สัญญาเลขที่ R2558C067

อภินันทนาการ

สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ : ฤทธิ์ของสารนารินจินต่อการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ ไกลเคชั่น เอ็นโปรดักส์

ผู้วิจัย
ผศ.ดร. วชิราวดี มาลากุล

สังกัด
มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 25 มิ.ย. 2559
เลขทะเบียน 1690768 4
เลขเรียกหนังสือ 3 RA

645
.D5
ว153ร
2558

สนับสนุนโดย
งบประมาณรายได้มหาวิทยาลัยนเรศวร
ปีงบประมาณ 2558

สัญญาเลขที่ : R2558C067
โครงการ : ฤทธิ์ของสารนารินจินต่อการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ ไกลเคชั่น เอ็นโปรดักส์
หัวหน้าโครงการ : ผศ. ดร. วชิราวดี มาลากุล
หน่วยงาน : ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

ความเป็นมาและเหตุผล : ปฏิกิริยาไกลเคชั่น เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ระหว่างโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งนำไปสู่การสร้าง Advance glycation end products (AGEs) โดยผ่านสารกลุ่มไดคาร์บอนิล เช่น methylglyoxal (MGO) การสะสมของ AGEs ในเนื้อเยื่อเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานและภาวะสูงอายุ ซึ่งการพัฒนาสารที่ยับยั้งการเกิด AGEs เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคที่เกิดจากสาร AGEs ได้ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ยับยั้งของสารนารินจินต่อการเกิด AGEs ในหลอดทดลอง

วิธีการทดลอง: สำหรับแบบจำลองในหลอดทดลองของปฏิกิริยาไกลเคชั่น จะใช้สารที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น (น้ำตาลฟรุคโตส และ MGO) และโปรตีนอัลบูมิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อมีหรือไม่มีสารนารินจิน (0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์) ร่วมด้วย ส่วนฤทธิ์ต้านไกลเคชั่นของสารนารินจินจะถูกวัดโดย AGE-specific fluorescence ส่วนการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนจากปฏิกิริยาไกลเคชั่น วิเคราะห์จากปริมาณของโปรตีนคาร์บอนิล รวมทั้งความสามารถของสารนารินจินต่อการดักจับ metal ions และสารกลุ่มไดคาร์บอนิลจะถูกวิเคราะห์โดยการวัดการดักจับ ferrous iron และความสามารถในการจับสาร MGO โดยตรง ตามลำดับ

ผลการทดลอง: เมื่อบ่มน้ำตาลฟรุคโตส หรือ MGO ร่วมกับโปรตีนอัลบูมิน ปริมาณสาร Fluorescent AGEs จะเพิ่มมากขึ้นตลอดระยะเวลาที่ศึกษา เมื่อให้สารนารินจิน (0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์) จะลดการเกิด AGEs โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสาร รวมทั้งสารนารินจิน (1 มิลลิโมลาร์) ยังลดปริมาณ MGO ประมาณ 66% ภายใน 3 วัน

สรุปผลการทดลอง: ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ป้องกันการเกิด AGEs ในหลอดทดลอง โดยออกฤทธิ์ผ่านการดักจับสารกลุ่มคาร์บอนิล

คำสำคัญ: สารนารินจิน, advanced glycation end products, สารกลุ่มไดคาร์บอนิล

Title : Effect of naringin on the formation of advanced glycation end products

Authors : Wachirawadee Malakul

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

Abstract

Background: Glycation is the non-enzymatic reaction between amino groups in proteins and reducing sugars, leading to the formation of advanced glycation end products (AGEs) via dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal (MGO). The accumulations of AGEs in tissues are involved in the development of diabetic complications and normal aging. The development of AGE inhibitors is considered to have therapeutic intervention in AGEs-related disorders. The aim of this study was to evaluate the in vitro effect of naringin on the formation of AGEs.

Methods: In vitro models of glycation, glycating agents (fructose and MGO) and bovine serum albumin (BSA) incubated at 37 °C for 21 days, were examined in the presence or absence of naringin (0.1, 0.5 and 1 mM). Antiglycation properties of naringin was investigated by measuring AGE-specific fluorescence. Glycation induced protein oxidation was examined using the protein carbonyl assays. In addition The capacity of naringin to trap metal ion and carbonyl compounds were determined by ferrous ion chelating and direct MGO trapping assay, respectively.

Results : Fluorescent AGE formation was increased after incubation of fructose or MGO with BSA throughout the study period. The addition of naringin (0.5 and 1 mM) reduced the formation of fructose and MGO derived AGEs in a concentration dependent manner. Fructose also caused an elevation of protein carbonyl content in glycated BSA. Naringin (1 mM) attenuated an increase in protein carbonyl content of fructose- glycated BSA. In addition naringin (1mM) scavenged 66 % of MGO in 3 days.

Conclusion: These results demonstrated that naringin effectively prevented the formation of fluorescent AGEs and protein oxidation *in vitro*. The antiglycation activities of naringin were attributed in part to their ability to trap reactive carbonyl compounds.

Keywords : naringin, advanced glycation end products, dicarbonyl compounds

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	2
สารบัญ	3
สารบัญรูปภาพ	4
สารบัญตาราง	5
สรุปโครงการ (Executive Summary)	6-8
บทนำ	9-10
วัตถุประสงค์โครงการ	10
วิธีการทดลอง	11-12
ผลการทดลอง	13-27
วิจารณ์ผลการทดลอง	28-29
เอกสารอ้างอิง	30-32
ภาคผนวก (Output ของ โครงการ)	33
ภาคผนวก (ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ)	34

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ค่า Fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	14
2	ค่า fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดย MGO เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 3 วัน	16
3	ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Fructosamine (%inhibition) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	18
4	ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Protein carbonyl (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	20
5	ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง Fe^{2+}-Ferrozine complex ของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 0.1 มิลลิโมลาร์ และสาร EDTA (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Fe2+-Ferrozine complex (%Chelating activity)	22
6	ผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO)	24
7	แสดงผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO)	26

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ค่าเปอร์เซนต์ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	15
2	ค่าเปอร์เซ็นต์ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดย MGO เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 3 วัน	17
3	ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Fructosamine (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	19
4	ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Protein carbonyl (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน	21
5	ผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO)	25
6	ผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO)	27

สัญญาเลขที่ R2558C067
สรุปโครงการ (Executive Summary)

โครงการ : ฤทธิ์ของสารนารินจินต่อการเกิดผลิตภัณฑ์แอดวานซ์ ไกลเคชั่น เอ็น โปรดักส์
หัวหน้าโครงการ : ผศ.ดร. วชิราวดี มาลากุล
หน่วยงาน : ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

โรคเบาหวาน เป็นภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังและพบได้ทั่วโลก โดยพบว่าประชากรโลกที่ป่วยด้วยโรคนี้มีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี โดยอัตราการป่วยและอัตราการตายของผู้ป่วยเบาหวานมีสาเหตุหลักมาจากโรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดแข็ง โรคหลอดเลือดสมองและ โรคไต เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้ ล้วนแล้วแต่เป็นผลจากการที่น้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงกว่าปกติเป็นเวลานาน และการเพิ่มขึ้นของปริมาณอนุมูลอิสระ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับการทำงานของอวัยวะต่างๆ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดจะจับกับโปรตีนภายในเซลล์ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า non-enzymatic glycation ซึ่งทำให้โครงสร้างของโปรตีนนั้นเปลี่ยนแปลงไป จนกลายเป็น advanced glycation end-products (AGEs) ในที่สุด มีรายงานวิจัย พบว่าอนุมูลอิสระเป็นส่วนหนึ่งที่ก่อให้เกิด AGEs สาร AGEs เป็นโปรตีนที่โมเลกุลไขว้พันกันไปมา (cross-linked protein) มีโครงสร้างเสถียร และเป็นพิษต่อเซลล์อย่างยิ่ง เพราะมีพันธะคู่จำนวนมาก ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อต่าง ๆ แบบไม่ผันกลับ ทำให้เนื้อเยื่อศูนย์เสียการทำหน้าที่ของมัน และเกิดการตายของเซลล์ ซึ่งก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญกับวิธีที่จะลดการเกิด glycation ของ protein หรือ ยับยั้งการสร้าง AGEs และ ลดการเกิดอนุมูลอิสระ อาจช่วยลดภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน ในผู้สูงอายุ หรือในผู้ที่ชอบบริโภคอาหารที่ผ่านความร้อนสูง ในปัจจุบันพืชผักสมุนไพรหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นยารักษาหรือบรรเทาอาการของโรคร้ายต่างๆ ส่วนหนึ่งอาจเป็นผลจากสารสำคัญในพืชผักนั้นๆมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระสูง สาร naringin สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) มีการศึกษาพบว่า สาร naringin มีฤทธิ์ metal chelating และต้านอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและเพิ่มปริมาณอินซูลินในหนูเบาหวาน ลดการเกิด diabetic neuropathy ในหนูเบาหวาน และ ลดการเกิดอนุมูลอิสระในหนูเบาหวาน

ส่วนการศึกษาผลของ naringin ต่อการยับยั้งการสร้าง AGEs รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ ยังไม่มีรายงานปรากฏ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษาผลของสาร naringin ต่อการเกิด glycation ของโปรตีน และกลไกการออกฤทธิ์ แบบ *In vitro*

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาผลของสาร naringin ต่อการสร้าง advanced glycation end products
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร naringin ในการยับยั้งการเกิด advanced glycation end products

วิธีการทดลอง

1.ฤทธิ์ต่อการเกิด ไกลเคชั่นของ BSA

นำสาร BSA (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) incubate ร่วมกับ จะถูกบ่มร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตส (500 mM) หรือ methyglyoxal โดยมี หรือ ไม่มี สาร naringin ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ร่วมด้วย ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้น นำไปวิเคราะห์

1.1. การเกิด ไกลเคชั่นของ BSA โดยการวัด

- Fluorescent AGEs
- Fructosamine levels

1.2. การเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยการวัดปริมาณ protein carbonyl

2. ฤทธิ์ต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

-Metal chelating activity

-ความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

ผลการทดลอง

1.ผลต่อการเกิด ไกลเคชั่นของ BSA

ในการทดลอง BSA/น้ำตาลฟรุคโตส และ BSA/methyglyoxal การเกิด AGEs จะลดลงโดยสาร สาร naringin ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสาร naringin ไม่มีผลต่อปริมาณ fructosamine ในการทดลอง BSA/น้ำตาลฟรุคโตส

2.ผลต่อการเกิด Protein oxidation

น้ำตาลฟรุคโตสยังเพิ่มการเกิด protein carbonyl ใน glycated BSA มากกว่า native BSA สาร naringin (1 มิลลิโมลาห์) ลดความเสียหายของโปรตีนจากการออกซิเดชั่นที่เป็นผลจากน้ำตาลฟรุคโตสสูง โดยลดการปริมาณ protein carbonyl

3. ฤทธิ์ต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

3.1. ฤทธิ์ต่อ Metal chelation activity

จากการศึกษา พบว่า สารนารินจิน 0.1- 1 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์ในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} โดยที่ 1 มิลลิโมลาร์ ออกฤทธิ์แย่งจับโลหะ Fe^{2+} ประมาณ 23 ± 3%

3.2. ฤทธิ์ต่อความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

เมื่อบ่มสารนารินจิน (naringin) ร่วมกับ MGO โดยตรงเป็นเวลา 3 วัน (3 Day) พบว่าสารนารินจินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลาย (5% เอทานอล) และการลดลงจะแปรผันตามระยะเวลาที่บ่ม สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะลดปริมาณ MGO ประมาณ 66 %

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษานี้ สรุปว่า สารนารินจินจะลดการสร้างสาร AGEs ใน BSA/Fructose system และ BSA/ methyglyoxal รวมทั้งยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีน ใน BSA/Fructose system โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดไกลเคชั่น อาจเป็นผลจากฤทธิ์ในการทำลายโลหะ Fe^{2+} หรือดักจับ สาร Methyglyoxal ซึ่งผลจากการทดลองนี้อาจนำไปสู่การศึกษาเชิงลึกของสารนารินจินเพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารในการรักษาอาการแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานได้

บทนำ

โรคเบาหวาน เป็นภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดสูงกว่าปกติ ซึ่งเป็นโรคเรื้อรังและพบได้ทั่วโลก โดยพบว่าประชากรโลกที่ป่วยด้วยโรคนี้มีอัตราเพิ่มขึ้นทุกปี ซึ่งในปี 2000 จะมีประชากรโลกที่ป่วยด้วยโรคนี้ 171 ล้านคน และ คาดว่าจะเพิ่มขึ้นเป็น 366 ล้านคนในปี 2030 [1] อัตราการป่วยและอัตราการตายของผู้ป่วยเบาหวานมีสาเหตุหลักมาจากโรคหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดแข็ง โรคหลอดเลือดสมองและ โรคไต เป็นต้น ซึ่งโรคเหล่านี้ ล้วนแล้วแต่เป็นผลจากการที่น้ำตาลในเลือดที่เพิ่มสูงกว่าปกติเป็นเวลานาน และการเพิ่มขึ้นของปริมาณอนุมูลอิสระ ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายกับการทำงานของอวัยวะต่างๆ โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นในเลือดจะจับกับโปรตีนภายในเซลล์ เรียกปฏิกิริยานี้ว่า non-enzymatic glycation

โดยกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น สามารถแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะต้น เป็นการทำปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตสกับโปรตีนในร่างกาย จนเกิด Schiff base ซึ่งไม่ค่อยเสถียร หลังจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น Amadori products ส่วนระยะกลาง เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ Amadori products จากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและปฏิกิริยาทางเคมีอื่นๆ จนกลายเป็นสารกลุ่ม reactive dicarbonyl compounds เช่น glyoxal, methyglyoxal และ deoxyglucosones ส่วนระยะสุดท้าย เป็นระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจนมีความเสถียรมากขึ้น ที่เรียกว่า AGEs [2-4]

AGEs เป็นโปรตีนที่โมเลกุลไขว้พันกันไปมา (cross-linked protein) มีโครงสร้างเสถียร และเป็นพิษต่อเซลล์อย่างยิ่ง เพราะมันมีพันธะคู่จำนวนมาก ซึ่งจะเข้าทำปฏิกิริยากับเนื้อเยื่อต่าง ๆ แบบไม่ผันกลับ ทำให้เนื้อเยื่อศูนย์เสียการทำหน้าที่ของมัน และเกิดการตายของเซลล์ [2-4] มีรายงานวิจัย พบว่าการสะสมของสาร AGEs ยังสามารถพบได้ในผู้สูงอายุ ซึ่งทำให้เกิดความเสื่อมของเซลล์ หรือโรคแทรกซ้อนในผู้สูงอายุ [5-7] และยังสามารถพบได้ในคนปกติ ที่ชอบรับประทานอาหารที่ผ่านความร้อนสูง เช่น ปิ้ง ย่าง ทอด เพราะการใช้อุณหภูมิสูงในการทำอาหาร ทำให้ ไขมันหรือโปรตีนทำปฏิกิริยากับน้ำตาล เกิดสาร AGEs ซึ่งจะดูดซึมเข้าร่างกาย ส่งผลมากมายในการทำลายเนื้อเยื่อต่างๆ [5]

ปัจจุบัน ยาที่มีฤทธิ์ต้านการเกิดไกลเคชั่น เช่น ยา aminoguanidine จึงมักถูกใช้ในวงการแพทย์ เพื่อป้องกันและรักษาภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน แต่การบริโภคยากลุ่มนี้ในผู้ป่วยเบาหวาน ก็มักพบอาการข้างเคียง เช่น โรคแผลในทางเดินอาหาร หรือภาวะเลือดจาง [8] ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสำคัญในการศึกษาพืชสมุนไพร หรือสารสำคัญจากพืชผักสมุนไพรในการลดการเกิด glycation ของ protein หรือ ยับยั้งการสร้าง AGEs โดยมีงานวิจัย พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ หรือ มีฤทธิ์ metal chelating activity หรือ มีฤทธิ์ทำลาย dicarbonyl compound จะส่งผลต้านการเกิด AGEs ได้ [8-11] จึงช่วยลดภาวะแทรกซ้อนต่างๆที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยเบาหวาน หรือในผู้สูงอายุ ดังนั้นการพัฒนาพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ อาจจะช่วยลดกระบวนการสร้าง AGEs และช่วยยืดอายุการทำงานของเซลล์ต่างๆ ทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเบาหวานหรือผู้สูงอายุดีขึ้น รวมทั้งยังลดอาการข้างเคียงที่เป็นผลจากยาที่มีฤทธิ์ต้านไกลเคชั่น และช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับยากลุ่มนี้ซึ่งมีราคาแพง

ในปัจจุบันผลไม้หลายชนิดถูกใช้เป็นทั้งยาและอาหาร เช่น ส้มโอ ซึ่งเป็นผลไม้ในตระกูลส้มที่ทุกคนรู้จักดีและนิยมรับประทานกันอย่างกว้างขวางเนื่องจากมีการปลูกกระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทย จัดเป็นผลไม้ที่มีศักยภาพในด้านการส่งออกไม่แพ้ผลไม้ชนิดอื่น ๆ ส้มโอมี ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ Citrus

grandis Osb. อยู่ในตระกูล Rutaceae สารที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของส้มโอ คือ naringin สารนี้จัดอยู่ในกลุ่มสารพวกฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม (citrus) มีการศึกษาพบว่า สาร naringin มีฤทธิ์ metal chelating และต้านอนุมูลอิสระ[12] มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและเพิ่มปริมาณอินซูลินในหนูเบาหวาน [13] ลดการเกิด diabetic neuropathy ในหนูเบาหวาน [14] และ ลดการเกิดอนุมูลอิสระในหนูเบาหวาน [15-16]

ส่วนการศึกษาผลของ naringin ต่อการยับยั้งการสร้าง AGEs รวมทั้งกลไกการออกฤทธิ์ ยังไม่มีรายงานปรากฏ งานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งวิจัยศึกษาผลของสาร naringin ต่อการเกิด glycation ของโปรตีน และกลไกการออกฤทธิ์ แบบ *In vitro*

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสาร naringin ต่อการสร้าง advanced glycation end products
2. ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร naringin ในการยับยั้งการเกิด advanced glycation end products

วิธีการทดลอง

1. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs

1.1. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model

นำโปรตีนอัลบูมิน (BSA) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ น้ำตาลฟรุคโตส (fructose) 500 มิลลิโมลาร์ ละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02% โซเดียม อะไซด์ (sodium azide) ผสมร่วมกับสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นนำไปวัด Fluorescence intensity ของสาร AGEs โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation 360 นาโนเมตร และ emission 460 นาโนเมตร ที่วันที่ 7, 14, และ 21 หลังจากการบ่ม

1.2. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model

นำโปรตีนอัลบูมิน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MGO 60 มิลลิโมลาร์ ละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02% โซเดียม อะไซด์ (sodium azide) ผสมร่วมกับสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปวัด Fluorescence intensity ของสาร AGEs โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation 360 นาโนเมตร และ emission 460 นาโนเมตร ที่วันที่ 1, 2, และ 3 หลังจากการบ่ม

1.3. ฤทธิ์ต่อการเกิด Amadori products

วิเคราะห์ปริมาณ Amadori products ซึ่งเป็นผลผลิตจากการเกิด protein glycation ในระยะ early stage โดยวิธี Fructosamine assay นำ Albumin (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาบ่มร่วมกับ Glucose 500mM ใน PBS (Phosphate buffer saline) โดยไม่มี หรือ มี สาร naringin ที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 7, 14, 21 วัน หลังจากนั้น ผสมกับ 0.5 mM NBT แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 530 nm

2. ฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยน้ำตาลฟรุคโตส

ฤทธิ์ของสาร สารนารินจิน ต่อการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยน้ำตาลฟรุคโตส โดยการวัดปริมาณของ protein carbonyle content (บ่งชี้ถึงการเกิด protein oxidation) ซึ่งทำการทดสอบโดยใช้ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2.1 ทั้งที่มีหรือไม่มี 6-gingerol ผสมกับ 2,4 –DNPH ใน 2N HCl จากนั้น incubate ไว้ 60 นาที ผสมกับ 20% trichloroacetic acid แล้ว centrifuged แล้วล้างด้วย ethanol:ethylacetate mixture (50:50) ก่อนนำมาละลายใน 8 M guanidine hydrochloride ใน 133 mM Tris solution ก่อนนำไปวัด absorbance ที่ 365 nm โดยจะทำซ้ำ 6-8 ตัวอย่าง (n=6-8)

3. ฤทธิ์ต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

3.1. ฤทธิ์ Metal chelating activity

นำ สารนารินจิน ที่ความเข้มข้นต่างๆ ผสมกับ 2 mM $FeCl_2$ หลังจากนั้นใส่สาร ferrozine solution ก่อน incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 562 nm ในการทดลองนี้จะใช้ EDTA เป็น positive control

3.2. ฤทธิ์ต่อความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

นำสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ หรือ vehicle (5% เอทานอล) บ่มร่วมกับ MGO ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากนั้นเติม o-phenylenediamine ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ MGO โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Mobile phases คือ 0.2% acetic acid และ acetonitrile, อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ Fortis C18 และความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร, retention time 4.3 นาที ปริมาณของ MGO จะถูกวิเคราะห์ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของ remaining MGO (\%)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟที่ช่วงเวลา 0}} \times 100$$

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

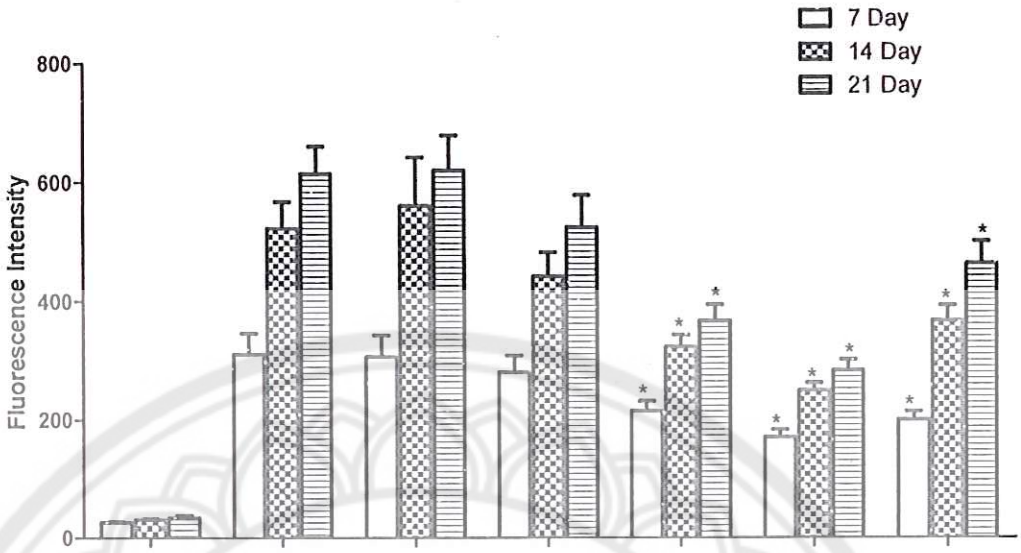
การวิเคราะห์ทางสถิติ ในทุกการทดลอง จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 6 ครั้ง และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน ส่วนความแตกต่างทางสถิติ ประเมินโดยใช้ one-way ANOVA โดยตั้งค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติที่จะใช้ในงานวิจัยนี้คือ GraphPad Prism

ผลการศึกษา

1. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs

1.1.ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน ร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสจะส่งผลให้เพิ่ม Fluorescence Intensity AGEs เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน Fluorescence Intensity ของสาร AGEs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับสาร AG (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ มากกว่า ฤทธิ์ยับยั้งของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสาร AG เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ลดการเกิด AGEs ในภาวะเบาหวาน (รูปที่ 1 และตารางที่ 1) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร



BSA	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	+	+	+	+	-
Naringin (mM)	-	-	-	0.1	0.5	1	-
Aminoguanidine (mM)	-	-	-	-	-	-	1

รูปที่ 1 แสดงถึงค่า Fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM
* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

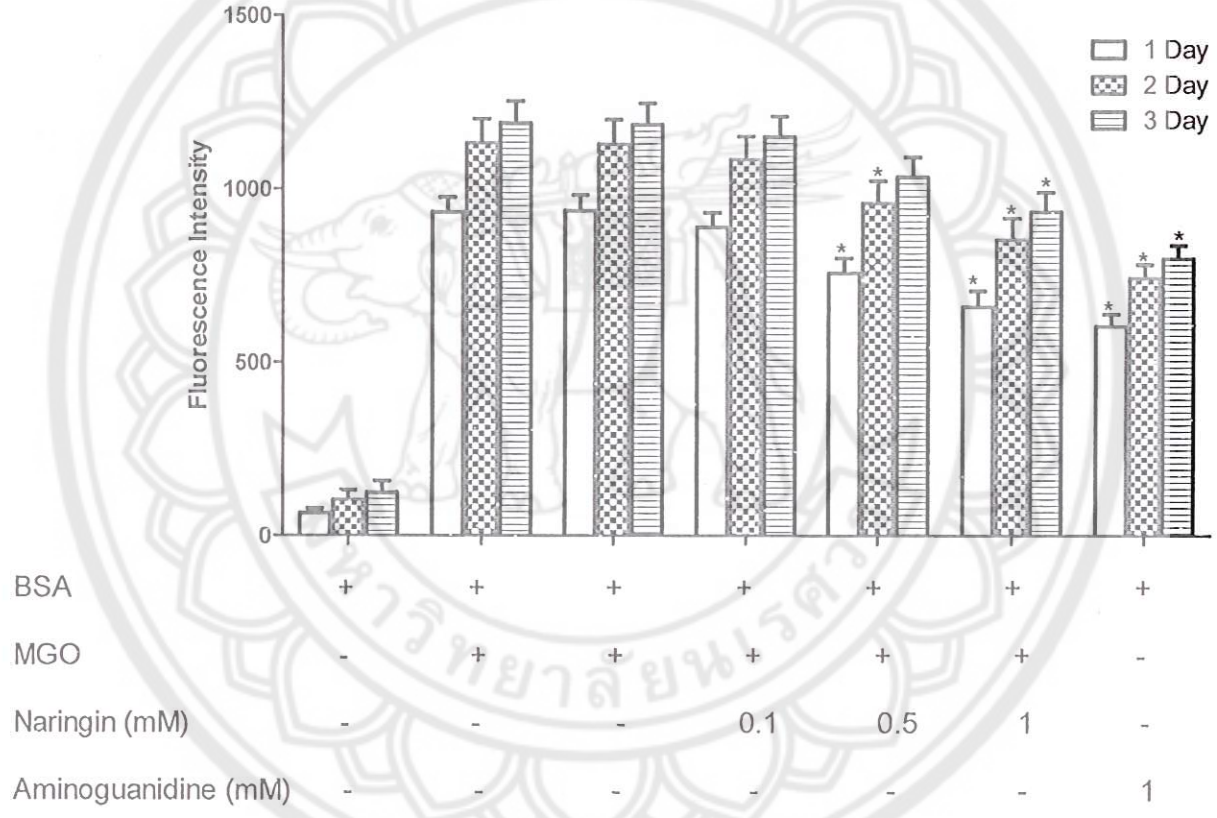
ตารางที่ 1 แสดงถึงค่าเปอร์เซนต์ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนาริน จิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	7 DAY	14 DAY	21 DAY
C	90.95 ± 0.98	93.86 ± 0.67	94.58 ± 0.51
F	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
F+V	4.13 ± 1.74	4.48 ± 1.12	4.44 ± 1.78
F+N 0.1 mM	8.16 ± 3.89	15.29 ± 4.05	15.29 ± 3.58
F+N 0.5 mM	29.07 ± 3.46*	37.69 ± 2.24*	40.19 ± 1.62 *
F+N 1 mM	43.66 ± 2.93 *	51.66 ± 2.29*	53.52 ± 1.57 *
F+AG 1 mM	32.98 ± 5.34 *	29.11 ± 3.97*	24.59 ± 2.75 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

1.2.ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน (BSA) ร่วมกับ MGO จะส่งผลให้เพิ่ม Fluorescence Intensity AGEs เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะลด Fluorescence Intensity ของ AGEs ตลอดระยะเวลา 3 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับ MGO (รูปที่ 2 และตารางที่ 2) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 22 % ขณะที่ฤทธิ์ของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ในการยับยั้งการเกิด AGEs ประมาณ 33 % จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 2 แสดงถึงค่า fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดย MGO เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 3 วัน , ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+MGO ($P < 0.05$)

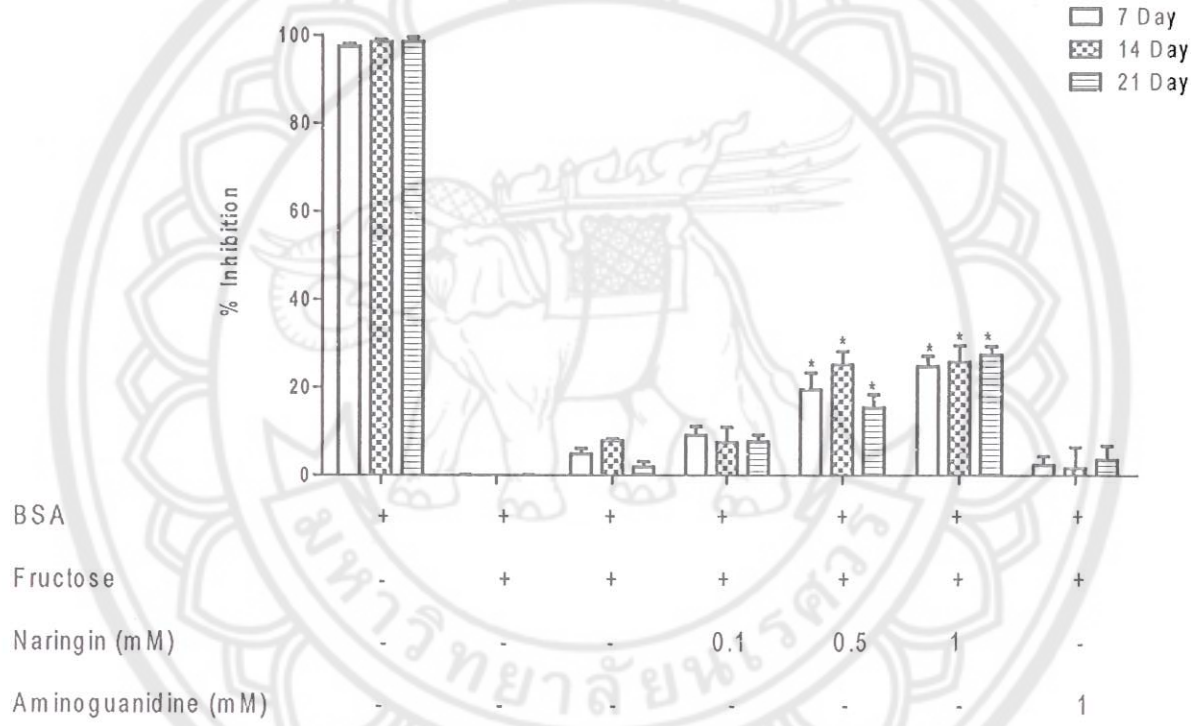
ตารางที่ 2 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดย MGO เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 3 วัน , ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	1 DAY	2 DAY	3 DAY
MGO	100 ± 0	100 ± 0	100 ± 0
MGO+N 0.1 mM	95.23 ± 0.76	95.81 ± 0.45	96.83 ± 0.29
MGO+N 0.5 mM	80.96 ± 1.81*	84.60 ± 1.27*	87.10 ± 0.88*
MGO+N 1 mM	70.39 ± 2.89*	75.10 ± 1.84*	78.16 ± 1.28 *
MGO+AG 1 mM	64.69 ± 2.72*	65.63 ± 2.03*	67.18 ± 2.11*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+MGO ($P < 0.05$)

1.3.ฤทธิ์ต่อการเกิด fructosamine ใน BSA-Fructose model

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน ร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสจะส่งผลให้เพิ่มระดับการสร้าง fructosamine เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน ระดับการสร้างของ fructasamine ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับสาร AG (รูปที่ 3, ตารางที่ 3) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด fructosamine ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ มากกว่า ฤทธิ์ยับยั้งของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 3, ตารางที่ 3) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิด fructosamine ใน BSA-Fructose model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 3 แสดงถึงค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Fructosamine (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

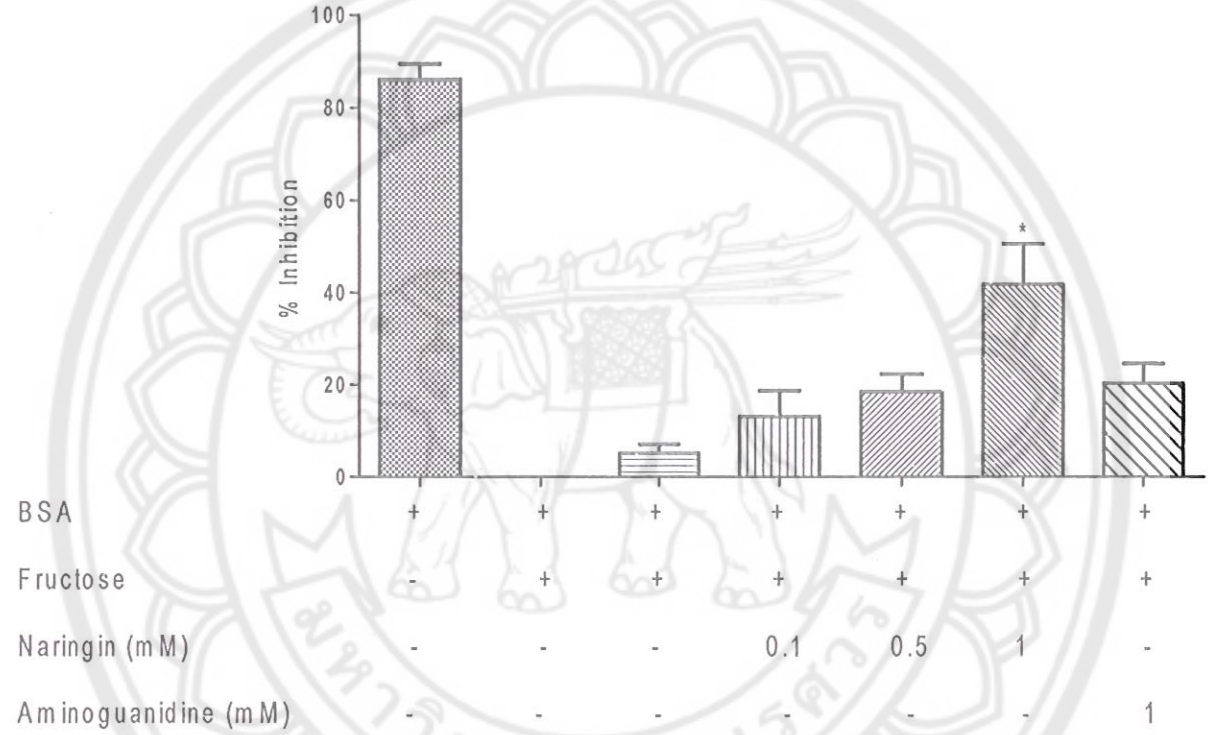
ตารางที่ 3 แสดงถึง ค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Fructosamine (%inhibition) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	7 DAY	14 DAY	21 DAY
C	97.41 ± 0.65	98.48 ± 0.51	98.52 ± 1.01
F	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
F+V	4.83 ± 1.26	7.84 ± 0.43	1.90 ± 1.19
F+N 0.1 mM	9.06 ± 2.05	9.24 ± 3.68	7.70 ± 1.47
F+N 0.5 mM	19.48 ± 3.89*	25.19 ± 3.03*	15.37 ± 3.02*
F+N 1 mM	24.81 ± 2.36*	25.80 ± 3.71*	27.43 ± 1.94*
F+AG 1 mM	4.00 ± 1.38	9.53 ± 5.71	7.80 ± 2.28

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

2. ฤทธิ์ต่อการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยน้ำตาลฟรุคโตส

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน ร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสจะส่งผลให้เพิ่มปริมาณของโปรตีน carbonyl เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน ปริมาณโปรตีน carbonyl ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl 51.64 ± 8.70% (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับสาร AG โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด โปรตีน carbonyl ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ มากกว่า ฤทธิ์ยับยั้งของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ (รูปที่ 4, ตารางที่ 4) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิดโปรตีน carbonyl ใน BSA-Fructose model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร



รูปที่ 4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Protein carbonyl (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเกิด Protein carbonyl (%inhibition) ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

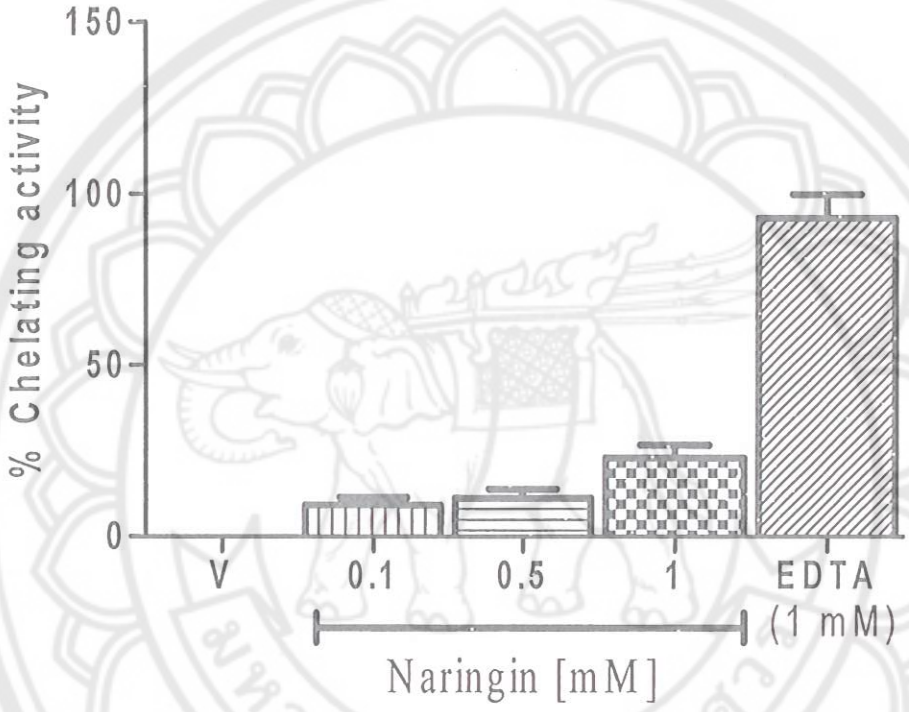
	% Inhibition
C	86.10 ± 3.34
F	0.00 ± 0.00
F+V	5.13 ± 1.97
F+N 0.1mM	13.10 ± 5.60
F+N 0.5 mM	18.50 ± 3.78
F+N 1 mM	51.64 ± 8.70*
F+AG 1 mM	27.07 ± 5.97

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

3. ฤทธิ์ต่อกระบวนการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น

3.1. ฤทธิ์ต่อ Metal chelation activity

จากการศึกษา พบว่า สารนารินจิน 0.1- 1 มิลลิโมลาร์ มีฤทธิ์ในการแย่งจับโลหะ Fe^{2+} น้อยกว่าสาร EDTA ซึ่งเป็น positive control พบว่า สารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ ออกฤทธิ์แย่งจับโลหะ Fe^{2+} ประมาณ 23 ± 3% ขณะที่ สาร EDTA ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ออกฤทธิ์แย่งจับโลหะ Fe^{2+} ประมาณ 93 ± 6% (รูปที่ 5)



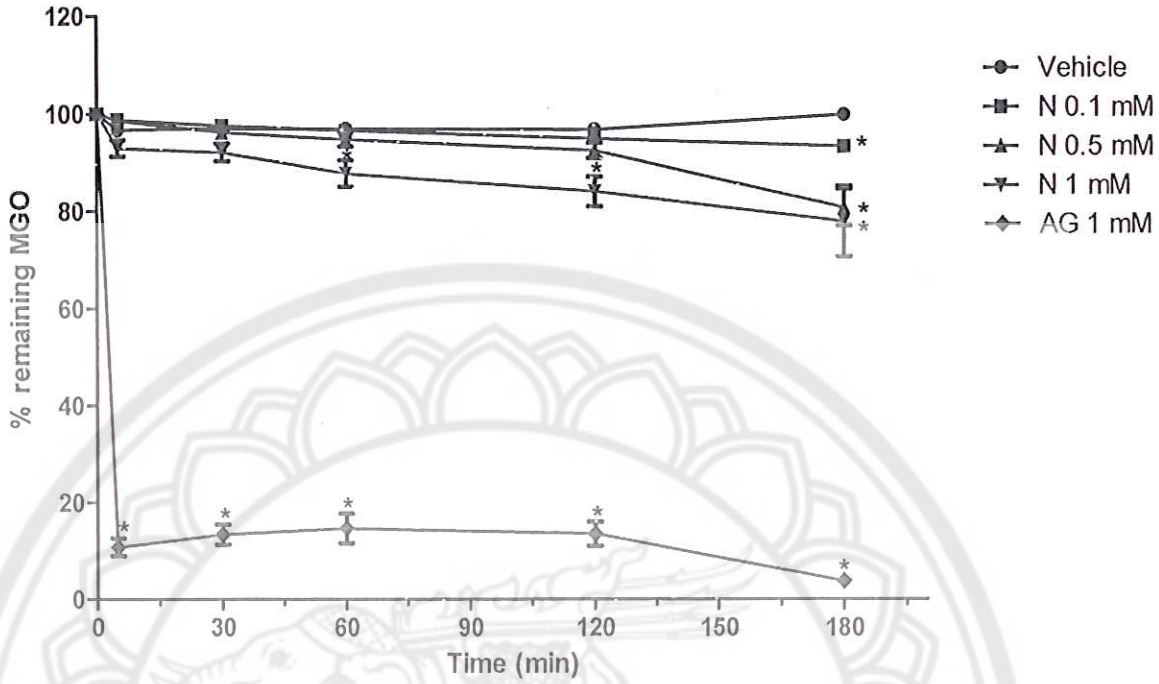
รูปที่ 5 แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ยับยั้ง Fe^{2+}-Ferrozine complex ของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 0.1 มิลลิโมลาร์ และสาร EDTA (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง Fe2+-Ferrozine complex (%Chelating activity), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ Vehicle ($P < 0.05$)

3.2. ฤทธิ์ต่อความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

เมื่อบ่มสารนารินจิน (naringin) ร่วมกับ MGO โดยตรงเป็นเวลา 180 นาที (180 min) ตามรูปที่ 6 พบว่าสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลาย (5% เอทานอล) และการลดลงจะแปรผันตามระยะเวลาที่บ่ม โดยจะเริ่มลดปริมาณ MGO ในเวลา 60 นาที (ตารางที่ 5) ขณะที่สาร AG สามารถลดปริมาณ MGO ตั้งแต่ในช่วง 5 นาที

รวมทั้ง เมื่อบ่มสารนารินจิน (naringin) ร่วมกับ MGO โดยตรงเป็นเวลา 3 วัน (3 Day) ตามรูปที่ 7 และตารางที่ 6 พบว่าสารนารินจินที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลาย (5% เอทานอล) และการลดลงจะแปรผันตามระยะเวลาที่บ่ม สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะลดปริมาณ MGO ประมาณ 66 % ขณะที่สาร AG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO ประมาณ 85 % จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารนารินจินมีผลดักจับหรือทำลายสาร MGO ได้โดยตรง



รูปที่ 6 แสดงผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับนาทีที่ 0 ($P < 0.05$)

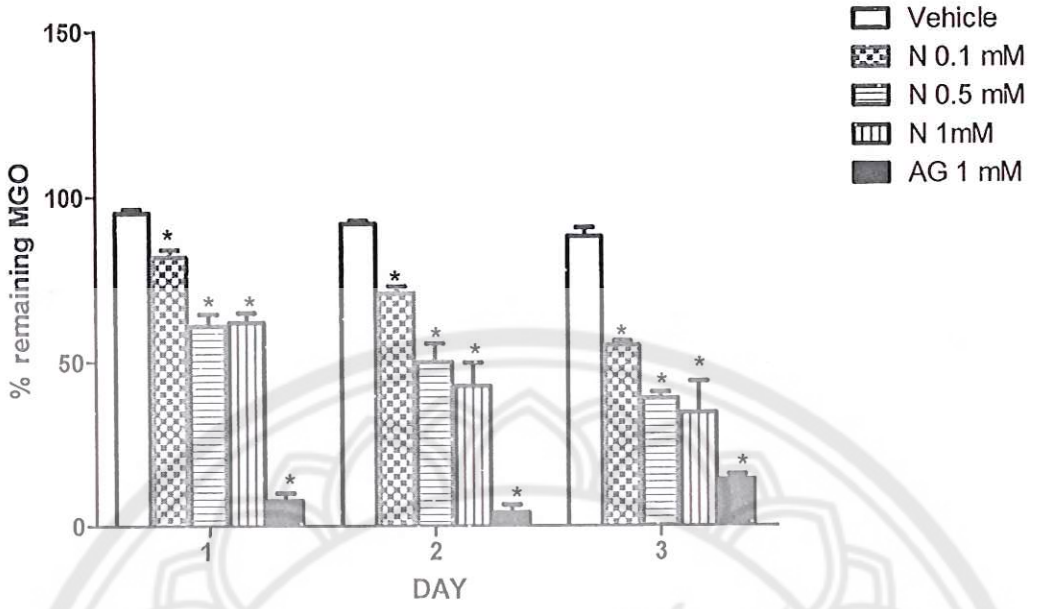
ib907684

สำนักหอสมุด
25 ส.ค. 2559

ตารางที่ 5 แสดงผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	Time (min)					
	0	5	30	60	120	180
Vehicle	100 ± 0	96.72 ± 0.90	96.99 ± 0.96	96.92 ± 0.87	96.77 ± 0.95	99.72 ± 0.25
N0.1 mM	100 ± 0	98.79 ± 0.34	97.57 ± 0.64	96.59 ± 0.58*	94.87 ± 1.10*	93.20 ± 1.13*
N0.5 mM	100 ± 0	98.57 ± 0.48	96.15 ± 1.19	94.74 ± 1.43	92.43 ± 1.54	80.67 ± 3.75*
N 1 mM	100 ± 0	92.96 ± 1.67	92.11 ± 1.76	87.74 ± 2.75*	84.02 ± 3.07*	77.82 ± 7.28*
AG1 mM	100 ± 0	10.79 ± 1.82*	13.40 ± 2.01*	14.68 ± 3.01*	13.49 ± 2.52*	3.73 ± 0.85 *

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับนาทีที่ 0 ($P < 0.05$)



รูปที่ 7 แสดงผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งกราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ Vehicle ของแต่ละวัน ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6 แสดงผลของสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่งแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

	1 DAY	2 DAY	3 DAY
Vehicle	93.13 ± 1.28	91.76 ± 1.05	87 ± 2.61
N 0.1 mM	81.70 ± 2.36*	70.70 ± 2.08*	54.84 ± 1.34*
N 0.5 mM	60.80 ± 3.79*	49.80 ± 5.65*	38.65 ± 1.97*
N 1 mM	61.93 ± 2.93*	42.48 ± 7.15*	34.39 ± 9.58*
AG 1 mM	7.73 ± 2.28*	4.07 ± 0.28*	14.06 ± 1.56*

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ Vehicle ของแต่ละวัน ($P < 0.05$)

วิจารณ์และสรุปผล

เป็นที่ทราบกันดี ว่าการสะสมของ AGEs ในร่างกายจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในภาวะซราภาพและโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน [17] โดยสาร AGEs เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาไกลเคชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างน้ำตาล (เช่น น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลฟรุคโตส) กับโปรตีน มีรายงานวิจัย พบว่า ปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนที่เกิดจากน้ำตาลฟรุคโตสนั้นจะเกิดได้เร็วกว่าน้ำตาลกลูโคส [18] โดยน้ำตาลฟรุคโตสที่เพิ่มขึ้นภายในร่างกายนั้นอาจมาจากปัจจัยภายนอก เช่น อาหารและเครื่องดื่ม หรือจากปัจจัยภายใน เช่น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นให้เป็นสาร sorbital และเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟรุคโตสในที่สุด โดยอาศัยกระบวนการ polyol pathway นอกจากนี้ สาร AGEs สามารถเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มไดคาร์บอนิลกับโปรตีนภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งสารกลุ่มไดคาร์บอนิล เช่น MGO นั้นสามารถสร้างขึ้นได้ในร่างกาย โดยอาจเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา glycolysis หรือ จากปฏิกิริยาไกลเคชั่นของน้ำตาลและโปรตีน หรือจากการเกิด lipid peroxidation [19]

งานวิจัยนี้พบว่า เมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสหรือ MGO ปริมาณสาร AGEs เพิ่มสูงขึ้นโดยขึ้นกับระยะเวลาที่บ่ม ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [18,20] มีงานวิจัย พบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จะมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น luteolin หรือ quercetin จะมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น [21] โดยกลไกการออกฤทธิ์มักเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [22] หรือฤทธิ์ในการทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิล [23] ในงานวิจัยนี้ ศึกษาฤทธิ์ของสารนารินจิน ซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า เมื่อบ่มสารนารินจินร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสหรือ MGO จะลดการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนอัลบูมิน มากกว่าสาร AG ซึ่งเป็นสารมาตราฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs

เป็นที่ทราบกันดีว่า กลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ยับยั้งการเกิด AGEs มักเกี่ยวของกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ดักจับโลหะทรานซิชัน (transition metal) หรือฤทธิ์ในการทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิล โดยปกติในระยะเริ่มต้นของการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น ทั้งน้ำตาลและ Schiff base มีแนวโน้มที่จะเกิดออกซิเดชั่นก่อให้เกิดสารกลุ่มไดคาร์บอนิล โดยอาศัยโลหะทรานซิชัน (transition metal) เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างสาร AGEs ในที่สุด ดังนั้นการดักจับหรือทำลายสารอนุมูลอิสระ เช่น hydroxyl radicals และ superoxide radicals หรือการให้สารที่มีฤทธิ์ดักจับโลหะทรานซิชัน (metal chelators) อาจช่วยลดการเกิด auto-oxidation ของน้ำตาล และการออกซิเดชั่นของ schiff base และ amadori products จึงลดการสร้างสาร AGEs ได้ [6-7] มีรายงานวิจัย พบว่า สารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถจะทำลายอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างปฏิกิริยาไกลเคชั่น รวมทั้งยังป้องกันน้ำตาลและไกลเคชั่นโปรตีนจากการเกิดออกซิเดชั่น นำไปสู่การยับยั้งการสร้างสาร AGEs [24,25] จากการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ด้วยวิธี ferric-reducing/antioxidant power (FRAP) และ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [26-28] รวมทั้งในการศึกษานี้ พบว่า สารนารินจินมีฤทธิ์ดักจับโลหะทรานซิชันและมี ความสามารถในการทำลายสาร methygloxal ดังนั้น จึงอาจยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของสารกลุ่มไดคาร์บอนิลให้กลายเป็นสาร AGEs ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินอาจเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการทำลายหรือดักจับสาร MGO

นอกจากการเกิดอนุมูลอิสระในระหว่างกระบวนการไกลเคชั่นจะเกี่ยวข้องกับการสร้างสาร AGEs แล้วยังเป็นตัวการสำคัญที่เหนี่ยวนำให้โปรตีนเสียสภาพและเกิดการออกซิเดชั่นของโปรตีน โดยโปรตีนคาร์บอนิลจะเป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายของโปรตีนอันเนื่องมาจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น [21] งานวิจัยนี้ พบว่า สารนาริน

จินสามารถลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลที่ถูกชักนำด้วยน้ำตาลฟรุคโตสได้ ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่า สารนารินจินอาจยับยั้งกระบวนการไกลเคชั่น จึงลดการเกิดสาร AGEs และช่วยลดปริมาณโปรตีนคาร์บอนิลได้ อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้ เป็นเพียงงานวิจัยเบื้องต้นที่ศึกษาในหลอดทดลอง จึงควรมีการศึกษาต่อยอดในอนาคต โดยการศึกษาในร่างกาย (in vivo study) เพื่อนำผลการทดลองไปใช้ได้จริง ทั้งในด้านการป้องกันภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาในหลอดทดลอง สรุปได้ว่าสารนารินจิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs และเกิดการออกซิเดชั่นของโปรตีนที่ชักนำด้วยน้ำตาลฟรุคโตส โดยออกฤทธิ์ผ่านการดักจับโลหะทรานซิชัน และการทำลายสาร methyglyoxal

เอกสารอ้างอิง

1. Schalkwijk, CG., & Stehouwer, CD. Vascular complications in diabetes mellitus: the role of endothelial dysfunction. *Clin Sci (Lond),* 2005;109:143-159.
2. Avogaro, A., de Kreutzenberg, S. V., & Fadini, G. Endothelial dysfunction: causes and consequences in patients with diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract,2008;* 82: S94-S101.
3. Peppa M, Raptis SA. Advanced glycation end products and cardiovascular disease. Curr Diabetes Rev. 2008;4:92-100.
4. Leslie RD, Cohen RM. Biologic variability in plasma glucose, hemoglobin A1c, and advanced glycation end products associated with diabetes complications J Diabetes Sci Technol. 2009;3(4):635-43.
5. Semba RD, Nicklett EJ, Ferrucci L. Does accumulation of advanced glycation end products contribute to the aging phenotype. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2010;65:963-75.
6. Simm A. Protein glycation during aging and in cardiovascular disease. J Proteomics. 2013;21:1-12.
7. Hu S, He W, Liu Z, Xu H, Ma G. The Accumulation of the Glycoxidation Product N(ε)-carboxymethyllysine in cardiac tissues with age, diabetes mellitus and coronary heart disease. Tohoku J Exp Med. 2013;230(1):25-32
8. Nagai R, Murray DB, Metz TO, Baynes JW. Chelation: a fundamental mechanism of action of AGE inhibitors, AGE breakers, and other inhibitors of diabetes complications. Diabetes. 2012;6:549-59
9. Karasu C. Glycoxidative stress and cardiovascular complications in experimentally-induced diabetes: effects of antioxidant. Open Cardiovasc Med J. 2010;4:240-56.
10. Mashilipa C, Wang Q, Slevin M, Ahmed N. Antiglycation and Antioxidant Properties of Soy Sauces. J Med Food. 2011
11. Muthenna P, Akileshwari C, Saraswat M, Bhanuprakash Reddy G. Inhibition of advanced glycation end-product formation on eye lens protein by rutin. Br J Nutr. 2012;107:941-9.
12. Chen YT, Zheng RL, Jia ZJ, Ju Y. Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. Free Radic Biol Med,1990:9:19–21.
13. Ali MM, El Kader MA.T he influence of naringin on the oxidative state of rats with streptozotocin-induced acute hyperglycaemia. Z Naturforsch C. 2004 Sep-Oct;59(9-10):726-33.

14. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. Fitoterapia. 2012 Jun;83(4):650-9.
15. Punithavathi VR, Anuthama R, Prince PS. Combined treatment with naringin and vitamin C ameliorates streptozotocin-induced diabetes in male Wistar rats.J Appl Toxicol, 2008:28:806–813
16. Mahmoud AM, Ashour MB, Abdel-Moneim A, Ahmed OM. J Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. Diabetes Complications. 2012 Nov;26(6):483-90
17. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. Nutrient 2010 Dec;2(12):1247-65.
18. Meeprom A, Sompong W, Chan CB, Adisakwattana S. Isoferulic acid, a new anti-glycation agent, inhibits fructose-and glucose-mediated protein glycation in vitro. Molecules 2013 May 30;18(6):6439-54.
19. Sadowska-Bartosz I, Galiniak S, Bartosz G. Kinetics of glycoxidation of bovine serum albumin by methylglyoxal and glyoxal and its prevention by various compounds. Molecules 2014 Apr 17;19(4):4880-96.
20. Ni Z, Zhuge Z, Li W, Xu H, Zhang Z, Dai H. Inhibitory effects of hydroxysafflor yellow A on the formation of advanced glycation end products in vitro. Biol Pharm Bull 2012 Aug 31;35(11):2050-3.
21. Wu CH, Yen GC. Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. J Agric Food Chem 2005 Apr 20;53(8):3167-7.
22. Asgary S, Naderi G, Sarrafzadegan N, Ghassemi N, Boshtam M, Rafie M, Arefian A. Anti-oxidant effect of flavonoids on hemoglobin glycosylation. Pharm Acta Helv 1999 Feb;73(5):223-6.
23. Matsuda H, Wang T, Managi H, Yoshikawa M. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. Bioorg Med Chem 2003 Dec 1;11(24):5317-23.
24. Jariyapamornkoon N, Yibchok-anun S, Adisakwattana S. Inhibition of advanced glycation end products by red grape skin extract and its antioxidant activity. BMC Complement Altern 2013 Jul 12;13:171-9.
25. Suantawee T, Wesarachanon K, Anantsuphasak K, Daenphetploy T, Thien-Ngern S, Thilavech T, Pasukamonset P, Ngamukote S, Adisakwattana S. Protein glycation inhibitory activity and antioxidant capacity of clove extract. J Food Sci Technol 2015 Jun;52(6):3843-50.

26. Gorinstein S, Huang D, Leontowicz H, Leontowicz M, Yamamoto K, Soliva-Fortuny R, Martin Belloso O, Martinez Ayala AL, Trakhtenberg S. Determination of naringin and hesperidin in citrus fruit by high-performance liquid chromatography:the antioxidant potential cirus fruit. Acta Chromatogr 2006;17:108-24.
27. De Martino L, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LF, De Feo V. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. Int J Mol Sci 2012 May 12;13(5):5406-19.
28. 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 April;33(4):697-701.

ที่ ศธ ๐๕๙๐.๐๗/ว๑๐๖๑

มหาวิทยาลัยพะเยา
ตำบลแม่กา อำเภอเมือง
จังหวัดพะเยา ๕๖๐๐๐

๒ พฤศจิกายน ๒๕๕๘

เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ "พะเยาวิจัย ครั้งที่ ๕"

เรียน นางสาวศิรินารถ เพ็งเนตร

ตามที่ท่านมีความประสงค์เข้าร่วมนำเสนอผลงานวิจัย ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ "พะเยาวิจัย ครั้งที่ ๕" ระหว่างวันที่ ๒๘-๒๙ มกราคม ๒๕๕๙ ณ หอประชุมพญางำเมือง มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา ในชื่อผลงาน : ผลของสารนารินจินต่อการสร้าง advanced glycation end products

บัดนี้ คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิฯ ได้พิจารณาผลงานของท่านเป็นที่เรียบร้อยแล้ว มีความยินดีที่จะเรียนให้ท่านทราบว่าผลงานวิจัย ของท่านผ่านการพิจารณาคัดเลือกให้นำเสนอรูปแบบ Poster Presentation ในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ "พะเยาวิจัย ครั้งที่ ๕" และได้รับการตีพิมพ์ Abstract + Proceedings

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และทางคณะกรรมการจัดการประชุมขอขอบพระคุณท่านที่เข้าร่วมการประชุมทางวิชาการระดับชาติ "พะเยาวิจัย ครั้งที่ ๕" มา ณ โอกาสนี้

ขอแสดงความนับถือ

วิบูลย์ วัฒนาธร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ วัฒนาธร)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและประกันคุณภาพ ปฏิบัติการแทน
อธิการบดีมหาวิทยาลัยพะเยา

คณะกรรมการดำเนินการประชุมวิชาการพะเยาวิจัย ครั้งที่ ๕
โทรศัพท์ ๐ ๕๔๔๖ ๖๖๖๖ ต่อ ๑๐๔๗-๘ (วริศรา คลังนุ่ม,วินิตตา ลือชัย)
โทรศัพท์เคลื่อนที่ ๐๘ ๒๖๒๙ ๑๙๗๐
โทรสาร ๐ ๕๔๔๖ ๖๗๑๔

ผลของสารนารินจินต่อการสร้าง advanced glycation end products

Effect of Naringin on the Formation of advanced glycation end products

ศิรินารถ เพ็งเนตร[1], วชิราวดี มาลากุล[1*]

Sirinat Pengnet[1], Wachirawadee Malakul[1*]

บทคัดย่อ

ปฏิกิริยาไกลเคชั่น เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องอาศัยการทำงานของเอนไซม์ระหว่างโปรตีนและน้ำตาลรีดิวซ์ ซึ่งนำไปสู่การสร้าง Advance glycation end products (AGEs) โดยผ่านสารกลุ่มไดคาร์บอนิล เช่น methylglyoxal (MGO) การสะสมของ AGEs ในเนื้อเยื่อเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานและภาวะสูงอายุ ซึ่งการพัฒนาสารที่ยับยั้งการเกิด AGEs เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาโรคที่เกิดจากสาร AGEs ได้ ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารนารินจินต่อการยับยั้งการเกิด AGEs ในหลอดทดลองและความสามารถในการจับสาร MGO สำหรับแบบจำลองในหลอดทดลองของปฏิกิริยาไกลเคชั่น จะใช้สารที่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น (น้ำตาลฟรุคโตส และ MGO) และโปรตีนอัลบูมิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน เมื่อมีหรือไม่มีสารนารินจิน (0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์) ร่วมด้วย การเกิดสาร AGEs จะถูกวัดด้วยวิธีวัด Fluorescence รวมทั้งความสามารถของสารนารินจินต่อการทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิลจะถูกวิเคราะห์โดยการวัดความสามารถในการจับสาร MGO โดยตรง เมื่อบ่มน้ำตาลฟรุคโตส หรือ MGO ร่วมกับโปรตีนอัลบูมิน ปริมาณสาร Fluorescent AGEs จะเพิ่มมากขึ้นตลอดระยะเวลาที่ศึกษา เมื่อให้สารนารินจิน (0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์) จะลดการเกิด AGEs โดยขึ้นกับความเข้มข้นของสาร รวมทั้งสารนารินจิน (1 มิลลิโมลาร์) ยังลดปริมาณ MGO ประมาณ 66% ภายใน 3 วัน ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ป้องกันการเกิด AGEs ในหลอดทดลอง โดยออกฤทธิ์ผ่านการดักจับสารกลุ่มคาร์บอนิล

คำสำคัญ: สารนารินจิน, advanced glycation end products, สารกลุ่มไดคาร์บอนิล

Abstract

Glycation is the non-enzymatic reaction between amino groups in proteins and reducing sugars, leading to the formation of advanced glycation end products (AGEs) via dicarbonyl compounds, such as methylglyoxal (MGO). The accumulations of AGEs in tissues are involved in the development of diabetic complications and normal aging. The development of AGE inhibitors is considered to have therapeutic intervention in AGEs-related disorders. The objective of this study was to evaluate the *in vitro* effect of naringin on the formation of AGEs and trapping of MGO. In vitro models of glycation, glycating agents (fructose and MGO) and bovine serum albumin (BSA) incubated at 37 °C for 21 days, were examined in the presence or absence of naringin (0.1, 0.5 and 1 mM). The formation of AGEs was detected through the reaction of glycating agents with protein by the fluorescence method. In addition the capacity of naringin to scavenge carbonyl compounds was determined by direct MGO trapping assay. Fluorescent AGE formation was increased after incubation of fructose or MGO with BSA throughout the study period. The addition of naringin (0.5 and 1 mM) reduced the formation of fructose and MGO derived AGEs in a concentration dependent manner. In addition naringin (1mM) scavenged 66 % of MGO in 3 days. These results demonstrated that naringin effectively prevented the formation of fluorescent AGEs in vitro. The antiglycation activities of naringin were attributed in part to their ability to trap reactive carbonyl compounds.

Keywords : naringin, advanced glycation end products, dicarbonyl compounds

[1]ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร พิษณุโลก

[1]Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phisanulok, Thailand

*Corresponding author: wachirawadeem@hotmail.com (W. Malakul)

บทนำ

Advanced glycation end products (AGEs) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาแบบไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างน้ำตาลและโปรตีน เรียกปฏิกิริยานี้ว่า ปฏิกิริยาไกลเคชั่น เป็นที่ทราบกันดีว่า AGEs จะเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพและโรคต่างๆมากมาย เช่น ภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดตีบแข็ง โรคอัลไซเมอร์ และภาวะสูงอายุ [1]

โดยปกติ ปฏิกิริยาไกลเคชั่น จะเริ่มต้นจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่คาร์บอนิลของน้ำตาล (เช่น น้ำตาลกลูโคส และ น้ำตาลฟรุคโตส) กับหมู่อะมิโนอิสระของโปรตีน ทำให้เกิดสารที่มีโครงสร้างไม่เสถียร ที่เรียกกว่า Schiff base ก่อนเปลี่ยนโครงสร้างเป็นสารที่มีความเสถียรมากขึ้น เรียกว่า Amadori products การเกิดออกซิเดชั่นของน้ำตาล Schiff base หรือ Amadori products จะทำให้เกิดสารกลุ่มไดคาร์บอนิล (เช่น methylglyoxal (MGO), glyoxal, และ 3-deoxyglucosone) โดยเมื่อสารกลุ่มนี้ทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ จะก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความเสถียรมากขึ้น เรียกว่า AGEs การสะสมของ AGEs ในเนื้อเยื่อจะก่อให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างและการทำงานของโปรตีนในร่างกาย ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆในโรคเบาหวาน เช่น โรคไต โรคหลอดเลือดตีบแข็ง [2,3] ดังนั้นการยับยั้งการเกิด AGEs น่าจะช่วยลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนเหล่านี้ในผู้ป่วยเบาหวานได้ ปัจจุบัน สารที่ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs มักออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งการเกิดออกซิเดชั่น หรือ ออกฤทธิ์ทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิล (เช่น MGO) แต่สารที่สังเคราะห์ขึ้นมาเหล่านี้ มักมีผลข้างเคียง เช่น สาร Aminoguanidine (AG) หรือ pyridoxamine [4] ดังนั้นการศึกษาหาสารสำคัญที่ได้มาจากพืชผัก และมีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs น่าจะปลอดภัยที่จะใช้รักษาหรือลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนต่างๆในผู้ป่วยโรคเบาหวาน

สารนารินจิน (naringin) เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ (flavonoid) มักพบในผลไม้ตระกูลส้ม [5] โดยมีการศึกษาคุณสมบัติพบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [6] มีฤทธิ์ลดระดับน้ำตาลในเลือดและเพิ่มปริมาณอินซูลินในหนูเบาหวาน [7,8] รวมทั้งลดการเกิด diabetic neuropathy ด้วย [9] แต่ยังไม่เคยมีการศึกษาผลของสารนารินจินต่อการเกิดไกลเคชั่นของโปรตีนอัลบูมินที่ถูกชักนำด้วยน้ำตาลฟรุคโตสและ MGO ในหลอดทดลอง จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาเกี่ยวกับสารนารินจินต่อการเกิด AGEs ดังนั้นงานวิจัยนี้ จึงมุ่งเน้นศึกษาฤทธิ์ของสารนารินจินต่อการยับยั้งการเกิด AGEs ในหลอดทดลองและความสามารถในการจับสาร MGO เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่เป็นประโยชน์ในการรักษาการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดหรือภาวะแทรกซ้อนของโรคเบาหวานต่อไปในอนาคต

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

สารนารินจิน (naringin), โปรตีนอัลบูมิน (BSA), O-phenylenediamine, น้ำตาลฟรุคโตส (fructose) และ Aminoguanidine จากบริษัท Sigma-Aldrich Chemical Co.,USA ส่วนสาร Methyglyoxal จากบริษัท Acros Organics, USA

วิธีการศึกษา

1. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model

นำโปรตีนอัลบูมิน (BSA) 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ น้ำตาลฟรุคโตส (fructose) 500 มิลลิโมลาร์ ละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02% โซเดียม อะไซด์ (sodium azide) ผสมร่วมกับสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 21 วัน จากนั้นนำไปวัด Fluorescence intensity ของสาร AGEs โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation 360 นาโนเมตร และ emission 460 นาโนเมตร ที่วันที่ 7, 14, และ 21 หลังจากการบ่ม

2. ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model

นำโปรตีนอัลบูมิน 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ MGO 60 มิลลิโมลาร์ ละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ pH 7.4 ที่มี 0.02% โซเดียม อะไซด์ (sodium azide) ผสมร่วมกับสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอนอล) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำไปวัด Fluorescence intensity ของสาร AGEs โดยเครื่อง microplate spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น excitation 360 นาโนเมตร และ emission 460 นาโนเมตร ที่วันที่ 1, 2, และ 3 หลังจากการบ่ม

3. ฤทธิ์ต่อความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

นำสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ AG (positive control) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ หรือ vehicle (5% เอทานอล) บ่มร่วมกับ MGO ที่ความเข้มข้น 3 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน จากนั้นเติม o-phenylenediamine ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของ MGO โดย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Mobile phases คือ 0.2% acetic acid และ acetonitrile, อัตราการไหล 1 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้คอลัมน์ Fortis C18 และความยาวคลื่นแสง 280 นาโนเมตร, retention time 4.3 นาที ปริมาณของ MGO จะถูกวิเคราะห์ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์ของ remaining MGO (\%)} = \frac{\text{พื้นที่ใต้กราฟ (Peak area) ที่ช่วงเวลาต่าง ๆ}}{\text{พื้นที่ใต้กราฟที่ช่วงเวลา 0}} \times 100$$

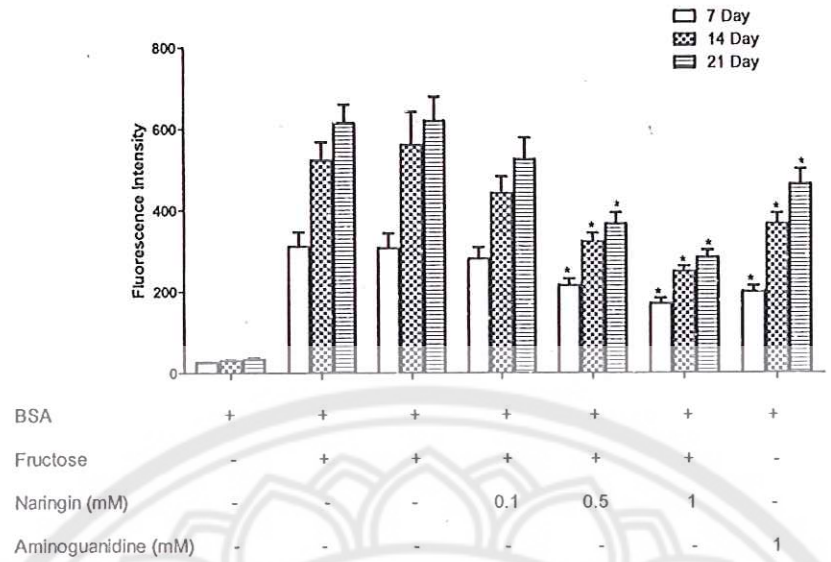
4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติ ในทุกการทดลอง จะทำการทดสอบตัวอย่างละ 6 ครั้ง และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย ± SEM ส่วนความแตกต่างทางสถิติ ประเมินโดยใช้ one-way ANOVA โดยตั้งค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 โปรแกรมวิเคราะห์ทางสถิติที่จะใช้ในงานวิจัยนี้คือ GraphPad Prism

ผลการศึกษา

1.ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน ร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสจะส่งผลให้เพิ่ม Fluorescence Intensity AGEs เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ เป็นเวลา 21 วัน Fluorescence Intensity ของสาร AGEs ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับสาร AG (รูปที่ 1) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ มากกว่า ฤทธิ์ยับยั้งของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสาร AG เป็นสารมาตรฐานที่ใช้ลดการเกิด AGEs ในภาวะเบาหวาน (รูปที่ 1) จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิด AGEs ใน BSA-Fructose model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร

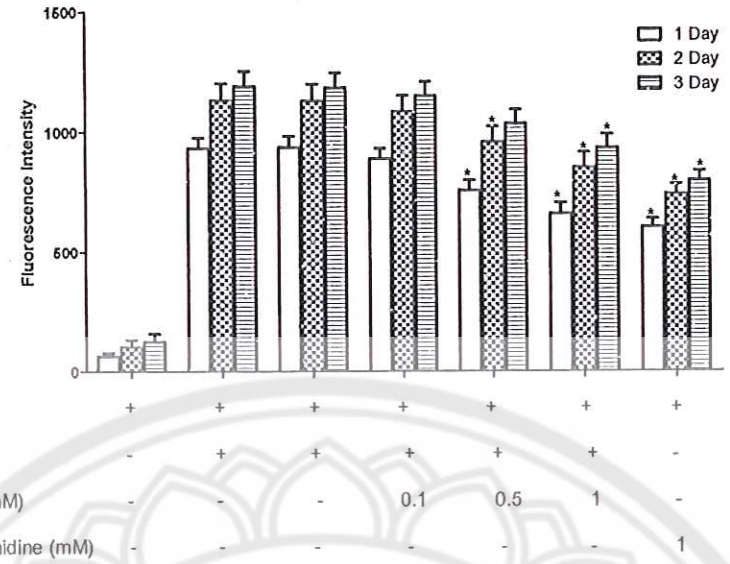


รูปที่ 1 แสดงถึงค่า Fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดยฟรุคโตส (Fructose) เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 21 วัน, ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+Fructose ($P < 0.05$)

2.ฤทธิ์ต่อการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model

จากการศึกษาพบว่าเมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมิน (BSA) ร่วมกับ MGO จะส่งผลให้เพิ่ม Fluorescence Intensity AGEs เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมบ่มเฉพาะโปรตีนอัลบูมิน และเมื่อให้สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะลด Fluorescence Intensity ของ AGEs ตลอดระยะเวลา 3 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่บ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับ MGO (รูปที่ 2) โดยฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินที่ 1 มิลลิโมลาร์ ประมาณ 22 % ขณะที่ฤทธิ์ของสาร AG ที่ 1 มิลลิโมลาร์ ในการยับยั้งการเกิด AGEs ประมาณ 33 % จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าสารนารินจินมีฤทธิ์ลดหรือยับยั้งการเกิด AGEs ใน BSA-MGO model โดยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร

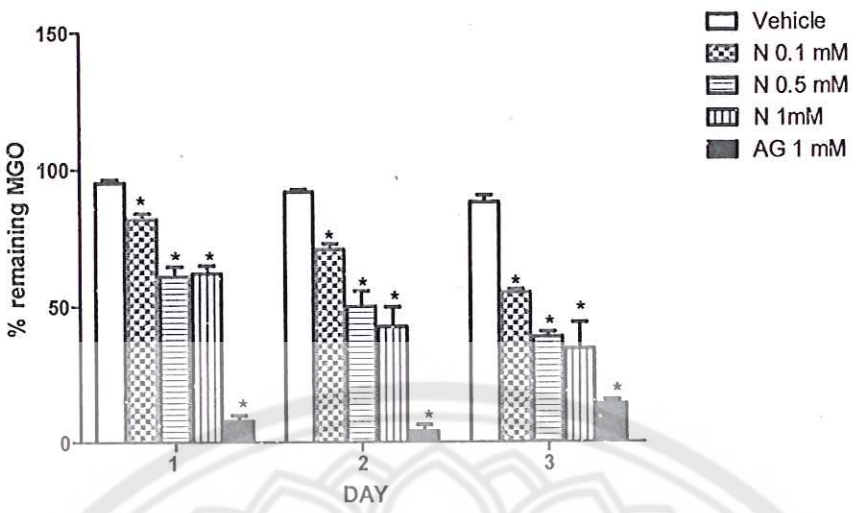


รูปที่ 2 แสดงถึงค่า fluorescent Intensity ของสาร AGEs ที่ถูกชักนำโดย MGO เมื่อบ่มร่วมกับสารนารินจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) เป็นเวลา 3 วัน , ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ BSA+MGO ($P < 0.05$)

3. ฤทธิ์ต่อความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)

เมื่อบ่มสารนารินจิน (naringin) ร่วมกับ MGO โดยตรงเป็นเวลา 3 วัน (3 Day) ตามรูปที่ 3 พบว่าสารนารินจิน ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับตัวทำละลาย (5% เอทานอล) และการลดลงจะแปรผันตามระยะเวลาที่บ่ม สารนารินจินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ จะลดปริมาณ MGO ประมาณ 66 % ขณะที่สาร AG ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ มีผลลดปริมาณ MGO ประมาณ 85 % จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารนารินจินมีผลดักจับหรือทำลายสาร MGO ได้โดยตรง



รูปที่ 3 แสดงผลของสารนาริงจิน (naringin) ที่ความเข้มข้น 1, 0.5 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ หรือ Aminoguanidine (AG) ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ หรือ vehicle (5% เอทานอล) ต่อความสามารถในการดักจับหรือทำลายสาร MGO ซึ่ง กราฟแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของปริมาณของสาร MGO ที่คงเหลือ (% remaining MGO), ค่าแสดงในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM * แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับ Vehicle ของแต่ละวัน ($P < 0.05$)

วิจารณ์และสรุปผล

เป็นที่ทราบกันดี ว่าการสะสมของ AGEs ในร่างกายจะเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพในภาวะชราภาพและโรคแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวาน [10] โดยสาร AGEs เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาไกลเคชั่น ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ไม่อาศัยเอนไซม์ระหว่างน้ำตาล (เช่น น้ำตาลกลูโคส หรือ น้ำตาลฟรุคโตส) กับโปรตีน มีรายงานวิจัยพบว่า ปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนที่เกิดจากน้ำตาลฟรุคโตสนั้นจะเกิดได้เร็วกว่าน้ำตาลกลูโคส [11] โดยน้ำตาลฟรุคโตสที่เพิ่มขึ้นภายในร่างกายนั้นอาจมาจากปัจจัยภายนอก เช่น อาหารและเครื่องดื่ม หรือจากปัจจัยภายใน เช่น เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มสูงขึ้นให้เป็นสาร sorbital และเปลี่ยนเป็นน้ำตาลฟรุคโตสในที่สุด โดยอาศัยกระบวนการ polyol pathway นอกจากนี้ สาร AGEs สามารถเกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารกลุ่มไดคาร์บอนิลกับโปรตีนภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งสารกลุ่มไดคาร์บอนิล เช่น MGO นั้นสามารถสร้างขึ้นได้ในร่างกาย โดยอาจเป็นผลผลิตจากปฏิกิริยา glycolysis หรือ จากปฏิกิริยาไกลเคชั่นของน้ำตาลและโปรตีน หรือจากการเกิด lipid peroxidation [12]

งานวิจัยนี้พบว่า เมื่อบ่มโปรตีนอัลบูมินร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสหรือ MGO ปริมาณสาร AGEs เพิ่มสูงขึ้นโดยขึ้นกับระยะเวลาที่บ่ม ซึ่งคล้ายคลึงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [11,13] มีงานวิจัย พบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จะมีฤทธิ์ป้องกันการเกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวาน จากการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ เช่น luteolin หรือ quercetin จะมีฤทธิ์ต้านการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่น [14] โดยกลไกการออกฤทธิ์มักเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ [15] หรือฤทธิ์ในการทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิล [16] ในงานวิจัยนี้ ศึกษาฤทธิ์ของสารนาริงจิน ซึ่งเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบว่า เมื่อบ่มสารนาริงจินร่วมกับน้ำตาลฟรุคโตสหรือ MGO จะลดการเกิดปฏิกิริยาไกลเคชั่นของโปรตีนอัลบูมิน มากกว่าสาร AG ซึ่งเป็นสารมาตราฐานที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs

เป็นที่ทราบกันดีว่า กลไกการออกฤทธิ์ของสารที่ยับยั้งการเกิด AGEs มักเกี่ยวของกับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระหรือฤทธิ์ในการทำลายสารกลุ่มไดคาร์บอนิล โดยมีงานวิจัยที่พบว่าสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนั้นจะสามารถลดการเกิดของ AGEs ได้ [17,18] สารนาริงจินเคยมีการศึกษา พบว่า มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระได้ด้วยวิธี ferric-reducing/antioxidant power (FRAP) และ 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) [19-21] รวมทั้งในการศึกษานี้ พบว่า สารนาริงจินมีความสามารถในการดักจับสาร methygloxal ดังนั้น จึงอาจยับยั้งการ

เปลี่ยนแปลงของสารกลุ่มไดคาร์บอนิลให้กลายเป็นสาร AGEs ดังนั้น ฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs ของสารนารินจินอาจเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและฤทธิ์ในการทำลายหรือดักจับสาร MGO อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้ เป็นเพียงงานวิจัยเบื้องต้นที่ศึกษาในหลอดทดลอง จึงควรมีการศึกษาต่อยอดในอนาคต โดยการศึกษาในร่างกาย (in vivo study) เพื่อนำผลการทดลองไปใช้ได้จริง ทั้งในด้านการป้องกันภาวะแทรกซ้อนในผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาในหลอดทดลอง สรุปได้ว่าสารนารินจิน มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิด AGEs โดยออกฤทธิ์ผ่านการดักจับสาร methyglyoxal

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิจัยจากงบประมาณรายได้ มหาวิทยาลัยนเรศวร

เอกสารอ้างอิง

1. Mizutani T, Shizuka F, Matsuzawa T, Amano Y, Arikawa Y. Anti-glycation activity of japanese chestnut (*Castanea crenata*) inner skin extract is beneficial for type 2 diabetes in rat model. J Anti Aging Med 2014 Jan 31;10(6):112-9.

2. Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS. Formation of glyoxal, methylyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. Biochem J 1999 Nov 15;344:109-16.

3. Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product–protein crosslinks. Arch Biochem Biophys 2003 Nov 1;419(1):89-96.

4. Thornalley PJ. Use of aminoguanidine (Pimagedine) to prevent the formation of advanced glycation endproducts. Arch Biochem Biophys 2003 Nov 1;419(1):31-40.

5. Caengprasath N, Ngamukote S, Makynen K, Adisakwattana S. The protective effects of pomelo extract (*Citrus grandis L. osbeck*) against fructose-mediated protein oxidation and glycation. EXCLI J 2013 June 10;12:491-502.

6. Cavia-Saiz M, Busto MD, Pilar-Izquierdo MC, Ortega N, Perez-Mateos M, Muñiz P. Antioxidant properties, radical scavenging activity and biomolecule protection capacity of flavonoid naringenin and its glycoside naringin: a comparative study. J Sci Food Agric 2010 May;90(7):1238-44.

7. Jung UJ, Lee MK, Jeong KS, Choi MS. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice. J Nutr 2004 Oct;134(10):2499-503.

8. Mahmoud AM, Ashour MB, Abdel-Moneim A, Ahmed OM. Hesperidin and naringin attenuate hyperglycemia-mediated oxidative stress and proinflammatory cytokine production in high fat fed/streptozotocin-induced type 2 diabetic rats. J Diabetes Complications 2012 Nov-Dec;26(6):483-90.

9. Kandhare AD, Raygude KS, Ghosh P, Ghule AE, Bodhankar SL. Neuroprotective effect of naringin by modulation of endogenous biomarkers in streptozotocin induced painful diabetic neuropathy. Fitoterapia 2012 Jun;83(4):650-9.

10. Luevano-Contreras C, Chapman-Novakofski K. Dietary advanced glycation end products and aging. Nutrient 2010 Dec;2(12):1247-65.

ภาคผนวก

เปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ดำเนินการมาและผลที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผนไว้	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. เพื่อศึกษาผลของสาร naringin ต่อการสร้าง advanced glycation end products	ศึกษาฤทธิ์ต่อการเกิดไกลเคชั่นของ BSA ที่ชักนำโดยน้ำตาลฟรุคโตส และ MGO	วิเคราะห์Fluorescent AGEs ที่ชักนำโดยน้ำตาลฟรุคโตส และ MGO	ได้ข้อมูลของฤทธิ์ของ naringin ต่อปริมาณ Fluorescent AGEs
		วิเคราะห์ Fructosamine levels	ได้ข้อมูลของฤทธิ์ของ naringin ต่อปริมาณ Fructosamine levels
		วิเคราะห์การเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยการวัดปริมาณ protein carbonyl	ได้ข้อมูลของการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนโดยการวัดปริมาณ protein carbonyl
2. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสาร naringin ในการยับยั้งการเกิด advanced glycation end products	ศึกษาฤทธิ์ Metal chelating activity	วิเคราะห์ Metal chelating activity	ได้ข้อมูลของฤทธิ์ Metal chelating activity ของ naringin
	ศึกษาความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)	วิเคราะห์ความสามารถในการจับสาร Methyglyoxal (MGO Trapping capacity)	ได้ข้อมูลความสามารถในการจับสาร Methyglyoxalของ naringin