

Title : Effects of *Tiliacora triandra* on protein glycosylation, lipid peroxidation and Ca^{2+} -ATPase activities in human erythrocytes exposed to high glucose levels

Authors : Wachirawadee Malakul

Department of Physiology, Faculty of Medical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand; E-mail address: wachirawadeem@hotmail.com

Abstract

Non-enzymatic glycation, as the chain reaction between reducing sugars and the free amino groups of proteins, has been shown to correlate with severity of diabetes and its complications. *Tiliacora triandra* Diels, one of the medicinal plants, known in Thai as Yanang, belongs to Menispermaceae family. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activity of the water extract of *T. triandra* and their inhibition of protein glycation in a bovine serum albumin (BSA)/glucose system. Furthermore lipid peroxidation, glycated hemoglobin and Ca^{2+} -ATPase activities were determined in the glucose-treated human RBC. The antioxidant activities of these extracts were evaluated by 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) free radical scavenging activity and ferrous ion chelating ability. The IC_{50} values were 61 ± 16 and 45 ± 4 $\mu\text{g/ml}$, respectively. The results indicated that high glucose treatment increased fluorescence intensity of glycated BSA, the level of glycated hemoglobin (GHb), and lipid peroxidation in the glucose-treated RBC. The activities of Ca^{2+} -ATPases were significantly lowered in high glucose-treated RBC. The extract (10-100 $\mu\text{g/ml}$) significantly quenched the fluorescence intensity of glycated BSA and lowered the level of GHb in a dose-dependent manner. However *T. triandra* extract had no effect on lipid peroxidation and Ca^{2+} -ATPase activities in the glucose-treated human RBC. These data concluded that the water extract of *T. triandra* possessed antioxidant and antiglycation activities. These results might lead to the possibility of using the plant extract for targeting diabetic complications.

Keywords : *Tiliacora triandra*, glycation, glycooxidation, diabetes

สัญญาเลขที่ : R2554B103

โครงการ : ผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด protein glycosylation, lipid peroxidation และการทำงานของ Ca^{2+} -ATPase ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากคนปกติ ในสภาวะน้ำตาลสูง

หัวหน้าโครงการ : ดร. วชิราวดี มาลากุล

หน่วยงาน : ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยา non-enzymatic glycation คือปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลและกลุ่มอะมิโนของโปรตีน ซึ่งเกี่ยวข้องกับความรุนแรงและภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน *Tiliacora triandra* Diels เป็นหนึ่งในสมุนไพรไทย รู้จักกันดีในชื่อ ย่านาง อยู่ในวงศ์ Menispermaceae งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดน้ำของย่านาง และฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไกลเคชันของโปรตีนใน bovine serum albumin (BSA)/glucose system รวมทั้ง lipid peroxidation และ glycated hemoglobin และการทำงานของ Ca^{2+} -ATPase จะถูกวิเคราะห์ในเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะน้ำตาลสูง โดยฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดจะวิเคราะห์โดยวิธี 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging activity และ ferrous ion chelating ability ซึ่ง ค่า IC_{50} เท่ากับ 61 ± 16 and 45 ± 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลอง พบว่า สภาวะน้ำตาลสูง จะเพิ่ม fluorescence intensity ของ glycated BSA ปริมาณของ glycated hemoglobin และ lipid peroxidation ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ส่วนการทำงานของ Ca^{2+} -ATPases จะลดลงในเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะน้ำตาลสูง สารสกัด (10-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จะลด fluorescence intensity ของ glycated BSA และ glycated hemoglobin โดยขึ้นกับความเข้มข้น อย่างไรก็ตาม สารสกัด *T. triandra* จะไม่มีผลต่อ lipid peroxidation และการทำงานของ Ca^{2+} -ATPase ในเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะน้ำตาลสูง จากข้อมูลนี้ สรุปได้ว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน ซึ่งผลการทดลองนี้อาจนำไปสู่การพัฒนาพืชสมุนไพรนี้ในการรักษาโรคแทรกซ้อนของเบาหวาน

คำสำคัญ: ย่านาง อนุมูลอิสระ ปฏิกิริยาไกลเคชัน

สารบัญ

	หน้า
Abstract	1
บทคัดย่อ	2
สารบัญ	3
สารบัญรูป	4
สารบัญตาราง	5
สรุปโครงการ (Executive Summary)	6-10
บทนำ	11-12
วัตถุประสงค์โครงการ	13
วิธีการทดลอง	14-16
ผลการทดลอง	17-26
วิจารณ์ผลการทดลอง	27-28
เอกสารอ้างอิง	29-31
ภาคผนวก	32

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงค่า IC ₅₀ ของ ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดย่านาง ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL – 10 mg/mL หรือสาร L- ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL – 10 mg/mL	18
2	แสดงค่า IC ₅₀ ของ ความสามารถในการ metal chelating activity ของสารสกัดย่านาง ที่ความเข้มข้น 1 µg/mL – 10 mg/mL หรือสาร EDTA ที่ความเข้มข้น 0.1 µg/mL – 10 mg/mL	18
3	แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไกลเคชัน (glycation) ของ <i>Tiliacora triandra</i> ความเข้มข้น 10, 25, 50 µg/ml เทียบกับ aminoguanidine (AG) 1 mM ที่ 7 วัน และ 24 วัน	20
4	แสดงผลของสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/mL ต่อการเกิด amadori compound ในระบบ BSA/glucose system ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM	20
5	แสดงค่าการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb) ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ใน สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัด ย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/mL	23
6	แสดงค่าการเกิด Lipid peroxide ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 mM (เลียนแบบภาวะปกติ) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 µg/mL	23

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงค่า fluorescence intensity ของ <i>Tiliacora triandra</i> 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ aminoguanidine 1 mM ที่ 7 วัน และ 24 วัน โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป Mean \pm SEM	21
2	แสดงผลของสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ต่อการเกิด amadori production ในระบบ BSA/glucose system ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm SEM; *P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG	22
3	แสดงการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb) ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ใน สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป Mean \pm SEM ; *P< 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG	25
4	แสดง Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC ที่อยู่ใน สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$	26

สัญญาเลขที่ R2554B103
สรุปโครงการ (Executive Summary)

โครงการ : ผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด protein glycosylation, lipid peroxidation และการทำงานของ Ca^{2+} -ATPase ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากคนปกติ ในสภาวะที่ชักนำให้มีระดับน้ำตาลสูง

หัวหน้าโครงการ : ดร. วชิราวดี มาลากุล

หน่วยงาน : ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติเนื่องจากร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในร่างกายไปใช้ได้ อย่างเต็มที่ สาเหตุเนื่องจากขาดฮอร์โมน อินซูลิน หรือ ร่างกายตอบสนองต่อฮอร์โมนตัวนี้ลดลง ซึ่งผลที่ตามมาคือระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม aldehyde ของ reducing sugar (เช่น glucose) และหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน หรือ เอมีนไฮโดรเจน ต่างๆ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า glycation หรือ non-enzymatic glycosylation ปฏิกิริยาดังกล่าวนำไปสู่การเกิดสารที่มีโครงสร้างที่เรียกว่า Schiff base ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปกลับมาได้ หลังจากนั้นจะมีการเรียงตัวใหม่ เป็นสารที่มีความคงตัวมากขึ้นเรียกว่า Amadori products และเมื่อ Amadori products เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และจะมีการจัดเรียงโครงสร้างใหม่ (rearrangement) จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่คงที่ที่เรียกว่า เรียกว่า advanced glycosylation end products (AGEs) การเกิด glycation ของ โปรตีน, เอมีนไฮโดรเจน หรือ Insulin หรือ การสะสมของ AGEs ส่งผลให้เซลล์นั้นๆ ทำงานผิดปกติ เช่น ลดการตอบสนองต่อ insulin หรือ ไวต่อการเกิด oxidative stress รวมทั้ง สาร AGEs ยังเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ ซึ่งจะไปทำลายเซลล์ต่างๆภายในร่างกาย จนก่อให้เกิดความผิดปกติ หรือ อาการแทรกซ้อนต่างๆในเบาหวาน (1-4) จากงานวิจัย พบว่า การเกิด glycation ของโปรตีน มีผลให้ ATPase activity จะลดลงในเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน และในเซลล์เม็ดเลือดแดงของคนป่วยเบาหวาน type I ซึ่งความผิดปกตินี้ จะส่งผลให้เกิด diabetic polyneuropathy ในเบาหวานได้ (5,7,9) โดยปกติแล้ว การควบคุมการเคลื่อนที่ของ cation ต่างๆบนเยื่อหุ้มเซลล์ โดย Na/K ATPase และ Ca^{2+} ATPase activity จะมีความสำคัญในการควบคุม น้ำ สารอาหาร และสารต่างๆให้แก่เซลล์ และยังมีผลควบคุมการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ และการนำสัญญาณของเซลล์ประสาท ซึ่งถ้า Na^+-K^+ ATPase และ Ca^{2+} ATPase activity ทำงาน

ผิดปกติไป อาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น diabetic neuropathy ในเบาหวานได้

สำหรับการรักษาโรคนี้จะได้ผลดีขึ้นอยู่กับการใช้ยาอย่างมีประสิทธิภาพและรับประทานยาอย่างสม่ำเสมอ จึงสามารถลดอัตราการตายและโรคแทรกซ้อนจากภาวะนี้ได้ แต่พบว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่มักให้ความร่วมมือในการรับประทานยาน้อยมาก อาจเป็นความยุ่งยากในการต้องใช้อาหารควบคู่กันหลายชนิด และยารักษาโรคเบาหวานหลายตัวก็นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมาก ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรในการป้องกันและควบคุมโรคจึงเป็นแนวทางในการรักษาที่น่าสนใจ ปัจจุบัน หลายคนหันมานิยมผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ พวกพืชผักปลอดสารพิษ รวมทั้งหันมาใช้สมุนไพรกันมากขึ้น สำหรับการใช้อยู่สมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรค เป็นภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมานานแล้ว แต่ยังไม่เคยมีผลงานวิจัยเด่นชัดที่สนับสนุนสรรพคุณเหล่านั้น ดังนั้นเพื่อส่งเสริมให้มีการใช้สมุนไพรในการรักษาโรคอย่างเหมาะสม จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเหล่านี้

ย่านางเป็นอีกหนึ่งสมุนไพรที่ใช้เป็นอาหารและเป็นยามาตั้งแต่โบราณ หมอยาโบราณภาคอีสาน เรียกชื่อยาของย่านางว่า “หมื่นปีไม่แก่” ชื่อวิทยาศาสตร์ Tiliacora triandra (Colebr.) Diels. วงศ์ Menispermaceae ด้วยสรรพคุณที่บอกต่อกันมา ว่าการดื่มน้ำคั้นจากใบย่านางเป็นประจำ จะสามารถลดน้ำตาลในเลือด ความดันโลหิตสูง ตกเลือดจากมดลูก โรคเก๊าท์ และโรคเชื้อราทำลายเล็บ หรือเป็นผื่นคัน เป็นต้น ถึงอย่างไรก็ยังไม่มีการวิจัยใดที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว นอกจากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่า สารสกัดน้ำของใบย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังพบสารประกอบ phenolic compound ในใบย่านาง

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมาก ยืนยันถึงการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับการเกิดโรคภัยต่างๆ รวมทั้งภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน ดังนั้นการให้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือบริโภคมะขาม และผลไม้ ซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าว อาจช่วยลดการเกิดโรคภัยแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดย่านางแบบ *In vitro* ต่อการเกิด glycosylated protein และ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) ของคนปกติ ในสภาวะ high glucose และยั้งศึกษาผลต่อการทำงานของ $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase และ Ca^{2+} ATPase activity บนผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC ghost) ของคนปกติ ที่อยู่ในสภาวะ high glucose ซึ่งเป็นการเลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจากเบาหวาน ซึ่งถ้าสารสกัดย่านางสามารถลดการเกิด glycosylated protein และ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) ของคนปกติ ในสภาวะ high glucose และเพิ่มการทำงานของ Ca^{2+} ATPase activity บนผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC ghost) ของคนปกติ ที่อยู่ในสภาวะ high glucose ได้ก็อาจจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง

ช่วยลดภาวะแทรกซ้อนและอัตราการป่วยจากโรคเบาหวาน และยังเป็นแนวทางพัฒนางานวิจัยยาสมุนไพรไทยในชั้นสูงเพื่อใช้ในเชิงคลินิกต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด glycation protein ใน BSA/glucose system และ high glucose-treated human erythrocytes ของคนปกติ
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด lipid peroxide ใน high glucose-treated human erythrocytes ของคนปกติ
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิดการทำงานของ Ca^{2+} ATPase activity บน high glucose-treated human erythrocytes ghost ของคนปกติ
4. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของสมุนไพรย่านางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในการบรรเทาอาการแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดย่านาง

นำใบของย่านางที่ได้จาก จ. ขอนแก่น ประเทศไทย มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C แล้วนำไปบดจนเป็นผงละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยน้ำจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -50°C จนกว่าจะนำมาใช้

2. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC) และผนังเซลล์ ของ RBC (RBC ghosts)

เลือดจากอาสาสมัครเพศชาย วัย 20 – 30 ปี ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ (70-110 mg/mL) จะถูกเก็บใน tube ที่มีสาร ethylenediamine tetraacetate (EDTA) จากนั้นจะนำไปปั่นให้ตกตะกอน (Centrifuge) แล้วแยกส่วนที่เป็น plasma และ buffy coat ทิ้ง หลังจากนั้นจะทำการแยกเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงและผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง หลังจากนั้นนำ เซลล์เม็ดเลือดแดงและผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ผสมใน phosphate-buffer saline ที่ผสม น้ำตาลกลูโคส ที่ 0, 5 และ 25 mM แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดลองเพื่อวิเคราะห์

- ฤทธิ์ต่อการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb)
- ฤทธิ์ต่อ Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC (RBC ghost)
- ฤทธิ์ต่อการเกิด Lipid peroxide

3. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ของสารสกัดย่านาง โดยวิเคราะห์จาก 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazil (DPPH) free radical scavenging activity และ ferrous ion chelating ability DPPH

4. ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation) โดยวิธี Glucose-BSA (bovine serum albumin) assay

นำ Albumin (5mg/ml) มาบ่มร่วมกับ Glucose 5 และ 500mM ใน PBS (Phosphate buffer saline) โดยไม่มี หรือ มีสารสกัดย่านาง ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อ มิลลิลิตร หรือสารมาตรฐาน aminoguanidine (เป็น positive control ซึ่งมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน) จากนั้น incubate ปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน

เมื่อครบกำหนด วัดการเรืองแสงโดยใช้เครื่อง Spectrofluorometer โดย excitation และ emission อยู่ที่ 360 nm และ 460 nm เพื่อประเมินการเกิด AGEs และวิเคราะห์ปริมาณ Amadori products โดยวิธี Fructosamine assay

ผลการทดลอง

1. ผลต้านอนุมูลอิสระ

พบว่า IC_{50} จากการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH และ metal chelating activity ของสารสกัดย่านาง เท่ากับ $61 \pm 16 \mu\text{g/ml}$ และ $45 \pm 4 \mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

3. ผลยับยั้งการเกิดไกลเคชัน (glycation)

เมื่อ Incubate bovine serum albumin และ glucose 500 mM เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าค่า fluorescence intensity เพิ่มขึ้น แสดงถึงการเกิดไกลเคชันที่เพิ่มขึ้น และค่า วัน amadori compound เพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามระยะเวลาในการ Incubate และ co-incubation ร่วมกับสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าค่า fluorescence intensity และ การเกิด amadori compound ลดลงซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด

4. ผลต่อการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb)

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะเพิ่มการเกิด glycosylated hemoglobin ของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากการทดลอง พบว่าสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลยับยั้งการเกิด glycosylated hemoglobin ขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ลดการเกิด glycosylated hemoglobin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

5. ผลต่อการเกิด Lipid peroxide

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะเพิ่มการเกิด Lipid peroxide ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และการให้สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลยับยั้งการเกิด Lipid peroxide ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

6. ผลต่อ Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC (RBC ghost)

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะลด Ca^{2+} - ATPase ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และการให้สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่มีผลต่อ Ca^{2+} - ATPase ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง

สรุปผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น โดยไม่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation และ Ca^{2+} ATPase activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ข้อมูลนี้ถือว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสนับสนุนคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรย่านางในการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาในการรักษาโรคแทรกซ้อนจากเบาหวานต่อไปในอนาคต

สัญญาเลขที่ : R2554B103

โครงการ : ผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด protein glycosylation, lipid peroxidation และการทำงานของ Ca^{2+} -ATPase ของเซลล์เม็ดเลือดแดงจากคนปกติ ในสภาวะน้ำตาลสูง

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติเนื่องจากร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในร่างกายนำไปใช้ได้ อย่างเต็มที่ สาเหตุเนื่องจากขาดฮอร์โมน อินซูลิน หรือ ร่างกายตอบสนองต่อฮอร์โมนตัวนี้ลดลง ซึ่งผลที่ตามมาคือระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม aldehyde ของ reducing sugar (เช่น glucose) และหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน หรือ เอนไซม์ ต่างๆ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า glycation หรือ non-enzymatic glycosylation ปฏิกิริยาดังกล่าว นำไปสู่การเกิดสารที่มีโครงสร้างที่เรียกว่า Schiff base ซึ่งเป็นสารที่ไม่คงที่เปลี่ยนแปลงไปกลับมา ได้ หลังจากนั้นจะมีการเรียงตัวใหม่ เป็นสารที่มีความคงตัวมากขึ้นเรียกว่า Amadori products และเมื่อ Amadori products เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) และจะมีการจัดเรียงโครงสร้าง ใหม่ (rearrangement) จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่คงที่ที่เรียกว่า เรียกว่า advanced glycosylation end products (AGEs) การเกิด glycation ของ โปรตีน, เอนไซม์ หรือ Insulin หรือ การสะสมของ AGEs ส่งผลให้เซลล์นั้นๆ ทำงานผิดปกติ เช่น ลดการตอบสนองต่อ insulin หรือ ไวต่อการเกิด oxidative stress รวมทั้ง สาร AGEs ยังเป็นแหล่งสำคัญที่ทำให้เกิดอนุมูล อิสระ ซึ่งจะไปทำลายเซลล์ต่างๆภายในร่างกาย จนก่อให้เกิดความผิดปกติ หรือ อาการแทรกซ้อน ต่างๆในเบาหวาน (1-4) จากงานวิจัย พบว่า การเกิด glycation ของโปรตีน มีผลให้ ATPase activity จะลดลงในเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้เป็นเบาหวาน (5-6) และในเซลล์ เม็ดเลือดแดงของคนป่วยเบาหวาน type I (7-8) ซึ่งความผิดปกตินี้ จะส่งผลให้เกิด diabetic polyneuropathy ในเบาหวานได้ (5,7,9) โดยปกติแล้ว การควบคุมการเคลื่อนที่ของ cation ต่างๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์ โดย Na/K ATPase และ Ca^{2+} ATPase activity จะมีความสำคัญในการควบคุม น้ำ สารอาหาร และสารต่างๆให้แก่เซลล์ และยังมีผลควบคุมการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อ และการนำสัญญาณของเซลล์ประสาท (10) ซึ่งถ้า Na^+-K^+ ATPase และ Ca^{2+} ATPase activity ทำงานผิดปกติไป อาจเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆ เช่น diabetic neuropathy ในเบาหวานได้

สำหรับการรักษาโรคนี้จะได้ผลดีขึ้นอยู่กับการใช้ยาอย่างมีประสิทธิภาพและรับประทานยา อย่างสม่ำเสมอ จึงสามารถลดอัตราการตายและโรคแทรกซ้อนจากภาวะนี้ได้ แต่พบว่าผู้ป่วยส่วน

ใหญ่มักให้ความร่วมมือในการรับประทานยาน้อยมาก อาจเป็นความยุ่งยากในการต้องใช้ยาควบคู่กันหลายชนิด และยารักษาโรคเบาหวานหลายตัวก็นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งมีราคาแพงมาก ดังนั้นการใช้พืชสมุนไพรในการป้องกันและควบคุมโรคจึงเป็นแนวทางในการรักษาที่น่าสนใจ ปัจจุบัน หลายคนหันมานิยมผลิตภัณฑ์ตามธรรมชาติ พวกพืชผักปลอดสารพิษ รวมทั้งหันมาใช้สมุนไพรกันมากขึ้น สำหรับการนำสมุนไพรในการป้องกันและรักษาโรค เป็นภูมิปัญญาที่สืบทอดกันมานานแล้ว แต่ยังไม่เคยมีผลงานวิจัยเด่นชัดที่สนับสนุนสรรพคุณเหล่านั้น ดังนั้นเพื่อส่งเสริมให้มีการนำสมุนไพรในการรักษาโรคอย่างเหมาะสม จึงควรมีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสมุนไพรเหล่านี้

ย่านางเป็นอีกหนึ่งสมุนไพรที่ใช้เป็นอาหารและเป็นยามาตั้งแต่โบราณ หมอยาโบราณภาคอีสาน เรียกชื่อยาของย่านางว่า “หมื่นปีไม่แก่” ชื่อวิทยาศาสตร์ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels. วงศ์ Menispermaceae ด้วยสรรพคุณที่บอกต่อกันมา ว่าการดื่มน้ำคั้นจากใบย่านางเป็นประจำ จะสามารถลดน้ำตาลในเลือด ความดันโลหิตสูง ตกเลือดจากมดลูก โรคเก๊าท์ และโรคเชื้อราทำลายเล็บ หรือเป็นผื่นคัน เป็นต้น (11-12) ถึงอย่างไรก็ยังไม่มียาวิจัยใดที่สนับสนุนข้อมูลดังกล่าว นอกจากการศึกษาเบื้องต้นที่พบว่า สารสกัดน้ำของใบย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และยังพบสารประกอบ phenolic compound ในใบย่านาง (13-14)

จากการศึกษาทางระบาดวิทยาจำนวนมาก ยืนยันถึงการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระสัมพันธ์กับการเกิดโรคภัยต่างๆ รวมทั้งภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวาน ดังนั้นการให้สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือวิตามินซี และผลไม้ ซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าว อาจช่วยลดการเกิดโรคภัยแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดย่านางแบบ *In vitro* ต่อการเกิด glycosylated protein และ oxidative stress ในเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC) ของคนปกติ ในสภาวะ high glucose และยังศึกษาผลต่อการทำงานของ Ca^{2+} ATPase activity บนผนังของเซลล์เม็ดเลือดแดง (RBC ghost) ของคนปกติ ที่อยู่ในสภาวะ high glucose ซึ่งเป็นการศึกษาแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูงจากเบาหวาน ผลที่ได้รับจากการทดลองนี้จะถือว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานทางวิทยาศาสตร์สำหรับสารสกัดย่านางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด glycation protein ใน BSA/glucose system และ high glucose-treated human erythrocytes ของคนปกติ
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิด lipid peroxide ใน high glucose-treated human erythrocytes ของคนปกติ
3. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดย่านางต่อการเกิดต่อการทำงานของ Ca^{2+} ATPase activity บน high glucose-treated human erythrocytes ghost ของคนปกติ
4. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานของสมุนไพรย่านางในการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในการบรรเทาอาการแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารสกัดย่านาง

นำใบของย่านางที่ได้จาก จ. ขอนแก่น ประเทศไทย มาหั่นเป็นชิ้นเล็กๆแล้วอบแห้งในตู้อบที่อุณหภูมิ 50°C แล้วนำไปบดจนเป็นผงละเอียดแล้วนำไปสกัดด้วยน้ำจากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -50°C จนกว่าจะนำมาใช้

2. การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดแดง (red blood cell; RBC)

เลือดจากอาสาสมัครเพศชาย วัย 20 – 30 ปี ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดปกติ ($70-110\text{ mg/mL}$) จะถูกเก็บใน tube ที่มีสาร ethylenediamine tetraacetate (EDTA) จากนั้นจะถูกนำไปปั่นให้ตกตะกอน (Centrifuge) แล้วแยกส่วนที่เป็น plasma และ buffy coat ที่ส่วนเซลล์เม็ดเลือดแดงที่เหลือจะนำไป dilute 1:10 ก่อนที่จะถูกล้างด้วย cold PBS (ตามวิธีใน Ref. 15)

3. การเตรียม RBC ในสภาวะ high glucose และ/หรือ มีสารสกัดย่านาง แบบ *In vitro*

นำ RBC จากคนปกติ dilute ใน phosphate-buffer saline ให้ได้ความเข้มข้นเป็น 10% hematocrit จากนั้น เติมสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ ก่อนเติมสารละลาย glucose 0, 5 และ 25 mM เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไป ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดลองขั้นต่อไป (ตามวิธีใน Ref. 16)

4. การเตรียมผนังเซลล์ ของ RBC (RBC ghosts)

RBC จากคนปกติ จะถูก dilute ด้วย hypotonic saline เพื่อทำให้เกิดการแตกของเซลล์เม็ดเลือดแดง แล้วนำไป centrifuge $20,000\text{ g}$ ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นล้างผนังเซลล์ ของ RBC ด้วย hypotonic saline ทำซ้ำ 3-4 ครั้ง (ตามวิธีใน Ref. 15)

5. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดย่านาง

นำสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับสารอนุมูลอิสระ DPPH 0.5 มิลลิลิตร แล้ว incubate ในที่มืด 30 นาที ก่อนนำไปวัด absorbance ที่ 517 nm โดยเครื่อง Spectrophotometer ในการทดลองนี้จะใช้ L-ascorbic เป็น positive control

6. ฤทธิ์ Metal chelating activity

นำสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 0, 10, 25, 50, 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมกับ 2 mM FeCl₂ หลังจากนั้นใส่สาร ferrozine solution ก่อน incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ในการทดลองนี้จะใช้ EDTA เป็น positive control

7. ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน (glycation) โดยวิธี Glucose-BSA (bovine serum albumin) assay

นำ Albumin (5mg/ml) มาบ่มร่วมกับ Glucose 5 และ 500mM ใน PBS (Phosphate buffer saline) โดยไม่มี หรือ มีสารสกัดย่านาง ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หรือสารมาตรฐาน aminoguanidine (เป็น positive control ซึ่งมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน) จากนั้น incubate ปฏิกิริยา ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน

เมื่อครบกำหนดให้เติมสาร Trichloroacetic acid (TCA) แล้ว centrifuge นาน 5 นาที ก่อนนำตะกอนที่ได้มาเติม PBS (ph 10) แล้ววัดการเรืองแสงโดยใช้เครื่อง Spectrofluorometer โดย excitation และ emission อยู่ที่ 360 nm และ 460 nm

8. ฤทธิ์ต่อการเกิด Amadori products

การทดลองนี้จะวิเคราะห์ปริมาณ Amadori products โดยวิธี Fructosamine assay นำ Albumin (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาบ่มร่วมกับ Glucose 5 และ 500mM ใน PBS (Phosphate buffer saline) โดยไม่มี หรือ มีสารสกัดย่านาง ที่ความเข้มข้น 0, 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 7 และ 14 วัน หลังจากนั้น ผสมกับ 0.5 mM NBT แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 530 nm

9. ฤทธิ์ต่อการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb)

ค่า GHb จะถูกวัดโดยใช้ Direct HbA1C kit ก่อนนำค่าที่ได้วัด Spectrophotometer ที่ 620 nM ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงในรูปแบบเปอร์เซ็นต์ของ total hemoglobin

10. ฤทธิ์ต่อการเกิด Lipid peroxide

การวัด lipid peroxide อาศัยหลักการทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid (TBA) จนได้ malondialdehyde (MDA) ซึ่งถือว่าเป็น end product ของ fatty acid oxidation นำ RBC ที่ได้จากข้อ 2 ผสมใน phosphate buffer saline และ butylated hydroxytoluene จากนั้นเติม 30%

TBA 0.5 มล. แล้วทิ้งบนน้ำแข็ง 2 ชม. ก่อนปั่นให้ตกตะกอนด้วย centrifuge 15 นาที Supernatant ที่ได้จะนำไปผสมกับ 1%TBA และ 0.05 NaOH แล้วปล่อยให้ทำปฏิกิริยาที่ boiling water bath 15 นาที ความเข้มข้นของ MDA-TBA complex ที่เกิดขึ้นจะวัดโดย Spectrophotometer ที่ 532 และ 600 nm (ตามวิธีใน Ref. 15)

11.ฤทธิ์ต่อ Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC (RBC ghost)

ปริมาณ Protein ของ RBC ghost จากคนปกติ จะถูกวัดโดยใช้ protein assay kit ซึ่งจะใช้ bovine serum albumin เป็น standard RBC ghost ผสมกับ 40 mM HEPES, 100 mM KCl, 5 mM $MgSO_4$, 2.1 mM ATP, 1 mM EGTA และ 0.86 mM $CaCl_2$ ทิ้งไว้ 5 นาที แล้วใส่ 100 mM EGTA ก่อน incubate บนน้ำแข็งเป็นเวลา 60 นาที ปริมาณ total phosphate ที่เกิดขึ้นจะถูกวัดโดยใช้ phosphate assay kit วัดโดย Spectrophotometer ที่ 660 nm ค่าที่ได้จะแสดงในรูปแบบ $\mu\text{mol/mg protein}$ (ตามวิธีใน Ref. 18)

12. การวิเคราะห์ทางสถิติ

จากผลการทดลอง ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป mean \pm SEM การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism

ผลการทดลอง

1 ผลการยับยั้งการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH

จากตารางที่ 1 พบว่า IC_{50} จากการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัดย่านางสามารถยับยั้งความเข้มข้นของสารอนุมูลอิสระ DPPH เท่ากับ 61 ± 16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรซึ่งเมื่อเทียบกับ L-ascorbic สารสกัดจากย่านางมีผลยับยั้งได้ดีกว่า L-ascorbic ถึง 2.6 เท่า

2. ผล metal chelating activity

จากตารางที่ 2 พบว่าค่า IC_{50} จากการ metal chelating activity ของสารสกัดย่านาง เท่ากับ 45 ± 4 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ขณะที่ ค่า IC_{50} จากการ metal chelating activity ของ EDTA เท่ากับ 17 ± 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 1 แสดงค่า IC 50 ของ ความสามารถในการดักจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารสกัด
 ย่านาง ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ – 10 mg/mL หรือสาร L- ascorbic acid ที่ความเข้มข้น 1
 $\mu\text{g/mL}$ – 10 mg/mL

สาร	IC ₅₀
ย่านาง	61± 16 $\mu\text{g/ml}$
l-ascorbic	160± 3 $\mu\text{g/ml}$

ตารางที่ 2 แสดงค่า IC 50 ของ ความสามารถในการ metal chelating activity ของสารสกัด
 ย่านาง ที่ความเข้มข้น 1 $\mu\text{g/mL}$ – 10 mg/mL หรือสาร EDTA ที่ความเข้มข้น 0.1 $\mu\text{g/mL}$ – 10
 mg/mL

สาร	IC ₅₀
ย่านาง	45 ± 4 $\mu\text{g/ml}$
EDTA	17 ± 3 $\mu\text{g/ml}$

3. ผลยับยั้งการเกิดไกลเคชัน (glycation) ของสารสกัดย่านาง

จากตารางที่ 3 และภาพที่ 1 แสดงฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาไกลเคชัน เมื่อ Incubate bovine serum albumin และ glucose 500 mM เป็นเวลา 7 และ 14 วัน พบว่าค่า fluorescence intensity เพิ่มขึ้น แสดงถึงการเกิดไกลเคชันที่เพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามระยะเวลาในการ Incubate และ co-incubation ร่วมกับสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 25 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าค่า fluorescence intensity ลดลงซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารสกัด ขณะที่สาร aminoguanidine ที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชันให้ผล fluorescence intensity ที่ลดลงเช่นเดียวกัน จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน

4. ผลต่อการเกิด Amadori production ใน BSA/glucose system

การเกิด glycation ของโปรตีน ซึ่งจะประเมินความสามารถของการเกิด amadori compound โดยใช้การวิเคราะห์ fructosamine assay โดย amadori compound จะ reduce สาร NBT เป็น tetrazinoly radical ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 530 nm จากการทดลอง พบว่าการ incubate โปรตีนอัลบูมินในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 500 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) เป็นระยะเวลา 7 และ 14 วัน จะเพิ่ม amadori compound โดยขึ้นกับระยะเวลา และ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะลดการเกิด amadori compound อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเกิดไกลเคชัน (glycation) ของ *Tiliacora triandra* ความเข้มข้น 10, 25, 50 µg/ml เทียบกับ aminoguanidine (AG) 1 mM ที่ 7 วัน และ 24 วัน

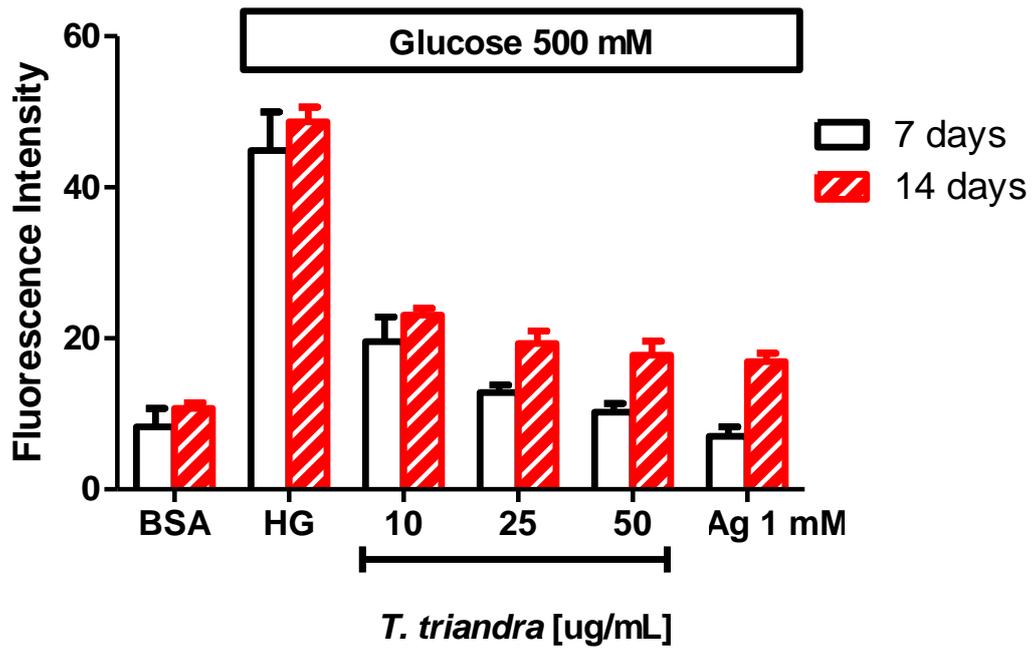
condition	7 วัน	14 วัน
	Mean ± SEM	Mean ± SEM
BSA	8.2± 2.4	10.7± 0.7
BSA+glucose 5 mM	13.1± 3.9	19.0± 1.8
BSA+glucose 500 mM	44.8± 5.1	46.6± 2.0
BSA+glucose 500 mM+สารสกัด 10 µg/ml	17.2± 2.9*	22.6± 0.8*
BSA+glucose 500 mM+สารสกัด 25 µg/ml	11.2± 1.3*	21.5± 1.9*
BSA+glucose 500 mM+สารสกัด 50 µg/ml	10.2± 1.1*	18.5± 1.8*
BSA+glucose 500 mM+AG 1mM	7.1± 1.2*	16.7± 1.1*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P< 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่ม BSA+glucose 500 mM

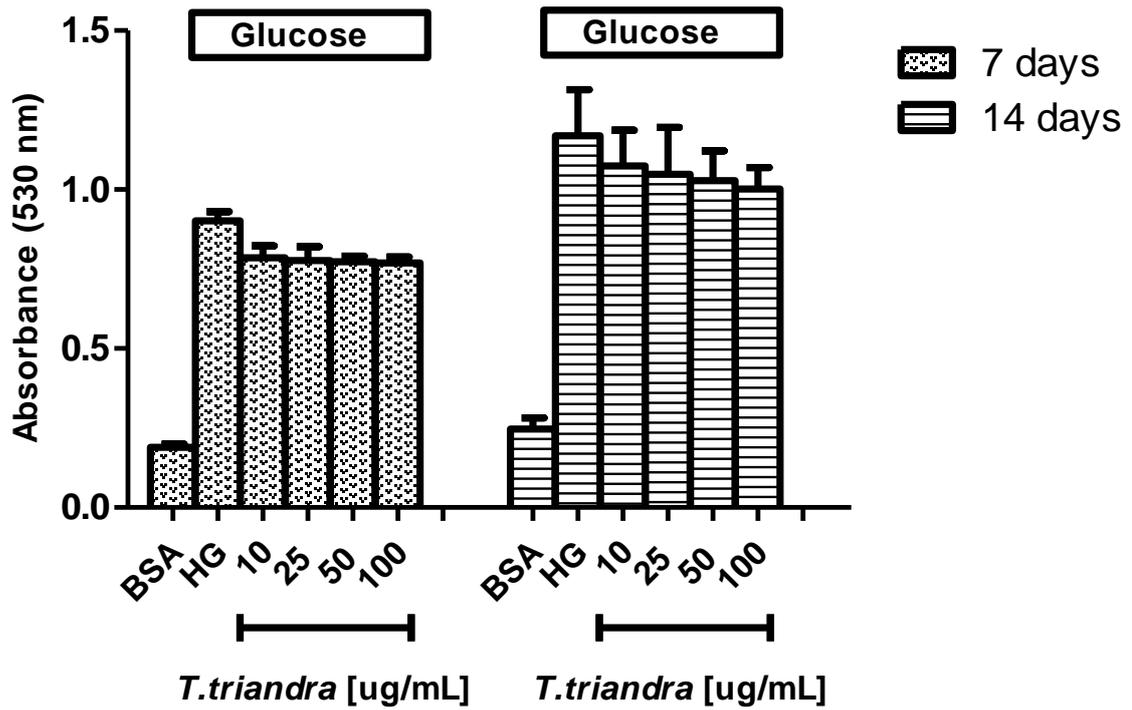
ตารางที่ 4 แสดงผลของสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 µg/mL ต่อการเกิด amadori compound ในระบบ BSA/glucose system ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	Amadori production (Absorbance; 530 nm)	
	7 วัน	14 วัน
BSA	0.19 ± 0.01	0.24 ± 0.03
HG (500 mM)	0.92 ± 0.04	1.17 ± 0.14
HG (500 mM) + สารสกัด 10 µg/mL	0.79 ± 0.03*	1.07 ± 0.11*
HG (500 mM) + สารสกัด 25 µg/mL	0.77 ± 0.04*	1.04 ± 0.14*
HG(500 mM) + สารสกัด 50 µg/mL	0.76 ± 0.01*	1.02 ± 0.09*
HG (500 mM) + สารสกัด 100 µg/mL	0.75 ± 0.02*	1.00 ± 0.06*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG



ภาพที่ 1 แสดงค่า fluorescence intensity ของ *Tiliacora triandra* 10, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ และ aminoguanidine 1 mM ที่ 7 วัน และ 24 วัน โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป Mean \pm SEM



ภาพที่ 2 แสดงผลของสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ต่อการเกิด amadori production ในระบบ BSA/glucose system ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย \pm SEM; * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG

5. ผลต่อการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb)

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะเพิ่มการเกิด glycosylated hemoglobin ของเซลล์เม็ดเลือดแดง จากการทดลอง พบว่าสารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งการเกิด glycosylated hemoglobin ขณะที่ความเข้มข้น 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ลดการเกิด glycosylated hemoglobin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(ตารางที่ 5 และภาพที่ 3)

6. ผลต่อการเกิด Lipid peroxide

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะเพิ่มการเกิด Lipid peroxide ของเซลล์เม็ดเลือดแดง และการให้สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลยับยั้งการเกิด Lipid peroxide ของเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังแสดงในตารางที่ 6

7. ผลต่อ Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC (RBC ghost)

จากการทดลอง พบว่าการ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) จะลด Ca^{2+} - ATPase ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง และการให้สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีผลต่อ Ca^{2+} - ATPase ของผนังเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังแสดงในภาพที่ 4

ตารางที่ 5 แสดงค่าการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb) ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ใน สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

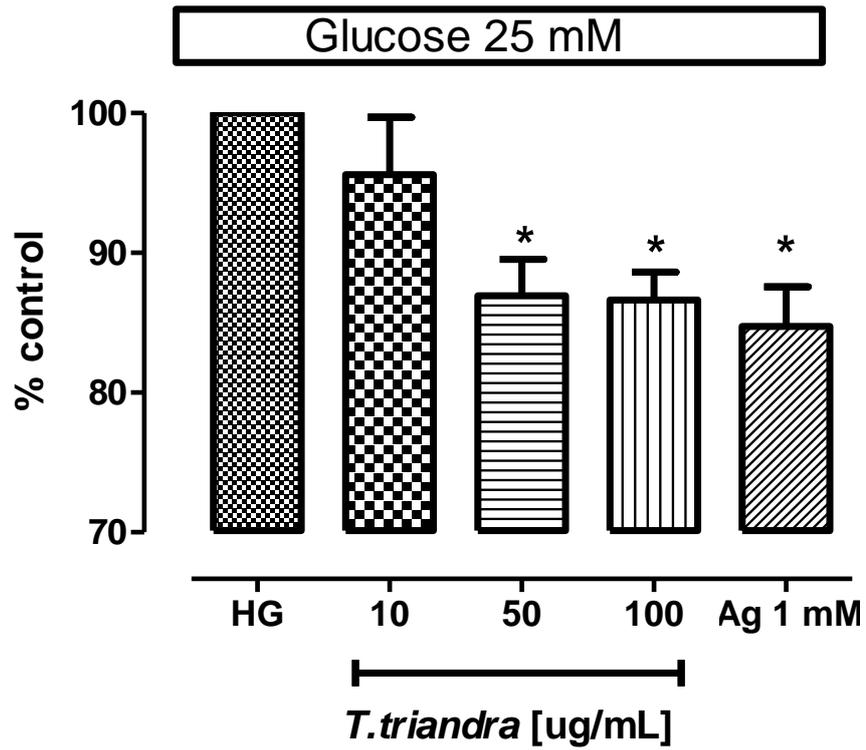
	Glycated Hemoglobin (HbA _{1c} , % control)
HG (25 mM)	100
HG (25 mM) + สารสกัด 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	96 \pm 4
HG (25 mM) + สารสกัด 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	87 \pm 3*
HG (25 mM) + สารสกัด 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	87 \pm 2*
HG (25 mM) + AG 1 mM	83 \pm 2*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG

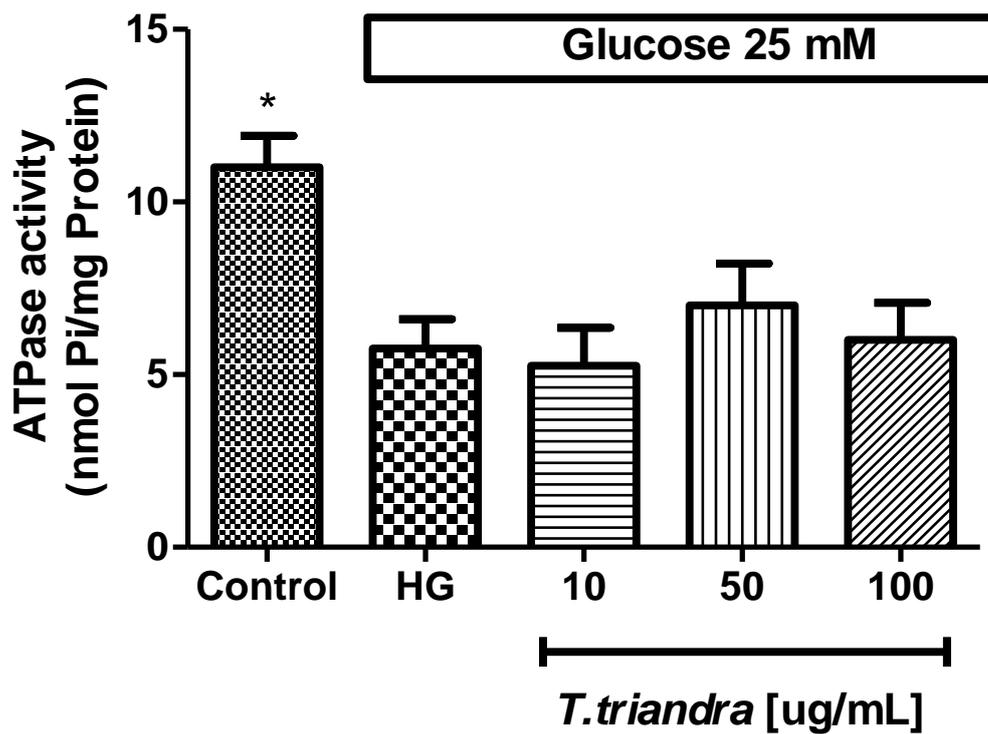
ตารางที่ 6 แสดงค่าการเกิด Lipid peroxide ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 5 mM (เลียนแบบภาวะปกติ) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 1, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

	Lipid peroxide (nmol/g Hb)
Glucose (5 mM)	3.5 \pm 0.9*
HG (25 mM)	4.8 \pm 1.3
HG (25 mM) + สารสกัดย่านาง 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.7 \pm 1.2
HG (25 mM) + สารสกัดย่านาง 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.2 \pm 1.0
HG (25 mM) + สารสกัดย่านาง 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	4.3 \pm 1.1

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG



ภาพที่ 3 แสดงการเกิด glycosylated hemoglobin (GHb) ของเม็ดเลือดแดงที่อยู่ใน สภาวะที่มี น้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยข้อมูลที่ได้จะอยู่ใน รูป Mean \pm SEM ; * $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG



ภาพที่ 4 แสดง Ca^{2+} ATPase activity ในผนังเซลล์ของ RBC ที่อยู่ใน สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM (เลียนแบบภาวะน้ำตาลในเลือดสูง; HG) และ สภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคส 25 mM ร่วมกับ สารสกัดย่านางที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; * $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม HG

วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ พบว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน โดยไม่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation และ Ca^{2+} ATPase activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดง

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติเนื่องจากร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลในร่างกายไปใช้ได้ อย่างเต็มที่ สาเหตุเนื่องจากขาดฮอร์โมน อินซูลิน หรือ ร่างกายตอบสนองต่อฮอร์โมนตัวนี้ลดลง ซึ่งผลที่ตามมาคือระดับน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ส่งผลให้เกิดการทำปฏิกิริยาระหว่างกลุ่ม aldehyde ของ reducing sugar (เช่น glucose) และหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน หรือ เอนไซม์ ต่างๆ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า glycation หรือ non-enzymatic glycosylation การเกิด glycation ของโปรตีน อาจแบ่งเป็น 2 ระยะ คือ ระยะเริ่มต้น ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจนเกิด amadori products ขณะที่ระยะสุดท้าย จะเป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ amadori products จนกลายเป็น AGEs ซึ่งจะมีคุณสมบัติเรืองแสง การวัด BSA fructosamine เป็นการประเมินการเกิด amadori products ในระยะเริ่มต้น (19) พบว่า สารสกัดย่านางมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด amadori products นอกจากนี้ ยังวัดการเกิด total AGE products โดยการวัด fluorescence intensity พบว่า การ incubate โปรตีนในสภาวะที่มีกลูโคสสูง จะเพิ่ม total AGE products และสารสกัด ย่านางมีฤทธิ์ลดการเกิด total AGE products นอกจากนี้ เมื่อ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงกับ น้ำตาลกลูโคส เป็นเวลา 1 วัน พบว่า มีการเพิ่มปริมาณ glycated hemoglobin และการให้สาร สกัดย่านางร่วมด้วย จะลดปริมาณ glycated hemoglobin ดังนั้น อาจสรุปได้ว่า สารสกัดย่านางมี ฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชัน

มีหลายงานวิจัย พบว่า การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ เป็นอีกปัจจัยที่ก่อให้เกิด ภาวะแทรกซ้อนต่างๆในโรคเบาหวาน โดยภาวะน้ำตาลที่เพิ่มสูงขึ้นจะเพิ่มอนุมูลอิสระ จาก ปฏิกิริยา autoxidation ของน้ำตาลกลูโคส หรือจากการเกิด glycated protein ซึ่งก่อให้เกิด lipid peroxidation และการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ต่างๆ รวมทั้งเซลล์เม็ดเลือดแดงในภาวะ เบาหวาน นอกจากนี้ อนุมูลอิสระก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่เสริมให้ glycated protein เกิดการ เปลี่ยนแปลงมากขึ้นจนเป็น AGEs (20,21) มีงานวิจัยพบว่า activity ของเอนไซม์ ATPase จะ ลดลงในเม็ดเลือดแดงที่อยู่ในภาวะน้ำตาลในเลือดสูง โดยเป็นผลมาจากการเกิด lipid peroxidation หรือ การเกิด glycation ของ enzyme protein

จากการทดลอง พบว่า สารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ โดยสามารถดักจับอนุมูล อิสระ DPPH ได้ดีกว่า L-ascorbic และยังสามารถจับกับโลหะที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน (metal chelating activity) ซึ่งให้ผลคล้ายกับการทดลองก่อนหน้า (13-14) จึงเป็นไปได้ว่า ฤทธิ์

ในการยับยั้งการเกิด AGEs ของสารสกัดย่านางนั้นอาจเป็นผลมาจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และ metal chelating activity เพราะ อนุมูลอิสระ และ transition metal ions มีส่วนทำให้เกิด AGEs (22, 23) เมื่อ incubate เซลล์เม็ดเลือดแดงในสภาวะที่มีน้ำตาลสูง จะเพิ่มการเกิด lipid peroxidation และลด Ca^{2+} ATPase activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่เมื่อให้สารสกัดย่านางร่วมด้วย กลับไม่มีผลต่อการเกิด lipid peroxidation และลด Ca^{2+} ATPase activity ของเซลล์เม็ดเลือดแดง เป็นไปได้ว่า ความเข้มข้นของสารสกัดย่านางที่ใช้ในการทดลองอาจน้อยเกินไป

ดังนั้นสรุปได้ว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลโคเคชัน ข้อมูลนี้ถือว่าเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการสนับสนุนคุณสมบัติของสารสกัดสมุนไพรย่านางในการนำมาพัฒนาเป็นยารักษาในการรักษาโรคแทรกซ้อนจากเบาหวานต่อไปในอนาคต

สรุปและเสนอแนะเกี่ยวกับการวิจัยในขั้นต่อไป

จากผลการวิจัยพบว่าสารสกัดย่านางมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาไกลโคเคชัน โดยเป็นการศึกษาแบบ *in vitro* อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดย่านางต่ออาการเกิดปฏิกิริยาไกลโคเคชันควรมีการศึกษาต่อไป รวมทั้งทั้งการศึกษาในสัตว์ทดลองและมนุษย์ เพื่อยืนยันคุณสมบัติของสารสกัดย่านางต่อเกิดปฏิกิริยาไกลโคเคชัน และสามารถนำมารักษาโรคแทรกซ้อนในภาวะเบาหวาน

เอกสารอ้างอิง

1. Jain, S. K., (1989). hyperglycemia can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J. Biol. Chem.* 264:21340–21345.
2. Rajeswari, P.; Natarajan, R.; Nadler, J. L.; Kumar, D., (1991). Glucose induces lipid peroxidation and inactivation of membrane associated iron transport enzymes in human erythrocytes in vivo and in vitro. *J. Cell Physiol.* 149:100–109.
3. Natarajan, R.; Lanting, L.; Gonzales, N.; Nadler, J., (1996). Formation of an F2-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am. J. Physiol.* 271:159–165.
4. Giugliano, D.; Paolisso, G.; Ceriello, A., (1996). Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 19:257–267.
5. Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF (1987) Sorbitol, phosphoinositides, and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 316: 599±605
6. Raccach D, Jannot MF, Issautier D, Vague P (1994) Effect of experimental diabetes on Na/K ATPase activity in red blood cells, peripheral nerve and kidney. *Diabet Metab* 20: 271-274
7. Raccach D, Gallice P, Pouget J, Vague P (1992) Hypothesis low Na/K ATPase activities of the red cell membrane, a potential marker of the predisposition to diabetic neuropathy. *Diabet Metab* 18:236-241
8. Finotti P, Palatini P (1987) Reduction of erythrocyte Na + K⁺ ATPase activity in Type I (insulin-dependent) diabetic subjects and its activation by homologous plasma. *Diabetes* 36: 991-995
9. Raccach D, Fabreguettes C, Azulay JP, Vague P (1996) Erythrocyte Na/K ATPase activity, metabolic control and neuropathy in insulin dependent diabetic patients. *Diabetes Care* 19: 564±568
10. Jain SK, Lim G., (2000). Lipoic acid decreases lipid peroxidation and protein glycosylation and increases (Na⁺ + K⁺)- and Ca⁺⁺-ATPase activities in high glucose-treated human erythrocytes. *Free Radic Biol Med.* 29(11):1122-8.

11. สถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข (2540) สมุนไพรพื้นบ้าน ฉบับรวม. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพมหานคร: P.A. Living Co., Ltd. หน้า 2-3.
12. โจเพชร มีทรัพย์. ย่านาง สมุนไพรมหัศจรรย์. ชีวระการพิมพ์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-16.
13. Smitinand,T.&Larsen,K.(1991). Flora of Thailand (Vol.5 Part3).Bangkok:The Forest Herbarium, Royal Forest Department.
14. Bungon W and Sasilak P., (2006). Free radical scavenger of Thai vegetables. Special project submitted in partial fulfilment of the requirement for the bachelor degree of science in pharmacy. Faculty of Pharmacy, Mahidol University.
15. Virgili F, Battistini N, Canali R, Vannini V, Tomasi A, (1996). High glucose-induced membrane lipid peroxidation on intact erythrocytes and on isolated erythrocyte membrane (ghosts). Journal of nutritional biochemistry . 7:156-161.
16. Jain SK, Rains J, Jones K., (2006) Effect of curcumin on protein glycosylation, lipid peroxidation, and oxygen radical generation in human red blood cells exposed to high glucose levels. Free Radic Biol Med. 41(1):92-6.
17. Iwalokun BA, Iwalokun SO., (2007). Association between erythrocyte Na^+K^+ -ATPase activity and some blood lipids in type 1 diabetic patients from Lagos, Nigeria. BMC Endocr Disord. 1;1-8.
18. Bewaji CO, Dawson AP., (1995). Thapsigargin protects human erythrocyte $\text{Ca}(2+)\text{-ATPase}$ from proteolysis. Cell Calcium.17(1):14-20.
19. Fu MX, Wells-Knecht KJ, Blackledge JA, Lyons TJ, Thorpe SR, Baynes JW., (1994) Glycation, glycooxidation, and cross-linking of collagen by glucose. Kinetics, mechanisms, and inhibition of late stages of the Maillard reaction. Diabetes. 43(5):676-83.
20. Yokozawa T, Nakagawa T., (2004). Inhibitory effects of Luobuma tea and its components against glucose-mediated protein damage. Food Chem Toxicol. 42(6):975-81.
21. Ardestani A, Yazdanparast R., (2007). Inhibitory effects of ethyl acetate extract of *Teucrium polium* on in vitro protein glycooxidation. Food Chem Toxicol. 45(12):2402-11.
22. Wang, J.; Sun, B.; Cao, Y.; Tian, Y., (2009). Protein glycation inhibitory activity of wheat bran feruloyl oligosaccharides Food Chem. 112, 350– 353

23. Price DL, Rhett PM, Thorpe SR, Baynes JW. Chelating activity of advanced glycation end-product inhibitors. *J Biol Chem.* 2001 ;28;276(52):48967-72.

ภาคผนวก

Output ของโครงการ

1. Poster presentation : Antioxidant and antiglycation properties of the water extract of *Tiliacora triandra*. Naresuan Research Conference 8, 28-29th July 2005, Phitsanulok, Thailand (แบบเอกสารตอบรับการนำเสนอผลงาน)