



ผลของสารเฮสเพอริดินต่อการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลำไส้เล็กในหนูเบาหวาน

พิจิตรา อ้อดเอก¹, อิทธิพล พวงเพชร², วันทณี หาญช้าง¹ และสะการะ ตันโสภณ^{1*}

Inhibitory Effect of Hesperidin on α -Glucosidase Activity and Small Intestinal Morphology in Diabetic Rats

Phichittra Od-ek¹, Ittipon Phoungpetchara², Wantanee Hanchang¹ and Sakara Tunsophon^{1*}

¹ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

²ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก 65000

¹Department of Physiology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

²Department of Anatomy, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000

* Corresponding author. E-mail address: sakarat@nu.ac.th

บทคัดย่อ

สารเฮสเพอริดินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ที่พบได้ในส้มโอ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด ลดไขมันและต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งอาจนำไปใช้ในการรักษาโรคเบาหวานได้ อย่างไรก็ตามยังไม่มีงานวิจัยศึกษาผลลดน้ำตาลของสารเฮสเพอริดินต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สำคัญเกี่ยวข้องกับการย่อยคาร์โบไฮเดรต รวมถึงการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็ก งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดิน โดยทำการศึกษาในหลอดทดลองเพื่อดูผลของสารเฮสเพอริดินต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส (Acarbose) และเพื่อศึกษาผลของสารเฮสเพอริดินต่อลักษณะโครงสร้างลำไส้เล็กของหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะเบาหวาน โดยการแยกลำไส้เล็กส่วนต้นของหนูทดลองที่ได้รับสารเฮสเพอริดินในปริมาณต่างๆ เพื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กส่วนต้นในหนูกลุ่มควบคุม หนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน จากการศึกษาการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสพบว่า ที่ความเข้มข้น 100 และ 200 ไมโครกรัม/มล. เฮสเพอริดินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ (ร้อยละ 21.35±5.56 และ 21.98±9.67) ไม่แตกต่างจากอะคาร์โบสที่ความเข้มข้นเดียวกัน (ร้อยละ 13.32±5.10 และ 34.55±20.92) แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นถึง 2,000 ไมโครกรัม/มล. สารเฮสเพอริดินแสดงฤทธิ์การยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ร้อยละ 33.46±4.24 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส ที่ความเข้มข้นเท่ากันมีร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ 83.22±16.69 ($P < 0.01$) ดังนั้นสารเฮสเพอริดินที่ความเข้มข้นต่ำมีความสามารถในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารมาตรฐานอะคาร์โบส แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของเฮสเพอริดินจะน้อยกว่าสารมาตรฐานอะคาร์โบสเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ ในการศึกษาผลของเฮสเพอริดินต่อโครงสร้างของลำไส้เล็กของหนูทดลองพบว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน ปริมาณ 50 มก./กก. น้ำหนักตัวและ 100 มก./กก. น้ำหนักตัว ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความยาวของวิลโลและโครงสร้างอื่นๆ แต่เป็นที่น่าสนใจว่าหนูเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. น้ำหนักตัวมีจำนวนกอบเบลทเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูเบาหวาน (7.70 ± 3.51 และ 13.67 ± 4.00 ที่ $P < 0.001$ ตามลำดับ) จากผลการทดลองที่ได้สรุปว่าสารเฮสเพอริดินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้บางส่วน ซึ่งอาจมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวานและมีผลในการลดจำนวนกอบเบลทเซลล์ซึ่งอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการลดการระคายเคือง ดังนั้นเฮสเพอริดินอาจสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยเบาหวานได้

คำสำคัญ: เฮสเพอริดิน เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส โรคเบาหวาน เซลล์ลำไส้เล็ก

Abstract

Hesperidin is a flavonoid found in citrus fruits. It has been reported to decrease plasma glucose, lipids and exhibit strong antioxidant activity. Its benefits could be used for treatment of Diabetes Mellitus (DM). The purposes of this study were to evaluate the effect of hesperidin on α -glucosidase by using *in vitro* study of difference concentration of hesperidin on α -



glucosidase activity compared to acarbose. Secondly, the morphological change of small intestinal structure was observed by using *in vivo* study of streptozotocin induced diabetic rats. The results demonstrated that hesperidin at low concentration of 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ inhibited α -glucosidase activity by 21.35 ± 5.56 and $21.98\pm 9.67\%$ and showed no significance difference inhibition of enzyme activity when compared to acarbose at the same concentration (13.32 ± 5.10 and $34.55\pm 20.92\%$). However, at high concentration of 2,000 $\mu\text{g/ml}$ of hesperidin and acarbose, the percentage of inhibition of hesperidin was significantly lower than that of acarbose at $P \text{ value} < 0.01$ (33.46 ± 4.24 and $83.22\pm 16.69\%$), respectively. Therefore, the efficiency of α -glucosidase inhibition at low concentration of hesperidin was not difference than acarbose whereas the inhibition efficiency was lower than acarbose at high concentration. In addition, the *in vivo* study of small intestinal structure showed no difference in amount, length and structure of villi when compared with rats in control, diabetic, diabetic with 50mg/kgBW and 100mg/kgBW hesperidin. However, the amount of goblet cells showed significant increased in diabetic group when compared to control group. Interestingly, the goblet cells were significantly decreased in diabetic group with 100mg/kgBW hesperidin when compared with diabetic group at $P \text{ value} < 0.001$ (7.70 ± 3.51 and 13.67 ± 4.00), respectively. In conclusion, hesperidin partially inhibited α -glucosidase activity that might reduce plasma glucose level. The treatment of hesperidin at 100mg/kgBW in diabetic rat decreased goblet cells that possibly involve in irritation mechanism of GI tract. Therefore, hesperidin might be useful for clinical application in DM treatment.

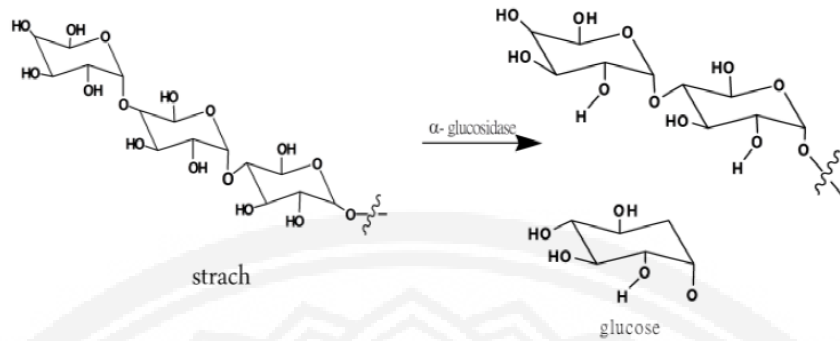
Keywords: Hesperidin, α -glucosidase, diabetes mellitus, intestinal cell

บทนำ

โรคเบาหวานเป็นความผิดปกติของร่างกายที่ผลิตฮอร์โมนอินซูลินไม่เพียงพอต่อความต้องการซึ่งเกิดจากความผิดปกติของเบต้าเซลล์ที่อยู่บริเวณไอเลตส์ออฟแลงเกอร์ฮานส์ (Islets of Langerhans) ที่ตับอ่อน โดยปกติน้ำตาลจะเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนอินซูลิน ในกรณีผู้ป่วยโรคเบาหวานอินซูลินจะไม่สามารถทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพหรือการตอบสนองต่ออินซูลินของอวัยวะเป้าหมายผิดปกติ ส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงตลอดเวลา (Mohammed, Koorbanally, & Islam, 2015, pp. 518-527) หากไม่ได้รับการรักษาอย่างเหมาะสมอาจนำไปสู่สภาวะของโรคแทรกซ้อน โดยปกติอินซูลินจะถูกหลั่งออกมาในปริมาณมากหลังรับประทานอาหาร โดยมีหน้าที่ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือด เก็บสะสมกลูโคสที่ตับและกล้ามเนื้อในรูปแบบไกลโคเจน และยับยั้งการเปลี่ยนไกลโคเจนไปเป็นกลูโคส รวมถึงกระตุ้นการสังเคราะห์โปรตีน โดยเป็นตัวเคลื่อนย้ายกรดอะมิโนเข้าสู่

เซลล์ ดังนั้นเป้าหมายหลักในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวาน คือ การลดระดับน้ำตาลให้อยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกับระดับปกติด้วยการใช้ยารับประทานและการฉีดอินซูลิน ควบคู่ไปกับการควบคุมอาหารและการออกกำลังกาย (Huang et al., 2015) นอกจากนี้ ยังมีทางเลือกหนึ่งของการรักษาโรคเบาหวาน ได้แก่ การใช้ยาที่มีคุณสมบัติยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตน้ำตาลกลูโคส เช่น เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส และเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (Loh & Hadira, 2011)

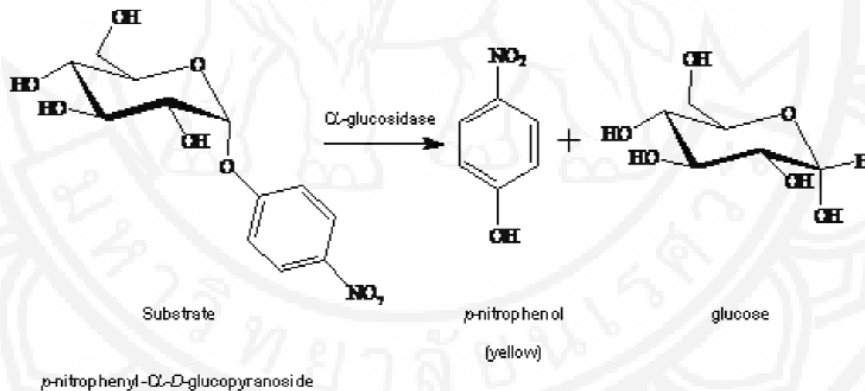
เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่บริเวณผนังเซลล์ของลำไส้เล็ก เอนไซม์ชนิดนี้จะย่อยน้ำตาลโพลีแซคคาไรด์ ซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากกว่า 10 โมเลกุลขึ้นไป เชื่อมต่อกันด้วยพันธะแอลฟาไกลูโคซิดิกด้วยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น น้ำตาลกลูโคส เข้าสู่กระแสเลือดและไปเลี้ยงส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย (Zhao et al., 2015, pp. 122-127) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน, 2554)

ดังนั้นจุดประสงค์ในการทำวิจัยนี้จึงมีเพื่อศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของเฮสเพอริดินที่มีต่อการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดส เฮสเพอริดินเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ พบได้ในพืชจำพวกสกุลส้ม จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่าเฮสเพอริดิน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ยับยั้งการอักเสบ ลดระดับไขมันในเลือดและลดความดัน (Peterson et al., 2006, pp. 74-78; Agrawal et al., 2014, pp. 1-2) สารเฮสเพอริดิน

อาจมีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือดและลดภาวะแทรกซ้อนที่เกิดจากเบาหวาน โดยผลที่ได้ อาจเกิดจากการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งสามารถใช้เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ใช้ในการลดระดับน้ำตาลในเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวาน การศึกษาฤทธิ์การยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดสในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิคทางสเปกโทรสโกปีเพื่อติดตามปฏิกริยาไฮโดรไลซิสสารตั้งต้นไปเป็นผลิตภัณฑ์ดังรูปที่ 2



รูปที่ 2 ปฏิกริยาไฮโดรไลซิสสารตั้งต้น (ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน, 2554)

จากรูปที่ 2 พารา-ไนโตรฟีนิล-แอลฟา-ดี-กลูโคไพราโนไซด์ (p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside: pNPG) เป็นสารละลายไม่มีสี ทำหน้าที่เป็นซับสเตรทในปฏิกริยาเมื่อมีเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจะถูกไฮโดรไลซ์ไปเป็นพารา-ไนโตรฟีนอล (p-nitrophenol) ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลืองและน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถตรวจสอบผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร ถ้าการทดลองมีค่าการดูดกลืนแสงมากแสดงว่า

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่ถ้าการทดลองให้ค่าการดูดกลืนแสงน้อยแสดงว่าเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ไม่สามารถทำงานได้อย่างเป็นปกติ นั่นคือ เอนไซม์ถูกยับยั้งการทำงานด้วยสารสมุนไพรรชนิดนั้น ๆ ดังนั้นการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสจึงเป็นวิธีการเบื้องต้นในการทดสอบพืชสมุนไพรรได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Lu, Demleitner, Song, Rychlik, & Huang, 2016, pp. 463-471)

วิธีการศึกษาและวัสดุอุปกรณ์

การวิจัยเรื่องนี้เป็นการศึกษาเชิงทดลอง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของเฮสเพอริดินในการยับยั้งแอลฟาไกลูโคซิเดส แล้วศึกษาผลที่มีต่อลำไส้เล็กที่แยกจากหนูแรทที่ได้รับการป้อนสารเฮสเพอริดิน และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น สารเฮสเพอริดิน เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสและสารมาตรฐานอะคาร์โบสที่ใช้ในการทดลองสั่งมาจาก Sigma-Aldrich, MO, USA โดยมีวิธีการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 *In vitro* study: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส

การทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสโดยการเปรียบเทียบสารเฮสเพอริดินที่ความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400, 1,600, 1,800 และ 2,000 มก./มล. เปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส

1. *In vitro*: การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดิน

1.1 เติมส่วนผสม ดังนี้

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{blank}}} \times 100$$

โดย A blank คือ ค่าการดูดกลืนแสง ของสารละลาย phosphate buffer

A sample คือ ค่าการดูดกลืนแสงของสารยับยั้งเอนไซม์

2. *In vivo* study: การศึกษาผลของสารเฮสเพอริดินที่มีต่อลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กส่วนต้นในหนูทดลองสัตว์ทดลอง

การทดลองนี้ได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการทดลองโดยคณะกรรมการกำกับและดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวรเรียบร้อยแล้ว โดยหนูทดลองที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นหนูพันธุ์ Sprague Dawley อายุ 2 เดือน โดยสั่งซื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ ม.มหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม และนำมาเลี้ยงที่สถานสัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร หนูถูกนำพักและปรับสภาพก่อนการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โดยหนูทดลองถูก

เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส (2.5 หน่วย/มล.) 2 ไมโครลิตร สารยับยั้งเอนไซม์ (เฮสเพอริดิน และสารมาตรฐานอะคาร์โบส) 18 ไมโครลิตร 50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer (pH 6.8) 50 ไมโครลิตร

1.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

1.3 จากนั้นเติมส่วนผสม ดังนี้

1 มิลลิโมลาร์ p-Nitrophenyl α -D-glucoside (initiate reaction) 20 ไมโครลิตร

50 มิลลิโมลาร์ phosphate buffer (pH 6.8) 50 ไมโครลิตร

1.4 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

1.5 เติม 1 โมลาร์ Sodium carbonate 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่อง Microplate reader

โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร และใช้ phosphate buffer เป็น blank โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน นำไปคำนวณหาร้อยละของการยับยั้ง (% inhibition) โดยคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

แบ่งกลุ่มเพื่อแยกเลี้ยงในกรง ๆ ละ 2-3 ตัว เลี้ยงโดยควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่างตามมาตรฐานของสถาน

สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย หนูทดลองถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ หนูกลุ่มควบคุมและหนูกลุ่มเบาหวานซึ่ง

เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเบาหวานโดยการฉีด Streptozotocin ขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าช่อง

ท้อง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ หนูที่เข้าเกณฑ์เป็นเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 200 มก./ดล. การ

ทดลองนี้ สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย คือ

1. กลุ่มควบคุม

2. กลุ่มเบาหวาน คือหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน

3. กลุ่มหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับสารเฮสเพอริดิน ขนาด 50 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 4 สัปดาห์



4. กลุ่มหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานและได้รับสารเฮสเพอริดิน ขนาด 100 มก./กก. น้ำหนักตัวเป็นเวลา 4 สัปดาห์

การเก็บตัวอย่าง

ทำการตัดลำไส้เล็กส่วนต้น (Duodenum) ซึ่งเป็นส่วนที่ติดกับกระเพาะอาหารออกมา 15 เซนติเมตร แล้วตัดท่อนละ 1 เซนติเมตร จำนวน 2 ท่อน แช่ใน 10% Neutral buffered formalin

การศึกษาเนื้อเยื่อของลำไส้ (Morphology)

ในการศึกษานี้เลือกใช้ Paraffin technique ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้าง การเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างหรือการวินิจฉัยด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. Fixation เป็นการนำลำไส้ที่ใช้สำหรับการศึกษา morphology มา fix ใน fixative ทันทีเพื่อป้องกันการเน่าเปื่อยของเนื้อเยื่อ (tissue autolysis) ซึ่งเป็นขั้นตอนการคงสภาพเนื้อเยื่อ ทำให้เนื้อเยื่อที่เป็น semi-fluid เป็น semi-solid ซึ่งง่ายต่อขั้นตอนการตัด (trim) ชิ้นเนื้อ และทำให้เห็นองค์ประกอบภายในเนื้อเยื่อได้ดี โดยใน

การศึกษานี้เลือกใช้ 10% neutral buffer formalin เป็น fixation

2. หลังจาก fixation นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอน ดังนี้

2.1 Washing เป็นการล้าง fixation ส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อโดยการล้างด้วย 70% Ethanol

2.2 Dehydration เป็นขบวนการทำให้ชิ้นเนื้อแห้งน้ำ โดยการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการใช้ dehydrant เช่น acetone, ethanol, isopropyl alcohol ในการทดลองนี้ใช้ ethanol ทั้งนี้เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง เช่น 70%, 80%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับ

2.3 Clearing เป็นการนำชิ้นเนื้อที่แห้งน้ำไปแช่ใน xylene เพื่อเป็นการนำ dehydrant ออกจากเนื้อเยื่อ โดยให้ clearing agent เข้าไปแทนที่

2.4 Infiltration เป็นขั้นตอนที่นำสาร embedding media (paraffin) เข้าสู่เนื้อเยื่อ

2.5 โดยในขั้นตอนในหัวข้อ 2.2 จนถึง 2.4 เป็นขั้นตอนที่ใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อซึ่งใช้การทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ โดยผู้วิจัยเตรียมสารเคมี และตั้งค่าเวลาในการแช่เนื้อเยื่อไว้ในสารเคมีแต่ละโถดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ

ตำแหน่งโถ	สารเคมี	เวลา (นาที)
1	-	-
2	70% Ethanol	45
3	80% Ethanol	45
4	90% Ethanol	45
5	95% Ethanol	45
6	95% Ethanol	45
7	100% Ethanol	45
8	100% Ethanol	45
9	Xylene	45
10	Xylene	45
11	Paraffin	60
12	Paraffin	120

3. Embedding โดยใช้เครื่องทำพาราฟินบล็อก วิธีการคือวางเนื้อเยื่อใน mold ซึ่งประกอบด้วย molten paraffin wax (embedded) จากนั้นจึงปล่อยให้เย็นและแข็งตัว

4. Sectioning of tissue เป็นการตัด paraffin section ด้วยเครื่อง Microtome หน้า 5 micron ลอยในอ่างน้ำอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส ใช้สไลด์เคลือบด้วย 3-aminopropyltriethoxysilane เพื่อป้องกัน



ชั้นเนื้อหูด รอให้ section แห้งสนิท โดยทิ้งไว้ค้างคืน จากนั้นจึงเริ่มทำการย้อมสี H&E Staining

5. Tissue staining หรือการย้อมสี ใช้วิธีการย้อมสี แบบมาตรฐาน โดยใช้สี Hematoxylin และ Eosin ในการ ย้อม เรียกการย้อมนี้ว่า H&E Staining ขั้นตอนในการ ย้อมสีเนื้อเยื่อ มีวิธีดังนี้

5.1 Deparaffinization โดยการดึง paraffin ออก ด้วย xylene

5.2 Rehydration โดยผ่านสารละลาย ethanol ในความเข้มข้นสูง (100% ethanol) ลงไปหาความเข้มข้นต่ำ (70% ethanol) เพื่อเป็นการเตรียมให้เซลล์มีความพร้อมในการที่จะใช้ย้อม

5.3 Staining เป็นการย้อมสีซึ่งทำให้ Nucleus และ Nucleolus ติดสีน้ำเงินหรือม่วงด้วย การจุ่มใน Hematoxylin แล้วตามด้วยการชะออกด้วยน้ำประปา เพื่อนำสีส่วนเกิน ออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อ ตามด้วยจุ่มสไลด์ใน 70% ethanol ก่อนจุ่มลงใน Eosin เพื่อย้อม cytoplasm

5.4 Dehydration โดยผ่านสารละลาย ethanol ในความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูงตามลำดับ

5.5 Clearing ใช้แซใน xylene ซึ่งเป็นตัว clearing agent เพื่อให้ section มีดรชนีการหักเหของแสงและมีความโปร่งใสของชิ้นเนื้อมากขึ้นกระบวนการในการย้อมสี H&E Staining แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงกระบวนการย้อมสี H&E Staining ในลำไส้เล็กที่แยกจากหนูแรทที่ได้รับการป้อนสารเสสเพอริน

ลำดับ	สารเคมี	เวลา
Deparaffinization		
1	Xylene	5 min
2	Xylene	5 min
3	Xylene	5 min
Rehydration		
1	Absolute Ethanol	3 min
2	Absolute Ethanol	3 min
3	95% Ethanol	3 min
4	70% Ethanol	3 min
5	Distilled water	5 min
Staining		
1	Hematoxylin	3.30 min
2	Tap water	10 min
3	70% Ethanol	1 min
4	Eosin	8 min
Dehydration		
1	80% Ethanol	1 min
2	95% Ethanol	1 min
3	Absolute Ethanol	3 min
4	Absolute Ethanol	5 min
Clearing		
1	Xylene	5 min
2	Xylene	5 min
3	Xylene	2 min



5.6 ทำการปิดสไลด์โดยการหยด mounting medium แล้วปิดด้วย coverslip เพื่อป้องกันการซีดจาง เพิ่มความชัดเจนในการส่องกล้องจุลทรรศน์และสามารถเก็บไว้ได้นาน

5.7 วิเคราะห์ข้อมูล

5.7.1 ทำการศึกษาสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยายต่ำสุดก่อนคือ 4x เพื่อดูรายละเอียดส่วนต่างๆ อย่างคร่าว ๆ ของลำไส้ จากนั้นจึงเพิ่มกำลังขยายเป็น 10x และ 40x ตามลำดับ เพื่อทำการศึกษาย่างละเอียดในส่วนอื่น ๆ ของลำไส้

5.7.2 นำสไลด์ที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีการเชื่อมต่อกับโปรแกรมการถ่ายภาพ และทำการบันทึกภาพที่ได้เพื่อนำไปประกอบการอธิบายในการนำเสนอ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองที่ได้จะนำไปวิเคราะห์ค่าความแตกต่างโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS 17.0 การเปรียบเทียบค่าระหว่างกลุ่มจะใช้ Student's t test หรือ One Way ANOVA ในการวิเคราะห์ผล ค่าความแตกต่างแสดงในรูปของ mean±SD ที่ P value<0.05

ผลการศึกษา

ตอนที่ 1 In vitro study: ผลการทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดิน

จากผลการวิเคราะห์หรือผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดินมีร้อยละการยับยั้ง 33.46±4.24 ที่ความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัม/มล. แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุด รองลงมาคือความเข้มข้น 1800 ไมโครกรัม/มล. โดยยับยั้งได้ร้อยละ 27.30±0.73 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับสารเฮสเพอริดินกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส พบว่ามีค่าร้อยละการยับยั้งน้อยกว่ามาก อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นต่ำ 100 และ 200 ไมโครกรัม/มล. พบว่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดินมีค่าไม่แตกต่างจากอะคาร์โบส โดยค่าร้อยละการยับยั้งของสารเฮสเพอริดินอยู่ที่ 21.35±5.56, 21.98±9.67 ในขณะที่ค่าร้อยละการยับยั้งของอะคาร์โบสอยู่ที่ 13.32±5.10, 34.55±20.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

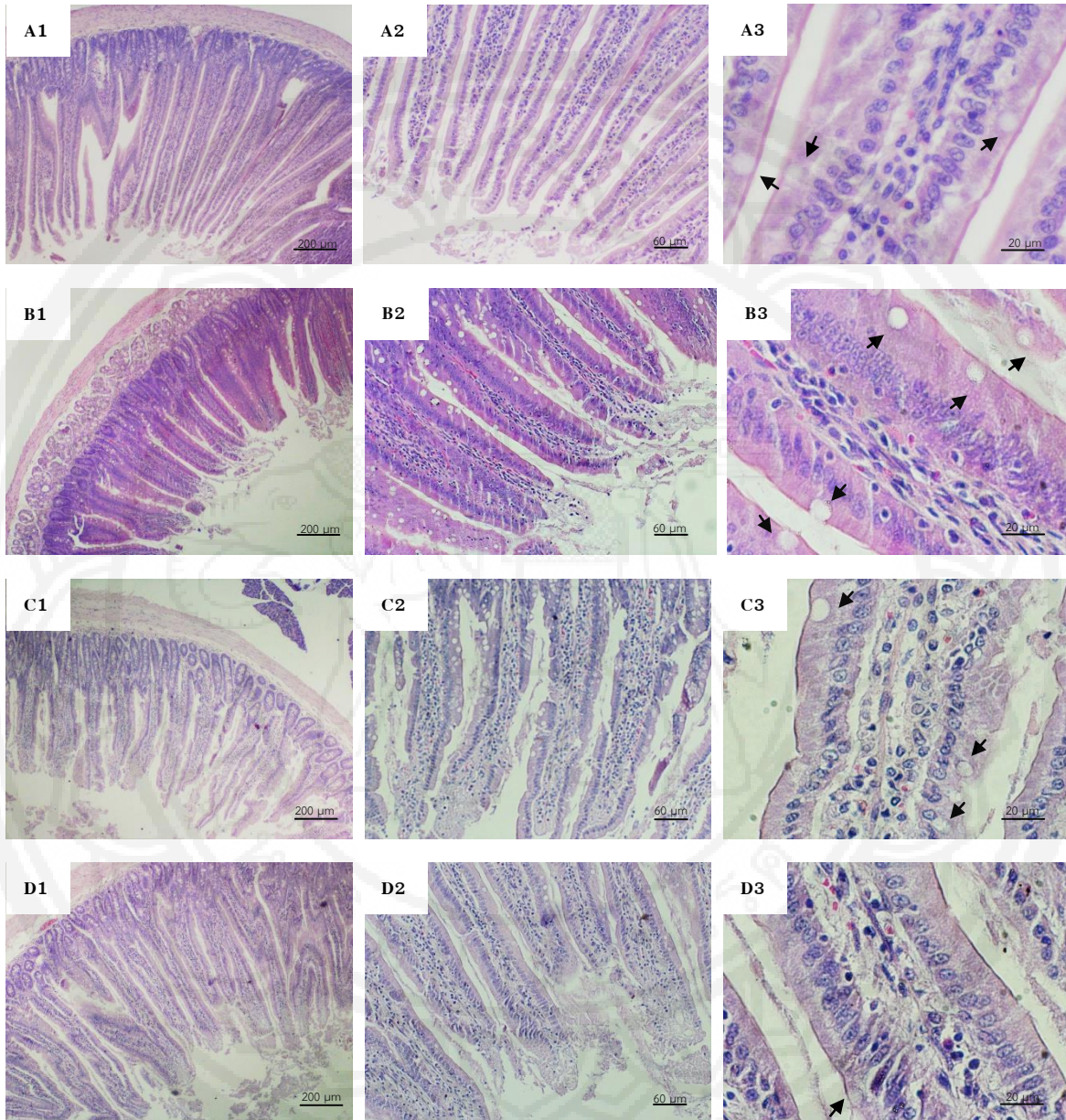
ตารางที่ 3 แสดงผลร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดินและอะคาร์โบส

ความเข้มข้น (ไมโครกรัม/มล.)	ร้อยละการยับยั้งของ สารอะคาร์โบส	ร้อยละการยับยั้งของ สารเฮสเพอริดิน
100	13.32±5.10	21.35±5.56
200	34.55±20.92	21.98±9.67
400	56.98±18.44	20.50±10.59 ^a
600	57.42±9.92	20.39±9.75 ^{aa}
800	66.09±16.09	22.24±6.63 ^{aa}
1000	65.43±10.95	18.15±8.37 ^{aa}
1200	70.59±7.34	23.45±17.16 ^{aa}
1400	74.28±16.40	17.01±1.83 ^{aa}
1600	76.47±12.73	25.31±10.90 ^{aa}
1800	79.60±4.18	27.30±0.73 ^{aaa}
2000	83.22±16.69	33.46±4.24 ^{aa,b}

^{a,aa,aaa} แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P value<0.05, 0.01 และ 0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ระหว่างสารอะคาร์โบสและสารเฮสเพอริดิน ค่าร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์แสดงในรูป mean±SD

^b แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P value<0.05 เมื่อเปรียบเทียบร้อยละการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ระหว่างสารเฮสเพอริดินที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม/มล. กับความเข้มข้นต่าง ๆ ค่าร้อยละการยับยั้งของเอนไซม์แสดงในรูป mean±SD

ตอนที่ 2 *In vivo* study: การศึกษาผลของสารเฮสเพอริดินที่มีต่อลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กส่วนต้นในหนูทดลอง ผลการศึกษาเนื้อเยื่อของลำไส้เล็กของหนูแรทที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน



รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างของลำไส้เล็กในหนูแรทที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน โดยภาพ A คือกลุ่มควบคุม ภาพ B คือกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับสารเฮสเพอริดิน ภาพ C คือกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 50 มก./กก. ภาพ D คือกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. (1 2 และ 3 คือกำลังขยาย 4X 10X และ 40X ตามลำดับและลูกศรชี้ตำแหน่งของกอบเบลทเซลล์)



ตารางที่ 4 แสดงค่าความยาว ความหนาบริเวณฐาน กลางและปลายของวิลไล และจำนวนกอบเบลทเซลล์ในลำไส้หนูแรทที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน

กลุ่มหนูทดลอง	ความยาว	ความกว้าง			จำนวนกอบเบลทเซลล์ต่อวิลไล
		ส่วนฐาน	ส่วนกลาง	ส่วนปลาย	
กลุ่มควบคุม	494.82± 121.01	122.41±10.31	110.71±14.13	64.86±20.38	6.60±3.16
กลุ่มเบาหวาน	614.81± 51.85	134.50±8.27	122.07±6.80	71.99±8.51	13.67±4.00 ^{aaa}
กลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 50 มก./กก.	720.05± 46.27	115.00±19.87	113.17±8.70	67.69±2.42	12.70±5.08 ^{aaa}
กลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก.	646.06± 91.34	120.63±12.25	104.15±19.97	68.44±21.99	7.70±3.51 ^{bbb}

^{aaa} แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P value < 0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกอบเบลทเซลล์ระหว่างหนูกลุ่มควบคุมและหนูในกลุ่มต่าง ๆ จำนวนกอบเบลทเซลล์แสดงในรูป mean±SD

^{bbb} แสดงความแตกต่างทางสถิติที่ P value < 0.001 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกอบเบลทเซลล์ระหว่างหนูกลุ่มเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 50 และ 100 มก./มล. จำนวนกอบเบลทเซลล์แสดงในรูป mean±SD

จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของลำไส้เล็กโดยกล้องจุลทรรศน์ (รูปที่ 3) พบว่าลักษณะของวิลไลทั้ง 4 กลุ่มการทดลองมีความคล้ายคลึงกัน ไม่แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลง จำนวนของกอบเบลทเซลล์จากการสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ในแต่ละกลุ่มการทดลองมีจำนวนใกล้เคียงกัน เมื่อทำการวิเคราะห์ผลความยาวของวิลไล ความกว้างบริเวณฐาน กลางและปลายของวิลไล และจำนวนกอบเบลทเซลล์ในแต่ละวิลไล (ตารางที่ 4) พบว่าวิลไลในกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 50 มก./กก. น้ำหนักตัว มีความยาวมากที่สุด คือ 720.05±46.27 รองลงมาคือกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. น้ำหนักตัวและกลุ่มเบาหวานมีความยาวของวิลไล 646.06±91.34 และ 614.81±51.85 ตามลำดับ กลุ่มที่มีความยาวของวิลไลน้อยที่สุดคือกลุ่มควบคุม มีความยาวของวิลไลเพียง 494.82±121.01 แต่อย่างไรก็ตามผลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ส่วนความกว้างของวิลไลบริเวณฐาน กลางและปลายของวิลไลนั้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเช่นเดียวกับความยาวของวิลไล นอกจากนี้ จากผลการศึกษาพบว่าจำนวนกอบเบลทเซลล์ในหนูแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกัน โดยในกลุ่มเบาหวานพบจำนวนกอบเบลทเซลล์มากที่สุด (13.67±4.00, P <0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) รองลงคือ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 50 มก./กก. น้ำหนักตัว

(12.70±5.08, P <0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) ในขณะที่หนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. น้ำหนักตัวนั้นมีจำนวนกอบเบลทเซลล์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม โดยพบกอบเบลทเซลล์จำนวน 7.70±3.51 และ 6.60±3.16 เซลล์ต่อวิลไล ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนกอบเบลทเซลล์ระหว่างหนูเบาหวานและหนูที่ได้รับสารเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. น้ำหนักตัว พบว่าจำนวนของกอบเบลทเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ P <0.001

อภิปรายผลการศึกษา

จากการทดสอบสารยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของเฮสเพอริดินโดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบสซึ่งเป็นยารักษาโรคเบาหวาน พบว่าสารเฮสเพอริดินซึ่งจัดเป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มล. โดยการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสคิดเป็นร้อยละ 33.46±4.24 เมื่อเปรียบเทียบกับผลกับการศึกษาของ Li et al. (2009, pp. 1496–1503) ที่ทำการศึกษาผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของสารสกัดในกลุ่มฟลาโวนอยด์ในใบของฮอว์ธอร์น (Hawthorn) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 0.2 หน่วย/มล. พบว่าสารสกัดในกลุ่มฟลาโวนอยด์



จากไบโอสอร์ธอร์นสามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้ร้อยละ 86 เมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบส และจากการศึกษาของ Yao, Zhu, Chen, Tian, and Wang (2013, pp. 59–66) ได้ศึกษาการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ Total Flavonoids (TFs) จากเมล็ด Cichorium glandulosum โดยใช้ TFs ความเข้มข้น 8, 16, 32 และ 64 มก./มล. จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TFs ที่ความเข้มข้น 8–64 มก./มล. มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส 36.59 ± 2.51 , 69.36 ± 9.52 , 74.72 ± 9.10 และ 95.93 ± 2.34 ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารมาตรฐานอะคาร์โบสที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม พบว่า TFs ที่ความเข้มข้น 16–64 มก./มล. มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมากกว่าสารมาตรฐานอะคาร์โบสที่มีค่าร้อยละการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสเท่ากับ 43.50 ± 3.08 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ การศึกษาถึงผลการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสของ Proanthocyanidins ในเมล็ดกระเจียบเขียว พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำสุด (2 ไมโครกรัม/มล.) มีค่า IC₅₀ เท่ากับ 16.88 ± 0.26 ไมโครกรัม/มล. เมื่อเปรียบเทียบกับอะคาร์โบส ซึ่งมีค่า IC₅₀ = 35.60 ± 1.47 ไมโครกรัม/มล. (Lu et al., 2016, pp. 463–471) จากผลการศึกษาในหลายงานวิจัยดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์บางชนิดอย่าง เช่น เฮสเพอริดิน สามารถยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดส ซึ่งอาจมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งผลการทดลองการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสในหลอดทดลอง (*in vitro* study) นี้ให้ผลที่สอดคล้องกับผลการทดลองในหนูเบาหวาน (*in vivo* study) ที่ได้รับสารเฮสเพอริดินในปริมาณ 100 มก./กก. พบว่าสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวานได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (personal communication กับดร.วันทณี หาญช่าง) ซึ่งการยับยั้งเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสมีความสำคัญต่อการลดน้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดต่าง ๆ ถ้าเอนไซม์นี้ถูกยับยั้งจะทำให้ลดการดูดซึมน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่ร่างกาย (Shihabudeen, Priscilla, & Thirumurugan, 2011, pp. 2–3) อย่างไรก็ตามกลไกที่แน่ชัดในการยับยั้งการทำงานของแอลฟาไกลูโคซิเดสของสารเฮสเพอริดินนั้นคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาต่อไป

เมื่อศึกษาผลของสารเฮสเพอริดินต่อลักษณะโครงสร้างลำไส้เล็กของหนูทดลอง พบว่าจำนวนของกอบเบลทเซลล์ในลำไส้เล็กของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวานเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยหนูกลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับสารเฮสเพอริดินมีจำนวนกอบเบลทเซลล์สูงสุดคือ 13.67 ± 4.00 เซลล์ต่อวิลลัส แต่เมื่อได้รับสารเฮสเพอริดินปริมาณ 50 และ 100 มก./กก. น้ำหนักตัว จำนวนกอบเบลทเซลล์ลดลงเหลือ 12.70 ± 5.08 และ 7.70 ± 3.51 เซลล์ต่อวิลลัส ตามลำดับ ซึ่งในหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับเฮสเพอริดิน 100 มก./กก. น้ำหนักตัว มีจำนวนกอบเบลทเซลล์ลดลงใกล้เคียงกับหนูกลุ่มควบคุมที่มีจำนวนกอบเบลทเซลล์เท่ากับ 6.60 ± 3.16 เซลล์ต่อวิลลัส ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Diani และคณะ (1976) ที่พบว่าหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้อยู่ในภาวะเบาหวานจะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของลำไส้เล็กเกิดขึ้นโดยพื้นที่ผิวของลำไส้เล็กเพิ่มมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันจำนวนกอบเบลทเซลล์ต่อวิลลัสมีจำนวนเพิ่มขึ้น การเพิ่มขึ้นของจำนวนกอบเบลทเซลล์ในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานอาจเกี่ยวข้องกับการอักเสบหรือระคายเคืองที่เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากกอบเบลทเซลล์มีหน้าที่สังเคราะห์และหลั่งสารเมือกออกมาเพื่อป้องกันการบาดเจ็บทั้งทางกายภาพและทางเคมี (Specian & Oliver, 1991) รวมถึงงานวิจัยนี้มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ Elmansy และ Almasry (2013, p. 233) ที่พบว่าหนูในกลุ่มเบาหวานมีจำนวนของกอบเบลทเซลล์ เยื่อเมือกและพื้นที่ผิวของกอบเบลทเซลล์เพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลต่อการเกิดภาวะระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหารและทำให้เกิดภาวะท้องเสีย แต่เมื่อมีการให้สาร thymoquinone ในหนูเบาหวานพบว่า สารนี้ทำให้พื้นที่ผิวกอบเบลทเซลล์ลดลงซึ่งอาจส่งผลต่อการลดการเกิด GI complication จากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ พบว่าหนูกลุ่มเบาหวานที่ได้รับสารเฮสเพอริดินปริมาณ 100 มก./กก. น้ำหนักตัว มีจำนวนของกอบเบลทเซลล์ลดลง อาจคาดเดาได้ว่าสารเฮสเพอริดินมีผลต่อการลดกระบวนการอักเสบหรือการระคายเคือง เนื่องจากในเนื้อเยื่อที่มีการอักเสบจะมีจำนวนกอบเบลทเซลล์เพิ่มขึ้นและต่อมเมือกมีการขยายใหญ่ขึ้น ทำให้มีการสร้างเมือกออกมามากและเหนียวกว่าปกติ เพื่อปกป้องเยื่อผิวทางเดินอาหาร



โดยกอบเบลทเซลล์จะหลั่ง mucin ซึ่งเป็นไกลโคโปรตีน โดยจะถูกเก็บไว้ในกอบเบลทเซลล์และจะหลั่งออกเมื่อเกิดการระคายเคือง (Johansson & Hansson, 2013, pp. 305-309) ถ้าจำนวนกอบเบลทเซลล์ลดลงอาจเนื่องมาจากการที่เฮสเพอริดินทำให้เกิดการอักเสบหรือระคายเคืองน้อยลง จึงทำให้การสร้างจำนวนกอบเบลทเซลล์ลดลง จากผลการทดลองที่ได้สรุปว่าสารเฮสเพอริดินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้บางส่วน ซึ่งอาจมีผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวานและมีผลในการลดจำนวนกอบเบลทเซลล์ซึ่งอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการลดการระคายเคือง ดังนั้น เฮสเพอริดินเป็นสารที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อเพื่อประยุกต์ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเบาหวานได้

สรุปผลการศึกษาและข้อเสนอแนะ

สารเฮสเพอริดินสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แอลฟาไกลูโคซิเดสได้บางส่วน ซึ่งอาจมีผลยับยั้งการย่อยสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ส่งผลต่อการลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูเบาหวาน นอกจากนี้การให้สารเฮสเพอริดินมีผลในการลดจำนวนกอบเบลทเซลล์เมื่อเปรียบเทียบกับหนูในกลุ่มเบาหวาน ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการกลไกในการลดการระคายเคืองของลำไส้ได้ อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกในการทำงานของเฮสเพอริดินในเชิงลึกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาวปวีณนทร์ สินไชย ที่ให้ความรู้และคำแนะนำในกระบวนการและวิธีการศึกษาโครงสร้างของลำไส้เล็ก ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

ปนัดดา ทินบุตร และจินดารัตน์ พิมพ์สมาน. (2554).ฤทธิ์ยับยั้งแอลฟา-กลูโคซิเดสของสารสกัดจากพืชตระกูลเฟินเพื่อใช้บำบัดโรคเบาหวาน. ใน การประชุมวิชาการนานาชาติวิศวกรรมเคมีและเคมีประยุกต์แห่ง

ประเทศไทย ครั้งที่ 21, 10-11 พฤศจิกายน 2554. สงขลา: ม.ป.พ. [1]

Agrawal, Y. O., Sharma, P. K., Shrivastava, B., Ojha, S., Upadhyay, H. M., Arya, D. S., & Goyal, S. N. (2014). Hesperidin produces cardioprotective activity via PPAR- γ pathway in ischemic heart disease model in diabetic rats. *PLoS ONE*, 9(11), e111212. doi:10.1371/journal.pone.0111212

Diani, A. R., Gerritsen, G. C., Stromsta, S., & Murray, P. (1976). A study of the morphological changes in the small intestine of the spontaneously diabetic Chinese hamster. *Diabetologia*, 12(2), 101-109.

Elmansy, R. A., & Almasry, S. M. (2013). Morphological and immunohistochemical analysis of the effects of thymoquinone on the neurovascular component of jejunal submucosa of diabetic rat model. *Journal of American Science*, 9(7).

Huang, X. L., Pan, J. H., Chen, D., Chen, J., Chen, F., & Hu, T. T. (2015). Efficacy of lifestyle interventions in patients with type 2 diabetes: A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Internal Medicine*, (in press).

Johansson, M. E. V., & Hansson, G. C. (2013). Mucus and the goblet cell. *Digestive Diseases*, 31, 305-309.

Li, H., Song, F., Xing, J., Tsao, R., Liu, Z., & Liu, S. (2009). Screening and structural characterization of alpha-glucosidase inhibitors from hawthorn leaf flavonoids extract by ultrafiltration LC-DAD-MSn and SORI-CID FTICR MS. *the American Society for Mass Spectrometry*, 20(8), 1496-1503.



- Loh, S. P., & Hadira, O. (2011). In vitro inhibitory potential of selected Malaysian plants against key enzymes involved in hyperglycemia and hypertension. *Malaysian Journal of Nutrition*, 17(1), 77–86.
- Lu, Y., Demleitner, M. F., Song, L., Rychlik, M., & Huang, D. (2016). Oligomeric proanthocyanidins are the active compounds in *Abelmoschus esculentus* Moench for its α -amylase and α -glucosidase inhibition activity. *Functional Foods*, 20, 463–471.
- Mohammed, A., Koorbanally, N. A., & Islam M. S. (2015). Ethyl acetate fraction of *Aframomum melegueta* fruit ameliorates pancreatic β -cell dysfunction and major diabetes-related parameters in a type 2 diabetes model of rats. *Environmental Psychology*, 175, 518–527.
- Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, S74–S80.
- Shihabudeen, M. S., Hansi Priscilla, D., & Thirumurugan, K. (2011). Cinnamon extract inhibits α -glucosidase activity and dampens postprandial glucose excursion in diabetic rats. *Nutrition and Metabolism*, 8(1), 1–11.
- Specian, R. D., & Oliver, M. G. (1991). Functional biology of intestinal goblet cells. *American Journal of Physiology*, 260(2 Pt 1), C183–C193.
- Yao, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, J., & Wang, Y. (2013). In vivo and in vitro antioxidant activity and α -glucosidase, α -amylase inhibitory effects of flavonoids from *Cichorium glandulosum* seeds. *Food Chemistry*, 139, 59–66.
- Zhao, D. G., Zhou, A. Y., Du, Z., Zhang, Y., Zhang, K., & Ma, Y. Y. (2015). Coumarins with α -glucosidase and α -amylase inhibitory activities from the flower of *Edgeworthia gardneri*. *Fitoterapia*, 107, 122–127.

Translated Thai Reference

- Tinabutr, P., & Pimsaman, J. (2011). Inhibitory effect of Fern on alpha-glucosidase activity in the treatment of diabetes mellitus. In *the 21st international conference on chemical engineering and applied chemistry* 10–11 November 2011. Songkla: n.p. [in Thai] [1]