



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่ออัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองและการทำงานของเซลล์
เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองของหนูขาวที่เป็นเบาหวาน

โดย ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

กรกฎาคม 2555

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่ออัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองและการทำงานของเซลล์
เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองของหนูขาวที่เป็นเบาหวาน

โดย ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ชุดโครงการ Thai Fruits-Functional Fruits

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความคิดเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบันนอกจากมุ่งเน้นการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดแล้วยังมุ่งเน้นไปที่การใช้สมุนไพร ผัก ผลไม้ เพื่อต้านฤทธิ์ และลดจำนวนสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากในร่างกายเมื่อมีระดับกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน มีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ของการบริโภคผลไม้ในการลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคเมเร็ง โรคทางระบบประสาท พบว่าผลไม้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดการทำลายเซลล์ในอวัยวะต่างๆ ส่วนประกอบสำคัญในผลไม้ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น ฤทธิ์จากวิตามิน และ ฟีนอลิกที่มีอยู่ในผลไม้ ผลไม้ในตระกูลส้ม เช่น ส้มโอ มีสารออกฤทธิ์ที่ให้ผลดีต่อการทำงานของเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เช่น วิตามินซี, และ flavonoid (ตัวอย่าง flavonoid ในส้ม ส้มโอ เช่น naringin, hesperidin, neohesperidin, rutin, naringenin) ประเทศไทยมีการปลูกส้มโอหลายจังหวัดและมีคุณภาพมีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ พบว่า ส้มโอที่ระยะความแก่เพื่อการส่งออกมีปริมาณวิตามินซี และ flavonoid ชนิดของ flavonoid ที่พบมากที่สุด ในส้มโอไทยได้แก่ naringin และพบความสามารถของส้มโอในการต้านอนุมูลอิสระที่ดีมาก แม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ของส้มโอดังกล่าวข้างต้นแต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของส้มโอในการปกป้องและฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดในโรคเบาหวานที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงอยู่เป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงเป็นจุดสนใจให้คณะผู้วิจัยทำการศึกษาศักยภาพของส้มโอโดยป้อนให้หนูที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงอย่างเรื้อรังกินเสริมเพื่อป้องกันและฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองและนำไปสู่การเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง

วัตถุประสงค์การวิจัย เพื่อศึกษาปริมาณฟีนอลิก ชนิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของน้ำคั้นส้มโอและศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่ออัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง และการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองในภาวะเบาหวานและเพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของส้มโอในเนื้อเยื่อสมอง **วิธีการวิจัย** ทำการสกัดน้ำคั้นส้มโอและวิเคราะห์หาสารฟีนอลิกและ ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในหนูขาวเพศผู้ แบ่งสัตว์ทดลองแบบสุ่มเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (CON), กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), กลุ่มเบาหวาน (STZ) และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) น้ำคั้นส้มโอที่ป้อนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มเบาหวานมีความเข้มข้น 10 มก/นน ตัว 1กค ป้อนให้กินวันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการศึกษาหลังจากสัตว์ทดลองได้รับการฉีดสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์หรือสเตรปโตโซโตซินไปแล้ว 8 สัปดาห์ ผู้วิจัยทำการศึกษแบบ in vivo ในขณะที่สัตว์ทดลองยังมีชีวิตอยู่โดยเทคนิค intravital fluorescence microscopic ศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง ทดสอบการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็ก และทดสอบฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในหลอดเลือดสมองของหนูที่เป็นเบาหวาน พารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษาได้แก่ 1) ศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวและการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่ทำให้หลอดเลือดคลายตัวโดยวิธีการทาง intravital florescent microscopy 2) เก็บเลือดเพื่อนำไปหาระดับกลูโคส คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ HbA1c ในพลาสมา 3) ตรวจหาระดับ lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมอง โดยวิธี TBARS

ผลการทดลอง ส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้วิเคราะห์มี pH เท่ากับ 4.81 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 11.6 °Brix เมื่อคิดเป็นร้อยละผลผลิตของน้ำคั้นส้มโอที่ได้จากเนื้อส้มโอ คิดเป็น 83.06 % เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทาง

ชีวภาพพบว่าส้มโอ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 123.03 ± 0.87 mgGAE/100g ของเนื้อ มี ปริมาณารังจีน 16.08 ± 0.51 mg/100g ของเนื้อ มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 2.37 ± 0.10 mg/100g ของเนื้อ และค่าEC₅₀ 1839.01 ± 61.68 mg/100 mL เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในส้มโอทองดีโดยเปรียบเทียบกับสารนารังจีนและเฮสเพอริดิน พบว่า ส้มโอทองดีประกอบด้วยนารังจีนเป็นหลัก การให้น้ำคั้นส้มโอเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์พบว่าสามารถลดระดับกลูโคส cholesterol และ triglyceride ในเลือดได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า HbA1C สามารถยืนยันได้ถึงการมีระดับกลูโคสในเลือดที่ลดลงในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ ที่น่าสนใจยิ่งได้แก่การให้น้ำคั้นส้มโอในหนูเบาหวานสามารถป้องกันการลดลงของอัตราการใช้หลอดเลือดที่สมองได้ สำหรับการศึกษางานของเอนโดทีเลียมโดยศึกษาดัชนีบ่งชี้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมได้แก่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาว และการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation พบว่าการให้น้ำคั้นส้มโอเป็นระยะเวลานานต่อเนื่องสามารถทำให้การทำงานของเอนโดทีเลียมทำงานได้ดีกว่าในหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ โดยเชื่อว่าเป็นผลมาจากฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของน้ำคั้นส้มโอ การศึกษาในปัจจุบันทำให้ผู้วิจัยได้เสนอ กลไกที่น้ำคั้นส้มโอสามารถป้องกันความผิดปกติของเอนโดทีเลียมเซลล์ในภาวะเบาหวานนั้นได้แก่การลดปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในภาวะเบาหวาน ดังนั้นการให้น้ำคั้นส้มโอกินเสริมเป็นระยะเวลานานอย่างต่อเนื่องสามารถป้องกันความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในโรคเบาหวานเรื้อรังได้อย่างมีประสิทธิภาพ

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : RDG5420040

ชื่อโครงการ :ฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในหนู

เบาะหวาน

ชื่อนักวิจัย : ผศ.ดร. อัมพร จาริยะพงศ์สกุล ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

E-mail address : amporma@swu.ac.th

ระยะเวลาของโครงการ : พฤษภาคม 2554 – พฤษภาคม 2555

เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองของหนูที่เป็นเบาะหวานและฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและของน้ำคั้นส้มโอและวิเคราะห์หาปริมาณฟลาโวนอยด์ของน้ำคั้นส้มโอ โดยศึกษาในหนูวิสตาร์เพศผู้ น้ำหนัก 200-250 กรัม ทำหนูให้เป็นเบาะหวานโดยวิธีฉีดสารสเตปโตโซโตซินเข้าทางหลอดเลือดดำขนาดความเข้มข้น 55 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักตัว แบ่งสัตว์ทดลองแบบสุ่มเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มควบคุม (CON) กลุ่มเบาะหวาน (STZ) กลุ่มควบคุมและกลุ่มเบาะหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ น้ำคั้นส้มโอที่ใช้มีขนาด 10 มก/นน ตัว 1 กก (CON-PM, STZ-PM ตามลำดับ) ป้อนน้ำคั้นส้มโอให้กินวันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 8 สัปดาห์ ทำการศึกษาหลังจากสัตว์ทดลองได้รับการฉีดสารละลายซิเตรทบัฟเฟอร์หรือสเตปโตโซโตซินไปแล้ว 8 สัปดาห์ พารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษาได้แก่ ระดับกลูโคสในเลือด ไกลโคซิเลเทดฮีโมโกลบิน พลาสมาคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวที่เอนโดทีเลียมภายในหลอดเลือดดำขนาดเล็กและการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร endothelium dependent vasodilator (ACh) และ endothelium independent vasodilator (NTG) และพารามิเตอร์ที่บ่งชี้ถึงระดับอนุมูลอิสระได้แก่การวัดระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเกิด lipid peroxidation จากผลการศึกษาพบว่าส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้วิเคราะห์มีร้อยละผลผลิตของน้ำคั้นส้มโอที่ได้จากเนื้อส้มโอ คิดเป็น 83.06 % เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าส้มโอ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 123.03 ± 0.87 mgGAE/100g ของเนื้อ ปริมาณนาริงจีน 16.08 ± 0.51 mg/100g ของเนื้อ ปริมาณกรดแอสคอร์บิก 2.37 ± 0.10 mg/100g ของเนื้อ และค่าEC₅₀ 1839.01 ± 61.68 mg/100 mL เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในส้มโอทองดีโดยเปรียบเทียบกับสารนาริงจีนและเฮสเพอริดิน พบว่า ส้มโอทองดีประกอบด้วยนาริงจีนเป็นหลัก ในหนูกลุ่มเบาะหวาน มีระดับกลูโคสในเลือด ไกลโคซิเลเทดฮีโมโกลบิน พลาสมาคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ช่วงอายุเดียวกัน ในหนูเบาะหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอมีระดับระดับกลูโคส ไกลโคซิเลเทดฮีโมโกลบิน พลาสมาคอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ต่ำกว่ากลุ่มเบาะหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองมีค่าต่ำ ขณะที่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีจำนวนสูงในหนูกลุ่มเบาะหวาน ในหนูเบาะหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโออัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองมีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาะหวาน ขณะที่การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีจำนวนต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาะหวาน ในหนูเบาะหวานมีความบกพร่องในการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อสาร ACh และในกลุ่มเบาะหวานที่ได้รับ น้ำคั้นส้มโอพบว่า น้ำคั้นส้มโอ สามารถป้องกันความบกพร่องในการตอบสนองของหลอดเลือดสมองต่อสาร ACh นอกจากนั้นระดับสารอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมองของหนูเบาะหวานมีระดับที่ต่ำลงเมื่อได้รับน้ำคั้นส้มโอ โดยสรุปการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในการทำงานของเซลล์

เอนโดทีเลียมในภาวะเบาหวาน ความผิดปกติที่เกิดขึ้นดังกล่าวนี้เป็นผลจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากระดับกลูโคสและไขมันในเลือดที่สูงผิดปกติเป็นเวลานานก่อให้เกิดการความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมมีผลทำให้ปริมาณการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีค่าเพิ่มขึ้น อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองลดลง และมีความบกพร่องในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilator สำหรับผลของน้ำคั้นส้มโอสามารถลดระดับ lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมองของหนูเบาหวานได้ เป็นที่น่าสนใจว่าจากการทดลองครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่าไม่เพียงแต่การให้น้ำคั้นส้มโอที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสามารถป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเอนโดทีเลียมที่เกิดจากภาวะเบาหวานแต่ยังอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจใช้ป้องกันการเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดในสมองในผู้ป่วยที่มีภาวะเบาหวานเรื้อรังได้

คำหลัก: น้ำคั้นส้มโอ หนูเบาหวาน เซลล์เอนโดทีเลียม การไหลเวียนเลือดที่สมอง สารต้านอนุมูลอิสระ

Abstract

Project Code : RDG5420040

Project Title : Effect of Pomelo juice extract on cerebral blood flow and cerebral endothelial function in streptozotocin-induced diabetic rats

Investigator : Assist.Dr. Amporn Jariyapongskul, Department of Physiology, Faculty of Medicine, Srinakharinvirot University
E-mail address : amporma@swu.ac.th

Project Period : May 2011 – May 2012

To investigate the effect of long-term supplementation of Pomelo juice extract (*Citrus maxima* Merr.) on cerebral blood flow and cerebral endothelial function in streptozotocin (STZ)-induced diabetic rats. The content of vitamin C, naringin and total phenolic were determined. The concentrate Pomelo juice extract was spray dried, and resultant the powder. Diabetes was induced in male Wistar Furth rats by intravenous injection of streptozotocin (STZ) (55 mg/kg b.w.). The rats were divided into four groups: control (CON), streptozotocin (STZ) rats and control and streptozotocin rats supplemented with Pomelo juice extract (CON-PM and STZ-PM; respectively) at 10 mg/kg bw. Pomelo juice extract was supplemented by gavage feeding one time per day for 8 weeks.

The experiments were performed at 8 weeks after injection of STZ. The metabolic parameters (blood glucose (BG), glycosylated hemoglobin (HbA1c), plasma cholesterol and triglyceride and cortex tissue superoxide anion) were measured. To examine the endothelial function, leukocyte adhesion to the venular endothelium was evaluated by counting leukocytes labeled with rhodamine 6G. In addition, functional responses of cerebral arterioles to endothelium-dependent (acetylcholine; ACh) and -independent (nitroglycerin; NTG) agonists were measured in control non-diabetic and diabetic rats with or without CAP supplementation. Moreover, the cerebral blood flow perfusion was evaluated using a laser Doppler flowmeter.

The results demonstrated that the biological compounds of Pomelo juice including total phenolic 123.03 ± 0.87 mgGAE/100g of fresh weight, naringin 16.08 ± 0.51 mg/100g of fresh weight, ascorbic 2.37 ± 0.10 mg/100g of fresh weight, and EC_{50} 1839.01 ± 61.68 mg/100 mL. The major flavonoid in pomelo "Thong Dee" is naringin. The STZ rats that were induced hyperglycemia showed the increased in HbA1c, plasma cholesterol and triglyceride and malondialdehyde. All of these abnormal metabolic parameters could be improved by supplementing Pomelo juice extract in STZ rats. The number density of adherent leukocytes was increased significantly in STZ-diabetic rats, but it was decreased in the cerebral blood flow perfusion, compared with control rats. In the STZ-PM rats, the cerebral blood flow perfusion was significantly increased but the leukocyte adhesion was decreased, as compared to STZ group. Furthermore, the magnitude of vasodilation to ACh was significantly less in STZ-rats. Supplementation with Pomelo juice extract significantly improved vasodilation in STZ rats. Response of pial arterioles to nitroglycerin was similar in control, STZ and STZ-PM rats.

In conclusion, long-term supplementation of Pomelo juice extract could prevent the endothelial dysfunction including decrease in leukocyte adhesion, improved endothelium dependent vasodilation and increase in cerebral blood flow perfusion which are induced by diabetes through its antioxidant effect. It was suggested that the antioxidant Pomelo juice extract might be a great supplement for preventing diabetic cerebrovascular disease.

Keywords: Pomelo juice, cerebral blood flow, endothelial dysfunction, diabetic rats, intravital fluorescence microscopy, antioxidant

สารบัญเรื่อง

(Table of contents)

IV

หน้า

บทสรุปผู้บริหาร	I
บทคัดย่อ (ไทย)	II
บทคัดย่อ (อังกฤษ)	III
สารบัญเรื่อง	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูปภาพ	VI
บทที่1: บทนำ	1
บทที่2: เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	2
บทที่3: วิธีดำเนินการวิจัย	7
บทที่4: ผลการทดลอง	14
บทที่5: สรุปและอภิปรายผล	31
เอกสารอ้างอิง	34

สารบัญตาราง

(List of tables)

ตาราง		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์น้ำหนัก, pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}$ Brix) ของส้มโอพันธุ์ทองดี	✓15
2	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอพันธุ์ทองดี	15
3	ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ($\mu\text{g/g}$ ของผง) ของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry, วิธี Spray dry	18
4	การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษาใน หนูเบาหวาน (STZ) และ หนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	20
5	การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษาในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	20
6	แสดงระดับระดับไกลโคไซเรตฮีโมโกลบินในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	22
7	แสดงระดับคอเลสเตอรอล ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนู เบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	23
8	แสดงไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนู เบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	24
9	แสดงอัตราเฉลี่ยการไหลเวียนเลือดที่สมอง ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	25
10	จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm) ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	27
11	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก	28
12	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerin 10^{-5} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู	29

เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

ตาราง

หน้า

13	ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	30
----	---	----

สารบัญรูป
(List of illustrations)

รูป		หน้า
1	โครมาโตแกรม HPLC ของเฮสเพอริดินและนารังจีน จากสารมาตรฐาน, UV detection ที่ 280 nm	16
2	โครมาโตแกรม HPLC ของนารังจีน จากน้ำคั้นส้มโอ, ใช้ UV detection ที่ 280 nm	16
3	น้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry	17
4	น้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Spray dry	17
5	น้ำคั้นส้มโอผงสีส้มที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Spray dry	17
6	การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในระยะเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษา ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์	21
7	แสดงระดับระดับไกลโคไซเรเดคอีโมโกลบินในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	22
8	แสดงระดับคอเลสเตอรอล ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	23
9	แสดงระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	24
10	แสดงอัตราเฉลี่ยการไหลเวียนเลือดที่สมอง ของในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	25
11	จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm) ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	27
12	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	28

รูป		หน้า
13	ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerin 10^{-5} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	29
14	ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerl cortex ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์	30

บทนำ

เบาหวานเป็นโรคเรื้อรัง ซึ่งทำให้ประเทศไทยต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการดูแลรักษาพยาบาล ผู้ป่วยเบาหวานอย่างต่อเนื่อง ค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้เป็นจำนวนมากเนื่องจากมีผู้ป่วยเบาหวานเข้ารับการรักษาย่างไม่ต่อเนื่อง ทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่ออวัยวะต่างๆตามมา โดยโรคเบาหวานเป็นตัวเร่งที่แรงมากที่ทำให้อุบัติการณ์ของโรคหัวใจและหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้นและเป็นสาเหตุสำคัญที่สุดของการเกิดหัวใจขาดเลือด (myocardial ischemia) ไตวาย (renal failure) และความผิดปกติที่ตาจนถึงตาบอด (retinopathy) (1-2) และที่สมองจะเกิดความผิดปกติทั้งในระบบประสาท (neuropathy) และระบบหลอดเลือด โดยเฉพาะการขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (stroke) (3) จากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานดังกล่าวข้างต้น มีสาเหตุพื้นฐานที่สำคัญคือการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ที่เรียกว่า diabetic macroangiopathy และ diabetic microangiopathy (4,5) ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหลอดเลือดขนาดเล็ก หรือ diabetic microangiopathy นั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านโครงสร้างและการทำงานของหลอดเลือด การเปลี่ยนแปลงทางด้านโครงสร้าง (morphological changes) นั้น มีรายงานการศึกษาวิจัยอยู่เป็นจำนวนมาก (4-5) พบว่าทั้งในคนที่เบาหวานและสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ที่ผนังหลอดเลือด ทั้งหลอดเลือดแดงรอง (arteriole) และหลอดเลือดฝอย (capillary) จะมีการหนาตัวของเนื้อเยื่อ ชั้น basement membrane (increased thickening of vascular basement membrane) (5,6) สำหรับความผิดปกติในแง่การทำงาน (functional changes) ของหลอดเลือดที่พบได้แก่ การเปลี่ยนแปลงในหน้าที่การขนส่งสารและน้ำ (hyperpermeability) (7) การเกิด impairment of autoregulation (6) เป็นต้น ที่น่าสนใจยิ่งจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาของข้าพเจ้าและคณะ(6)พบว่าในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยมีรูปแบบการเป็นเบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (insulin dependent diabetic mellitus; IDDM) จะมีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมอง (cerebral microvessels) ได้แก่ การเกิด microaneurysm การหนาตัวของเนื้อเยื่อ basement membrane ของหลอดเลือด arterioles และ capillaries จากข้อมูลเหล่านี้จะเห็นได้ว่าภาวะแทรกซ้อนทางด้านหลอดเลือดในโรคเบาหวานสามารถเกิดขึ้นได้ในอวัยวะสำคัญต่าง ๆ รวมไปถึงสมองที่นำไปสู่การขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (stroke) จากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยเบาหวานจะมีอัตราเสี่ยงในการเกิดโรคสมองขาดเลือด (ischemic stroke) มากกว่าคนที่ไม่ได้เป็นเบาหวานสูงถึง 2-6 เท่า(8) อุบัติการณ์ของผู้ป่วยโรคเบาหวานที่มีภาวะแทรกซ้อนทางระบบประสาท (neuropathy) พบว่าเกิดจากการลดลงของปริมาณเลือดที่ไปเลี้ยงเซลล์ประสาทและเนื้อเยื่อสมองอันก่อให้เกิดการขาดเลือดในที่สุด (9)

สาเหตุของการเกิดความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือดในภาวะเบาหวานที่สำคัญได้แก่ การมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารอนุมูลอิสระในร่างกาย ในปัจจุบันพบว่าระดับกลูโคสในเลือดที่สูงเป็นระยะเวลานานในภาวะเบาหวานเป็นตัวก่อให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายรวมถึงในหลอดเลือดด้วย(10) สารอนุมูลอิสระนี้จะทำให้อนโดที่เลียมเซลล์ที่ผนังหลอดเลือดทำงานผิดปกติไป สาเหตุที่ทำให้มีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมากในภาวะที่มีกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานนั้นมีกลไกหลายอย่าง เช่น กลไกทาง cyclooxygenase โดยผ่าน PGH_2 (11) หรือโดยกลไกทาง protein glycosylation (12) และการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในกระบวนการ polyol pathway (13) เป็นต้น

การรักษาโรคเบาหวานในปัจจุบันนอกจากมุ่งเน้นการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือดแล้วยังมุ่งเน้นไปที่การใช้สมุนไพร ผัก ผลไม้ เพื่อต้านฤทธิ์ และลดจำนวนสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากในร่างกาย มีรายงานการวิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาฤทธิ์ของการบริโภคผลไม้ในการลดปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด โรคมะเร็ง โรคทาง

ระบบประสาท (14-15) ผลไม้ส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ลดการทำลายเซลล์ ไปจนถึงลดการทำลายเนื้อเยื่อ ส่วนประกอบสำคัญในผลไม้ที่มีฤทธิ์ดังกล่าว เช่น ฤทธิ์จากวิตามิน และ ฟีนอลิกที่มีอยู่ในผลไม้ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ 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) (16-17) ประเทศไทยมีการปลูกส้มโอหลายจังหวัดและมีคุณภาพมีคุณค่าทางอาหารและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ เช่น เปลือก เนื้อ และเมล็ด นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระยังมีสรรพคุณในการช่วยบำรุงกระเพาะอาหาร การย่อยอาหาร จากการศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอ พบว่า ส้มโอพันธุ์ทองดีที่ระยะความแก่เพื่อการส่งออกมีปริมาณวิตามินซี และ flavonoid (18) ชนิดของ flavonoid ที่พบมากที่สุดที่ส้มโอพันธุ์ทองดีได้แก่ naringin และพบความสามารถของส้มโอทองดีในการต้านอนุมูลอิสระ แม้ว่าจะมีการศึกษาฤทธิ์ของส้มโอดังกล่าวข้างต้นแต่ยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของส้มโอในการปกป้องและฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดในโรคเบาหวานที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงอยู่เป็นระยะเวลานาน ดังนั้นจึงเป็นจุดสนใจให้คณะผู้วิจัยทำการศึกษากิจกรรมของส้มโอโดยป้อนให้หนูที่มีภาวะกลูโคสในเลือดสูงอย่างเรื้อรังกินเสริมเพื่อป้องกันและฟื้นฟูการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองและนำไปสู่การเพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดในสมอง

ผลสำเร็จของงานวิจัยได้แก่การพัฒนาส่งเสริมสรรพคุณของส้มโอเพื่อการแข่งขันในตลาดโลกโดยมีงานวิจัยที่นำเสนอฤทธิ์ทางชีวภาพอย่างเด่นชัดเป็นตัวรองรับ ในขณะนี้การศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ของ ส้มโอ ยังเป็นการศึกษาในหลอดทดลองและทำใน cell culture เป็นส่วนใหญ่ แต่งานวิจัยที่นำเสนอในครั้งนี้ คณะผู้วิจัยทำการศึกษารูปแบบ *in vivo* ในหนูขาวที่เป็นเบาหวานขณะที่ยังมีชีวิตอยู่โดยเทคนิค intravital fluorescence microscopic

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus)

โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) เป็นโรคที่มีระดับกลูโคสสูงในเลือด สาเหตุมาจากระดับฮอร์โมนอินซูลิน (insulin) ในร่างกายมีไม่เพียงพอซึ่งอาจเกิดขึ้นเพราะอินซูลินมีน้อยกว่าปกติไม่พอใช้หรือเกือบไม่มีเลย หรือจากการมีอินซูลินในเลือดสูงกว่าปกติแต่ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้เพียงพอเนื่องจากตัวรับ (receptor) ของอินซูลินไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

ในปัจจุบันการจำแนกโรคเบาหวานตามหลักเกณฑ์ขององค์การอนามัยโลก (19) ได้แก่เบาหวานชนิดพึ่งอินซูลิน (insulin-dependent diabetes mellitus; IDDM; type1 DM) และชนิดไม่พึ่งอินซูลิน (non-insulin dependent diabetes mellitus; NIDDM; type2 DM) สำหรับสาเหตุของการเกิดโรคเบาหวานชนิด IDDM นั้นเกี่ยวข้องกับ HLA ในโครโมโซมที่ทำให้เกิดการติดเชื้อง่าย ส่วนใน NIDDM เกี่ยวข้องกับกรรมพันธุ์เป็นส่วนใหญ่สำหรับความเครียด สิ่งแวดล้อมมีส่วนทำให้โรคเบาหวานแสดงออกหรือมีอาการรุนแรงขึ้น การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเนื่องจากมีระดับอินซูลินไม่เพียงพอหรือออกฤทธิ์ไม่ได้นั้นทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน metabolism ของคาร์โบไฮเดรตทำให้ตับปล่อยกลูโคส กลูโคสออกมาในกระแสเลือด และร่างกายไม่สามารถนำกลูโคสไปใช้เป็นพลังงานได้ จึงทำให้มีระดับกลูโคสสูงในกระแสเลือด หรือในกรณีที่ได้รับอินซูลิน (receptor) บนผนังเซลล์มีจำนวนน้อยแม้ว่าจะมีอินซูลินมากพอ อินซูลินก็ไม่สามารถออกฤทธิ์ได้ นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงใน metabolism ของไขมันในภาวะเบาหวานด้วย ทำให้ระดับ cholesterol และ triglyceride สูงขึ้น สาเหตุต่างๆดังกล่าวข้างต้นก่อให้เกิดพยาธิสภาพต่อหลอดเลือดทั้งขนาดใหญ่และหลอดเลือดขนาดเล็ก พยาธิสภาพที่เกิดขึ้นยิ่งนานก็ยิ่งมีอาการรุนแรงมากขึ้น ถ้าการควบคุมระดับกลูโคสไม่ดีพอภาวะแทรกซ้อนเหล่านี้จะเกิดเร็วขึ้น

ภาวะแทรกซ้อนทางด้านหลอดเลือดในโรคเบาหวาน (vascular complication)

ผู้ป่วยเบาหวานที่มีระดับกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานๆ หรือในกรณีที่ได้รับการควบคุมระดับกลูโคสไม่ดีพอ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพและการสูญเสียหน้าที่การทำงานของอวัยวะต่างๆ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอุบัติการณ์ของการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานดังกล่าวมีสาเหตุพื้นฐานมาจากการเปลี่ยนแปลงหรือเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดทั้งขนาดเล็กและใหญ่ที่เรียกว่า diabetic microangiopathy และ diabetic macroangiopathy ตามลำดับ

Diabetic microangiopathy พบเป็นภาวะแทรกซ้อนที่สำคัญทั้งในเบาหวานชนิด IDDM และ NIDDM โดยเฉพาะในผู้ป่วย IDDM ความรุนแรงของการเกิด microangiopathy จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาของการดำเนินโรค (11)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในหลอดเลือดขนาดเล็กนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งด้านโครงสร้าง (morphological changes) และการทำงาน (functional changes) สำหรับ morphological changes มีรายงานการศึกษาอยู่เป็นจำนวนมากทั้งในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานและสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานพบว่าที่ผนังหลอดเลือดทั้งหลอดเลือดแดงรอง (arteriole) และหลอดเลือดฝอย (capillary) มีการหนาตัวของเนื้อเยื่อ basement membrane มากผิดปกติ มีการโป่งพองของหลอดเลือดขนาดเล็ก (microaneurysms) (1) สำหรับการเปลี่ยนแปลงในแง่การทำงานของหลอดเลือดเช่นมีการขนส่งสารและน้ำมากผิดปกติ (hyperpermeability) (12) หรือเกิด impairment of vascular autoregulation (13) เป็นต้น

แม้ว่าในปัจจุบันจะยังไม่ทราบกลไกของการเกิดความผิดปกติของหลอดเลือดในโรคเบาหวาน แต่อย่างไรก็ตามได้มีการตั้งสมมติฐานว่าเกิดขึ้นจากมีความผิดปกติของเอนโดทีเลียมเซลล์ (endothelial dysfunction) ในสภาวะปกติเอนโดทีเลียมมีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของหลอดเลือด โดยอาศัยสมดุลของสารต่างๆ ที่สร้างและหลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์ เช่น nitric oxide, endothelin-1, prostaglandin เป็นต้น เมื่อเกิด endothelial dysfunction ขึ้นสมดุลดังกล่าวจะเสียไป ทำให้เกิดความผิดปกติของหลอดเลือดทั้งในแง่โครงสร้างและการทำงาน

Endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวาน

ดังได้กล่าวข้างต้นแล้วว่า ในผู้ป่วยที่เป็นเบาหวานและใน model ของสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานอย่างเรื้อรัง โดยเฉพาะในกรณีที่ไม่ได้ควบคุมระดับกลูโคสในเลือด จะเกิดพยาธิสภาพต่อหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญของร่างกายซึ่งนำไปสู่อัตราเสี่ยงต่อการเกิดโรคแทรกซ้อน สูญเสียความสามารถในการทำงานของอวัยวะนั้นๆ ตลอดจนถึงเพิ่มอัตราตายในเบาหวานทั้งชนิด ; type1 DM และ ; type2 DM จากการศึกษามากมายนำมาซึ่งข้อมูลความรู้ที่พอสรุปได้คือปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด (vascular complication) ในภาวะเบาหวานได้แก่

1. ภาวะ hyperglycemia
2. ภาวะ dyslipidemia

ปัจจัยทั้ง 2 มีบทบาทสำคัญทำให้การทำงานของเอนโดทีเลียมเซลล์เปลี่ยนแปลงไปที่เรียกว่า endothelial dysfunction (20)

ในสภาวะปกติเอนโดทีเลียมมีหน้าที่ในการควบคุมการทำงานของหลอดเลือด โดยอาศัยสมดุลของสาร mediators ต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์ ซึ่งได้แก่ สาร nitric oxide (endothelium derived relaxing factor), endothelin-1, prostaglandin เป็นต้น nitric oxide เป็นสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัว ป้องกันการเกาะติดของเกร็ดเลือด เป็นต้น ขณะที่ endothelin-1 มีฤทธิ์ในการทำให้หลอดเลือดหดตัว ดังนั้นจะเห็นได้ว่าถ้ามีการเสียสมดุลของ mediator ต่าง ๆ ที่สร้างและหลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์ ที่พบในภาวะเบาหวานคือ มีการสร้างและหลั่ง nitric oxide ลดลง รวมทั้งการทำงานของ nitric oxide ผิดปกติไป ปัจจัยที่ใช้นำซึ่งเกิด endothelial dysfunction ซึ่ง

เป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่ 1) การเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators 2) มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมมากขึ้นผิดปกติ (21-22)

ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของการเกิด endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวานที่สำคัญ คือ การมีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระในร่างกาย การที่ระดับกลูโคสสูงในเลือดจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงและเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายกระบวนการ อันได้แก่ การเกิด glucose autooxidation จากกระบวนการทาง polyol pathway, และ protein glycation เป็นต้น นอกเหนือจากนั้นความผิดปกติใน metabolism ของไขมัน (dyslipidemia) (23-24) จากภาวะเบาหวานก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้

กระบวนการเพิ่มอนุมูลอิสระในภาวะเบาหวาน

1. Polyol pathway

มีเอนไซม์ที่สำคัญ 2 ชนิด ในกระบวนการทาง Polyol ได้แก่ aldose reductase, และ sorbital dehydrogenase ในภาวะเบาหวาน กลูโคสในเลือดที่สูง คือ glucose glucose ที่สูงขึ้นไปจะถูกเปลี่ยนให้เป็น sorbital โดยเอนไซม์ aldose reductase (25) และเปลี่ยนต่อไปเป็น fructose โดย sorbital dehydrogenase การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดขึ้นในเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องอาศัยอินซูลินในการนำ glucose เข้าเซลล์ ได้แก่ เลนซ์ เอนโดทีเลียมเซลล์ ในภาวะที่ระดับกลูโคสสูงในเลือดจะมีผลเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระโดยผ่านทางการทำงานเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ aldose reductase มีการตั้งสมมติฐานกับการเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ อันเนื่องมาจากระดับกลูโคสในเลือดสูง โดยเชื่อว่าเป็นผลมาจากการทำงานของ aldose reductase เพิ่มขึ้น เนื่องจากการทำงานของ aldose reductase จะอาศัย NADPH (nicotine-adenine dinucleotide phosphate) เป็น co-factor ในขณะที่เดียวกันกระบวนการผลิต reduced glutathione (GSH) (เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่ง) และการผลิต nitric oxide จาก L-arginine จำเป็นต้องใช้ NADPH เป็น co-factor เช่นกัน (26) ดังนั้นในภาวะ เบาหวานที่มีระดับกลูโคสสูงในเลือดจะมีระดับ NADPH ลดต่ำลง รวมทั้ง ระดับ GSH และ nitric oxide จะมีปริมาณลดลงไปด้วยในที่สุดระดับอนุมูลอิสระจะเพิ่มปริมาณมากขึ้นเนื่องจากเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและปริมาณอนุมูลอิสระ

มีการศึกษาที่ยืนยันสมมติฐานดังกล่าวซึ่งทำการศึกษาในหลอดทดลอง โดยนำเอนโดทีเลียมเซลล์ เลี้ยงไว้ใน media ที่มีปริมาณกลูโคสสูง (33 mmol/l) จะพบว่าปริมาณ NADPH ลดลงถึง 42% (25) จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่า การเพิ่มการทำงานของ aldose reductase ในกระบวนการทาง polyol ในภาวะเบาหวานเป็นสาเหตุหนึ่งของการเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระ และทำให้เอนโดทีเลียมเซลล์ทำงานผิดปกติไป

2. Non-enzymatic glycosylation

ปริมาณกลูโคสที่สูงเกินในภาวะเบาหวานจะทำให้เกิดปฏิกิริยา non-enzymatic glycosylation โดยจับกับโปรตีนเกิดเป็น Schiff base และ Amadori product ตามลำดับ ซึ่งผลิตภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถเปลี่ยนกลับได้ (reversible product) แต่ในที่สุดถ้าระดับกลูโคสในเลือดยังคงสูงอยู่ จะกลายเป็น advanced glycosylation product (AGE) ซึ่งไม่สามารถเปลี่ยนกลับได้ (irreversible product) AGE จะสะสมอยู่ในหลอดเลือด ทำให้ basement membrane ของหลอดเลือดหนาตัวขึ้น เมื่อ AGE เข้าสู่กระแสเลือดจะทำให้การทำงานของเอนโดทีเลียมเปลี่ยนแปลงไป ถ้า AGE ไปรวมตัวกับ macrophages จะเป็นผลให้มีปฏิกิริยาตอบสนอง โดยมีการหลั่งสารหลายชนิด เช่น tumor necrosis factor (TNF), interleukin-1 (IL-1) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ทำให้มีการเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด ยิ่งไปกว่านั้นจะมีตัวรับ

(receptor) ของ AGE ซึ่งอยู่บนเม็ดเลือดขาว macrophages, endothelial cells และ mesangial เซลล์ของไต (27-28) เมื่อ AGE จับกับตัวรับบนเอนโดทีเลียมเซลล์จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลอิสระนี้จะย้อนมาทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมเซลล์อีกครั้ง

การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวาน พบว่า AGE จากภาวะกลูโคสสูงในเลือดจะทำให้ การทำงานหรือฤทธิ์ของ nitric oxide รวมทั้งปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญ

3. Protein kinase C activation

ระดับกลูโคสในเลือดที่สูงเป็นระยะเวลานานทำให้มีการขนส่งกลูโคสเข้าเซลล์จำนวนมาก ภายในเซลล์จึงมีความเข้มข้นของกลูโคสที่สูง มีผลไปกระตุ้นการทำงานของ protein kinase C (PKC) ผ่านทาง diacylglycerol การกระตุ้นการทำงานของ PKC จะส่งผลไปลดการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม ทำให้ลดการสร้าง endothelial nitric oxide synthase (eNOS) เพิ่มการสังเคราะห์ endothelin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF) กระตุ้นการสร้างและหลั่ง proinflammatory cytokine เช่น NF- κ B และกระตุ้นการสร้าง สารอนุมูลอิสระ (29-30)

4. Dyslipidemia in diabetes

แม้ว่าระดับกลูโคสสูงในเลือดจะเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการก่อให้เกิด endothelial dysfunction แต่ในเบาหวานที่ควบคุมระดับกลูโคสในเลือดไม่ดีพอพบว่าจะมีความผิดปกติใน metabolism ของไขมันเกิดขึ้น ซึ่งได้แก่การมีระดับ cholesterol และ triglyceride สูงในเลือด และระดับ high density lipoprotein (HDL) จะต่ำลง เป็นที่ทราบกันดีว่า cholesterol ในพลาสมา ร้อยละ 60-70 จะถูกขนส่งโดย low-density lipoprotein (LDL) เมื่อระดับ cholesterol ในเลือดสูงขึ้น ก็จะมีปริมาณ LDL-cholesterol สูงขึ้นตามไปด้วย LDL-cholesterol จะถูก modified ไปในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน โอกาสที่ LDL จะเกิด oxidation ได้เป็น oxidized LDL (OxLDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการศึกษามากมายที่พบว่าในผู้ป่วยหรือสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานจะมีระดับ OxLDL สูง และ OxLDL จะมีผลไปทำลายเอนโดทีเลียมเซลล์ด้วย ในขณะที่เกิด oxidation ของ LDL จะเกิด superoxide anion (O_2^-) ออกมาด้วย (31) ซึ่ง O_2^- จะมีผลไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมได้ Hein K และคณะ (32) และ Shimokawa K (33) ได้แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่ระดับคลอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะเป็นดัชนีบ่งชี้การมี LDL-cholesterol สะสมในผนังหลอดเลือดและมีผลทำให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators

ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในภาวะเบาหวานนั้น ทั้งระดับกลูโคสที่สูงอยู่เป็นระยะเวลานาน ร่วมกับมีปริมาณไขมันทั้งคลอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ ที่สูงขึ้นในเลือด จะเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้มีปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดทั้งด้านโครงสร้างและการทำงาน

จากรายงานการเฝ้าระวังโรคเบาหวาน พ.ศ.2547 โดย ศิริพิทยาคุณกิจ กรมควบคุมโรค ได้แสดงผลการศึกษาดังนี้ จำนวนผู้ป่วยเบาหวาน 228,309 ราย มีภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือดแดงและอวัยวะต่างๆ คิดเป็น ร้อยละ 13.4 และมีภาวะแทรกซ้อนที่ตาเป็นอันดับ 3 รองจากภาวะแทรกซ้อนที่หลอดเลือดแดง และภาวะแทรกซ้อนอื่นๆ จากรายงานดังกล่าวพบว่า แนวโน้มการเกิดภาวะแทรกซ้อนที่หลอดเลือดขนาดเล็กในสมองของผู้ป่วยเบาหวานจะเริ่มรุนแรงมากขึ้น ซึ่งจะนำไปสู่ภาวะการขาดเลือดในที่สุด (34)

ผลไม้ในประเทศไทยส่วนใหญ่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพสูง ตัวอย่างเช่น ฟ้าชนในตระกูลส้ม รวมทั้งส้มโอเป็นผลไม้ชนิดหนึ่งที่มีแหล่งปลูกในหลายจังหวัด และเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออกไปขายยังต่างประเทศ

ส้มโอ (pummelo, pummelo, or shaddock)

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Citrus grandis* Osbeck หรือ *Citrus maxima* Merr. จัดอยู่ในวงศ์ : Rutaceae

ส้มโอ มีชื่อพื้นบ้านดังนี้ ทางเหนือเรียกว่า มะขุน มะโอ ส่วนทางมาเลย์-ยะลาเรียก ลีมาบาลี ทางเขมรเรียก ไกรยตะลอง และที่กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอนจะเรียก ลังอุ

ส้มโอเป็นไม้ผลตระกูลส้ม มีถิ่นกำเนิดในบริเวณจีนตอนใต้ และในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แหล่งในการเพาะปลูกส้มโอของประเทศไทยมีหลายจังหวัด และพบมีคุณค่าทางโภชนาการและสรรพคุณทางยาที่น่าสนใจ ได้แก่ เนื้อส้มโอ มีวิตามินซีมาก ตามมาด้วยวิตามินเอ วิตามินบี1 และวิตามินบี2 น้ำในส้มไอยังมีกลูโคสประเภทย่อยสลายได้ทันทีเรียกว่ากลูโคส (glucose) ให้พลังงานแก่ร่างกายอย่างรวดเร็ว ส้มไอยังมีเส้นใยสูง ช่วยในการขับถ่ายและขับสารพิษ (35) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยพบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของผลไม้ตระกูลส้ม ได้แก่ flavonoids, carotenoids และ vitamin C เป็นที่ทราบกันดีว่า สารในกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์ป้องกันโรคหัวใจและหลอดเลือด มีฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านจุลชีพ (36) ชนิดของ flavonoid ที่พบในส้มโอเป็นชนิด flavanone, flavone และ flavonol โดยในกลุ่ม flavanone เป็นกลุ่มที่พบมากที่สุดและชนิดของ flavanone ที่มีปริมาณมากที่สุดในส้มโอไทยได้แก่ naringin นอกจากนั้นยังพบ flavanone ตัวอื่นๆบ้าง เช่น narirutin, eriocitrin และ neoeriocitrin (37) จากการศึกษาของ เสาวภา ไชยวงศ์ และคณะ (2010) พบว่าส้มโอพันธุ์ ทับทิมสยามมีปริมาณ naringin มากที่สุด เท่ากับ 76.81 mg/100 g fresh weight of fruit สำหรับพันธุ์ทองดี ขาวใหญ่ ขาวน้ำผึ้ง และขาวแตงกวามีปริมาณ naringin ที่ใกล้เคียงกันประมาณ 36-40 mg/100 g fresh weight of fruit (18)

Naringin(4', 5, 7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside) เป็นสารในกลุ่ม flavanone ที่พบมากในส้มโอไทย มีรายงานการศึกษาแสดงให้เห็นว่า naringin มีฤทธิ์ด้านการอักเสบ ต้านเซลล์มะเร็ง ลดระดับไขมันในเลือด และมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (38-39) ในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของส้มโอไทยในการป้องกันความผิดปกติของหลอดเลือดในภาวะต่างๆ แบบ in vivo study จึงเป็นจุดสนใจให้ผู้ลงทุนและคณะทำการศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอที่ผ่านการทำ freeze dried ป้อนให้หนูที่มีภาวะเบาหวานกินเป็นระยะเวลานานโดยตั้งสมมติฐานไว้ว่า **“ส้มโอที่ให้กินเป็นระยะเวลานานสามารถป้องกันหรือลดความผิดปกติในการทำงานของหลอดเลือดและเพิ่มอัตราการไหลเวียนที่สมองในโรคเบาหวานได้”** ความสำเร็จของงานวิจัยชิ้นนี้นอกจากเป็นการเผยแพร่งานวิจัยไทย ยังจะช่วยส่งเสริมการบริโภคส้มไอยภายในประเทศ การเพิ่มมูลค่าของส้มโอไทยเพื่อการส่งออกและยังเป็นการพัฒนาเศรษฐกิจได้ด้วย

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของน้ำคั้นส้มโอในการป้องกันการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในหนูเบาหวาน

- 1 ศึกษาปริมาณฟีนอลิก ชนิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มไอย
- 2 ศึกษาฤทธิ์ของ น้ำคั้นส้มโอต่ออัตราการไหลเวียนเลือดที่ สมอง และการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมอง
- 3 ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของ น้ำคั้นส้มโอในเนื้อเยื่อสมอง

ระเบียบวิธีวิจัย

1. ขั้นตอนการทำวิจัย

1.1 การวิจัยครั้งนี้ใช้หนูขาว (Wistar Furth) เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ตาบลศาลายา มหาวิทยาลัยมหิดล โดยนำมาเลี้ยงรวมกัน 3 ตัวต่อกรง ในอุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส และแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ โดยแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ

A) กลุ่มควบคุม ได้แก่หนู ที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือปกติ (0.9% normal saline solution) เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง (CON-rats)

B) กลุ่มควบคุมและได้รับการเสริมด้วยน้ำคั้นส้มโอ ได้แก่หนู ที่ได้รับการฉีดน้ำเกลือปกติ (0.9% normal saline solution) เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง (CON-PM rats) และป้อนผงน้ำคั้นส้มโอขนาด 10 มก/กก. น้ำหนักตัวผสมน้ำป้อนให้หนูกินทุกวันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

C) กลุ่มเบาหวาน ได้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ด้วยการฉีดสาร streptozotocin (STZ) ขนาด 55 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำ ที่หาง (STZ-rats) กลุ่มนี้ให้ดื่มน้ำธรรมดาทุกวันจนถึงวันที่ทำการทดลอง

D) กลุ่มเบาหวานและได้รับการเสริมด้วยน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM rats) หนูกลุ่มนี้ได้รับการฉีดสาร STZ เช่นเดียวกับ STZ-rats และป้อนผงน้ำคั้นส้มโอขนาด 10 มก/กก. น้ำหนักตัวผสมน้ำป้อนให้หนูกินทุกวันเป็นเวลา 8 สัปดาห์

เริ่มให้น้ำคั้นส้มโอ เสริมหลังจากฉีด STZ หรือน้ำเกลือปกติไปแล้ว 72 ชั่วโมง ผงน้ำคั้นส้มโอผสมในน้ำกลั่นปกติปริมาณ 1 mL

1.2 การเหนี่ยวนำสัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวานและเกณฑ์ตัดสินภาวะเบาหวาน

โดยการฉีดสาร streptozotocin (สารนี้จะไปทำลายเบต้าเซลล์ของตับอ่อน) ขนาด 55 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เข้าทางหลอดเลือดดำที่หาง หลังจากอดอาหารแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดสาร streptozotocin แล้ว 72 ชั่วโมง ทำการตรวจหาระดับกลูโคสในกระแสเลือดของหนูทดลองทุกกลุ่มและทุกตัว โดยใช้เครื่องวัด Glucometer (Advantage, Bohringer Mannheim, Germany) สัตว์ทดลองที่มีระดับกลูโคสในกระแสเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 250 มิลลิกรัม/เดซิลิตร ร่วมกับมีอาการกินน้ำมาก กินอาหารจุ บัสสาวะบ่อย น้ำหนักไม่เพิ่มขึ้น (หรือลดลง) จะได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นเบาหวาน

หนูทั้ง 4 กลุ่ม จะถูกนำมาศึกษาหาอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองและศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม ที่ช่วงเวลา 8 สัปดาห์ หลังการฉีดน้ำเกลือปกติและการฉีด STZ และหลังจากป้อนน้ำคั้นส้มโอ

1.3. วัตถุดิบส้มโอที่ใช้ในการศึกษา

ส้มโอพันธุ์ทองดี (*C. grandis* (L.) Osbeck) จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ปอกเปลือก และนำไปคั้นน้ำด้วยเครื่องคั้นน้ำแบบแยกกากระดับอุตสาหกรรม นำน้ำคั้นส้มโอที่ได้ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ - 30 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการแปรรูปและวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

A. การเตรียมน้ำคั้นส้มโอสำหรับการแปรรูป

ทำการละลาย (thawing) ตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอที่อุณหภูมิห้อง และไปแยกกากอีกครั้งโดยใช้เครื่อง Large Capacity Refrigerated Centrifuge (Mfr. SANYO GALLenkamp PLC, FALCON) จากนั้นปรับปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของน้ำคั้นส้มโอส่วนใสให้เท่ากับ 15 °Brix ด้วย Maltodextrin DE10 (บริษัท เบอร์ลี่ ยุคเกอร์ จำกัด

(มหาชน) และเติมสารป้องกันการจับตัวเป็นก้อน คือ Tricalcium phosphate (SD BNI (CN) CO.,LTD) คนให้เข้ากัน โดยปริมาณของส่วนประกอบน้ำคั้นส้มโอผง ได้แก่ น้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทองดีที่ผ่านการแยกกาก 95%, Maltodextrin DE10 4% และ Tricalcium phosphate 1% ได้เป็นน้ำคั้นส้มโอผสม

B. การศึกษากระบวนการแปรรูปน้ำคั้นส้มโอผง

B.1 การแปรรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) ในระดับห้องปฏิบัติการ

นำตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอผสม จากข้อ A ใส่ถาดอลูมิเนียม (สำหรับเครื่อง Freeze dryer) นำถาดอลูมิเนียมแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-12 ชั่วโมง จากนั้นนำเข้าเครื่อง Freeze dryer (Scanvac 2-55, CoolSafe 55-4, SCIENTIFIC PROMOTION CO.,LTD.) จนน้ำระเหยหมดจะได้ผงน้ำคั้นส้มโอ (ใช้เวลาประมาณ 6 ชั่วโมง) ซึ่งน้ำหนักน้ำคั้นส้มโอผงที่ได้เพื่อคำนวณร้อยละผลผลิต และนำตัวอย่างบรรจุลงในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันอากาศและความชื้น นำถุงซิปล็อคใส่ในถุงอลูมิเนียมเพื่อป้องกันแสง รวมทั้งใส่ซิลิกาเจลเพื่อช่วยดูดความชื้น เก็บตัวอย่างไว้ในที่แห้งและพ้นแสง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

B.2 การแปรรูปด้วยเทคนิคการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dry)

นำตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอผสม จากข้อ A ใส่ในปั๊มเกอร์ ทำแห้งโดยเครื่อง Spray dryer (NIRO ATOMIZER, COPENHAGEN DENMARK) ตั้งอุณหภูมิเข้า 150 องศาเซลเซียส จากนั้นชั่งน้ำหนักน้ำคั้นส้มโอผงที่ได้จากถ้วยรองรับผงของเครื่อง Spray dryer เพื่อคำนวณร้อยละผลผลิต บรรจุน้ำคั้นส้มโอผงลงในถุงซิปล็อคเพื่อป้องกันอากาศและความชื้น นำถุงซิปล็อคใส่ในถุงอลูมิเนียมเพื่อป้องกันแสง รวมทั้งใส่ซิลิกาเจลเพื่อช่วยดูดความชื้น เก็บตัวอย่างไว้ในที่แห้งและพ้นแสง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

C. การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี

C.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด (Total phenolic) โดยวิธี Folin- ciocalteu (ดัดแปลงจาก Singleton และ Rossi, 1965) (40)

การทำกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน Gallic acid 1000 ppm ใช้ Gallic acid 0.01 กรัม นำมาละลายน้ำปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0, 40, 80, 120, 160 และ 200 ppm ในปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

โดยปิเปตน้ำคั้นส้มโอ เจือจางในอัตราส่วน 1:10, 1:15, 1:25 และน้ำคั้นส้มโอผงเจือจางในอัตราส่วน 1:10 (น้ำคั้นส้มโอผง 1 กรัม/น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร), 1:15 (น้ำคั้นส้มโอผง 1 กรัม/น้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร), 1:25 (น้ำคั้นส้มโอผง 1 กรัม/น้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร), น้ำกลั่น หรือสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 40, 80, 120, 160, 200 ppm 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำกลั่น 7.5 มิลลิลิตร และ Folin - Ciocalteu 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex (Vortex-Genze2,G-560E,USA) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลาย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 10 % 0.6 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex (Vortex-Genze2,G-560E,USA) นำไปให้ความร้อนที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 755 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง UV - Vis Spectrophotometer (UV-1601, Shimadzu Corporation, Japan) โดยใช้น้ำกลั่นเป็น Blank หลังจากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ทำเป็นกราฟมาตรฐาน เพื่อใช้เปรียบเทียบกับค่าที่วัดได้ของสารสกัด และคำนวณความเข้มข้นของสารสกัดในรูปของ มิลลิกรัมของ Gallic acid สมมูลต่อกรัมของผงหรือน้ำคั้นส้มโอ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

C.2 การวิเคราะห์ปริมาณฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (Total Flavonoids) (ดัดแปลงจาก Rafaela Guimarães และคณะ, 2010) (41)

การทำกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน (+)-Catechin 1000 ppm ใช้ (+)-Catechin 0.01 กรัม นำมาละลายน้ำปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0, 20, 40, 60 และ 100 ppm ในปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$

ปิเปตน้ำคั้นส้มโอ หรือสารละลายน้ำคั้นส้มโอผง (น้ำคั้นส้มโอผง 0.1 กรัมในน้ำ 2 มิลลิลิตร) หรือสารละลายมาตรฐาน (+)-Catechin ความเข้มข้น 20, 40, 60, 100 ppm ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร มาผสมกับน้ำ 2 มิลลิลิตร เพื่อเจือจาง และเติมสารละลาย NaNO_2 เข้มข้น 5% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 6 นาที เติมสารละลาย AlCl_3 เข้มข้น 10% ปริมาตร 0.15 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลาย NaOH เข้มข้น 4% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วเติมน้ำกลั่นทันทีจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที จะเห็นเป็นสีชมพูเข้ม นำมาวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร คำนวณความเข้มข้นในรูปของ มิลลิกรัมของ (+)- catechin สมมูลต่อ กรัมของผงหรือน้ำคั้นส้มโอ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

C.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ด้วยวิธีของ Klein และ Perry, 1986)(42)

การทำกราฟมาตรฐาน โดยเตรียมสารละลายมาตรฐาน L-Ascorbic acid 1000 ppm ใช้ L-Ascorbic acid 0.01 กรัม นำมาละลายใน 1% metaphosphoric acid แล้วปรับปริมาตรให้เท่ากับ 10 มิลลิลิตร นำมาเจือจางให้เป็นสารละลายที่มีความเข้มข้น 0, 6, 10, 20, 40, 60 และ 100 ppm ในปริมาตร 10 มิลลิลิตรโดยใช้สูตร $C_1V_1 = C_2V_2$ ปิเปตสารละลายมาตรฐาน L-Ascorbic ความเข้มข้น 0, 6, 10, 20, 40, 60 และ 100 ppm 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2,6-dichloroindophenol ความเข้มข้น 8.6×10^{-5} โมลาร์ 9 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 30 นาที ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร

ปิเปตน้ำคั้นส้มโอ 1 มิลลิลิตร หรือชั่งน้ำคั้นส้มโอผงประมาณ 150 มิลลิกรัม เติม 1% metaphosphoric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไป Sonicate (Elma, D-78224 Singen / Htw, Germany) 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น Centrifuge (H-1200B, KOKUSAN ENSINKI, TOKYO, JAPAN) นำของเหลวใสปริมาณ 1 มิลลิลิตร ผสมกับ 2,6-dichloroindophenol ความเข้มข้น 8.6×10^{-5} โมลาร์ 9 มิลลิลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงภายใน 30 นาที ที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร คำนวณปริมาณและรายงานผลเป็นหน่วย ไมโครกรัมของ L-Ascorbic acid ต่อ กรัมของผงหรือน้ำคั้นส้มโอ ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

C.4 การวิเคราะห์ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ด้วยวิธี DPPH Scavenging assay (ดัดแปลงจาก Yamasaki และคณะ, 1994)(43)

เตรียมสารละลายมาตรฐาน BHT (Butylhydroxytoluene) ให้มีความเข้มข้น 1,000 ppm โดยชั่ง BHT 10 มิลลิกรัม (0.01 กรัม) ละลายด้วย absolute ethanol 10 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางสารละลาย BHT ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 200, 100, 20, 10, และ 5 ppm

เตรียมสารละลาย DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) ให้มีความเข้มข้น 6×10^{-5} โมลาร์ โดยชั่งน้ำหนัก DPPH 2.4 มิลลิกรัม (0.0024 กรัม) ละลายและปรับปริมาตรเป็น 100 ml ด้วย absolute ethanol เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สารละลายควรเตรียมทันทีก่อนใช้ และสารละลายที่เตรียมแล้วเก็บได้ไม่เกิน 3 วัน)

เตรียมสารละลายของสารตัวอย่างให้มีความเข้มข้น 500, 1000 และ 5000 ppm สำหรับน้ำคั้นส้มโอ และ 500, 1000 และ 3000 ppm สำหรับน้ำคั้นส้มโอผงด้วยน้ำกลั่น

ปิเปตสารละลายน้ำคั้นส้มโอ สารละลายมาตรฐาน แต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง เติมด้วยสารละลาย DPPH 1 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้สารผสมเข้ากันดี ส่วน blank ของสารละลายตัวอย่าง เตรียมโดยปิเปตสารละลายน้ำคั้นส้มโอของแต่ละความเข้มข้น ความเข้มข้นละ 1 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง Control เตรียมโดยปิเปตน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เติมด้วยสารละลาย DPPH 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ส่วน blank ของ control เตรียมโดยปิเปต absolute ethanol 1 มิลลิลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง ตั้งไว้ที่มีด 30 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร สำหรับสารละลายมาตรฐาน BHT ทำเช่นเดียวกัน โดยเปลี่ยนจากสารละลายน้ำคั้นส้มโอเป็นสารละลายมาตรฐาน BHT ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละความเข้มข้นจะทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง คำนวณหา % inhibition จากสูตร

$$\% \text{ inhibition} = \frac{[\text{OD. control} - \text{OD. blank, control}] - [\text{OD. sample} - \text{OD. blank, sample}]}{[\text{OD. control} - \text{OD. blank, control}]} \times 100$$

เมื่อ OD.control	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร
OD.blank, control	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของ absolute ethanol 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร
OD.sample	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 ไมโครลิตร บสารละลาย DPPH 100 ไมโครลิตร
OD.blank, sample	คือ	ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างที่ความเข้มข้นต่างๆ 100 ไมโครลิตร กับน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร

สร้างกราฟระหว่าง % inhibition (แกน Y) กับความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง (แกน X) จากนั้นนำสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาคำนวณโดยให้ $y=50$ จะได้ค่า EC_{50} (Efficient concentration)ซึ่งหมายถึง ความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ไปลดปริมาณอนุมูล DPPH ลง 50%

D. วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ

D.1 การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งที่ละลายได้

นำน้ำคั้นส้มโอนำมาวัดหาปริมาณของแข็งที่ละลายได้ด้วยเครื่อง Refractometer (ATAGO, N-2E, Japan)

D.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้น

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาหาปริมาณความชื้นโดยใช้เครื่องวัดความชื้นอินฟราเรด (IR) (Sartorius, YTC-01L, Germany) ตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง โดยตั้งอุณหภูมิประมาณ 105 – 110 องศาเซลเซียส เปิดเครื่องทิ้งไว้ 30 นาที ซึ่งตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอผงประมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ใส่ถาดอลูมิเนียมฟรอยด์เกลี่ยให้ทั่วเป็นชั้นบางๆ นำตัวอย่างพร้อมถาดไปวางในเครื่องหาความชื้น รอจนเครื่องทำงานเสร็จ อ่านค่าความชื้นจากเครื่องซึ่งรายงานเป็นความชื้นที่สูญเสียไป เมื่อเทียบกับน้ำหนักเปียกของตัวอย่างเป็นร้อยละ หรือน้ำหนักกรัม ทำการวิเคราะห์ซ้ำ 3 ครั้ง

D.3 การวิเคราะห์ปริมาณนาริงจีน โดยใช้เครื่อง HPLC

น้ำคั้นส้มโอผง (0.01mg/5ml) หรือตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอไม่ต้องเจือจาง นำเข้าวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC คอลัมน์ที่ใช้คือ Prodigy 5U ODS3 100R, 250 mm x 4.6 mm, 5µm Mobile Phase ประกอบด้วย A คือ 0.1% Acetic acid และ B คือ Acetonitrile, โดยสภาวะของวิเคราะห์ ดังนี้ เวลา 0 นาที 10.0 %B, เวลา 3 นาที 10.0 %B, เวลา 30 นาที 45.0 %B, เวลา 33 นาที 45.0 %B, เวลา 38 นาที 10.0 %B อัตราการไหลอยู่ที่ 1ml/min เครื่องตรวจวัดสัญญาณ คือ Diode array detector (DAD) ที่ความยาวคลื่น 260 280 และ 320 นาโนเมตร

3. การผ่าตัดและการบันทึกภาพ intravital fluorescent microscopy ของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมอง (cerebral microvessels)

ในวันทำการทดลองสลบหนูด้วยการฉีดเพนโทบาร์บิทัล (sodium pentobarbital) ขนาด 50 mg/kg bw เข้าทางช่องท้อง อาจเสริมขนาดของยาสลบในขณะทำการทดลองเพื่อกันไว้ในภาวะสลบ ตรวจระดับกลูโคสในเลือดจากหลอดเลือดดำที่หาง โดยเครื่อง Glucometer

ทำการเจาะคอและสอดท่อเข้าทางหลอดลม ต่อเข้ากับเครื่องช่วยหายใจชนิด small animal respirator (Harvard apparatus rodent respirator 681)

สอดท่อ polyethylene (PE10) เข้าหลอดเลือดแดง femoral ข้างขวา หล่อด้วยสาร heparin เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือดและต่อท่อเข้ากับ pressure transducer (Nihon TP 300-T) ของเครื่อง polygraph (Nihon RM600) สำหรับบันทึกความดันเลือดแดง (arterial pressure) และสำหรับดูดเลือด นำไปวิเคราะห์หาค่า 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)

สอดท่อ polyethylene (PE10) เข้าหลอดเลือดดำ femoral ข้างขวาเช่นกัน สำหรับเป็นทางให้ยาและสารต่าง ๆ ควบคุมอุณหภูมิของร่างกายหนู ประมาณ $37^\circ C$ โดยการให้หนูนอนบน heating mat จากนั้นทำการผ่าและเลาะกระดูกโหลกศีรษะ (craniotomy) บริเวณ anterior surface ของกระดูกโหลกศีรษะ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 7 mm. บริเวณที่ใช้ electrical drill เลื่อยเอากระดูกโหลกศีรษะออกต้องหยดน้ำเกลือเป็นระยะ ๆ ตลอดการเลื่อยเพื่อป้องกันอันตรายจากความร้อนของการเลื่อย ต่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดของสมอง เมื่อกระดูกโหลกศีรษะส่วน anterior surface ถูกเลื่อยและดึงออก หล่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดสมองส่วนผิว (pial cerebral vessels) ด้วยน้ำสมองเทียม (artificial cerebro spinal fluid; Artificial CSF) ตลอดเวลาที่ทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura จากนั้นทิ้งระยะเวลาให้สัตว์ทดลองปรับภาวะร่างกายให้อยู่ในภาวะสมดุลประมาณ 20 นาที ทำการครอบ cranial window ซึ่งทำด้วยวงแหวน stainless มีรูตรงกลาง บริเวณสมองที่เลาะกระดูกออกและหล่อเนื้อเยื่อสมองด้วยสารน้ำหล่อสมองเทียมตลอดเวลา ขั้นตอนการศึกษา จะแบ่งเป็นขั้นตอนตามวัตถุประสงค์ต่าง ๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ทำการวัดอัตราการไหลเวียนเลือดของสมองบริเวณที่ ครอบ cranial window จำนวน 2 ตำแหน่งเพื่อนำมาหาค่าเฉลี่ย

ขั้นตอนที่ 2 ทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura โดยใช้ forcep ปลายแหลมดึงและเขี่ยขนาดเล็กเบอร์ 27 ตัดเยื่อ dura ออกให้หมด หล่อเนื้อเยื่อและหลอดเลือดสมองส่วนผิว (pial cerebral vessels) ด้วยน้ำสมองเทียม (artificial cerebro spinal fluid; Artificial CSF) ตลอดเวลาที่ทำการเลาะเยื่อหุ้ม dura infuse artificial CSF เข้าไปภายในบริเวณที่ครอบด้วย cranial window ซึ่งมีรูเปิด 3 รู เพื่อ infused artificial CSF เข้าไป และเปิดให้มีทางไหลของสารออก

สู่ภายนอกสมอง โดยใช้ infusion pump ด้วยอัตราการหยด 1 มล/นาที่ หลังจากเตรียมหนูเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมอง (pial cerebral microvessels) แล้วให้นำหนูขึ้นวางบนแท่นของกล้อง fluorescent microscope ใช้เลนส์วัตถุขนาด X20 ที่ต่อเข้ากับกล้องวิดีโอ SIT (Hamamatsu Photonics) สัญญาณจากกล้องวิดีโอต่อเข้ากับ video printer (Sony) เพื่อพิมพ์ภาพที่ต้องการในขณะที่ทำการทดลองและต่อเข้ากับ video recorder (Sony) เพื่อบันทึกการเปลี่ยนแปลงของ cerebral microcirculation ตลอดเวลาทำการทดลองและสุดท้ายภาพการไหลเวียนของเลือด การเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ ของหลอดเลือดในขณะที่ทำการทดลองจะปรากฏบน video monitor (real time) เพื่อศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมเซลล์ของผนังหลอดเลือดดำ postcapillary โดยการฉีดสาร Rhodamine 6-G (R 6-G Sigma) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่เข้าไป labeled ที่เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวที่ถูก labeled จะมีคุณสมบัติในการเรืองแสง เมื่อดูผ่านกล้อง fluorescent ถ้ามีการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนผนังหลอดเลือด จะเห็นได้อย่างชัดเจน บันทึกการเปลี่ยนแปลงลงใน video tape ทั้งก่อนและหลังฉีด R 6-G เป็นเวลา 20 นาที ความเข้มข้นของ RGG คือ 0.03 gm ผสมใน 0.9% normal saline solution 100 ml ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ femoral 0.2-0.3 ml ครึ่งเดียว

ขั้นตอนที่ 3 ทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือด arterioles ต่อสาร acetylcholine 10^{-6} mol /L ที่เป็น endothelium dependent vasodilation

ขั้นตอนที่ 4 เก็บเลือดจากหลอดเลือดดำเพื่อนำไปหาระดับ blood glucose

ขั้นตอนที่ 5 เก็บเนื้อเยื่อสมองส่วน anterior cerebral cortex แบ่งเป็น 2 ส่วน สำหรับนำไปศึกษาการแสดงออกของ ICAM -1 expression และ วัดระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมอง

2. พารามิเตอร์ที่ใช้ศึกษา

2.1 การวัดอัตราการไหลเวียนเลือดที่ผิวสมอง

หลังผ่าตัดเสร็จประมาณ 20 นาที รอให้สัตว์ทดลองอยู่ในภาวะคงที่ ทั้งความดันเลือดแดง และการหายใจ จากนั้นวัดอัตราการไหลของเลือดบริเวณสมองที่ทำการผ่าตัดได้ด้วยเครื่อง laser Doppler flowmeter เป็นบริเวณ 2 ตำแหน่งนำมาหาค่าเฉลี่ย

2.2 การวัดการเกาะติดศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม หลังจากวัดอัตราการไหลเวียนเลือดที่ผิวสมองเสร็จสิ้น นำหนูขึ้นวางบนแท่นของกล้อง fluorescent microscope ใช้เลนส์วัตถุขนาด X20 ที่ต่อเข้ากับกล้องวิดีโอ SIT (Hamamatsu Photonics) สัญญาณจากกล้องวิดีโอต่อเข้ากับ video recorder (Sony) เพื่อบันทึกการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวหลอดเลือดดำ postcapillary ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 20-40 μm โดยการฉีดสาร Rhodamine 6-G (R 6-G Sigma) ซึ่งเป็นสารเรืองแสงที่เข้าไป labeled ที่เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดขาวที่ถูก labeled จะมีคุณสมบัติในการเรืองแสง เมื่อดูผ่านกล้อง fluorescent ถ้ามีการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนผนังหลอดเลือด จะเห็นได้อย่างชัดเจน บันทึกการเปลี่ยนแปลงลงใน video tape ทั้งก่อนและหลังฉีด R 6-G เป็นเวลา 20 นาที ความเข้มข้นของ RGG คือ 0.03 gm ผสมใน 0.9% normal saline solution 100 ml ฉีดเข้าหลอดเลือดดำ femoral 0.2-0.3 ml ฉีดสารเรืองแสง fluorescein isothiocyanate dextran (FITC -dextran) MW 250,000 สารนี้จะไปจับกับโปรตีนใน plasma จะเห็นหลอดเลือดที่ต้องการศึกษาเรืองแสง ซึ่งทำให้สามารถวัดขนาดของหลอดเลือดได้

2.3 การทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดแดง arterioles (vascular reactivity)

หลังจากบันทึกการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวแล้ว ทำการทดสอบการขยายตัวของหลอดเลือดแดงขนาดเล็กที่ผิวสมอง (pial cerebral arterioles) ต่อสารต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilation ได้แก่ acetylcholine ความเข้มข้น 10^{-6} M และสารที่เป็น endothelium independent vasodilation ได้แก่ nitroglycerin 10^{-5} M โดยการ infusion สารดังกล่าวเข้าไปใน window เป็นเวลา 5 นาที จะเห็นการขยายตัวของหลอดเลือดแดง ซึ่งจะเริ่ม

ขยายตัวตั้งแต่นาทีที่ 1 และขยายสูงสุดที่นาทีที่ 3 ทำการบันทึกการเปลี่ยนแปลงขนาดของหลอดเลือดตลอดการศึกษาทั้งก่อน ขณะ และหลังการให้สาร

เมื่อเสร็จสิ้นการศึกษาจะนำภาพที่บันทึกไว้มาวิเคราะห์ผล

2.4 เก็บเลือดจากหนูที่ทำการศึกษาเพื่อนำไปหาพารามิเตอร์ทาง metabolic

หลังจากเสร็จสิ้นการศึกษาทาง intravital fluorescent microscopy จะเก็บเลือดจากการทำ heart puncture 5-10 cc เก็บไว้เพื่อนำไปหาระดับ กลูโคส คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ HbA1c ในพลาสมา

การวัดระดับ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ lipid peroxidation โดยอาศัยหลักการ colorimetrically มีคลื่นการดูดกลืนแสงที่ 530-540 nm ค่าที่คำนวณได้มีหน่วยเป็น μM

3.วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

1. Regional cerebral blood flow อัตราการไหลของเลือดบริเวณผิวสมอง (pial cerebral cortex area) ที่ทำการผ่าตัดไว้ด้วยเครื่อง laser Doppler flowmeter เป็นบริเวณ 2 ตำแหน่ง ตำแหน่งละ 3 ครั้ง นำมาหาค่าเฉลี่ย
2. การวัดขนาดของหลอดเลือดคือการวัด diameter ของหลอดเลือด ซึ่ง labeled ด้วย FITC -dextran จากภาพวิดีโอ โดยอาศัยโปรแกรม Global Image Software ซึ่งจะได้ขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของหลอดเลือด
3. การนับจำนวนการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมเซลล์ ใช้วิธีนับแบบ manual โดยนำวิดีโอเทปที่บันทึกไว้มาวิเคราะห์ผล เม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมได้แก่เม็ดเลือดขาวที่หยุดนิ่งที่ผนังหลอดเลือดดำ postcapillary ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm เป็นเวลา ≥ 30 วินาที ในหลอดเลือดแต่ละเส้นเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนผนังหลอดเลือดจะถูกนับและนำมาแปลงค่าเพื่อนำเสนอข้อมูลเป็นจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติด ต่อความยาวของหลอดเลือด 100 μm .

4. การวิเคราะห์การตอบสนองของหลอดเลือด โดยการวัดขนาดของหลอดเลือดก่อน นาทีที่ 3 ขณะให้สารแต่ละชนิด แล้วนำมาหาร้อยละการเปลี่ยนแปลงขนาดของหลอดเลือดเทียบกับค่าก่อนให้สาร

4.การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

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

วิเคราะห์ข้อมูลเปรียบเทียบ โดยใช้ one-way ANOVA:Post Hoc multiple comparisons และตามด้วย Tukey's analysis โดยกำหนดค่าความน่าจะเป็น (P value) ที่ $P \leq 0.05$

ผลการทดลอง

จากการศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน แบ่ง การศึกษา ออกเป็น 3 ส่วนได้แก่

1. ศึกษาปริมาณฟีนอลิก ชนิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของน้ำคั้นส้มโอ
2. ศึกษาผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการเปลี่ยนแปลงทาง metabolic และ hemodynamics
 - 2.1 พารามิเตอร์การเปลี่ยนแปลงทาง metabolics คือ blood glucose, plasma cholesterol, plasma triglyceride, plasma HbA1C และน้ำหนักตัว
 - 2.2 พารามิเตอร์การเปลี่ยนแปลงทาง hemodynamics ได้แก่ regional cerebral blood flow
3. ศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของเอนโดทีเลียม
 - 3.1 ศึกษาการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary venule
 - 3.2 ศึกษาการตอบสนองของหลอดเลือดแดงเล็กที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilators
4. ศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำคั้นส้มโอ

ผลการทดลอง

1. ศึกษาเปอร์เซ็นต์น้ำหนัก (Weight percent), องค์ประกอบและคุณสมบัติพื้นฐานของส้มโอ

ตารางที่ 1 แสดงส่วนประกอบของส้มโอพันธุ์ทองดี เปลือกส้มโอคิดเป็น 51.09 %, กากส้มโอคิดเป็น 8.28 % และน้ำคั้นส้มโอคิดเป็น 40.63 % โดยส้มโอพันธุ์ทองดีที่ใช้วิเคราะห์มี pH เท่ากับ 4.81 และมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 11.6 °Brix เมื่อคิดเป็นร้อยละผลผลิตของน้ำคั้นส้มโอที่ได้จากเนื้อส้มโอ คิดเป็น 83.06 % เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าส้มโอ มีปริมาณฟีนอลิกทั้งหมด 123.03 ± 0.87 mgGAE/100g ของเนื้อ มีปริมาณนาริงจีน 16.08 ± 0.51 mg/100g ของเนื้อ มีปริมาณกรดแอสคอร์บิก 2.37 ± 0.10 mg/100g ของเนื้อ และค่า EC_{50} 1839.01 ± 61.68 mg/100 mL (ดังตารางที่ 2) เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในส้มโอทองดีโดยเปรียบเทียบกับสารนาริงจีนและเฮสเพอริดิน พบว่า ส้มโอทองดีประกอบด้วยนาริงจีนเป็นหลัก (รูปที่ 1 และ 2)

ตาราง 1 เปอร์เซนต์น้ำหนัก, pH และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix) ของส้มโอพันธุ์ทองดี

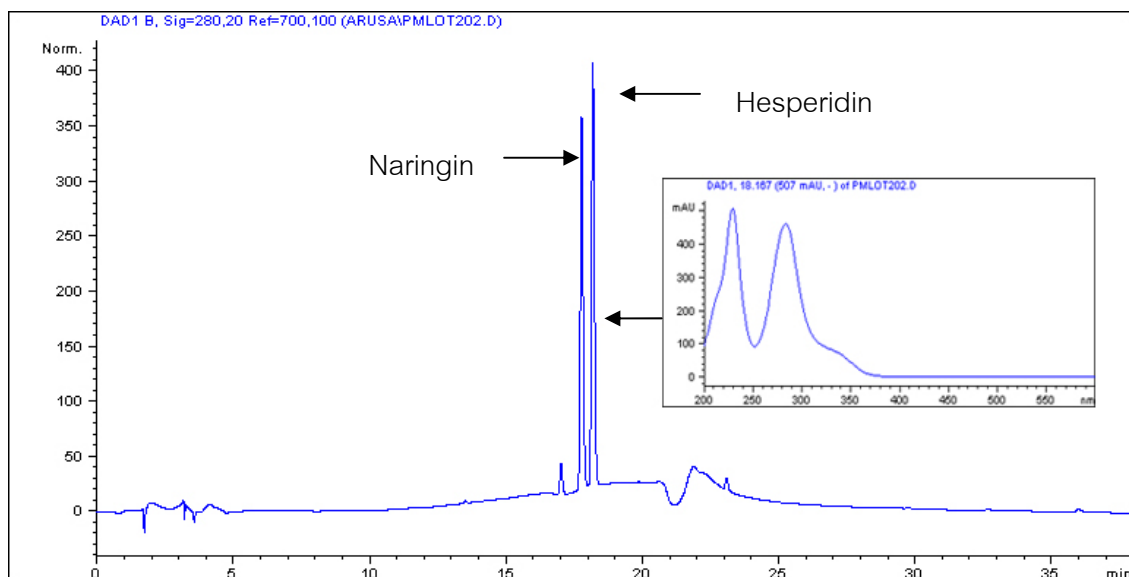
% เปลือกส้มโอ	51.09
% กากส้มโอ	8.28
% น้ำคั้นส้มโอ	40.63
pH	4.81
ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (°Brix)	11.6
ร้อยละผลผลิต (จากเนื้อส้มโอ)	83.06

ตาราง 2 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอพันธุ์ทองดี

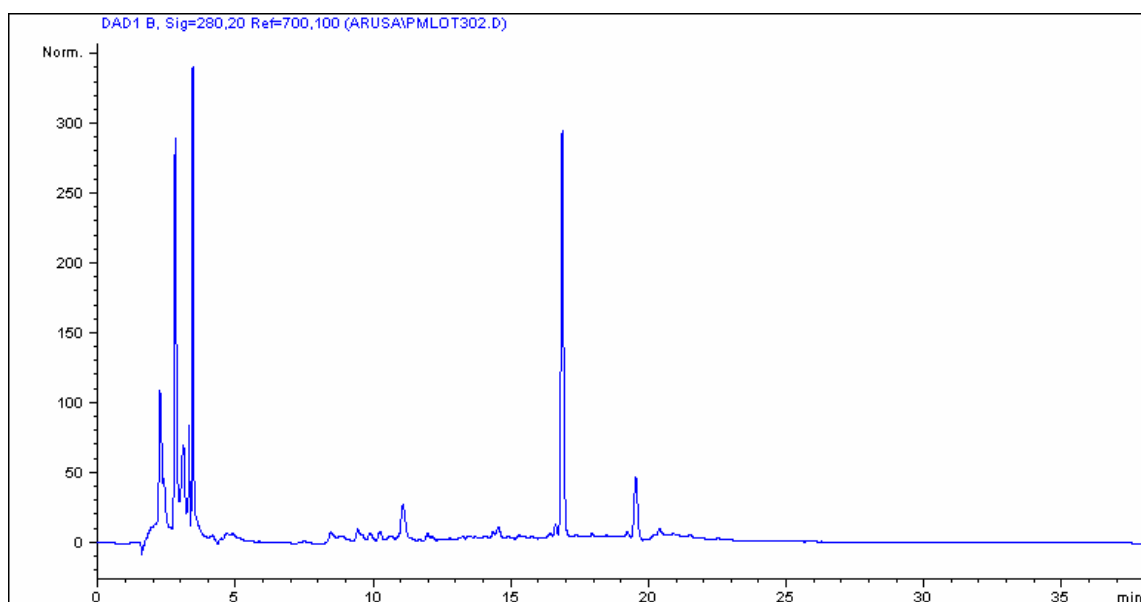
ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	
ฟีนอลิกทั้งหมด (mgGAE/100g ของเนื้อ)	123.03 ± 0.87
ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (mgCE/100g ของเนื้อ)	2.72 ± 0.23
นาริงจีน (mg/100g ของเนื้อ)	16.08 ± 0.51
กรดแอสคอร์บิก (mg/100g ของเนื้อ)	2.37 ± 0.10
EC_{50} (mg/100 mL)	1839.01 ± 61.68

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่า EC_{50} หมายถึงปริมาณความเข้มข้นของสารที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง



รูป 1 โครมาโตแกรม HPLC ของเฮสเพอริดินและนาริงจิน จากสารมาตรฐาน, UV detection ที่ 280 nm.



รูป 2 โครมาโตแกรม HPLC ของนาริงจิน จากน้ำคั้นส้มโอ, ใช้ UV detection ที่ 280 nm.

2. ศึกษาผลกระทบของการทำแห้งต่อคุณภาพน้ำคั้นส้มโอผง

ในกระบวนการแปรรูปน้ำคั้นส้มโอผงจะใช้เทคนิคการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze dry) และเทคนิคการทำแห้งด้วยเครื่องอบแห้งแบบพ่นกระจาย (Spray dry) ในระดับห้องปฏิบัติการโดยกำลังการผลิตวิธี Spray dry มีอัตราการป้อน (Feeding rate) น้ำคั้นส้มโอ 1333.33 ml / Hour ซึ่งพบว่าน้ำคั้นส้มโอผงวิธี Freeze dry มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 6.71 % และมีปริมาณความชื้นสูงสุดคือ 6.47 ± 0.69 % , วิธี Spray dry มีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 1.68 % และมีปริมาณความชื้นสูงสุดคือ 4.43 ± 0.13 % ลักษณะทางกายภาพของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปทั้ง 2 วิธี แสดงในรูปที่ 3-5 ซึ่งลักษณะปรากฏของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry ซึ่งมีสีเหลืองอมส้ม ขนาดอนุภาคค่อนข้างใหญ่ และมีการเกาะตัวเป็นก้อน ลักษณะปรากฏของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Spray dry พบว่า มีสีเหลืองขาว นอกจากนั้น ยังมี ซึ่งเป็นน้ำคั้นส้มโอผงที่ค้างอยู่ในตัวเครื่อง Spray dryer

(บริเวณท่อ) โดยลักษณะของผงมีสีส้ม คล้ายกับน้ำคั้นส้มโผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry ซึ่งมีร้อยละของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 8.95 % และมีปริมาณความชื้นสูงสุดคือ 4.25 ± 0.13 %



รูป 3 น้ำคั้นส้มโผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry



รูป 4 น้ำคั้นส้มโผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Spray dry



รูป 5 น้ำคั้นส้มโผงสีส้มที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Spray dry

2.2 เปรียบเทียบคุณสมบัติของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านการแปรรูปในห้องปฏิบัติการ

น้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry และ วิธี Spray dry นอกจากจะมีลักษณะทางกายภาพที่แตกต่างกันแล้ว มีปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ดังตารางที่ 3 ผงน้ำคั้นส้มโอสีส้มจาก Spray Dryer มีปริมาณฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ทั้งหมดและนาริงจินสูงกว่า Spray Dryer และมีปริมาณร้อยละผลผลิตสูงกว่า เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในตัวอย่งน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปทั้ง 2 วิธี ได้แก่ วิธี Freeze dry, และ วิธี Spray dry (ตารางที่ 4) พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า EC_{50} กับปริมาณนาริงจินมีความสัมพันธ์สูง ($r = -0.968$) ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้าม กล่าวคือเมื่อปริมาณนาริงจินสูงขึ้น จะส่งผลให้ค่า EC_{50} ต่ำลง ซึ่งหมายถึง มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น (ค่า EC_{50} หมายถึง ปริมาณความเข้มข้นของสารที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง) โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ กับ สารประกอบฟีนอลิก ขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น โครงสร้างทางเคมีของแต่ละองค์ประกอบ, การทำปฏิกิริยาร่วมกัน และสภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ นอกจากนี้การจับอนุมูลอิสระ DPPH ของสารประกอบฟีนอลิก ขึ้นกับจำนวนหลักของกลุ่ม hydroxyl ที่มีอยู่ในโมเลกุล และความสามารถในการให้อิเล็กตรอน (ตัวรีดิวซ์) (Rapisarda et al., 2008)

ตาราง 3 ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ($\mu\text{g/g}$ ของผง) ของน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยวิธี Freeze dry, วิธี Spray dry

ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	ตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอผง		
	Freeze dry	Spray dry (สีขาว)	Spray dry (สีส้ม)
ฟีนอลิกทั้งหมด ($\mu\text{gGAE/g}$ ของผง)	$5676.77^b \pm 340.83$	$5264.58^c \pm 17.65$	$6479.94^a \pm 14.26$
ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ($\mu\text{gCE/g}$ ของผง)	$129.38^c \pm 5.67$	$595.11^b \pm 16.56$	$769.86^a \pm 51.35$
นาริงจิน ($\mu\text{g/g}$ ของผง)	$3769.20^c \pm 126.18$	$4347.85^b \pm 20.28$	$4434.67^a \pm 8.08$
กรดแอสคอร์บิก ($\mu\text{g/g}$ ของผง)	$3275.63^a \pm 177.54$	$2183.16^c \pm 135.53$	$2338.49^b \pm 70.08$
EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	$2587.40^a \pm 24.41$	$1503.16^b \pm 9.77$	$948.08^c \pm 28.42$

หมายเหตุ : ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าในแถวเดียวกันสำหรับน้ำคั้นส้มโอผงที่ผ่านกระบวนการแปรรูปแต่ละวิธี มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

ค่า EC_{50} หมายถึงปริมาณความเข้มข้นของสารที่มีความสามารถในการกำจัดสารอนุมูลอิสระได้ครึ่งหนึ่ง

ในการศึกษาครั้งนี้เลือกผลผลิตจากน้ำคั้นส้มโอที่แปรรูปโดยวิธี *Spray dry* ที่ได้ผงน้ำคั้นส้มโอสีส้ม เนื่องจากให้สารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมด ฟลาโวนอยด์ทั้งหมด นาวิจลิน กรดแอสคอร์บิก ในปริมาณที่สูงกว่าวิธีอื่น และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีกว่า

การเปลี่ยนแปลงทาง Metabolic

ผลของผงน้ำคั้นส้มโอขนาด 10 มก/กก นน. ตัว ในหนูควบคุมปกติไม่มีผลเปลี่ยนแปลงค่า พารามิเตอร์ทั้งหมดที่ศึกษา

ผลต่อ blood glucose , glycosylated hemoglobin (HbA1C), Plasma cholesterol และ triglyceride

หลังจากที่หนูได้รับการฉีด STZ ไปแล้ว 72 ชั่วโมง เพื่อเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน พบว่าระดับ blood glucose สูงขึ้น ≥ 350 mg/dl และมีอาการแสดงร่วมคือกินน้ำมาก (polydipsia) กินอาหารมาก (polyphagia) และปัสสาวะมาก (polyuria) รวมทั้งมีน้ำหนักลดลง โดยระดับกลูโคสในเลือดที่สูงขึ้นและอาการแสดงดังกล่าวจะคงอยู่ตลอดระยะเวลาของการทดลอง

หลังจากหนูทดลองได้รับการฉีด streptozotocin แล้ว 8 สัปดาห์ จะเกิดภาวะกลูโคสในเลือดสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับหนูควบคุมที่อายุเดียวกัน เช่นเดียวกับค่า glycosylated hemoglobin (HbA1C) ซึ่งเป็นดัชนีที่บ่งบอกถึงการมีระดับกลูโคสในเลือดสูงเป็นระยะเวลานาน มีค่าที่สูงในหนูกลุ่มเบาหวานเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ทำการศึกษา นอกจากนี้ระดับ cholesterol และ triglyceride ในเลือดของหนูเบาหวานจะสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตาราง 6 และ 7

จากการศึกษาผลของน้ำคั้นส้มโอขนาดความเข้มข้น 10 มก./กก นน.ตัว ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์ ต่อการเปลี่ยนแปลงทาง metabolic ได้ผลที่น่าสนใจยิ่งได้แก่ ระดับกลูโคสในเลือด , plasma cholesterol และ triglyceride ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ ดังแสดงในตารางที่ 4 - 7 และรูปที่ 8 - 9

ตาราง 4. การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษาใน หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

	สัปดาห์ที่ 1 หลังฉีดสาร STZ	สัปดาห์ที่ 2 หลังฉีด STZ & ป้อน น้ำคั้น ส้มโอ	สัปดาห์ที่ 4 หลังฉีด STZ & ป้อนน้ำคั้น ส้มโอ	สัปดาห์ที่ 6 หลังฉีด STZ & ป้อน น้ำคั้น ส้มโอ	สัปดาห์ที่ 8 หลัง ฉีด STZ & ป้อน น้ำคั้นส้มโอ
STZ-PM group	415.00±21.65	405.00±17.78	389.25±20.84	374.50±16.86	353.00±16.21 ⁺⁺⁺
	สัปดาห์ที่ 1 หลังฉีดสาร STZ	สัปดาห์ที่ 2 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 4 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 6 หลังฉีด STZ	สัปดาห์ที่ 8 หลังฉีด STZ
STZ-group	350.00±14.42	351.30±14.05	349.70±9.61	352.70±9.02	350.00±10.00

ค่าในตารางแสดงเป็น mean ±SEM

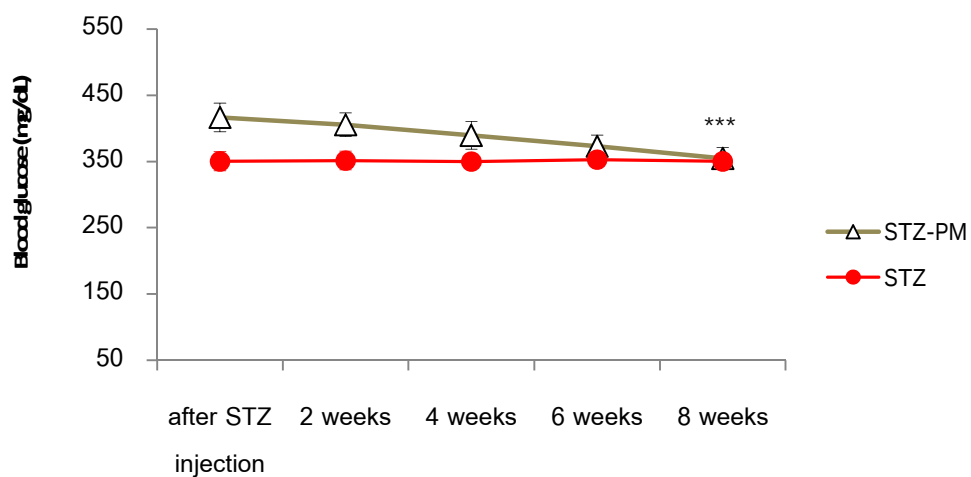
⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 หลังฉีดสาร STZ

ตาราง 5. การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษาในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

	Day ที่1	สัปดาห์ที่ 4 หลัง ป้อนน้ำคั้นส้มโอ	สัปดาห์ที่ 8 หลัง ป้อนน้ำคั้นส้มโอ
CON-PM group	100.00±5.10	99.80±1.48	94.60±3.05
	Day ที่1	สัปดาห์ที่ 4 หลัง กิน น้ำเปล่า	สัปดาห์ที่ 8 หลัง กิน น้ำเปล่า
CON-group	105.6±6.54	103.6±5.18	107.6±5.77

ค่าในตารางแสดงเป็น mean ±SEM

รูป 6. การเปลี่ยนแปลงระดับกลูโคสในเลือดในช่วงเวลา 8 สัปดาห์ที่ทำการศึกษา ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) บ่อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

ค่าสถิติที่ปรากฏในกราฟเปรียบเทียบในกลุ่ม STZ-PM ในสัปดาห์ที่ 8 เปรียบเทียบกับช่วงเวลาหลังฉีด STZ

***p < 0.001 เมื่อเทียบกับสัปดาห์ที่ 1 หลังฉีดสาร STZ

ตาราง 6. แสดงระดับระดับไกลโคไซด์ฮีโมโกลบินในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) บ่อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

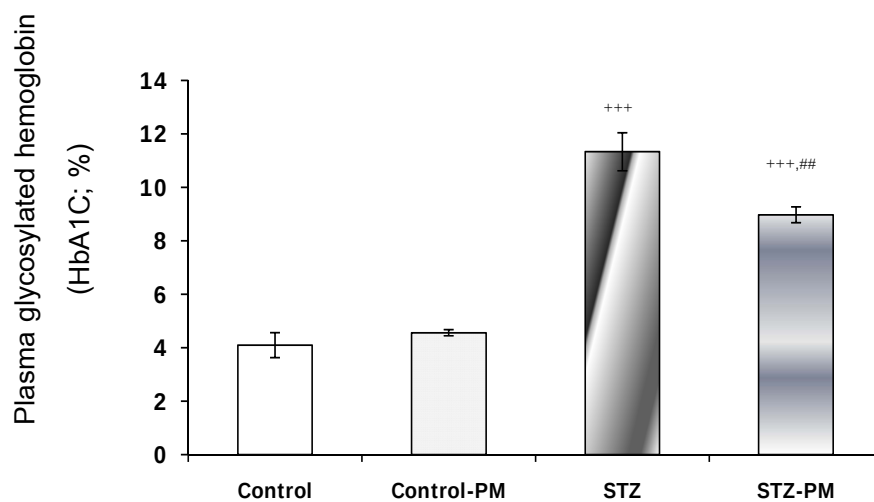
Plasma glycosylated hemoglobin (HbA1C; %)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
4.12±0.47	4.56±0.11	11.33±0.71 ⁺⁺⁺	8.97±0.30 ^{+++,#}

ค่าในตารางแสดงเป็น mean ±SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{##} p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

รูป 7. แสดงระดับระดับไกลโคไซด์ฮีโมโกลบินในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) บ่อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean ±SEM.

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{##} p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 7. แสดงระดับคอเลสเตอรอล ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Plasma cholesterol (mg/dL)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
46.0±3.42	52.20±1.49	91.0±7.2 ⁺⁺⁺	72.0±5.5 ^{++,#}

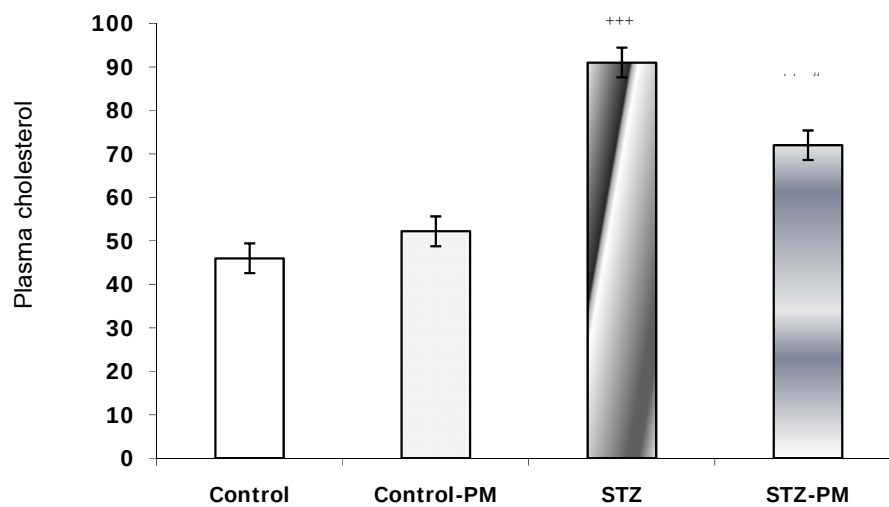
ค่าในตารางแสดงเป็น mean ±SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

⁺⁺ p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

[#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

รูป 8. แสดงระดับคอเลสเตอรอล ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean ±SEM.

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

⁺⁺ p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

[#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ตาราง 8. แสดงไตรกลีเซอไรด์ในเลือด ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Plasma triglyceride (mg/dL)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
136.0±7.90	120.40±17.09	298.33±50.84 ⁺⁺⁺	173.25±22.17 ^{ns,#}

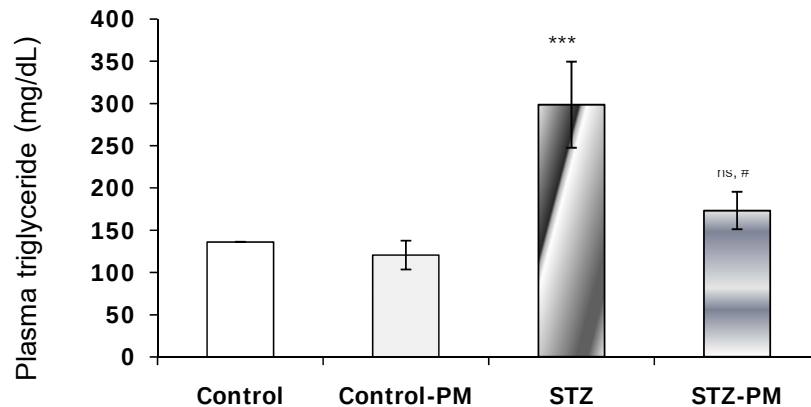
ค่าในตารางแสดงเป็น mean ±SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

[#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

รูป 9. แสดงระดับไตรกลีเซอไรด์ ในเลือดในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean ±SEM.

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

[#] p < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

การเปลี่ยนแปลงทาง Hemodynamics

อัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง (regional cerebral blood flow; rCBF) มีค่าต่ำในหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและที่น่าสนใจยิ่งได้แก่ การให้น้ำคั้นส้มโอในหนูเบาหวานสามารถป้องกันการลดลงของอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองได้ (rCBF ; หนูควบคุม = 237.18 ± 4.21 , หนูควบคุมที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ = 243.8 ± 2.03 , หนูเบาหวาน = 192.53 ± 8.94 , หนูเบาหวานที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ = 224.29 ± 3.51)

ตาราง 9. แสดงอัตราเฉลี่ยการไหลเวียนเลือดที่สมอง ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับผงน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก เป็นเวลา 8 สัปดาห์

Regional cerebral blood flow (Arbitrary unit)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
237.18 ± 4.21	243.80 ± 2.03	$192.53 \pm 8.94^{+++}$	$224.29 \pm 3.51^{ns,##}$

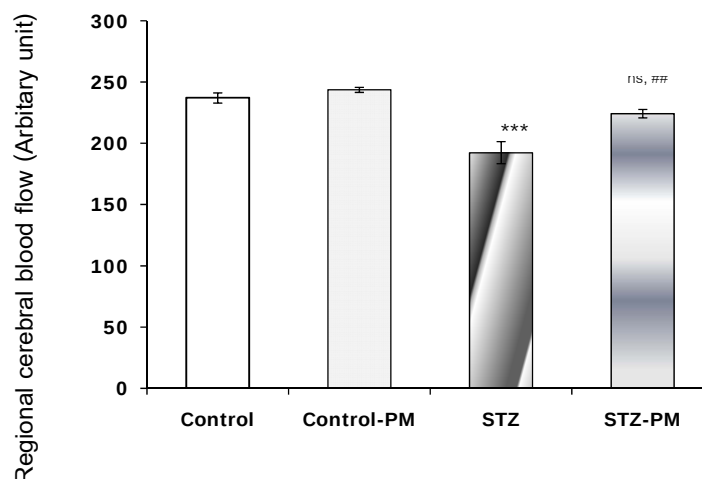
ค่าในตารางแสดงเป็น mean $\pm$ SEM .

$+++$ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

$##$ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

รูป 10. แสดงอัตราเฉลี่ยการไหลเวียนเลือดที่สมอง ของในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean $\pm$ SEM. .

$+++$ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

$##$ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

ศึกษาผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการทำงานของเอนโดทีเลียม

ในการศึกษาครั้งนี้ parameters ที่ใช้บ่งชี้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมได้แก่

1. การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary venule
2. การตอบสนองของหลอดเลือดแดงเล็กที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilator

การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary venule

ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว (leukocyte adhesion; LA) บนเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm การเกาะติดของเม็ดเลือดขาวในกลุ่มเบาหวานมีค่าสูงกว่าในกลุ่มควบคุมมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอพบว่าการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวมีค่าต่ำกว่าในกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ

การตอบสนองของหลอดเลือดแดงเล็กที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilators

การตอบสนองของหลอดเลือดที่ผิวสมองต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation สารที่ใช้เป็น endothelium dependent ในการศึกษานี้ได้แก่ acetylcholine (ACh) ขนาดความเข้มข้น 10^{-6} M จากผลการศึกษาพบว่าหลอดเลือดแดง arterioles (เส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 μm) ในหนูเบาหวานมีการขยายตัวเมื่อได้รับสาร ACh น้อยกว่าหนูควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้ง 2 ช่วงอายุแสดงว่ามีความบกพร่องในการขยายตัวเมื่อได้รับสาร endothelium dependent และในกลุ่มที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอพบว่าสามารถป้องกันความบกพร่องในการขยายตัวเมื่อได้รับสาร endothelium dependent ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่เป็น endothelium independent (nitroglycerin; NTG) พบว่าไม่มีความแตกต่างในการตอบสนองต่อสาร NTG 10^{-5} mol/L

จากการศึกษาในส่วนการทดสอบการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม พบว่าหนูเบาหวานมีความผิดปกติอยู่ที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียมและการให้น้ำคั้นส้มโอเป็นระยะเวลานานสามารถป้องกันความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตาราง 10. จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm) ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Leukocyte adhesion (cell/100 μm length of venule)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
1.32 ± 0.39	0.87 ± 0.01	$5.94 \pm 1.63^{+++}$	$1.57 \pm 3.51^{\text{ns}, \#\#}$

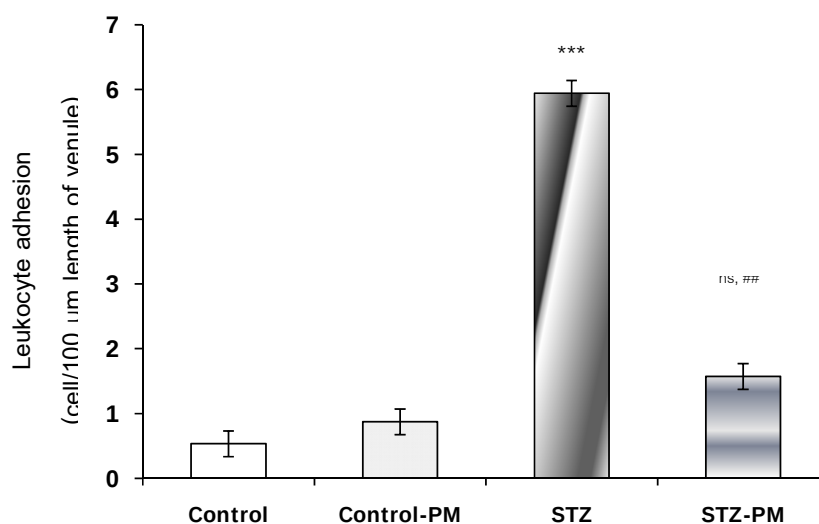
ค่าในตารางแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

$+++$ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

$\#\#$ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

รูป 11. จำนวนเม็ดเลือดขาวที่เกาะติดบนเอนโดทีเลียมในหลอดเลือดดำ postcapillary (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm) ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

$+++$ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

$\#\#$ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

ตาราง 11. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับผงน้ำตาลคันส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับผงน้ำตาลคันส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปาก

Acetylcholine (percent change from baseline)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
58.87 $\pm$ 2.62	55.34 $\pm$ 2.31 ^{ns}	22.93 $\pm$ 1.50 ⁺⁺⁺	38.59 $\pm$ 1.71 ^{ns,##}

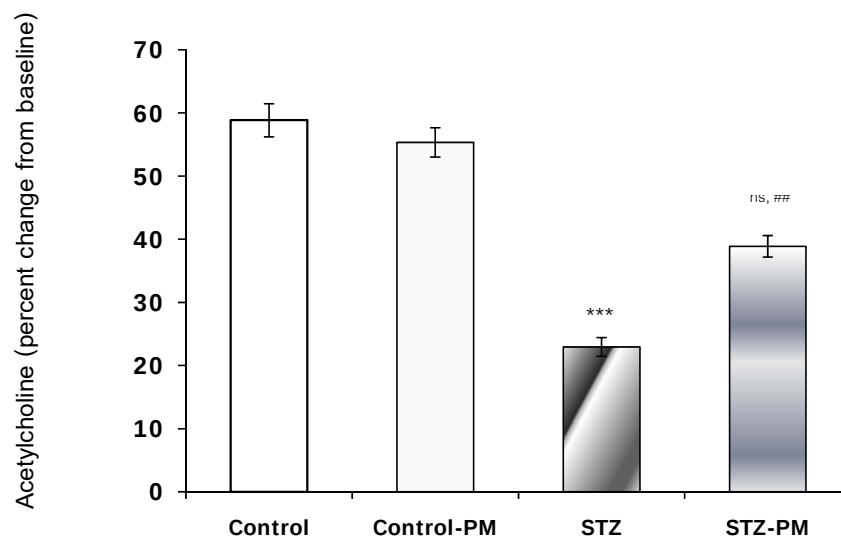
ค่าในตารางแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{##} p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

รูป 12. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Acetylcholine 10^{-6} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำตาลคันส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนู เบาหวาน ที่ได้รับน้ำตาลคันส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{##} p < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

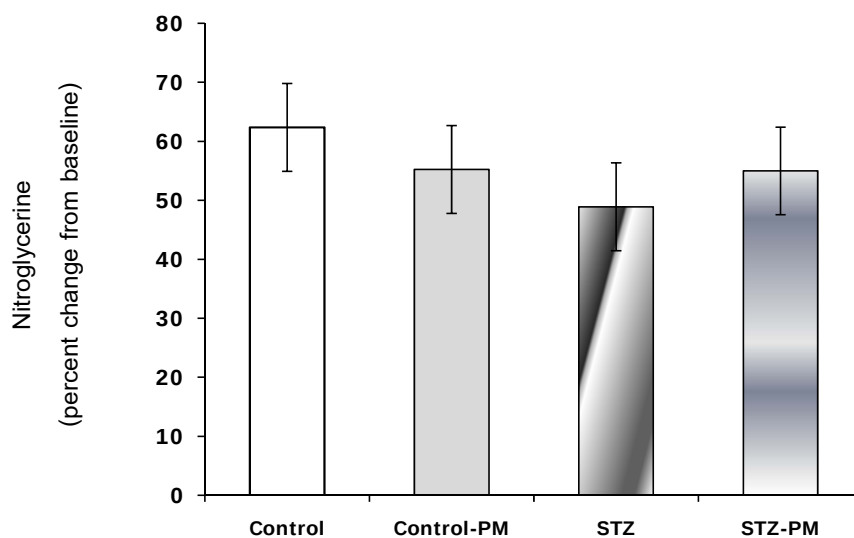
ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

ตาราง 12. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerin 10^{-5} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Nitroglycerin (percent change from baseline)			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
62.34 $\pm$ 7.4	55.21 $\pm$ 3.85	48.88 $\pm$ 5.08	54.96 $\pm$ 1.48

ค่าในตารางแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

รูป 13. ร้อยละการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองขนาด 20-40 μm ต่อสาร Nitroglycerin 10^{-5} mol/L ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในกราฟแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

ศึกษาผลของผงน้ำคั้นส้มโอต่อ ระดับ lipid peroxidation

วัดระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูที่เป็นเบาหวานพบระดับ malondialdehyde ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา lipid peroxidation ใน cerebral cortex มีระดับที่สูงกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และกลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนด้วยผงน้ำคั้นส้มโอ จะมีระดับ malondialdehyde ลดต่ำลง เมื่อเทียบกับหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ

ตาราง 13. ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์

Malondyaldehyde μ M/25 mg brain tissue weight			
CON	CON-PM	STZ	STZ-PM
6.07 $\pm$ 0.39	6.24 $\pm$ 0.68	13.11 $\pm$ 1.07 ⁺⁺⁺	6.22 $\pm$ 0.11 ^{ns,###}

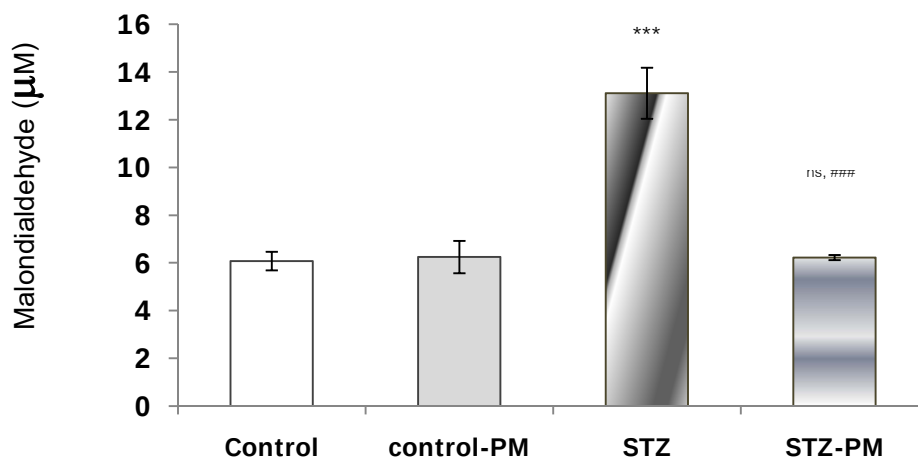
ค่าในตารางแสดงเป็น mean $\pm$ SEM

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{###} p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

รูป 14. ระดับ malondialdehyde ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cerl cortex ในหนูปกติ (CON) หนูปกติที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (CON-PM), หนูเบาหวาน (STZ) และหนูเบาหวาน ที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ (STZ-PM) ป้อนทางปากเป็นเวลา 8 สัปดาห์



ค่าในก

⁺⁺⁺ p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ

^{###} p < 0.001 เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน

ns ; ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับปกติ

สรุปและอภิปรายผล

การศึกษานี้ได้ผลการศึกษาที่สำคัญได้แก่การให้น้ำคั้นส้มโอป้องกันทางปากเป็นระยะเวลานาน

1. ปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอพันธุ์ทองดีที่นำมาคั้นพบว่ามีสารฟลาโวนอยด์ในปริมาณที่สูง
2. ลดระดับกลูโคส ระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวาน
3. ป้องกันการลดลงของอัตราการไหลเวียนเลือดในสมองในหนูที่เป็นเบาหวาน
4. ป้องกันการทำงานที่บกพร่องของเซลล์เอนโดทีเลียมในภาวะเบาหวาน
5. ลดระดับอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมอง

การวิเคราะห์หาปริมาณสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของส้มโอพันธุ์ทองดี

จากการวิเคราะห์ชนิดของสารประกอบฟีนอลิกในส้มโอทองดีโดยเปรียบเทียบกับสารนาริงจีนและเฮสเพอริดินมาตรฐาน พบว่าส้มโอทองดีประกอบด้วยสารฟลาโวนอยด์ชนิดที่เป็นนาริงจีนเป็นหลัก ซึ่งการศึกษานี้ให้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาของ เสาวภา และคณะ ซึ่งทำการค้นคว้างานวิจัยและแสดงไว้ว่าส้มโอในประเทศไทยมีสารฟลาโวนอยด์ประกอบอยู่และชนิดที่พบในส้มโอไทยได้แก่ naringin, narirutin, eriocitin และ neoeriocitrin โดยพบ naringin ในปริมาณที่มากกว่าฟลาโวนอยด์ตัวอื่น ได้แก่ 13-85 mg/100g fresh weight ของเนื้อส้มโอ โดยพันธุ์ทองดีจะมี naringin ประมาณ 36.40 mg/100g fresh weight ของเนื้อส้มโอ(44)

ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการเปลี่ยนแปลงทาง metabolic

การศึกษาของพบว่าระดับกลูโคสในเลือดที่สูงเป็นระยะเวลานานในโรคเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษาโดยยีนยันได้จากระดับ glycosylated hemoglobin (HbA1C) ที่สูงขึ้นแสดงให้เห็นความรุนแรงของโรคที่สูงขึ้นตามระยะเวลาที่เป็นเบาหวาน ในขณะที่เดียวกันยังพบการเพิ่มขึ้นของคอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดตามระยะเวลาที่เป็นเบาหวานเช่นเดียวกัน จากผลของการป้องกันสารน้ำคั้นส้มโอเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ในหนูที่เป็นเบาหวานพบว่าระดับกลูโคส คอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวาน แม้ว่าน้ำคั้นส้มโอจะมีฤทธิ์ลดระดับกลูโคสในเลือดแต่ก็ไม่สามารถที่จะปรับระดับกลูโคสให้กลับสู่ระดับปกติได้ในหนูเบาหวานที่ได้รับการป้องกันด้วยน้ำคั้นส้มโอซึ่งกล่าวได้ว่าน้ำคั้นส้มโอมีฤทธิ์เป็น mild hypoglycemic agent โดยการศึกษาในปัจจุบันได้ผลการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาของ Oyedepo (2012) ซึ่งทำการศึกษาโดยป้องกันน้ำคั้นจากส้มโอให้หนูเบาหวานกิน เป็นเวลา 22 วัน พบระดับกลูโคส คอเลสเตอรอล ลดลงเมื่อเทียบกับหนูเบาหวานที่อายุเดียวกัน (45) การศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ทำการศึกษาในหนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานโดยสาร STZ ที่มีฤทธิ์ทำลาย β -cell ของตับอ่อน โดยสาร STZ จะถูกนำไปสู่ β -cell ผ่านทาง glucose transporter protein (GLUT2) ทำให้ β -cell ของตับอ่อนสร้างและหลั่งอินซูลินลดลง) จากรายงานการศึกษาจำนวนหนึ่งซึ่งศึกษาฤทธิ์ของสาร streptozotocin (STZ) ในการชักนำสัตว์ทดลองให้เป็นเบาหวานโดยการทำลาย β -cell ของตับอ่อนโดยการทำให้เกิด สารอนุมูลอิสระไปทำลาย DNA ของเซลล์เกิด cell necrosis และ apoptosis พบว่า STZ ที่ขนาดสูงประมาณ 165mg/Kg bw จะทำลาย beta cell mass ได้ถึง 80 % ยังคงมี β -cell mass ที่ไม่ถูกทำลายประมาณ 20 % นอกจากนั้นการศึกษาของ Simsec และคณะ(2012)ได้ฉีดสาร melatonin ให้แก่หนูขาวที่ได้รับการชักนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร STZ ไปแล้ว 14 วัน พบว่า มี insulin positive cell เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับ melatonin และลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ด้วย โดยผ่านกลไก antioxidant และ anti-apoptosis สำหรับการศึกษานี้แม้จะได้หาระดับ insulin ในเลือด แต่พบว่าระดับ blood glucose ในหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอมีค่าลดลง จากความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการใช้สารหรือยาเพื่อลด blood glucose โดยทั่วไปนั้นสารหรือยานั้น จะมีฤทธิ์เหมือน insulin ในการศึกษาของผู้วิจัยในครั้งนี้ใช้สาร STZ ที่ขนาดไม่สูงใน

การชักนำหนูให้เป็นเบาหวานจึงน่าจะมี β -cell mass ที่ไม่ถูกทำลายจากสาร STZ คงเหลืออยู่มากกว่า 20% เมื่อให้น้ำคั้นส้มโอซึ่งมีสารสำคัญหลายชนิดที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ เช่น flavonoid, vitamin C และ naringin เป็นระยะเวลานานอย่างต่อเนื่อง จึงมีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ มีผลฟื้นฟูสภาพเซลล์โดยเฉพาะ cell membrane ให้สามารถทำงานได้ดีขึ้น เช่นเดียวกัน β -cell ของตับอ่อนที่เหลืออยู่ก็จะสามารถทำงานได้มีการหลั่งอินซูลินได้มากขึ้น สามารถนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์ได้มากขึ้น ระดับกลูโคสในเลือดก็มีค่าลดลง (46-47) การศึกษาของผู้วิจัยและคณะแสดงให้เห็นว่านอกจากระดับกลูโคสที่ลดลงแล้ว ระดับคอเลสเตอรอล และ ไตรกลีเซอไรด์ก็มีค่าลดลงในหนูเบาหวานที่ได้รับน้ำคั้นส้มโอ การศึกษาโดย Jung และคณะ (2005) แสดงให้เห็นว่า naringin ในผลส้มมีฤทธิ์ในการลด plasma และ hepatic cholesterol ในหนูเบาหวานโดยการทำงานผ่านการลดการทำงานของ hepatic 3- hydroxyl-3-methylglutaryl-coenzyme (HMG-CoA) reductase และเพิ่มการขับถ่าย cholesterol ออกจากอุจจาระ (48) ซึ่งการศึกษาของผู้วิจัยพบว่าในน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทองดีมี นารินจีนและ vitamin C เป็นหลัก เชื่อว่าหนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนด้วยน้ำคั้นส้มโอมีค่า metabolic ที่ลดลงส่วนหนึ่งเป็นผลมาจาก naringin และ vitamin C

ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการลดระดับสารอนุมูลอิสระ

ระดับกลูโคสในเลือดสูงร่วมกับภาวะ คอเลสเตอรอล และไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ทั้ง 3 ปัจจัยนี้ เป็นตัวก่อให้เกิดระดับอนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นมากในภาวะเบาหวาน โดยยืนยันได้จากผลการศึกษาในปัจจุบันที่พบว่าระดับ malondialdehyde ที่เป็นผลิตภัณฑ์ของกระบวนการ lipid peroxidation ในเนื้อเยื่อสมองส่วน cortex ของหนูเบาหวานมีระดับสูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการให้น้ำคั้นส้มโอ พบว่าน้ำคั้นส้มโอสามารถลดระดับ lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของน้ำคั้นส้มโอ Pichaiyongvongdee และคณะ (2009) รายงานการวิจัยไว้ว่าส้มโอพันธุ์ทองดีมีสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้แก่ vitamin C, total phenolic, และ naringin เป็นหลัก และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระโดยสามารถจับกับอนุมูลอิสระ DPPH (49)

ผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการป้องกันความบกพร่องในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียม

การศึกษาทั้งในปัจจุบันและที่ผ่านมาซึ่งข้อมูลความรู้ที่พอสรุปได้ถึงปัจจัยที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือด (vascular complication) ในภาวะเบาหวานได้แก่ ภาวะ hyperglycemia และ ภาวะ hyperlipidemia ปัจจัยทั้ง 2 มีบทบาทสำคัญทำให้การทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมสูญเสียหน้าที่ในการทำงานที่เรียกว่า endothelial dysfunction ปัจจัยที่ชี้ชัดว่าเกิด endothelial dysfunction ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วไป ได้แก่

1. การเกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators
2. มีปริมาณการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเอนโดทีเลียมมากขึ้นผิดปกติ (50-51) ในปัจจุบันเชื่อว่าสาเหตุของการเกิด endothelial dysfunction ในภาวะเบาหวานที่สำคัญ คือ การมีปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการเสียสมดุลระหว่างระบบต้านอนุมูลอิสระและอนุมูลอิสระในร่างกาย การที่ระดับกลูโคสในเลือดสูงจะทำให้สารต้านอนุมูลอิสระลดลงและเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น อันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลายกระบวนการ อันได้แก่ การเกิด glucose autooxidation จากกระบวนการทาง polyol pathway และ protein glycation เป็นต้น นอกเหนือจากนั้นความผิดปกติใน metabolism ของไขมัน (dyslipidemia) จากภาวะเบาหวานก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ปริมาณอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้ (52-53)

แม้ว่าระดับกลูโคสในเลือดที่สูงกว่าปกติจะเป็นสาเหตุหลักที่สำคัญในการก่อให้เกิด endothelial dysfunction แต่ในเบาหวานที่ควบคุมระดับกลูโคสในเลือดไม่ดีพอพบว่าจะมีความผิดปกติใน metabolism ของไขมันเกิดขึ้น ซึ่งได้แก่

การมีระดับ cholesterol และ triglyceride สูงในเลือด และระดับ high density lipoprotein (HDL) จะต่ำลง เป็นที่ทราบกันดีว่า cholesterol ในพลาสมา ร้อยละ 60-70 จะถูกขนส่งโดย low-density lipoprotein (LDL) เมื่อระดับ cholesterol ในเลือดสูงขึ้น ก็จะมีปริมาณ LDL-cholesterol สูงขึ้นตามไปด้วย LDL-cholesterol จะถูก modified ไปในเลือดของผู้ป่วยเบาหวาน โอกาสที่ LDL จะเกิด oxidation ได้เป็น oxidized LDL (OxLDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งมีการศึกษามากมายที่พบว่าในผู้ป่วยหรือสัตว์ทดลองที่เป็นเบาหวานจะมีระดับ OxLDL สูง และ OxLDL จะมีผลไปทำลายเอนโดทีเลียมเซลล์ด้วย ในขณะที่เกิด oxidation ของ LDL จะเกิด superoxide anion (O_2^-) ออกมาด้วย ซึ่ง O_2^- จะมีผลไปทำอันตรายต่อเอนโดทีเลียมได้ Hein K และคณะ (54) ได้แสดงให้เห็นว่าในกรณีที่มีระดับคอเลสเตอรอลสูงในเลือด จะเป็นดัชนีบ่งชี้การมี LDL-cholesterol สะสมในผนังหลอดเลือดและผลทำให้เกิดความบกพร่องของหลอดเลือดในการตอบสนองต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilators

จากการศึกษาในปัจจุบันของผู้วิจัยได้ทำการทดสอบหน้าที่ของเซลล์เอนโดทีเลียมโดยทดสอบการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม และการทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดเล็กที่สมอง (cerebral arterioles) ต่อสารที่เป็น endothelium dependent ได้แก่ สาร acetylcholine (ACh) และ endothelium independent ได้แก่ สาร nitroglycerin (NTG) ระดับกลูโคสในเลือดที่สูงร่วมกับการมีระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูงเป็นระยะเวลานานมีผลทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดเล็กที่สมอง (cerebral arterioles) ต่อสาร ACh ลดลงในหลอดเลือดของหนูเบาหวาน และไม่มีผลการเปลี่ยนแปลงขนาดหลอดเลือดเมื่อให้สาร NTG ซึ่งผลนี้แสดงว่าความผิดปกติในการตอบสนองโดยการขยายตัวของหลอดเลือดดังกล่าวเป็นความผิดปกติในการทำงานที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียม (endothelial cell) มิใช่ที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด (vascular smooth muscle cell) นอกจากนั้นผลการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่หลอดเลือดดำที่สมองเป็นดัชนีหนึ่งที่ยืนยันความผิดปกติหรือความบกพร่องในการทำงานที่ระดับเซลล์เอนโดทีเลียม กลไกหลักที่ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมมาจากการมีระดับสารอนุมูลอิสระที่เพิ่มสูงขึ้นจากการที่มีระดับกลูโคส คอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ความผิดปกติในการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมทำให้สาร nitric oxide ซึ่งเป็นสารที่หลั่งมาจากเอนโดทีเลียมเซลล์และทำให้หลอดเลือดขยายตัว มีปริมาณลดลง และทำให้ nitric oxide สูญเสียการทำงานไปได้ เมื่อสารที่ทำให้หลอดเลือดขยายตัวลดลง กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ cell adhesion molecule ก่อให้เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาวบนเซลล์เอนโดทีเลียม และที่สำคัญได้แก่ปริมาณเลือดไปเลี้ยงที่สมองลดลง

ผลของการให้น้ำคั้นส้มโอพบว่าสามารถป้องกันความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมและทำให้เพิ่มอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมองในภาวะเบาหวานได้ กลไกของน้ำคั้นส้มโอในการป้องกันการความผิดปกติของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานเชื่อว่าเกิดจากการป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ โดยผ่านทางกลไกระดับกลูโคสในเลือด ลดระดับคอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์

ดังนั้นคณะผู้วิจัยสามารถสรุปผลการศึกษาได้ว่า น้ำคั้นส้มโอมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดขนาดเล็กของสมองในหนูเบาหวานที่ได้รับการป้อนด้วยน้ำคั้นส้มโออย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานโดยผ่านกลไกในการลดระดับอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากการมีระดับไขมันและกลูโคสในเลือดที่สูงผิดปกติ ฤทธิ์ต่อเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดของน้ำคั้นส้มโอทำให้หนูเบาหวานสามารถรักษาอัตราการไหลเวียนเลือดในสมองให้คงระดับที่ปกติไว้ได้ ข้อมูลการศึกษานี้ คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สามารถนำไปเพื่อพัฒนาการศึกษาฤทธิ์ของน้ำคั้นส้มโอในผู้ป่วยเบาหวานเพื่อเป็นแนวทางหรือทางเลือกหนึ่งในการป้องกันภาวะแทรกซ้อนต่อหลอดเลือดของผู้ป่วยเบาหวานได้ในอนาคต ในอีกทางหนึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่ปลูกส้มโอทั้งเพื่อบริโภคในประเทศ และเพื่อการส่งออก จึงควรจะมีการพัฒนาองค์ความรู้ ประโยชน์ของส้มโอ ที่จะนำมาใช้แทนยาได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Tooke JE. Microcirculation and diabetes. Br Med Bull 1989;45:206-212
2. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. Diabetes Care 1995;18:269-271.
3. Bell DSH. Stroke in diabetic patient. Diabetic Care 1994;17:213-219.
4. Barnett AH. Pathogenesis of diabetic microangiopathy: an overview. Am J Med 1991;90(Suppl 6a):6-67.
5. Cester N, Rabini RA, Salvolini E. Activation of endothelial cells during insulin-dependent diabetes mellitus: a biochemical and morphological study. Eur J Clin Invest 1996;20:569-573.
6. Jariyapongskul A, Niimi H, Patumraj S. Cerebral microcirculation response to hemorrhagic hypotension in spontaneously diabetic rats: an intravital fluorescence microscopic analysis. Proceeding 6th World Congress for Microcirculation, Munich (Germany) 1996 August :977-981.
7. Stauber WT, Ong S-H, and Mckusky RS. Selective extravascular escape of albumin into cerebral cortex of the diabetic rat. Diabetes 1981;30:500.
8. Lai SM, Alter M, Friday G, Sobel E. A multifactorial analysis of risk factors for recurrence of ischemic stroke. Stroke 1994;25:958-962.
9. Tesfaye S, Malik R, Ward JD. Vascular factors in diabetic neuropathy. Diabetologia 1994;37:847-854.
10. Diederich D, Skopec J, Diederich A, and Dai Fu-X. Endothelial dysfunction in mesenteric resistance arteries of diabetic rats: role of free radicals. Am J Physiol 1994;266:H1153-H1161.
11. Bucala R, Tracey KS, Cerami A. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. J Clin Invest 1991;87:432-438.
12. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, and Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature (Lond) 1986;320:454-456.
13. Giugliano D, Ceriello A, and Paolisso G. Diabetes mellitus, Hypertension, and Cardiovascular disease: which role for oxidative stress. Metabolism 1995;44:363-368
14. Diplock AT. Antioxidants and disease prevention. Molecular Aspects of Medicine, 1994, 15:293-376.
15. Willett WC. Diet and health: what should we eat? Science. 1994 Apr 22;264(5158):532-537.
16. Tanizawa H, Ohkawa Y, Takino Y, Miyase T, Ueno A, Kageyama T, and Hara S. Studies on natural antioxidants in citrus species I. Determination of antioxidative activities of citrus fruits. Chem. Pharm. Bull. 40: 1940-1942, 1992.
17. Kawaii, S., Y. Tomono, E. Katase, K. Ogawa and M. Yano. 1999. Quantitation of flavonoid constituents in Citrus fruits. J. Agric. Food Chem. 47: 3565-3571.

18. ชีรพงษ์ เทพกรณ์ และ เสาวภา ไชยวงศ์. การประเมินสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพและความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของส้มโอพันธุ์ทองดีในประเทศไทยเพื่อการส่งออก. Proceeding งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วทท) ครั้งที่ 35 (35th Congress on Science and Technology of Thailand) October 15-17,2009, Chonburi, Thailand
19. Alberti KG, Zimmet PZ. Definition/ diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part1:diagnosis and classification of diabetes mellitus provisional report of a WHO consultation. Diabetes Med 1998;15:539-553.
20. Atkinson MA, Maclaren NK. The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. N Eng J Med 1994;331:1428-1436.
21. Bucala R, Tracey KS, Cerami A. Advanced glycosylation end products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilation in experimental diabetes. J Clin Invest 1991;87:432-438.
22. Mayhan WG, Simons LK, Sharpe QM. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus . Am J Physiol 1991;260:H319-H326.
23. Miyata N, Tsuchida K, Okuyama S, Otomok, Kasaya Y. Age-related changes in endothelium-dependent relaxation in aorta from genetically diabetic WBN/Kob rats. Am J Physiol 1991;262:H1104-H1109.
24. Gryglewski RJ, Palmer RMJ, and Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. Nature(Lond) 1986;320:454-456.
25. Kashiwagi A, Asahina T, Ikebuchi M, Tanaka Y, Takagi Y, Nishio Y, Kikkawa R, Shigita Y. Abnormal glutathione metabolism and increased cytotoxicity caused by H₂O₂ in human umbilical vein endothelial cells cultured in high glucose medium. Diabetologia 1994;37:264-269.
26. Gonzales AM, Sochor, Hothersall JS, McLean P. Effect of aldose reductase inhibitor (sorbitol) on integration of polyol pathway, pentose phosphate pathway, and glycolytic rate in diabetic rat lens. Diabetes 1986;35:1200-1205.
27. Gillery P, Monboisse JC, Maquat FX, Glycation of protein as a source of superoxide. Diabetes Metab 1988;14:25-30.
28. Sakurai T, Tsuchiya S, Superoxide production from non-enzymatic glycated proteins. FEBS Lett 1988;236:406-410.
29. Ways DK, Sheetz MJ. The role of protein kinase C in the development of the complications of diabetes. Vitam Horm 2000;60:149-193.
30. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robison GS, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. J Clin Invest 1996;98:2018-2026.
31. Yuichi O, Timothy E, Harrison P, and Harison DG. Hypercholesterolemia increased endothelial superoxide anion production .J Clin Invest 1993;91:2546-2551.

32. Hein K, Thomas FG, Ramwell PW. Superoxide production in the isolated rabbit aorta and the effect of alloxan, indomethacin and nitrovasodilators. J pharmacol Exp Ther 1991;256:537-541.
33. Shimokawa H, Vanhoutte PM, Impaired endothelium-dependent relaxation to aggregating platelets and related vasoactive substances in porcine coronary arteries in hypercholesterolemia and atherosclerosis. Circ Res 1989;64:900-914.
34. อัญชลี ศิริพิทยาคุณกิจ สถานการณ์โรคเบาหวานในประเทศไทย. Weekly Epidemiological Surveillance Report 2005 Vol. 36 No. 47 สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค
35. Guihua, X., L. Donghong, C. Jianchu, Y. Xingqian, M. Yaqin and S. John. Juice components and antioxidant capacity of citrus varieties cultivated in China. Food Chem 2008;106: 545-551.
36. Tripoli E., Guardia M.L., Giammanco S., Majo D.D, and Giammanco M. Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. Food Chemistry 2007;104:466-479.
37. Pichaiyongvongdee S and Haruenkit R. Investigation of limonoids, flavanones, total polyphenol content and antioxidant activity in seven Thai Pummelo cultivars Kasetsart J. (Nat. Sci.) 2009; 43 : 458 – 466.
38. Cariño-Cortés R, Alvarez-González I, Martino-Roaro L, Madrigal-Bujaidar E. Effect of naringin on the DNA damage induced by daunorubicin in mouse hepatocytes and cardiocytes. Biol Pharm Bull. 2010;33(4):697-701.
39. Aggarwal A, Gaur V, Kumar A. Nitric oxide mechanism in the protective effect of naringin against post-stroke depression (PSD) in mice. Life Sci. 2010 Jun 19;86(25-26):928-935.
40. Singleton, V. L; & Rossi, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. Enology and Viticulture. 1965;16(1): 144-158.
41. Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J.C.M., Sousa, J., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: Grapefruit, lemon, lime and orange. Food and Chemical Toxicology. 2010;48(1): 99-106.
42. Rapisarda, P; & Bianco, Marisol L; & Pannuzzo, P; & Timpanaro, N. Effect of cold storage on vitamin C, phenolics and antioxidant activity of five orange genotypes [*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]. Postharvest Biology and Technology. 2008;49(1): 348-354
43. Yamasaki, K; & Hashimoto, A; & Kokusenya, Y; & Miyamoto, T; & Sato, T. Electrochemical method for estimating the antioxidative effects of methanol extracts of crude drugs. Chem Pharm Bull. 1994;42(1): 1663-1665.
44. เสาวภา ไชยวงศ์ และ อีรพงษ์ เทพภรณ์ ฟลาโวนอยด์ในส้มโอไทย. Thai Journal of Applied Science 2010;V2(9):79-89
45. Oyedepo, T.A. Effect of Citrus maxima (Merr.) Fruit Juice in Alloxan-Induced Diabetic Wistar Rats. Science Journal of Medicine & Clinical Trial 2012;125:1-8
46. W.J., Ferber S., Johnson J.H., Newgard C.B. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. Diabetes 1994;43(11):1326-1333.

47. Simsec N.,Kaya M, Kara A, Can I, Karadeniz A, Kalkan Y. Effects of melatonin on islet neogenesis and beta cell apoptosis in streptozotocin-induced diabetic rats: an immunohistochemical study. *Domestic Animal Endocrinology* 2012; 43:47-57
48. Jung UN , Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2006;38:1134–1145.
49. Theppakorn T and Chaiwong S. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant capacities of pomelo cv. “Thong Dee” in Thailand for export. 35TH Congress on Science and Technology of Thailand 15-17 October 2552.
50. Mayhan WG, Simsons LK, Sharpe QM. Mechanism of impaired responses of cerebral arterioles during diabetes mellitus . *Am J Physiol* 1991;260:H319-H326.
51. Miyata N, Tsuchida K, Okuyama S, Otomok, Kasaya Y. Age-related changes in endothelium-dependent relaxation in aorta from genetically diabetic WBN/Kob rats. *Am J Physiol* 1991;262:H1104-H1109.
52. Stephen M Setter, R Keith Campbell, and Clifton J Cahoon. Biochemical Pathways for Microvascular Complications of Diabetes Mellitus *Ann. Pharmacother* 2003;37: 1858 - 1866.
53. Nikkila EA. Plasma triglycerides in human diabetes. *Proc R Soc Med* 1974;67:18-21.
54. Hein K, Thomas FG, Ramwell PW. Superoxide production in the isolated rabbit aorta and the effect of alloxan, indomethacin and nitrovasodilators. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;256:537-541.

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมา
และผลที่ได้รับตลอดโครงการ

เดือนที่	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	กิจกรรมที่ดำเนินการมา
6 เดือนที่ 1	1 ศึกษาปริมาณฟีนอลิก ชนิดและปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มโอผง 2 ศึกษาฤทธิ์ของ น้ำส้มโอต่ออัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง และการทำงานของเซลล์เอนโดทีเลียมในหลอดเลือดสมองในช่วงเวลาต่างๆ ของการเป็นเบาหวาน	1.1 วิเคราะห์ปริมาณฟีนอลิกจากน้ำส้มโอผง 1.2 วิเคราะห์ปริมาณของสารฟลาโวนอยด์ของน้ำส้มโอผง 2.1.ฉีดสาร streptozotocin ให้หนูเป็นเบาหวาน 2.2 ป้อนน้ำคั้นส้มโอ 2.3. การทดสอบการไหลเวียนเลือดที่สมองการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาว และการตอบสนองของหลอดเลือดแดง ต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation ในหนูที่เป็นเบาหวาน 8 สัปดาห์	1.1.1 ผงน้ำคั้นส้มโอ 1.1.2 ตรวจวัดร้อยละผลผลิตที่ได้ ปริมาณฟีนอลิก จากน้ำส้มโอผง 1.1.3 ตรวจวัดปริมาณ ฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะ Naringin จากน้ำส้มโอผง 2.1. หนูปกติและเบาหวานทั้งได้รับและไม่ได้รับ น้ำคั้นส้มโอ 2.2. ผลอัตราการไหลเวียนเลือดที่สมอง การเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาว	1.1.1 คั้นน้ำส้มโอและทำให้เป็นผงโดยการทำให้ Freeze Dry และ spray dry 1.1.2 ตรวจวัดร้อยละผลผลิตที่ได้ ปริมาณฟีนอลิก จากน้ำส้มโอผง โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก Folin Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) 1.1.3 ตรวจวัดปริมาณ ฟลาโวนอยด์โดยเฉพาะ Naringin จากน้ำส้มโอผง ด้วยวิธี HPLC ที่ดัดแปลงจาก de Lourdes Mata Bilbao et al, 2007 2.1.1ฉีดสาร streptozotocin ให้หนูเป็นเบาหวาน การสกัดน้ำคั้นส้มโอใช้เวลาประมาณ 6 เดือน ซึ่งเดิมกำหนดไว้แค่ 4 เดือน จึงทำให้การศึกษากฎทางชีวภาพ ล่าช้าไปกว่ากำหนด 2 เดือนกว่า

	วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	กิจกรรมที่ดำเนินการมา
6 เดือนที่ 2		1.วิเคราะห์ผลทุกชนิดทั้ง hemodynamics , metabolic parametersและ การศึกษาการทำงานของ endothelium 2.ศึกษาระดับ malondialdehydeในเนื้อเยื่อสมอง	รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	1.ทดสอบการไหลเวียนเลือดที่สมองการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาว และการตอบสนองของหลอดเลือดแดง ต่อสารที่เป็น endothelium dependent และ independent vasodilation ในหนูที่เป็นเบาหวาน 8 สัปดาห์ วิเคราะห์ parameters เกือบทุกชนิด ตรวจหาระดับ malondialdehydeในเนื้อเยื่อสมอง
2เดือนที่ขอเพิ่มเติม		วิเคราะห์ผลการทดลองและเขียนรายงานการวิจัย	รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์	วิเคราะห์ผลการทดลองและเขียนรายงานการวิจัย

ผลที่ได้รับตลอดโครงการ

1. น้ำคั้นส้มโอที่ให้แก่หนูที่ถูกทำให้เป็นเบาหวานสามารถลดระดับกลูโคส cholesterol และ triglyceride ในเลือดได้
2. น้ำคั้นส้มโอให้ผล **ป้องกัน endothelial dysfunction** ในภาวะเบาหวานได้โดยประเมินจากการเกาะติดของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีจำนวนลดลง และการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสารที่เป็น endothelium dependent vasodilator และช่วยรักษาสภาพการไหลเวียนเลือดในสมองให้อยู่ในระดับปกติได้
3. การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นประสิทธิภาพของน้ำคั้นส้มโอในการลดอนุมูลอิสระที่เนื้อเยื่อสมองในหนูเบาหวาน

