

อภิปรายผลการทดลอง

ผลการตรวจสอบสารประกอบเคมีในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น

ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดที่ตรวจพบด้วยวิธี Folin-Ciocalteu's phenol colorimetric (Asami et al., 2003) ในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 1 กรัม เท่ากับ 2.16 ± 0.01 มิลลิกรัม และปริมาณของฟลาโวนอยด์ ซึ่งเป็นสารตัวหนึ่งในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่ตรวจพบด้วยวิธี Aluminum chloride colorimetric และ 2,4-Dinitrophenylhydrazine colorimetric method (Chang et al., 2002) พบว่าในสารสกัดจากเมล็ดองุ่น 1 กรัม มีปริมาณสารฟลาโวนอยด์เท่ากับ 0.801 ± 0.059 มิลลิกรัม

เมล็ดองุ่นประกอบด้วย (+)-catechins, (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-O-gallate ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลเป็น monomer และพบ procyanidins ที่มีโครงสร้างโมเลกุลเป็น dimer, trimer และ tetramer โดยสารดังกล่าวเป็นฟลาโวนอยด์ในกลุ่มสารประกอบฟีนอลิกที่พบในเมล็ดองุ่น (Saito et al., 1998) ซึ่งจากการตรวจสอบสารสกัดด้วยวิธีโครมาโทกราฟีในการศึกษาครั้งนี้ พบสารที่เป็นองค์ประกอบหลักในสารสกัดเมล็ดองุ่นที่สกัดได้ 5 ชนิด ได้แก่ กรดแกลลิก (gallic acid) โปรไซยานิดินบี 1 (procyanidin B1) แคททิซิน (catechin) โปรไซยานิดินบี 2 (procyanidin B2) เอพิแคททิซิน (epicatechin) โปรไซยานิดินบี 3 (procyanidin B3) (รูปที่ 1) ซึ่งจากการศึกษาของ Pinent และคณะ (2004) พบว่า โปรไซยานิดินส์ในสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ L6E9 myotubes และ 3T3-L1 adipocytes ได้ ตามความเข้มข้นของสารสกัดเมล็ดองุ่น ซึ่งแสดงว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน และสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 250 มก./กก. สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า proanthocyanidins ของสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำเป็นเบาหวานด้วย alloxan ได้ (El-Alfy et al., 2005) ดังนั้นโปรไซยานิดินส์ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นน่าจะเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด

ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่น (grape seed extract; GSE) ต่อระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับพลาสมาอินซูลินในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน

จากผลการศึกษาโดยให้สารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกัน 8 สัปดาห์ พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาหลังอดอาหารได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 6 และ 8 (ตารางที่ 4) และผลต่อระดับพลาสมาอินซูลิน พบว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1% สามารถลดระดับพลาสมาอินซูลินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 8 (ตารางที่ 5) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงโดยให้ผลใกล้เคียงกับกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone

น้ำตาลฟรุกโตสสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงได้ (hyperglycemia) โดยเกิดจากการที่เมแทบอลิซึมของฟรุกโตสสามารถผ่านจุดควบคุมของปฏิกิริยา ซึ่งอยู่ที่ เอนไซม์ฟอสโฟฟรุกโตโคเนสได้ (phosphofructokinase) จึงสามารถเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสได้อย่างต่อเนื่อง ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากขบวนการนี้ คือ กลูโคส แลคเตท และไพรูเวท (Mayes, 1993) ซึ่งเป็นข้อเสถียรของ ขบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส ทำให้มีการสร้างกลูโคสเพิ่มมากขึ้น จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาขณะอดอาหารสูงได้ (fasting hyperglycemia) นอกจากนี้ การรับประทานอาหารที่มีพลังงานสูง ซึ่งมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบอยู่มาก เนื้อเยื่อไขมันจะทำหน้าที่เก็บ พลังงานส่วนเกินไว้ในรูปของไตรกลีเซอไรด์ ส่งผลทำให้มีการเสริมสร้างเนื้อเยื่อไขมันมากขึ้น และนำไปสู่ภาวะ อ้วน โดยเป็นปัจจัยเสริมทำให้การออกฤทธิ์ของอินซูลินต่อเนื้อเยื่อที่ตอบสนองบกพร่อง พบว่า เนื้อเยื่อไขมันจะ มีการผลิตและการหลั่ง adipokines ที่ผิดปกติ เช่น มีการหลั่ง TNF- α และ interleukin-6 (IL-6) เพิ่มมากขึ้น ซึ่ง cytokines เหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น insulin-antagonist ได้ โดยสามารถรบกวนการส่งสัญญาณของอินซูลิน ได้โดยตรง (Rotter, 2003) และพบว่าระดับ TNF- α และ IL-6 ที่สูงขึ้น สามารถทำให้ระดับน้ำตาลกลูโคสใน พลาสมาสูงได้ (Lindmark, 2006) โดย TNF- α เป็นปัจจัยส่งเสริมทำให้ร่างกายเกิดภาวะดื้ออินซูลินและยัง สามารถยับยั้งการผลิต adiponectin ได้ นอกจากนี้ จะทำให้มีการกระตุ้นการสลายไตรกลีเซอไรด์ (lipolysis) ของเซลล์ไขมันเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้มีการปลดปล่อยกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) ออกสู่กระแสเลือด เพิ่มขึ้นไปยังเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น กล้ามเนื้อและตับ (Lewis, 2002) การเพิ่มขึ้นของกรดไขมันอิสระส่งผลทำให้มี การเก็บกรดไขมันอิสระดังกล่าวไปสะสมอยู่ในกล้ามเนื้อลาย ส่งผลกระทบต่อการส่งสัญญาณของอินซูลินกับ โปรตีนต่างๆภายในเซลล์ ทำให้การเคลื่อนที่ของ glucose transporter (GLUT4) ไปยังเซลล์เมมเบรนผิดปกติ ทำให้ความสามารถของอินซูลินในการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ลดน้อยลง (Watson and Pessin, 2001) ในตัวก็มี การส่งสัญญาณต่ออินซูลินผิดปกติไปเช่นกัน เนื่องจากกรดไขมันอิสระสามารถทำให้ดับกระตุ้นการสร้าง กลูโคสมากขึ้นโดยขบวนการไกลโคจีโนไลซิส (glycogenolysis) และขบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส (gluconeogenesis) พบว่ากรดไขมันอิสระสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ glucose 6-phosphatase และเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxykinase ได้ในขบวนการกลูโคเนโอเจเนซิส ผลลัพธ์สุดท้ายคือ ทำให้มีการสร้างกลูโคสจากตับมากขึ้น การกำจัดกลูโคสที่ตับลดลง ส่งผลทำให้ระดับ น้ำตาลกลูโคสในพลาสมาเพิ่มสูงขึ้น และตับอ่อนก็จะมีการตอบสนองโดยการหลั่งอินซูลินออกมาเพิ่มขึ้น เกิด ภาวะ hyperinsulinemia ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดภาวะดื้ออินซูลินได้ (Garvey et al., 1986)

ภาวะระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาสูงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species: ROS) โดยผ่านกลไกต่างๆ เช่น ทำให้น้ำตาลสามารถจับกับกรดอะมิโนอิสระในกระแสเลือด



โดยไม่ต้องใช้อินซูลิน ในระยะแรกจะเกิดเป็นสารที่ไม่ เสถียรอยู่หลายชั่วโมง เรียกว่า Schiff base ต่อมาจะ กลายสภาพเป็นสารที่เสถียรขึ้น เรียกว่า early glycosylation product (EGP) หรือ Amadori protein แต่ถ้ามี ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงเป็นเวลานาน สารนี้จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น advanced glycation end products (AGEs) (Brownlee et al., 1988) โดย AGEs ที่เกิดขึ้นสามารถเหนี่ยวนำให้เนื้อเยื่อเกิดภาวะดื้อต่อ อินซูลินได้ โดยทำให้การส่งสัญญาณของอินซูลินภายในเซลล์กล้ามเนื้อบกพร่อง (Miele et al., 2003) จากผล การทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นจะมีระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาลดลง อาจเนื่องมาจาก สาร procyanidins ในสารสกัดเมล็ดองุ่น สามารถกระตุ้นการนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ได้ (Pinent et al., 2004) ซึ่งออกฤทธิ์เหมือนกับอินซูลิน (insulinomimetic) จึงสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาได้

จากการคำนวณ HOMA-IR สามารถบ่งบอกถึงภาวะดื้ออินซูลินได้ โดยการใช้ค่าของระดับกลูโคสใน พลาสมา และระดับพลาสมาอินซูลินในการคำนวณ (American Diabetic Association, 1998) จากผลการ ทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./ กก./วัน พบว่า HOMA-IR มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ อาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง แสดงถึงสารสกัดเมล็ดองุ่นและยา rosiglitazone สามารถลดภาวะดื้อ อินซูลินได้

สำหรับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติพบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสและระดับพลาสมาอินซูลินเฉลี่ยเพิ่มสูงขึ้น ตลอด 8 สัปดาห์ของการทดลอง (ตารางที่ 4 และ 5) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความทนต่อระบบน้ำตาลกลูโคส (glucose tolerance) ลดลงตามอายุที่เพิ่มขึ้น (Meneilly and Tessier, 2001) ส่งผลทำให้ระดับอินซูลินสูงขึ้น ตามไปด้วย นอกจากนี้อาจเกิดจากบริเวณในการเก็บตัวอย่างเลือดแตกต่างกัน โดยเก็บตัวอย่างเลือดจาก หลอดเลือดดำที่หาง (สัปดาห์ที่ 0 และ 4) กับตัวอย่างเลือดจากหัวใจ (สัปดาห์ที่ 8) ซึ่งส่งผลทำให้มีระดับ น้ำตาลกลูโคสแตกต่างกัน และอาจส่งผลทำให้มีระดับอินซูลินแตกต่างกันได้ (Matsuzawa et al., 1994)

สำหรับกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ซึ่งเป็นยาเม็ดลดน้ำตาลในเลือดในกลุ่ม Thiazolidinediones ที่ ออกฤทธิ์โดยเพิ่มความไวต่อฤทธิ์ของอินซูลินที่ตับ กล้ามเนื้อ และเนื้อเยื่อไขมัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำมา เป็นตัวควบคุมเชิงบวก (positive control) พบว่าในสัปดาห์ที่ 6 สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมา เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงในเวลาเดียวกันได้ 15% และในสัปดาห์ที่ 8 ลดลงได้ 21% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่พบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมามีค่าเพิ่มขึ้นจากสัปดาห์ที่ 6 อาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่ให้ยาน้อยเกินไปซึ่งจะเห็นผลของยาต้องใช้ระยะเวลาอย่างน้อย 2-3 สัปดาห์ มี รายงานว่าฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาของยาต้องใช้ระยะเวลา 6-12 สัปดาห์ในการออก ฤทธิ์ (Cheng and Fantus, 2005) ส่วนผลต่อระดับพลาสมาอินซูลิน พบว่าในสัปดาห์ที่ 4 มีระดับพลาสมา อินซูลินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานการศึกษาถึงผลของการรับประทานฟรุกโตสในปริมาณสูง ทำให้เกิดภาวะ hyperinsulinemia, insulin

resistance, hypertriglyceridemia และ hypertension ได้ในสัตว์ทดลอง (Zavaroni et al., 1980; Hwang et al., 1987; Thorburn et al., 1989; Elliou et al., 2002) จากนั้นเริ่มต้นให้ยาในสัปดาห์ที่ 5 ของการทดลอง พบว่าในสัปดาห์ที่ 8 กลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone มีระดับพลาสมาอินซูลินลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งแสดงว่า rosiglitazone สามารถเพิ่มความไวของเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่อฤทธิ์ของอินซูลินได้ (Saltiel and Olefsky, 1996; Olefsky, 2000; Kaplan et al., 2001) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่กล้ามเนื้อ ซึ่งยาจะไปเพิ่มการส่งสัญญาณของอินซูลิน โดยเมื่อ PPAR- γ ถูกกระตุ้น จะมีการผลิต GLUT4 โดยการถอดรหัส (transcription) ของ GLUT4 เพิ่มขึ้น จากนั้นจะเกิดการเคลื่อนที่ไปยังผนังเซลล์ ทำให้สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้ (Saltiel and Olefsky, 1996) นอกจากนี้ยาอาจทำให้มีระดับ adiponectin เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถลดภาวะดื้ออินซูลินได้โดย adiponectin จะเพิ่มการสลายกรดไขมันอิสระ (β -oxidation) และลดการสร้างปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่ตับ (gluconeogenesis) นอกจากนี้ยังทำให้กล้ามเนื้อสามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้เพิ่มขึ้น (Maeda et al., 2002)

จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นมีปริมาณการกินอาหารและน้ำหนักตัวน้อยลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติและกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากสารฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถลดปริมาณการกินอาหารโดยผ่าน leptin receptor-independent appetite control pathway ซึ่งส่งผลทำให้สามารถลดหรือป้องกันการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวได้ (Kao et al., 2000) และสารฟลาโวนอยด์ยังสามารถกระตุ้นกระบวนการเผาผลาญไขมันของร่างกายได้ (Murase et al., 2002) โดยการควบคุม rate limiting enzyme ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (เอนไซม์ acetyl-CoA carboxylase และ fatty acid synthase) และการออกซิเดชันของกรดไขมัน (เอนไซม์ acyl-CoA dehydrogenase) ในตับ ทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ที่ตับและในพลาสมาลดลง ซึ่งส่งผลทำให้เนื้อเยื่อไขมันในช่องท้องลดลงได้ (Kamisoyama et al., 2008) นอกจากนี้สารฟลาโวนอยด์สามารถยับยั้งการย่อยและการดูดซึมไขมัน โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการย่อยไตรกลีเซอไรด์จากอาหาร และ lipoprotein lipase ได้ (Moreno et al., 2003) จึงส่งผลทำให้กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นมีการเพิ่มขึ้นของน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ประสิทธิภาพของสารสกัดเมล็ดดองุ่นในการขจัด น้ำตาลในพลาสมาของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) โดยการทำให้ oral glucose tolerance test (OGTT)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดเมล็ดดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% ในการขจัดน้ำตาลกลูโคสในพลาสมาโดยการทำให้ OGTT ในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลิน (ตารางที่ 8) พบว่า หลังจากได้รับสารละลายกลูโคส 15 นาที ระดับน้ำตาลกลูโคสของกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากผลของสารสกัดเมล็ดดองุ่นต่อระดับพลาสมาอินซูลินของหนูเบาหวานโดยการทำให้ OGTT (ตารางที่ 4-3) พบว่า กลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับพลาสมาอินซูลินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ หลังจากได้รับกลูโคสที่เวลา 15, 90 และ 120 นาที ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่าระดับพลาสมาอินซูลินลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในเวลาที่ 15, 60, 90 และ 120 นาที เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

จะเห็นได้ว่าสารสกัดเมล็ดดองุ่นขนาด 1% และ 2% สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ภายใน 2 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง โดยอาจเกิดจากสารสกัดเมล็ดดองุ่นออกฤทธิ์กระตุ้นการหลั่งอินซูลินได้ในภาวะที่มีน้ำตาลสูงและสามารถกระตุ้นการนำกลูโคสกลับเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในหนูขาว คือ สารสกัดเมล็ดดองุ่นสามารถลดระดับน้ำตาลในพลาสมาได้หลังจากได้รับการป้อนกลูโคส (ภาวะน้ำตาลสูง) ทั้งในหนูปกติและหนูเบาหวาน นอกจากนี้สารสกัดเมล็ดดองุ่นอาจมีกลไกการออกฤทธิ์อื่นๆ ได้ด้วย เช่น การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ลำไส้ โดยเอนไซม์นี้มีหน้าที่ในการย่อยคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แล้วจึงดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ซึ่งเมื่อเกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้จะทำให้กลูโคสถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้ช้าลง (Vats et al., 2002) แต่เนื่องจากการทำให้ OGTT ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ป้อนกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวโดยที่ไม่ได้ทำการทดลองป้อนน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น มอลโตส หรือซูโครสให้กับหนูขาว จึงไม่สามารถระบุได้แน่ชัดว่าสารสกัดจากเมล็ดดองุ่นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alpha-glucosidase ที่ลำไส้เล็กหรือไม่ จึงควรทำการศึกษาเพื่อยืนยันผลนี้ต่อไปในอนาคต

ผลของสารสกัดเมล็ดดองต่อระดับไขมันในเลือด การทำงานของตับและไตในหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินด้วยอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง (High-fructose diet; HF diet) ติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ผลต่อสารเคมีในเลือดเมื่อให้สารสกัดเมล็ดดอง 0.5%, 1% และ 2% ผสมในอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงติดต่อกันเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า (ตารางที่ 7)

ค่าที่ใช้ประเมินการทำงานของไต คือ BUN และ creatinine ซึ่ง BUN เป็นค่าความเข้มข้นของไนโตรเจนของยูเรียในซีรัมพบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง มีค่า BUN เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ แต่ค่า BUN ที่เพิ่มขึ้นยังคงอยู่ในช่วงของค่าปกติซึ่งเท่ากับ 6-20 ส่วนค่า BUN ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง และค่า creatinine เป็นค่าบ่งชี้การทำงานของไต พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนค่า creatinine ของกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้บ่งบอกว่าสารสกัดเมล็ดดองไม่มีผลต่อการทำงานของไต

สำหรับค่าเอนไซม์ alanine aminotransferase (ALT) นั้นเป็นค่าซึ่งบ่งชี้ความเสียหายของเซลล์ตับ พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่า ค่า ALT ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

สำหรับเอนไซม์ aspartate aminotransferase (AST) พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ AST เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดดองขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ AST ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

AST เป็นเอนไซม์ที่พบได้ปริมาณสูงในเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ ตับ และเซลล์กล้ามเนื้อลาย พบได้บ้างในเนื้อเยื่ออื่น เช่น ไต สมอง ตับอ่อน และเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นต้น ระดับ AST ที่สูงขึ้นเพียงค่าเดียว อาจบ่งบอกเฉพาะเจาะจงไม่ได้ว่าเกิดจากตับ เนื่องจาก AST มีการกระจายตัวในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่ง ALT จะบ่งชี้โรคตับได้ดีกว่า เนื่องจากมีการกระจายตัวที่จำกัด โดยระดับ AST ที่เพิ่มสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการเกิด hemolysis ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้เกิด artifact ส่งผลทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้

สำหรับเอนไซม์ alkaline phosphatase (ALK) พบว่าค่า ALK ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้บ่งบอกว่าสารสกัดเมล็ดองุ่นไม่มีผลต่อท่อทางเดินน้ำดี

ระดับ cholesterol และ triglycerides เป็นค่าที่บ่งชี้ระดับไขมันในเลือด พบว่าค่า cholesterol ของกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และ 2% พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีระดับ cholesterol ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง และค่า triglycerides พบว่ากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาล ฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับ triglycerides เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ triglycerides ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง นอกจากนี้ระดับ HDL ซึ่งเป็นไขมันที่มีความหนาแน่นสูง พบว่าระดับ HDL ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับ HDL ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

การรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตส ตับสามารถสร้างไตรกลีเซอไรด์ได้จากกระบวนการ re-esterification ของกรดไขมันอิสระกับกลีเซอรอล จากนั้นไตรกลีเซอไรด์จะถูกส่งออกไปในกระแสเลือด โดยรวมกับพอสฟอลิปิด คอเลสเตอรอล และ Apo B-100 ได้เป็นไลโปโปรตีน เรียก very low density lipoprotein (VLDL) ซึ่งเป็นไลโปโปรตีนที่พาไตรกลีเซอไรด์จากการสังเคราะห์ในเซลล์ตับ (endogenous triglycerides) ไปสู่นเนื้อเยื่อต่าง ๆ โดยเฉพาะเนื้อเยื่อไขมัน ดังนั้น เมื่อรับประทานอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสในปริมาณสูง จะทำให้มีการสร้าง VLDL เพิ่มมากขึ้น และทำให้มีไตรกลีเซอไรด์สะสมอยู่ในตับมากขึ้นไปด้วย (Mayes, 1993) ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความไวของเซลล์ต่ออินซูลินลดลงได้

จากผลการทดลองพบว่า ระดับไตรกลีเซอไรด์ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง อาจเนื่องมาจากเกิดการรวมตัวของ glycerol-3-phosphate ในตับซึ่งอาจนำไปสู่การสังเคราะห์

VLDL ที่เพิ่มขึ้นได้ ต่อมากรดไขมันอิสระที่เพิ่มขึ้นในพลาสมา สามารถรบกวนการส่งสัญญาณของอินซูลินได้โดยตรง ทำให้การ phosphorylation ของโปรตีนภายในเซลล์บกพร่อง และส่งผลทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลินเกิดขึ้นได้ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นพบว่า สารโพลีฟีนอลที่พบในเมล็ดองุ่นสามารถลดระดับไตรกลีเซอไรด์ได้ (Ruzaidi et al., 2005) อาจเนื่องมาจากสารโพลีฟีนอลที่พบในเมล็ดองุ่นสามารถเปลี่ยนแปลงการเมแทบอลิซึมของไลโปโปรตีน จึงส่งผลทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ลดลงได้ (Zem et al., 2005) นอกจากนี้การลดระดับไตรกลีเซอไรด์ อาจเกิดจากการที่สารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pancreatic lipase และ lipoprotein lipase ทำให้การย่อยสลายไขมันลดลง ส่งผลทำให้ระดับกรดไขมันอิสระและโมโนกลีเซอรอล ที่จะนำไปใช้ในการสร้างไตรกลีเซอไรด์ลดลง จึงส่งผลทำให้ระดับไตรกลีเซอไรด์ลดลงได้ (Diego et al., 2003)

ผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อการเกิด lipid peroxidation และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในตับ

ผลต่อการเกิด lipid peroxidation ในตับ พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาล ฟรุกโตสปริมาณสูง มีระดับ malondialdehyde เพิ่มขึ้น 18% เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดองุ่นขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน มีค่า malondialdehyde ลดลง 14%, 22% และ 14% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ภาวะ oxidative stress เกิดขึ้นเนื่องจากภาวะความไม่สมดุลระหว่างการเกิดอนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ โดยอนุมูลอิสระหรือ ROS ที่เพิ่มขึ้น สามารถทำอันตรายต่อสารชีวโมเลกุลต่างๆภายในเซลล์ ได้แก่ ผนังเซลล์, DNA, และโปรตีน (Halliwell and Gutteridge, 1990) ส่งผลทำให้เนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บและเกิดความเสียหายได้ (oxidative damage) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ได้ ซึ่งสาร procyanidins ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นมีโครงสร้างแบบ catechol หรือ ortho-diphenolic group โดยถือเป็นโครงสร้างที่สำคัญที่สุดสำหรับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งนอกจากจะมีบทบาทสำคัญสำหรับการยับยั้งอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่เป็น hydrogen donating แล้วยังสามารถจับหรือคีเลตโลหะหนักโดยเฉพาะทองแดง (Cu) และเหล็ก (Fe) (Cao et al., 1997) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นการสร้างและเกิดปฏิกิริยาถูกใช้ของอนุมูลอิสระในร่างกายได้ โครงสร้างนี้ทำให้สารสกัดเมล็ดองุ่นมีฤทธิ์แรงในการต้านอนุมูลอิสระ (Havsteen, 2002) โดยมีฤทธิ์แรงกว่าวิตามินซีและอี หรือ beta-carotene (Fine, 2000; Joshi et al., 2001; Moskaug, 2005) จึงส่งผลทำให้ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการเกิด lipid peroxidation และใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการเกิดภาวะ oxidative stress ลดลงได้ (Karthikeyan et al., 2007)

สำหรับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) พบว่า กลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคองขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เป็นเอนไซม์ที่มีเหล็ก และสังกะสี เป็นส่วนประกอบ ทำหน้าที่กำจัดอนุมูล superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) ได้เป็น H_2O_2 และ O_2 จากผลการทดลองพบว่า ระดับเอนไซม์ SOD ที่ลดลง สาเหตุเกิดจาก lipid peroxidation ที่เกิดขึ้นในกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง เนื่องจากการเกิดภาวะ oxidative stress จะก่อให้เกิด ROS ในปริมาณมาก และอาจไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้ (Karthikeyan et al., 2007) นอกจากนี้ สารสกัดเมล็ดคองสามารถกำจัดอนุมูล superoxide anion ได้ จึงทำให้มีระดับเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้น

สำหรับเอนไซม์ catalase (CAT) พบว่าระดับเอนไซม์ catalase ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีระดับเอนไซม์ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคองขนาด 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นเมื่อ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

เอนไซม์ catalase เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัด H_2O_2 ได้เป็นน้ำ และ O_2 จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดคองสามารถกำจัด H_2O_2 ได้ จึงส่งผลทำให้ระดับเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้น

ระดับ total glutathione และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) พบว่าระดับ total glutathione ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคองขนาด 0.5% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่ามีระดับ total glutathione เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) พบว่า ระดับเอนไซม์ GPx ของกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูงมีค่าลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดเมล็ดคองขนาด 0.5%, 1%, 2% และกลุ่มที่ได้รับยา rosiglitazone ขนาด 4 มก./กก./วัน พบว่าระดับเอนไซม์ GPx ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีน้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง

ระบบของกลูตาไธโอน ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากอนุมูลอิสระและ ROS โดยเอนไซม์ GPx เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยนจากกรูบิรดิซ (GSH) เป็นรูบออกซิไดซ์ (GSSG) ทำให้ H_2O_2 สลายกลายเป็นโมเลกุลของ

น้ำ จากนั้น GSSG ที่เกิดขึ้นก็จะเปลี่ยนกลับมาอยู่ในรูป ปรีดิวิธตามเดิม โดยอาศัยเอนไซม์ glutathione reductase (GR) ซึ่งต้องการ NADPH เป็นโคเอนไซม์ (Gerard-Monnier and Chandiere, 1996) จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดเมล็ดองุ่นสามารถเพิ่มปริมาณของ GSH ได้ ซึ่งสาร proanthocyanidin ที่พบในสารสกัดเมล็ดองุ่นมีผลต่อการแสดงออกของยีนของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ โดยทำให้ระดับ mRNA ของ GPx และ mRNA ของ GR เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้สามารถรักษาปริมาณของ GSH ได้ เนื่องจากระบบกลูตาไธโอนเป็นปฏิกิริยา redox ซึ่งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ GPx และ GR แต่เนื่องจากการทำวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการวัดระดับในรูปของ total glutathione จึงอาจไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ GR ดังกล่าว

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้ คือ

1. ศึกษาผลของสารสกัดเมล็ดองุ่นต่อระดับ adiponectin และ leptin ของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินเหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
2. ศึกษาปริมาณไกลโคเจนในตับ และกล้ามเนื้อของหนูเบาหวานที่เกิดภาวะดื้ออินซูลินเหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลฟรุกโตสปริมาณสูง
3. ศึกษาขบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของสารสกัดเมล็ดองุ่นกับตัวรับอินซูลิน (insulin receptor)

บทสรุป

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า สารสกัดจากเมล็ดองุ่นนั้นมีฤทธิ์ในการต้านเบาหวานโดยสามารถลดปริมาณน้ำตาลในเลือด ลดปริมาณการกินอาหาร ลดน้ำหนัก และลดระดับของ triglyceride ในหนูทดลองได้ นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดองุ่นยังสามารถต้านอนุมูลอิสระ ลดการเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งภาวะดังกล่าวผลให้เกิดความเสียหายของอวัยวะและเนื้อเยื่อและเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคแทรกซ้อนอื่นๆ ตามมาในผู้ป่วยเบาหวาน โดยสารสกัดเมล็ดองุ่นนั้นสามารถลดการเกิด lipid peroxidation และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญได้แก่ เอนไซม์ SOD และ CAT ที่สำคัญคือสารสกัดเมล็ดองุ่นนั้นไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของตับและไต จึงเหมาะสมอย่างยิ่งในการศึกษาเพื่อนำมาพัฒนาเป็นยารักษาเบาหวานต่อไป เนื่องจากเป็นสารที่ได้จากธรรมชาติ ราคาถูก ให้ผลในการรักษาใกล้เคียงกับยารักษาเบาหวานที่ใช้ในปัจจุบัน ทั้งยังมีความปลอดภัยสูงอีกด้วย