

## โครงการวิจัยย่อยที่ 3

เรื่อง

ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย)  
ต่อฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

Effect of fish oil from hybrid catfish

(*Pangasius larnaudii* x *Pangasianodon hypophthalmus*)

on antihyperglycemic and antioxidant activities

in type 2 diabetic rats



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

**โครงการย่อยที่ 3** ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสรวย) ต่อฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

Effect of fish oil from hybrid catfish on antihyperglycemic and antioxidant activities in Type 2 Diabetic rats

### 1. บทคัดย่อภาษาไทยและภาษาอังกฤษ (Abstract)

วัตถุประสงค์ของศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์และกลไกที่เกี่ยวข้องกับการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดและต้านอนุมูลอิสระของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมขนาดต่างๆ ในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยอาหารไขมันสูงและสารสเตรบิโตโซโตซิน พบว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในขนาด 1,000 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในหนูที่มีภาวะเบาหวานเป็นเวลา 12 สัปดาห์สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดและพื้นที่ใต้กราฟของกลูโคสจากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสทางปากซึ่งบ่งชี้ว่าการทุเลาของภาวะดื้อต่ออินซูลิน ลดระดับไขมันคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูที่มีภาวะเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ โดยยังพบว่าการเพิ่มการปรากฏของโปรตีนขนส่งกลูโคสชนิดที่ 4 บนเซลล์เมมเบรนร่วมกับเพิ่มประสิทธิภาพการส่งสัญญาณภายในเซลล์ของ insulin โดยเฉพาะการกระตุ้น Akt และ PKC $\zeta$  ซึ่งบ่งชี้ว่าการเพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน ทั้งยังมีผลช่วยเพิ่มระดับของฮอร์โมนอะดิโปเนกทินและลดระดับของฮอร์โมนเลปทินในเลือด นอกจากนี้ยังพบว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมยังมีผลลดระดับของเอ็มดีเอหรือ malondialdehyde ซึ่งเป็นตัวชี้วัดการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชันด้วย จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดและลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันจากโรคเบาหวานชนิดที่ 2 และแสดงให้เห็นศักยภาพของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร

**คำสำคัญ:** น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม, โรคเบาหวานชนิดที่ 2, ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง, ภาวะเครียดออกซิเดชัน

### Abstract

This study aimed to evaluate the antihyperglycemic and antioxidant activities of fish oil from hybrid catfish in high fat diet and streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. Feeding with fish oil from hybrid catfish at a dose of 1,000 mg/kg BW for 12 weeks to diabetic rats significantly lowered the plasma glucose levels as well as the area under the curve for glucose from the oral glucose tolerance test indicating improved insulin resistance. Moreover, the plasma total cholesterol and triglyceride levels were corrected towards the control rats. Interestingly, the increased membrane GLUT4 protein expression, phosphorylation of Akt (Ser473) and phosphorylation of PKC $\zeta$  (Thr410/403) in soleus muscle were found in fish oil from hybrid catfish -treated diabetic rats indicating changing of the intracellular insulin signaling mechanism and finally enhanced of insulin sensitivity and increased skeletal glucose uptake. Furthermore, the fish oil from hybrid catfish supplement significantly increased plasma adiponectin levels and decreased plasma leptin levels in type 2 diabetic rats. Consistently, levels of malondialdehyde (MDA), a lipid peroxidation marker, were significantly decreased in hybrid catfish-treated diabetic rats. Thus, these results indicated the potentiality of fish oil from hybrid catfish for the correction of type 2 diabetes mellitus and its related complications like oxidative stress and hyperlipidemia. This fish oil may be good candidate for promising nutraceutical treatment for the management of diabetes.

**Keywords:** fish oil, hybrid catfish, type 2 diabetes mellitus, hyperglycemia, oxidative stress

## 2. บทนำ

### ความสำคัญและที่มาของปัญหา

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อที่พบบ่อย และเป็นปัญหาที่สำคัญต่อภาวะสุขภาพของคนทั่วโลก พยาธิสภาพของโรคเบาหวานเกิดจากพันธุกรรมและ/หรือมีความผิดปกติของการสร้างฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) จากตับอ่อน หรือจากการที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อ insulin ที่ลดลงหรือมีภาวะดื้อต่อ insulin (insulin resistance) ทำให้มีระดับของน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) โรคเบาหวานที่พบในปัจจุบัน อาจแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งมีภาวะอ้วนและอายุที่เพิ่มขึ้น (aging) เป็นปัจจัยเสี่ยงสำคัญต่อการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 ซึ่งพบได้บ่อยและเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศไทยคือ โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ถึงแม้ว่าสาเหตุการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย แต่จากรายงานการศึกษาในคลินิกและในสัตว์ทดลองในระยะหลังนี้พบว่า สารอนุมูลอิสระหรือการเกิดภาวะ oxidative stress มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพการเกิดโรคเบาหวาน เช่น การหลั่ง insulin จากตับอ่อนลดลง ภาวะดื้อต่อ insulin รวมทั้งการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ของโรคเบาหวาน ได้แก่ โรคต้อกระจก (cataract) โรคความดันโลหิตสูง (hypertension) โรคหลอดเลือดอุดตัน (arteriosclerosis) โรคไตวาย (renal failure) และโรคหัวใจ

จากรายงานการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในมนุษย์ พบว่า กรดไขมันชนิด DHA (docosahexaenoic acid) และ EPA (eicosapentaenoic acid) ซึ่งพบมากในน้ำมันปลา มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่หลากหลายโดยเฉพาะฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูขาวที่มีภาวะเบาหวาน และลดการเกิดสารอนุมูลอิสระจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ทำให้ลดอัตราการเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน ได้แก่ ความผิดปกติของการทำงานของ endothelial cell ของหลอดเลือด การเกิดการอุดตันของหลอดเลือด การเกิดภาวะแทรกซ้อนทางไต ซึ่งในที่สุดแล้วก็จะช่วยให้ผู้ป่วยโรคเบาหวานสามารถควบคุมระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพและจะทำให้มีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นในที่สุด

และจากผลการศึกษานำร่องโดยการให้น้ำมันดิบ (crude oil) โดย crude oil 100 กรัม มีส่วนประกอบของไขมันไม่อิ่มตัวเท่ากับ 51.09 กรัม ซึ่งประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนชนิดกรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 ได้แก่ ALA (alpha-linolenic acid), EPA และ DHA และกรดไขมันชนิดโอเมก้า-6 ได้แก่ กรดไลโนเลนิก (gamma-linolenic acid) จากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1 มล./กก./วัน ร่วมกับการให้อาหารไขมันสูงต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ในหนูขาว พบว่า มีผลช่วยควบคุมระดับของกลูโคส และไขมันชนิดต่างๆ ในเลือดให้กลับเข้าสู่ค่าที่ใกล้เคียงกับในหนูขาวกลุ่มควบคุม โดยมีประสิทธิผลที่ไม่แตกต่างไปจากหนูขาวกลุ่มที่ได้รับ commercial fish oil ที่ใช้เป็น positive control นอกจากนี้ crude oil จากปลาหนึ่งลูกผสมยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดทดลองในแบบจำลองการกำจัดอนุมูล ABTS อีกด้วย โดยสรุปจากผลการวิจัยเบื้องต้นดังกล่าว แสดงให้เห็นว่า crude oil จากหนึ่งปลาผสมมีฤทธิ์ทาง

ชีวภาพที่ช่วยสนับสนุนการนำไปใช้ประโยชน์ในภาวะเบาหวานได้ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในเชิงลึกต่อไปในหนูที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานชนิดที่ 2

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาผลและกลไกการออกฤทธิ์ของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย) ต่อการลดระดับน้ำตาลในหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

2.2 เพื่อศึกษาของผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย) ต่อการต้านอนุมูลอิสระในหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

### 3. ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวานเป็นโรคเรื้อรังที่เกิดจากความผิดปกติของระบบต่อมไร้ท่อที่พบบ่อย และเป็นปัญหาที่สำคัญต่อภาวะสุขภาพของคนทั่วโลก สาเหตุของโรคเบาหวานเกิดจากพันธุกรรมและ/หรือมีความผิดปกติของการสร้างฮอร์โมนอินซูลินจากตับอ่อน หรือจากการที่ร่างกายมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนอินซูลินที่ลดลงหรือมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน โรคเบาหวานที่พบในปัจจุบัน อาจแบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆ คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (เดิมเรียก โรคเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลินหรือ Insulin dependent diabetes mellitus; IDDM) และโรคเบาหวานชนิดที่ 2 (เดิมเรียก โรคเบาหวานชนิดไม่พึ่งอินซูลินหรือ non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM) ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวเนื่องกันเป็นปัจจัยเสี่ยงของการเกิดโรค โรคเบาหวานชนิดที่พบได้บ่อยและเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศไทย คือ โรคเบาหวานชนิดที่ 2

ถึงแม้ว่าสาเหตุการเกิดโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จะเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย จากรายงานการศึกษาในคลินิกและในสัตว์ทดลอง พบว่า สารอนุมูลอิสระหรือการเกิดภาวะ oxidative stress มีบทบาทสำคัญต่อพยาธิสภาพการเกิดโรคเบาหวาน ในงานวิจัยหลายๆงาน พบว่า ในผู้ป่วยโรคเบาหวานที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ หรือมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง จะทำให้มีผลเพิ่มสารอนุมูลอิสระหรือก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress ในร่างกาย ทั้งจากกลไก auto-oxidation of glucose และ non-enzymatic protein glycation (Wolff *et al.*, 1987) อนุมูลอิสระจะถูกปล่อยออกมาในรูปของโมเลกุลที่ไม่ครบวงจรซึ่งพร้อมที่จะทำปฏิกิริยากับโมเลกุลตัวอื่น มีผลก่อฤทธิ์ที่เป็นพิษ (cytotoxic effect) ต่อ membrane phospholipids หรือ มีอันตรายเป็นต่อเซลล์ อาทิเช่น lipid peroxidation, ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ (inactivation of enzymes), เปลี่ยนแปลง intracellular oxidation-reduction state และอาจทำลาย DNA ได้ การเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระอาจเป็นผลมาจากการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น และ/หรือ มีการทำลายสารอนุมูลอิสระลดลง โดยปกติร่างกายมีกลไกที่จะลดสารอนุมูลอิสระโดยอาศัยเอนไซม์ที่มีบทบาทเกี่ยวกับการทำลายสารอนุมูลอิสระ (antioxidant enzymes) ได้แก่ glutathione peroxidase (GSH-Px) หรือ superoxide dismutase (SOD) หรือ อาศัยกลไกที่ไม่พึ่งเอนไซม์ (non-enzymatic scavenger components) ได้แก่

glutathione และ วิตามินอี ซึ่งสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะ oxidative stress ได้ (Simmons *et al.*, 1984) ในผู้ป่วยเบาหวานยังพบว่า การเพิ่มขึ้นของ สารอนุมูลอิสระหรือภาวะ oxidative stress เป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของโรคเบาหวาน เช่น การหลั่งฮอร์โมนอินซูลินลดลง ภาวะดื้อต่อฮอร์โมนอินซูลิน และการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆของโรคเบาหวาน ได้แก่ โรคต้อกระจก (cataract), โรคความดันโลหิตสูง (hypertension), โรคหลอดเลือดอุดตัน (arteriosclerosis), โรคไตวาย (renal failure) และโรคหัวใจ เป็นต้น ทั้งนี้มีรายงานว่าอัตราการป่วยและอัตราการตายของประชากรโลกเพิ่มขึ้นจากทั้งโรคเบาหวานโดยตรง และจากภาวะแทรกซ้อนดังกล่าวข้างต้น (Wolff *et al.*, 1987)

น้ำมันปลา (fish oil) เป็นน้ำมันที่สกัดจากส่วนของเนื้อ หนัง หัวและหางของปลา โดยเฉพาะจากปลาทะเล ในน้ำมันปลามีกรดไขมันหลายชนิด แต่กรดไขมันที่สำคัญและมีการนำไปใช้ประโยชน์ทางการแพทย์หรือส่งเสริมสุขภาพ ได้แก่ กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 และกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 กรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ที่สำคัญ 2 ชนิด คือ eicosapentaenoic acid (EPA) และ docosahexaenoic acid (DHA) ซึ่งเป็นกรดไขมันที่จำเป็นต่อร่างกายเพราะร่างกายคนไม่สามารถสร้างได้เอง สำหรับกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 6 นั้น พบมากในน้ำมันพืชหลายชนิด เช่น น้ำมันดอกคำฝอย น้ำมันดอกทานตะวัน ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาวิจัยทางการแพทย์ที่ยืนยันประโยชน์ของน้ำมันปลาต่อสุขภาพและการป้องกันโรค โดยเฉพาะในโรคเบาหวานพบว่า น้ำมันปลาสามารถช่วยให้คนไข้เบาหวานประเภทที่ 2 สามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดโดยการทำงานของฮอร์โมนอินซูลินได้ ซึ่งโรคเบาหวานชนิดนี้มักเกิดในคนอ้วนและมักมีภาวะดื้อต่ออินซูลิน นักวิจัยชาวเนเธอร์แลนด์พบว่าการกิน EPA ในปริมาณ 30 กรัมต่อวัน จะช่วยในการควบคุมน้ำตาลในเลือดให้ดีขึ้นในคนไข้เบาหวานชนิดที่ 2 นี้ นอกจากนี้ ดร.มาร์การเรท เจ อัลบริงค์ ศาสตราจารย์แห่งมหาวิทยาลัยเวสต์เวอร์จิเนีย เมืองมอร์แกนทาวน์ ศึกษาผลของน้ำมันปลาต่อระบบหัวใจและหลอดเลือดในคนไข้เบาหวาน พบว่า น้ำมันปลาในปริมาณสูง คือ ประมาณ 45 มล. ซึ่งมีกรดไขมันโอเมก้า 3 ประมาณ 18 กรัม มีผลลดระดับไตรกลีเซอไรด์และคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (Wallin *et al.*, 2012) ส่วนการศึกษาในสัตว์ทดลองยังช่วยยืนยันฤทธิ์การลดภาวะดื้อต่ออินซูลินได้ในเซลล์ไขมัน (Lombardo *et al.*, 2007) นอกจากประโยชน์ในการช่วยควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดแล้ว น้ำมันปลายังพบว่า สามารถช่วยต้านภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ได้ (Siriwardhana *et al.*, 2012)

#### 4. ระเบียบวิธีวิจัย

##### 4.1 การสกัดน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสม

น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมจะถูกเตรียมจากโครงการวิจัยย่อยที่ 2 เรื่องการสกัดน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย) เพื่อเพิ่มมูลค่าและการใช้ประโยชน์เป็นอาหารปลา

#### 4.2 การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในสัตว์ทดลอง

4.2.1 การศึกษาผลต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลาย (skeletal glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวปกติ เพื่อหาขนาดของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมที่เหมาะสมสำหรับการให้สัตว์ทดลอง (effective dose)

ทำการสลบสัตว์ทดลองภายหลังอดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 10-12 ชั่วโมง โดยใช้ pentobarbital sodium ขนาด 50 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว จากนั้นทำการผ่าตัดแยกกล้ามเนื้อกระบังลม โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (hemidiaphragm) ซ้ายและขวา นำมาล้างเลือดในสารละลาย balance salt solution ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส นำ hemidiaphragm แต่ละข้าง(แยกข้างซ้ายและขวา) ของสัตว์ทดลองแต่ละตัว ใส่ใน flask ที่มีสารละลาย balance salt solution ในภาวะที่ไม่มีอินซูลิน (basal glucose uptake) และ ในภาวะที่มีอินซูลิน (insulin-stimulated glucose uptake) ที่ความเข้มข้นของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่างๆ จากนั้นจึงทำการ incubate เป็นเวลา 90 นาที ใน shaking water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C โดยมี 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> ผ่านสารละลายใน flask ตลอดเวลา ภายหลังครบ 90 นาที นำ hemidiaphragm ออกมาชั่งน้ำหนัก และตรวจความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในสารละลาย เพื่อใช้สำหรับคำนวณค่าของ skeletal glucose uptake และค่าความเข้มข้นของน้ำมันปลาที่เหมาะสมสำหรับการให้สัตว์ทดลอง (effective dose) ต่อไป

#### 4.2.2 การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

หนูขาวเพศผู้พันธุ์ wistar (น้ำหนักตัว 200-250 กรัม) โดยแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ได้แก่

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม (control) (NDC)

กลุ่มที่ 2: กลุ่มควบคุมได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมความเข้มข้นสูง ขนาด 1,000 mg/kg BW/day (NFO)

กลุ่มที่ 3: กลุ่มเบาหวานควบคุม (DMC)

กลุ่มที่ 4: กลุ่มเบาหวานได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมความเข้มข้นต่ำ ขนาด 500 mg/kg BW/day (DMFO500)

กลุ่มที่ 5: กลุ่มเบาหวานได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมความเข้มข้นสูง ขนาด 1,000 mg/kg BW/day (DMFO1,000)

กลุ่มที่ 6: กลุ่มเบาหวานได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW/day (DMCFO)

กลุ่มที่ 7: กลุ่มเบาหวานได้รับน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด ขนาด 1,000 mg/kg BW/day (DMmet)

สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 3-7 จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 โดยการให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นฉีดสาร streptozotocin (STZ) ขนาด 35 mg/kg BW เข้าทางช่องท้อง โดยสัตว์ทดลองจะได้รับอาหารไขมันสูงต่อเนื่องจนสิ้นสุดการทดลอง สัตว์ทดลองที่ถูกฉีดสาร STZ เป็นเวลา 2

สัปดาห์ ที่มีระดับพลาสมา glucose ภายหลังอดอาหาร 8 ชั่วโมง  $\geq 250$  mg% และไม่มีภาวะ hypoinsulinemia จะถือว่าเกิดภาวะเบาหวานและจะถูกนำไปศึกษาทดลองต่อไป และสำหรับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 2, 4 และ 5 จะได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสม โดยการป้อนเข้าปากทุกวัน ในขณะที่สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ 7 จะได้รับน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ สัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะได้รับอาหารและน้ำอย่างเพียงพอ ทำการบันทึกน้ำหนักทุกสัปดาห์ตลอดการทดลอง เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจและเนื้อเยื่อต่างๆ เพื่อวิเคราะห์ค่าชีวเคมีในพลาสมา

1. การศึกษาฤทธิ์ในการลดระดับสารเคมี (glucose, insulin, leptin, adiponectin และไขมัน) ในเลือดและเนื้อเยื่อของหนูเบาหวานชนิดที่ 2

การวิเคราะห์ทางชีวเคมีในเลือด ทำการตรวจวัดระดับพลาสมา glucose, triglyceride (TG) และ cholesterol โดยใช้เทคนิค enzymatic test โดยใช้ commercial kit และทำการตรวจวัดระดับพลาสมา insulin leptin และ adiponectin ใช้เทคนิคการตรวจวัดวิธี ELISA โดยใช้ commercial kit ความไวในการตอบสนองของเนื้อเยื่อร่างกายต่ออินซูลิน (whole body insulin resistance) จะประเมินโดยใช้ HOMA index ( $HOMA = \text{ผลคูณของระดับ insulin (uU/ml) และระดับ glucose (mmol/L) ในพลาสมา} / 22.5$ ) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของระดับ glucose ในพลาสมาหลังจากป้อนสารละลายกลูโคสในการทดสอบความทนทานกลูโคสโดยจะแสดงในค่าของพื้นที่ใต้กราฟ (area under curve, AUC)

การวิเคราะห์ทางชีวเคมีในเนื้อเยื่อ ทำการตรวจปริมาณ TG ในตับและ red gastrocnemius เพื่อประเมินภาวะ hepatic and muscle insulin resistance โดยการนำชิ้นเนื้อตับมาบดในสารละลาย chloroform isopropanol และทิ้งไว้ในห้องมืด เมื่อครบ 16 ชั่วโมง ดูดสารละลายที่ TG ที่ถูกสกัดจำนวน 1 ml และนำมาอบให้แห้ง จากนั้นจึงนำมาละลายในสารละลาย bovine serum albumin และตรวจหาระดับ TG โดยใช้ commercial kit

การตรวจวัดปริมาณโปรตีน GLUT4 ในกล้ามเนื้อ soleus โดยใช้ western blot analysis เพื่อประเมินความสามารถในการนำกลูโคสเข้าเซลล์กล้ามเนื้อ โดยนำชิ้นกล้ามเนื้อมาบดและปั่นเพื่อแยกส่วนของผนังเซลล์ (membrane fraction) เพื่อนำไปแยกหาโปรตีน จากนั้นนำไปหาปริมาณโปรตีน โดยใช้ primary antibody ต่อ Glut-4 (anti Glut - 4 primary antibody) หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มของโปรตีนที่ปรากฏ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

การศึกษาการส่งสัญญาณภายในของอินซูลิน (insulin signaling) ในกล้ามเนื้อ soleus โดยใช้วิธี immunoprecipitate และ western blot analysis โดยการวัดการปรากฏของ PI3K, Akt phosphorylation of Akt (Ser 473), PKC $\zeta$  และ phosphorylation of PKC $\zeta$  (Thr410/403) โดยนำเนื้อเยื่อมาบดโดยใช้เครื่อง homogenizer หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อมาปั่นแยกโดยใช้เครื่องปั่นแบบหมุนเหวี่ยง เมื่อได้ส่วนของโปรตีนแล้วนำมาหาปริมาณโปรตีนก่อน จากนั้นทำการแยกโปรตีนที่สนใจโดยใช้ primary

antibody ต่อ PI3K, Akt phosphorylation of Akt (Ser 473), PKC $\zeta$  และ phosphorylation of PKC $\zeta$  (Thr410/403) หลังจากนั้นทำการวัดความเข้มข้นของโปรตีนที่ปรากฏ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2. การศึกษาผลต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลาย (skeletal glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่แยกออกจากตัว (isolated hemidiaphragm)

การเตรียมกล้ามเนื้อกระบังลม ทำการสลบสัตว์ทดลองภายหลังอดอาหารเป็นเวลาอย่างน้อย 10 - 12 ชั่วโมง โดยใช้ pentobarbital sodium ขนาด 50 mg/kg BW จากนั้นทำการผ่าตัดแยกกล้ามเนื้อกระบังลม โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน (hemidiaphragm) ซ้ายและขวา นำมาล้างเลือดในสารละลาย balance salt solution ที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคส

นำ hemidiaphragm แต่ละข้าง (แยกข้างซ้ายและขวา) ของสัตว์ทดลองแต่ละตัว ใส่ใน flask ที่มีสารละลาย balance salt solution ในภาวะที่ไม่มีอินซูลิน (basal glucose uptake) และ ในภาวะที่มีอินซูลิน (insulin-stimulated glucose uptake) จากนั้นทำการ incubate เป็นเวลา 90 นาที ใน shaking water bath ที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C โดยมี 95%O<sub>2</sub>-5%CO<sub>2</sub> ผ่านสารละลายใน flask ตลอดเวลา ภายหลังครบ 90 นาที นำ hemidiaphragm ออกมาชั่งน้ำหนัก และตรวจความเข้มข้นของกลูโคสที่เหลือในสารละลาย เพื่อใช้สำหรับคำนวณค่าของ skeletal glucose uptake ต่อไป

3. การศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของหนูเบาหวานชนิดที่ 2

การวัดปริมาณมาลอนไดอัลดีไฮด์จากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชัน ใช้ซีรัมตกตะกอนโปรตีนด้วย trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิต่ำ เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาปั่นแยกเอาส่วน supernatant เพื่อมาทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ที่อุณหภูมิ 100 °C วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร โดยใช้ชุดน้ำยาตรวจโดยเทียบหาความเข้มข้นจากกราฟมาตรฐาน

## 5. ผลการวิจัย

### 5.1 การสกัดน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย)

ตารางที่ 3-1 ชนิดของไขมัน (fatty acid) ชนิดต่างๆ ที่พบในน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย) และน้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาด

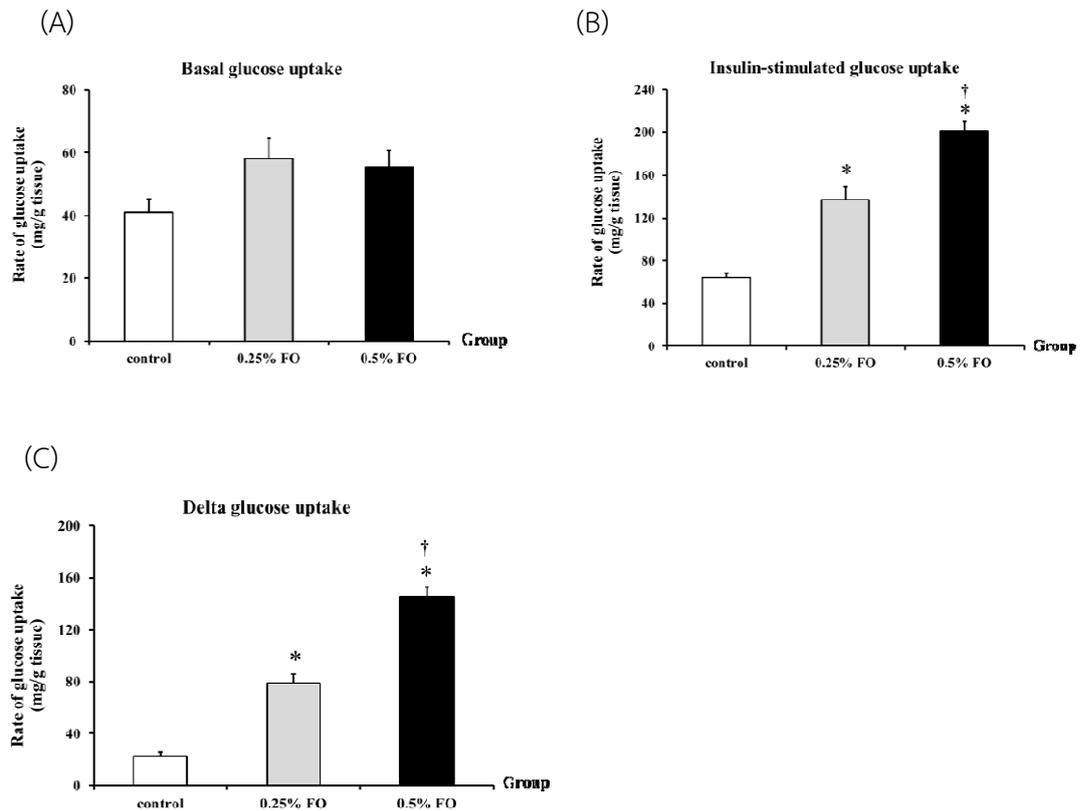
ชนิดกรดไขมัน (fatty acid composition)	ปริมาณ (g/100g)		
	Crude oil	Crude oil +carbon	Fish oil (commercial grade)
ไขมันอิ่มตัว (Saturated fat)	42.99	35.93	35.27
ไขมันไม่อิ่มตัว (Unsaturated fatty acid)	57.03	64.06	64.75
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (Monounsaturated fatty acid)	42.57	46.97	23.78
กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (Polyunsaturated fatty acid)	14.46	17.09	40.97
Omega-3	1.83	2.20	34.15
Eicosapentaenoic acid (C20: 5n3)	0.20	0.21	20.98
Docosahexaenoic acid (C22:6n3)	0.44	0.34	12.25
Omega-6	11.93	14.23	6.24
Omega-9	38.72	41.32	11.94

ผลการตรวจวิเคราะห์ชนิดของไขมันชนิดต่างๆ ที่พบในน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ปลาเทโพ x ปลาสวาย) ดังแสดงในตารางที่ 3-1 พบว่า น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมประกอบด้วยกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) เพียง 35.93% และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เป็นส่วนมากถึง 64.06% ซึ่งประกอบด้วย monounsaturated fatty acids 46.97% ได้แก่ กรดไขมันชนิดโอเมก้า-9 41.32% ที่สำคัญคือ oleic acid 41.19% และ polyunsaturated fatty acids 17.09% ได้แก่ กรดไขมันชนิดโอเมก้า-6 14.23% (เช่น linolenic acid 12.45%), กรดไขมันชนิดโอเมก้า-3 2.20% (เช่น  $\alpha$ -linolenic acid 1.48%, eicosapentaenoic acid (0.21%, docosahexaenoic acid 0.34%)

เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาด พบว่า น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมมีปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัวและกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ใกล้เคียงกัน คือ 35.27% vs. 35.93% และ 64.75% vs. 64.06% ตามลำดับ แต่น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมจะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูงกว่า (46.97%) ขณะที่น้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาดจะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงกว่า (40.97%)

## 5.2 ผลการทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในสัตว์ทดลอง

5.2.1 การศึกษาผลต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลาย (skeletal glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวปกติ เพื่อหาขนาดของน้ำมันปลาที่เหมาะสมสำหรับการให้สัตว์ทดลอง (effective dose)



ภาพที่ 3-1 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในภาวะ basal (A), insulin-stimulated (B) และ delta (C) glucose uptake ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวปกติ \* $p < 0.05$ ; significantly different from the control group, † $p < 0.05$ ; significantly different from the 0.25% FO group.

จากภาพที่ 3-1(A) แสดงปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อกระบังลมในภาวะที่ไม่มีฮอร์โมนอินซูลิน (Basal glucose uptake) ผลการทดลอง พบว่า ปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อกระบังลมในภาวะที่ไม่มีฮอร์โมนอินซูลินมากกระตุ้นระหว่างกล้ามเนื้อควบคุม (ไม่มีน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสม) และกล้ามเนื้อที่ถูก incubate ด้วยน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาดต่างๆ (0.25 g% และ 0.5 g% ตามลำดับ) ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในภาวะที่มีฮอร์โมนอินซูลิน (25 IU/ml) ดังแสดงในภาพที่ 3-1(B) พบว่า ปริมาณกลูโคสที่เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อกระบังลมมีค่าเพิ่มขึ้นในทุกกลุ่มทดลอง และที่สำคัญน้ำมัน

ปลาจากปลาหนังลูกผสม (0.25 g% และ 0.5 g% ) มีผลเพิ่มการพากลูโคสที่เข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อกระบังลมที่กระตุ้นโดยฮอร์โมนอินซูลิน (Insulin-stimulated glucose uptake) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกล้ามเนื้อควบคุม ในลักษณะของ dose dependent manner ( $137.32 \pm 11.91$ ,  $200.85 \pm 9.76$  และ  $63.81 \pm 4.48$  mg/g tissue ตามลำดับ) และเช่นเดียวกันจากภาพที่ 3-1(C) ซึ่งแสดงค่าของการพากลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อโดยฤทธิ์ของอินซูลิน หรือ  $\Delta$  glucose uptake พบว่า ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมมีค่าการพากลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อโดยฤทธิ์ของอินซูลินเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในขนาด 0.25g% และ 0.5g% ( $79.23 \pm 6.71$  ,  $145.30 \pm 7.59$  และ  $22.75 \pm 3.09$  mg/g tissue ตามลำดับ) ในลักษณะของ dose dependent manner เช่นเดียวกัน

จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมมีผลเพิ่มฤทธิ์ของฮอร์โมนอินซูลินต่อการกระตุ้นการพากลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวปกติ ทั้งในขนาด 0.25 g% และ 0.5 g% ซึ่งคิดเปรียบเทียบได้เท่ากับขนาด 150 mg/kg BW และ 300 mg/kg BW ตามลำดับ และขนาดที่ได้ดังกล่าวนี้จะถูกนำไปประยุกต์เพื่อใช้ในการศึกษาทดลองในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวานชนิดที่ 2 ต่อไป สำหรับกลไกเบื้องต้นที่อาจเกี่ยวข้องในการเพิ่มฤทธิ์ของฮอร์โมนอินซูลินต่อการกระตุ้นการพากลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อกระบังลมนั้น จะมีการศึกษาในลำดับต่อไปทั้งใน isolated muscle และในสัตว์ทดลอง

### 5.2.2 การทดสอบฤทธิ์ชีวภาพในสัตว์ทดลอง

1. ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีดสารสเตโรบิโตไซโตซิน

การศึกษาดังกล่าวนี้นับเป็นงานที่ต่อเนื่องจากการศึกษาผลต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลาย (skeletal glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวปกติเพื่อหาขนาดของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมที่เหมาะสมสำหรับการให้สัตว์ทดลอง พบว่า ขนาดที่มีผลต่อการกระตุ้นการพากลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อกระบังลมนั้นเทียบเท่ากับขนาด 300 mg/kg BW ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเลือกใช้ขนาดของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมที่จะให้แก่สัตว์ทดลองในเบื้องต้นเริ่มที่ขนาด 500 mg/kg BW/day และขนาด 1,000 mg/kg BW/day ก่อนเพื่อให้เห็นผลที่เด่นชัด

ตารางที่ 3-2 แสดงลักษณะของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 เมื่อเริ่มการทดลอง

	Normal rats	Diabetic rats
<b>Body weight (g)</b>	<b>345 ± 4.90</b>	<b>333 ± 3.50</b>
<b>Plasma glucose level (mg/dl)</b>	<b>163.02 ± 2.44</b>	<b>329.88 ± 8.60 *</b>
<b>Plasma insulin level (ng/ml)</b>	<b>1.43 ± 0.24</b>	<b>2.12 ± 0.20</b>

หมายเหตุ \* $p < 0.05$ ; Diabetic rats vs. Normal rats, n=10

จากตารางที่ 3-2 แสดงถึงน้ำหนักตัว ระดับน้ำตาลกลูโคส และระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดของกลุ่มหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 หลังการให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 2 สัปดาห์ แล้วฉีดสารสเตรบิโตโซโตซินเข้าทางช่องท้องเป็นเวลา 14 วัน พบว่า น้ำหนักตัวของทั้งกลุ่มหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานชนิดที่ 2 สูงกว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ในขณะที่ระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดของสัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ หรืออาจกล่าวได้ว่าไม่พบภาวะ hypoinsulinemia ในกลุ่มหนูเบาหวานชนิดที่ถูกฉีดสารสเตรบิโตโซโตซิน ซึ่งจากผลการทดลองในตารางที่ 3-2 ดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอาหารไขมันสูงร่วมกับการฉีดสารสเตรบิโตโซโตซินนั้น แสดงลักษณะอาการสำคัญของโรคเบาหวานชนิดที่ 2 คือ มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) โดยที่ไม่มีภาวะการขาดฮอร์โมนอินซูลิน (hypoinsulinemia) และสามารถนำไปใช้ในการศึกษานี้ได้อย่างเหมาะสมต่อไป

**ตารางที่ 3-3** แสดงผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อน้ำหนักตัวและน้ำหนักของไขมันในช่องท้องเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

	NDC	NFO	DMC	DMFO500	DMFO1000	DMCFO	DMMet
Body weight (g)	523.75 ± 17.67	513.13 ± 10.81	530.63 ± 17.15	533.75 ± 22.48	459.29 ± 25.67 <sup>#, †</sup>	492.86 ± 13.31	523.75 ± 12.67
Visceral fat (g)	39.67 ± 2.22	41.38 ± 2.92	53.24 ± 3.44*	54.48 ± 5.44*	37.94 ± 4.10 <sup>#, †</sup>	42.59 ± 3.69	50.10 ± 3.15*
Visceral fat/Body weight	0.076 ± 0.008	0.080 ± 0.005	0.100 ± 0.005*	0.100 ± 0.007*	0.082 ± 0.007 <sup>#</sup>	0.086 ± 0.006	0.095 ± 0.004*

หมายเหตุ \* $p < 0.05$  vs. NDC, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs. DMC, <sup>†</sup>  $p < 0.05$  vs. DMMet, n=10

จากตารางที่ 3-3 ซึ่งแสดงถึงน้ำหนักตัวและน้ำหนักของไขมันในช่องท้องของสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูขาวปกติไม่มีผลที่ทำให้ น้ำหนักตัวและปริมาณไขมันในช่องท้องเพิ่มสูงขึ้น สำหรับหนูขาวกลุ่มเบาหวานควบคุม (DMC) นั้นพบว่า ถึงแม้จะมีน้ำหนักตัวที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติควบคุม (NDC,  $p > 0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า หนูขาวกลุ่มเบาหวานควบคุมมีน้ำหนักของไขมันในช่องท้องและสัดส่วนไขมันในช่องท้องต่อน้ำหนักตัวที่มากกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) บ่งชี้ว่าหนูเบาหวานนี้มีภาวะอ้วนลงพุงขึ้น

การให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูขาวที่มีภาวะเบาหวาน เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า กลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW มีผลช่วยลดทั้งน้ำหนักตัว น้ำหนักของไขมันในช่องท้อง และสัดส่วนไขมันในช่องท้องต่อน้ำหนักตัวอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $p < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่าการให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูขาวที่เบาหวานชนิดที่ 2 ในขนาด 1,000 mg/kg BW มีผลช่วยทำให้มีการสะสมของไขมันในช่องท้องลดลง ในขณะที่การให้ยา

metformin ไม่มีผลต่อน้ำหนักตัวหรือน้ำหนักของไขมันในช่องท้องของหนูเบาหวาน และที่น้ำหนักใจคือกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW พบว่า มีน้ำหนักตัวและน้ำหนักของไขมันในช่องท้อง ต่ำกว่ากลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา metformin อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

2. ผลการศึกษาผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อระดับ plasma biochemical parameters ในเลือดในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

ตารางที่ 3-4 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อระดับ plasma biochemical parameters

	NDC	NFO	DMC	DMFO500	DMFO1000	DMCFO	DMMet
Glucose (mg/dl)	152.43 ± 4.54	143.48 ± 7.29	377.85 ± 26.87*	289.52 ± 19.46* <sup>#</sup>	274.63 ± 20.29* <sup>#</sup>	297.87 ± 17.79* <sup>#</sup>	254.43 ± 10.77* <sup>#</sup>
Insulin (ng/ml)	2.21 ± 0.33	2.74 ± 0.51	3.27 ± 0.30*	2.58 ± 1.38	1.71 ± 0.33 <sup>#</sup>	2.52 ± 0.42	2.03 ± 0.28 <sup>#</sup>
Triglyceride (mg/dl)	80.28 ± 3.01	81.70 ± 3.46	126.78 ± 13.55*	90.35 ± 8.17* <sup>†</sup>	69.20 ± 7.22 <sup>#</sup>	75.62 ± 9.23 <sup>#</sup>	64.50 ± 6.54 <sup>#</sup>
Cholesterol (mg/dl)	82.75 ± 3.52	79.86 ± 4.01	98.11 ± 3.79*	90.65 ± 5.02	85.20 ± 4.74 <sup>#</sup>	91.75 ± 4.26	86.30 ± 1.69 <sup>#</sup>
LDL (mg/dl)	14.75 ± 1.65	12.60 ± 0.98	13.00 ± 1.79	12.60 ± 2.16	12.50 ± 1.19	11.60 ± 1.63	15.00 ± 1.76
HDL (mg/dl)	49.00 ± 1.78	48.40 ± 3.88	50.33 ± 2.19	54.20 ± 5.16	62.25 ± 4.79	59.00 ± 3.52	62.60 ± 2.69
Leptin (ng/ml)	19.55 ± 1.46	21.39 ± 1.15	27.89 ± 2.52*	26.49 ± 3.18*	17.54 ± 1.91 <sup>#</sup>	16.96 ± 1.61 <sup>#</sup>	21.10 ± 2.13 <sup>#</sup>
Adiponectin (µg/ml)	27.46 ± 2.42	25.46 ± 4.68	21.17 ± 2.11*	29.98 ± 1.79 <sup>#</sup>	33.46 ± 3.12 <sup>#</sup>	30.06 ± 1.75 <sup>#</sup>	26.07 ± 2.40
HOMA-index	0.80 ± 0.12	0.87 ± 0.20	3.18 ± 0.36*	1.83 ± 0.29* <sup>#</sup>	1.13 ± 0.26 <sup>#</sup>	1.82 ± 0.26* <sup>#</sup>	1.33 ± 0.24 <sup>#</sup>

หมายเหตุ \* $p < 0.05$  vs. NDC, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs. DMC, <sup>†</sup>  $p < 0.05$  vs. DMMet, n=10

จากผลการทดลองในตารางที่ 3-4 พบว่า กลุ่มหนูปกติควบคุม (NDC) และกลุ่มหนูปกติที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW (NFO) มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในขนาดสูง (1,000 mg/kg BW) ไม่มี adverse side effects ที่ทำให้เกิดภาวะ hypoglycemia ในหนูปกติ และสำหรับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) นั้นจะเห็นว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตลอดการทดลองทั้งและเมื่อครบ 12 สัปดาห์แล้ว พบว่า กลุ่มหนูเบาหวานควบคุมมีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดสูงกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ , 377.85 ± 26.87 mg/dl vs. 152.43 ± 4.54 mg/dl) เมื่อทำการป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวาน พบว่า หนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW (DMFO 1,000) มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำกว่า (-27.32%) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) อย่างมีนัยสำคัญ (274.63 ± 20.29 mg/dL และ 377.85 ± 26.87

mg/dL ,  $p < 0.05$  ตามลำดับ) ในขณะที่การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานขนาด 500 mg/kg BW (DMFO 500) จะพบว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำกว่ากลุ่มหนูเบาหวานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน (-23.4% ,  $289.52 \pm 19.46$  mg/dL และ  $377.85 \pm 26.87$  mg/dL ,  $p < 0.05$  ตามลำดับ) เพียงแต่ว่าการป้อนน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานที่ขนาด 1,000 mg/kg BW จะเริ่มเห็นผลลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดอย่างมีนัยสำคัญได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 ในขณะที่การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานที่ขนาด 500 mg/kg BW นั้น จะเริ่มเห็นผลลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดอย่างมีนัยสำคัญได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 8 ส่วนผลของการให้น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูเบาหวาน (DMCFO) นั้น พบว่า มีลักษณะคล้ายกับผลของกลุ่ม DMFO 500 กล่าวคือ ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดไม่แตกต่างจากกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) ใน 4 สัปดาห์แรกของการป้อน แต่เมื่อป้อนต่อไปจนถึงสัปดาห์ที่ 12 พบว่า ระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำกว่ากลุ่มหนูเบาหวานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (-21.2% ,  $297.87 \pm 17.79$  และ  $377.85 \pm 26.87$  mg/dL,  $p < 0.05$  ตามลำดับ) สำหรับการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ในหนูเบาหวาน (DMMet) นั้นมีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดได้อย่างมีประสิทธิภาพดีที่สุด กล่าวคือ มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่ำกว่า (25.2%) เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ในสัปดาห์ที่ 4 ( $295.93 \pm 33.9$  และ  $395.51 \pm 9.8$  mg/dL,  $p < 0.05$  ตามลำดับ) และ ลดลงถึง 32.7% เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมในสัปดาห์ที่ 12 ( $254.43 \pm 10.77$  mg/dL และ  $377.85 \pm 26.87$  mg/dL,  $p < 0.05$  ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดระหว่างกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW กับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา metformin พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาทดลองดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นศักยภาพในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (antihyperglycemic effect) ของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 และพบว่า ในขนาดที่เท่ากัน (1,000 mg/kg BW) นั้น น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมสามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดได้ภายในระยะเวลาที่เร็วกว่าและลดได้มากกว่าน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด และที่สำคัญคือยังมีประสิทธิผลในการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ใกล้เคียงยา metformin ที่ขนาด 50 mg/kg BW

สำหรับผลต่อระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดนั้น พบว่าการป้อนน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW ไม่มีทำให้ระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดของหนูขาวปกติมีการเปลี่ยนแปลง ( $2.74 \pm 0.51$  vs.  $2.21 \pm 0.33$  ng/mL) และเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลต่อระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน บ่งชี้ว่าน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมที่ขนาด 1,000 mg/kg BW ไม่ผลต่อการควบคุม glucose homeostasis และ insulin sensitivity ในหนูขาวปกติซึ่งยืนยันด้วยค่า HOMA index ที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $0.87 \pm 0.20$  vs.  $0.80 \pm 0.12$ ,  $p > 0.05$ ) ส่วนในกลุ่มหนูเบาหวานควบคุมนั้น จะเห็นว่ามียกระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $3.27 \pm 0.30$  vs.  $2.21 \pm 0.33$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) บ่งชี้ว่ามีภาวะ hyperinsulinemia และยืนยันด้วยค่า HOMA index ที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

( $3.18 \pm 0.36$  vs.  $0.80 \pm 0.12$ ,  $p < 0.05$ ) ซึ่งบ่งชี้และยืนยันว่าเกิดภาวะ insulin resistance ขึ้น และเมื่อทำการป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า หนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด  $1,000$  mg/kg BW มีการลดลงของระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ( $1.71 \pm 0.33$  vs.  $3.27 \pm 0.30$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) สอดคล้องกับการลดลงของ HOMA index ( $1.13 \pm 0.26$  vs.  $3.18 \pm 0.36$ ,  $p < 0.05$ ) แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของ insulin resistance หรืออาจกล่าวว่าการเพิ่ม insulin sensitivity ให้ดีขึ้น ซึ่งผลดังกล่าวในลักษณะเช่นนี้ยังพบได้ในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้ยา metformin ทั้งระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดและ HOMA index ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $2.03 \pm 0.28$  vs.  $3.27 \pm 0.30$  ng/mL และ  $1.33 \pm 0.24$  vs.  $3.18 \pm 0.36$ ,  $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกันสำหรับการป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานที่ขนาด  $500$  mg/kg BW และป้อนด้วยน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด  $1,000$  mg/kg BW นั้น พบว่า ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทั้งระดับฮอร์โมนอินซูลินในเลือดเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม อย่างไรก็ตามการป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานที่ขนาด  $500$  mg/kg BW และป้อนด้วยน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด  $1,000$  mg/kg BW มีผลช่วยลด HOMA index อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ( $1.83 \pm 0.29$ ,  $1.82 \pm 0.26$  vs.  $3.18 \pm 0.36$  ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) แต่ถ้าเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ให้ treatment แล้วจะเห็นว่าหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด  $1,000$  mg/kg BW มีการลดลงของ HOMA index มากที่สุด ( $-64.5\%$ ) รองลงมาตามลำดับ คือ การให้ยา metformin ( $-58.2\%$ ), การป้อนด้วยน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด  $1,000$  mg/kg BW ( $-42.8\%$ ) และ การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานที่ขนาด  $500$  mg/kg BW ( $-42.5\%$ )

สำหรับผลต่อระดับฮอร์โมน leptin ในเลือดนั้น พบว่า การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด  $1,000$  mg/kg BW ขนาด  $1,000$  mg/kg BW ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมน Leptin ในเลือดของหนูขาวปกติ ดังแสดงในตารางที่ 3-4 ( $21.39 \pm 1.15$  vs.  $19.55 \pm 1.46$  ng/mL,  $p > 0.05$ ) แต่ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า จะมีระดับฮอร์โมน leptin ในเลือดเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $27.89 \pm 2.52$  vs.  $19.55 \pm 1.46$  ng/mL,  $p < 0.05$ ) และเมื่อป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด  $1,000$  mg/kg BW และน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด  $1,000$  mg/kg BW พบว่า มีผลลดระดับฮอร์โมน leptin ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $17.54 \pm 1.91$ ,  $16.96 \pm 1.61$  vs.  $27.89 \pm 2.52$  ng/mL,  $p > 0.05$ ) ซึ่งคิดเป็น  $-37\%$  และ  $-39\%$  ตามลำดับ ส่วนการให้ยา metformin ขนาด  $50$  mg/kg BW ก็สามารถลดระดับฮอร์โมน leptin ในเลือดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน ( $-24\%$ ,  $21.10 \pm 2.13$  vs.  $27.89 \pm 2.52$  ng/mL,  $p > 0.05$ )

ผลต่อระดับฮอร์โมน adiponectin ในเลือดนั้น พบว่า การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด  $1,000$  mg/kg BW ไม่มีผลต่อระดับฮอร์โมน adiponectin ในเลือดของหนูขาวปกติ ดังแสดงในตารางที่ 3-4 ( $25.46 \pm 4.68$  vs.  $27.46 \pm 2.42$   $\mu$ g/mL,  $p > 0.05$ ) แต่ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า ระดับฮอร์โมน

adiponectin ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $21.17 \pm 2.11$  vs.  $27.46 \pm 2.42$   $\mu\text{g/mL}$ ,  $p < 0.05$ ) และในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 นั้น เป็นที่น่าสนใจว่าการป้อนด้วยน้ำมันปลาทั้งน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW และการป้อนด้วยน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW สามารถเพิ่มระดับของฮอร์โมน adiponectin ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานควบคุม ( $29.98 \pm 1.79$ ,  $33.46 \pm 3.12$ ,  $30.06 \pm 1.75$  vs.  $21.17 \pm 2.11$   $\mu\text{g/mL}$  ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) โดยที่กลุ่มที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW มีระดับของฮอร์โมน adiponectin เพิ่มขึ้นมากที่สุดถึง 58% ในขณะที่การให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW นั้นไม่มีผลเพิ่มฮอร์โมน adiponectin ในเลือดของหนูเบาหวาน

ดังแสดงในตารางที่ 3-4 พบว่า การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูขาวปกติไม่มีผลต่อระดับของไขมันต่างๆ ในเลือด ได้แก่ triglyceride, cholesterol, LDL และ HDL ( $p > 0.05$ ) และในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า ระดับของ triglyceride และ cholesterol ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มหนูควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $126.78 \pm 13.55$  vs.  $80.28 \pm 3.01$  mg/dL,  $98.11 \pm 3.79$  vs.  $82.75 \pm 3.52$  mg/dL ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) แต่ระดับของ LDL และ HDL นั้น พบว่า ไม่แตกต่างกัน ( $13.00 \pm 1.79$  vs.  $14.75 \pm 1.65$  mg/dL,  $50.33 \pm 2.19$  vs.  $49.00 \pm 1.78$  mg/dL,  $p > 0.05$ ) และเมื่อครบ 12 สัปดาห์ของการให้น้ำมันปลาชนิดต่างๆ พบว่า ทั้งน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW และน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW สามารถลดระดับ triglyceride ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม เช่นเดียวกับผลที่พบในกลุ่มที่ได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ( $p < 0.05$ ) โดยระดับ triglyceride ในเลือดของกลุ่มที่ได้รับยา metformin ลดลง 49% ในขณะที่กลุ่มที่ป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW ลดลง 45.4% สำหรับผลต่อระดับ cholesterol ในเลือดนั้น พบว่า เฉพาะการป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW (-13.2%) และกลุ่มที่ได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW (-12%) เท่านั้นที่มีผลลดระดับ cholesterol ในเลือดของหนูเบาหวานชนิดที่ 2 แม้ว่าการ treatment ต่างๆ ในการศึกษาจะไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับไขมัน LDL และ HDL ในเลือด แต่ก็เป็นที่น่าสนใจว่าทั้งการป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW และยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีแนวโน้มที่จะเพิ่มระดับของไขมัน HDL ในเลือด โดยการป้อนด้วยน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW พบว่าระดับของไขมัน HDL ในเลือดเพิ่มขึ้น 23.7% และ กลุ่มที่ได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีระดับของไขมัน HDL ในเลือดเพิ่มขึ้น 24.4%

3. ผลการศึกษาผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อการต้านอนุมูลอิสระของหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

ตารางที่ 3-5 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อระดับ plasma MDA

	NDC	NFO	DMC	DMFO500	DMFO1000	DMCFO	DMMet
Plasma MDA ( $\mu\text{M}$ )	3.85 $\pm$ 0.50	4.05 $\pm$ 0.36	8.19 $\pm$ 0.92*	4.26 $\pm$ 0.62 <sup>#</sup>	3.52 $\pm$ 0.51 <sup>#</sup>	4.20 $\pm$ 0.51 <sup>#</sup>	5.08 $\pm$ 0.64 <sup>#</sup>

หมายเหตุ \*  $p < 0.05$  vs. NDC, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs. DMC, n=10

จากตารางที่ 3-5 แสดงผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อระดับ MDA ในเลือด ซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ถึงภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้น พบว่า ในกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) มีระดับของ plasma MDA สูงกว่ากลุ่มควบคุม (NDC) อย่างมีนัยสำคัญ (8.19 $\pm$ 0.92 vs. 3.85 $\pm$ 0.50  $\mu\text{M}$ ,  $p < 0.05$ ) แสดงว่า ในภาวะเบาหวานซึ่งมี hyperglycemia จะส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้น และเมื่อทำการป้อนสารทดสอบในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (ขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW), น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีระดับ MDA ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (4.26 $\pm$ 0.62, 3.52 $\pm$ 0.51, 4.20 $\pm$ 0.51, 5.08 $\pm$ 0.64 vs. 8.19 $\pm$ 0.92  $\mu\text{M}$  ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) โดยที่น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW สามารถลดระดับ MDA ในเลือดได้มากที่สุดถึง 57%

4. ผลการศึกษาผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อระดับ tissue triglyceride accumulation ในเลือดในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

ตารางที่ 3-6 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อระดับ tissue triglyceride

	NDC	NFO	DMC	DMFO500	DMFO1000	DMCFO	DMMet
Hepatic triglyceride (mg/g tissue)	29.51 $\pm$ 2.45	26.28 $\pm$ 2.51	65.93 $\pm$ 6.84*	65.15 $\pm$ 8.80*	57.57 $\pm$ 5.71*	67.63 $\pm$ 9.40*	68.24 $\pm$ 8.85*
Muscle triglyceride (mg/g tissue)	8.03 $\pm$ 0.79	8.99 $\pm$ 0.65	10.95 $\pm$ 1.11*	8.35 $\pm$ 1.04	8.38 $\pm$ 1.56	9.01 $\pm$ 1.17	7.90 $\pm$ 0.49 <sup>#</sup>

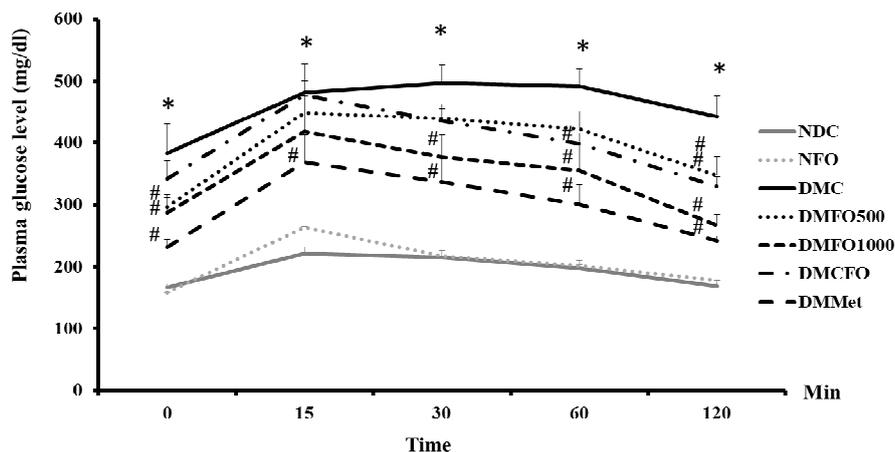
หมายเหตุ \*  $p < 0.05$  vs. NDC, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs. DMC, n=10

จากตารางที่ 3-6 แสดงผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อปริมาณ triglyceride ที่สะสมในตับ พบว่า ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 มีปริมาณ hepatic triglyceride สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (65.93 $\pm$ 6.84 vs. 29.51 $\pm$ 2.45 mg/g tissue) และการให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานชนิด

ที่ 2 ด้วย ขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า ไม่มีผลช่วยลดปริมาณ hepatic triglyceride อย่างนัยสำคัญ ( $p>0.05$ ) แต่อย่างไรก็ตามหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนัง ลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW ยังพบว่า hepatic triglyceride ลดลงได้มากที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานควบคุม (-12.69%,  $p>0.05$ )

สำหรับปริมาณ triglyceride ที่สะสมในกล้ามเนื้อ (muscle triglyceride) ดังแสดงในตารางที่ 3-6 พบว่า ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 มีปริมาณ muscle triglyceride สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $10.95\pm 1.11$  vs.  $8.03\pm 0.79$  mg/g tissue) และการให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ด้วยขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW ติดต่อกันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า มีผลลดการสะสมของ triglyceride ในกล้ามเนื้อ ได้ประมาณ 17.7-23.5% ( $p>0.05$ ) โดยที่กลุ่มที่ได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW พบว่า มีปริมาณ muscle triglyceride ต่ำกว่ากลุ่มเบาหวานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (-27.9%,  $7.90\pm 0.49$  vs.  $10.95\pm 1.11$  mg/g tissue)

#### 5. การศึกษาผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสในหนูเบาหวานชนิดที่ 2



ภาพที่ 3-2 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสในหนูเบาหวานชนิดที่ 2,  $p<0.05$  vs. NDC; # $p<0.05$  vs. DMC, n=10

ตารางที่ 3-7 ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

	<b>TAUC</b> (mg/dl x min x 10 <sup>2</sup> )	<b>BAUC</b> (mg/dl x min x 10 <sup>2</sup> )	<b>IAUC</b> (mg/dl x min x 10 <sup>2</sup> )
<b>NDC</b>	<b>23.42 ± 1.19</b>	<b>20.02 ± 0.74</b>	<b>3.40 ± 0.72</b>
<b>NFO</b>	<b>24.49 ± 0.83</b>	<b>19.03 ± 0.51</b>	<b>5.48 ± 0.58</b>
<b>DMC</b>	<b>56.28 ± 4.51*</b>	<b>41.62 ± 5.44*</b>	<b>14.65 ± 2.33*</b>
<b>DMFO500</b>	<b>48.21 ± 2.72<sup>#,†</sup></b>	<b>35.57 ± 2.42<sup>†</sup></b>	<b>12.64 ± 2.19</b>
<b>DMFO1000</b>	<b>41.38 ± 3.81<sup>#</sup></b>	<b>33.37 ± 3.75<sup>#</sup></b>	<b>8.01 ± 1.26<sup>#</sup></b>
<b>DMCFO</b>	<b>47.48 ± 1.95<sup>#,†</sup></b>	<b>36.63 ± 1.80<sup>†</sup></b>	<b>10.85 ± 3.17</b>
<b>DMMet</b>	<b>36.06 ± 3.59<sup>#</sup></b>	<b>26.72 ± 1.06<sup>#</sup></b>	<b>9.34 ± 3.08</b>

หมายเหตุ \* $p < 0.05$  vs. NDC, <sup>#</sup>  $p < 0.05$  vs. DMC, <sup>†</sup>  $p < 0.05$  vs. DMMet, n=10

TAUC, Total area under the curve; BAUC, Basal area under the curve; IAUC, Incremental area under the curve.

จากภาพที่ 3-2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดต่อการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสด้วยการป้อนน้ำตาลกลูโคสทางปาก (oral glucose tolerance test) ขนาด 2 g/kg BW ผลการทดลองพบว่า กลุ่มหนูปกติควบคุมและกลุ่มหนูปกติที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW เป็นเวลา 11 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส ซึ่งสอดคล้องกับผลของค่าพื้นที่ใต้กราฟจากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส (TAUC, BAUC และ IAUC) ที่แสดงในภาพที่ 3-2 และตารางที่ 3-7 ของสัตว์ทดลองทั้งสองกลุ่ม พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม พบว่า มีระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดที่สูงกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ตลอดระยะเวลาการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส ( $p < 0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ 3-2 และมีค่าพื้นที่ใต้กราฟจากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส (TAUC, BAUC และ IAUC) ที่มากกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ 140.3%, 107.9% และ 330.9% ตามลำดับ ดังตารางที่ 3-7 ( $p < 0.05$ )

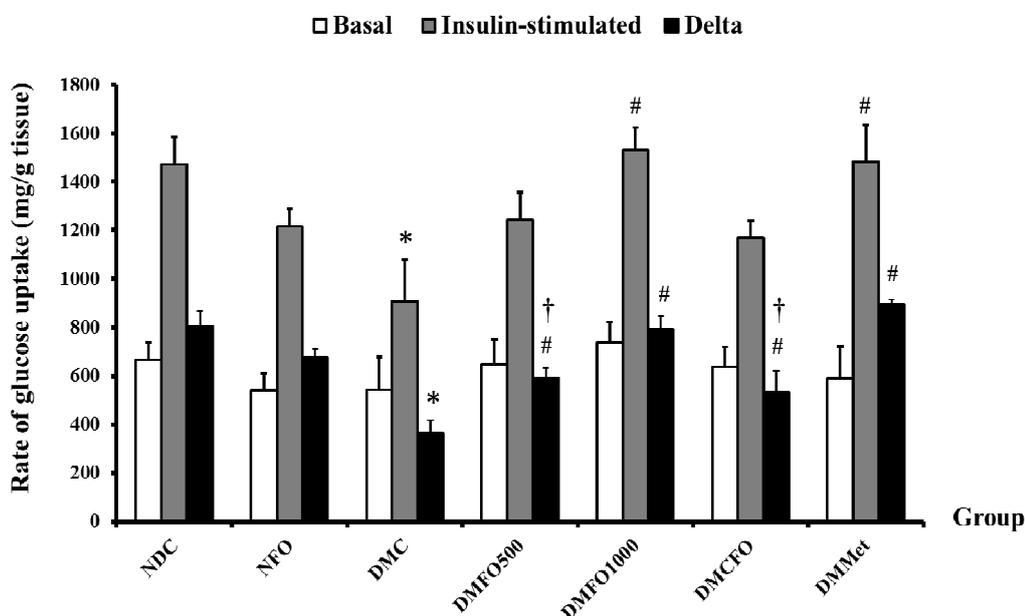
ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 500 mg/kg BW, ขนาด 1,000 mg/kg BW และได้รับน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW เป็นเวลาทั้งสิ้น 11 สัปดาห์ พบว่า มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดจะเริ่มลดต่ำลงตั้งแต่นาทีที่ 30 และลดลงต่ำกว่าระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในนาทีที่ 120 (ดังภาพที่ 3-2,  $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม

เมื่อพิจารณาถึงค่าพื้นที่ใต้กราฟที่เพิ่มขึ้นสุทธิจากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส (IAUC) นั้น พบว่า เฉพาะกลุ่มได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW เท่านั้นที่มีค่า TAUC, BAUC และ IAUC ต่ำกว่ากลุ่มหนูเบาหวานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-26.38%, -19.8% และ -45.3% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-7 และ ภาพที่ 3-2,  $p < 0.05$ )

สำหรับการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นเวลา 11 สัปดาห์ นั้น มีผลให้การเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูเบาหวานลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้ ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ (ภาพที่ 3-2,  $p < 0.05$ ) และมีค่าพื้นที่ใต้กราฟจากการทดสอบความทนทานต่อ กลูโคส (TAUC และ BAUC) ที่ลดลงต่ำกว่าค่าในกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (-36% และ -35.8% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3-7 และ ภาพที่ 3-2,  $p < 0.05$ ) แต่ค่าพื้นที่ใต้กราฟที่เพิ่มขึ้นสุทธิ จากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส (IAUC) นั้น มีแนวโน้มที่จะลดลงแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญ ทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) และที่น่าสนใจอย่างยิ่ง คือ กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW นั้นสามารถลดค่าพื้นที่ใต้กราฟที่เพิ่มขึ้นสุทธิจากการทดสอบความทนทานต่อกลูโคส (IAUC) ได้มากกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา metformin ดังแสดงในตารางที่ 3-7 (-45.3% และ -36.2% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 มีผล เพิ่ม whole body insulin sensitivity หรือ improved glucose intolerance ได้ดีเช่นเดียวกับผลของ metformin

สรุปผลการศึกษาทดลองจากทั้งผลต่อการลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (Antihyperglycemic effect) และผลการทดสอบความทนทานต่อกลูโคสทางปาก (oral glucose tolerance test) แสดงให้เห็นว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมโดยเฉพาะขนาด 1,000 mg/kg BW มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสใน เลือด และช่วยลดภาวะ impaired glucose tolerance ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ดีเทียบเท่ากับยา metformin 50 mg/kg BW (ซึ่งเป็นขนาดยาที่ค่อนข้างสูง สำหรับผู้ป่วยที่ไม่สามารถควบคุมระดับน้ำตาล กลูโคสได้ด้วยยาในขนาดทั่วไป)

6. การศึกษาผลต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลาย (skeletal glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูขาวที่มีภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

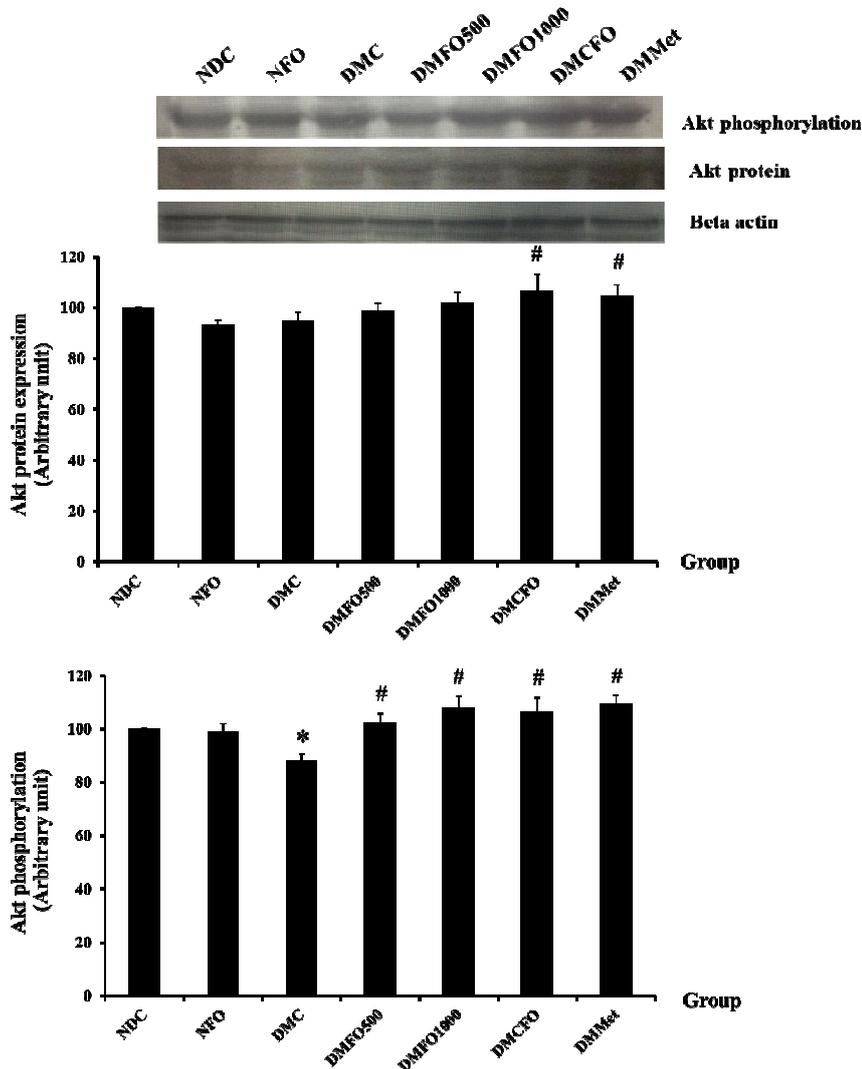


ภาพที่ 3-3. ผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในภาวะ basal (A), insulin-stimulated (B) และ delta (C) glucose uptake) ในกล้ามเนื้อกระบังลมของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 \* $p < 0.05$  vs. NDC, #  $p < 0.05$  vs. DMC, †  $p < 0.05$  vs. DMMet,  $n = 10$

จากภาพที่ 3-3 แสดงผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในหนูปกติและหนูเบาหวานนั้น พบว่า การป้อนน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ในหนูขาวปกติ ไม่มีผลกระทบต่อ การนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายทั้งในภาวะที่ไม่มีฮอร์โมนอินซูลิน (basal glucose uptake) และในภาวะที่มีฮอร์โมนอินซูลิน (insulin stimulated glucose uptake) ( $p > 0.05$ ) ส่วนในกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม (DMC) นั้น พบว่า การนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในภาวะที่ไม่มีฮอร์โมนอินซูลิน (basal glucose uptake) ไม่แตกต่างจากกลุ่มหนูปกติควบคุม แต่การนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในภาวะที่มีฮอร์โมนอินซูลิน (insulin stimulated glucose uptake) และค่าของการพากลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อโดยฤทธิ์ของอินซูลิน หรือ  $\Delta$  glucose uptake ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $p > 0.05$ ) สำหรับในกลุ่มหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมโดยเฉพาะที่ขนาด 1,000 mg/kg BW เป็นเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ พบว่า มีผลเพิ่มทั้งการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กล้ามเนื้อลายในภาวะที่มีฮอร์โมนอินซูลิน (insulin stimulated glucose uptake) และค่าของการพากลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อโดยฤทธิ์ของอินซูลิน หรือ  $\Delta$  glucose uptake อย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานควบคุมเช่นเดียวกับกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW ( $p>0.05$ )

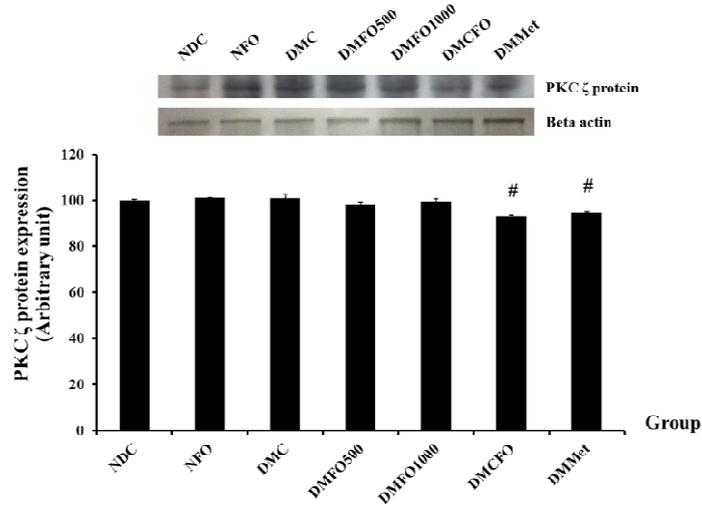
7. การศึกษาการส่งสัญญาณภายในของอินซูลิน (insulin signaling) ในกล้ามเนื้อ soleus เพื่อเป็นการศึกษากลไกที่อาจเกี่ยวกับฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (antihyperglycemia) และ improved glucose intolerance ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของการส่งสัญญาณอินซูลิน (insulin signaling) ในกล้ามเนื้อ soleus ด้วยวิธี Western blot analysis



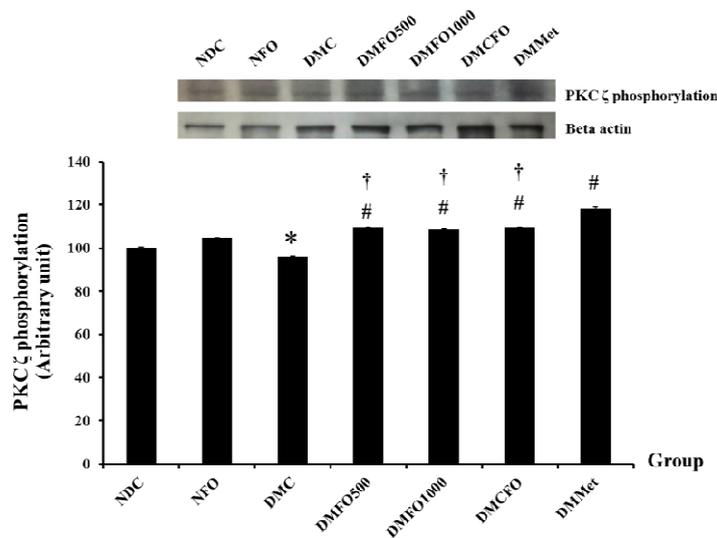
ภาพที่ 3-4 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อ Akt protein expression และ phosphorylation Akt (Ser473) ในกล้ามเนื้อ soleus ของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 \* $p<0.05$  vs. NDC, #  $p<0.05$  vs. DMC, †  $p<0.05$  vs. DMMet, n=10

ผลการศึกษา พบว่า ภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ไม่มีผลต่อปริมาณของ PIK3 protein expression (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และไม่มีผลต่อปริมาณ Akt protein expression เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $p>0.05$ ) ดังแสดงในภาพที่ 3-4 แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า การให้น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีผลให้ Akt protein expression ในกล้ามเนื้อ soleus เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ( $106.57\pm 6.50$ ,  $104.72\pm 4.18$  vs.  $95.03\pm 3.24$  ตามลำดับ,  $p<0.05$ ) แต่ผลการศึกษาน่าสนใจ คือ ระดับของ phosphorylation ของ Akt (Ser473) ของกลุ่มเบาหวานควบคุมลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $88.25\pm 2.29$  vs.  $99.93\pm 0.33$ ,  $p<0.05$ ) สำหรับการให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ที่ขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW, การให้น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีผลเพิ่มระดับของ phosphorylation ของ Akt (Ser473) อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ( $102.42\pm 3.27$ ,  $108.02\pm 4.09$ ,  $106.78\pm 4.84$ ,  $109.12\pm 3.53$  vs.  $88.25\pm 2.29$  ตามลำดับ,  $p<0.05$ ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของ pAkt (Ser473) ต่อ Akt protein expression แล้ว พบว่า เฉพาะในหนูเบาหวานในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมที่ขนาด 1,000 mg/kg BW เท่านั้น ที่มี pAkt (Ser473)/ Akt protein expression ratio เพิ่มสูงกว่ากลุ่มหนูเบาหวานควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $1.07\pm 0.04$  vs.  $0.93\pm 0.01$ ,  $p<0.05$ ) ซึ่ง Akt นั้นจัดเป็น downstream signaling สำคัญของฮอร์โมนอินซูลินที่จะทำให้เกิดผลทางฤทธิ์ชีวภาพ หรือ Physiological action ของฮอร์โมนอินซูลิน

(A)



(B)

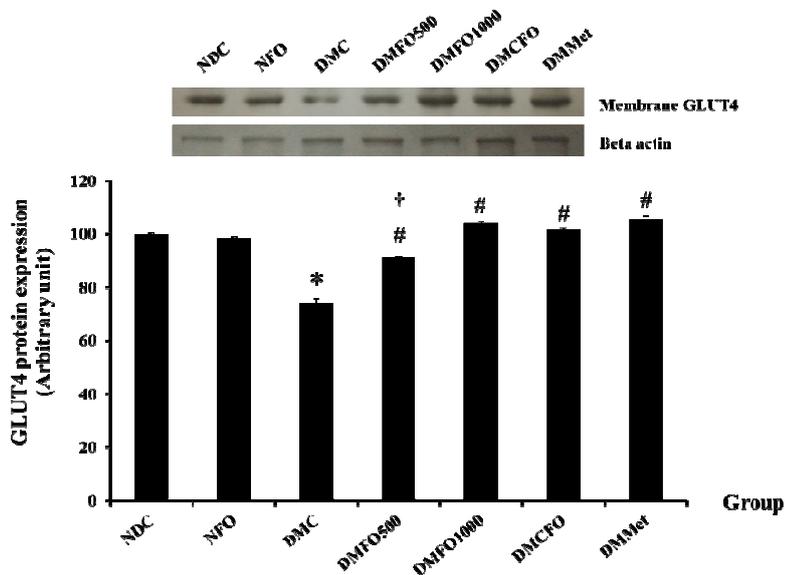


ภาพที่ 3-5 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อ PKC $\zeta$  protein expression และ PKC $\zeta$  phosphorylation (Thr410/403) ในกล้ามเนื้อ soleus ของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2

\* $p < 0.05$  vs. NDC, #  $p < 0.05$  vs. DMC, †  $p < 0.05$  vs. DMMet, n=10

ดังภาพที่ 3-5 แสดงปริมาณของ PKC $\zeta$  protein expression และ PKC $\zeta$  phosphorylation (Thr410/403) ในกล้ามเนื้อ soleus ของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า ภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ไม่มีผลต่อปริมาณของ PKC $\zeta$  protein expression เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $p > 0.05$ ) แต่การให้น้ำมันปลาที่จำหน่ยตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีผลให้ PKC $\zeta$  protein expression ในกล้ามเนื้อ soleus ลดต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มหนูเบาหวานควบคุม ( $92.97 \pm 0.34$ ,  $94.95 \pm 0.52$  vs.  $100.87 \pm 1.72$  ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) และเมื่อศึกษาเกี่ยวกับ

ปริมาณ PKC $\zeta$  phosphorylation (Thr410/403) (ภาพที่ 3-6 B) พบว่า กลุ่มเบาหวานควบคุมมีระดับของ PKC $\zeta$  phosphorylation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูปกติควบคุม ( $95.99 \pm 0.24$  vs.  $100.00 \pm 0.77$ ,  $p < 0.05$ ) และการให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW การให้น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีผลเพิ่มระดับของ phosphorylation ของ PKC $\zeta$  อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานควบคุม ( $109.62 \pm 0.00$ ,  $108.81 \pm 0.14$ ,  $109.51 \pm 0.03$ ,  $118.29 \pm 0.76$  vs.  $95.99 \pm 0.24$  ตามลำดับ,  $p < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม กลุ่มที่ได้รับยา metformin พบว่า มีระดับของ PKC $\zeta$  phosphorylation (Thr410/403) มากที่สุด และมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำมันปลาทั้งน้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดและน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )



ภาพที่ 3-6 ผลของน้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมต่อ Membrane GLUT4 expression ในกล้ามเนื้อ soleus ของหนูปกติและหนูเบาหวานชนิดที่ 2 \* $p < 0.05$  vs. NDC, #  $p < 0.05$  vs. DMC, †  $p < 0.05$  vs. DMMet,  $n = 10$

จากภาพที่ 3-6 แสดงปริมาณของ Membrane GLUT4 protein expression ในกล้ามเนื้อ soleus พบว่า กลุ่มเบาหวานควบคุมมีระดับของ Membrane GLUT4 protein expression ต่ำกว่ากลุ่มหนูปกติควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ( $74.20 \pm 1.37$  vs.  $100.00 \pm 0.44$ ,  $p < 0.05$ ) และการให้น้ำมันปลาจากปลาหมึกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 ขนาด 500 และ 1,000 mg/kg BW การให้น้ำมันปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาดขนาด 1,000 mg/kg BW และการให้ยา metformin ขนาด 50 mg/kg BW มีผลเพิ่มระดับของ Membrane GLUT4 protein expression ได้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานควบคุม

(91.33±0.31, 104.40±0.34, 101.59±0.61, 105.88±1.14 vs. 74.20±1.37,  $p<0.05$ ) แสดงให้เห็นว่า การให้ treatment ดังกล่าวข้างต้นมีผลกระตุ้น insulin signaling ซึ่งที่สุดจะมีผลทำให้มีการ Translocation ของ GLUT4 จาก cytosolic vesicles ไปยัง membrane ได้มากขึ้น และปริมาณของ Membrane GLUT4 protein expression ที่เพิ่มขึ้นนี้จะส่งผลให้มีการ uptake ของกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อลายได้มากขึ้น

## 6. อภิปรายและวิจารณ์ผล

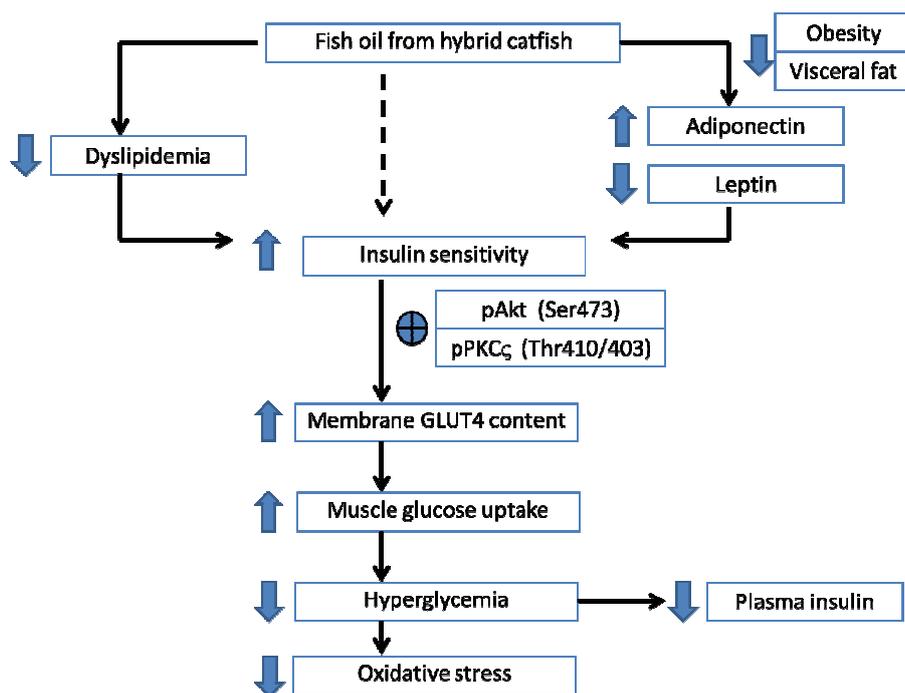
การศึกษาเกี่ยวกับผลของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมต่อฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 และในหนูขาวปกติครั้งนี้ใช้เวลาในการให้ treatment ต่างๆ เป็นเวลาทั้งสิ้น 12 สัปดาห์ ผลการศึกษาสำคัญ ได้แก่ 1) การให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม ขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูขาวปกติ นั้น ไม่พบว่าเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (adverse side effects) กล่าวคือ ไม่ก่อให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) และไม่พบภาวะไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (dyslipidemia) หรือมีการสะสมของ triglyceride ในตับและกล้ามเนื้อ ทั้งยังไม่พบว่ามีภาวะ oxidative stress เกิดขึ้นโดยดูจากระดับ plasma MDA ที่ไม่เปลี่ยนแปลง และ 2) การให้น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมโดยเฉพาะที่ขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 นั้น พบว่า มีผลช่วยในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (antidiabetic effect), improved insulin intolerance และลดระดับไขมัน triglyceride , cholesterol ในเลือด (hypolipidemia) รวมทั้งยังสามารถช่วยลดระดับ plasma MDA ซึ่งบ่งชี้ได้ว่ามีภาวะ oxidative stress ที่ลดลง

จากผลการตรวจวิเคราะห์ส่วนประกอบที่เป็นไขมันชนิดต่างๆ ของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม (w/w) จะเห็นได้ว่าน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม มีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่ค่อนข้างสูงเทียบเท่ากับน้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาดซึ่งส่วนใหญ่ล้วนนำเข้ามาจากต่างประเทศ เพียงแต่ชนิดของกรดไขมันที่ตรวจพบนั้นส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids; MUFAs) มากถึง 46.97% ในจำนวนนี้เป็นกรดไขมัน Oleic acid 41.19% และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) เพียง 17.09% ซึ่งในจำนวนนี้เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid (EPA) 0.21% และ docosahexaenoic acid (DHA) 0.34% ในขณะที่น้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาดจะมีปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนสูงกว่า คือ 40.97% ซึ่งในจำนวนนี้เป็นกรดไขมันกลุ่มโอเมก้า 3 ได้แก่ eicosapentaenoic acid 20.98% และ docosahexaenoic acid 12.25% และมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว ประมาณ 23.7% ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง MUFAs และ PUFAs นี้ต่างก็มีรายงานผลการศึกษาวิจัย พบว่า มีประโยชน์ต่อร่างกายมากมาย อาทิ เช่น ลดโคเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ นอกจากนี้ยังช่วยให้น้ำเลือดไม่เหนียวข้น ซึ่งให้ผลดีต่อสุขภาพหัวใจและหลอดเลือด โดยทั่วไปแล้วกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวจะพบได้มากใน อะโวคาโด น้ำมันมะกอก น้ำมันรำข้าว น้ำมันดอกทานตะวัน น้ำมันคาโนลา และน้ำมันเมล็ดอัลมอนต์ ซึ่งส่วนใหญ่มีราคาค่อนข้างแพง และต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ แต่

จากผลการศึกษาที่บ่งชี้ว่า ฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมน่าจะเป็นผลส่วนใหญ่จากกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (MUFAs) มากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อนหรือ PUFAs เนื่องจากผลการศึกษาทดลองในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมนั้น ให้ผลดีเทียบเคียงกับยา metformin ซึ่งใช้เป็น positive control และ reference drug ส่วนกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำมันปลาที่จำหน่ายในท้องตลาดจะมีผลที่ด้อยกว่า และเมื่อพิจารณาถึงชนิดของกรดไขมันที่ตรวจก็จะพบว่า น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW นั้นจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวมากถึง 469.7 mg (ในจำนวนนี้มี กรดไขมัน Oleic acid 411.9 mg) และมีไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน โดยเฉพาะ EPA และ DHA เพียง 2.1 mg และ 3.4 mg เท่านั้น สอดคล้องกับคำแนะนำการบริโภคไขมันยุคปัจจุบันที่เปลี่ยนไป โดย WHO/FAO และ The American Heart Association (AHA)<sup>47</sup> แนะนำให้บริโภค PUFA ลดลงเหลือร้อยละ 6-10 ของพลังงานที่ควรได้รับในแต่ละวัน ลด SFA ลงน้อยกว่าร้อยละ 10 โดยมีกรดไขมันทรานส์น้อยกว่าร้อยละ 1 และเพิ่มสัดส่วนของ MUFA มากขึ้นได้ถึงร้อยละ 10-20 หรือ 15-30 โดยพลังงานจากไขมันทั้งหมดร้อยละ 15-30 (WHO, 2008)

สำหรับผลต้านเบาหวาน (Anti-diabetic effect) ของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 นั้น จากรายงานการศึกษานี้พบว่า น้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ขนาด 1,000 mg/kg BW/day สามารถช่วยลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของหนูที่มีภาวะเบาหวาน เพิ่ม insulin sensitivity (จากการที่มี HOMA IR ที่ลดลง) และ improved glucose intolerance sensitivity (จากการลดลงของ AUCs จากการทดสอบด้วย oral glucose tolerance test) ได้ดีเทียบเท่ากับยา metformin ขนาด 50 mg/kg ซึ่งปัจจุบันนี้ยา metformin ถูกนำมาใช้เป็น first line drug ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ออกฤทธิ์โดยการเพิ่ม peripheral insulin sensitivity ที่กล้ามเนื้อ และลดกระบวนการ gluconeogenesis ที่ตับ (Hundal and Inzucchi, 2003) โดยจากการศึกษานี้จะเห็นได้ว่า มีกลไกและปัจจัยหลายอย่างที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสม **ดังสรุปไว้ในภาพที่ 3-7** ได้แก่ ผลต่อการลดระดับไขมัน cholesterol และ triglyceride ในเลือด ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่าภาวะไขมันในเลือดสูงโดยเฉพาะ cholesterol และ free fatty acids เป็นหนึ่งสาเหตุของภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) (Boden and Shulman, 2002) และสอดคล้องกับหลายๆการศึกษาทั้งในคนและสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นว่า การให้ MUFAs มีผลช่วยลดภาวะ dyslipidemia และ ช่วยเพิ่ม insulin sensitivity (Rivellese *et al.*, 2003; Riccardi *et al.*, 2004) และอีกกลไกหนึ่งของ MUFAs เกี่ยวข้องกับผลต่อการลดลงของ Body weight และ visceral fat ซึ่งจะมีผลให้ระดับของ leptin hormone ในเลือดลดลง ร่วมกับเพิ่มระดับของ adiponectin hormone ในเลือด ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองนี้ มีผลต่อการทำงานของฮอร์โมนอินซูลิน (Yang *et al.*, 2011a; Yang *et al.*, 2011b; Fu *et al.*, 2005) สอดคล้องกับการศึกษาของ Paniagua *et al.* (2007) ที่พบว่าอาหารที่มีปริมาณของ MUFAs สูงนั้นจะมีผลป้องกันภาวะอ้วนลงพุงและเพิ่มระดับของ adiponectin mRNA ในเซลล์ไขมันได้ในคนที่ภาวะ insulin

resistance และประการสำคัญมีรายงานว่ากรดไขมัน MUFAs สามารถช่วยเพิ่ม insulin sensitivity และช่วยในการทำงานของตับอ่อนได้เช่นเดียวกัน (Lopez *et al.*, 2008) และผลจากการเพิ่ม insulin sensitivity นี้สัมพันธ์กับการ improved insulin signaling ได้แก่การกระตุ้น phosphorylation Akt (Ser473) และ phosphorylation PKC $\zeta$  (Thr410/403) ซึ่งส่งผลให้มีการ Translocation ของ GLUT4 ไปยัง cell membrane เพิ่มขึ้น และในที่สุดส่งผลให้เกิดการ uptake ของกลูโคสเข้าสู่เซลล์กล้ามเนื้อได้เพิ่มขึ้น (Shepherd and Kahn, 1999) นอกจากนี้จากผลการศึกษายังพบว่า การลดลงของระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือดของกลุ่มหนูที่ได้รับน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวาน ขนาด 1,000 mg/kg BW ยังส่งผลให้มีระดับของ plasma MDA ลดลง บ่งชี้ว่ามีการเกิดภาวะ oxidative stress ลดลงด้วย ถึงแม้ว่าจะไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่น่าจะมีความสัมพันธ์กับระดับของภาวะ hyperglycemia ที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามพบว่า มีรายงานการศึกษาของ Quiles *et al.* (2006) พบว่า การบริโภคอาหารที่มีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยวสูง เช่น น้ำมันมะกอก (olive oil) มีผลลดภาวะ mitochondrial oxidative stress และลดความเสื่อมจากวัย (aging process)



ภาพที่ 3-7 แสดง proposed mechanisms ที่อาจเกี่ยวข้องกับผลลดระดับน้ำตาลกลูโคสในเลือด (anti-hyperglycemia) และภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ของน้ำมันปลาจากปลาหนังลูกผสมในหนูเบาหวานชนิดที่ 2

## 7. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้ และการใช้ประโยชน์

การศึกษาเกี่ยวกับผลและกลไกเบื้องต้นของน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมต่อฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและต้านอนุมูลอิสระในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 เป็นเวลา 12 สัปดาห์ พบว่า การให้น้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสม ขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูขาวปกติ นั้น ไม่พบว่าเกิดผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ (adverse side effects) เช่น ภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ (hypoglycemia) หรือภาวะไขมันในเลือดเพิ่มสูงขึ้น (Dyslipidemia) และผลที่สำคัญคือการให้น้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมขนาด 1,000 mg/kg BW ในหนูเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่า มีผลช่วยในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (antidiabetic effect), improved insulin intolerance และลดระดับไขมัน triglyceride , cholesterol ในเลือด (hypolipidemia) รวมทั้งยังสามารถช่วยลดภาวะ oxidative stress

และจากการศึกษานี้บ่งชี้ว่าน้ำมันปลาจากปลาหนึ่งลูกผสมนี้เป็นอีกของแหล่งสำคัญของกรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monounsaturated fatty acids; MUFAs) ที่มีราคาถูกกว่าการนำเข้ามาจากต่างประเทศ และสามารถนำไปพัฒนาเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและเพิ่มมูลค่าจากเศษไขมันที่เหลือทิ้งจากการแล่นเนื้อได้ต่อไป

## 8. บรรณานุกรม

- Wolff; S.P., and R.T., Dean. 1987. Glucose autoxidation and protein modification. The potential role of 'autoxidative glycosylation' in diabetes. *Biochem J.* 245 : 243-50.
- Simmons, K. 1984. Defense against free radicals has therapeutic implications. *JAMA.* 251 : 2187-92.
- Wallin, A., D., Di Giuseppe, N., Orsini, P.S., Patel, N.G., Forouhi, and A., Wolk. 2012. Fish consumption, dietary long-chain n-3 fatty acids, and risk of type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Diabetes Care.* 35(4) : 918-29.
- Lombardo, Y.B., G., Hein, and A., Chicco. 2007. Metabolic syndrome: effects of n-3 PUFAs on a model of dyslipidemia, insulin resistance and adiposity. *Lipids.* 42(5) : 427-37.
- Siriwardhana, N., N.S., Kalupahana, and N., Moustaid-Moussa. 2012. Health Benefits of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. *Adv. Food. Nutr. Res.* 65 : 211-22.
- The Joint FAO/WHO Expert Consultation on Fats and Fatty Acids in Human Nutrition, November 10-14, 2008, WHO HQ, Geneva

- Hundal, R.S., and S.E., Inzucchi. 2003. Metformin: new understandings, new uses. *Drugs*. 63(18) : 1879-94.
- Boden, G., and G.I., Shulman. 2002. Free fatty acids in obesity and type 2 diabetes: defining their role in the development of insulin resistance and beta-cell dysfunction. *Eur. J. Clin. Invest.* 32(3) : 14-23.
- Rivellese, A.A., Maffettone, B., Vessby, M., Uusitupa, K., Hermansen, L., Berglund, A., Louheranta, B.J., Meyer, and G., Riccardi. 2003. Effects of dietary saturated, monounsaturated and n-3 fatty acids on fasting lipoproteins, LDL size and postprandial lipid metabolism in healthy subjects. *Atherosclerosis*. 167(1) : 149-58.
- Riccardi, G., R., Giacco, and A.A., Rivellese. 2004. Dietary fat, insulin sensitivity and the metabolic syndrome. *Clin Nutr.* 23(4) : 447-56.
- Yang, Z.H., H., Miyahara, T., Mori, N., Doisaki, and A., Hatanaka. 2011. Beneficial effects of dietary fish-oil-derived monounsaturated fatty acids on metabolic syndrome risk factors and insulin resistance in mice. *J. Agric. Food. Chem.* 59(13) : 7482-7489.a
- Yang, Z.H., H., Miyahara, S., Takemura, and A., Hatanaka. 2011. Dietary saury oil reduces hyperglycemia and hyperlipidemia in diabetic KK-A<sup>y</sup> mice and in diet-induced obese C57BL/6J mice by altering gene expression. *Lipids*. 46(5) : 425-434.b
- Fu, Y., N., Luo, R.L., Klein and W.T., Garvey. 2005. Adiponectin promotes adipocyte differentiation, insulin sensitivity, and lipid accumulation. *J. Lipid. Res.* 46:1369-1379.
- Paniagua, J.A., A., Gallego de la Sacristana, I., Romero, A., Vidal-Puig, J.M., Latre, E., Sanchez, P., Perez-Martinez, J., Lopez-Miranda and F., Perez-Jimenez. 2007. Monounsaturated fat-rich diet prevents central body fat distribution and decreases postprandial adiponectin expression induced by a carbohydrate-rich diet in insulin-resistant subjects. *Diabetes Care*. 2007. 30 : 1717-1723.
- López, S., B., Bermúdez, Y.M., Pacheco, J., Villar, R., Abia and F.J., Muriana. 2008. Distinctive postprandial modulation of beta cell function and insulin sensitivity by dietary fats: monounsaturated compared with saturated fatty acids. *Am. J. Clin. Nutr.* 88(3) : 638-644.
- Shepherd, P., and B., Kahn. 1999. Glucose transporters and insulin action. *N. Engl. J. Med.* 341 : 240-246.

Quiles, J.L., G., Barja, M., Battino, J., Mataix, and V., Solfrizzi. 2006. Role of Olive Oil and Monounsaturated Fatty Acids in Mitochondrial Oxidative Stress and Aging. *Nutr. Rev.* 64 : S31-S39.

## 9. ผลผลิต (output) หรือตัวชี้วัด

นำเสนอผลงานวิจัย แบบโปสเตอร์ เรื่อนำ Evaluation of anti-diabetic efficacy of fish oil from a hybrid catfish (*Pangasianodon hypophthalmus* x *Pangasius bocourti*) in high-fat diet plus streptozotocin (STZ) induced type 2 diabetic rats ในงานประชุมวิชาการนานาชาติ Burapha University International Conference 2014 Global Warming and Its Impacts ระหว่างวันที่ 3-4 กรกฎาคม 2557 ณ จ ชลบุรี.

## 10. ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาทางคลินิก โดยเปรียบเทียบผลกระทบทางสุขภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อการชักนำให้เกิดภาวะไขมันในเลือดผิดปกติ (Dyslipidemia) และการทำให้เกิดภาวะน้ำหนักเกินหรือภาวะอ้วน (Obesity) ในอาสาสมัครชาวไทย เพื่อให้ทราบข้อมูลอันจะมีผลต่อการสร้างความเชื่อมั่นของผู้บริโภคของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากน้ำมันปลาน้ำจืด

2. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์ทดลอง เกี่ยวกับผลของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากน้ำมันปลาน้ำจืดต่อการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองปกติ, สัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดเบาหวาน หรือสัตว์ทดลองที่มีอายุมาก (aging) เนื่องจากเป็นประเด็นที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบันเพราะเป็นอีกหนึ่งปัญหาทางสาธารณสุขของประเทศที่กำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ รวมทั้งประเทศไทยด้วย นอกจากนี้ผลการศึกษาดังกล่าวยังจะทำให้ทราบข้อมูลอันเป็นประโยชน์ต่อการนำไปส่งเสริมการพัฒนาน้ำมันปลาจากน้ำจืดเพื่อเป็นของผลิตภัณฑ์เสริมอาหารด้วย