

ผลต้านออกซิเดชันของเบอเบอรินในสมองของหนูไม่ช้เบาหวานชนิดที่ 2

Antioxidative Effect of Berberine on the Brain of Type 2 Diabetic Mice

ทินกร เหล่าออง (Thinnakorn Lao-ong)* ดร.วรัญญา จตุพรประเสริฐ (Dr.Waranya Chatuphonprasert)**

ดร.กนกวรรณ จารุกัจฉา (Dr.Kanokwan Jarukamjorn)***

บทคัดย่อ

เบอเบอรินเป็นสารธรรมชาติที่พบในสมุนไพรหลายชนิด ที่นิยมใช้ในผู้ป่วยเบาหวานเนื่องจากมีรายงานถึงฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือด แต่การศึกษาฤทธิ์ด้านภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองยังปรากฏรายงานน้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเบอเบอรินต่อระบบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูไม่ช้เบาหวานชนิดที่ 2 ผลการศึกษาพบว่า เบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์สามารถลดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูไม่ช้เบาหวานให้ใกล้เคียงระดับปกติได้ โดยไม่มีผลต่อระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูปกติ นอกจากนั้นแล้วเบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์ยังสามารถลดปริมาณกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ในสมองหนูไม่ช้เบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ การใช้เบอเบอรินมีข้อดีเหนือกว่าไกลเบนคลาไมด์หรือสารทั้งสองชนิดรวมกัน เนื่องจากเบอเบอรินไม่เปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอนไซม์ SOD และเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ในภาวะเบาหวานให้ใกล้เคียงกับภาวะปกติแล้ว ยังไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ด้านภาวะเครียดออกซิเดชันในภาวะปกติด้วย ดังนั้นการใช้เบอเบอรินในการแพทย์ทางเลือกเพื่อการรักษาโรคเบาหวานจึงมีข้อดีในแง่ที่มีศักยภาพเป็นสารต้านภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองโดยไม่ส่งผลกระทบต่อร่างกายในภาวะปกติ

ABSTRACT

Berberine is a natural compound found in many medicinal plants which is widely used for diabetic treatment. Many studies have reported potential of berberine on the hypoglycemic effect, but little is known about its effect on oxidative stress. The present study aimed to investigate the effects of berberine on antioxidation system in the brain of type 2 diabetic (DM2) mice. Berberine and/or glibenclamide significantly reduced level of lipid peroxidation in the DM2 mouse brains to nearly the same level as the normals while the level of lipid peroxidation in the normals were not changed. In addition, berberine and/or glibenclamide significantly decreased the content of oxidized glutathione in diabetic mice. Regarding the antioxidation enzymes, berberine is superior than glibenclamide or the combination of berberine and glibenclamide since berberine did not affect the SOD activity while the GPx activity was increased in the diabetes to nearly the same level as the normals. In addition, berberine did not altered activities of antioxidation enzymes in the normals. Thus, our findings suggested that using berberine as alternative treatment for diabetes could bring the extra-beneficent consequence according to its antioxidation potential in the brain and no interfering effects on the normal stage.

คำสำคัญ: เบอเบอริน โรคเบาหวานชนิดที่ 2 ภาวะเครียดออกซิเดชัน

Key Words: Berberine, Diabetes mellitus type 2, Oxidative stress

* นักศึกษา หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเภสัชเคมีและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** อาจารย์ สาขาวิชาปรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

*** รองศาสตราจารย์ กลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยเทก โน โลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ (PANPB) คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

ปัจจุบันจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในทุกประเทศทั่วโลก และมีแนวโน้มจะเพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มวัยกลางคนและผู้สูงอายุ ในปี ค.ศ. 2010 มีจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานประมาณ 285 ล้านคนทั่วโลกและร้อยละ 90 เป็นผู้ป่วยด้วยโรคเบาหวานชนิดที่ 2 จำนวนผู้ป่วยทั่วโลกอาจเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีการคาดการณ์ว่าในปี ค.ศ. 2030 จะมีจำนวนผู้ป่วยเบาหวานมากถึง 439 ล้านคน (Chen et al., 2011) แม้ว่าโรคเบาหวานจะไม่ทำให้สูญเสียชีวิตในทันที แต่เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยด้อยลง รวมทั้งก่อให้เกิดผลกระทบทางเศรษฐกิจและสังคมทั้งทางตรงและทางอ้อม เนื่องจากโรคเบาหวานเป็นโรคที่จำเป็นต้องได้รับการรักษาอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นผู้ป่วยเบาหวานส่วนใหญ่จึงมีพฤติกรรมแสวงหาการรักษาด้วยการแพทย์ทางเลือกอื่นๆ อาทิ การใช้สมุนไพรหรืออาหารเสริมต่างๆ ร่วมกับยาแผนปัจจุบัน หรือในบางรายอาจหยุดการใช้ยาแผนปัจจุบันและหันมาบริโภคสมุนไพรเพียงอย่างเดียว ด้วยความเชื่อที่ว่าการใช้สมุนไพรไม่มีอันตรายและปลอดภัยมากกว่าการใช้ยาแผนปัจจุบัน

สารสังเคราะห์ที่ใช้เป็นยาด้านเบาหวานในปัจจุบันมักก่อให้เกิดอาการข้างเคียงที่สำคัญ อาทิ การทำให้ระดับน้ำตาลในเลือดลดต่ำ (hypoglycemia) อย่างรุนแรง ความเป็นพิษต่อตับและไต และความไม่ปลอดภัยกับการใช้กับหญิงตั้งครรภ์ ดังนั้นองค์การอนามัยโลก (WHO) จึงสนับสนุนให้มีการค้นคว้าและวิจัยหาสารด้านเบาหวานจากพืชที่มีการใช้อยู่ในท้องถิ่นเพื่อก่อให้เกิดการค้นพบสารจากธรรมชาติที่สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาด้านเบาหวานที่ใช้ได้อย่างปลอดภัยไม่ก่อให้เกิดอาการข้างเคียงหรือเกิดอาการข้างเคียงน้อยที่สุด

เบอเบอริน (berberine) เป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีเป็นไอโซควิโนลิโนอัลคาลอยด์ (isoquinoline alkaloids) (Punitha et al., 2005) ออกฤทธิ์ในการลดระดับน้ำตาลในเลือด จากการทดลองทางคลินิกใน

ผู้ป่วยเบาหวานที่ได้รับเบอเบอรินขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยรับประทานติดต่อกันเป็นเวลา 3 เดือนพบว่าสามารถควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้เทียบเท่ากับผู้ป่วยที่ได้รับยาเมทฟอร์มิน (metformin) และยังมีผลดีกว่าเมทฟอร์มินในการลดไขมันด้วย (Yin et al., 2008) ถึงแม้ว่างานวิจัยในปัจจุบันจะก้าวไปถึงขั้นการใช้เบอเบอรินเพื่อรักษาโรคเบาหวานและอาการผิดปกติอื่นๆ แต่ข้อมูลขนาด วิธีการใช้ และข้อควรระวังและความเป็นพิษ ยังไม่มีการศึกษาด้วยกระบวนการทางวิทยาศาสตร์การแพทย์และเภสัชศาสตร์ที่ครบถ้วน เป็นระบบเชื่อถือได้ อีกทั้งการศึกษาทางพิษวิทยาของเบอเบอรินในสมุนไพรยังมีข้อมูลอยู่น้อยและขัดแย้งกัน โดยเฉพาะสมุนไพรแห้ว (*Coscinium fenestratum*) ซึ่งผู้ป่วยเบาหวานในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยนิยมใช้รักษาเบาหวาน กล่าวคือ มีรายงานว่าหนูไม่ซึ้งได้รับสารสกัดหยาบส่วนเมธานอลของแห้วขนาด 5 กรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการป้อนทางปากเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ ไม่แสดงอาการหรือความผิดปกติใดๆ (Chomnawang et al., 2009) ในขณะที่การศึกษาในหนูแรทซึ่งได้รับสารสกัดหยาบส่วนเมธานอลของแห้วขนาดเพียง 5-20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน โดยการป้อนทางปากเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ กลับพบความผิดปกติของจำนวนเซลล์ประสาทในสมอง (Wattanathorn et al., 2006) และการได้รับสารสกัดหยาบส่วนเมธานอลของแห้วในขนาดสูง 2.5-5.0 กรัม/กิโลกรัม/วัน ในหนูแรทโดยการป้อนทางปากเป็นเวลา 90 วัน พบความผิดปกติของดัชนีชี้วัดเคมีบางค่าในเลือด (Wongcome et al., 2007) ส่วนข้อมูลความปลอดภัยหรือความเป็นพิษด้านอื่นๆ รวมถึงข้อมูลอันตรกิริยาของยา (drug interaction) ยังไม่พบรายงานการศึกษาแต่อย่างใด

การสนับสนุนเบอเบอรินซึ่งเป็นสารสำคัญในแห้วซึ่งเป็นพืชของประเทศไทย ต่อ ยอดไปเป็นยารักษาเบาหวานได้ จะช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจจากการนำเข้าสารเคมีจากต่างประเทศเพื่อผลิตยาแผนปัจจุบัน อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมเกษตรกรผู้ปลูกสมุนไพรแห้วและเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของทรัพยากรในประเทศ

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

สารเคมี เบอเบอรินคลอไรด์ (berberine chloride) และ นิโคตินาไมด์ (nicotinamide) เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา สเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin, STZ) จาก Merck ประเทศเยอรมนี ไกลเบนคลาไมด์ (glibenclamide) จาก Wako Pure Chemical ประเทศญี่ปุ่น สารมาตรฐานมาลอนไดแอลดีไฮด์ (malondialdehyde) และ กรดไทโอบาร์บิตูริก (thiobarbituric acid) จาก Fluka ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ขั้นตอนและวิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูไม่ซ้สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 6 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา ประเทศไทย นำมาเลี้ยงที่ศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย พักสัตว์ทดลองไว้เป็นเวลา 7 วัน โดยให้อาหารและน้ำอย่างเพียงพอตลอดเวลา ในห้องเลี้ยงที่ควบคุมอุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 30-60 เปอร์เซ็นต์ การระบายอากาศ 10-15 รอบ/ชั่วโมง แสงสว่าง 12 ชั่วโมง/วัน ภายใต้การกำกับดูแลของสัตว์แพทย์ประจำศูนย์ และเป็นไปตามข้อเสนอนที่ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (AEKKU06/2553)

2. การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

โดยการให้นิโคตินาไมด์ขนาด 1000 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง ครั้งเดียว แก่หนูไม่ซ้ซึ่งถูกอดอาหารข้ามคืน หลังการให้นิโคตินาไมด์ 15 นาที จึงให้สเตรปโตโซโทซินขนาด 150 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าทางช่องท้อง ครั้งเดียว (Tahara et al., 2009; Novelli et al., 2010) 2 สัปดาห์หลังจากการเหนี่ยวนำภาวะเบาหวาน ให้หนูไม่ซ้ช้อดอาหารเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นป้อนสารละลายกลูโคสขนาด 2 กรัม/กิโลกรัม ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่หางของหนูไม่ซ้ การป้อนสารละลายกลูโคส เพื่อวิเคราะห์ระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0.5, 1 และ 2 ชั่วโมงด้วยเครื่อง Glucometer

(Accu-Check® Advantage II Performa kits, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) (Sakuma et al., 2001) เปรียบเทียบกับระดับน้ำตาลในเลือดที่เวลา 0.5 ชั่วโมง ก่อนการป้อนสารละลายกลูโคส หนูไม่ซ้ที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตรขึ้นไป จะถูกคัดเข้ากลุ่มการศึกษาหนูที่มีภาวะเบาหวานต่อไป

3. การแบ่งกลุ่มการศึกษา

หนูไม่ซ้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ หนูปกติและหนูที่มีภาวะเบาหวาน แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (กลุ่มละ 5 ตัว) ประกอบด้วย 1) กลุ่มควบคุมที่ได้รับสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer saline) ขนาด 0.1 มิลลิลิตร/วัน 2) กลุ่มที่ได้รับเบอเบอริน ขนาด 100 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (Chatuphonprasert et al., 2011) 3) กลุ่มที่ได้รับไกลเบนคลาไมด์ ขนาด 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม/วัน (Suba et al., 2004) และ 4) กลุ่มที่ได้รับทั้งเบอเบอรินและไกลเบนคลาไมด์ โดยการป้อนทางปาก (intragastric) วันละครั้ง ทุกวัน ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ (เบอเบอรินและไกลเบนคลาไมด์เตรียมในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต) 24 ชั่วโมงหลังการป้อนสารครั้งสุดท้ายจะทำการสลับสัตว์ทดลองโดยการฉีดสารละลาย pentobarbital ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร เข้าทางช่องท้อง และแยกสมองเพื่อการวิเคราะห์ต่อไป

4. การตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ในระบบต้านออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซ้

4.1 สมรรถนะของเอนไซม์ SOD

บดตัวอย่างสมองหนูไม่ซ้ในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟส ปิเปตสารละลายของตัวอย่างเดิมสารละลายคลอโรฟอร์ม (chloroform) และเอทานอล (ethanol) นำไปเขย่าเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $13,000 \times g$ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปิเปตส่วนใสด้านบนเพื่อตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ SOD โดยผสมกับสารละลายปฏิกิริยา (reaction mixture) ที่ประกอบด้วยแซนทีน (xanthine) ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์, กรดเ

ทีลินไดอะมินเททระอะซิดิก ความเข้มข้น 0.6 มิลลิโมลาร์, ไนโตรบลูเตตระโซเลียม (nitroblue tetrazolium, NBT) ความเข้มข้น 750 ไมโครโมลาร์, โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) ความเข้มข้น 400 มิลลิโมลาร์ และโบวินซีรีมอัลบูมิน ความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร จากนั้นเติมเอนไซม์แซนทีนออกซิเดส (xanthine oxidase enzyme) ปริมาณ 8 ยูนิต/มิลลิกรัม โปรตีน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยการเติมคอปเปอร์คลอไรด์ (copper chloride, CuCl_2) ความเข้มข้น 0.8 มิลลิโมลาร์ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร (Chatuphonprasert et al., 2012; Ozmen et al., 2002; Sun et al., 1988) เพื่อคำนวณหาสมรรถนะของเอนไซม์ SOD ของตัวอย่างเทียบกับสารละลายมาตรฐานของเอนไซม์ SOD จากร้อยละของการยับยั้ง (%inhibition) การเกิดซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide)

4.2 สมรรถนะของเอนไซม์ CAT

บดตัวอย่างสมองหนูไม่ชันในสารละลายเกลือบัพเฟอร์ฟอสเฟส ปิเปดสารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 130 ไมโครโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และโซเดียมโปแตสเซียมบัพเฟอร์ ทีเอช 7.4 ความเข้มข้น 60 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที เติมสารละลายแอมโมเนียมโมลิบเดต (ammonium molybdate) ความเข้มข้น 32.4 มิลลิโมลาร์ เพื่อหยุดปฏิกิริยา ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และคำนวณหาสมรรถนะของเอนไซม์ CAT (Chatuphonprasert et al., 2012; Góth, 1991)

4.3 สมรรถนะของเอนไซม์ GPx

บดตัวอย่างสมองหนูไม่ชันในสารละลายเกลือบัพเฟอร์ฟอสเฟส ปิเปดสารละลายตัวอย่างผสมกับสารละลายบัพเฟอร์ ซึ่งประกอบด้วยโซเดียมฟอสเฟต บัพเฟอร์ (sodium phosphate buffer) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ และกรดเอทีลินไดอะมินเททระอะซิดิก (ethylene diamine tetra acetic, EDTA) ความเข้มข้น 0.4

มิลลิโมลาร์ เติมสารละลายโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้น 0.1 มิลลิโมลาร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นนำออกมาเติมรีดิวซ์กลูตาไทโอน (reduced glutathione) ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเติมกรด 5-ซัลโฟซาลิซิลิก (5-sulfosalicylic acid, SSA) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ทันทีเพื่อหยุดปฏิกิริยา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1,900 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสด้านบนไปตรวจวัดสมรรถนะของเอนไซม์ GPx (Pinto and Bartley, 1969) โดยตรวจวัดจากระดับกลูตาไทโอนในรูปแบบออกซิไดซ์ที่เกิดขึ้น ซึ่งใช้วิธีการเช่นเดียวกับการตรวจวัดจากระดับกลูตาไทโอนในรูปแบบออกซิไดซ์ และคำนวณเป็นค่าสมรรถนะของเอนไซม์ GPx (Chatuphonprasert et al., 2012)

5. การตรวจวัดระดับกลูตาไทโอนในรูปแบบของปริมาณกลูตาไทโอนรวม (total GSH) กลูตาไทโอนในรูปแบบรีดิวซ์ (GSH) และออกซิไดซ์ (GSSG) ในสมองหนูไม่ชัน
บดตัวอย่างสมองหนูไม่ชันในสารละลายเกลือบัพเฟอร์ฟอสเฟส นำไปวัดระดับกลูตาไทโอนในรูปแบบของปริมาณกลูตาไทโอนรวม โดยตกตะกอนสารละลายแขวนลอยของตัวอย่างด้วยสารละลายกรด 5-ซัลโฟซาลิซิลิก ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 $\times g$ เป็นเวลา 10 นาที ปิเปดส่วนใสด้านบนผสมกับสารละลายปฏิกิริยาที่ประกอบด้วยสารละลายเกลือบัพเฟอร์ โพแตสเซียมฟอสเฟต ทีเอช 7.0 (potassium phosphate buffer saline, pH 7.0) ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์, กลูตาไทโอนรีดักเตส (glutathione reductase) ปริมาณ 6 ยูนิต/มิลลิลิตร และ 5,5-ไดไธโอบิส (2-ไนโตรเบนโซอิก แอซิด) (5,5-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), DTNB) ความเข้มข้น 1.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที เติมรีดิวซ์นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต (reduced nicotinamide

adenine dinucleotide phosphate, NADPH) ความเข้มข้น 0.16 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ในช่วงเวลา 0-5 นาที จำนวนระดับเอนไซม์ทั้งหมดโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูตาไทโอน (Kondo et al., 2011; Chatuphonprasert et al., 2012)

สำหรับการตรวจวัดระดับกลูตาไทโอนในรูปแบบออกซิไดซ์ มีขั้นตอนเช่นเดียวกันกับการตรวจวัดปริมาณกลูตาไทโอนรวมดังกล่าวข้างต้น แต่นำสารละลายตัวอย่าง มาเติมสารละลาย 4-ไวนิลไพรีดีน (4-vinylpyridine) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง ก่อนเติมสารละลายปฏิกิริยา และรีดิวซ์โคคินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ฟอสเฟต จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงเช่นเดียวกัน จำนวนปริมาณโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูตาไทโอนในรูปแบบออกซิไดซ์ (Kondo et al., 2011; Chatuphonprasert et al., 2012)

ปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์หาจากผลต่างระหว่างปริมาณกลูตาไทโอนรวมและกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์

6. การตรวจวัดระดับภาวะเครียดออกซิเดชันจากปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูไมซ์ด้วยเทคนิค TBARS (thiobarbituric acid reactive substances) (Kondo et al., 2011; Chatuphonprasert et al., 2012)

บดตัวอย่างสมองหนูไมซ์ในสารละลายเกลือบัฟเฟอร์ฟอสเฟต เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายปฏิกิริยา (ประกอบด้วยกรดไทโอบาร์บิทริก (thiobarbituric acid) ความเข้มข้น 0.2 เปอร์เซ็นต์ และกรดไตรคลอโรอะซิติก (trichloroacetic acid) ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์) ก่อนย้ายไปไว้ในอ่างน้ำเดือด อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองแช่ลงในอ่างน้ำแข็ง และหยุดปฏิกิริยาโดยเติมสารละลายกรดไตรคลอโรอะซิติก ความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ทันที นำไปวัดค่าการเรืองแสงด้วยเครื่อง

สเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer) ที่ความยาวคลื่นกระตุ้น (excitation wavelength) 528 นาโนเมตร และความยาวคลื่นคายพลังงาน (emission wavelength) 551 นาโนเมตร แล้วคำนวณความเข้มข้นของมาลอนไดอัลดีไฮด์ (malondialdehyde, MDA) ในตัวอย่างโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานมาลอนไดอัลดีไฮด์ (Chatuphonprasert et al., 2011; Udomsuk et al., 2012)

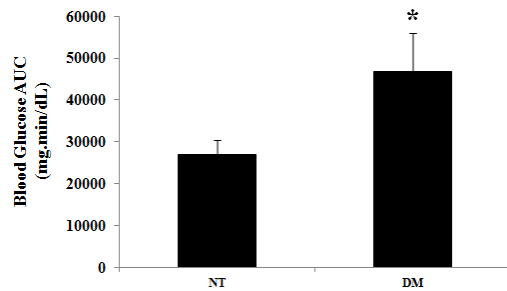
สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มโดย One-Way ANOVA ร่วมกับการทดสอบแบบ Tukey ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS 17.0

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. ผลของเบอเบอรินต่อระดับน้ำตาลในเลือดของหนูไมซ์

การเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 โดยการฉีดโคคินาไมด์และสเตปโตโซโทซิน พบว่าสามารถชักนำหนูไมซ์ให้มีระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มสูงขึ้นแตกต่างจากหนูปกติกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญภายใน 2 สัปดาห์ (รูปที่ 1) การได้รับเบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานให้ใกล้เคียงระดับปกติอย่างมีนัยสำคัญ

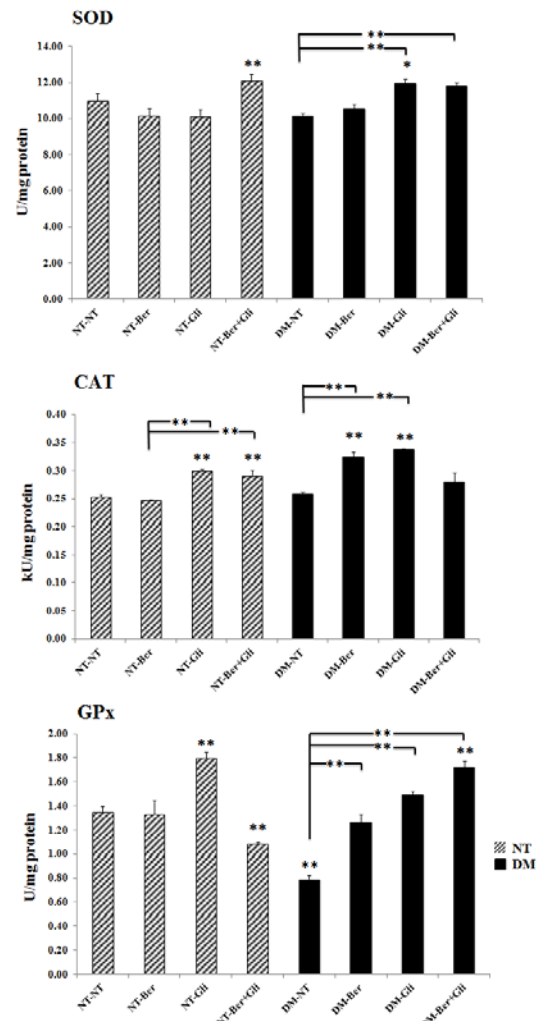


รูปที่ 1 พื้นที่ใต้เส้นกราฟ (area under the curve, AUC) ของระดับน้ำตาลในเลือดหนูไม่ซ้ ทดสอบโดยวิธี oral glucose tolerance test. NT, หนูปกติ; DM, หนูที่ได้รับนิโคตินาไมด์และสเตรปโตโซโทซิน, * $p < 0.05$, $n = 20$

2. ผลของเบอเบอรินต่อสมรรถนะของเอนไซม์ในระบบต้านออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซ้

เบอเบอรินไม่มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ SOD, CAT และ GPx ในหนูปกติ ในขณะที่ไกลเบนคลาไมด์สามารถเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ CAT และ GPx การได้รับเบอเบอรินร่วมกับไกลเบนคลาไมด์ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT เพิ่มขึ้น ในขณะที่ GPx กลับลดลง (รูปที่ 2)

หนูที่มีภาวะเบาหวานมีสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่สมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT ยังไม่เปลี่ยนแปลง การได้รับเบอเบอรินหรือไกลเบนคลาไมด์พบว่าสามารถเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ CAT และ GPx ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สามารถเพิ่มสมรรถนะของเอนไซม์ GPx ให้เท่ากับหนูปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการได้รับสารทั้งสองร่วมกัน ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้น ในขณะที่สมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ CAT ไม่เปลี่ยนแปลง



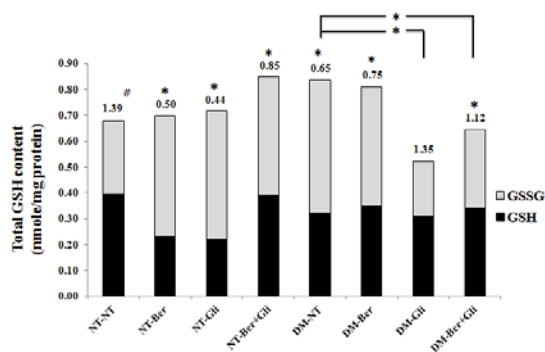
รูปที่ 2 สมรรถนะของเอนไซม์ด้านภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซ้. NT, หนูปกติ; DM, หนูที่ถูกชักนำภาวะเบาหวานชนิดที่ 2; Ber, เบอเบอริน; Gli, ไกลเบนคลาไมด์; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs NT, $n = 3-5$

3. ผลของเบอเบอรินต่อระดับกลูตาไทโอนในรูปของปริมาณกลูตาไทโอนรวม กลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์และออกซิไดซ์ในสมองหนูไม่ซ้

ในหนูปกติพบว่า เบอเบอรินหรือไกลเบนคลาไมด์ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูตาไทโอนรวม แต่มีผลในการลดปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์และเพิ่มปริมาณกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ ส่วนการได้รับร่วมกันพบว่า มีผลในการเพิ่มปริมาณ

กลูตาไทโอนรวมและกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ (รูปที่ 3)

หนูที่มีภาวะเบาหวานจะมีปริมาณกลูตาไทโอนรวมและกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์เพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ต่อออกซิไดซ์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์สามารถลดปริมาณกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ในหนูที่มีภาวะเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยไกลเบนคลาไมด์พบว่าสามารถลดปริมาณกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ จนทำให้อัตราส่วนระหว่างปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์และออกซิไดซ์เท่ากับหนูปกติได้

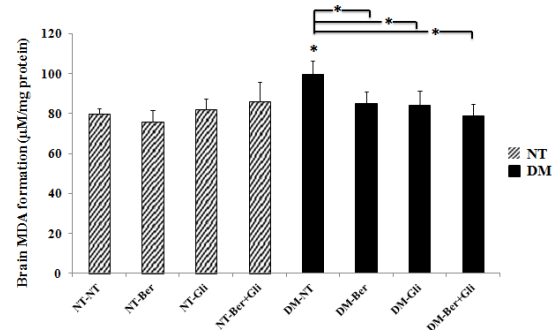


รูปที่ 3 ปริมาณกลูตาไทโอนรวม กลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ รูปออกซิไดซ์ และอัตราส่วนระหว่างปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) ต่อออกซิไดซ์ (GSSG) ในสมองหนูไม่ซ. NT, หนูปกติ; DM, หนูที่ถูกชักนำภาวะเบาหวานชนิดที่ 2; Ber, เบอเบอริน; Gli, ไกลเบนคลาไมด์; #, ตัวเลขเหนือแท่งกราฟหมายถึงอัตราส่วนระหว่างปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ต่อออกซิไดซ์; * $p < 0.01$ vs NT, $n = 3-5$

4. ผลของเบอเบอรินต่อระดับภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซ

เบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูปกติ แต่สามารถลดระดับภาวะเครียดออกซิเดชันที่

เพิ่มขึ้นในหนูที่มีภาวะเบาหวานให้ต่ำลงจนไม่แตกต่างจากหนูปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 ระดับการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซ. NT, หนูปกติ; DM, หนูที่ถูกชักนำภาวะเบาหวานชนิดที่ 2; Ber, เบอเบอริน; Gli, ไกลเบนคลาไมด์; * $p < 0.01$ vs NT, $n = 3-5$

สรุปผลการวิจัย

สเตรปโตโซโทซินและนิโคตินาไมด์สามารถชักนำภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 ได้ โดยสเตรปโตโซโทซินชักนำให้มีการตายของเบตาเซลล์ (Lenzen, 2007) ส่งผลให้อินซูลินหลั่งออกมาได้ลดลง ในขณะที่นิโคตินาไมด์มีส่วนช่วยป้องกันการอักเสบและการตายของเบตาเซลล์ รวมถึงช่วยในการเจริญและแบ่งเซลล์ของเบตาเซลล์ (Ibrahim et al., 2008) ดังนั้นการให้นิโคตินาไมด์แก่หนูไม่ซก่อนสเตรปโตโซโทซินจึงสามารถยับยั้งการอักเสบและการทำลายเบตาเซลล์อันเนื่องมาจากสเตรปโตโซโทซินได้บางส่วน ส่งผลให้เบตาเซลล์ยังสามารถหลั่งอินซูลินได้ แต่ปริมาณของอินซูลินที่หลั่งน้อยลงร่างกายจึงมีอินซูลินที่ทำงานในการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดภาวะเบาหวานชนิดที่ 2

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเบอเบอรินในสมองของหนูไม่ซที่ถูกชักนำภาวะเบาหวานชนิดที่ 2 โดยมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ต่อระบบการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันพบว่า เบอเบอรินสามารถลดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูไม่ซที่มีภาวะเบาหวานได้เทียบเท่ากับไกลเบนคลาไมด์ การที่สารทั้งสองชนิด

สามารถระดับลิปิดเปอร์ออกซิเดชันได้ เนื่องจากทั้ง เบอเบอรินและไกลเบนคลาไมด์มีฤทธิ์ในการลดระดับ น้ำตาลในเลือด (Yin et al., 2008; Gutniak et al., 1996) จึงส่งผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระในร่างกายจาก กระบวนการออกซิเดชันของกลูโคส (glucose oxidation) กระบวนการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน (non-enzymatic glycation of proteins) และการย่อยสลายผ่าน ปฏิกิริยาออกซิเดชันของโปรตีนที่เกาะกับน้ำตาล (oxidative degradation of glycated proteins) ที่เกิดขึ้น ในภาวะเบาหวาน (Maritim et al., 2003) และทำให้อ อนุมูลอิสระซึ่งเป็นสาเหตุของภาวะเครียดออกซิเดชัน ในสมองลดลง

ผลต่อปริมาณกลูตาไทโอนในสมองหนูไม่พบว่า ทั้งเบอเบอรินและไกลเบนคลาไมด์ให้ผลดีโดยการลด ปริมาณกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์ในภาวะเบาหวาน และไกลเบนคลาไมด์มีผลลดปริมาณ กลูตาไทโอนใน รูปออกซิไดซ์ดีกว่าเบอเบอริน แต่การใช้สารทั้งสอง ชนิดในภาวะปกติ อาจส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดลด ต่ำกว่าปกติ ทำให้ ATP ในเซลล์สมองลดลง และลดการ สร้าง NADPH ในวิถีเพนโตสฟอสเฟต (pentose phosphate pathway) (Hino et al., 2005) การขาด NADPH จะส่งผลลดสมรรถนะของเอนไซม์กลูตาไท โอนรีดักเตส (glutathione reductase) ที่ทำหน้าที่ เปลี่ยนกลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์เป็นกลูตาไทโอน รูปรีดิวซ์ ดังนั้นในสภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำจากการ ได้รับเบอเบอรินและ/หรือไกลเบนคลาไมด์ ร่างกายจึงมี ปริมาณกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ลดลง ในขณะที่ตัวกัน กลูตาไทโอนในรูปออกซิไดซ์จะเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ภาวะเบาหวานยังส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลง สมรรถนะของเอนไซม์ต้านภาวะเครียดออกซิเดชันใน สมอง เช่นเดียวกับการศึกษานี้ที่พบว่า ในภาวะ เบาหวานเอนไซม์ GPx มีสมรรถนะที่ลดลง ในขณะที่ เอนไซม์ SOD และ CAT ไม่เปลี่ยนแปลง โดยปกติแล้ว เอนไซม์ SOD จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนซูเปอร์ ออกไซด์แอนไอออน (O_2^-) ไปเป็นไฮโดรเจนเปอร์ ออกไซด์ (H_2O_2) และถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นน้ำ (H_2O)

และออกซิเจน (O_2) โดยเอนไซม์ GPx และ CAT ใน ภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไม่มาก เอนไซม์ GPx จะทำหน้าที่หลักในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ มากกว่าเอนไซม์ CAT (Nazaroglu et al., 2009) จาก การศึกษานี้การเพิ่มขึ้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ใน สมองอาจไม่สูงมาก เนื่องจากระยะเวลาที่ศึกษาเพียง 2 สัปดาห์ จึงพบเพียงการเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของ เอนไซม์ GPx เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตาม การได้รับเบอ เบอรินหรือไกลเบนคลาไมด์จะสามารถเพิ่มสมรรถนะ ของเอนไซม์นี้ในภาวะเบาหวานให้เท่ากับหรือใกล้เคียง กับระดับปกติได้ ผลจากการศึกษานี้เป็นข้อมูล สนับสนุนข้อดีเพิ่มเติมของเบอเบอริน เนื่องจากเบอเบอ รินไม่มีผลรบกวนสมรรถนะของเอนไซม์ในภาวะปกติ ในขณะที่ไกลเบนคลาไมด์มีผลเปลี่ยนแปลงสมรรถนะ ของเอนไซม์ CAT และ GPx ได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนอุดหนุนและส่งเสริมการทำ วิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ คลัสเตอร์สหสาขา บัณฑิตวิทยาลัย และกลุ่มวิจัยฤทธิ์ทางยาของผลิตภัณฑ์ ธรรมชาติโดยเทคโนโลยีชีวภาพทางเภสัชศาสตร์ (PANPB 2011-2014) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- Chatuphonprasert, W., Nemoto, N., Sakuma, T., and Jarukamjorn, K. 2011. Modulations of cytochrome P450 expression in diabetic mice by berberine. *Chem Biol Interact.* 196(1-2): 23-29.
- Chatuphonprasert, W., Sangkawat, T., Nemoto, N., and Jarukamjorn, K. 2011. Suppression of beta-naphthoflavone induced CYP1A expression and lipid-peroxidation by berberine. *Fitoterapia.* 82(6): 889-895.

- Chatuphonprasert, W., Udomsuk, L., Monthakantirat, O., Churikhit, Y., Putalun, W., and Jarukamjorn, K. 2012. Effects of *Pueraria mirifica* and miroestrol on the antioxidation-related enzymes in ovariectomized mice. *J Pharm Pharmacol*. DOI: 10.1111/jphp.12003.
- Chen, L., Magliano, DJ., and Zimmet, PZ. 2011. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus-present and future perspectives. *Nat Rev Endocrinol*. 8(4): 228-236.
- Chomnawang, MT., Trinapakul, C., and Gritsanapan, W. 2009. In vitro anticonococcal activity of *Coscinium fenestratum* stem extract. *J Ethnopharmacol*. 122(3): 445-449.
- Góth, L. 1991. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 196(2-3): 143-151.
- Gutniak, MK., Juntti-Berggren, L., Hellström, PM., Guenifi, A., Holst, JJ., and Efendic, S. 1996. Glucagon-like peptide I enhances the insulinotropic effect of glibenclamide in NIDDM patients and in the perfused rat pancreas. *Diabetes Care*. 19(8): 857-863.
- Hino, K., Nishikawa, M., Sato, E., and Inoue, M. 2005. L-carnitine inhibits hypoglycemia-induced brain damage in the rat. *Brain Res*. 1053(1-2): 77-87.
- Ibrahim, SS., and Rizk, SM. 2008. Nicotinamide: A cytoprotectant against streptozotocin-induced diabetic damage in wistar rat brains. *Afr J Biochem Res*. 2(8): 174-180.
- Kondo, S., Chatuphonprasert, W., Jaruchotikamol, A., Sakuma, T., and Nemoto, N. 2011. Cellular glutathione content modulates the effect of andrographolide on β -naphthoflavone-induced CYP1A1 mRNA expression in mouse hepatocytes. *Toxicology*. 280(1-2): 18-23.
- Lenzen, S. 2007. The mechanisms of alloxan and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia*. 51(2): 216-226.
- Maritim, AC., Sanders, RA., and Watkins, JB. 2003. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *J Biochem Mol Toxicol*. 17(1): 24-38.
- Nazaroglu, NK., Sepici-Dincel, A., and Altan, N. 2009. The effects of sulfonylurea glyburide on superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase activities in the brain tissue of streptozotocin-induced diabetic rat. *J Diabetes Complications*. 23(3): 209-213.
- Novelli, M., Bonamassa, B., Masini, M., Funel, N., Canistro, D., Tata, DV., Martano, M., Soleti, A., Campani, D., Paolini, M., and Masiello, P. 2010. Persistent correction of hyperglycemia in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic mice by a non-conventional radical scavenger. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*. 382(2): 127-137.
- Ozmen, B., Ozmen, D., Erkin, E., Guner, I., Habif, S., and Bayindir, O. 2002. Lens superoxide dismutase and catalase activities in diabetic cataract. *Clin Biochem*. 35(1): 69-72.
- Pinto, RE., and Bartley, W. 1969. The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J*. 112(1): 109-115.

- Punitha, ISR., Rajendran, K., Shirwaikar, A., and Shirwaikar, A. 2005. Alcoholic stem extract of *Coscinium fenestratum* regulates carbohydrate metabolism and improves antioxidant status in streptozotocin–nicotinamide induced diabetic rats. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2(3): 375-381.
- Sakuma, T., Honma, R., Maguchi, S., Tamaki, H., and Nemoto, N. 2001. Different expression of hepatic and renal cytochrome P450s between the streptozotocin-induced diabetic mouse and rat. *Xenobiotica.* 31(4): 223–237.
- Suba, V., Murugesan, T., Arunachalam, G., Mandal, SC., and Saha, BP. 2004. Anti-diabetic potential of *Barleria lupulina* extract in rats. *Phytomedicine.* 11(2-3): 202-205.
- Sun, Y., Oberley, LW., and Li, Y. 1988. A simple method for clinical assay of superoxide dismutase. *Clin Chem.* 34(3): 497-500.
- Tahara, A., Matsuyama-Yokono, A., Nakano, R., Someya, Y., Hayakawa, M., and Shibasaki, M. 2009. Effects of combination of dipeptidyl peptidase-IV inhibitor ASP8497 and antidiabetic drugs in streptozotocin-nicotinamide-induced mildly diabetic mice. *Eur J Pharmacol.* 605(1-3): 170-176.
- Udomsuk, L., Juengwatanatrakul, T., Putalun, W., and Jarukamjorn, K. 2012. Bimodal action of miroestrol and deoxymiroestrol, phytoestrogens from *Pueraria candollei* var. *mirifica*, on hepatic CYP2B9 and CYP1A2 expressions and antilipid peroxidation in mice. *Nutr Res.* 32(1): 45-51.
- Wattanathorn, J., Uabundit, N., Itarat, W., Mucimapura, S., Laopatarakasem, P., and Sripanidkulchai, B. 2006. Neurotoxicity of *Coscinium fenestratum* stem, a medicinal plant used in traditional medicine. *Food Chem Toxicol.* 44(8): 1327-1333.
- Wongcome, T., Panthong, A., Jesadanont, S., Kanjanapothi, D., Taesotikul, T., and Lertprasertsuke, N. 2007. Hypotensive effect and toxicology of the extract from *Coscinium fenestratum* (Gaertn.) Colebr. *J Ethnopharmacol.* 111(3): 468-475.
- Yin, J., Xing, H., and Ye, J. 2008. Efficacy of berberine in patients with type 2 diabetes mellitus. *Metabolism.* 57(5): 712-717.