYM (%)	83.50 \pm 2.96	75.50 \pm 5.72	85.00 \pm 2.48	85.50 \pm 1.66	82.50 \pm 5.12
MON (%)	3.25 \pm 2.02	3.25 \pm 1.11	2.75 \pm 1.44	2.75 \pm 0.85	2.00 \pm 1.00
EOS (%)	0.25 \pm 0.25	0.50 \pm 0.29	0.75 \pm 0.25	0.50 \pm 0.29	0.75 \pm 0.75
BAS (%)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	731.3 \pm 45.3	863.0 \pm 44.5	638.8 \pm 35.7	667.8 \pm 21.4	798.8 \pm 43.5
MCV (fl)	57.10 \pm 0.58	52.63 \pm 0.37 ^a	54.90 \pm 0.38 ^{a b}	54.30 \pm 0.86 ^a	53.45 \pm 0.43 ^a
MCH (pg)	19.25 \pm 0.24	18.35 \pm 0.10 ^a	19.40 \pm 0.14 ^b	19.18 \pm 0.18 ^b	19.03 \pm 0.11 ^b
MCHC (g/dl)	33.65 \pm 0.30	34.88 \pm 0.17 ^a	35.38 \pm 0.29 ^a	35.28 \pm 0.26 ^a	35.63 \pm 0.36 ^a

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ($n = 4$)

^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg

ตาราง 4.6 ค่าเลือด (Haematological parameter) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Parameters	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Female</i>					
RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	8.10 \pm 0.17	7.94 \pm 0.32	8.21 \pm 0.19	8.12 \pm 0.15	8.40 \pm 0.16
HGB (g/dl)	16.00 \pm 0.00	15.50 \pm 0.65	16.25 \pm 0.25	16.00 \pm 0.00	16.75 \pm 0.25
HCT (%)	45.50 \pm 0.65	43.25 \pm 2.10	44.00 \pm 0.71	44.50 \pm 0.87	45.00 \pm 0.82
WBC ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	1.33 \pm 0.25	5.18 \pm 2.26	1.08 \pm 0.40	1.35 \pm 0.35	1.58 \pm 0.11
LYM (%)	86.25 \pm 0.95	87.50 \pm 3.40	76.25 \pm 4.63	82.25 \pm 4.84	88.50 \pm 1.04
MON (%)	2.00 \pm 0.41	3.50 \pm 1.56	2.00 \pm 0.71	1.75 \pm 1.11	0.75 \pm 0.48
EOS (%)	2.25 \pm 0.85	1.00 \pm 1.00	5.50 \pm 4.27	3.50 \pm 2.22	1.50 \pm 0.29
BAS (%)	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00
PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	618.5 \pm 43.1	811.8 \pm 34.8 ^a	807.3 \pm 49.0 ^a	818.8 \pm 43.3 ^a	752.8 \pm 45.2 ^a
MCV (fl)	56.00 \pm 0.58	54.43 \pm 0.80	53.78 \pm 0.60	54.80 \pm 0.46	53.63 \pm 0.29
MCH (pg)	19.75 \pm 0.40	19.68 \pm 0.20	19.63 \pm 0.34	19.78 \pm 0.14	19.60 \pm 0.06
MCHC (g/dl)	35.28 \pm 0.55	36.10 \pm 0.27	36.50 \pm 0.27	36.08 \pm 0.27	36.55 \pm 0.25

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. (n = 4)

^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตาราง 4.7 ค่าทางชีวเคมี (Biochemical parameter) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Parameters	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Male</i>					
Glucose (mg/dl)	125.8 ± 10.4	114.3 ± 10.7	135.8 ± 5.1	114.0 ± 2.0	118.5 ± 4.3
Total cholesterol (mg/dl)	61.50 ± 2.60	52.75 ± 3.50	61.50 ± 4.52	44.50 ± 2.84	50.75 ± 5.82
Triglyceride (mg/dl)	80.75 ± 18.44	85.50 ± 6.61	81.75 ± 13.83	76.75 ± 6.16	93.75 ± 23.02
Creatinine (mg/dl)	0.78 ± 0.09	0.65 ± 0.03	0.69 ± 0.04	0.68 ± 0.01	0.67 ± 0.04
AST (U/l)	96.25 ± 7.39	96.00 ± 6.49	99.00 ± 9.46	95.00 ± 10.98	98.00 ± 8.37
ALT (U/l)	32.75 ± 4.27	28.25 ± 3.64	33.25 ± 2.93	25.50 ± 2.72	29.25 ± 3.09

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)

ตาราง 4.8 ค่าทางชีวเคมี (Biochemical parameter) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Parameters	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Female</i>					
Glucose (mg/dl)	101.0 ± 8.2	91.00 ± 2.1	104.5 ± 7.0	101.8 ± 7.0	83.75 ± 4.4
Total cholesterol (mg/dl)	53.00 ± 2.80	45.50 ± 3.20	45.75 ± 4.64	44.25 ± 1.49	42.25 ± 5.47
Triglyceride (mg/dl)	40.50 ± 10.21	47.25 ± 3.50	52.25 ± 14.63	35.75 ± 2.87	47.75 ± 7.12
Creatinine (mg/dl)	0.74 ± 0.06	0.83 ± 0.06	0.73 ± 0.04	0.74 ± 0.07	0.76 ± 0.02
AST (U/l)	93.75 ± 6.21	86.00 ± 5.87	88.00 ± 7.36	75.00 ± 5.45	86.00 ± 4.06
ALT (U/l)	24.25 ± 2.50	35.25 ± 13.33	23.75 ± 1.55	19.25 ± 0.48	23.00 ± 1.47

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)

ตาราง 4.9 น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน (Relative organ weight) ของหนูเพศผู้ที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Organs	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Male</i>					
Heart	0.26 ± 0.00	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Lung	0.43 ± 0.04	0.42 ± 0.01	0.46 ± 0.07	0.50 ± 0.03	0.44 ± 0.02
Liver	2.62 ± 0.10	2.84 ± 0.02	2.77 ± 0.12	2.75 ± 0.11	2.63 ± 0.04
Left kidney	0.27 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.02	0.28 ± 0.01	0.26 ± 0.01
Right kidney	0.28 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.30 ± 0.02	0.29 ± 0.01	0.28 ± 0.02
Spleen	0.17 ± 0.01	0.17 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.16 ± 0.02
Left testes	0.46 ± 0.01	0.53 ± 0.03	0.51 ± 0.01	0.54 ± 0.03	0.50 ± 0.04
Right testes	0.46 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.54 ± 0.02	0.53 ± 0.02	0.49 ± 0.03

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

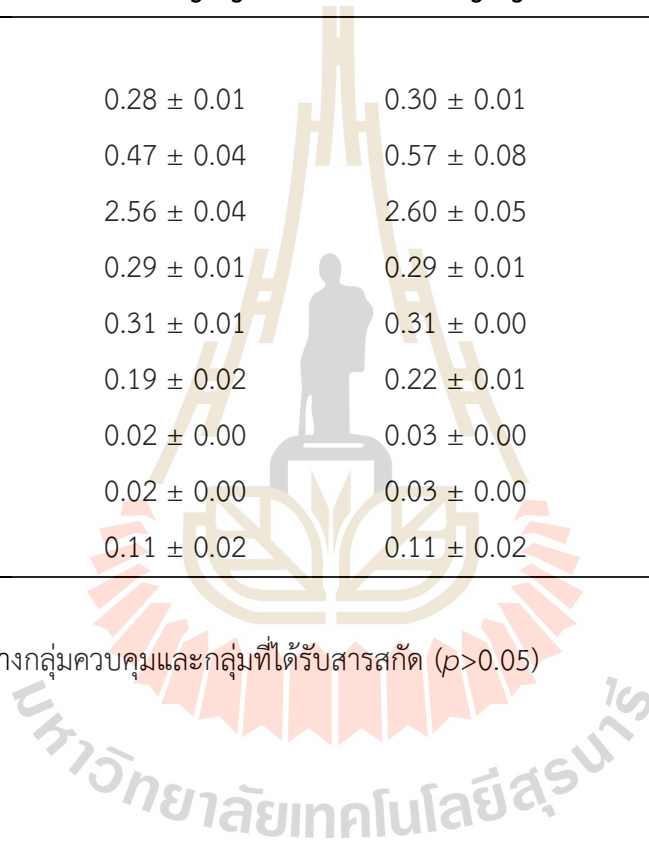
ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)

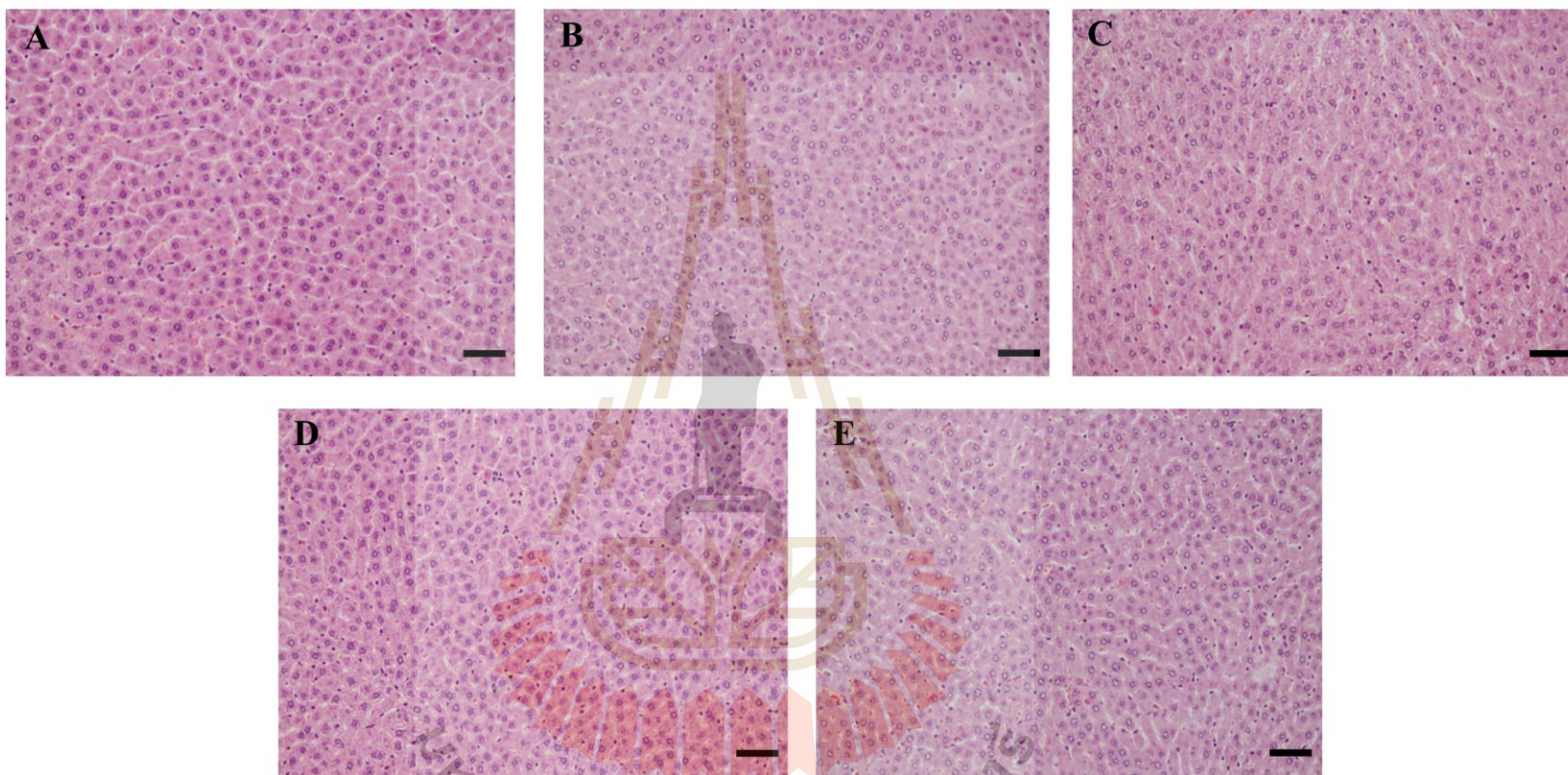
ตาราง 4.10 น้ำหนักสัมพัทธ์ของอวัยวะภายใน (Relative organ weight) ของหนูเพศเมียที่ได้รับสารสกัดที่ขนาดต่างๆ เป็นเวลา 42 วัน

Organs	Control	Treatment			
		250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	2000 mg/kg
<i>Female</i>					
Heart	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01	0.30 ± 0.01	0.28 ± 0.00	0.29 ± 0.01
Lung	0.44 ± 0.02	0.47 ± 0.04	0.57 ± 0.08	0.40 ± 0.03	0.55 ± 0.06
Liver	2.41 ± 0.09	2.56 ± 0.04	2.60 ± 0.05	2.46 ± 0.04	2.38 ± 0.08
Left kidney	0.27 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.29 ± 0.01	0.27 ± 0.01	0.28 ± 0.01
Right kidney	0.29 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.31 ± 0.00	0.28 ± 0.01	0.29 ± 0.02
Spleen	0.24 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.02	0.20 ± 0.01
Left ovary	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Right ovary	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Uterus	0.13 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.01

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 4)

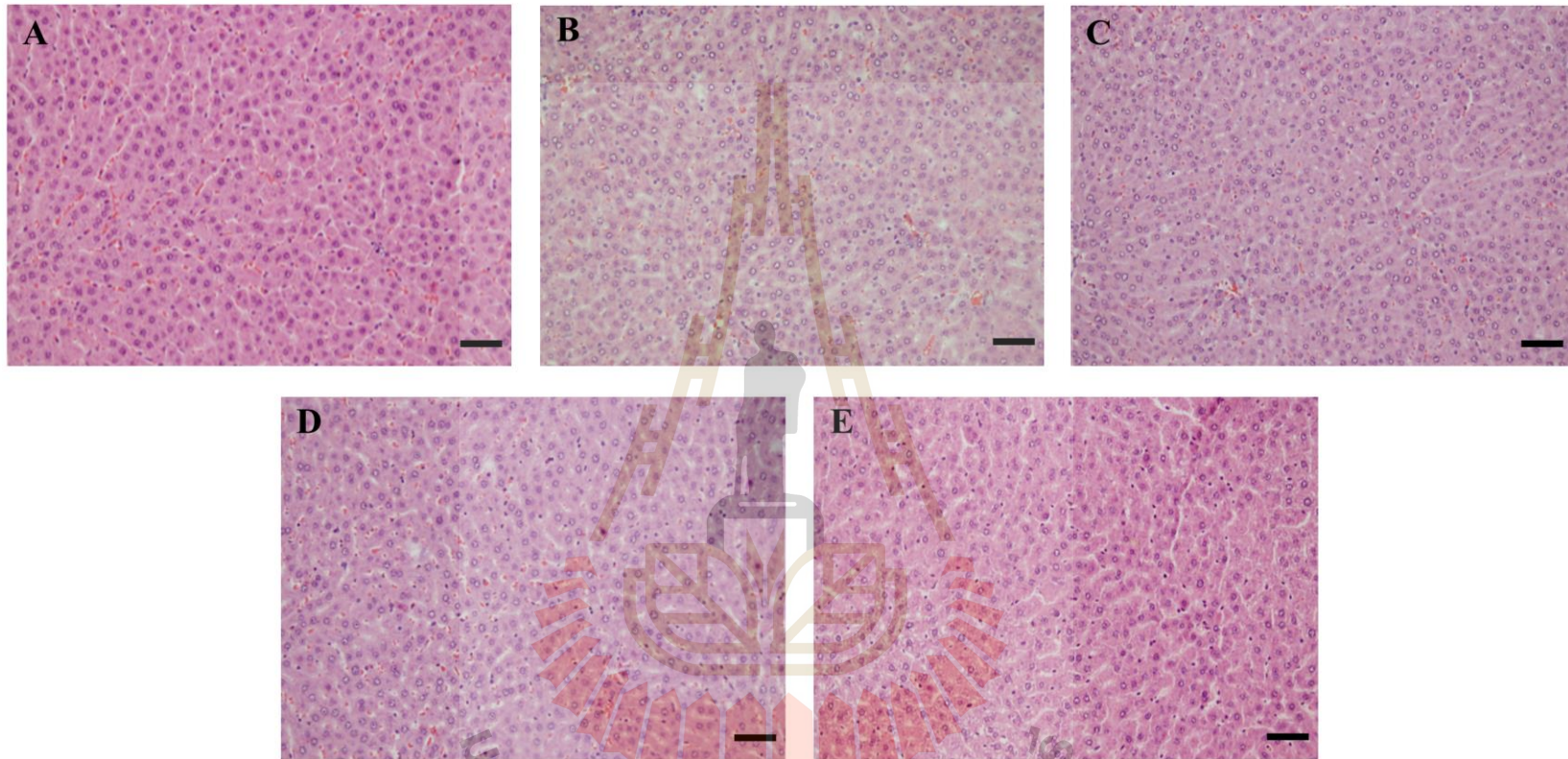
ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารสกัด ($p > 0.05$)





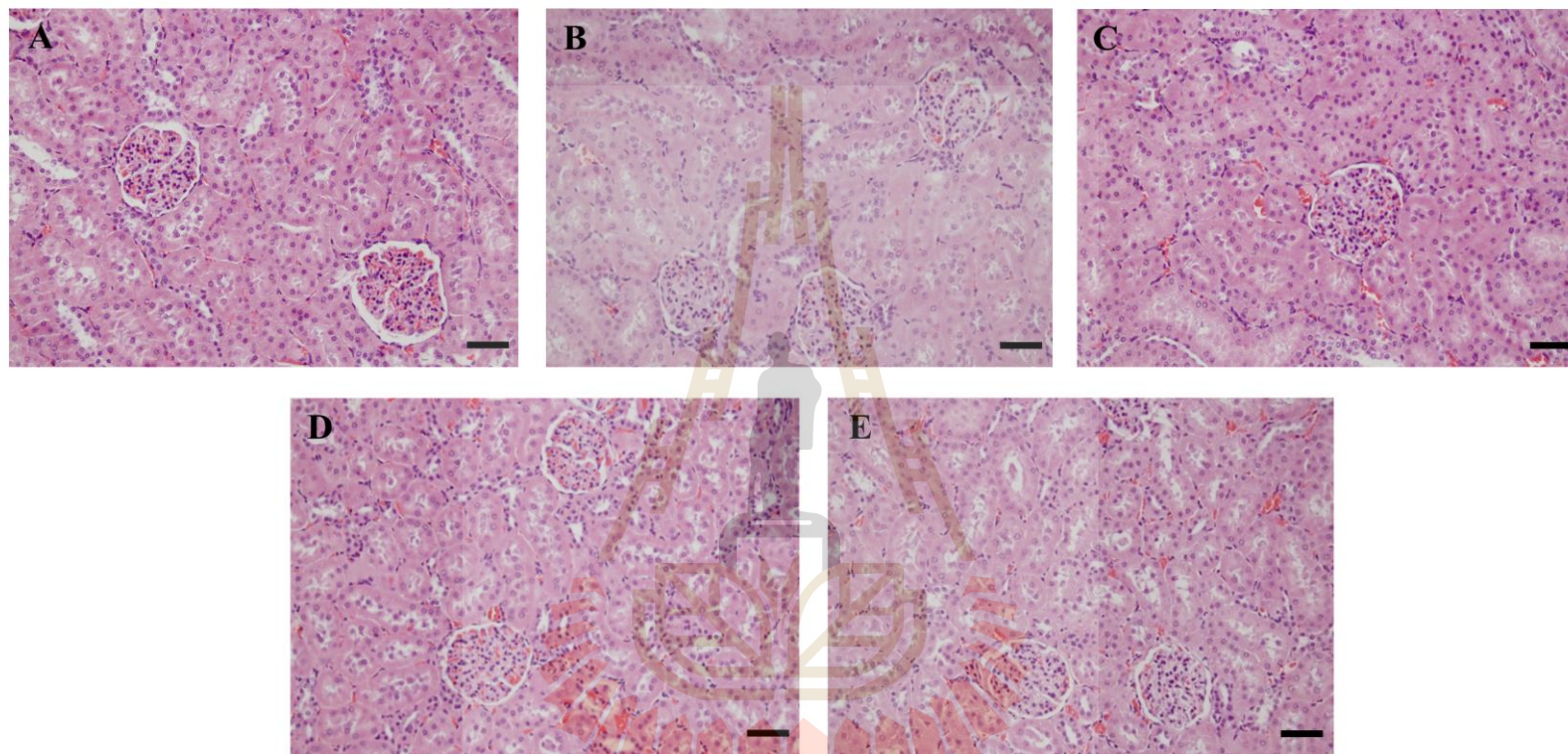
Bar = 50 μ m

รูปที่ 4.4 รูปถ่ายตัดขวางของหนูเพศผู้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด รูป A คือ กลุ่มควบคุม ส่วน B - E คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ตามลำดับ slide ย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin staining กำลังขยาย 200 เท่า



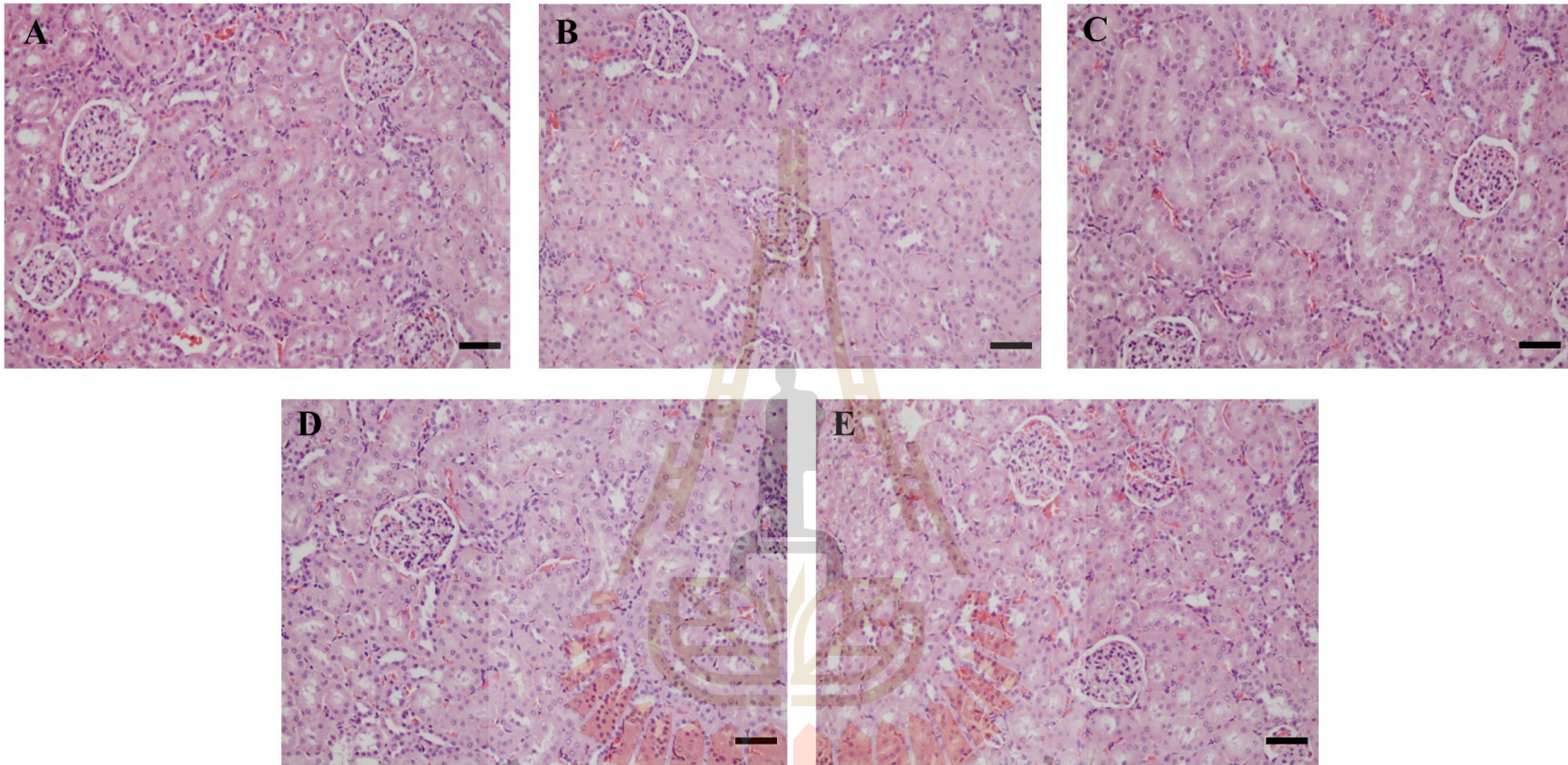
Bar = 50 µm

รูปที่ 4.5 รูปถ่ายตัดของหนูเพศเมียจากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด รูป A คือ กลุ่มควบคุม ส่วน B – E คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ตามลำดับ slide ย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin staining กำลังขยาย 200 เท่า



Bar = 50 μ m

รูปที่ 4.6 รูปถ่ายไตของหนูเพศผู้จากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด รูป A คือ กลุ่มควบคุม ส่วน B – E คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ตามลำดับ slide ย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin staining กำลังขยาย 200 เท่า



Bar = 50 μ m

รูปที่ 4.7 รูปถ่ายไตของหนูเพศเมียจากกล้องจุลทรรศน์ที่ได้รับสารสกัด รูป A คือ กลุ่มควบคุม ส่วน B – E คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ตามลำดับ slide ย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin staining กำลังขยาย 200 เท่า

ตาราง 4.11 ผลของสารสกัดต่อน้ำหนักหนูและระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหาร (fasting blood glucose)

Treatment	Body weight (g)		Blood glucose levels (mg/dl)			
	Initial	Final	0 day	5 day	10 day	15 day
NC	234.00 ± 5.70	274.00 ± 10.37	82.80 ± 2.79	79.00 ± 3.48	82.80 ± 1.51	81.20 ± 2.27
DM	230.00 ± 3.53	190.00 ± 10.00 ^a	335.80 ± 3.13	346.20 ± 3.41 ^a	355.40 ± 4.08 ^a	406.60 ± 12.90 ^a
DM+Extract	230.00 ± 9.35	222.00 ± 12.45 ^{a, b}	332.60 ± 12.94	275.20 ± 14.53 ^{a, b}	240.40 ± 10.01 ^{a, b}	172.80 ± 6.57 ^{a, b}
DM+Glib	225.00 ± 7.50	230.00 ± 6.12 ^{a, b}	336.00 ± 7.17	263.00 ± 18.07 ^{a, b}	220.80 ± 17.84 ^{a, b}	126.20 ± 5.95 ^{a, b}

NC, หนูปกติที่ได้รับน้ำกลั่น; DM, หนูเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่น; DM + Extract, หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg; DM + Glib, หนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 20 mg/kg

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 5)

^a p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มหนูปกติที่ได้รับน้ำกลั่น

^b p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่น

ตาราง 4.12 ผลของสารสกัดต่อค่าทางชีวเคมี (Biochemical parameter)

Treatment	Liver enzymes	
	AST (U/l)	ALT (U/l)
NC	75.00 ± 1.77	28.60 ± 1.48
DM	309.00 ± 73.20 ^{a, b}	65.60 ± 24.45 ^{a, b}
DM + Extract	119.40 ± 4.08 ^{a, b}	37.60 ± 4.62 ^{a, b}
DM + Glib	122.80 ± 5.04 ^{a, b}	37.40 ± 5.04 ^{a, b}

NC, หนูปกติที่ได้รับน้ำกลั่น; DM, หนูเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่น; DM + Extract, หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 mg/kg; DM + Glib, หนูเบาหวานที่ได้รับยา glibenclamide ขนาด 20 mg/kg

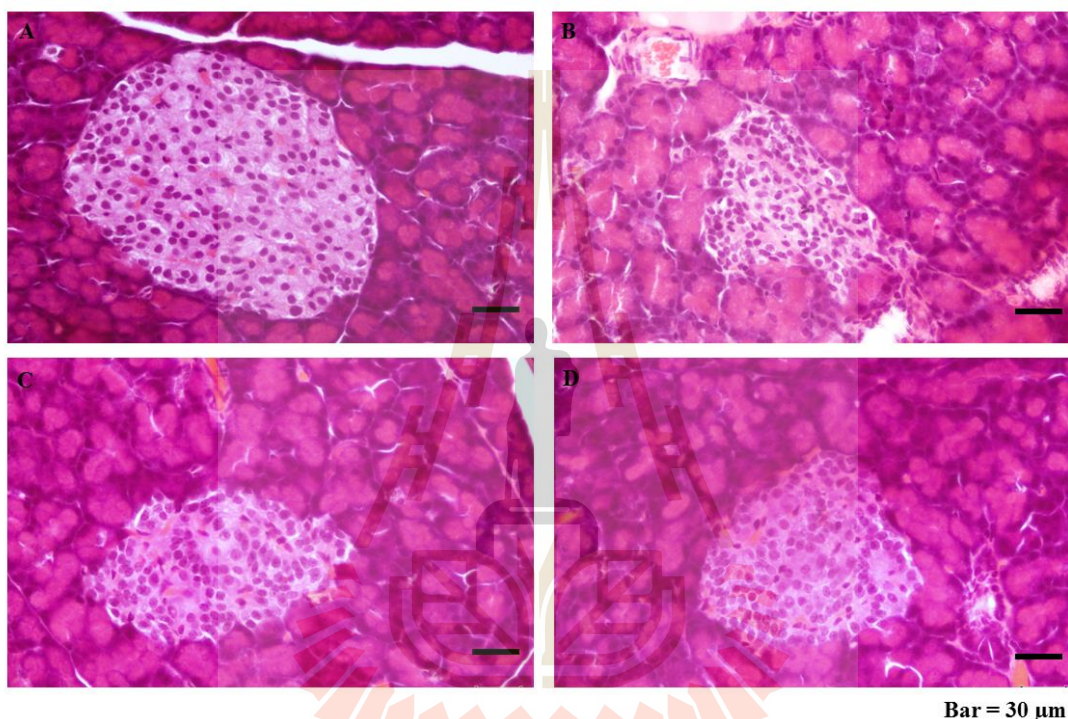
ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 5)

^a p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มหนูปกติที่ได้รับน้ำกลั่น

^b p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำกลั่น

4.7.3 ฤทธิ์ปกป้องตับอ่อนของสารสกัด

เมื่อทำการตรวจสอบทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าพื้นที่ของ islets of Langerhans ในหนูกลุ่มที่เป็นเบาหวานและไม่ได้รับยาจะมีขนาดเล็กลงอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.8B) เมื่อเทียบกับหนูปกติ (รูปที่ 4.8A) จากรูปที่ 4.8C และ 4.8D จะเห็นได้ว่าการเสียหายของ islets of Langerhans จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อได้รับสารสกัดและยา glibenclamide ตามลำดับ สังเกตได้จากขนาดที่ใหญ่ขึ้นและรูปร่างที่คล้ายกับภาวะปกติมากขึ้น



รูปที่ 4.8 รูปถ่ายตับอ่อนของหนูทดลอง ภาพ A เป็นภาพของ islets of Langerhans จากหนูปกติ ขณะที่ภาพ B ถ่ายมาจากกลุ่มหนูเบาหวานที่ไม่ได้ยาใดๆ ส่วนภาพ C และ D ได้จากตับอ่อนของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดและยา glibenclamide ตามลำดับ slide ย้อมด้วยวิธี Hematoxylin and eosin staining กำลังขยาย 400 เท่า

4.8 ฤทธิ์ลดน้ำตาลของสารสกัดทำในหลอดทดลอง

4.8.1 ผลของสารสกัดต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคส

การตรวจสอบผลของสารสกัดต่อการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสทำโดยใช้ลำไส้ที่กลับเอาด้านในออก ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 4.13 ลำไส้ที่บ่มด้วยสารสกัดและ NaF ซึ่งใช้เป็นสารมาตรฐานในกลุ่ม

ตาราง 4.13ฤทธิ์ต้านการดูดซึมกลูโคสของสารสกัด

Treatment	Glucose concentration inside the sacs (mg/dl)	% Inhibition
Control	306.84 ± 4.89	0.00 ± 0.00
Extract 0.25 mg/ml	283.47 ± 6.84 ^a	7.65 ± 0.88 ^a
Extract 0.5 mg/ml	269.65 ± 3.73 ^{a, b}	12.1 ± 1.01 ^{a, b}
Extract 2.5 mg/ml	225.63 ± 7.11 ^{a, b}	26.4 ± 2.26 ^{a, b}
NaF 0.2 M	188.02 ± 2.38 ^a	38.7 ± 0.71 ^a

ค่าที่แสดงคือ mean ± S.E.M. (n = 5)

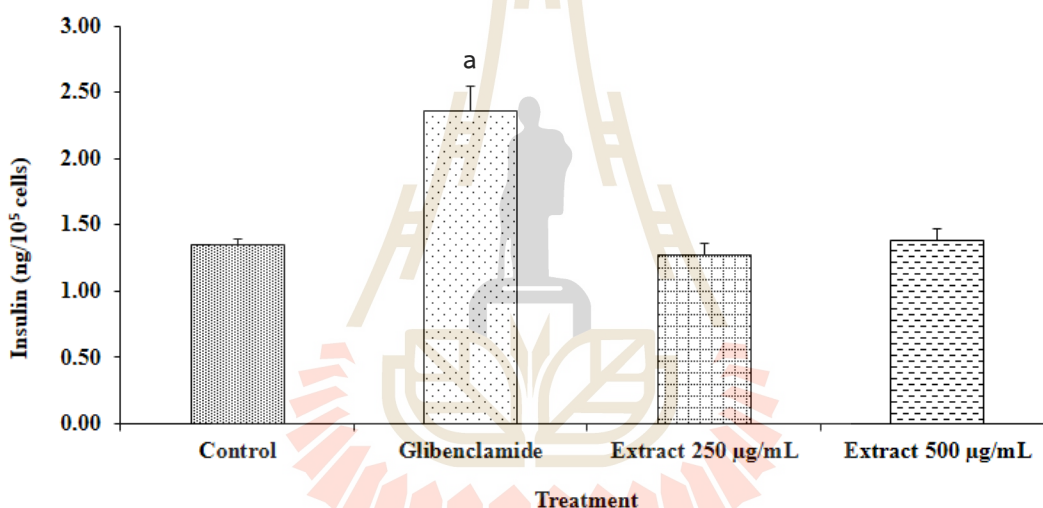
^a p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม

^b p<0.05 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสารสกัดในขนาดถัดไปที่ต่ำกว่า

ควบคุม (positive control) มีการดูดซึมกลูโคสลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ฤทธิ์ยับยั้งการดูดซึมกลูโคสของสารสกัดเป็นไปแบบที่ขึ้นกับขนาดยา (dose-dependent) โดยฤทธิ์จะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มขนาดยาให้สูงขึ้น

4.8.1 ผลของสารสกัดต่อการหลั่งอินซูลิน

ผลของสารสกัดที่ไปกระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากเซลล์ RINm5F แสดงไว้ในรูป 4.9 ยา glibenclamide ซึ่งเป็นที่ทราบว่ามีการออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินจากบีต้าเซลล์ของตับอ่อน ทำให้ความเข้มข้นของอินซูลินในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มขึ้นจาก 1.35 ± 0.04 ng/ 10^5 cells (กลุ่มควบคุม) เป็น 2.36 ± 0.15 ng/ 10^5 cells ขณะที่เซลล์ที่ได้รับสารสกัดขนาด 250 and 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่สามารถกระตุ้นให้มีการหลั่งอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 4.9 ผลของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือต่อการหลั่งอินซูลินเซลล์ RINm5F

ค่าที่แสดงคือ mean \pm S.E.M. ($n = 3$)

^a $p < 0.05$ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สารกลุ่มฟีนอลิกเป็นสารทุติยภูมิ (secondary metabolite) ที่พบหลากหลายในพืช โดยที่สารเหล่านี้อาจเป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลิตรงควัตถุ เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ ความต้านทานต่อเชื้อโรค และหน้าที่อื่นๆ ของพืช (Lattanzio et al., 2006) สารกลุ่มฟีนอลิกจึงได้รับความสนใจในแง่ของประโยชน์ที่มีต่อสุขภาพของมนุษย์จากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในโมเลกุล (Imeh and Khokhar, 2002; Parr and Bolwell, 2000) เป็นที่ยอมรับกันอย่างกว้างขวางว่าพืชเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญในการรักษาโรคมะเร็ง มีหลักฐานชี้ชัดว่าสารกลุ่มฟีนอลิกของพืชนี้ให้ผลป้องกันการเกิดโรคไม่ติดต่อได้หลายโรค รวมทั้งโรคความดันโลหิตสูงและโรคเบาหวาน (Randhir et al., 2008) มีการค้นพบความสัมพันธ์ระหว่างสารกลุ่มฟีนอลิกของพืชกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (Velioglu et al., 1998) ในการศึกษาได้นำวิธี Folin-Ciocalteu มาใช้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารกลุ่มฟีนอลิก (total phenolic content) ที่มีอยู่ในสารสกัดน้ำจากต้นชะเอมเหนือ วิธีนี้มีหลักการที่ว่าสารกลุ่มฟีนอลิกสามารถส่งผ่านอิเล็กตรอนไปยังโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อนของกรด phosphomolybdic และ phosphotungstic ได้ แล้วผลิตสารประกอบเชิงซ้อนสีฟ้าเกิดความเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติในการดูดกลืนแสงได้ที่ 750 nm (Magalhães et al., 2008) หลังการตรวจวิเคราะห์พบว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือที่ได้มีสารประกอบฟีนอลิกอยู่ 78.84 ± 0.01 mg GAE/g

สารกลุ่มฟลาโวนอยด์จัดเป็นกลุ่มหนึ่งในสารประกอบกลุ่มฟีนอลิก มีการศึกษาหลายการศึกษา รายงานว่าสารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Quezada et al., 2004) โดยหมู่ hydroxyl ในโมเลกุลของฟลาโวนอยด์ออกฤทธิ์ยับยั้งหรือขัดขวางการกำจัดอนุมูลอิสระ (Kiranmai et al., 2011) ในการศึกษาได้ทำการตรวจสอบปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ (total flavonoid content) ด้วยวิธี aluminium chloride colorimetry โดยใช้หลักการที่ว่า aluminum chloride จะเกิดสารประกอบ keto ที่คงตัวที่หมู่ hydroxyl ที่ตำแหน่ง C-3, C-4 หรือ C-5 ของฟลาโวนหรือฟลาโวนอล นอกจากนั้นยังสามารถทำให้เกิดสารประกอบเชิงซ้อนกับหมู่ orthodihydroxyl ในวงแหวน A- หรือ B-ring ของฟลาโวนอยด์ (Chang et al., 2002) ผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าปริมาณสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดมีค่า 54.72 ± 1.81 mg catechin/g

จะเห็นได้ว่าในปัจจุบันฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของพืชนั้นได้รับความสนใจมาก มีหลักฐานแสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบด้วยวิธีในหลอดทดลองสอดคล้องกับผลที่ได้ในสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามควรจะใช้วิธีตรวจสอบวิธีที่มีหลักการวัดการส่งผ่านอะตอมของไฮโดรเจนควบคู่ไปกับการวัดการส่งผ่านอิเล็กตรอน จะ

แปรผลได้ถูกต้องตามจริงมากกว่า (Sacchetti et al., 2005) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกัน 3 วิธี คือ วิธีแรกที่ใช้คือการใช้ ABTS เป็นสารอนุมูลอิสระเพื่อให้เกิดการส่งผ่านอะตอมของไฮโดรเจนของสารที่ต้องการตรวจวัดไปยัง ABTS แล้วเปลี่ยนเป็นสารประกอบที่มีความคงตัวและดูดกลืนแสงได้ที่ 734 nm (Tachakittirungrod et al., 2007) ที่ความยาวคลื่นนี้จะมีการรบกวนจากสารประกอบอื่นค่อนข้างน้อย (Magalhães et al., 2008)

วิธีที่สองที่ใช้คือสาร DPPH ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดวิธีหนึ่งในการตรวจหาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของตัวอย่างที่ได้จากพืช (Ali et al., 2008) DPPH เป็นอนุมูลอิสระที่คงตัว สารสีม่วงนี้จะเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระในตัวอย่างที่นำมาทดสอบ หลังทำปฏิกิริยากับสารต้านอนุมูลอิสระ DPPH จะถูกเปลี่ยนไปเป็น 2,2-diphenyl-1-hydrazine หรืออนุพันธ์ของ hydrazine ซึ่งจะทำการดูดกลืนแสงที่ 517 nm ลดลง (Tepe et al., 2011)

วิธีที่สามที่ใช้ในการวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดคือวิธี Ferric reducing antioxidant power (FRAP) ซึ่งใช้หลักการในการทำปฏิกิริยา reduction ของสารสกัดกับสารประกอบ ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) เกิดสีน้ำเงินของ ferrous ซึ่งตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 593 nm (Benzie and Strain, 1996) สารต้านอนุมูลอิสระจะทำหน้าที่เป็นตัวส่งอิเล็กตรอนให้กับอนุมูลอิสระเกิดสารประกอบที่คงตัวขึ้น (Tachakittirungrod et al., 2007)

จากผลการศึกษาค้นพบว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือขนาด 2400 $\mu\text{g/ml}$ ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 93.71% เมื่อใช้วิธี ABTS และสารสกัดในขนาด 1200 $\mu\text{g/ml}$ ให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูงสุดที่ 88.36 % เมื่อใช้วิธี DPPH โดยค่า IC_{50} ที่คำนวณได้ คือ 515.05 ± 0.13 และ 239.85 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่า Ferric reducing power อยู่ที่ 0.23 ± 0.05 $\mu\text{mol Fe}^{2+}/\text{mg}$ ของสารสกัด

โดยปกติฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากการทำในหลอดทดลองอาจจะไม่สอดคล้องกับผลที่ได้ในสิ่งมีชีวิต เพื่อให้แน่ใจว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือสามารถให้ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตได้จริง ผู้วิจัยจึงได้ตรวจสอบถึงฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ของตับอ่อน RINm5F จากการทำลายด้วยสาร alloxan ทั้งก่อนและหลังการได้รับสาร พบว่าสารสกัดสามารถปกป้องการทำลายให้อนุมูลอิสระในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงนำสารสกัดไปทดสอบฤทธิ์ในสัตว์ทดลองต่อไป

เพื่อให้แน่ใจว่าสารสกัดจะสามารถนำมาใช้ในการรักษาโรคได้ จำเป็นจะต้องทราบถึงข้อมูลในด้านความปลอดภัย ดังนั้นก่อนที่จะได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวานในสัตว์ทดลอง ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบพิษที่อาจเกิดขึ้นจากสารสกัดในหนูปกติก่อน การทดสอบความปลอดภัยอันดับแรกคือการทำ การทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน หนูปกติทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับการป้อนสารในขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg ไม่แสดงให้เห็นว่าเกิดความเป็นพิษใดๆ หลังจากการสังเกตเป็นเวลา 14

วัน เนื่องจากไม่มีหนูที่ได้รับสารกลุ่มไตตายเลย ไม่สามารถระบุขนาดที่ทำให้หนูตาย 50% (LD₅₀) ได้ จึงสรุปว่าสารสกัดสามารถถูกจัดเข้าอยู่ในประเภท 5 คือมีความเป็นพิษต่ำหรือไม่มีพิษตามหลักเกณฑ์ขององค์การ OECD (2001)

เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังซึ่งจำเป็นต้องได้รับการรักษาแบบยาวนาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดเพื่อเป็นข้อมูลในการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต หลังจากหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสารสกัดในขนาด 250, 500, 1000 และ 2000 mg/kg เป็นเวลา 42 วัน ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและการเจริญเติบโต รวมทั้งพฤติกรรมต่างๆ ของหนูเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ตรวจสอบน้ำหนักของอวัยวะภายในซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นตัวชี้วัดที่ไวต่อความเป็นพิษของสารเคมีที่เข้าสู่ร่างกาย (Michael et al., 2007) พบว่าไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงนอกจากนั้นจำนวนเม็ดเลือดชนิดต่างๆ และค่าทางชีวเคมีส่วนใหญ่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ถึงแม้ว่าจะมีค่าบางค่าที่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ค่าที่เปลี่ยนแปลงไปทุกค่ายังคงอยู่ในระดับปกติที่เคยมีรายงานมาแล้ว สรุปได้ว่าสารสกัดไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์ทดลองเมื่อได้รับสารแบบกึ่งเรื้อรังเป็นเวลานาน 42 วัน

หลังจากทดสอบความเป็นพิษแล้ว จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเบาหวานของสารสกัดโดยใช้หนูเบาหวานที่ชักนำด้วยสาร alloxan ขนาดของสาร alloxan ที่ปรากฏในการวิจัยต่างๆ ก่อนข้างมีความหลากหลาย ขนาดที่ต่างกันจะชักนำให้ระดับน้ำตาลที่สูงขึ้นผิดปกติแตกต่างกันออกไป (Rathi et al., 2001) หนูที่ได้รับสาร alloxan แล้วมีระดับน้ำตาลในเลือดหลังอดอาหารระหว่าง 150 และ 250 mg/dl จะถูกพิจารณาว่าเป็นเบาหวานแบบไม่รุนแรง ขณะที่หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 mg/dl ที่ถูกจัดว่าเป็นเบาหวานที่รุนแรง (Gupta et al., 2009) สาร alloxan เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเลียนแบบน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นถึงถูกนำเข้าสู่เซลล์ผ่านทางโปรตีน glucose transporter 2 (GLUT2) เมื่อเข้าสู่ปีศาจเซลล์แล้วจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของตับอ่อนโดยการปล่อย สารอนุมูลอิสระ ได้แก่ reactive oxygen species (ROS) ออกมาทำให้เซลล์ตาย (Lenzen, 2008; Szkudelski, 2001) เมื่อปีศาจเซลล์ของตับอ่อนถูกทำลาย การปล่อยอินซูลินเข้าสู่กระแสเลือดจึงน้อยลง ทำให้สัตว์ทดลองไม่สามารถนำกลูโคสในเลือดไปใช้ได้เหมาะสม เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น ทำให้เกิดความผิดปกติของเมทาโบลิซึม เกิดการสลายโปรตีนและไขมันที่สะสมไว้มาใช้แทน กล้ามเนื้อลีบ น้ำหนักลด (Kasetti et al., 2010; Shabeer, et al., 2009) ในการศึกษาหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเบาหวานเมื่อได้รับสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุม ควบคู่ไปกับน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น หนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดยังมีระดับน้ำตาลกลูโคสหลังอดอาหารที่ลดลง เทียบเท่ากับกลุ่มที่ได้รับยา glibenclamide ผลการทดลองชี้แนะว่าน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นน่าจะเกิดจากการที่

สารสกัดไปทำให้สัตว์ทดลองสามารถควบคุมการใช้น้ำตาลในร่างกายได้ดีขึ้น ทำให้สามารถสร้างโปรตีนที่จำเป็นสำหรับร่างกายได้อย่างปกติมากขึ้น (Eliza et al., 2009)

เมื่อทำการตรวจสอบตับอ่อนของหนูด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสี hematoxylin/eosin พบว่าหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับยาใดๆ นั้นจะมีการทำลายโครงสร้าง islet of Langerhan ในตับอ่อน สังเกตได้จากรูปร่างที่หดเล็กและผิดปกติ ในขณะที่ตับอ่อนของหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดและยา glibenclamide จะมีการทำลายน้อยลง การกลับคืนสภาพของเซลล์ใน islet of Langerhan หลังการถูกทำลายด้วย alloxan เมื่อหนูได้รับยา glibenclamide ที่สังเกตได้จากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาที่เคยรายงานมาแล้วโดย Venkatesh และคณะ (2010) แต่ไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด อย่างไรก็ตามผลของสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือในการคืนสภาพของเซลล์ที่ถูกทำลายด้วย alloxan อาจเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัด ดังที่เคยมีผู้เสนอแนะไว้ในการศึกษาฤทธิ์ต้านเบาหวานของใบลูกชืด (*Trigonella foenumgraecum*) ก็เป็นไปได้ (Premanath et al., 2012)

ตับเป็นอวัยวะสำคัญของร่างกายเนื่องจากมีหน้าที่รับผิดชอบต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมมากมายหลายประการ รวมทั้งยังเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ในการกำจัดสารพิษอีกด้วย ในเซลล์ตับจึงประกอบด้วยเอนไซม์หลากหลาย แต่เอนไซม์ที่ใช้เป็นตัวชี้วัด (Biomarker) ต่อความสมบูรณ์หรือหน้าที่ของตับได้แก่ AST และ ALT (Ohaeri, 2001) ในการศึกษาที่ใช้โมเดลที่ชักนำหนูให้เกิดเบาหวานด้วยสารเคมีที่เป็นพิษซึ่งรวมถึงการใช้ alloxan ด้วย พบว่าสารเหล่านั้นจะชักนำให้เอนไซม์ AST และ ALT ในเลือดสูงขึ้น (Eliza et al., 2009; Ju et al., 2008) ในการศึกษาพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดมีระดับ AST และ ALT ลดลงเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับยา ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือมีฤทธิ์ในการปกป้องตับในสัตว์ทดลองได้เช่นเดียวกับการทดลองในเซลล์

ผลกระทบจากระดับน้ำตาลที่สูงกว่าปกติและลดลงช้าหลังรับประทานอาหารทำให้มีความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนเพิ่มมากขึ้น (Ceriello et al., 2002) แนวทางในการลดระดับน้ำตาลหลังรับประทานอาหารทำได้โดยการขัดขวางการดูดซึมคาร์โบไฮเดรตจากทางเดินอาหาร (Si et al., 2010) การทดสอบครั้งนี้มีการใช้ sodium fluoride (NaF) เป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบเมื่อทำการทดสอบการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากลำไส้ด้วยการใช้ลำไส้ส่วน jejunum กลับด้านในออก (Wilson and Wiseman, 1954) NaF ออกฤทธิ์โดยไปยับยั้งเอนไซม์ enolase ซึ่งจำเป็นใน glycolytic pathway ทำให้โมเลกุลของ ATP ลดลง ดังนั้นกระบวนการดูดซึมกลูโคสในลำไส้ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยโมเลกุลของ ATP จึงถูกขัดขวาง (Sanford et al., 1965; Gumińska and Sterkowicz, 1976) ในการศึกษาพบว่า เมื่อบ่มสารสกัดในขนาด 0.25, 0.5 and 2.5 mg/ml ทำให้เกิดการยับยั้งการดูดซึมกลูโคสได้เช่นเดียวกับ sodium fluoride ผลการทดลองที่ได้ชี้ให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดอย่าง

หนึ่งของสารสกัดคือการรบกวนการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสผ่านลำไส้ และอาจจะนำมาใช้ในผู้ป่วยที่มีปัญหาการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดหลังรับประทานอาหารได้

เซลล์ตับอ่อนของหนูขาว RINm5F ถูกนำมาใช้ในการศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อการหลั่งอินซูลินจากตับอ่อน ในการศึกษานี้ได้ทำการวัดความเข้มข้นของอินซูลินที่หลั่งออกจากเซลล์ชนิดนี้ด้วยวิธี enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) โดยใช้ยา glibenclamide ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินเป็น positive control เป็นที่ทราบกันว่ายาชนิดนี้ออกฤทธิ์โดยการปิดกั้น ATP-sensitive potassium channels บนเยื่อหุ้ม β -cell ของตับอ่อน ทำให้เซลล์เกิดภาวะ depolarization จึงทำให้เกิดการไหลเข้าของแคลเซียมผ่านทาง calcium channel ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้เกิดกระบวนการ exocytosis ของ insulin granule (Finkel et al., 2009) เซลล์ RINm5F cells ที่ได้รับ glibenclamide จึงมีระดับอินซูลินใน medium สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารใดๆ (รูปที่ 4.9) ในทางตรงข้าม พบว่าสารสกัดไม่มีฤทธิ์เพิ่มการหลั่งอินซูลินแต่อย่างใด ผลการทดลองนี้ชี้แนะว่าสารสกัดจากต้นชะเอมเหนือ อาจมีข้อดีในแง่ที่จะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำในผู้ป่วยน้อยกว่าการใช้ยาในกลุ่มที่กระตุ้นการหลั่งอินซูลิน

สรุป การศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากลำต้นชะเอมเหนือมีความเป็นพิษต่ำ และฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ชักนำให้เกิดโรคเบาหวานด้วยสาร alloxan ได้ โดยน่าจะไปปกป้องการทำลายเซลล์ของตับอ่อนและยับยั้งการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสจากทางเดินอาหาร การศึกษานี้ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อการใช้พืชนี้เป็นยารักษาโรคเบาหวานทางเลือก ก็ตามยังไม่สามารถบอกถึงสารออกฤทธิ์ในสารสกัดนี้ได้ การศึกษาวิธีการแยกสารประกอบให้บริสุทธิ์ออกมาทดสอบ เพื่อระบุชนิดของสารที่รับผิดชอบต่อฤทธิ์ต้านเบาหวานที่พบจากงานวิจัยนี้ จะมีประโยชน์ต่อการพัฒนายาใหม่ต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Aekplakorn, W., Abbott-Klafter, J., Premgamone, A., Dhanamun, B., Chaikittiporn, C., Chongsuivatwong, V., et al. (2007). Prevalence and management of diabetes and associated risk factors by regions of Thailand. *Diabetes Care*. 30: 2007-2012.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., et al. (2008). Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*. 41(1): 1-15.
- American Diabetes Association. (2010). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 33: S62-S69.
- Ayoola, G., Coker, H., Adesegun, S., Adepoju-Bello, A., Obaweya, K., Ezennia, E., et al. (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 7(3): 1019-1024.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*. 99(1): 191-203.
- Bangkok Herbarium. (2009). **Type specimens in Bangkok herbarium volume III : Guttiferae to Myrcinaceae**. Bangkok: Agricultural cooperatives association of Thailand, pp 61.
- Beardsall, K., Yuen, K., Williams, R., and Dunger, D. (2006). Applied physiology of glucose control. *Current Paediatrics*. 16(6): 434-438.
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239(1): 70-76.
- Bor, J.-Y., Chen, H.-Y., and Yen, G.-C. (2006). Evaluation of antioxidant activity and inhibitory effect on nitric oxide production of some common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5): 1680-1686.
- Ceriello, A., Taboga, C., Tonutti, L., Quagliaro, L., Piconi, L., and Bais, B. (2002). Evidence for an independent and cumulative effect of postprandial hypertriglyceridemia

- and hyperglycemia on endothelial dysfunction and oxidative stress generation: effects of short- and long-term simvastatin treatment. **Circulation**. 106(10): 1211-1218.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., and Chern, J.-C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**. 10: 178-182.
- Chew, Y.-L., Goh, J.-K., and Lim, Y.-Y. (2009). Assessment of *in vitro* antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. **Food Chemistry**. 116(1): 13-18.
- Chiu, H.-L., Wu, J.-H., Tung, Y.-T., Lee, T.-H., Chien, S.-C., and Kuo, Y.-H. (2008). Triterpenoids and Aromatics from *Derris laxiflora*. **Journal of Natural Products**. 71(11): 1829-1832.
- Chivapat, S., Chavalittumrong, P., Attawish, A., and Soonthornchareonnon, N. (2009). Toxicity study of lupinifolin from stem of *Derris reticulata* Craib. **Journal of Thai Traditional & Alternative Medicine**. 7(2-3): 146-155.
- Chotchoungchatchai, S., Saralamp, P., Jenjittikul, T., Pornsiripongse, S., and Prathanturarug, S. (2012). Medicinal plants used with Thai Traditional Medicine in modern healthcare services: A case study in Kabchoeng Hospital, Surin Province, Thailand. **Journal of Ethnopharmacology**. 141(1): 193-205.
- Clayton, B. D., Stock, Y. N., and Cooper, S. E. (2009). **Basic Pharmacology for Nurses**. 14th edition. Missouri: Mosby Elsevier, pp 550-583.
- Eliza, J., Daisy, P., Ignacimuthu, S., and Duraipandiyan, V. (2009). Antidiabetic and antilipidemic effect of eremanthin from *Costus speciosus* (Koen.)Sm., in STZ-induced diabetic rats. **Chemico-Biological Interactions**. 182(1): 67-72.
- Fatima, S. S., Rajasekhar, M. D., Kumar, K. V., Kumar, M. T. S., Babu, K. R., and Rao, C. A. (2010). Antidiabetic and antihyperlipidemic activity of ethyl acetate:isopropanol (1:1) fraction of *Vernonia anthelmintica* seeds in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**. 48(2): 495-501.
- Finkel, R., Clark, M. A., and Cubeddu, L. X. (2009). **Lippincott's Illustrated Review: Pharmacology**. 5th edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, pp 285-295.

- Fröde, T. S., and Medeiros, Y. S. (2008). Animal models to test drugs with potential antidiabetic activity. **Journal of Ethnopharmacology**. 115(2): 173-183.
- Genuth, S. M. (2008). Hormonal regulation of energy metabolism. *In* : B. M. Koeppen and B. A. Stanton (eds.). **Berne and Levi Physiology**. 6th edition. St. Louis: Mosby Elsevier, pp. 664-695.
- Goodman, H. M. (2003). The pancreatic islets. *In*: Byrne, J. H. (ed.) **Essential Medical Physiology**. 3rd edition. Amsterdam: Elsevier Academic Press, pp 637-656.
- Gumińska, M., and Sterkowicz, J. (1976). Effect of sodium fluoride on glycolysis in human erythrocytes and Ehrlich ascites tumour cells in vitro. **Acta Biochimica Polonica**. 23: 285-291.
- Gupta, S., Sharma, S. B., Bansal, S. K., and Prabhu, K. M. (2009). Antihyperglycemic and hypolipidemic activity of aqueous extract of *Cassia auriculata* L. leaves in experimental diabetes. **Journal of Ethnopharmacology**. 123(3): 499-503.
- Hazra, B., Biswas, S., and Mandal, N. (2008). Antioxidant and free radical scavenging activity of *Spondias pinnata*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**. 8(1): 63.
- Hinson, J., Raven, P., and Chew, S. (2007). **The endocrine system**. Edinburgh: Churchill Livingstone Elsevier, pp 108-112.
- Imeh, U., and Khokhar, S. (2002). Distribution of conjugated and free phenols in fruits: Antioxidant activity and cultivar variations. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50(22): 6301-6306.
- Jiang, C., Liu, S., He, W., Luo, X., Zhang, S., Xiao, Z., et al. (2012). A new prenylated flavanone from *Derris trifoliata* Lour. **Molecules**. 17(12): 657-663.
- Ju, J. B., Kim, J. S., Choi, C. W., Lee, H. K., Oh, T.-K., and Kim, S. C. (2008). Comparison between ethanolic and aqueous extracts from Chinese juniper berries for hypoglycaemic and hypolipidemic effects in alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 115(1): 110-115.
- Karch, A. M. (2011). **Focus on Nursing Pharmacology**. 5th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, pp 584-605.

- Kasetti, R. B., Rajasekhar, M. D., Kondeti, V. K., Fatima, S. S., Kumar, E. G. T., Swapna, S., et al. (2010). Antihyperglycemic and antihyperlipidemic activities of methanol:water (4:1) fraction isolated from aqueous extract of *Syzygium alternifolium* seeds in streptozotocin induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**. 48(4): 1078-1084.
- Khan, M. R., Omoloso, A. D., and Barewai, Y. (2006). Antimicrobial activity of the *Derris elliptica*, *Derris indica* and *Derris trifoliata* extractives. **Fitoterapia**. 77(4): 327-330.
- Kiranmai, M., Kumar, C. M., and Ibrahim, M. (2011). Comparison of total flavanoid content of *Azadirachta indica* root bark extracts prepared by different methods of extraction. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and chemical Sciences**. 2: 254-261.
- Krisanapun, C., Peungvicha, P., Temsiririrkkul, R., and Wongkrajang, Y. (2009). Aqueous extract of *Abutilon indicum* Sweet inhibits glucose absorption and stimulates insulin secretion in rodents. **Nutrition Research**. 29(8): 579-587.
- Lattanzio, V., Lattanzio, V. M. T., and Cardinali, A. (2006). **Phytochemistry: Advances in Research**. Kerala: Research Signpost, pp 24-25.
- Laupattarakasem, P., Houghton, P. J., Houtt, J. R. S., and Itharat, A. (2003). An evaluation of the activity related to inflammation of four plants used in Thailand to treat arthritis. **Journal of Ethnopharmacology**. 85(2-3): 207-215.
- Lenzen, S. (2008). The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**. 51: 216-226.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., and Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**. 613(1): 1-19.
- Mahabusarakam, W., Deachathai, S., Phongpaichit, S., Jansakul, C., and Taylor, W. C. (2004). A benzil and isoflavone derivatives from *Derris scandens* Benth. **Phytochemistry**. 65(8): 1185-1191.
- Mahidol, C., Prawat, H., Ruchirawat, S., Lihkitwitayawuid, K., Lin, L.-Z., and Cordell, G. A. (1997). Prenylated flavanones from *Derris reticulata*. **Phytochemistry**. 45(4): 825-829.

- Maiti, R., Das, U. K., and Ghosh, D. (2005). Attenuation of hyperglycemia and hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats by aqueous extract of seed of *Tamarindus indica*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. 28: 1172-1176.
- Martini, F. H., Ober, W. C., Garrison, C. W., Welch, K., and Hutchings, R. T. (2006). **Fundamentals of Anatomy & Physiology**. 7th edition. San Francisco: Daryl Fox, pp 617-620.
- Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50(12): 3444-3452.
- Michael, B., Yano, B., Sellers, R. S., Perry, R., Morton, D., Roome, N., et al. (2007). Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: A review of regulatory guidelines and a survey of current practices. **Toxicologic Pathology**. 35(5): 742-750.
- Morel, S., Helesbeux, J.-J., Séraphin, D., Derbré, S., Gatto, J., Aumond, M.-C., et al. (2013). Anti-AGEs and antiparasitic activity of an original prenylated isoflavonoid and flavanones isolated from *Derris ferruginea*. **Phytochemistry Letters**. 6(3): 498-503.
- Nolte, M. S. (2009). Pancretic hormones & antidiabetic drugs *In* : B. G. Katzung, S. B. Master & A. J. Trevor (eds.) **Basic & Clinical Pharmacology** 11th edition. Singapore: The McGraw-Hill Companies, pp 727-751.
- Notkins, A. L. (2002). Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. **Journal of Biological Chemistry**. 277(46): 43545-43548.
- OECD. (2001). Acute oral toxicity-acute toxic class method. In: OECD guideline for testing of chemicals No 423., [online]. Available: <http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-423-acute-oral-toxicity-acute-toxic-class-method-9789264071001-en>.
- Ohaeri, O. C. (2001). Effect of garlic oil on the levels of various enzymes in the serum and tissue of streptozotocin diabetic rats. **Bioscience Reports**. 21(1): 19-24.

- Ohnishi, S. T., Ohnishi, T., Muranaka, S., Fujita, H., Kimura, H., Uemura, K., et al. (2005). A possible site of superoxide generation in the complex I segment of rat heart mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**. 37(1): 1-15.
- Parr, A. J., and Bolwell, G. P. (2000). Phenols in the plant and in man. The potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 80(7): 985-1012.
- Patel, D. K., Kumar, R., Laloo, D., and Hemalatha, S. (2011). Evaluation of phytochemical and antioxidant activities of the different fractions of *Hybanthus enneaspermus* (Linn.) F. Muell. (Violaceae). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. 4(5): 391-396.
- Patel, D. K., Prasad, S. K., Kumar, R., and Hemalatha, S. (2012). An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2(4): 320-330.
- Patel, S. B., Santani, D., Shah, M. B., and Patel, V. S. (2012). Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of *Bryonia Laciniosa* seed extract and its saponin fraction in streptozotocin-induced diabetes in rats. **Journal of Young Pharmacists**. 4(3): 171-176.
- Patil, R., Patil, R., Ahirwar, B., and Ahirwar, D. (2011). Current status of Indian medicinal plants with antidiabetic potential: a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. 2(1): S291-S298.
- Premanath, R., Lakshmidevi, N., Jayashree, K., and Suresh, R. N. (2012). Evaluation of anti-diabetic effect of *Trigonella foenum graecum* Linn. Leaf extract in streptozotocin induced diabetic rats. **International Journal of Diabetes in Developing Countries**. 32(3): 138-144.
- Quezada, N., Asencio, M., Del Valle, J. M., Aguilera, J. M., and Gómez, B. (2004). Antioxidant activity of crude extract, alkaloid fraction, and flavonoid fraction from Boldo (*Peumus boldus* Molina) Leaves. **Journal of Food Science**. 69(5): C371-C376.
- Ramkumar, K. M., Lee, A. S., Krishnamurthi, K., Devi, S. S., Chakrabarti, T., Kang, K. P., et al. (2009). *Gymnema montanum* H. protects against alloxan-induced oxidative stress

- and apoptosis in pancreatic β -cells. **Cellular Physiology and Biochemistry**. 24(5-6): 429-440.
- Randhir, R., Kwon, Y.-I., and Shetty, K. (2008). Effect of thermal processing on phenolics, antioxidant activity and health-relevant functionality of select grain sprouts and seedlings. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**. 9(3): 355-364.
- Rao, R. R., Tiwari, A. K., Prabhakar Reddy, P., Suresh Babu, K., Ali, A. Z., Madhusudana, K., et al. (2009). New furanoflavanoids, intestinal α -glucosidase inhibitory and free-radical (DPPH) scavenging, activity from antihyperglycemic root extract of *Derris indica* (Lam.). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 17(14): 5170-5175.
- Rao, S. A., Srinivas, P. V., Tiwari, A. K., Vanka, U. M. S., Rao, R. V. S., Dasari, K. R., et al. (2007). Isolation, characterization and chemobiological quantification of α -glucosidase enzyme inhibitory and free radical scavenging constituents from *Derris scandens* Benth. **Journal of Chromatography B**. 855(2): 166-172.
- Rathi, S. S., Grover, J. K., and Vats, V. (2002). The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. **Phytotherapy Research**. 16(3): 236-243.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., and Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**. 26(9-10): 1231-1237.
- Sacchetti, G., Maietti, S., Muzzoli, M., Scaglianti, M., Manfredini, S., Radice, M., et al. (2005). Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**. 91(4): 621-632.
- Sanford, P. A., Smyth, D. H., and Wathing, M. (1965). Sources of energy for transfer systems in the rat intestine. **Journal of Physiology (London)**. 179: 72.
- Shabeer, J., Srivastava, R. S., and Singh, S. K. (2009). Antidiabetic and antioxidant effect of various fractions of *Phyllanthus simplex* in alloxan diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**. 124: 34-38.

- Shaw, J. E., Sicree, R. A., and Zimmet, P. Z. (2010). Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 87: 4-14.
- Si, M.-m., Lou, J.-s., Zhou, C.-X., Shen, J.-N., Wu, H.-H., Yang, B., et al. (2010). Insulin releasing and alpha-glucosidase inhibitory activity of ethyl acetate fraction of *Acorus calamus* *in vitro* and *in vivo*. **Journal of Ethnopharmacology**. 128(1): 154-159.
- Siri Ruckhachati Nature Park. (2010). *Derris reticulata* Craib., [online]. Available: https://www.pharmacy.mahidol.ac.th/siri/index.php?page=search_detail&medicinal_id=13.
- Sittiwet, C., and Puangpronpitag, D. (2009). Antimicrobial properties of *Derris scandens* aqueous extract. **Journal of Biological Sciences**. 9(6): 607-611.
- Smirin, P., Taler, D., Abitbol, G., Brutman-Barazani, T., Kerem, Z., Sampson, S. R., et al. (2010). *Sarcopoterium spinosum* extract as an antidiabetic agent: *In vitro* and *in vivo* study. **Journal of Ethnopharmacology**. 129(1): 10-17.
- Songsak, T. (1995). **Phytochemistry of stem bark and pharmacognostic specification of *Derris reticulata* Craib**. M.Sc. thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, pp 1-4.
- Stratton, I. M., Adler, A. I., Neil, H. A. W., Matthews, D. R., Manley, S. E., Cull, C. A., et al. (2000). Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **British Medical Journal**. 321: 405-412.
- Szkudelski, T. (2001). The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological research**. 50: 536-546.
- Tachakittirungrod, S., Okonogi, S., and Chowwanapoonpohn, S. (2007). Study on antioxidant activity of certain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract. **Food Chemistry**. 103(2): 381-388.
- Tepe, B., Degerli, S., Arslan, S., Malatyali, E., and Sarikurkcu, C. (2011). Determination of chemical profile, antioxidant, DNA damage protection and antiamebic activities of *Teucrium polium* and *Stachys iberica*. **Fitoterapia**. 82(2): 237-246.

- Tewtrakul, S., Cheenpracha, S., and Karalai, C. (2009). Nitric oxide inhibitory principles from *Derris trifoliata* stems. **Phytomedicine**. 16(6-7): 568-572.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. 39(1): 44-84.
- Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., and Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 46(10): 4113-4117.
- Venkatesh, S., Madhava Reddy, B., Dayanand Reddy, G., Mullangi, R., and Lakshman, M. (2010). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of *Helicteres isora* roots in alloxan-induced diabetic rats: a possible mechanism of action. **Journal of Natural Medicines**. 64(3): 295-304.
- Vongnam, T., Wittayalertpanya, S., Raungrungsi, N., and Limpanasithikul, W. (2013). Inhibitory effect of *Derris reticulata* ethanol extract on LPS-induced macrophage activation. **Asian Biomed**. 75(1): 89-95.
- Wang, S., Melnyk, J. P., Tsao, R., and Marcone, M. F. (2011). How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. **Food Research International**. 44(1): 14-22.
- WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus. (1980). **Second Report, Technical Report**. Series 646. Geneva: World Health Organisation, pp 65-66.
- WHO. (2010). Diabetes. [online]. Available: www.who.int/nmh/publications/fact_sheet_diabetes_en.pdf
- Wild, S., Roglic, G., Green, A., Sicree, R., and King, H. (2004). Global prevalence of diabetes. **Diabetes Care**. 27: 1047-1053.
- Wilson, T. H., and Wiseman, G. (1954). The use of sacs of everted small intestine for the study of transference of substances from the mucosal to the serosal surface. **The Journal of Physiology**. 123: 116-125.
- Wisetsutthichai, S., Techamahaneerat, S., Junyaprasert, V., and Soonthronchareonnon, N. (2005). Gel preparation development from *Derris reticulata* Craib.

- extract as an anti-herpes simplex drug. **Thai Journal of Phytopharmacy**. 12(2): 11-22.
- Wiwanitkit, V. (2011). Thai ethnopharmacological herbs for diabetes treatment: Data collection and informatics tracing for therapeutic property. **Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews**. 5(2): 103-104.
- Yadav, R., and Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. **Journal of Phytology**. 3(12): 10-14.
- Yenesew, A., Twinomuhwezi, H., Kabar, J. M., Akala, H. M., Kiremire, B. T., Heydenreich, M., et al. (2009). Antiplasmodial and larvicidal flavonoids from *Derris trifoliata*. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**. 23(3): 409-414.
- Yeo, R., and Sawdon, M. (2007). Hormonal control of metabolism: regulation of plasma glucose. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. 8(7): 295-298.
- Young, I. S., and Woodside, J. V. (2001). Antioxidants in health and disease. **Journal of Clinical Pathology**. 54: 176-186.
- Zhang, P., Zhang, X., Brown, J., Vistisen, D., Sicree, R., Shaw, J., et al. (2010). Global healthcare expenditure on diabetes for 2010 and 2030. **Diabetes Research and Clinical Practice**. 87: 293-301.