

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาดจากส้มโอพันธุ์ทองดี ต่อภาวะดื้อต่ออินซูลินและความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำในหนูเบาหวานชนิด 2

ชลธิชา วงศ์ไชยา¹ ชลธิชา อาริบบำบัด¹ นนทพัฒน์ เบ็ญจธรรม¹ อัมพร จาริยะพงศ์สกุล²

¹หลักสูตรชีวภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

²ภาควิชาสรีรวิทยา หลักสูตรชีวภาพการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Received: February 12, 2020

Revised: March 27, 2020

Accepted: March 31, 2020

บทคัดย่อ

ส้มโอมีสารพฤกษเคมีที่สำคัญโดยเฉพาะสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ แต่ในปัจจุบันยังไม่พบการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของสารสกัดจากส้มโอในการป้องกันหรือฟื้นฟูความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำในภาวะเบาหวานชนิด 2 ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาดจากส้มโอต่อภาวะดื้อต่ออินซูลิน การเรียนรู้และความจำในหนูเบาหวานชนิด 2 โดยทำการศึกษาในหนูขาว Sprague Dawley เพศผู้ (น้ำหนักตัว 150-180 กรัม) แบ่งหนูเป็น 3 กลุ่มและแบ่งอย่างสุ่ม ได้แก่ หนูควบคุมปกติ (Control) และหนูเบาหวานชนิด 2 ทั้งที่ได้รับและไม่ได้รับการป้องกันด้วยสารสกัดหยาดจากส้มโอ (DM2-PM และ DM2 ตามลำดับ) การเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานชนิด 2 โดยป้อนอาหารไขมันสูง (ไขมัน 40%, 5,085 กิโลกรัม-แคลอรี) เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นฉีดสารสเตโรบโดโซโตซินขนาดต่ำ 30 mg/kg BW เข้าทางหลอดเลือดดำ ป้อนสารสกัดหยาดจากส้มโอ (PM) ขนาด 200 mg/kg BW แก่หนูเบาหวานเป็นเวลา 12 สัปดาห์ พารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษา ได้แก่ 1) พารามิเตอร์ทางเมตาบอลิก ได้แก่ ระดับกลูโคส (blood glucose; BG) คอเลสเตอรอล (cholesterol; CHOL) ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride; TG) และค่าฮีโมโกลบิน เอวันซี (hemoglobin A1C: HbA1C) ในเลือด วิเคราะห์ระดับอินซูลินในเซรัม (S. insulin) ทดสอบ Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) และคำนวณดัชนีบ่งชี้ภาวะดื้อต่ออินซูลิน (HOMA-IR) 2) ค่าอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง (cerebral blood perfusion; CBP) 3) ระยะเวลาที่บ่งชี้ความสามารถในการเรียนรู้และความจำ โดยใช้วิธี Morris water maze (MWM) test โดยการหาระยะเวลา escape latency (EL) ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ความสามารถในการเรียนรู้ และ total time spent in platform area (TTSP) เป็นดัชนีบ่งชี้ด้านความจำ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม Control พบว่าหนู DM2 มีระดับ BG, HbA1C, CHOL, TG ในเลือดและค่า S. insulin สูงกว่า ขณะที่ค่า CBP ต่ำกว่า เมื่อคำนวณค่า HOMA-IR ได้ผลว่าหนูกลุ่ม DM2 มีภาวะดื้อต่ออินซูลิน เมื่อทดสอบ MWM test พบว่าหนู DM2 มีระยะเวลา EL ที่ยาวและ TTSP ที่สั้นกว่าหนู control บ่งชี้ว่ามีความสามารถในการเรียนรู้และความจำที่ต่ำกว่ากลุ่ม Control ขณะที่หนูกลุ่ม DM2-PM พบมีค่าทางเมตาบอลิกที่ลดลงทั้ง BG, CHOL, TG รวมทั้ง S. insulin และดัชนี HOMA-IR ต่ำกว่าค่าในกลุ่ม DM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการทดสอบ MWM พบว่าระยะเวลา ของ EL ที่สั้น และ TTSP ที่ยาวกว่าหนู DM2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาดจากส้มโอที่ป้อนให้หนูเบาหวานอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถฟื้นฟูความบกพร่องทางด้านการเรียนรู้และความจำในหนูเบาหวานชนิด 2 ได้ โดยส่วนหนึ่งเป็นผลมาจากการลดลงของภาวะดื้อต่ออินซูลิน การเพิ่มขึ้นของอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง และจากฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด

คำสำคัญ: สารสกัดหยาดจากส้มโอ เบาหวานชนิด 2 ภาวะดื้อต่ออินซูลิน อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง ความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำ

ผู้นิพนธ์ประสานงาน:

อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

114 ถนนสุขุมวิท ซอยสุขุมวิท 23

แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพฯ 10110

อีเมล: ampornswu@gmail.com

Effect of Pomelo crude extract (Thong Dee cultivar) on insulin resistance and cognitive impairment in type 2 diabetic rats

Chonticha Wongchaiya¹, Chonticha Areebambud¹, Nontapat Benjatham¹, Amporn Jariyapongskul²

¹Biomedical Science program, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

²Department of Physiology and Biomedical Science program, Faculty of Medicine,
Srinakharinwirot University

Abstract

One of the most important chemical compositions of Pomelo crude extract is flavonoids which are classified as strong anti-oxidant and anti-inflammatory activities. However, the effect of Pomelo crude extract on cognitive impairment in type 2 diabetes has not been investigated. Therefore, the present study aims to examine effects of Pomelo crude extract (PM) on insulin resistance and cognitive impairment in type 2 diabetes (DM2) rat model. Male Sprague-Dawley rats (150-180 grams) were randomly divided into three groups: normal control (Control), type 2 diabetes with PM (DM2-PM) and type 2 diabetes without PM (DM2) supplementation. Type 2 diabetes was induced in rats by feeding high fat diet (40.0% fat with 5,085 kcal/kg diet) for consecutive three weeks followed by an I.V. injection of low dose streptozotocin (30 mg/kg BW). Daily gavage feeding of PM with 200 mg/kg BW was performed for 12 weeks. The effect of PM was studied on 1) metabolic changes; blood glucose (BG), hemoglobin A1C (HbA1C) blood cholesterol (CHOL), triglyceride (TG), serum insulin (S. insulin), Oral Glucose Tolerance Test (OGTT) and calculated HOMA-IR (insulin resistance index), 2) cerebral blood perfusion (CBP) and 3) cognitive performance. Morris water maze test was used to evaluate cognitive performance. The elevated blood glucose, HbA1c, cholesterol, triglyceride were observed in DM2 rats. Our results showed that insulin resistance, as evaluated by an increasing in S. insulin and HOMA-IR were developed in HF fed and low dose of STZ induced DM2 rat model. Compared with control rats, DM2 rats had decline in CBP and cognitive performance in the Morris water maze test. Performance on Morris water maze test improved after PM supplementation in DM2-PM rats. PM not only reduced EL but also increased the TTSP in the target quadrant in DM2-PM rats compared to those of DM2 rats. In addition, as compared to DM2 rats, DM2-PM rats demonstrated a significant reduction in BG, CHOL, TG and S. insulin and HOMA-IR. Therefore, long-term Pomelo crude extract supplementation in type 2 diabetic rats could improve cognitive impairment through increased insulin sensitivity and increased in cerebral blood perfusion through its anti-hyperglycemia, and anti-dyslipidemia.

Keywords: type 2 diabetes mellitus, pomelo crude extract, insulin resistance, cerebral blood perfusion, cognitive impairment

Corresponding Author:

Amporn Jariyapongskul

Department of Physiology, Faculty of Medicine,

Srinakharinwirot University

114 Sukhumvit Road, Sukhumvit 23,

Bangkok 10110, Thailand

E-mail: ampornswu@gmail.com

บทนำ

โรคเบาหวานชนิด 2 (type 2 diabetes mellitus) เกิดจากภาวะที่ร่างกายตอบสนองต่ออินซูลินลดลง หรือมีภาวะที่ดื้อต่ออินซูลินส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงเป็นระยะเวลานาน รวมไปถึงภาวะดื้อต่ออินซูลิน ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่ออวัยวะสำคัญต่างๆ ทั้ง หัวใจ ตา ไต และ สมอ ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาถึงความเชื่อมโยงของโรคเบาหวานกับการเกิดภาวะสมองเสื่อมโดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานอย่างเรื้อรังจะมีความบกพร่องด้านความสามารถทางการเรียนรู้และความจำ (cognitive impairment)¹ ผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน จะมีผลกระทบต่อเซลล์และเนื้อเยื่อต่างๆ ของร่างกายรวมถึงเซลล์เอ็นโดทีเลียมที่บุผนังหลอดเลือด ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือด นำไปสู่การลดลงของอัตราการไหลเวียนเลือดที่อวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะที่สมอง จะทำให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ blood brain barrier (BBB)² Weller และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษา และตั้งสมมติฐานไว้ว่าการทำงานที่ผิดปกติของหลอดเลือดในสมองทำให้เกิดความผิดปกติในกระบวนการอะไมลอยด์ (A β) ในเนื้อเยื่อสมองทำให้เกิดการสะสมของ A β ³ นอกจากนั้นระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงยังมีผลกระทบต่อระบบประสาทและเนื้อเยื่อสมอง ความผิดปกติดังกล่าวข้างต้นจะนำไปสู่การเกิดภาวะ cognitive impairment โดยเฉพาะสมองในส่วนฮิปโปแคมปัสที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ และการจดจำในระยะยาวจะทำให้เกิดโรคสมองเสื่อม และโรคอัลไซเมอร์ได้ในที่สุด⁴⁻⁶ นอกเหนือจากระดับน้ำตาลที่สูงมากเกินปกติจะเป็นปัจจัยเสี่ยงหนึ่งของการเกิดภาวะสมองเสื่อมแล้ว ยังพบว่าภาวะดื้อต่ออินซูลิน (insulin resistance) ที่เกิดในโรคเบาหวานชนิด 2 ยังมีผลต่อการเกิดภาวะสมองเสื่อมด้วย โดยระดับของอินซูลินในเลือดที่สูงมากเกินปกติในภาวะดื้อต่ออินซูลิน มีผลทำให้เซลล์สมองเกิดภาวะดื้อต่อ

อินซูลินด้วย และ insulin receptor ในเนื้อเยื่อสมองจะทำงานได้ลดลง นำไปสู่การเกิดภาวะสมองเสื่อมได้

จากข้อมูลการวิจัยดังกล่าวข้างต้นจะเห็นว่าภาวะแทรกซ้อนของเบาหวานต่อสมองที่นำไปสู่การเกิดภาวะสมองเสื่อมนั้นมีจุดกำเนิดมาจากการมีระดับน้ำตาลที่สูงเกินปกติเป็นเวลานานและการเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินทำให้มีผลกระทบต่อการทำงานของหลอดเลือดในสมองและการทำงานของเซลล์ประสาท ดังนั้น การป้องกันการเกิดภาวะสมองเสื่อมในผู้ป่วยเบาหวานที่ดีที่สุด ได้แก่ การลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดให้ใกล้เคียงปกติมากที่สุด และการเพิ่มการทำงานทั้งฮอร์โมนอินซูลินและตัวรับอินซูลินที่สมอง

การรักษาโรคเบาหวานและป้องกันภาวะแทรกซ้อนของเบาหวานในปัจจุบันให้ความสนใจไปที่การใช้สมุนไพร ผัก และผลไม้ที่มีในท้องถิ่นเพื่อต้านฤทธิ์เบาหวาน มีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่ง ที่ศึกษาฤทธิ์ของการบริโภคผลไม้ในการลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท^{7,8} ผลไม้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดการทำลายเซลล์ ไปจนถึงลดการทำลายเนื้อเยื่อส่วนประกอบสำคัญในผลไม้ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น ฤทธิ์จากวิตามิน และฟีนอลิกที่มีอยู่ในผลไม้ก็มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ผลไม้ในตระกูลส้ม เช่น ส้มโอ นอกจากจะมีส่วนประกอบเป็น sugar, organic acid, citric acid แล้วยังมีสารออกฤทธิ์ที่ให้ผลดีต่อการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น ascorbic acid, mineral และ flavonoid (ตัวอย่าง flavonoid ในส้ม, ส้มโอ เช่น naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin)^{9,10} ประเทศไทยมีการปลูกส้มโอหลายจังหวัดและมีคุณภาพ มีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยาทั้งที่ได้จากส่วนเปลือก เนื้อ และเมล็ด นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ส้มโอยังมีสรรพคุณในการช่วยบำรุงกระเพาะอาหาร การย่อยอาหาร จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ พบว่า ส้มโอพันธุ์ทองดีที่ระยะความแก่เพื่อการ

ส่งออกมีปริมาณวิตามินซี และ flavonoid¹¹ ชนิดของ flavonoid ที่พบมากที่สุดคือในส้มโอพันธุ์ทองดี ได้แก่ naringin การศึกษาในปัจจุบัน โดย Sachdeva และคณะ (2014) พบว่าการป้อนสาร naringin ขนาด 50 mg/kg BW ให้หนูที่ถูกทำให้เป็นอัลไซเมอร์ สามารถฟื้นฟูภาวะ cognitive impairment ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยผ่านทางการลดอนุมูลอิสระ และลดสาร cytokine ในเนื้อเยื่อสมอง¹² การศึกษาครั้งนี้ใช้สารสกัดหยาบจากเนื้อส้มโอพันธุ์ทองดี ที่ยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนเพื่อทดสอบฤทธิ์ในการฟื้นฟูภาวะดื้อต่ออินซูลินและภาวะบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำในหนูเบาหวานชนิด 2

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากส้มโอพันธุ์ทองดีต่อภาวะดื้อต่ออินซูลิน การเรียนรู้ และความจำในหนูเบาหวานชนิด 2

วิธีการศึกษา

วัตถุดิบส้มโอที่ใช้ในการศึกษา

ส้มโอพันธุ์ทองดี (*C.grandis* (L.) Osbeck) จากสวนของเกษตรกร (สวนวิรัตน์ สุขแสง) ในอำเภอปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช เป็นส้มโอเกรดส่งออกโดยกำหนดความแก่ที่ 70% ส้มโอที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เก็บเกี่ยวในช่วงเวลาเดียวกันจำนวน 100 kg นำมาปอกเปลือก และนำเนื้อส้มโอไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบแยกกากระดับอุตสาหกรรม นำน้ำคั้นส้มโอที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการแปรรูปและวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

การเตรียมสารสกัดหยาบจากส้มโอ

ทำการละลาย (thawing) ตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอที่อุณหภูมิห้อง และนำไปแยกกากอีกครั้งโดยใช้เครื่อง Large Capacity Refrigerated Centrifuge (Mfr. SANYO GALLINKAMP PLC, FALCON) จากนั้นปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำคั้น

ส้มโอส่วนใสให้เท่ากับ 15° Brix ด้วย Maltodextrin DE10 (บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ จำกัด (มหาชน)) และเติมสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน ได้แก่ Tricalcium phosphate (SD BNI (CN) CO.,LTD) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำน้ำคั้นส้มโอที่ได้ นำไปเข้าเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dry) จนได้สารสกัดหยาบเป็นผง จากนั้นทำการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของสารสกัดหยาบจากส้มโอโดยการวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (total phenolic) โดยวิธี Folin- ciocalteu (ดัดแปลงจาก Singleton และ Rossi, 1965)¹³, วิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (total flavonoids) (ดัดแปลงจาก Rafaela Guimarães และคณะ, 2010)¹⁴, วิเคราะห์ปริมาณนาริงจีน โดยใช้เครื่อง High performance liquid chromatography (HPLC)

ผลการสกัดและตรวจสอบสารออกฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากส้มโอ

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากส้มโอ พบว่า ส้มโอพร้อมเปลือก 100 กิโลกรัมสามารถสกัดเป็นสารสกัดหยาบได้ 1.57 กิโลกรัม สารสกัดหยาบจากส้มโอ มีปริมาณความชื้น 2.07 % เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าสารสกัดหยาบจากส้มโอ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด $3389.73 \pm 360.98 \mu\text{gGAE/g}$, ปริมาณฟลาโวนอยด์ $192.2 \pm 10.8 \mu\text{gCE/g}$, ปริมาณกรดแอสคอร์บิก $1694.15 \pm 26.59 \mu\text{g/g}$ และมีปริมาณนาริงจีน $416.70 \pm 21.82 \mu\text{g/g}$

การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวพันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ เพศผู้ น้ำหนัก 150-180 กรัม จาก บริษัท โนมูระสยามอินเตอร์เนชั่นแนล (ประเทศไทย) จำกัด โดยนำมาเลี้ยงรวมกัน 3 ตัวต่อกรง ในอุณหภูมิห้อง 22 ± 2 องศาเซลเซียส และแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

ขั้นตอนการทำวิจัยโดยใช้สัตว์ทดลองได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมในสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (SWU-A-008-2562) แบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว

A) กลุ่มควบคุมปกติ (Control) ให้กินอาหารปกติมีส่วนประกอบ 4.5% fat, 50.70% carbohydrate และ 24% protein, แคลอรีรวม 3,040 kcal/kg diet ตลอดการทดลอง

B) กลุ่มเบาหวานชนิด 2 (DM2) กลุ่มนี้ให้กินอาหารไขมันสูงต่อเนื่องจนถึง 12 สัปดาห์หลังฉีดสาร streptozotocin (STZ)

C) กลุ่มเบาหวานชนิด 2 และได้รับการป้องกันด้วยสารสกัดหยาบจากส้มโอ (DM2-PM) หนูกลุ่มนี้หลังจากฉีดสาร STZ ไปแล้ว 48 ชั่วโมงให้เริ่มป้อนสารสกัดหยาบจากส้มโอ (PM) ขนาด 200 mg/kg BW ผสมน้ำป้อนให้หนูกินทุกวันเป็นเวลา 12 สัปดาห์ตลอดระยะเวลาป้อน PM หนูจะได้รับอาหารไขมันสูงเช่นเดียวกับกลุ่ม DM2

การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวานชนิด 2

ให้หนูกินอาหารไขมันสูง ที่มีส่วนประกอบ 40.0% fat, 35.0% carbohydrate, และ 25.0% protein, แคลอรีรวม 5,085 kcal/kg diet เป็นเวลา 3 สัปดาห์ จากนั้นฉีดสาร STZ (สารนี้จะไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน) ขนาด 30 mg/kg BW ละลายใน 0.9% normal saline solution (0.9% NSS) ฉีดเข้าทางหลอดเลือดดำ (intravenous; i.v.) หลังจากฉีด STZ แล้ว 48 ชั่วโมง ทำการตรวจระดับน้ำตาลในกระแสเลือดโดยใช้เครื่อง Glucometer (Advantage, Bohringer Mannheim, Germany) สัตว์ทดลองที่มีระดับน้ำตาลในกระแสเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 250 mg/dL จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวาน ในกลุ่มควบคุมปกติจะได้รับการฉีด 0.9% NSS เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง

การศึกษาในสัตว์ทดลอง

พารามิเตอร์ที่ศึกษา

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิก

- ระดับ glucose, HbA1C, cholesterol, triglyceride ในเลือด และเซรัมอินซูลิน

ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดจะทำการวัดด้วยเครื่อง Glucometer (Advantage, Bohringer Mannheim, Germany) ระดับ cholesterol, triglyceride ในเลือดวัดโดยใช้เครื่อง (Advantage, Bohringer Mannheim, Germany)

- ทดสอบภาวะทนทานต่อ glucose (Oral glucose tolerance test: OGTT) การทดสอบ OGTT เป็นตัวบ่งชี้หนึ่งที่ยืนยันการเกิดภาวะเบาหวาน โดยเจาะเลือดหนูก่อนอาหารและน้ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ณ เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาทีหลังป้อน glucose ที่มีความเข้มข้น 3 g/kg BW นำค่า blood glucose ณ เวลาต่างๆ มา plot กราฟ เพื่อหาพื้นที่ใต้กราฟ มีหน่วยเป็น arbitrary unit (AU)

- วิเคราะห์หาปริมาณ insulin ใน serum ในสัปดาห์ที่ 12 หลังฉีด STZ

- การประเมินภาวะดื้อต่ออินซูลิน โดยการหาค่าดัชนี homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) โดยใช้ค่า fasting blood glucose (FBG) และค่าอินซูลินในเซรัมมาคำนวณหาดัชนี HOMA-IR ตามสูตรดังนี้ $HOMA-IR = (Glucose \times Insulin) / 22.5^{15}$ จากสูตรค่าอินซูลินมีหน่วยเป็น international dosage units per liter (U/L) ขณะที่ค่า FBG มีหน่วยเป็น mmol/L

การทดสอบการเรียนรู้และความจำโดยวิธี

Morris water maze

การศึกษาพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำที่เกี่ยวข้องกับทิศทาง (spatial memory) โดยใช้วิธี Morris water maze test ตามวิธีที่พัฒนาโดย Morris (1984) ¹⁶

การทดสอบความสามารถในการเรียนรู้ด้วยวิธี Morris water maze (MWM) โดยเตรียมอ่างน้ำทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ฟุต และลึก 3 ฟุต แบ่งออกเป็น 4 quadrants ควบคุมให้น้ำมีอุณหภูมิอยู่ที่ 23-26 องศาเซลเซียส ติดตั้งแท่นพลาสติก (platform) สำหรับให้หนูยืนลงไปใต้น้ำที่ตำแหน่ง quadrant ไດ quadrant หนึ่ง ของอ่างน้ำ โดยหนูจะมองไม่เห็น platform เพื่อทำการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้ของหนู ในวันทำการทดสอบ MWM จะเติม non-fat milk ลงไปให้น้ำในอ่างขุ่นเพื่อไม่ให้หนูมองเห็นว่า platform วางอยู่ที่ quadrant ไດ จากนั้นปล่อยหนูลงน้ำใน quadrant ตรงข้ามกับ quadrant ที่วาง platform ให้หนูว่ายน้ำจนเจอ platform และให้หนูพักบน platform หากหนูไม่สามารถหา platform ได้ภายในเวลา 120 วินาที หนูจะได้รับการช่วยเหลือให้ว่ายน้ำยัง platform โดยทดสอบวันละ 4 ครั้ง (interval) เป็นเวลา 5 วัน โดยแต่ละครั้งจะปล่อยหนูไว้ที่ quadrant ต่างๆ จับเวลาที่หนูใช้ในการตามหา platform บันทึกภาพด้วยกล้องวิดีโอ บันทึกระยะเวลาที่เริ่มปล่อยหนูให้ว่ายน้ำจนค้นพบ platform เรียกระยะเวลาที่หนูเริ่มว่ายน้ำจนค้นพบ platform จนเจอว่า escape latency; EL (second) นำข้อมูลทั้ง 5 วันมาวิเคราะห์หาค่า EL หลังจากนั้นในวันที่ 6 นำหนูมาทดสอบอีกครั้ง โดยครั้งนี้จะนำเอา platform ที่เคยวางอยู่ได้น้ำออก ปล่อยหนูลงน้ำโดยการสุม quadrant และให้หนูว่ายน้ำเป็นเวลา 1 นาที บันทึกภาพและเวลาที่หนูใช้ใน quadrant ที่เคยมี platform อยู่ ซึ่งค่าที่ได้นำมาวิเคราะห์ความสามารถในการจดจำของหนู หนูที่จำได้ว่า platform เคยวางอยู่ที่ตำแหน่งใดหนูจะว่ายวนอยู่ใน quadrant ที่เคยวาง platform ไว้เป็นเวลาที่ยาวกว่าหนูที่จำไม่ค่อยได้ เวลาที่หนูว่ายวนใน quadrant ที่เคยวาง platform ไว้ได้น้ำนี้เรียกว่า total time spent in platform area (TTSP; second) ดังนั้น หนูที่มีความจำดีกว่าจะมี EL สั้นและมี TTSP ยาวกว่า

การบันทึกอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง

ในวันทำการทดลอง ทำให้หนูสลบด้วยการฉีดโซเดียม เพนโทบาร์บิทัล (sodium pentobarbital) ขนาด 50 mg/kg BW เข้าทางช่องท้อง อาจเสริมขนาดของยาสลบในขณะทำการทดลองเพื่อคงไว้ในภาวะสลบ ทำการเจาะคอและสอดท่อเข้าทางหลอดลม ต่อเข้ากับเครื่องช่วยหายใจชนิด small animal respirator (Harvard apparatus rodent respirator 681) สอดท่อ polyethylene (PE10) เข้าหลอดเลือดแดง femoral ข้างขวาและต่อท่อเข้ากับ pressure transducer (Nihon TP 300-T) สำหรับบันทึกความดันเลือดแดง (arterial pressure) และเก็บตัวอย่างเลือดไปวิเคราะห์หาค่า arterial blood gas เพื่อปรับและควบคุมความดัน O_2 ในเลือดแดง (PaO_2) ให้มีระดับอยู่ระหว่าง 95-100 mmHg และค่าความดัน CO_2 ในเลือดแดง ($PaCO_2$) ที่ 35-45 mmHg ตลอดการทดลอง (โดยการปรับอัตราการหายใจ, tidal volume และปริมาณ O_2 จากเครื่องช่วยหายใจ) จากนั้นทำการผ่าและเลาะกระดูกศีรษะ (craniotomy) บริเวณ anterior surface ของกระดูกศีรษะ เมื่อกระดูกศีรษะส่วน anterior surface ถูกเลื่อยและดึงออก หล่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดสมองส่วนผิว (pial cerebral vessels) ด้วยน้ำสมองเทียม (artificial cerebro spinal fluid; artificial CSF) จากนั้นทิ้งระยะเวลาให้สัตว์ทดลองปรับสภาวะร่างกายให้อยู่ในภาวะสมดุลประมาณ 20 นาที ทำการครอบ cranial window ซึ่งทำด้วยวงแหวน stainless มีรูตรงกลาง ทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura และ infuse artificial CSF เข้าไปภายในบริเวณที่ครอบด้วย cranial window หลังจากนั้น ทำการวัดอัตราการไหลเวียนเลือดของสมอง (cerebral blood perfusion; CBP) ด้วยเครื่อง Laser Doppler Flow Metry (Moore Lab, UK) บริเวณที่ครอบ cranial window จำนวน 4 ตำแหน่งเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้นำเสนอเป็นค่า mean $\pm$ standard error of mean (SEM)

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบ โดยใช้ One-way ANOVA และ Post Hoc multiple comparisons ด้วย Tukey's test โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็น (P value) ที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

การเปลี่ยนแปลงทาง Metabolic

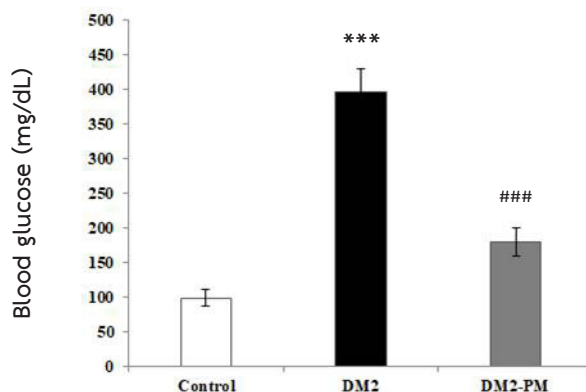
ผลของสารสกัดหยาดจากส้มโอ (PM) ขนาด 200 mg/kg BW ต่อการเปลี่ยนแปลง blood glucose, hemoglobin (HbA1C), serum insulin, plasma cholesterol และ triglyceride

หลังจากให้หนูกินอาหารไขมันสูงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และฉีดสาร STZ ขนาดต่ำ พบว่าหนูมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงมากกว่า 250 mg/dL หลังจากที่ได้รับ PM ไปแล้ว 12 สัปดาห์ หนูกลุ่ม DM2-PM มีระดับ blood glucose, cholesterol และ triglyceride ในเลือดที่ต่ำกว่าหนูกลุ่ม DM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับค่า HbA1C ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง

เป็นระยะเวลานาน มีค่าที่สูงในหนูกลุ่ม DM2 และลดต่ำลงในกลุ่ม DM2-PM ซึ่งยืนยันความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของสารสกัดหยาดจากส้มโอ ดังแสดงในรูปที่ 1 และตารางที่ 1

ผลการทดสอบภาวะทนทานต่อ glucose (Oral glucose tolerance test: OGTT) การทดสอบ OGTT เป็น indicator หนึ่งที่ช่วยยืนยันการเกิดภาวะเบาหวาน เมื่อนำค่าน้ำตาลในเลือด ณ เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาทีหลังป้อน glucose มา plot graph (รูปที่ 2) เพื่อหาค่าพื้นที่ใต้กราฟ พบว่าค่าพื้นที่ใต้กราฟในหนูกลุ่ม DM2 มีค่าที่สูงกว่า กลุ่ม Control และ DM2-PM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ค่าพื้นที่ใต้กราฟกลุ่ม DM2 = 4,743.34 AU, Control = 1,538.14 AU และ DM2-PM = 2,910.54 AU) พื้นที่ใต้กราฟที่มีค่าสูงสุดในกลุ่ม DM2 ยืนยันการเกิดภาวะเบาหวาน

การศึกษาภาวะดื้อต่ออินซูลินพบว่าระดับ serum insulin และค่าดัชนี HOMA-IR ซึ่งเป็นดัชนีหนึ่งที่ชี้ภาวะดื้อต่ออินซูลิน มีค่าที่สูงมากในกลุ่ม DM2 และลดลงในกลุ่ม DM2-PM ดังแสดงในตารางที่ 1

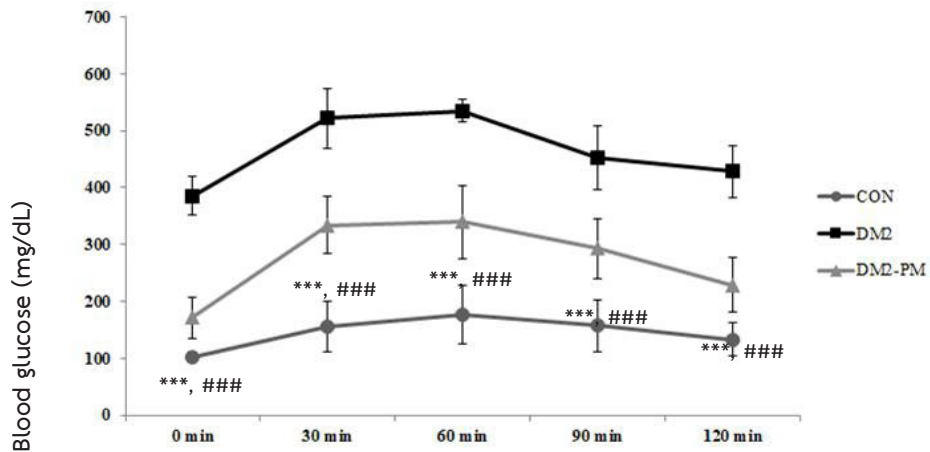


ค่าในรูปที่แสดงเป็น mean $\pm$ SEM

รูปที่ 1 การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 12 สัปดาห์ที่ทำการศึกษาในหนูปกติ (Control; n=7) หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดหยาดจากส้มโอ (DM2-PM; n=7) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

*** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM2



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean±SEM

รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดหลังได้รับการป้อนกลูโคส (oral glucose tolerance test) ในหนูปกติ (Control; n=7), หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และหนูเบาหวานชนิด 2 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากเนื้อส้มโอ (DM2-PM; n=7) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

*** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM2

ตารางที่ 1 ระดับโคโคไลเรเตดฮีโมโกลบิน อินซูลิน คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ในเลือด และค่าคำนวณ HOMA-IR ในหนูปกติ (Control; n=7), หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และหนูเบาหวานชนิด 2 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากส้มโอ (DM2-PM; n=7) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 12 สัปดาห์

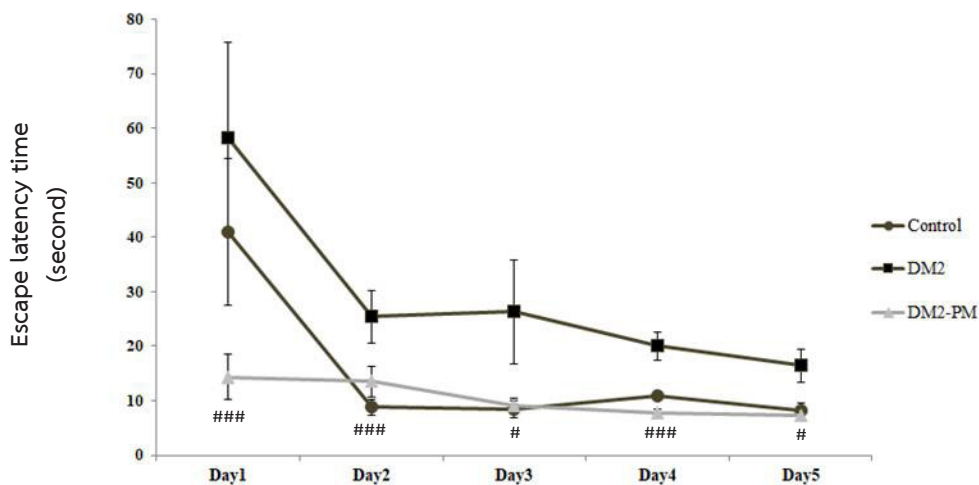
	Control	DM2	DM2-PM
Glycosylated Hemoglobin (HbA1C)	3.84 ± 0.42	6.90 ± 1.02***	4.54 ± 0.98##
Serum Insulin (U/L)	7.0 ± 0.40	81.49 ± 0.60***	50.29 ± 3.8***,###
HOMA-IR	1.68 ± 0.25	80.31 ± 7.56***	31.08 ± 10.19***,###
Cholesterol (mg/dL)	120.09 ± 5.59	180.75 ± 40.32***	148.00 ± 20.39#
Triglyceride (mg/dL)	97.36 ± 3.54	176.75 ± 9.43***	98.62 ± 12.5###

*** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control

$p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM2

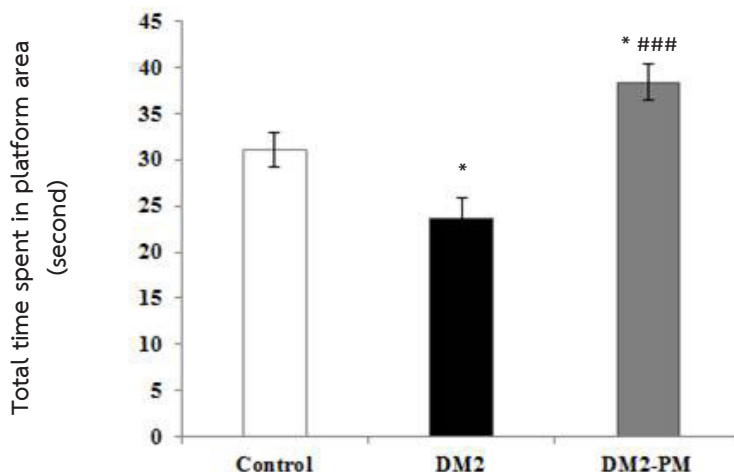
ฤทธิ์ของสารสกัดหยาดจากเนื้อสมองต่อการเปลี่ยนแปลงด้านการเรียนรู้และความจำ

ค่า Escape latency (EL) เป็นดัชนีที่ใช้ประเมินการเรียนรู้ของหนู และค่า Total time spent in platform area (TTSP) เป็นดัชนีที่ใช้ประเมินความสามารถทางด้านความจำ โดยจับเวลาที่หนูว่ายไปที่ quadrant ที่เคยวาง platform จากผลการศึกษาพบว่าหนู DM2 จะใช้เวลาในการหา platform นานกว่า ทำให้ค่า EL ยาวกว่า และใช้เวลาใน quadrant ที่เคยวาง platform น้อย ทำให้ค่า TTSP สั้นกว่าเมื่อเทียบกับค่าในหนู Control และ หนู DM2-PM (รูปที่ 3 และ รูปที่ 4)



รูปที่ 3 ผลการทดสอบด้านการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี Morris Water Maze Test เพื่อหาค่า Escape latency time (second) ของหนูปกติ (Control; n=7), หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และหนูเบาหวานชนิด 2 ที่ได้รับสารสกัดหยาดจากสมอง (DM2-PM; n=7) เป็นเวลา 12 สัปดาห์

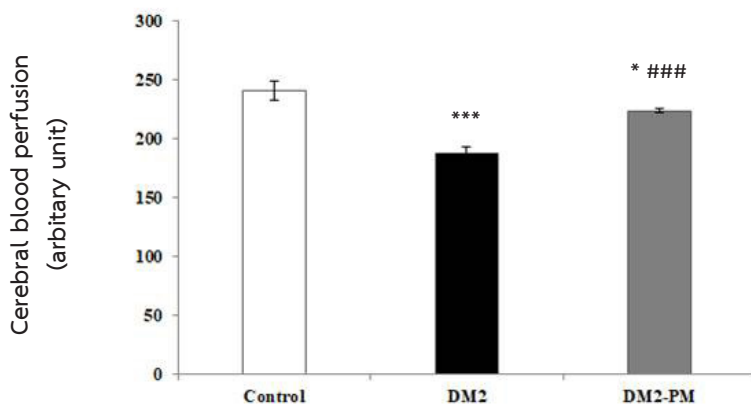
$p < 0.05$, ### $p < 0.001$ กลุ่ม DM2-PM เทียบกับกลุ่ม DM2



รูปที่ 4 ผลการทดสอบด้านการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี Morris Water Maze Test เพื่อหาค่า Total time spent in platform area (second) ของหนูปกติ (Control; n=7), หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และ หนูเบาหวานชนิด 2 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากส้มโอ (DM2-PM; n=7) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 12 สัปดาห์
* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, ### $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM2

การเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง

อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง (Cerebral blood perfusion) มีค่าต่ำในหนู DM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนู Control และการให้สารสกัดหยาบจากส้มโอในหนูเบาหวานชนิด 2 (DM2-PM) ทำให้อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองสูงกว่ากลุ่ม DM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 5 แสดงอัตราเฉลี่ยการไหลเวียนเลือดที่สมองของหนูปกติ (Control; n=7), หนูเบาหวานชนิด 2 (DM2; n=7) และ หนูเบาหวานชนิด 2 ที่ได้รับสารสกัดหยาบจากส้มโอ (DM2-PM; n=7) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 12 สัปดาห์
* $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, *** $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม Control, ### $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม DM2

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้ได้ผลการศึกษาที่สำคัญ ได้แก่ การให้สารสกัดหยาบจากส้มโอป้องกันทางปากต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน 12 สัปดาห์ในหนูที่เป็นเบาหวานชนิด 2 สามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่บกพร่องไป โดยสัมพันธ์กับการลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน และเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง

จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบความสัมพันธ์ระหว่างโรคเบาหวานชนิด 2 กับการเกิดความบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ (cognitive impairment)¹⁷ ไปจนถึงการเกิดภาวะสมองเสื่อมและการเกิด Alzheimer disease^{18,19} สาเหตุของภาวะ cognitive impairment ในโรคเบาหวานชนิด 2 นั้นเกิดจากสาเหตุหลายประการร่วมกัน ได้แก่ ภาวะ hyperglycemia, insulin resistance, inflammation รวมทั้ง oxidative stress ซึ่งปัจจัยดังกล่าวมีผลกระทบต่อระบบประสาท และระบบหลอดเลือดสมอง และนำไปสู่ภาวะ cognitive impairment ในที่สุด การศึกษาในครั้งนี้ใช้โมเดลหนูเบาหวานชนิด 2 ที่เกิดจากการให้อาหารไขมันสูงเป็นเวลา 3 สัปดาห์ เพื่อให้หนูเกิดภาวะ insulin resistance จากนั้นฉีดสาร streptozotocin ขนาดต่ำเพื่อให้สารไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน และเกิดภาวะ hyperglycemia ตามมา จากผลการศึกษาพบว่าหนูกลุ่มเบาหวานชนิด 2 (DM2) มีระดับน้ำตาลและระดับอินซูลินในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้นี้เป็นไปในทิศทางเดียวกับงานวิจัยอื่น^{20,21,22} นอกจากนั้นยังพบความผิดปกติของระดับไขมันในเลือดทั้งคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ที่สูงกว่ากลุ่มปกติ ซึ่งยืนยันได้ว่าโมเดลที่ให้หนูกินอาหารไขมันสูงและฉีดสาร STZ ขนาดต่ำจะมีความผิดปกติทาง metabolic ที่เข้าได้กับโรคเบาหวานชนิด 2 ในคน²³ เมื่อทำการทดสอบการเรียนรู้และความจำโดยวิธี Morris Water Maze พบว่าหนูกลุ่ม DM2 ใช้เวลาในการว่ายน้ำหา platform (escape latency)

นานกว่าหนูปกติ ในทางตรงข้ามผลการทดสอบ total time spent in platform area พบว่าหนูกลุ่ม DM2 ใช้เวลาอยู่ใน quadrant ที่เคยมี platform วางอยู่สั้นกว่าหนูกลุ่ม Control จากผลการศึกษาดังกล่าวบ่งชี้ว่าหนู DM2 มีภาวะบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ ที่น่าสนใจหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับการป้องกันด้วยสารสกัดหยาบจากส้มโอ (DM2-PM) พบว่าหนูกลุ่มนี้ ใช้เวลาในการทดสอบ escape latency สั้นกว่าและเวลาใน total time spent in platform area ยาวกว่าในหนูกลุ่ม DM2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลการทดลองบ่งชี้ว่า หนูเบาหวานที่ได้รับการป้องกันสารสกัดหยาบจากส้มโอ เป็นเวลานานอย่างต่อเนื่องมีผลให้การเรียนรู้และความจำที่บกพร่องไปเกิดการฟื้นฟูที่ดีขึ้น

ส้มโอเป็นไม้ผลตระกูลส้ม ที่ทั้งเปลือกและเนื้อกลีบมีสารที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ flavonoids, carotenoids และ vitamin C เป็นที่ทราบกันดีว่า สารในกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านจุลชีพ ชนิดของ flavonoid ที่พบในส้มโอเป็นชนิด flavanone, flavone และ flavonol โดยในกลุ่ม flavanone เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดและชนิดของ flavanone ที่มีปริมาณมากที่สุดในส้มโอไทย ได้แก่ naringin นอกจากนั้นยังพบ flavanone ตัวอื่นๆ บ้าง เช่น narirutin, eriocitrin และ neoeriocitrin²⁴ จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารออกฤทธิ์ในส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีสาร naringin ในปริมาณ 416.70 ± 21.82 $\mu\text{g/g}$ ของสารสกัดหยาบจากส้มโอ Naringin (4', 5, 7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) เป็นสารในกลุ่ม flavanone ที่มีรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นว่า naringin มีฤทธิ์ด้านการอักเสบต้านเซลล์มะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ มีรายงานการศึกษาโดย Anand และคณะ (2014) พบว่าการป้องกัน naringin ขนาด 50 mg/kg BW ให้หนูที่ถูกทำให้เป็นอัลไซเมอร์กิน เป็น

ระยะเวลา 21 วัน สามารถฟื้นฟูภาวะ cognitive impairment ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยผ่านทางการลดอนุมูลอิสระ และลดปริมาณสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory cytokine) ในเนื้อเยื่อสมอง²⁵ และผลการศึกษาที่ผ่านมาของอัมพรและคณะที่บ่อนสารสกัดหยาบจากส้มโอให้หนูที่เป็นเบาหวานชนิด 1 กินเป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่าสามารถลดความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองได้²⁶ ผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าหนู DM2 มีอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง (CBP) ต่ำกว่าหนู Control ซึ่งการมีค่า CBP ที่ต่ำลงเป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เนื้อเยื่อสมองมีเลือดไปเลี้ยงลดลงกว่าภาวะปกติรวมทั้งเนื้อเยื่อสมองบริเวณ hippocampus ที่ทำหน้าที่ควบคุมด้านการเรียนรู้และความจำ และ CBP มีค่าสูงขึ้นในกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับสารสกัดหยาบจากส้มโอ ส่วนนี้อาจเกิดจากสาร flavonoid หลายชนิดรวมทั้ง naringin ที่อยู่ในส้มโอมีฤทธิ์ปกป้องและฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดของสมอง ลดการเกิดอนุมูลอิสระ ทำให้หลอดเลือดมีการทำงานที่ดีขึ้น ลดความบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะดื้อต่ออินซูลิน กับการเกิด cognitive impairment พบว่าระดับของอินซูลินในเลือดที่สูงมากเกินไปเกินไปในภาวะดื้อต่ออินซูลินจะมีผลทำให้เซลล์สมองเกิดภาวะดื้อต่ออินซูลินด้วย และ insulin receptor ในเนื้อเยื่อสมองจะทำงานได้ลดลง²⁷ กลไกที่น่าสนใจกลไกหนึ่งของการเกิดภาวะสมองเสื่อม และเกิดโรคอัลไซเมอร์ในผู้ป่วยเบาหวานชนิด 2 ได้แก่ การที่ insulin receptor มีการทำงานลดลง จะมีผลทำให้การสังเคราะห์โปรตีนหลายๆ ชนิดลดลงตามไปด้วย ซึ่งรวมถึงโปรตีนที่ทำหน้าที่เอนไซม์ที่เรียกว่า insulin degradation enzyme (IDE) จะมีปริมาณลดลงในภาวะดื้อต่ออินซูลิน IDE มีหน้าที่ในการสลาย $A\beta$ ในเนื้อเยื่อ เมื่อ IDE มีปริมาณลดลง ผลที่เกิดขึ้นได้แก่ มีการสะสมของ $A\beta$ ในเนื้อเยื่อสมองเพิ่มขึ้น²⁸

ในที่สุดจะเกิด cognitive impairment นอกจากนั้นยังมี impaired insulin signaling ภายในเซลล์ทำให้เกิดความผิดปกติของการสื่อสารสัญญาณภายในเซลล์ในเส้นทาง insulin/PI3K/GSK3 ภายในเนื้อเยื่อสมอง ทำให้เกิดความผิดปกติในการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท และทำให้เซลล์ตายในเวลาต่อมา²⁹ ส่งผลให้การนำกลูโคสมาใช้ในสมองลดลงรวมทั้งบริเวณ hippocampus ด้วย นำไปสู่การเกิด oxidative stress ในสมองมากขึ้น ผลการศึกษาในครั้งนี้แม้ว่ามิได้ศึกษาถึงกลไกที่ผ่านทาง insulin signaling pathway ในสมอง แต่จากการที่หนูเบาหวานได้รับสารสกัดหยาบจากส้มโออย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานถึง 12 สัปดาห์มีผลให้การเรียนรู้และความจำดีขึ้น มีอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองสูงขึ้น กลไกหลักมาจากการลดระดับน้ำตาลในเลือด การลดภาวะดื้อต่ออินซูลินทั้งในเนื้อเยื่อส่วนปลายและเนื้อเยื่อสมอง ทำให้การสร้างสารอนุมูลอิสระลดลงทั้งในหลอดเลือดและในเนื้อเยื่อสมอง ส่งผลให้มีการฟื้นฟูการทำงานของสมองส่วน hippocampus จนทำให้มีการฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำตามมา

สรุปผล

จากข้อมูลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการให้สารสกัดหยาบจากเนื้อส้มโออย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานสามารถฟื้นฟูภาวะบกพร่องด้านการเรียนรู้และความจำ โดยผ่านทางการลดภาวะดื้อต่ออินซูลิน ลดภาวะน้ำตาลและไขมันในเลือดที่สูงผิดปกติและเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองในหนูเบาหวานชนิด 2 ผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปพัฒนาศึกษาต่อยอดเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ทั้งกลไกทาง insulin signaling pathway และกลไกอื่นๆ ของส้มโอและสารออกฤทธิ์ที่สำคัญของส้มโอ เช่น naringin เพื่อใช้เป็นแนวทางหรือทางเลือกหนึ่งในการป้องกันและรักษาภาวะแทรกซ้อนต่อการเกิดโรคสมองเสื่อมในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานได้ในอนาคต ในอีกทางหนึ่ง

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ปลูกส้มโอทั้งเพื่อบริโภคในประเทศ และเพื่อการส่งออก จึงควรมีการพัฒนาองค์ความรู้ด้านประโยชน์ของส้มโอที่จะนำมาใช้เพื่อลดการใช้จ่ายสังเคราะห์ได้ในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก สำนักงานวิจัยแห่งชาติ (TRF: DBG5480008) และทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (Med-SWU-592-2562)

References

1. Kodl CT, Seaquist ER. Cognitive dysfunction and diabetes mellitus. *Endocrine Rev* 2008;29(4):494-511.
2. Bell RD, Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms and blood-brain barrier disorder in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2009;118(1):103-13.
3. Weller RO, Massey A, Newman TA, et al. Cerebral amyloid angiopathy: amyloid beta accumulates in putative interstitial fluid drainage pathways in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1998 Sep;153(3):725-33.
4. Barbagallo M, Dominguez LJ. Type 2 diabetes mellitus and Alzheimer's disease. *World J Diabetes* 2014 Dec 15;5(6):889-93.
5. Zhao L, Teter B, Morihara T, et al. Insulin-degrading enzyme as a downstream target of insulin receptor signaling cascade: implications for Alzheimer's disease intervention. *J Neurosci* 2004 Dec8;24(49):111-20.
6. Ho L, Qin W, Pompl PN, et al. Diet-induced insulin resistance promotes amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *FASEB J* 2004 May;18(7):902-4.
7. Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. *Mol Aspects Med* 1994;5:293-76.
8. Willett WC. Diet and health: what should we eat?. *Science* 1994 Apr 22;264(5158):532-37.
9. Tanizawa H, Ohkawa Y, Takino Y, et al. Studies on natural antioxidants in citrus species. I. Determination of antioxidative activities of citrus fruits. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1992;40:1940-2.
10. Kawaii S, Tomono Y, Katase E, et al. Quantitation of flavonoid constituents in citrus fruits. *J Agric Food Chem* 1999;47:3565-71.
11. Theppakorn T, Chaiwong S. The evaluating Bioactive compounds and antioxidant capacity Pomelo Thong Dee cultivar in Thailand for Export. In: Burapha University, Faculty of Science Proceeding, editor. The 35th Congress on Science and Technology of Thailand (STT 35); October 15-17 2009; Venue : The Tide Resort (Bangsaen Beach), Chonburi, Thailand / Organized by The Science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the King in Association with faculty of Science, Burapha University.
12. Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial

- dysfunction. *Pharmacol Biochem Behav* 2014 Nov 6;127C:101-10.
13. Singleton. V. L., Joseph A. Rossi. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am J Enol Vitic* 1965 January;16(1):144-58.
 14. Guimarães R, Barros L, Barreira JC, et al. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. *Food Chem Toxicol* 2010 Jan;48(1):99-106.
 15. Jariyapongskul A, Areebambud C, Suksamrarn S, et al. Alpha-Mangostin attenuation of Hyperglycemia-induced ocular hypoperfusion and blood retinal barrier leakage in the early stage of type 2 diabetes rats. *Biomed Res Int* 2015; 785826. Published online 2015 Apr 9. doi: 10.1155/2015/785826.
 16. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984 May;11(1):47-60.
 17. Luchsinger JA. Type 2 diabetes and cognitive impairment: linking mechanisms. *J Alzheimers Dis* 2012;30 Suppl 2:S185-98. doi: 10.3233/JAD-2012-111433.
 18. Janson J, Laedtke T, Parisi JE, et al. Increased risk of type 2 diabetes in Alzheimer disease. *Diabetes* 2004 Feb;V53:125-35.
 19. Akter K, Lanza EA, Martin SA, et al. Diabetes mellitus and Alzheimer's disease: shared pathology and treatment?. *Br J Clin Pharmacol* 2011;71:3:365-76.
 20. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, et al. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2000;49(11):1390-94.
 21. Wang HJ, Jin YX, Shen W, et al. Low dose streptozotocin (STZ) combined with high energy intake can effectively induce type 2 diabetes through altering the related gene expression. *Asia Pac J Clin Nutr* 2007;16(1):412-17.
 22. Ming Zhang, Xiao-Yan Lv, Jing Li, et al. The Characterization of High-Fat Diet and Multiple Low-Dose Streptozotocin Induced Type 2 Diabetes Rat Model. *Exp Diabetes Res* 2009 Jan 4. doi: 10.1155/2008/704045.
 23. Søs Skovsø. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig* 2014 Jul;5(4):349-58. doi: 10.1111/jdi.12235.
 24. Pichaiyongvongdee S, Haruenkit R. Investigation of Limonoids, Flavanones, Total Polyphenol Content and Antioxidant Activity in Seven Thai Pummelo Cultivars. *Kasetsart J (Nat. Sci.)* 2009;43:458-66.
 25. Sachdeva AK, Kuhad A, Chopra K. Naringin ameliorates memory deficits in experimental paradigm of Alzheimer's disease by attenuating mitochondrial dysfunction. *Pharmacol Biochem Behav* 2014 Dec 6;127:101-10.
 26. Jariyapongskul A. Complete research report. Research grant from, Thailand Science Research and Innovation (TSRI) Project code RDG5420040-2555. Effect of Pomelo juice extract on cerebral blood flow and cerebral endothelial function in streptozotocin-induced diabetic rats.

27. Mateusz Maciejczyk, Ewa Zebrowska, Adrian Chabowski. Insulin Resistance and Oxidative Stress in the Brain: What's New?. *Int J Mol Sci* 2019;20(4):874.doi; 10.3390/jims20040874.
28. Farris W, Mansourian S, Chang Y, et al. insulin, amyloid β -protein, and the β -amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *PNAS* 2003;100 (7): 4162-7.
29. Goedert M, Spillantini MG, Crowther RA. Tau proteins and neurofibrillary degeneration. *Brain Pathol* 1991;1:279-86.