

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ผลของสารนารินจีนต่อภาวะดีอินซูลิน และทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตส

ผู้วิจัย : ผศ.ดร. วชิราวดี มาลากุล
สังกัด : มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน.....

เลขทะเบียน..... 1047717

เลขเรียกหนังสือ..... ว ๑๒

5๓๓

.15

๑๙๕๕

๒๕๕๙

สนับสนุนโดยงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2559

Effect of naringin on insulin resistance and vascular function in fructose fed rats

Abstract

High fructose consumption is associated with metabolic disorders including hyperglycemia, insulin resistance, and dyslipidemia as well as endothelial dysfunction. Naringin, the major grapefruit flavonoid, has antioxidant, lipid lowering, insulin sensitizing, and cardiovascular protective activities. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of naringin treatment on insulin resistance and vascular function in fructose fed rats. Male Sprague-Dawley rats were given 10% fructose in drinking water for 12 weeks, whereas control rats were fed drinking water alone. Naringin (100 mg/kg) was orally administered to fructose fed rats during the last 4 weeks of the study. After 12 weeks, blood samples were collected for measurement of blood glucose, insulin, lipid profile and total nitrate/nitrite (NO_x). Vascular function was assessed by isometric tension recording. Aortic expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated eNOS (p-eNOS), and nitrotyrosine were evaluated by western blotting analysis. Results showed that fructose-fed rats exhibited a significant increase in serum insulin, glucose, total cholesterol, triglyceride, and low density lipoprotein and insulin resistance index (HOMA-IR) index. In rat aortae, fructose reduced acetylcholine-induced vasorelaxation, without affecting on sodium nitroprusside-induced vasorelaxation. Treatment of fructose-fed rats with naringin restored fructose-induced metabolic alterations and endothelial dysfunction. Fructose-fed rats also exhibited a decreased serum NO_x level, reduced eNOS and p-eNOS protein expression, and enhanced nitrotyrosine expression in aortae. These alterations were improved by naringin treatment. The present study suggests that naringin treatment for 4 weeks improves high fructose induced insulin resistance,

hyperlipidemia, and vascular dysfunction in rats. The vascular effect of naringin is mainly mediated through an enhanced NO bioavailability via increased eNOS activity and decreased NO inactivated to peroxynitrite in aortae.

Keywords: naringin, fructose-fed rats, endothelial dysfunction, nitric oxide, nitrotyrosine



ผลของสารนารินจินต่อภาวะดื้ออินซูลินและทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส

บทคัดย่อ

การบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสปริมาณสูงจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม รวมถึง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะไขมันในเลือดสูง และความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด นารินจิน เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ลดไขมันในเลือด เพิ่มความไวในการตอบสนองต่ออินซูลิน และฤทธิ์ปกป้องหัวใจและหลอดเลือด ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อวิเคราะห์ผลของการให้สารนารินจินต่อ ภาวะดื้ออินซูลินการทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส หนูทดลองสายพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้จะได้รับ 10% น้ำตาลฟรุคโตสในน้ำดื่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ ขณะที่หนูกลุ่มควบคุม ได้รับน้ำดื่มปกติ สารนารินจิน (100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม) จะถูกบ่อนให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสในช่วงปลาย 4 สัปดาห์ของการทดลอง ภายหลัง 12 สัปดาห์ของการทดลอง เลือดจะถูกเก็บเพื่อวิเคราะห์ค่าน้ำตาลในเลือด อินซูลิน ไขมัน และปริมาณ nitrate/nitrite (NOx) การทำงานของหลอดเลือดจะถูกบันทึกค่า isometric tension การแสดงออกของโปรตีน endothelial nitric oxide synthase (eNOS), phosphorylated eNOS (p-eNOS), และ nitrotyrosine จะถูกวิเคราะห์โดยเทคนิค western blotting ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสจะพบการเพิ่มขึ้นของซีรัมอินซูลิน น้ำตาลกลูโคส คอเลสเตอรอล ไตรกลีเซอไรด์ และ low density lipoprotein และดัชนีบ่งชี้ภาวะดื้ออินซูลิน (HOMA-IR) ส่วนในหลอดเลือดแดง ของหนูทดลอง น้ำตาลฟรุคโตสจะลดการคลายตัวของหลอดเลือดที่ชักนำโดยสาร acetylcholine โดยไม่มีผลต่อการคลายตัวที่ชักนำโดยสาร sodium nitroprusside การให้สารนารินจินแก่หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงจะช่วยฟื้นฟูความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมและความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือดที่เกิดจากน้ำตาลฟรุคโตสได้ นอกจากนี้ หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ยังพบการลดลงของปริมาณ NOx ในซีรัม ลดการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS, เพิ่มการแสดงออกของ nitrotyrosine ในหลอดเลือดแดง การเปลี่ยนแปลงนี้ จะถูกฟื้นฟูโดยการให้สารนารินจิน การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าการบ่อนสารนารินจินเป็นเวลา 4 สัปดาห์สามารถฟื้นฟูภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะไขมันในเลือดสูงและความผิดปกติของหลอดเลือดที่ชักนำโดยน้ำตาลฟรุค

โทษ ฤทธิ์ของนารินจินต่อหลอดเลือดอาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณของสาร NO โดยการเกิดการทำงานของ eNOS หรือลดการเกิด peroxynitrite ในหลอดเลือด

คำสำคัญ: สารนารินจิน หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส, เยื่อหลอดเลือดทำงานผิดปกติ, nitric oxide, nitrotyrosine



สารบัญ

	หน้า
Abstract	1-2
บทคัดย่อ	3-4
สารบัญ	5
สารบัญตาราง	6
สารบัญภาพ	7
สรุปโครงการ (Executive Summary)	8-12
บทนำ	13-14
วิธีการทดลอง	15-20
ผลการทดลอง	
1. ผลต่อน้ำหนักตัว และค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือด	21-23
2. ผลต่อการทำงานของหลอดเลือด	24-27
3. ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม	28-29
4. ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ	30-32
4. ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine	33-35
วิจารณ์ผลการทดลอง	36-39
เอกสารอ้างอิง	40-45
ภาคผนวก	
- Output ของโครงการ	46
- เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการ	47-48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อ น้ำหนักตัว และค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือด ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส	22
2	ค่า pEC50 และ Rmax ต่อสาร ACh และ SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนู กลุ่มต่างๆ	25
3	ค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ	28
4	ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อระดับ MDA, SOD, GPx, และ AGEs ในซีรัม ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส	31
5	ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อระดับ MDA, SOD, และ GPx ในตับของหนูที่ ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส	32

สารบัญรูปร่างภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ผลของสารนารินจินต่อระดับน้ำตาล, อินซูลิน และ ค่าดัชนี HOMA-IR ในเลือดของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส	23
2	การตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร ACh ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN)	26
3	การตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร SNP ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN)	27
4	ค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ	29
5	ภาพ Western blots ของการแสดงออกของ eNOS , phosphorylated eNOS ที่ตำแหน่ง Ser1177 residue , และ nitrotyrosine ที่หลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN)	34
6	ภาพแสดงค่า densitometry ratio ของโปรตีน eNOS , phosphorylated eNOS ที่ตำแหน่ง Ser1177 residue , และ nitrotyrosine ที่หลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN)	35

สัญญาเลขที่ R2559B065

สรุปโครงการ (Executive Summary)

ชื่อโครงการ ผลของสารนารินจินต่อภาวะดื้ออินซูลิน และทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส

หัวหน้าโครงการ ผศ.ดร.วชิราวดี มาลากุล

หน่วยงาน ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

โทรศัพท์ 055-964655 โทรสาร 055-964770 อีเมล wachirawadeem@hotmail.com

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากผลการรายงานของ The World Health Organization ในปี 2008, พบว่าโรคหัวใจและหลอดเลือด (cardiovascular disease) มี อัตราการตายเป็นอันดับ 1 ของประชากรโลก โดยประชากรทั่วโลกที่เสียชีวิตด้วยโรคนี้ มีประมาณ 17.3 ล้านคน ในปี 2008 หรือ 30% ของอัตราการตายของประชากรโลก โดยส่วนใหญ่จะเสียชีวิตด้วยโรคหลอดเลือดหัวใจตีบ (coronary artery disease) ประมาณ 7.3 ล้านคนจากการคาดการณ์ของ The World Health Organization อัตราป่วยด้วยโรคหัวใจและหลอดเลือด จะมีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี และอาจเพิ่มถึง 23.6 ล้านคน ในปี 2030 และทุกวันนี้ วงการแพทย์ยอมรับอย่างไม่มีข้อโต้แย้งแล้วว่า สาเหตุหนึ่งของโรคหัวใจ มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับสิ่งที่ทุกคนรับประทานเข้าไป การบริโภคอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลสูง ถือว่าเป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis) ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น โดยการบริโภคอาหารหรือเครื่องดื่มที่ผสมน้ำตาลสูง เป็นเวลานาน จะก่อให้เกิดความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน และเพิ่มปริมาณอนุมูลอิสระในร่างกาย จนก่อให้เกิดความเสียหายของหลอดเลือด

จากการสืบค้นข้อมูล พบว่า สาร naringin ซึ่งเป็นสารสำคัญที่ได้จากผลไม้ที่มีรสเปรี้ยว เช่นส้มโอ มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สามารถลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือด และสามารถฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือด

เลือดได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า สาร naringin อาจช่วยลดความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน
ภาวะอ้วนและช่วยฟื้นฟูการทำงานของหลอดเลือดในสัตว์ทดลองที่ชักนำให้เกิดภาวะ metabolic syndrome
ได้ โครงการวิจัยนี้มุ่งศึกษาฤทธิ์ของสาร naringin ต่อความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน และ
การทำงานของหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการได้รับสาร naringin เป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ในด้านต่างๆ
ดังนี้

1. ฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาล, ฮอร์โมนอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด
2. ฤทธิ์ต่อการทำงานของหลอดเลือด
3. ฤทธิ์ต่อระดับ nitric oxide
4. ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine
5. ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 2
เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาเลา มหาวิทยาลัยมหิดล การทดลองจะเริ่มต้นหลังจากได้รับ
สัตว์ทดลองมาพักที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองของ ม. นเรศวร เป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ หลังจากนั้น จะถูก
แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับ น้ำดื่มปกติ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

2. กลุ่มที่มีได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูง (F) จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุกโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์

3. กลุ่มที่มีได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูงร่วมกับสารนารินจิน (FN) กลุ่มนี้ จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุกโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และถูกป้อนสารนารินจิน 100 มก/กก/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (โดยเริ่มจากสัปดาห์ที่ 9 ถึงสัปดาห์ที่ 10 ของการให้น้ำตาลฟรุกโตส)

2. ฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน

2.1 ฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาลในเลือดและปริมาณ insulin ในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ นำไปวัดระดับน้ำตาลในเลือด ปริมาณอินซูลิน และ การเกิด AGEs ในซีรัม ส่วนภาวะดื้ออินซูลินประเมินจากค่า homeostasis model assessment index for insulin resistance (HOMA-IR) formula

2.2 ฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน และภาวะอ้วน

ก่อนและหลังได้รับน้ำตาลฟรุกโตส ทุก 1 สัปดาห์ หนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกชั่งน้ำหนักตัวและวัด ปริมาณน้ำและอาหารที่กินเข้าไป

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) ในซีรัมจะถูกวิเคราะห์ จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จาก สูตรการคำนวณของ Friedewald equation

3 ผลต่อ การทำงานของหลอดเลือด และปริมาณสาร NO ในหลอดเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หลอดเลือดแดง thoracic aorta จะถูกแยกเพื่อวิเคราะห์โครงสร้างของผนัง หลอดเลือด โดยการย้อม hematoxylin-eosin stain และทดสอบวัดการทำงานของหลอดเลือด โดยวิธี

organ bath technique ส่วนปริมาณของ nitric oxide ในซีรัม โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ nitrite และ nitrate

4. ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine

การแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine ในหลอดเลือดแดง aorta จะถูกวิเคราะห์โดย Western blot analysis

ผลการทดลอง

ในการศึกษานี้ หนูทดลองได้รับ 10% ของน้ำตาลฟรุคโตสผสมในน้ำดื่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จะทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ซึ่งวิเคราะห์จากการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลและอินซูลินในเลือดและการเพิ่มขึ้นของค่า HOMA-IR นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งวิเคราะห์จากการเพิ่มขึ้นของคอเลสเตอรอล, LDL และไตรกลีเซอไรด์ ในซีรัม การป้อนสารนารินจินในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดภาวะดื้ออินซูลินและภาวะไขมันในเลือดสูงได้ การศึกษานี้ พบว่าหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะมีการคลายตัวของหลอดเลือดที่ชักนำโดยสาร Ach ลดลง ขณะที่การคลายตัวของหลอดเลือดที่ชักนำโดยสาร SNP ไม่เปลี่ยนแปลง และยังพบการลดลงของปริมาณสาร NO ในซีรัมของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส เมื่อป้อนสารนารินจินให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส พบว่าจะเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด จนมีค่าใกล้เคียงกับการคลายตัวของหลอดเลือดในหนูกลุ่มควบคุม รวมทั้งสารนารินจินยังเพิ่มปริมาณสาร NO ในซีรัมของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส การศึกษานี้ยังพบการลดลงของโปรตีน eNOS และ p-eNOS และการเพิ่มขึ้นของโปรตีน nitrotyrosine ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส นอกจากนี้ยังพบว่าการป้อนสารนารินจินให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS (Ser1177) และลดการแสดงออกของ nitrotyrosine ในหลอดเลือด แสดงให้เห็นว่า การให้สารนาริน

จีน จะเพิ่มปริมาณสาร NO โดยเพิ่มโปรตีน eNOS และ p-eNOS และลดการ inactivation ของสาร NO จากฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ

สรุปผลการทดลอง

การทดลองนี้สรุปได้ว่าการป้อนสารนารินจีนเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถฟื้นฟูภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะไขมันในเลือดสูงและความผิดปกติของหลอดเลือดที่ชักนำโดยน้ำตาลฟรุกโตส ฤทธิ์ของนารินจีนต่อหลอดเลือดอาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณของสาร NO โดยการเกิดการ ทำงานของ eNOS หรือลดการเกิด peroxynitrite ในหลอดเลือด



บทนำ

น้ำตาลฟรุคโตสมักถูกนำมาใช้ผสมกับอาหารและเครื่องดื่มจำนวนมากเนื่องจากมีรสชาติหวานกว่า และราคาถูกกว่าน้ำตาลกลูโคส มีรายงานวิจัย พบว่าการบริโภคน้ำตาลฟรุคโตสในปริมาณสูงและเป็นเวลานานสามารถก่อให้เกิดความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม เช่น ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะอ้วน และความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด (Johnson et al., 2007; Tappy, Le, Tran, & Paquot, 2010) ปัจจัยทั้งหมดนี้ล้วนแล้วแต่เป็นปัจจัยเสี่ยงที่ก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด ซึ่งโรคนี้เป็นสาเหตุของอัตราการป่วยและการตายของประชากรโลก (Lorber, 2014; Nelson, 2013)

ความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือดถือว่าเป็นอาการเริ่มต้นของการเกิดโรคหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) และโรคหัวใจและหลอดเลือด และถือว่าเป็นเป้าหมายสำคัญในการรักษาโรคหัวใจและหลอดเลือด (Favero, Paganelli, Buffoli, Rodella, & Rezzani, 2014) โดยปกติ เยื่อหลอดเลือดทำหน้าที่สำคัญในควบคุมขนาดหลอดเลือดโดยการสร้างหรือหลั่งสารที่มีฤทธิ์ต่อหลอดเลือด (vasoactive factors) เช่น สาร nitric oxide (NO) โดยสาร NO จะถูกสร้างจากการเปลี่ยน L-arginine ไปเป็น L-citrulline โดยเอนไซม์ endothelial NO synthase (eNOS) และมีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ และฤทธิ์ต้านการแข็งตัวของเลือด (Fadel, 2017) การลดลงของสาร NO ซึ่งอาจเกิดจากลดลงของการทำงานของ eNOS หรือเพิ่มการทำลายสาร NO จะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ขึ้นกับเยื่อหลอดเลือด การเพิ่มการเกิดลิ้มเลือด และการก่อให้เกิดภาวะแข็งตัวของหลอดเลือด (Vanhoutte, Shimokawa, Feletou, & Tang, 2017) มีรายงานวิจัยพบว่า สัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะพบความผิดปกติของการคลายตัวของหลอดเลือดแบบที่ขึ้นกับเยื่อหลอดเลือด และมีการลดลงของสาร NO (Jia, Aroor, Whaley-Connell, & Sowers, 2014; Kho, Lee, Cha, Choi, & Kang, 2014; Pektas, Sadi, & Akar, 2015)

มีรายงานวิจัย พบว่า การบริโภคน้ำตาลฟรุคโตส สามารถกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับสาร NO จนก่อให้เกิดสาร peroxynitrite (Zhao, Vanhoutte, & Leung, 2015) (Wang, Meng, Chang, & Wu, 2006) ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์แรงกว่าเดิม ยิ่งส่งผลทำลายเซลล์หลอดเลือดและลดการทำงานของสาร NO ส่งผลให้การทำงานของหลอดเลือดผิดปกติ ก่อให้เกิดภาวะเส้นเลือดตีบหรือแข็ง (atherosclerosis) ในที่สุด ซึ่งอาจเกิดขึ้นทั่วทุกส่วนของร่างกาย เช่น เกิดการตีบแข็งที่หลอดเลือดหัวใจ ทำให้เกิดภาวะหัวใจขาดเลือด หรือการตีบแข็งที่เส้นเลือดสมอง อาจทำให้เป็นอัมพฤกษ์ อัมพาตได้ เป็นต้น มีการศึกษาในสัตว์ทดลอง พบว่าหลอดเลือดแดงของสัตว์ทดลองที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสจะมีการแสดงออกของโปรตีน eNOS และมีการเพิ่มการแสดงออกของ nitrotyrosine ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระและการลดลงของการสร้างสาร NO อาจเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือดที่เกิดจากน้ำตาลฟรุคโตส (Babacanoglu, Yildirim, Sadi, Pektas, & Akar, 2013; Litterio et al., 2015)

สารนารินจิน (4',5,7-trihydroxyflavone 7-rhamnoglucoside) สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) (Chanet et al., 2012) มีการศึกษาพบว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ, ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ลดไขมันในเลือด และฤทธิ์ป้องกันหัวใจและหลอดเลือด (Adebiyi, Adebiyi, & Owira, 2016; Alam, Kauter, & Brown, 2013; Chanet et al., 2012; Pu et al., 2012) มีรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าสารนารินจินสามารถฟื้นฟูภาวะดื้ออินซูลินและลดระดับน้ำตาลในเลือด (Pu et al., 2012; Sharma et al., 2011) รวมทั้งยังมีฤทธิ์ลดความดันเลือดและฟื้นฟูความผิดปกติของหลอดเลือดในหนูทดลองที่ได้รับอาหารคาร์โบไฮเดรตและไขมันในเลือดสูง (Alam et al., 2013) และในหนูที่มีความดันเลือดสูง (Ikemura, Sasaki, Giddings, & Yamamoto, 2012) สารนารินจินยังลดการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์เยื่อหลอดเลือดและในหัวใจของหนูเบาหวานโดยยับยั้ง NADPH_{oxidase} (Adebiyi et al., 2016) (W. Li et al., 2014) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาใดศึกษาฤทธิ์ของสารนารินจินต่อความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด ดังนั้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารนารินจินต่อภาวะดื้ออินซูลิน ภาวะไขมันใน

เลือดสูง และความผิดปกติของหลอดเลือด ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูง รวมทั้งศึกษาากลไกของสารนารินจินที่ออกฤทธิ์ต่อหลอดเลือด

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อตรวจสอบฤทธิ์ของการได้รับสารนารินจิน เป็นเวลา 1 เดือนในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูง ในด้านต่างๆ ดังนี้

1. ศึกษาฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาล, ฮอริโมนอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด
2. ศึกษาฤทธิ์ต่อการทำงานของหลอดเลือด
3. ศึกษาฤทธิ์ต่อระดับ nitric oxide
4. ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine
5. ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ



วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสัตว์ทดลอง

วิธีการทดลองที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ทดลองได้ผ่านการพิจารณาจาก คณะกรรมการดูแลและกำกับการใช้ สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

หนูแรท (rats) เพศผู้ สายพันธุ์ Sprague-Dawley (SD) น้ำหนัก 200-250 กรัม อายุประมาณ 2 เดือน จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ศาลาया มหาวิทยาลัยมหิดล การทดลองจะเริ่มต้นหลังจากได้รับ สัตว์ทดลองมาพักที่สถานเลี้ยงสัตว์ทดลองของ ม. นเรศวร เป็นเวลาประมาณ 1 อาทิตย์ หลังจากนั้นจะถูกแบ่ง ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ

1. กลุ่มควบคุม (C) จะได้รับ น้ำดื่มปกติ เป็นเวลา 12 สัปดาห์
2. กลุ่มที่มีได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์
3. กลุ่มที่มีได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูงร่วมกับสารนารินจิน (FN) กลุ่มนี้ จะได้รับ น้ำดื่มผสมน้ำตาลฟรุคโตส 10% เป็นเวลา 12 สัปดาห์ และถูกป้อนสารนารินจิน 100 มก/กก/วัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (โดยเริ่ม จากสัปดาห์ที่ 9 ถึงสัปดาห์ที่ 10 ของการให้น้ำตาลฟรุคโตส)

2. การแยกหลอดเลือดแดง aorta

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ทั้งหนูทุกกลุ่ม จะถูกทำให้สลบด้วย Nembutal 50 mg/kg ก่อนที่จะถูกผ่าตัด แยกหลอดเลือดแดง thoracic aorta ออกมา ก่อนนำไปทดสอบวัดการทำงานของ หลอดเลือด และ วิเคราะห์ค่า NO, lipid peroxidation, Superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPx)

3. การเตรียม liver homogenate

นำตับ 500 mg ใน 4.5 ml ของสารละลาย iced cold PBS, pH 7.0 ไปทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่อง homogenizer หลังจากนั้นนำไป centrifuge ที่ 12000 g x 30 นาที เก็บ supernatant เพื่อนำไปวิเคราะห์ผล

4 ฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมัน

4.1 ฤทธิ์ต่อระดับน้ำตาลในเลือดและปริมาณ insulin ในเลือด

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง หนูทดลองจะถูกเก็บเลือดโดยเจาะเลือดที่หัวใจ นำไปวัดระดับน้ำตาลในเลือดโดย glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostic, France) และเลือดจะถูกปั่นแยกซีรัมโดยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอินซูลินในซีรัม โดย Rat/Mouse Insulin ELISA kit (Merck Milipore, Madrid, Spain) ส่วนภาวะดื้ออินซูลินประเมินจากค่า homeostasis model assessment index for insulin resistance (HOMA-IR) formula โดยใช้สูตร $HOMA-IR = \frac{[fasting\ insulin(ng/ml) \times fasting\ glucose\ (mg/dL)]}{405}$

การเกิด AGEs ในซีรัม วิเคราะห์โดยนำซีรัมเจือจางด้วย saline (1:15 v/v) หลังจากนั้น นำไปวัด fluorescence intensity ที่ excitation wavelength of 370 nm และ emission wavelength of 440 nm.

4.2 ฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน และภาวะอ้วน

4.2.1 ผลต่อภาวะอ้วน

ก่อนและหลังได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ทุก 1 สัปดาห์ หนูทดลองทุกกลุ่มจะถูกชั่งน้ำหนักตัวและวัดปริมาณน้ำและอาหารที่กินเข้าไป

4.2.2 ฤทธิ์ต่อเมตาบอลิซึมของไขมัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณ total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) และ triglyceride (TG) ในซีรัมจะถูกวิเคราะห์ โดยใช้ commercial test kit จากนั้นคำนวณหาค่า LDL-C concentration จากสูตรการคำนวณของ Friedewald equation

$$\text{LDL} = \text{TC} - \text{HDL} - \text{TG}/5$$

5. ฤทธิ์ต่อการทำงานของหลอดเลือด

เพื่อศึกษาความสามารถในการหดตัวของหลอดเลือดแดง สาร PE ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะถูกหยดลง organ bath ที่มีเนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูทุกกลุ่ม และเพื่อศึกษาความสามารถในการคลายตัวของหลอดเลือดแดง เนื้อเยื่อหลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มต่างๆ จะถูกเหนี่ยวนำให้ตัวระดับปานกลางด้วยสาร PE (10^{-9} - 10^{-5} M) ก่อนที่หยด สาร ACh ที่ความเข้มข้น 10^{-9} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อประเมินสภาพของเซลล์ endothelium หรือ สาร SNP ที่ความเข้มข้น 10^{-10} - 10^{-5} M แบบ Cumulative dose จะลง organ bath เพื่อประเมินสภาพของเซลล์ smooth muscle

6. ฤทธิ์ต่อปริมาณ nitric oxide

นำซีรัมจากหนูทุกกลุ่ม มาวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide โดยวิเคราะห์จากปริมาณผลิตภัณฑ์สุดท้ายของ NO คือ total nitrite และ nitrate โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

7. ฤทธิ์ต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine

การแสดงออกของโปรตีน eNOS , p-eNOS และ nitrotyrosine จะถูกวิเคราะห์โดย Western blot analysis นำหลอดเลือด aorta ที่แยกหนุ่ทุกกลุ่มมาปั่น (homogenize) ใน ice-cold RIPA buffer ที่มี ส่วนผสมของ protease and phosphatase inhibitor แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4°C. และ supernatant ที่ได้จะถูกทำการตรวจวัดปริมาณของโปรตีน โดยใช้ bicinchoninic acid protein assay kit (Merck Millipore). เนื้อเยื่อ aortic homogenates ปริมาณ 40 µg protein จะถูก แยกโปรตีนโดย 7.5% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis ก่อนจะถูก เคลื่อนย้ายโปรตีนไปสู่ polyvinylidene difluoride membranes หลังจากนั้น จะถูก blocked ด้วย 5% nonfat dry milk เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อน incubated กับ anti-eNOS (1:500), anti-phospho-eNOS Ser1177 (1:500), anti-nitrotyrosine (1:1000) และ anti-β actin (1:5000) at 4°C overnight. หลังจากนั้น membranes จะถูกล้างด้วย tris-buffered saline with Tween 20 (TBST) ก่อนนำไป incubated ร่วมกับ anti-rabbit horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (1:5000) ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้น การแสดงออกของโปรตีน จะถูก visualized โดยใช้ Luminata forte HRP detection reagent (Merck Millipore) และ จะถูกวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยเครื่อง Bio-Rad image analysis system (Quantity One, Bio-Rad, USA)

8. ฤทธิ์ต่อการเกิดอนุมูลอิสระในหลอดเลือด

นำหลอดเลือด aorta ที่แยกหนุ่ทุกกลุ่มมาปั่น (homogenize) ด้วยเครื่อง Homogenizer จากนั้น นำ supernatant วิเคราะห์ปริมาณ lipid peroxidation และ Protein carbonyl ในหลอดเลือด ซึ่งแสดงถึง การเกิดอนุมูลอิสระ และค่า Superoxide dismutase และ glutathione reductase ในหลอดเลือด ซึ่งออก ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งวิเคราะห์โดย Commercial assay kits (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)

9. วิเคราะห์ข้อมูล

จากผลการทดลองนี้ ข้อมูลที่ได้จะอยู่ในรูป $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ค่าการคลายตัวของหลอดเลือดแดง จะวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การตอบสนองเมื่อเทียบกับค่าหดตัวสูงสุดที่กระตุ้นด้วย PE ซึ่งแสดงค่าในรูปของความไวของการตอบสนองของสาร (Sensitivity; pEC_{50}) กับ ค่าการคลายตัวสูงสุด (R_{max}) โดยค่า pEC_{50} จะคำนวณจากกราฟการตอบสนองของหลอดเลือดแดงต่อสาร ACh หรือ SNP โดยแสดงค่าในรูป negative log molar concentration ของสาร ACh หรือ SNP ที่ให้ผลขยายหลอดเลือดที่ 50% ของการคลายตัวสูงสุด ($-\log \text{EC}_{50}$) ซึ่งค่านี้จะถูกคำนวณด้วยโปรแกรม GraphPad Prism version 5 ส่วนค่า R_{max} คือการคลายตัวสูงสุดของหลอดเลือด ที่เกิดจากการให้ ACh หรือ SNP ซึ่งวัดเป็นเปอร์เซ็นต์การคลายตัวเมื่อเทียบกับค่าหดตัวสูงสุดที่กระตุ้นด้วย PE การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ one way analysis of variance (ANOVA) และวัดค่าความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncann test ทดสอบค่าความแตกต่างทางสถิติและค่าระดับความเชื่อมั่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

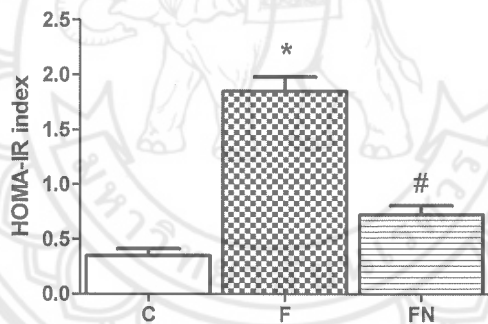
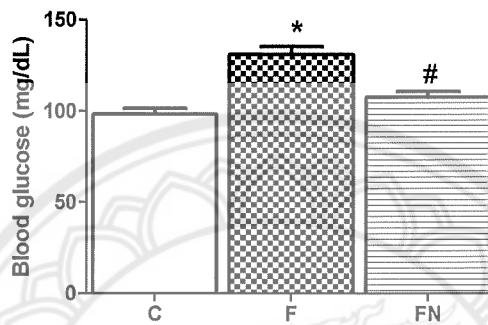
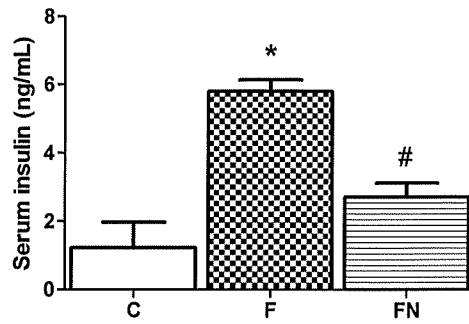
1. ผลต่อน้ำหนักตัว และค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือด

จากตารางที่ 1 ก่อนและหลังสิ้นสุดการทดลอง น้ำหนักตัวของหนูทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะมีค่า blood glucose insulin และค่าดัชนี HOMA-IR มากกว่าหนูกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงถึงการเกิดภาวะดื้ออินซูลินในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส รวมทั้ง หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ยังมีค่า TC triglyceride และ LDL-C มากกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงถึงการเกิดภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส การได้รับสารนารินจินเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะมีผลลดภาวะดื้ออินซูลิน โดยลดระดับ blood glucose insulin และ HOMA-IR และมีผลลดภาวะไขมันในเลือดสูง (Hyperlipidemia) โดยลดค่า TC triglyceride และ LDL-C ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ดังแสดงในตารางที่ 1 และภาพที่ 1

ตารางที่ 1. ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อ น้ำหนักตัว และค่าพารามิเตอร์ต่างๆในเลือดของหนูที่ได้รับ น้ำตาลฟรุคโตส

	C	F	FN
Initial body weight (g)	256 ± 3	250 ± 3	251 ± 2
Final body weight (g)	487 ± 7	535 ± 6	483 ± 6
Blood glucose (mg/dL)	99 ± 9	149 ± 13	114 ± 4
Total cholesterol (mg/dL)	60 ± 7	78 ± 5*	63 ± 3 [#]
Triglyceride (mg/dL)	61 ± 7	82 ± 5*	52 ± 4 [#]
HDL-C (mg/dL)	30 ± 4	26 ± 2	27 ± 1
LDL-C (mg/dL)	24 ± 5	37 ± 2*	26 ± 3 [#]

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ; FN คือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ *P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , #P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F



ภาพที่ 1 ผลของสารนารินจินต่อระดับน้ำตาล (A), อินซูลิน (B) และ ค่าดัชนี HOMA-IR ในเลือดของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ; FN คือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม F

2. ผลต่อการทำงานของหลอดเลือด

โดยประเมินจากการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh และสาร SNP โดยปกติ สาร ACh จะออกฤทธิ์ขยายหลอดเลือด โดยผ่านทางเซลล์ endothelium จากการทดลองพบว่า endothelium-dependent relaxation ต่อ ACh ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเพียงอย่างเดียว (F) จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงถึงความผิดปกติของเซลล์ endothelium ในหนูที่ได้น้ำตาลฟรุคโตสสูง เมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 100 มก/กก/วันเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะทำให้การตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร ACh ในหนูที่ได้น้ำตาลฟรุคโตสเพิ่มขึ้นใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุม แสดงว่า สารนารินจินสามารถช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของ endothelium ในหนูที่ได้น้ำตาลฟรุคโตสสูงได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ ในภาพที่ 2

ส่วนสาร SNP จะออกฤทธิ์ที่เซลล์กล้ามเนื้อเรียบโดยตรงในการขยายตัวของหลอดเลือด ซึ่งพบว่า endothelium-independent relaxation ต่อ SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้น้ำตาลฟรุคโตสสูง จะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่า การให้น้ำตาลฟรุคโตสสูงจะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเซลล์กล้ามเนื้อเรียบของหลอดเลือด และเมื่อให้สารนารินจิน เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ จะไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อ SNP ในหนูที่ได้น้ำตาลฟรุคโตสสูง ดังแสดงในตารางที่ 2 และ ในภาพที่ 3

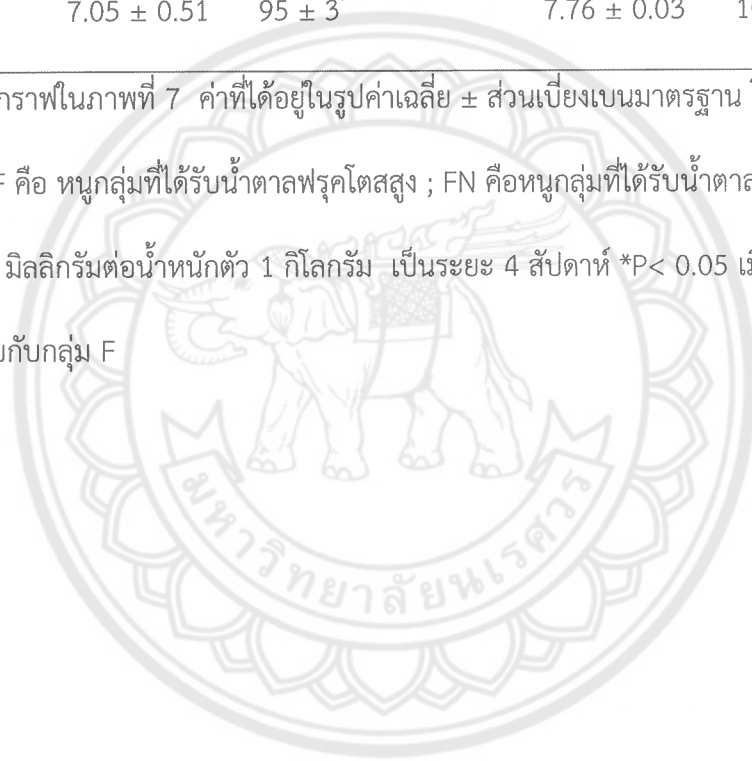
10/11/17

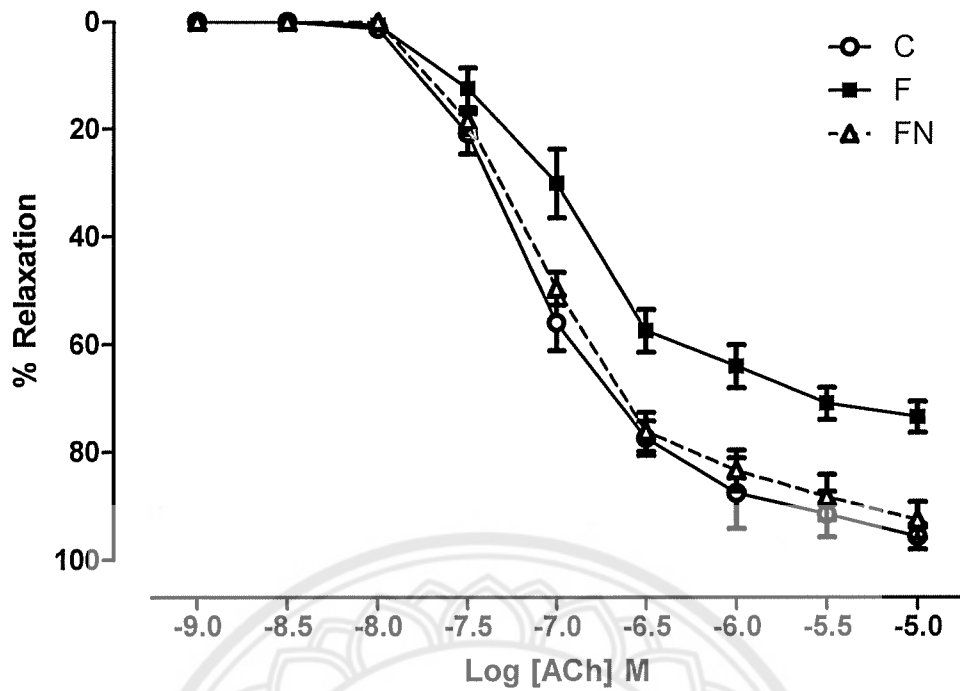
๑ OP
572
15
อ.ป.ร.
๒๕๕๙

ตารางที่ 2 แสดงค่า pEC₅₀ และ R_{max} ต่อสาร ACh และ SNP ของหลอดเลือด aorta ในหนูกลุ่มต่างๆ

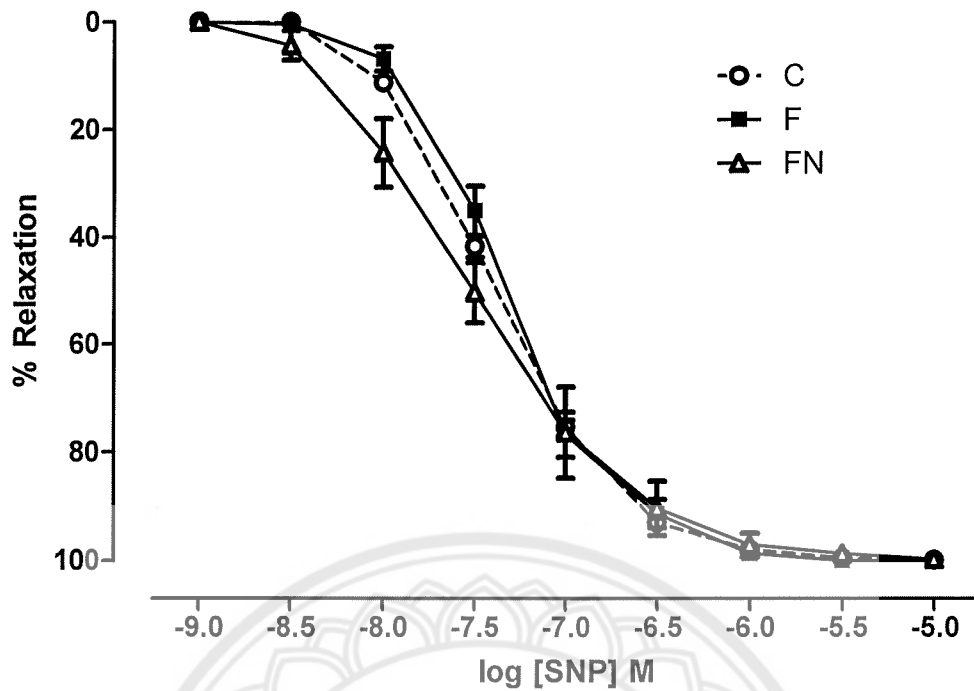
Group	ACh		SNP	
	pEC50	Rmax	pEC50	Rmax
C	7.17 ± 0.09	94 ± 3	7.42 ± 0.13	100 ± 0.1
F	6.91 ± 0.08	73 ± 4*	7.23±0.07	100 ± 0.1
FN	7.05 ± 0.51	95 ± 3 [#]	7.76 ± 0.03	100 ± 0.2

ค่าที่ได้คำนวณจาก กราฟในภาพที่ 7 ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูง ; FN คือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุกโตสสูง ร่วมกับ ป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ *P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , [#] P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F





ภาพที่ 2 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร ACh ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับบิอน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN) โดยกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดที่ถูก pre-contraction ด้วย PE ซึ่งอยู่ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือด ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน



ภาพที่ 3 แสดงการตอบสนองของหลอดเลือดเออร์ตาต่อสาร SNP ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN) โดยกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือดที่ถูก pre-contraction ด้วย PE ซึ่งอยู่ในรูปค่าเปอร์เซ็นต์การคลายตัวของหลอดเลือด ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

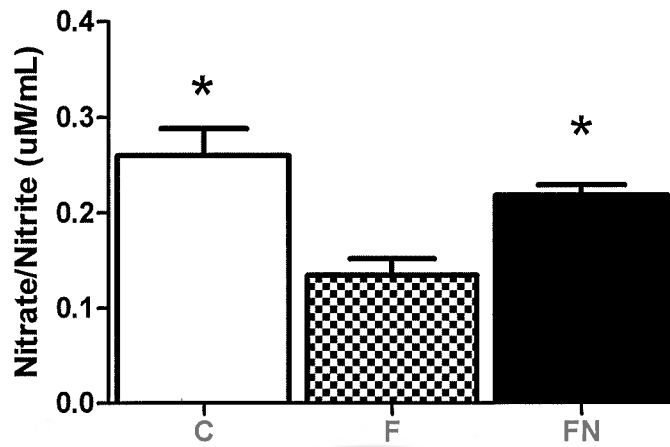
3. ผลต่อปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม

เพื่อประเมินประสิทธิภาพการทำงานของสาร NO ซึ่งหลั่งจากเซลล์ endothelium ในการทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดนั้น จะประเมินจากปริมาณของผลิตภัณฑ์สุดท้ายของสาร nitric oxide คือ สาร nitrate และ nitrite ในการทดลอง พบว่า ปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสจะน้อยกว่าหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การป้อนสาร naringin (100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) จะเพิ่มปริมาณ nitrate และ nitrite ในซีรัม ในหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส (ตารางที่ 3 และ ภาพที่ 4)

ตารางที่ 3 แสดงค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

กลุ่ม	Nitrate/Nitrite ($\mu\text{M}/\text{mL}$)
C	0.26 ± 0.03
F	$0.13 \pm 0.02^*$
FN	$0.21 \pm 0.01^\#$

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ; FN คือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม F



ภาพที่ 4 แสดงค่า Nitrate/Nitrite ในซีรัมของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับบิอน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN) ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม F

4.ผลต่อการเกิดอนุมูลอิสระ

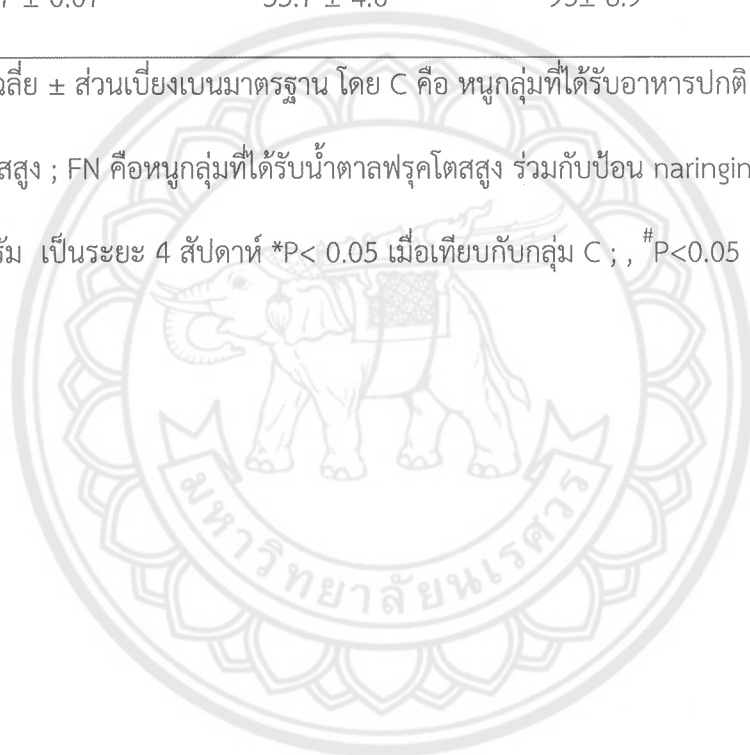
จากตารางที่ 4 แสดงค่า MDA ในซีรัม ซึ่งเป็นค่าบ่งชี้การเกิดภาวะออกซิเดชันของไขมัน (lipid peroxidation) พบว่า หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะมีปริมาณ MDA ในซีรัม และตับมากกว่าหนูที่ได้รับอาหารปกติ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อสารนารินจิน (100 มก/กก) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดปริมาณ MDA ในซีรัม และในตับ แสดงว่า การบริโภคสารนารินจิน อาจช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง นอกจากนี้ ค่า AGEs ซึ่งเป็นผลจากการเกิดไกลเคชันระหว่างน้ำตาลกับโปรตีน จะมีค่าเพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อให้สารนารินจินเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลด AGEs ในซีรัม ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

จากตารางที่ 5 แสดงค่า enzyme ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD และ GPx ในซีรัมและตับ พบว่า ค่า SOD และ GPx ในซีรัมและตับ ในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ที่มีค่าไม่แตกต่างจาก หนูกลุ่มควบคุม เมื่อป้อนสารนารินจิน 100 มก/กก) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ไม่มีผลเปลี่ยนแปลง SOD และ GPx ในซีรัม และตับ ในหนูได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

ตารางที่ 4. ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อระดับ MDA, SOD, GPx, และ AGEs ในซีรัมของหนูที่ได้รับ น้ำตาลฟรุคโตส

กลุ่ม	MDA ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	SOD (U/mL)	GPx ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	AGE (fluorescent units)
C	0.8 ± 0.06	30.3 ± 0.9	90 ± 7.8	51 ± 5
F	$1.3 \pm 0.06^*$	28.9 ± 1.9	80 ± 5.4	$79 \pm 5^*$
FN	$0.7 \pm 0.07^\#$	33.7 ± 4.6	93 ± 8.9	$49 \pm 3^\#$

ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ; FN คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , $^\# P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม F



ตารางที่ 5. ผลของการป้อนสารนารินจิน ต่อระดับ MDA, SOD, และ GPx ในตับของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส

โตส

Group	MDA (nM/mg protein)	SOD (U/mg protein)	GPx (μ U/mg protein)
C	10.5 \pm 1.1	60.3 \pm 4.9	58 \pm 6.7
F	19.1 \pm 2.6*	52.8 \pm 5.8	45 \pm 5.9
FN	12.3 \pm 1.7 [#]	65.9 \pm 6.6	56 \pm 6.1

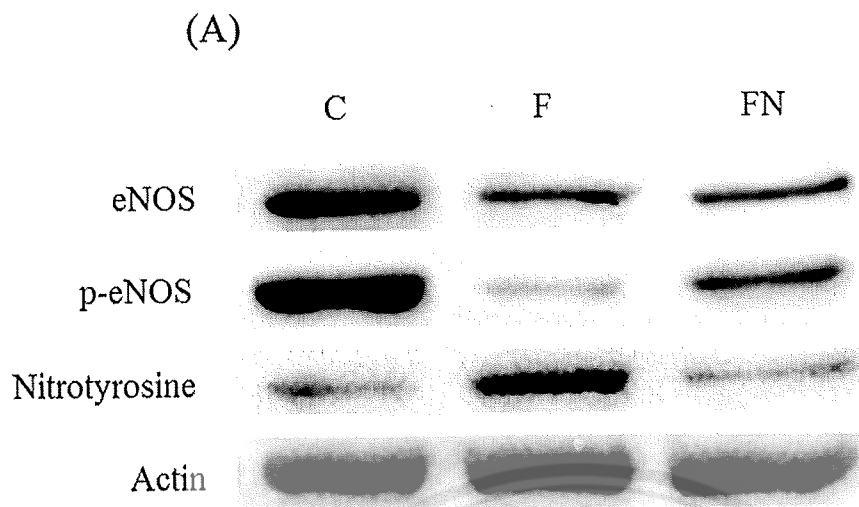
ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดย C คือ หนูกลุ่มที่ได้รับอาหารปกติ ; F คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ; FN คือหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เป็นระยะ 4 สัปดาห์ *P< 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , [#] P<0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่ม F



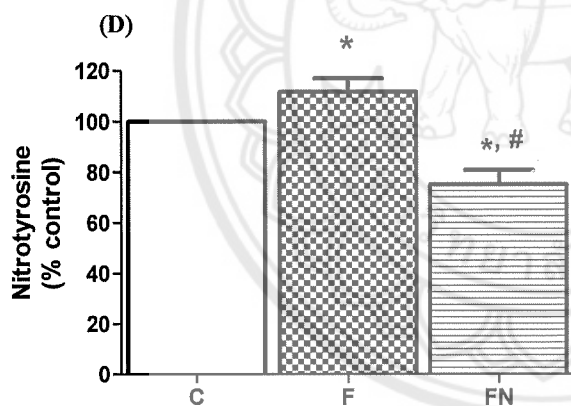
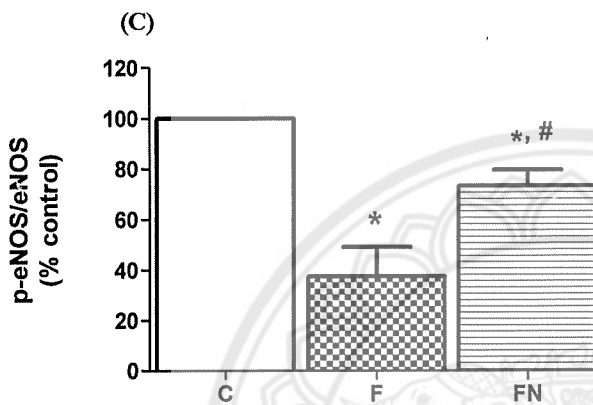
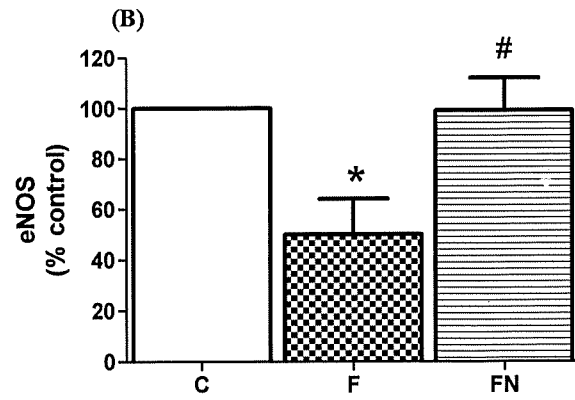
5. ผลต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS, p-eNOS และ nitrotyrosine

จากภาพที่ 5 และ 6 การแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะค่าน้อยกว่าในหลอดเลือดหนูกุ่มควบคุม เมื่อป้อนสารนารินจิน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส นอกจากนี้ ยังพบว่าโปรตีน nitrotyrosine ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิดอนุมูลอิสระ หรือ peroxynitrite ในเนื้อเยื่อ มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเมื่อเทียบกับหนูกุ่มควบคุม และการป้อนสารนารินจิน จะลดการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส





ภาพที่ 5 แสดงภาพ Western blots ของ eNOS, phosphorylated eNOS ที่ตำแหน่ง Ser1177 residue , และ nitrotyrosine ที่หลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN)



ภาพที่ 6 การแสดงออกของ eNOS (ภาพ B), phosphorylated eNOS ที่ตำแหน่ง Ser1177 residue (ภาพ C), และ nitrotyrosine (ภาพ D) ที่หลอดเลือดแดง aorta ของหนูกลุ่มควบคุม (C) , กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง (F), กลุ่มที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง ร่วมกับป้อน naringin 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม (FN) ค่าที่ได้อยู่ในรูปค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน * $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C ; , # $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม F

วิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษานี้ พบว่า การให้สารนารินจิน (100 มก/กก/วัน) เป็น 4 สัปดาห์แก่หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง จะช่วยฟื้นฟูความผิดปกติของการทำงานของหลอดเลือด และเพิ่มปริมาณ nitric oxide ในซีรัม รวมทั้งยังเพิ่มการแสดงออกของ eNOS และ p-eNOS และลดการแสดงออกของ nitrotyrosine ในหลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง

มีรายงานวิจัยว่าหนูทดลองที่ได้รับน้ำดื่มที่ผสมน้ำตาลฟรุคโตส จะเกิดความผิดปกติทางเมตาบอลิซึม เช่น ภาวะไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ภาวะอินซูลินในเลือดสูง ภาวะอ้วน รวมทั้งก่อให้เกิดความผิดปกติเยื่อผนังหลอดเลือด (El-Bassossy, Badawy, Neamatallah, & Fahmy, 2016; Tappy et al., 2010) ความผิดปกติเหล่านี้จะก่อให้เกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (Favero et al., 2014; Lorber, 2014; Nelson, 2013) ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสที่ใช้ในการศึกษานี้จะใกล้เคียงกับปริมาณของน้ำตาลในเครื่องดื่มทั่วไป และมีรายงานว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุคโตสที่ใช้ในการศึกษานี้จะก่อให้เกิดความผิดปกติของเมตาบอลิซึมของน้ำตาลและไขมันและความผิดปกติของการทำงานของหลอดเลือด (Tappy et al., 2010; Ventura, Davis, & Goran, 2011) ในการศึกษานี้ หนูทดลองได้รับ 10% ของน้ำตาลฟรุคโตสผสมในน้ำดื่ม เป็นเวลา 12 สัปดาห์ จะทำให้เกิดภาวะดื้ออินซูลิน ซึ่งวิเคราะห์จากการเพิ่มขึ้นของน้ำตาลและอินซูลินในเลือดและการเพิ่มขึ้นของค่า HOMA-IR นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดภาวะไขมันในเลือดสูง ซึ่งวิเคราะห์จากการเพิ่มขึ้นของคอเลสเตอรอล, LDL และไตรกลีเซอไรด์ ในซีรัม การป้อนสารนารินจินในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสสูง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะลดภาวะดื้ออินซูลินและภาวะไขมันในเลือดสูงได้

มีรายงานวิจัยพบว่าสารนารินจินสามารถลดความผิดปกติทางเมตาบอลิซึมเหล่านี้ในสัตว์ทดลอง การศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสารนารินจินลดระดับน้ำตาลและไขมันในเลือดในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเบาหวานและภาวะ metabolic syndrome (Adebiji et al., 2016; Chanet et al., 2012; Pu et al., 2012) จากการทดลองในหนูเบาหวาน ชนิดที่ 2 พบว่าสารนารินจินลดไขมันและน้ำตาลในเลือด โดยการควบคุมเมตาบอลิซึม

ลิซิมของไขมัน และมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมเมทาบอลิซึมของน้ำตาลกลูโคส (Jung, Lee, Park, Kang, & Choi, 2006) จากการทดลองในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง สารนารินจินสามารถกระตุ้น AMPK-mediated MAPKs signaling ซึ่งจะส่งผลให้ลดภาวะดื้ออินซูลิน น้ำตาลในเลือดสูงและไขมันในเลือดสูง (Pu et al., 2012)

ทั้งภาวะไขมันในเลือดสูง ภาวะน้ำตาลในเลือดสูง และภาวะดื้ออินซูลิน ล้วนแล้วแต่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อผนังหลอดเลือด ซึ่งถือว่าเป็นอาการแสดงเริ่มต้นของภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) และโรคหัวใจและหลอดเลือด (Huang et al., 2013; Tabit, Chung, Hamburg, & Vita, 2010) การลดลงของความสามารถของหลอดเลือดในการขยายตัวแบบที่ขึ้นกับเยื่อหลอดเลือด ถือว่าเป็นอาการแสดงที่สำคัญของความผิดปกติในการทำงานของเยื่อหลอดเลือด ภาวะปกติเยื่อหลอดเลือดจะมีบทบาทสำคัญในการควบคุมขนาดของหลอดเลือด โดยสร้างและหลั่งสารที่มีฤทธิ์ขยายหลอดเลือด เช่น สาร nitric oxide (NO), prostaglandin I₂ (PGI₂), และ endothelium derived hyperpolarizing factor (EDHF) (Vanhoutte et al., 2017) มีรายงานวิจัย พบว่า สาร NO ที่หลั่งจากเยื่อหลอดเลือด มีบทบาทเด่นในการขยายหลอดเลือด aorta และมักจะมีปริมาณลดลง ในพยาธิสภาพต่างๆ เช่น ภาวะไขมันในเลือดสูง metabolic syndrome เบาหวาน และความดันเลือดสูง มีการศึกษา พบว่า การได้รับน้ำตาลฟรุคโตสปริมาณสูง จะส่งผลให้เยื่อหลอดเลือดผิดปกติ โดยจะเกี่ยวข้องกับการลดลงของ NO ในหลอดเลือด (El-Bassossy et al., 2016; Pektas et al., 2015)

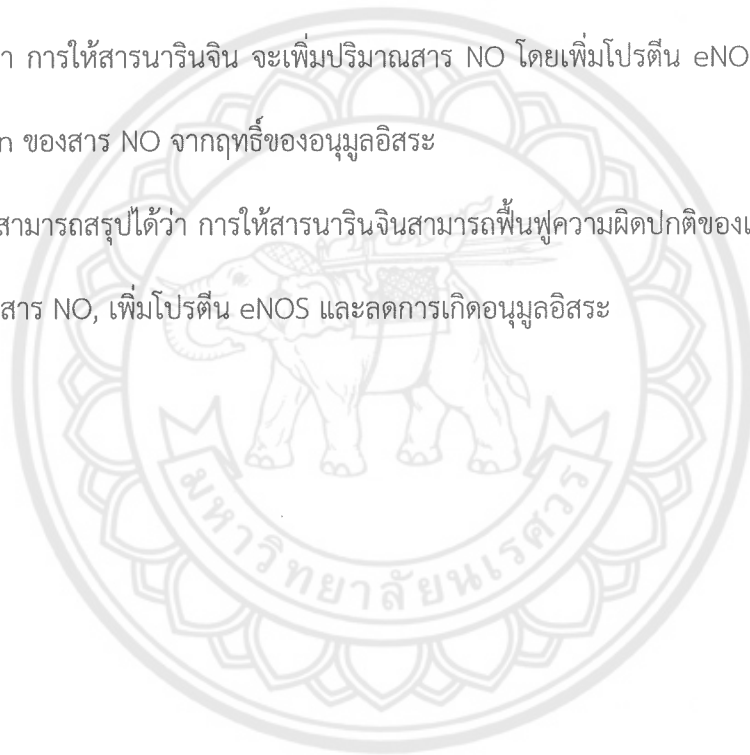
การศึกษานี้ พบว่าหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส จะมีการคลายตัวของหลอดเลือดที่ชักนำโดยสาร Ach ลดลง ขณะที่การคลายตัวของหลอดเลือดที่ชักนำโดยสาร SNP ไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าน้ำตาลฟรุคโตส จะก่อให้เกิดความผิดปกติของการคลายตัวของหลอดเลือดที่ขึ้นกับเยื่อหลอดเลือด ซึ่งผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (Babacanoglu et al., 2013; Develi-Is et al., 2014) นอกจากนี้ ในการศึกษานี้ ความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือดของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ยังสอดคล้องกับการลดลงของปริมาณสาร NO ในซีรัมของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส

มีรายงานวิจัย พบว่า สารนารินจิน สามารถฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือดในหนูที่มีภาวะความดันเลือดสูง และในหนูที่ได้รับอาหารไขมันสูง (Alam et al., 2013; Ikemura et al., 2012) ในการศึกษาี้ เมื่อป้อนสารนารินจินให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส พบว่าจะเพิ่มการคลายตัวของหลอดเลือด จนมีค่าใกล้เคียงกับการคลายตัวของหลอดเลือดในหนูกลุ่มควบคุม รวมทั้งสารนารินจินยังเพิ่มปริมาณสาร NO ในซีรัมของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ดังนั้น จากผลการทดลองข้างต้น จึงเป็นไปได้ว่าฤทธิ์ของสารนารินจินในการฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด เกิดจากความสามารถของสารนารินจินในการเพิ่มสาร NO ในหลอดเลือด

สาร NO ที่เพิ่มขึ้นในหลอดเลือด อาจเป็นผลจากการเพิ่มการสร้างสาร NO หรือ การลดการทำลายของสาร NO โดยอนุมูลอิสระ โดยปกติ การสร้างสาร NO จะขึ้นกับเอนไซม์ eNOS ซึ่งจะถูกระตุ้นโดยการ phosphorylation ที่ตำแหน่ง Ser 1177, Ser633 หรือ Ser 614 มีรายงานวิจัย พบว่า การ phosphorylation เอนไซม์ eNOS ที่ตำแหน่ง Ser 1177 จะเป็นเป้าหมายสำคัญในการฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด (S. Li et al., 2015; Yu et al., 2012) นอกจากนี้ ยังมีรายงานวิจัย พบว่าการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ สามารถลดปริมาณของสาร NO ได้ โดยอนุมูลอิสระ เช่น superoxide จะทำปฏิกิริยากับสาร NO กลายเป็นสารอนุมูลอิสระ peroxynitrite ที่มีฤทธิ์ร้ายแรงกว่าเดิม (Zhao et al., 2015) ซึ่งในการทดลองนี้ พบว่า MDA ซึ่งแสดงถึงการเกิด lipid peroxidation ในซีรัมในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเพิ่มสูงขึ้น รวมทั้ง ยังพบการแสดงออกของ nitrotyrosine ที่หลอดเลือดในหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเพิ่มขึ้น ซึ่งโปรตีน nitrotyrosine จะเป็นตัวบ่งชี้การเกิด peroxynitrite ในเนื้อเยื่อ มีรายงานวิจัยพบว่า หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสจะมีการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS ในหลายเนื้อเยื่อ รวมทั้งในหลอดเลือดแดง aorta นอกจากนี้ ยังเพิ่มปริมาณของ peroxynitrite ซึ่งเป็นผลจากการเพิ่มการสร้างอนุมูลอิสระ superoxide และเพิ่มการสร้าง methyglyoxal (Stanisic et al., 2016; Wang et al., 2006; Xu, Tu, Wang, Fang, & Wang, 2011)

ในการศึกษานี้ พบการลดลงของโปรตีน eNOS และ p-eNOS และการเพิ่มขึ้นของโปรตีน nitrotyrosine ในหลอดเลือด aorta ของหนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตส ซึ่งผลการทดลองนี้จะสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบการลดลงของการคลายตัวของหลอดเลือดแบบขึ้นกับเยื่อหลอดเลือดและการลดลงของสาร NO ในซีรัม มีงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่า สารนารินจินสามารถเพิ่มการแสดงออกของและ p-eNOS (Ser1177) และลดการแสดงออกของ nitrotyrosine ในกล้ามเนื้อหัวใจที่ถูกชักนำให้เกิดภาวะขาดเลือด (Rani et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า การป้อนสารนารินจินให้หนูที่ได้รับน้ำตาลฟรุคโตสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ จะเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS (Ser1177) และลดการแสดงออกของ nitrotyrosine ในหลอดเลือด แสดงให้เห็นว่า การให้สารนารินจิน จะเพิ่มปริมาณสาร NO โดยเพิ่มโปรตีน eNOS และ p-eNOS และลดการ inactivation ของสาร NO จากฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ

งานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่า การให้สารนารินจินสามารถฟื้นฟูความผิดปกติของเยื่อหลอดเลือด โดยการเพิ่มปริมาณของสาร NO, เพิ่มโปรตีน eNOS และลดการเกิดอนุมูลอิสระ



เอกสารอ้างอิง

- Adebiyi, O. A., Adebiyi, O. O., & Owira, P. M. (2016). Naringin Reduces Hyperglycemia-Induced Cardiac Fibrosis by Relieving Oxidative Stress. *PLoS One*, 11(3), e0149890. doi: 10.1371/journal.pone.0149890
- Alam, M. A., Kauter, K., & Brown, L. (2013). Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. *Nutrients*, 5(3), 637-650. doi: 10.3390/nu5030637
- Babacanoglu, C., Yildirim, N., Sadi, G., Pektas, M. B., & Akar, F. (2013). Resveratrol prevents high-fructose corn syrup-induced vascular insulin resistance and dysfunction in rats. *Food Chem Toxicol*, 60, 160-167. doi: 10.1016/j.fct.2013.07.026
- Chanet, A., Milenkovic, D., Deval, C., Potier, M., Constans, J., Mazur, A., . . . Berard, A. M. (2012). Naringin, the major grapefruit flavonoid, specifically affects atherosclerosis development in diet-induced hypercholesterolemia in mice. *J Nutr Biochem*, 23(5), 469-477. doi: 10.1016/j.jnutbio.2011.02.001
- Develi-Is, S., Ozen, G., Bekpinar, S., Topal, G., Unlucerci, Y., Dogan, B. S., & Uysal, M. (2014). Resveratrol improves high-fructose-induced vascular dysfunction in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 92(12), 1021-1027. doi: 10.1139/cjpp-2014-0245
- El-Bassossy, H., Badawy, D., Neamatallah, T., & Fahmy, A. (2016). Ferulic acid, a natural polyphenol, alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent relaxation. *Chem Biol Interact*, 254, 191-197. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.013

- Fadel, P. J. (2017). Nitric Oxide and Cardiovascular Regulation: Beyond the Endothelium. *Hypertension*. doi: 10.1161/hypertensionaha.117.08999
- Favero, G., Paganelli, C., Buffoli, B., Rodella, L. F., & Rezzani, R. (2014). Endothelium and its alterations in cardiovascular diseases: life style intervention. *Biomed Res Int*, 2014, 801896. doi: 10.1155/2014/801896
- Huang, Q., Qin, L., Dai, S., Zhang, H., Pasula, S., Zhou, H., . . . Min, W. (2013). AIP1 suppresses atherosclerosis by limiting hyperlipidemia-induced inflammation and vascular endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 33(4), 795-804. doi: 10.1161/atvbaha.113.301220
- Ikemura, M., Sasaki, Y., Giddings, J. C., & Yamamoto, J. (2012). Preventive effects of hesperidin, glucosyl hesperidin and naringin on hypertension and cerebral thrombosis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Phytother Res*, 26(9), 1272-1277. doi: 10.1002/ptr.3724
- Jia, G., Aroor, A. R., Whaley-Connell, A. T., & Sowers, J. R. (2014). Fructose and uric acid: is there a role in endothelial function? *Curr Hypertens Rep*, 16(6), 434. doi: 10.1007/s11906-014-0434-z
- Johnson, R. J., Segal, M. S., Sautin, Y., Nakagawa, T., Feig, D. I., Kang, D. H., . . . Sanchez-Lozada, L. G. (2007). Potential role of sugar (fructose) in the epidemic of hypertension, obesity and the metabolic syndrome, diabetes, kidney disease, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*, 86(4), 899-906.

- Jung, U. J., Lee, M. K., Park, Y. B., Kang, M. A., & Choi, M. S. (2006). Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(7), 1134-1145. doi: 10.1016/j.biocel.2005.12.002
- Kho, M. C., Lee, Y. J., Cha, J. D., Choi, K. M., & Kang, D. G. (2014). Gastrodia elata Ameliorates High-Fructose Diet-Induced Lipid Metabolism and Endothelial Dysfunction. 2014, 101624. doi: 10.1155/2014/101624
- Li, S., Li, Q., Lv, X., Liao, L., Yang, W., Li, S., . . . Zhu, D. (2015). Aurantio-obtusin relaxes systemic arteries through endothelial PI3K/AKT/eNOS-dependent signaling pathway in rats. *J Pharmacol Sci*, 128(3), 108-115. doi: 10.1016/j.jphs.2015.05.006
- Li, W., Wang, C., Peng, J., Liang, J., Jin, Y., Liu, Q., . . . Sun, H. (2014). Naringin inhibits TNF-alpha induced oxidative stress and inflammatory response in HUVECs via Nox4/NF-kappa B and PI3K/Akt pathways. *Curr Pharm Biotechnol*, 15(12), 1173-1182.
- Litterio, M. C., Vazquez Prieto, M. A., Adamo, A. M., Elesgaray, R., Oteiza, P. I., Galleano, M., & Fraga, C. G. (2015). (-)-Epicatechin reduces blood pressure increase in high-fructose-fed rats: effects on the determinants of nitric oxide bioavailability. *J Nutr Biochem*, 26(7), 745-751. doi: 10.1016/j.jnutbio.2015.02.004
- Lorber, D. (2014). Importance of cardiovascular disease risk management in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 7, 169-183. doi: 10.2147/dmso.s61438
- Nelson, R. H. (2013). Hyperlipidemia as a risk factor for cardiovascular disease. *Prim Care*, 40(1), 195-211. doi: 10.1016/j.pop.2012.11.003

- Pektas, M. B., Sadi, G., & Akar, F. (2015). Long-Term Dietary Fructose Causes Gender-Different Metabolic and Vascular Dysfunction in Rats: Modulatory Effects of Resveratrol. *Cell Physiol Biochem*, 37(4), 1407-1420. doi: 10.1159/000430405
- Pu, P., Gao, D. M., Mohamed, S., Chen, J., Zhang, J., Zhou, X. Y., . . . Jiang, H. (2012). Naringin ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat diet. *Arch Biochem Biophys*, 518(1), 61-70. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.026
- Rani, N., Bharti, S., Manchanda, M., Nag, T. C., Ray, R., Chauhan, S. S., . . . Arya, D. S. (2013). Regulation of heat shock proteins 27 and 70, p-Akt/p-eNOS and MAPKs by Naringin Dampens myocardial injury and dysfunction in vivo after ischemia/reperfusion. *PLoS One*, 8(12), e82577. doi: 10.1371/journal.pone.0082577
- Sharma, A. K., Bharti, S., Ojha, S., Bhatia, J., Kumar, N., Ray, R., . . . Arya, D. S. (2011). Up-regulation of PPARgamma, heat shock protein-27 and -72 by naringin attenuates insulin resistance, beta-cell dysfunction, hepatic steatosis and kidney damage in a rat model of type 2 diabetes. *Br J Nutr*, 106(11), 1713-1723. doi: 10.1017/s000711451100225x
- Stanisic, J., Koricanac, G., Culafic, T., Romic, S., Stojiljkovic, M., Kostic, M., . . . Tepavcevic, S. (2016). Low intensity exercise prevents disturbances in rat cardiac insulin signaling and endothelial nitric oxide synthase induced by high fructose diet. *Mol Cell Endocrinol*, 420, 97-104. doi: 10.1016/j.mce.2015.11.032

- Tabit, C. E., Chung, W. B., Hamburg, N. M., & Vita, J. A. (2010). Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord*, 11(1), 61-74. doi: 10.1007/s11154-010-9134-4
- Tappy, L., Le, K. A., Tran, C., & Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: new findings, new questions. *Nutrition*, 26(11-12), 1044-1049. doi: 10.1016/j.nut.2010.02.014
- Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M., & Tang, E. H. (2017). Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol (Oxf)*, 219(1), 22-96. doi: 10.1111/apha.12646
- Ventura, E. E., Davis, J. N., & Goran, M. I. (2011). Sugar content of popular sweetened beverages based on objective laboratory analysis: focus on fructose content. *Obesity (Silver Spring)*, 19(4), 868-874. doi: 10.1038/oby.2010.255
- Wang, H., Meng, Q. H., Chang, T., & Wu, L. (2006). Fructose-induced peroxynitrite production is mediated by methylglyoxal in vascular smooth muscle cells. *Life Sci*, 79(26), 2448-2454. doi: 10.1016/j.lfs.2006.08.009
- Xu, X., Tu, L., Wang, L., Fang, X., & Wang, D. W. (2011). CYP2J3 gene delivery reduces insulin resistance via upregulation of eNOS in fructose-treated rats. *Cardiovasc Diabetol*, 10, 114. doi: 10.1186/1475-2840-10-114
- Yu, L., Liu, Y., Qiu, Z., Liu, S., Gao, X., & Zhu, D. (2012). Cellular mechanisms and intracellular signaling pathways for the modulation of eNOS in pulmonary arteries by 15-HETE. *J Recept Signal Transduct Res*, 32(2), 87-95. doi: 10.3109/10799893.2012.660530

Zhao, Y., Vanhoutte, P. M., & Leung, S. W. (2015). Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *J*

Pharmacol Sci, 129(2), 83-94. doi: 10.1016/j.jphs.2015.09.002



ภาคผนวก 1

Output ของโครงการ

1. Effect of Naringin on Insulin Resistance and Oxidative Stress In Fructose Fed Rats. ตีพิมพ์วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Naresuan University Journal:Science and Technology) ปีที่ 26 ฉบับที่ 2 ประจำเดือนเมษายน-มิถุนายน 2561 กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ (แนบเอกสารตอบรับการตีพิมพ์)





บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานเลขาธิการบัณฑิตวิทยาลัย งานวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ โทร.๘๘๓๕

ที่ ศธ ๐๕๒๗.๐๒/๒๔๗๗

วันที่ ๒๑ กรกฎาคม ๒๕๖๐

เรื่อง ตอบรับการตีพิมพ์บทความ

เรียน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วชิราวดี มาลากุล

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานนิพนธ์เรื่อง “Effect of Naringin on Insulin Resistance and Oxidative Stress in Fructose Fed Rats” เพื่อขอลงตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (Naresuan University Journal: Science and Technology) นั้น

ผลงานนิพนธ์ของท่านได้ผ่านการพิจารณาโดยผู้ทรงคุณวุฒิเรียบร้อยแล้ว และได้รับการพิจารณาให้ลงตีพิมพ์ในวารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ ๒๖ ฉบับที่ ๒ ประจำเดือนเมษายน – มิถุนายน ๒๕๖๑ กลุ่มสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพ ทั้งนี้ ทางวารสารจะดำเนินการจัดทำวารสารอิเล็กทรอนิกส์ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้นิพนธ์และเพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งท่านสามารถดาวน์โหลดบทความต้นฉบับของท่านได้จาก www.journal.nu.ac.th

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชัย วิทยาอารีย์กุล)

รองคณบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์ ปฏิบัติราชการแทน

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

1 Effect of naringin on insulin resistance and oxidative stress in fructose fed rats

2 Wachirawadee Malakul ^{1,*}, Sirinat Pengnet¹

3 Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok 65000

4 *Corresponding author email: wachirawadeem@hotmail.com

5

6

Abstract

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

Consumption of fructose is associated with the development of insulin resistance. Naringin, the major grapefruit flavonoid, has antioxidant, lipid lowering, insulin sensitizing, and cardiovascular protective activities. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of naringin treatment on insulin resistance and oxidative stress in fructose fed rats. Male rats were divided into three groups: control (C), fructose (F), and fructose+ naringin (FN). Fructose fed rats received 10% fructose (w/v) in the drinking water for 12 weeks. Naringin (100 mg/kg/day) was orally administered for the final 4 weeks of the study. At the end of the study, the levels of insulin and blood glucose, as well as an insulin resistance index (HOMA-IR) were determined. Hepatic and serum levels of malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzyme, including superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) activities were measured. Results showed that fructose-fed rats exhibited a significant increase in serum insulin, glucose, and HOMA-IR index. Fructose feeding also increased hepatic and serum MDA levels. Treatment of the fructose-fed rats with naringin reversed these alterations. These results suggest that naringin treatment for 4 weeks improves high fructose induced insulin resistance and oxidative stress in rats.

18

Keywords: Naringin, Fructose, Insulin resistance, Oxidative stress

19

20

Introduction

21

22

23

24

25

26

27

28

The use of fructose in soft drinks and food products is dramatically increased in recent decades (Tappy, Le, Tran, & Paquot, 2010). It is now widely recognized that both sedentary lifestyle and unhealthy dietary habits contribute to the development of metabolic disorders (Stanhope, 2016). There is increasing evidence that the consumption of high amounts of fructose, mainly through soft drinks, increases the risk of metabolic disturbance including hyperglycemia, insulin resistance, and hyperinsulinemia (Ferder, Ferder, & Inserra, 2010; Ter Horst, Schene, Holman, Romijn, & Serlie, 2016). Insulin resistance is a pathological condition in which tissues cannot fully respond to the hormone insulin. This hormone regulates the blood

29 glucose levels in body by promoting glucose uptake into body cells and regulating carbohydrate and protein
30 metabolism Insulin resistance plays an important role in the initiation of type 2 diabetes, a major risk factor
31 for cardiovascular disease (Tangvarasittichai, 2015; Tran, Yuen, & McNeill, 2009).

32 There is evidence demonstrated that oxidative stress is closely associated with insulin resistance
33 (Rains & Jain, 2011; Tangvarasittichai, 2015). An elevation of reactive oxygen species (ROS) generation
34 results in damage to lipid, protein, and other molecules, which may contribute to the development of insulin
35 resistance (Rains & Jain, 2011; Tangvarasittichai, 2015). Fructose consumption has also been reported to
36 increase oxidative stress and induce insulin resistance (Hininger-Favier, Benaraba, Coves, Anderson, &
37 Roussel, 2009; Murunga et al., 2016). There are several studies demonstrating that administration of
38 antioxidant agents to rodents can decrease plasma insulin, glucose, and ameliorate insulin resistance in fructose
39 fed conditions (Faure et al., 1997; Hininger-Favier et al., 2009; Suwannaphet, Meeprom, Yibchok-Anun, &
40 Adisakwattana, 2010). Therefore, a decrease in ROS formation might be a therapeutic approach to reduce
41 fructose induced insulin resistance.

42 Naringin (4',5,7-trihydroxyflavanone 7-rhamnoglucoside), the major compound of flavonoid found
43 in grapefruit, is reported to possess beneficial pharmacological effects, including antihyperlipidemic,
44 antioxidant, and antihyperglycemic activities in vivo models (Adebiyi, Adebiyi, & Owira, 2016; Alam,
45 Kauter, & Brown, 2013; A. M. Mahmoud, Ashour, Abdel-Moneim, & Ahmed, 2012; Pu et al., 2012). In
46 animal experiments, naringin could also improve insulin signaling (Alam et al., 2013). However, no studies
47 were undertaken on the effect of naringin against high fructose-induced insulin resistance and oxidative
48 stress. Therefore, the aim of present study was to investigate whether naringin treatment reduces insulin
49 resistance and oxidative stress in fructose fed rats.

50

51

52

Methods and Materials

53

Chemicals

54 Naringin, fructose, and carboxymethylcellulose (CMC) were purchased from Sigma Chemical Co.
55 (St. Louis, MO, USA). Rat/Mouse Insulin ELISA kit was obtained from Merck Milipore (Madrid, Spain).
56 Naringin was dissolved in 0.1% CMC before use.

57 **Animals and experimental protocol**

58 Male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 180–200 g were obtained from the National Laboratory
59 Animal Center, Mahidol University, Bangkok, Thailand. All animals used in this study were housed at a
60 constant temperature of 20 – 22°C, with a 12-h light-dark cycle and were allowed free access to tap water
61 and the standard rat chow for one week. After acclimatization, rats were randomly divided into the following
62 groups (8 rats per group): control (C), receiving tap water *ad libitum*; fructose (F), receiving fructose
63 solution and vehicle 0.1% CMC; and fructose+naringin (FN), receiving fructose solution and naringin (100
64 mg/kg body weight/d). Fructose solution was administered to the rats as 10% fructose (w/v) in drinking
65 water *ad libitum* for 12 weeks. Naringin (100 mg/kg body weight /d) was dissolved in 0.1% CMC and
66 orally administrated to rats during the last four weeks of fructose feeding. The consumed fructose solution were
67 measured daily. All animal procedures were performed within the institutional guidelines for the care and use
68 of laboratory animals and were approved by the Animal Ethics Committee of Naresuan University, Thailand.

69 **Sample preparation**

70 At the end of 12 weeks of fructose feeding, overnight fasted rats were euthanized with
71 intraperitoneal pentobarbital (50 mg/kg). Blood samples were collected by cardiac puncture and subsequently
72 centrifuged at 10,000g for 15 min at 4 °C. Serum supernatants were subsequently separated for biochemical
73 analysis. Liver tissue of animals was rapidly dissected and immediately homogenized in ice cold phosphate
74 buffer (50 mm, pH 7.4). The homogenate was then centrifuged at 3000 g for 20 min at 4 °C and the
75 supernatant was collected for subsequent measurement of MDA, SOD, and GPx.

76 **Measurement of glucose, insulin and advanced glycation end products (AGEs)**

77 Fasting blood glucose levels were measured using a glucometer (Accu-Chek, Roche Diagnostic,
78 France). The total insulin concentration in the serum was measured by using Rat/Mouse Insulin ELISA kit
79 (Merck Milipore, Madrid, Spain) according to manufacturer's instructions. Insulin resistance was determined
80 using the homeostasis model assessment index for insulin resistance (HOMA-IR) formula: HOMA-IR =

81 [fasting insulin (ng/ml) x fasting glucose (mg/dL)] /405 (Chutia & Lynrah, 2015). The serum AGE
82 formation was determined according to a previous method (El-Bassossy, Badawy, Neamatallah, & Fahmy,
83 2016). Briefly, serum was diluted in saline (1:15 v/v) and the fluorescence intensity was measured at an
84 excitation wavelength of 370 nm and emission wavelength of 440 nm.

85 **Determination of oxidative stress.**

86 Level of malondialdehyde (MDA) was determined using the TBRAS assay kit (Cayman Chemical,
87 Ann Arbor, MI, USA). Briefly, supernatants from liver homogenates or serum (0.1 mL) was mixed with a
88 sodium dodecyl sulfate solution (0.1 mL) and color reagent (4 mL). The reaction mixture was heated in a
89 boiling water bath at 95°C for 60 minutes and then rapidly cooled. After centrifugation, the absorbance of the
90 supernatant was measured at 532 nm.

91 The activity of superoxide dismutase (SOD) in the liver homogenates and serum was determined
92 using the superoxide dismutase kit (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) in accordance with the
93 manufacturer's instructions. Briefly, supernatants from liver homogenates or serum was suspended in radical
94 detector. The reaction was started by addition of xanthine oxidase. After an incubation of 30 minutes at room
95 temperature, the absorbance was measured at 450 nm.

96 The glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using a GPx assay kit (Cayman Chemical,
97 Ann Arbor, MI, USA) according to the manufacturer's protocol. Briefly, supernatants from liver homogenates
98 or serum (20 µL) was mixed with 100 µL of assay buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, containing 5 mM
99 EDTA) and 50 µL of co-substrate mixture (lyophilized powder of NADPH, glutathione, and glutathione
100 reductase). The reaction was initiated by addition of cumene hydroperoxide (20 µL). Absorbance at 340nm
101 was measured at 60 sec intervals for 6 min.

102 **Statistics**

103 Results are expressed as the mean ± SEM. Data were analyzed by one-way analysis of variance
104 (ANOVA) followed by Dunnett's test (GraphPad Prism 4.0 software, San Diego, USA). *P* < 0.05 was
105 considered statistically significant.

106

107

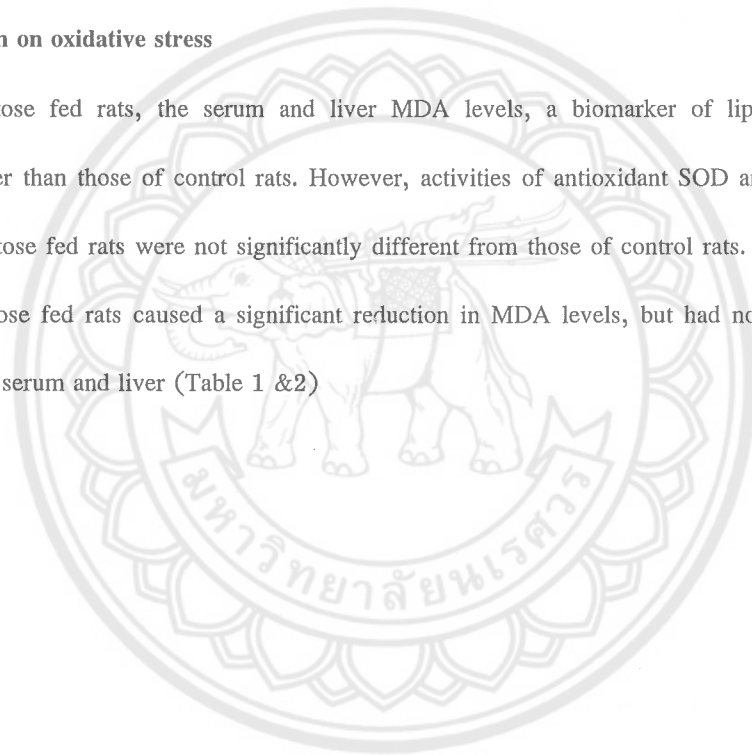
Results

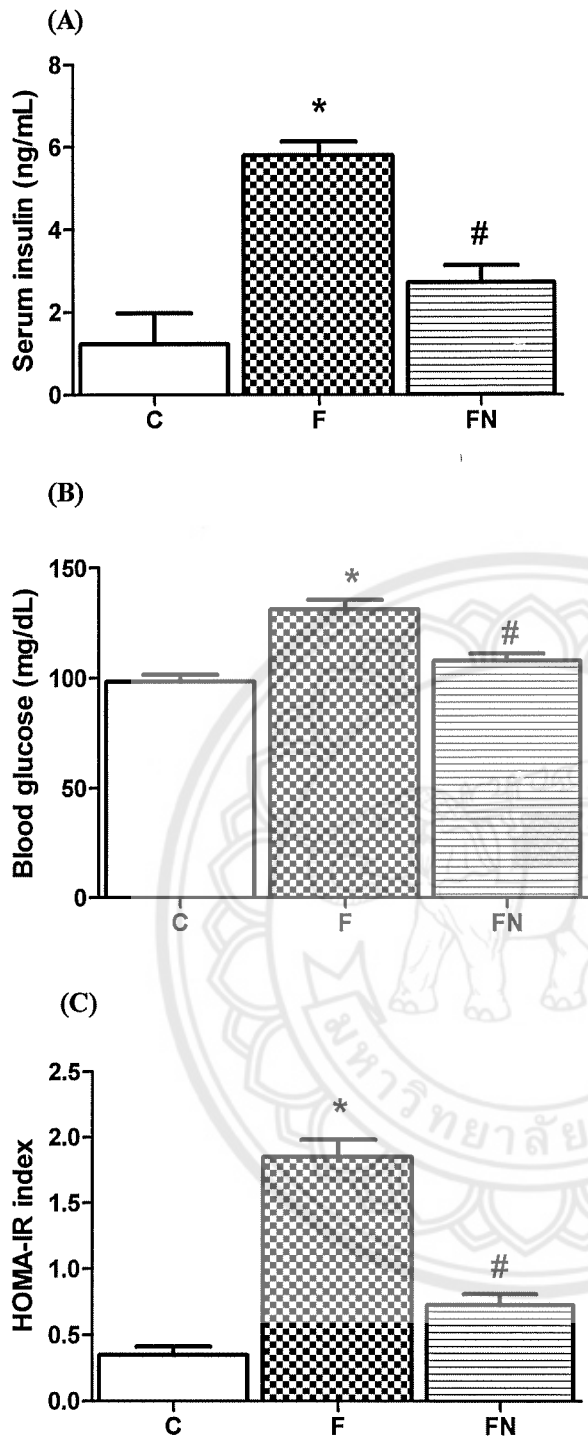
108 **Effect of naringin on blood glucose, insulin and advanced glycation end products (AGEs)**

109 There was no difference in fluid intake among the three experimental groups (control 43 ± 6 ; fructose
110 37 ± 8 ; fructose+naringin 38 ± 7 mL/day/rat). Rats treated with 10% (w/v) fructose in drinking water
111 significantly increased levels of blood glucose and serum insulin, and HOMA-IR index when compared to
112 control group. Treatment with naringin for 4 weeks reversed these parameters in fructose fed rats (Figure 1).
113 Serum AGEs formation of the F group significantly increased in comparison with that of the C group.
114 However, treatment of fructose fed rats with naringin decreased fructose induced AGE formation (Table 1).

115 **Effect of naringin on oxidative stress**

116 In fructose fed rats, the serum and liver MDA levels, a biomarker of lipid peroxidation, were
117 statistically higher than those of control rats. However, activities of antioxidant SOD and GPx in both serum
118 and liver of fructose fed rats were not significantly different from those of control rats. Oral administration of
119 naringin to fructose fed rats caused a significant reduction in MDA levels, but had no effect on antioxidant
120 activities in both serum and liver (Table 1 & 2)





121

122 **Figure 1** Effect of naringin treatment on the levels of blood glucose (A), serum insulin (B), and HOMA-IR index (C) in
 123 fructose fed rats. Data are expressed as mean \pm SEM (n=8 in each group). Control(C), fructose fed rats (F), fructose fed rats
 124 treated with naringin (100 mg/kg/day) (FN). *P < 0.05 as compared to control; #P < 0.05 as compared to fructose.

125

126

127 **Table 1** Effect of daily oral administration of naringin on levels of serum MDA, SOD, GPx, and AGEs in fructose-fed rats

128

Group	MDA ($\mu\text{M}/\text{mL}$)	SOD (U/mL)	GPx ($\mu\text{U}/\text{mL}$)	AGE (fluorescent units)
C	0.8 \pm 0.06	30.3 \pm 0.9	90 \pm 7.8	51 \pm 5
F	1.3 \pm 0.06*	28.9 \pm 1.9	80 \pm 5.4	79 \pm 5*
FN	0.7 \pm 0.07 [#]	33.7 \pm 4.6	93 \pm 8.9	49 \pm 3 [#]

129 Values are expressed as the mean \pm SEM; *P < 0.05 compared with control group; #P < 0.05 compared with F group.

130

131 **Table 2** Effect of daily oral administration of naringin on levels of hepatic MDA, SOD, and GPx in fructose-fed rats

Group	MDA (nM/mg protein)	SOD (U/mg protein)	GPx ($\mu\text{U}/\text{mg protein}$)
C	10.5 \pm 1.1	60.3 \pm 4.9	58 \pm 6.7
F	19.1 \pm 2.6*	52.8 \pm 5.8	45 \pm 5.9
FN	12.3 \pm 1.7 [#]	65.9 \pm 6.6	56 \pm 6.1

132 Values are expressed as the mean \pm SEM; *P < 0.05 compared with control group; #P < 0.05 compared with F group.

133

134

Discussion

135

136

137

138

139

140

141

142

143

144

145

146

Chronic consumption of dietary sugars is associated with accelerating insulin resistance which precedes the development of type 2 diabetes (Shanik et al., 2008). Insulin resistance refers to the condition of reduced cellular sensitivity to hormone insulin, which mediates glucose uptake. This leads to decreased glucose metabolism and increased blood glucose concentration. The decreased responsiveness of tissues to insulin leads to the pancreas compensation and subsequently increased insulin secretion to maintain blood glucose concentration (Shanik et al., 2008). Fructose is widely used as a sweetener in several foods and beverages (Basaranoglu, Basaranoglu, Sabuncu, & Senturk, 2013; Hanover & White, 1993). Numerous studies have been shown that high fructose consumption caused hyperinsulinemia and insulin resistance in animals (Hozayen, Mahmoud, Soliman, & Mostafa, 2016; Putakala, Gujjala, Nukala, & Desireddy, 2017). The insulin resistance is commonly determined by the homeostatic model assessment of insulin resistance (HOMA-IR) index, which calculated by both fasting blood glucose and insulin levels (Tangvarasittichai, 2015; Wallace & Matthews, 2002).

147 Our results showed that the administration of fructose (10% w/v) in drinking water to rats for 12
148 weeks causes the development of insulin resistance as indicated by the significant increase in blood glucose and
149 serum insulin levels and HOMA-IR values. This is in agreement with previous studies reporting the
150 development of insulin resistance in fructose fed animals (El-Bassossy et al., 2016; Hininger-Favier et al.,
151 2009). However, the mechanisms of insulin resistance due to fructose intake are not completely understood.
152 Several hypotheses have been proposed to explain the development of insulin resistance in fructose fed
153 conditions, including an impairment of intracellular insulin signaling pathway, a change in the activities of
154 several enzymes regulating hepatic glucose metabolism, and a generation of reactive oxygen species (ROS)
155 (Basciano, Federico, & Adeli, 2005; Tran et al., 2009).

156 The present study demonstrated that naringin treatment for 4 weeks lowered blood glucose and
157 insulin, and improved insulin resistance in fructose fed rats. It has been demonstrated that naringin reduced the
158 levels of blood glucose and insulin in high fat fed mice and diabetic rats (A. M. Mahmoud et al., 2012). In
159 type 2 diabetic *db/db* mice, naringin increased glycolysis and decreased gluconeogenesis in liver, leading to
160 reduced blood glucose levels (Jung, Lee, Jeong, & Choi, 2004). In mice fed high fat diet, naringin could
161 improve insulin resistance via activation of the AMP activated protein kinase pathway (Pu et al., 2012).
162 Therefore, naringin might have a beneficial effect against the development of insulin resistance induced by high
163 fructose intake.

164 In addition to insulin resistance, high fructose consumption could also trigger ROS generation. After
165 absorption, fructose is primarily metabolized via fructolysis in the liver. Rapid fructolysis results in ATP
166 depletion, resulting in enhancing oxidative stress, which causes the cellular function disruption and damage
167 (Zhang, Jiao, & Kong, 2017). Furthermore, there is an evidence that fructose and its metabolites cause
168 advanced glycation end products (AGEs) formation and subsequently ROS production, leading to lipid
169 peroxidation (Zhang et al., 2017). MDA levels have been used as the indicator of oxidative damage initiated
170 by ROS. Oxidative stress has been shown to play an important role in the development and progression of
171 insulin resistance (Rains & Jain, 2011; Tangvarasittichai, 2015). It has been reported that insulin signaling
172 was impaired under oxidative stress conditions, leading to insulin resistance of the cell (Rains & Jain, 2011).
173 In animal experiments, overproduction of ROS in liver and adipose tissue induced the development of insulin

174 resistance (Matsuzawa–Nagata et al., 2008). Our results were consistent with previous studies demonstrating
175 that fructose feeding elevated oxidative stress as evidenced by an increase in serum MDA levels (Develi–Is et
176 al., 2014; A. A. Mahmoud & Elshazly, 2014). In addition, our study also found that there were no changes
177 in antioxidant enzyme activities (SOD and GPx) in serum and liver homogenates among the three experimental
178 groups. However, previous studies have reported increase in (Demirtas, Pasaoglu, Bircan, Kantar, &
179 Turkozkan, 2015) and decrease in (Ajiboye et al., 2016; Dornas et al., 2013) antioxidant enzyme activities
180 in fructose fed animals. One possible explanation for a lack of significant change in the activity of SOD and
181 GPx in the present study probably due to the different concentrations of sugar used or a degree of severity of
182 metabolic abnormalities. Furthermore, serum AGEs levels were also elevated in fructose fed rats. Naringin has
183 been reported to have free radical scavenging and antioxidant properties in several animal models (A. M.
184 Mahmoud et al., 2012; Murunga et al., 2016). In our study, administration of naringin decreased serum
185 TBARS and AGEs levels in fructose fed rats. These results suggested that naringin could inhibit high fructose
186 induced oxidative stress damage in rats.

187

188

Conclusion and Suggestion

189 The present study demonstrates that high fructose intake induces insulin resistance and oxidative stress
190 in rats. Oral administration of naringin for 4 weeks ameliorates high fructose induced insulin resistance and
191 oxidative stress. Our findings provide the beneficial effect of naringin for treating fructose induced insulin
192 resistance. However, further studies are needed to explain the exact underlying mechanisms of insulin
193 sensitizing effect of naringin in fructose fed conditions.

194

195

Acknowledgements

196 This research was supported by grants from the National Research Council of Thailand.

197

198

References

- 199 Adebisi, O. A., Adebisi, O. O., & Owira, P. M. (2016). Naringin Reduces Hyperglycemia-Induced Cardiac
200 Fibrosis by Relieving Oxidative Stress. *PLoS One*, *11*(3), e0149890. doi:
201 10.1371/journal.pone.0149890
- 202 Ajiboye, T. O., Raji, H. O., Adeleye, A. O., Adigun, N. S., Giwa, O. B., Ojewuyi, O. B., & Oladiji, A. T.
203 (2016). Hibiscus sabdariffa calyx palliates insulin resistance, hyperglycemia, dyslipidemia and
204 oxidative rout in fructose-induced metabolic syndrome rats. *J Sci Food Agric*, *96*(5), 1522-1531.
205 doi: 10.1002/jsfa.7254
- 206 Alam, M. A., Kauter, K., & Brown, L. (2013). Naringin improves diet-induced cardiovascular dysfunction
207 and obesity in high carbohydrate, high fat diet-fed rats. *Nutrients*, *5*(3), 637-650. doi:
208 10.3390/nu5030637
- 209 Basaranoglu, M., Basaranoglu, G., Sabuncu, T., & Senturk, H. (2013). Fructose as a key player in the
210 development of fatty liver disease. *World J Gastroenterol*, *19*(8), 1166-1172. doi:
211 10.3748/wjg.v19.i8.1166
- 212 Basciano, H., Federico, L., & Adeli, K. (2005). Fructose, insulin resistance, and metabolic dyslipidemia.
213 *Nutr Metab (Lond)*, *2*(1), 5. doi: 10.1186/1743-7075-2-5
- 214 Chutia, H., & Lynrah, K. G. (2015). Association of Serum Magnesium Deficiency with Insulin Resistance in
215 Type 2 Diabetes Mellitus. *J Lab Physicians*, *7*(2), 75-78. doi: 10.4103/0974-2727.163131
- 216 Demirtas, C. Y., Pasaoglu, O. T., Bircan, F. S., Kantar, S., & Turkozkan, N. (2015). The investigation of
217 melatonin effect on liver antioxidant and oxidant levels in fructose-mediated metabolic syndrome
218 model. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, *19*(10), 1915-1921.
- 219 Develi-Is, S., Ozen, G., Bekpinar, S., Topal, G., Unlucerci, Y., Dogan, B. S., & Uysal, M. (2014).
220 Resveratrol improves high-fructose-induced vascular dysfunction in rats. *Can J Physiol Pharmacol*,
221 *92*(12), 1021-1027. doi: 10.1139/cjpp-2014-0245
- 222 Dornas, W. C., de Lima, W. G., dos Santos, R. C., Guerra, J. F., de Souza, M. O., Silva, M., . . . Silva, M.
223 E. (2013). High dietary salt decreases antioxidant defenses in the liver of fructose-fed insulin-
224 resistant rats. *J Nutr Biochem*, *24*(12), 2016-2022. doi: 10.1016/j.jnutbio.2013.06.006

225 El-Bassossy, H., Badawy, D., Neamatallah, T., & Fahmy, A. (2016). Ferulic acid, a natural polyphenol,
226 alleviates insulin resistance and hypertension in fructose fed rats: Effect on endothelial-dependent
227 relaxation. *Chem Biol Interact*, 254, 191-197. doi: 10.1016/j.cbi.2016.06.013

228 Faure, P., Rossini, E., Lafond, J. L., Richard, M. J., Favier, A., & Halimi, S. (1997). Vitamin E improves
229 the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J Nutr*,
230 127(1), 103-107.

231 Ferder, L., Ferder, M. D., & Inserra, F. (2010). The role of high-fructose corn syrup in metabolic syndrome
232 and hypertension. *Curr Hypertens Rep*, 12(2), 105-112. doi: 10.1007/s11906-010-0097-3

233 Hanover, L. M., & White, J. S. (1993). Manufacturing, composition, and applications of fructose. *Am J Clin*
234 *Nutr*, 58(5 Suppl), 724s-732s.

235 Hininger-Favier, I., Benaraba, R., Coves, S., Anderson, R. A., & Roussel, A. M. (2009). Green tea extract
236 decreases oxidative stress and improves insulin sensitivity in an animal model of insulin resistance,
237 the fructose-fed rat. *J Am Coll Nutr*, 28(4), 355-361.

238 Hozayen, W. G., Mahmoud, A. M., Soliman, H. A., & Mostafa, S. R. (2016). Spirulina versicolor improves
239 insulin sensitivity and attenuates hyperglycemia-mediated oxidative stress in fructose-fed rats. *J*
240 *Intercult Ethnopharmacol*, 5(1), 57-64. doi: 10.5455/jice.20151230055930

241 Jung, U. J., Lee, M. K., Jeong, K. S., & Choi, M. S. (2004). The hypoglycemic effects of hesperidin and
242 naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. *J*
243 *Nutr*, 134(10), 2499-2503.

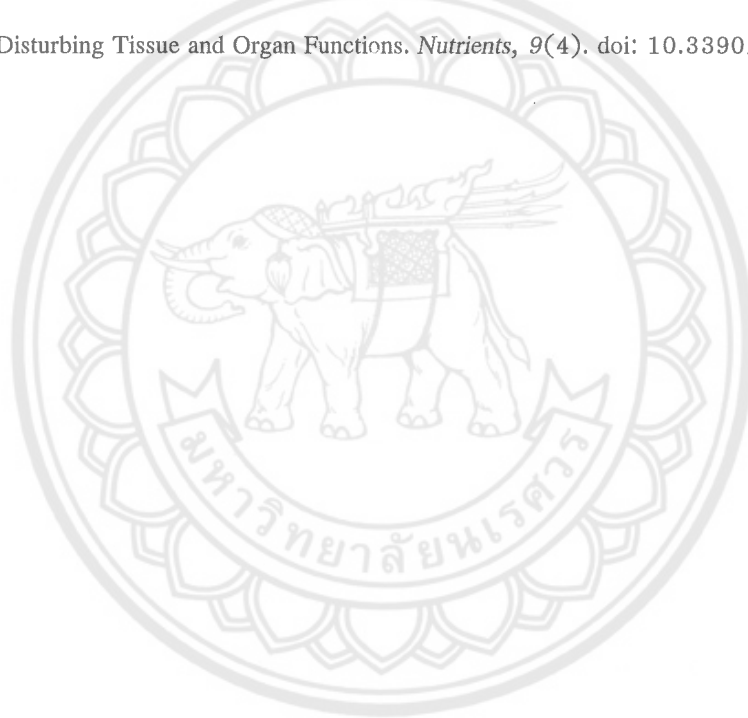
244 Mahmoud, A. A., & Elshazly, S. M. (2014). Ursodeoxycholic acid ameliorates fructose-induced metabolic
245 syndrome in rats. *PLoS One*, 9(9), e106993. doi: 10.1371/journal.pone.0106993

246 Mahmoud, A. M., Ashour, M. B., Abdel-Moneim, A., & Ahmed, O. M. (2012). Hesperidin and naringin
247 attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high
248 fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. *J Diabetes Complications*, 26(6), 483-490. doi:
249 10.1016/j.jdiacomp.2012.06.001

- 250 Matsuzawa-Nagata, N., Takamura, T., Ando, H., Nakamura, S., Kurita, S., Misu, H., . . . Kaneko, S.
251 (2008). Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and
252 obesity. *Metabolism*, 57(8), 1071-1077. doi: 10.1016/j.metabol.2008.03.010
- 253 Murunga, A. N., Miruka, D. O., Driver, C., Nkomo, F. S., Cobongela, S. Z., & Owira, P. M. (2016).
254 Grapefruit Derived Flavonoid Naringin Improves Ketoacidosis and Lipid Peroxidation in Type 1
255 Diabetes Rat Model. *PLoS One*, 11(4), e0153241. doi: 10.1371/journal.pone.0153241
- 256 Pu, P., Gao, D. M., Mohamed, S., Chen, J., Zhang, J., Zhou, X. Y., . . . Jiang, H. (2012). Naringin
257 ameliorates metabolic syndrome by activating AMP-activated protein kinase in mice fed a high-fat
258 diet. *Arch Biochem Biophys*, 518(1), 61-70. doi: 10.1016/j.abb.2011.11.026
- 259 Putakala, M., Gujjala, S., Nukala, S., & Desireddy, S. (2017). Beneficial Effects of *Phyllanthus amarus*
260 Against High Fructose Diet Induced Insulin Resistance and Hepatic Oxidative Stress in Male Wistar
261 Rats. *Appl Biochem Biotechnol*. doi: 10.1007/s12010-017-2461-0
- 262 Rains, J. L., & Jain, S. K. (2011). Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med*,
263 50(5), 567-575. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.12.006
- 264 Shanik, M. H., Xu, Y., Skrha, J., Dankner, R., Zick, Y., & Roth, J. (2008). Insulin resistance and
265 hyperinsulinemia: is hyperinsulinemia the cart or the horse? *Diabetes Care*, 31 Suppl 2, S262-268.
266 doi: 10.2337/dc08-s264
- 267 Stanhope, K. L. (2016). Sugar consumption, metabolic disease and obesity: The state of the controversy. *Crit*
268 *Rev Clin Lab Sci*, 53(1), 52-67. doi: 10.3109/10408363.2015.1084990
- 269 Suwannaphet, W., Meeprom, A., Yibchok-Anun, S., & Adisakwattana, S. (2010). Preventive effect of grape
270 seed extract against high-fructose diet-induced insulin resistance and oxidative stress in rats. *Food*
271 *Chem Toxicol*, 48(7), 1853-1857. doi: 10.1016/j.fct.2010.04.021
- 272 Tangvarasittichai, S. (2015). Oxidative stress, insulin resistance, dyslipidemia and type 2 diabetes mellitus.
273 *World J Diabetes*, 6(3), 456-480. doi: 10.4239/wjd.v6.i3.456
- 274 Tappy, L., Le, K. A., Tran, C., & Paquot, N. (2010). Fructose and metabolic diseases: new findings, new
275 questions. *Nutrition*, 26(11-12), 1044-1049. doi: 10.1016/j.nut.2010.02.014

- 276 Ter Horst, K. W., Schene, M. R., Holman, R., Romijn, J. A., & Serlie, M. J. (2016). Effect of fructose
277 consumption on insulin sensitivity in nondiabetic subjects: a systematic review and meta-analysis of
278 diet-intervention trials. *Am J Clin Nutr*, 104(6), 1562-1576. doi: 10.3945/ajcn.116.137786
- 279 Tran, L. T., Yuen, V. G., & McNeill, J. H. (2009). The fructose-fed rat: a review on the mechanisms of
280 fructose-induced insulin resistance and hypertension. *Mol Cell Biochem*, 332(1-2), 145-159. doi:
281 10.1007/s11010-009-0184-4
- 282 Wallace, T. M., & Matthews, D. R. (2002). The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med*,
283 19(7), 527-534.
- 284 Zhang, D. M., Jiao, R. Q., & Kong, L. D. (2017). High Dietary Fructose: Direct or Indirect Dangerous
285 Factors Disturbing Tissue and Organ Functions. *Nutrients*, 9(4). doi: 10.3390/nu9040335

286



ภาคผนวก 2

เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลต่อภาวะอ้วน ระดับน้ำตาล, ฮอร์โมนอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด	1.1. เตรียมสัตว์ทดลอง โดยแบ่งหนูแรทเป็น 3 กลุ่ม	1. เพื่อให้ได้ข้อมูลผลต่อภาวะอ้วน ระดับน้ำตาล, ฮอร์โมนอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด	1.1. เตรียมสัตว์ทดลอง โดยแบ่งหนูแรทเป็น 3 กลุ่ม
	1.2. วิเคราะห์ระดับน้ำตาล, ฮอร์โมนอินซูลิน และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด	1.2. เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ น้ำตาล, ฮอร์โมนอินซูลิน ระดับไขมันในเลือด และการเกิดไกลเคชั่นในเลือด และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าดัชนีบ่งบอกภาวะดื้ออินซูลิน	1.2. ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อภาวะดื้ออินซูลินและการเกิดไกลเคชั่น ของหนูกลุ่มต่างๆ
	1.3. วิเคราะห์ระดับไขมันในเลือด	1.3. เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่า atherogenic index	1.3. ได้ข้อมูลฤทธิ์ในการลดระดับของ total cholesterol, LDL, HDL และ triglyceride และ atherogenic index ของหนูกลุ่มต่างๆ
2. เพื่อให้ได้ข้อมูลผล ต่อการเกิดอนุมูลอิสระ	2.1. วิเคราะห์การเกิดอนุมูลอิสระ	2.1 เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากหนูกลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ MDA, SOD, GPx ในซีรัม	2.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อปริมาณ MDA, SOD, GPx ในซีรัมของหนูกลุ่มต่างๆ

		2.2. เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากหนู กลุ่มต่างๆ นำไปวัดปริมาณของ MDA, SOD, GPx ในตับ	2.2 ได้ข้อมูลฤทธิ์ต่อปริมาณ MDA, SOD, GPx ในตับของหนูกลุ่มต่างๆ
3.เพื่อให้ได้ข้อมูลผลต่อการทำงานของหลอดเลือด	3.1. ศึกษาฤทธิ์ของขมิพู่ผงต่อการทำงานของหลอดเลือด	3.1. เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะทำการสลับหนูเพื่อผ่าตัดแยกหลอดเลือดแดง aorta มาทดสอบการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร Ach และ SNP	3.1. ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร Ach โดยไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของหลอดเลือดต่อสาร SNP ในหลอดเลือดของหนูกลุ่มต่างๆ
4.ฤทธิ์ต่อระดับ nitric oxide	4.1 วิเคราะห์ปริมาณของสาร nitric oxide	4.1 วิเคราะห์หาปริมาณของ สาร nitric oxide ในซีรัม โดยใช้ Nitrate/Nitrite Fluorometric Assay Kit	4.1 ได้ข้อมูลฤทธิ์การเพิ่มสาร nitric oxide ในของหนูกลุ่มต่างๆ
5.เพื่อให้ได้ข้อมูลผลต่อการแสดงออกของโปรตีน eNOS	5.1. วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน eNOS	5.1.วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS	5.1. ได้ข้อมูลผลของการแสดงออกของโปรตีน eNOS และ p-eNOS
		5.2.วิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine	5.2. ได้ข้อมูลผลต่อการแสดงออกของโปรตีน nitrotyrosine