รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

ผลของนมผึ้งต่อกระบวนการเพอร์ออกซิเดชั่นของไขมันในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน

The effect of royal jelly to the lipid peroxidation in diabetic rats

งบประมาณประจำปี 2543

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

8.16
73ร

อาจารย์พรรณี หนูซื่อตรง

ผศ.ดร.ภญ.รุ้งตะวัน สุภาพผล

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

638.16
พ 2735

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอแสดงความขอบคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ได้ให้โอกาสคณะผู้วิจัยเสนอโครงการวิจัย และได้รับการพิจารณาให้รับทุนอุดหนุนการวิจัยในปีงบประมาณ 2543 จำนวน 250,000 บาท (สองแสนห้าหมื่นบาทถ้วน)

คณะผู้วิจัยได้ใช้ความวิริยะอุตสาหะอย่างเต็มที่เพื่อให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จตรงตามวัตถุประสงค์ที่ได้ขอทุนไว้ และใคร่ขอถือโอกาสนี้แสดงความขอบพระคุณเป็นอย่างสูงต่อมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

อาจารย์ พรรณี หนูซื่อตรง

ผศ.ดร.ภญ. รุ้งตะวัน สุภาพผล

16 พ.ย. 2544

157405

บทคัดย่อ

นมผึ้งเป็นอาหารเสริมที่คณะผู้วิจัยได้นำมาศึกษา ผลต่อกระบวนการเพอร์ออกซิ-เดชั่นของไขมันในหนูที่เป็นโรคเบาหวาน ภายหลังชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมพบว่า ระดับน้ำตาลเพิ่มขึ้นและน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง ระดับ malondialdehyde (MDA) เพิ่มขึ้น ระดับ superoxide dismutase (SOD) activity ลดลง ระดับ catalase activity ไม่เปลี่ยนแปลง ระดับ glutathione เพิ่มขึ้น และระดับ glutathione peroxidase (GSH-Px) activity ลดลง ภายหลังเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่า กลุ่มหนูปกติ พบว่า ระดับ MDA ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 49 ชุด post-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 28 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 ระดับ SOD activity ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 14, $p < 0.05$ ที่ day 56 และ day 70 ระดับ catalase activity ชุด post-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 28 ระดับ glutathione ชุด pre-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 28 ถึง day 49 และ $p < 0.001$ ที่ day 56 และ GSH-Px activity เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มเบาหวาน พบว่าระดับ MDA ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 49 และ $p < 0.001$ ที่ day 42 ถึง day 56 ชุด post-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 35 และ $p < 0.001$ ที่ day 28, day 42 และ day 49 ระดับ SOD activity ชุด pre-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 56 ชุด post-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 28, $p < 0.01$ ที่ day 46 และ $p < 0.05$ ที่ day 32 ระดับ catalase activity ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.05$ ที่ day 42 และชุด post-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 28, day 49 และ day 56, $p < 0.001$ ที่ day 35 และ day 42 ระดับ glutathione ชุด pre-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 42 และ day 70, $p < 0.01$ ที่ day 49 และ day 56 และ $p < 0.001$ ที่ day 63 และระดับ GSH-Px activity ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 และ $p < 0.01$ ที่ day 63 ชุด post-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p<0.001$ ที่ day 28 ถึง day 49 จากผลการทดลองสรุปได้ว่านมผึ้งมีคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ ลดกระบวนการเพอร์ออกซิเดชั่น และเพิ่มปริมาณและ/หรือเพิ่มประสิทธิภาพของ antioxidant ในร่างกายได้แก่ SOD และ glutathione อย่างไรก็ตามการให้นมผึ้งก่อนการชักนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotocin ให้ผลไม่แตกต่างจากการให้ภายหลังจากที่เป็นเบาหวานแล้ว

Abstract

Royal jelly is a widely used as a supplementary food. The present study was designed to investigate the effect of royal jelly to the lipid peroxidation in diabetic rats. Body weight, blood glucose level, malondialdehyde (MDA) activity, superoxide dismutase (SOD) activity, catalase activity, glutathione activity and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity were determined every 7 days both before and after administration of streptozotocin 50 mg/kg. Mean plasma glucose level was significant increased from that of the control group in both pre-treatment and post-treatment. The percent change of body weight profile was significant decreased from the control group in both pre-treatment and post-treatment. Mean MDA and mean glutathione were significant increase from the control. Mean SOD activity and mean GSH-Px were significant decrease from the control. Mean catalase activity was not significant difference when compared to the control group.

Oral lyophilized royal jelly administration of 2 g/kg once a day to the control group showed significant decrement mean MDA at day 49 ($p < 0.01$) in pre-treatment. Mean MDA in post-treatment significantly increased at day 28 ($p < 0.001$) and significantly decreased at day 56 ($p < 0.05$). Mean SOD activity was significant reduction at day 14 ($p < 0.001$) and at day 56 and day 70 ($p < 0.05$). Mean catalase activity was significant decrement at day 28 ($p < 0.05$) in post-treatment. Mean glutathione was also significant increment at day 28 to day 49 ($p < 0.05$) and day 56 ($p < 0.001$) in pre-treatment. Mean GSH-Px activity was not sifnificant reduction throughout the experiment. Oral lyophilized royal jelly administration of 2 g/kg once a day to the diabetes group showed significant decrement of MDA in both pre- and post-treatment; $p < 0.05$ at day 49, $p < 0.001$ at day 42 to day 56 in pre-treatment, $p < 0.05$ at day 35, $p < 0.001$ at day 28, day 42 and day 49. Mean SOD activity was significant increase $p < 0.01$ at day 56 in pre-treatment and $p < 0.001$ at day 28, $p < 0.01$ at day 46 and $p < 0.05$ at day 32 in post-treatment. Mean catalase activity was significant reduction $p < 0.05$ at day 42 in pre-treatment, $p < 0.01$ at day 28, day 49 and day 56, $p < 0.001$ at day 35 and day 42 in post-treatment. Mean glutathione activity was significant increase at day 42 and day 70 ($p<0.05$), day 49 and day 56 ($p < 0.01$) and day 63 ($p < 0.001$)in pre-treatment. Mean GSH-Px activity was significant reduction at day 56 ($p<0.05$) and day 63 ($p < 0.01$) in pre-treatment and at day 28 to day 49 ($p < 0.001$) in post-treatment. From our studies it has appeared that royal jelly partially has antioxidant activity and partially inhibit lipid peroxidation probably by increase the number and /or the quality of antioxidant such as SOD activity and glutathione activity. However the time given royal jelly did not clearly showed in this report.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	3
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	4
สารบัญเรื่อง	5
บทนำ	6
- ความสำคัญและที่มาของปัญหา	6
- วัตถุประสงค์	6
- ขอบเขตการวิจัย	7
- ผลที่คาดว่าจะได้รับ	7
การทบทวนวรรณกรรม	7
ระเบียบวิธีวิจัย	9
- สัตว์ทดลอง	9
- วิธีวิจัย	9
- การเก็บตัวอย่างเลือด	11
สถานที่ทำการวิจัย	12
ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	12
เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	12
- วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์	13
- สารเคมี	12
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	14
บทสรุปและข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	25

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

นมผึ้งเป็นอาหารเสริมที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน โดยที่ยังไม่มีหลักฐานการวิจัยทางการแพทย์ที่ชัดเจน เพียงแต่อาศัยหลักการที่ว่าผึ้งงานนำนมผึ้งมาเลี้ยงผึ้งนางพญาตลอดชีวิต ทำให้ผึ้งนางพญามีคุณสมบัติพิเศษมาก ๆ ต่างจากผึ้งงานทั่วไปที่มีโอกาสได้รับนมผึ้งเพียง 3 วันแรกของชีวิตเท่านั้น แต่หลักฐานทางการแพทย์สำหรับนมผึ้งถือได้ว่ายังน้อยมาก โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระเกือบจะไม่มีเลย ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระมักเกิดกับไขมัน (lipid peroxidation) ทำให้เกิดสารเมแทบอไลต์ที่ชื่อ malondialdehyde (MDA) และสามารถตรวจพบได้ในห้องปฏิบัติการ นอกจากนี้การตรวจสารต้านอนุมูลอิสระอื่น ๆ ก็จะใช้เป็นข้อมูลยืนยันฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของนมผึ้งต่อไขมันได้เป็นอย่างดี ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione

การศึกษาค้นคว้าวิจัยทางการแพทย์ปัจจุบันทราบว่าอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของการเกิดโรคหลายชนิดเช่น Alzheimer's disease Rheumatoid arthritis การอักเสบ โรคชรา (aging) มะเร็ง และ atherosclerosis เป็นต้น ดังนั้นหากทราบว่านมผึ้งมีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นก็จะเป็นกุญแจสำคัญในการป้องกันโรค บรรเทาอาการโรค และ/หรือรักษาโรคดังกล่าวข้างต้นได้เป็นอย่างดี กล่าวคือหากนมผึ้งมีความสามารถต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและ/หรือเพิ่มสาร antioxidant ในร่างกายได้ก็อาจนำไปใช้ป้องกัน ลดความรุนแรงของโรค และ/หรือรักษาโรคบางชนิดได้ โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคเบาหวาน หรืออย่างน้อยจะช่วยทำให้คุณภาพชีวิตของผู้ป่วยดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของนมผึ้งในขนาดสูง (2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) ต่อระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูทดลองที่ชักนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotocin
2. เพื่อศึกษาปริมาณ lipid peroxide ที่เพิ่มขึ้นในกระแสเลือดของหนูทดลองที่ชักนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotocin
3. เพื่อตรวจสอบความสามารถของนมผึ้งขนาดสูงในการลดปริมาณสาร lipid peroxide ในกระแสเลือดของหนูทดลองที่ชักนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotocin
4. เพื่อตรวจสอบผลของนมผึ้งขนาดสูงที่มีต่อระบบการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (เช่น superoxide dismutase, glutathione) ของหนูทดลองที่ชักนำให้เป็นเบาหวานโดย streptozotocin

ขอบเขตการวิจัย

เนื่องจากในปัจจุบันยังมิได้มีการวิจัยผลของนมผึ้งต่อกระบวนการ lipid peroxidation และกระบวนการต้าน lipid peroxidation ในผู้ป่วยโรคเบาหวานมาก่อน โครงการนี้จึงเริ่มต้นจากการใช้หนูทดลองในทุกขั้นตอนของการวิจัย

ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถยืนยันได้ค่อนข้างแน่นอนว่านมผึ้งจะมีผลลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน คือต้านทานโรคเบาหวานได้จริงหรือไม่
2. หากนมผึ้งสามารถต้านโรคเบาหวานได้จริง ฤทธิ์นี้จะผ่านกลไกการทำงานในลักษณะใด ใช่ผลต่อ lipid peroxide ในกระแสเลือดหรือไม่
3. หากนมผึ้งไม่สามารถต้านโรคเบาหวานได้ นมผึ้งจะสามารถชะลอมิให้อาการของโรคเบาหวานทรุดหนักลง โดยการลดระดับ lipid peroxide ในกระแสเลือดได้หรือไม่
4. เป็นการเปิดแนวการวิจัยใหม่อีกด้านหนึ่งของนมผึ้งในแง่ของฤทธิ์ต่อสาร lipid peroxide ซึ่งอาจนำไปใช้ในโรคต่าง ๆ ที่มีระดับ lipid peroxide ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น

การทบทวนวรรณกรรม

นมผึ้ง (royal jelly) มีลักษณะเป็นครีมเหลว ข้น สีขาวนวล รสฝาด และเผ็ดเล็กน้อย สร้างมาจากต่อมใต้คอหอย (hypopharyngeal gland) และต่อมน้ำลายใต้ขากรรไกร (mandibular salivary gland) ของผึ้งงานที่มีอายุเฉลี่ยประมาณ 5-15 วัน ที่เรียกว่า ผึ้งพยาบาล ผึ้งงานใช้นมผึ้งเลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญาจนเติบโตไปตลอดชีวิต แม้ว่าประสิทธิภาพของนมผึ้งจะไม่ได้รับการยืนยันอย่างเป็นทางการจากวงการแพทย์ก็ตาม อีกทั้งกลไกการออกฤทธิ์ก็ยังไม่เป็นที่ทราบกันอย่างชัดเจน แต่เนื่องจากการที่นมผึ้งถูกนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนของผึ้งนางพญา ทำให้ผึ้งนางพญามีลักษณะที่โดดเด่นกว่าผึ้งวรรณะอื่น เช่น ขนาดโตกว่า สวยงามกว่า อายุยืนนานกว่าผึ้งทั่วไป 10-20 เท่า สามารถออกไข่ในวันหนึ่ง ๆ ได้มากถึง 2,000 ฟอง เป็นเวลาติดต่อกันทุกวันนานประมาณ 10 เดือนใน 1 ปี ผลต่าง ๆ เหล่านี้ทำให้นมผึ้งถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน ทั้งที่รับประทานเป็นอาหารเสริม (supplement food) บำรุงร่างกาย (health tonic) ตลอดจนนำมาผสมในเครื่องสำอางบำรุงผิวพรรณ [1-4]

ส่วนประกอบของนมผึ้งนับได้ว่ามีสารที่เป็นประโยชน์มากเช่น คาร์โบไฮเดรต 10-12 % โปรตีน 14-15 % ไขมัน 3-5 % เกลือแร่และวิตามินหลายชนิด นอกจากนี้ยังพบสารสำคัญอีกหลายชนิดเช่น royalisin, acetylcholine, insulin-like peptide, sebacic acid และฮอร์โมนเพศชาย เป็นต้น สารสำคัญชนิดหนึ่งซึ่งถือว่าสำคัญที่สุดในนมผึ้งคือ 10-hydroxy-2-decenoic acid เป็นสารที่พบเฉพาะในนมผึ้งเท่านั้น ใช้เป็นดรรชนีบ่งบอกคุณภาพของนมผึ้ง นมผึ้งที่มีคุณ

ภาพดีจะต้องมีกรดไขมันนี้อยู่มาก รายงานวิจัยเกี่ยวกับนมผึ้งหลายฉบับมุ่งความสนใจไปที่ฤทธิ์ของสาร 10-hydroxy-2-de-cenoic acid เช่น มีฤทธิ์ต้านการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราหลายชนิด สามารถต้านสารกัมมันตรังสี และยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้[2-16]

สำหรับผลของนมผึ้งต่อโรคเบาหวานยังเป็นที่ถกเถียงกันอยู่มาก มีการค้นพบสารที่เรียกว่า insulin-like peptide ในนมผึ้งที่สามารถกระตุ้นกระบวนการ glucose oxidation ของเนื้อเยื่อไขมันได้[16,17] และเมื่อทำการฉีดสารสกัดของนมผึ้งเข้าไปในตัวอ่อนของ lipidopteran (Manduca Sexta) จะทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดต่ำ นอกจากนี้ผลการศึกษาทางชีวเคมียังพบอีกว่า insulin-like peptide มีน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับของวัวมาก รวมทั้งสามารถแย่งจับกับ insulin receptor ของหมูได้ คุณสมบัติเหล่านี้แสดงให้เห็นค่อนข้างชัดเจนว่า สารดังกล่าวมีคุณสมบัติทางชีวเคมีเช่นเดียวกับ insulin ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมอื่น ๆ[18]

แต่ก็มีรายงานออกมาในทางตรงกันข้ามคือ นมผึ้งไม่สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองที่เป็นเบาหวานในระยะเฉียบพลัน[19] และเมื่อศึกษาผลของนมผึ้งต่อโรคเบาหวานชนิดเรื้อรังก็ไม่พบความสามารถในการลดระดับน้ำตาลในกระแสเลือดของนมผึ้งเช่นเดียวกัน[20, 21] ครั้นเมื่อทำการศึกษาในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานก็พบว่าไม่ทำให้ระดับน้ำตาลในกระแสเลือดลดลง แต่ทำให้ผู้ป่วยรู้สึกสุขสบายขึ้น[22]

ปัจจุบันสมมุติฐานในการเกิดอนุมูลอิสระ (free radical) ทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและนำไปสู่พยาธิสภาพของโรคต่าง ๆ ได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายและมีการวิจัยกันอย่างต่อเนื่อง อนุมูลอิสระสามารถทำปฏิกิริยากับโมเลกุลชนิดตาง ๆ ในร่างกายได้จำนวนมาก ก่อให้เกิดโรคหลาย ๆ ชนิด ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระเป็นลักษณะ chain reaction คือทำให้สารอนุมูลอิสระเข้าทำปฏิกิริยาเสื่อมสภาพและสร้างสารอนุมูลอิสระใหม่ไปเร่งให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นอีกต่อไปอย่างควบคุมไม่ได้ ปฏิกิริยาที่มีผลเสียต่อร่างกายอย่างมากคือ การทำให้เกิด cross-linking ของ DNA มีการทำลายโปรตีน ไขมัน และ macromolecule อื่น ๆ เกิดความเสียหายมากมายตามมา เช่น การบาดเจ็บของเซลล์ การแก่ (aging) และโรคหลายชนิดเช่น artherosclerosis เบาหวาน มะเร็ง เป็นต้น

ปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระมักจะเกิดกับไขมันที่เรียกกันว่า lipid peroxidation เกิดสาร metabolite ชื่อ malondialdehyde (MDA) ซึ่งสามารถวิเคราะห์ได้ในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นการวิเคราะห์หาปริมาณ MDA จึงเป็นข้อบ่งชี้อย่างดีว่าเกิดปฏิกิริยาของอนุมูลอิสระในร่างกายหรือไม่มากน้อยเพียงใด ปกติร่างกายจะมีระบบหรือกระบวนการควบคุมและทำลายสารอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทำหน้าที่ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและกำจัดอนุมูลอิสระได้ จึงทำให้เราทุกคนไม่เกิดโรคเมื่อได้รับสารใน

กลุ่มอนุมูลอิสระเข้าสู่ร่างกาย ปัญหาที่เกิดโรคต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้วมักเกิดจากการได้รับอนุมูลอิสระจำนวนมากจนระบบนี้ไม่สามารถควบคุมอนุมูลอิสระได้ หรืออาจเกิดจากระบบต้านอนุมูลอิสระเสื่อมสภาพไปเอง[23, 24]

เนื่องจากนมผึ้งเป็นอาหารเสริมที่ได้รับการกล่าวอ้างว่าสามารถรักษาหรือบรรเทาอาการของโรคหลายชนิดที่เกิดจากอนุมูลอิสระ โครงการนี้จึงเป็นการวิเคราะห์สาร 3 กลุ่มหลักในตัวอย่างน้ำเลือดที่เก็บจากหนูทดลองคือ

1. วัดปริมาณกลูโคสเพื่อยืนยันสภาพการเป็นเบาหวานของหนูทดลอง
2. วัดปริมาณสาร metabolite คือ MDA เพื่อเป็นดรรชนีบ่งบอกปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดจากอนุมูลอิสระ
3. วัดการทำงานของระบบต้านออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระคือ SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลจากการวิเคราะห์สารทั้ง 3 กลุ่มในตัวอย่างน้ำเลือดของหนูทดลองจะสามารถชี้ชัดว่า (1) เบาหวานก่อให้เกิดสาร lipid peroxide จากอนุมูลอิสระจริงหรือไม่ ระบบการต้านออกซิเดชั่นของร่างกายเสื่อมไปด้วยหรือไม่ แม้จะมีรายงานจากผู้ป่วยเบาหวานว่าพบสาร lipid peroxide ในกระแสเลือดของผู้ป่วยเบาหวานก็จริง แต่ก็มีข้อควรระวังไว้ว่า lipid peroxide อาจมาจากสาเหตุอื่นก็ได้ และ (2) นมผึ้งจะลดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของอนุมูลอิสระได้หรือไม่ สามารถฟื้นการทำงานของระบบต้านออกซิเดชั่นได้จริงหรือไม่

ระเบียบวิธีวิจัย

1. สัตว์ทดลอง ใช้หนูขาวเพศผู้พันธุ์ Wistar น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา เลี้ยงแยกกรงละ 3-4 ตัว ที่อุณหภูมิห้อง 25 °C และแสงสว่าง 12 ชั่วโมงต่อวัน โดยให้อาหารสำเร็จรูปจากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์

2. วิธีวิจัย เป็นการศึกษาแบบ in vivo คือทำในหนูทดลอง แบ่งหนูทดลองออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

การทดลองที่ 1 (post-treatment)

กลุ่มที่ 1-1 เป็นหนูปกติที่ฉีดน้ำเกลือ (0.9% NSS) เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนน้ำดื่ม 5 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 28 วันทำการวิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 1-2 เป็นหนูปกติที่ฉีดน้ำเกลือ (0.9 % NSS) เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน จึงวิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 1-3 เป็นหนูที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin เข้าเส้นเลือดดำในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนน้ำดื่ม 5 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 1-4 เป็นหนูที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin เข้าเส้นเลือดดำในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน แล้ววิเคราะห์หาปริมาณ MDA SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

การทดลองที่ 2 (pre-treatment)

กลุ่มที่ 2-1 เป็นหนูปกติ ป้อนน้ำดื่ม 5 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน ฉีดน้ำเกลือ (0.9% NSS) เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนน้ำดื่ม 5 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน วิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 2-2 เป็นหนูปกติ ป้อนนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 14 วัน ฉีดน้ำเกลือ (0.9 % NSS) เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน วิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 2-3 เป็นหนูปกติที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin เข้าเส้นเลือดดำในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนน้ำดื่ม 5 มิลลิลิตรต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน จึงวิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

กลุ่มที่ 2-4 เป็นหนูปกติที่ทำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin เข้าเส้นเลือดดำในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม เจาะเลือดทำการวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส แล้วป้อนนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน เป็นเวลา 28 วัน จึงวิเคราะห์หาปริมาณ MDA, SOD, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione ทุก 7 วัน เป็นเวลา 28 วัน

3. การเก็บตัวอย่างเลือดจากหนูทดลอง เจาะเลือดจากหนูทดลองทางเส้นเลือดที่หาง (tail vein) ทุก 7 วัน ทุกตัวอย่างเลือดจะทำการวิเคราะห์สารดังต่อไปนี้

3.1 ปริมาณกลูโคส โดยวิธี glucose oxidase-peroxidase method ทำได้โดยนำตัวอย่างเลือด 16 ไมโครลิตร หยดลงบน glucose strip สำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในเลือด ทิ้งไว้นาน 1 นาที อ่านค่าด้วยเครื่อง accutrend

3.2 ปริมาณ malondialdehyde (MDA) ทำได้โดย (1) นำตัวอย่างน้ำเลือด 0.2 มิลลิลิตร มาผสมกับ 8.1 % sodium dodecyl sulfate, 20 % acetic acid, 0.8 % thiobarbituric acid (2) อุ่นให้ร้อนที่ 90^{o}ซ นาน 60 นาที (3) ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำประปา (4) เติมน้ำกลั่น n-butanol และ pyridine เขย่าให้เข้ากัน (5) นำไปปั่นที่ความเร็ว 4000 รอบต่อวินาที นาน 10 นาที (6) แยกชั้น organic layer มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตร (7) คำนวณปริมาณ MDA เป็นนาโนโมลต่อ 100 มิลลิกรัมฮีโมโกลบิน เทียบกับ standard curve ที่เตรียมโดยวิธีเดียวกันแต่ใช้ MDA standard solution ในปริมาณต่าง ๆ กัน

3.3 ปริมาณ alanine aminotransferase (ALT) นำตัวอย่างน้ำเลือด 0.1 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ reagent kit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ alanine aminotransferase ทิ้งไว้นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร

3.4 ปริมาณ aspartate aminotransferase (AST) 0.1มิลลิลิตร ผสมรวมกับ reagent kit สำหรับวิเคราะห์ปริมาณ alanine aminotransferase ทิ้งไว้นาน 1 นาที ที่อุณหภูมิห้องแล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร

3.5 ปริมาณ superoxide dismutase (SOD) นำตัวอย่างน้ำเลือด 500 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.1 M ethylene diaminetetraacetic acid, 1.5 mg % potassium cyanide, 1.5 mM nitroblue

tetrazolium, 0.067 M phosphate buffer ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร เทียบกับ standard curve

3.6 ปริมาณ catalase ผสม 67 mM phosphate buffer และ H_2O_2 – phosphate buffer เข้าด้วยกัน แล้วเติมตัวอย่างเลือด ประมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตร เทียบกับ standard curve ที่เตรียมโดยวิธีเดียวกัน แต่ใช้ catalase standard solution ในปริมาณต่าง ๆ กัน

3.7 ปริมาณ glutathione peroxidase นำตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร ผสมกับ 50 mM Tris buffer, glutathione reductase และ cumene hydroperoxide ทิ้งไว้นาน 5 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร เทียบกับ standard curve

3.8 ปริมาณ glutathione นำตัวอย่างเลือด 0.1 มิลลิลิตร ผสมรวมกับ 0.1 M phosphate buffer pH 8.0 เติม dithiobis (2-nitrobenzoic acid) 0.4 g % แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 410 นาโนเมตร เทียบกับ standard curve ที่เตรียมโดยวิธีเดียวกัน แต่ใช้ glutathione standard solution ในปริมาณต่าง ๆ กัน

สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23, กรุงเทพ 10110

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย

กุมภาพันธ์ 2543 - พฤษภาคม 2544

เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย

กรงเลี้ยงหนูที่ทำด้วยเหล็กไร้สนิม
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)
เครื่องชั่งสารชนิดหยาบ, เครื่องชั่งสารชนิดละเอียด
เครื่องประมวลผล (microcomputer)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
เครื่องปั่นผสม (vortex)
อ่างน้ำชนิดควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
วัสดุเครื่องแก้วทางวิทยาศาสตร์

วัสดุและอุปกรณ์วิทยาศาสตร์

autopipette ขนาดต่าง ๆ

pipette tip ขนาดต่าง ๆ

pipette tip rack

eppendorf tube

eppendorf tube rack

glass test tube

glass test tube with screw cap

test tube rack

ขวดแก้ว (Duran) ขนาดต่าง ๆ

autoclaved tape

aluminium foil

สารเคมี

หนูขาว

อาหารสัตว์ และวัสดุรองนอนนมผึ้ง

น้ำกลั่น (double - distilled water)

ethanol

chloroform

sodium chloride

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ MAD

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ ALT, AST

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ SOD

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ catalase

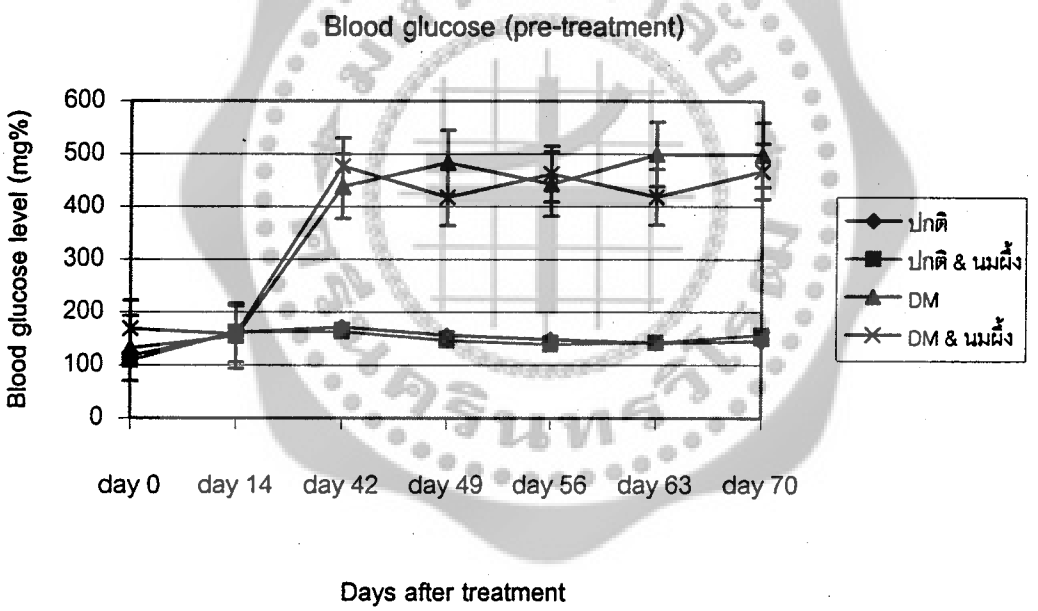
ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glutathione peroxidase

ชุดสารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณ glutathione

ยาสลบ แอลกอลฮอล และอื่น ๆ

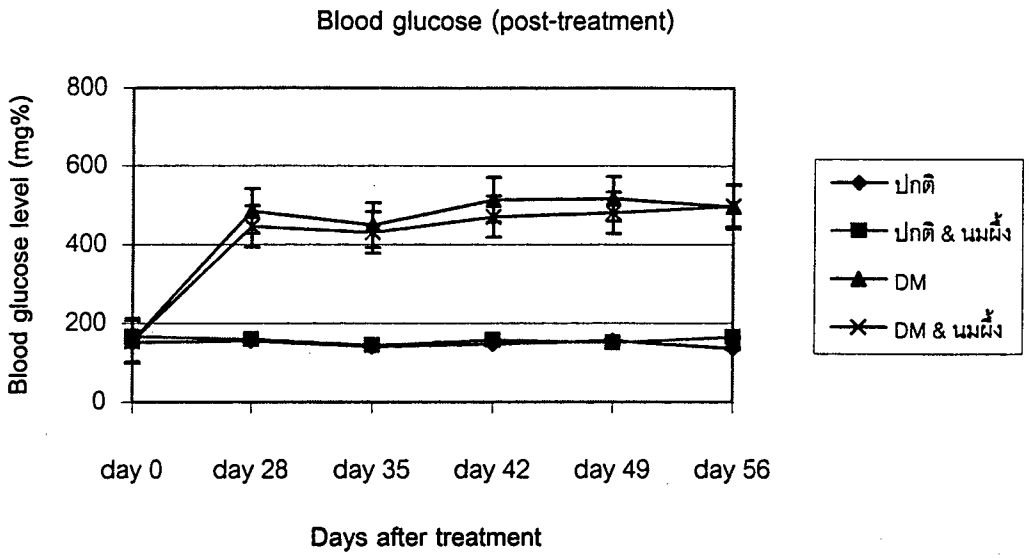
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

1. ผลต่อระดับน้ำตาลในเลือด ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติไม่แตกต่างจากหนูปกติที่ได้รับนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน และระดับน้ำตาลในเลือดของหนูเบาหวาน ไม่แตกต่างจากหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ทั้งในกลุ่ม pre-treatment (ภาพ 1) และ post-treatment (ภาพ 2) จึงสามารถยืนยันได้ว่านมผึ้งไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือดในหนูที่ชักนำให้เป็นเบาหวานชนิดเรื้อรังโดย streptozotocin 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม[20, 21] ระดับน้ำตาลในเลือดของหนูที่ชักนำให้เป็นเบาหวานได้เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$-0.001) ตลอดการทดลองคือกลุ่ม pre-treatment หนูเบาหวานค่าเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 438.33 ± 14.57 ถึง 499.33 ± 20.56 และหนูเบาหวานที่เสริมนมผึ้งค่าเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 417.25 ± 98.87 ถึง 477.25 ± 38.41 และกลุ่ม post-treatment หนูเบาหวานค่าเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 449.50 ± 43.01 ถึง 516.67 ± 0.0001 และหนูเบาหวานที่เสริมนมผึ้งค่าเฉลี่ยอยู่ที่ระดับ 446.14 ± 82.42 ถึง 498.14 ± 56.99 ส่วนหนูปกติค่าเฉลี่ยระดับน้ำตาลอยู่ที่ 160.17 ± 16.94 ถึง 166.00 ± 19.95 ตลอดการทดลอง



ภาพ 1 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้ขนาด 2 รับนมผึ้งกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment

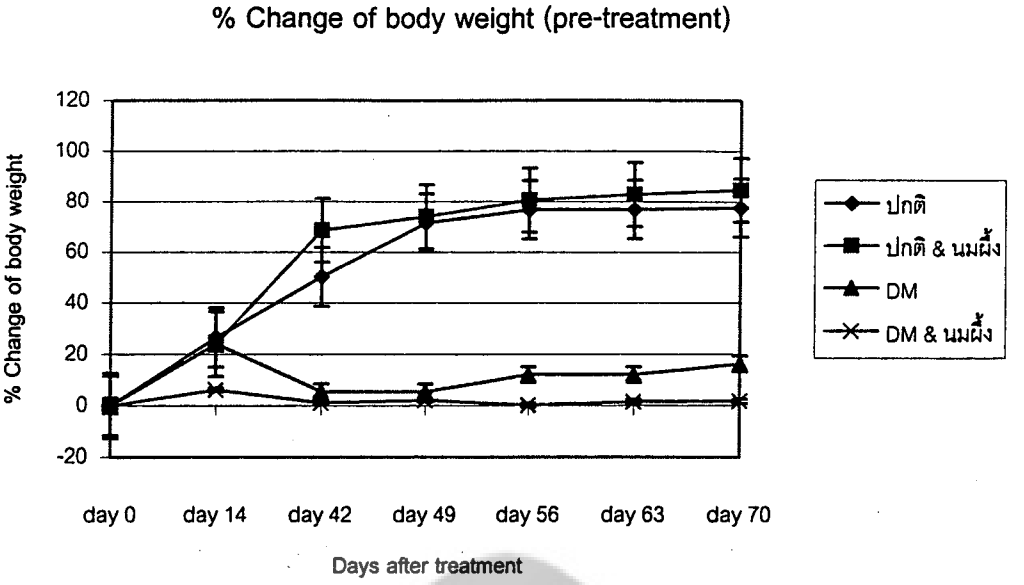
หนูปกติ	n = 6
หนูปกติเสริมนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน	n = 6
หนูเบาหวาน	n = 6
หนูเบาหวานเสริมนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน	n = 6



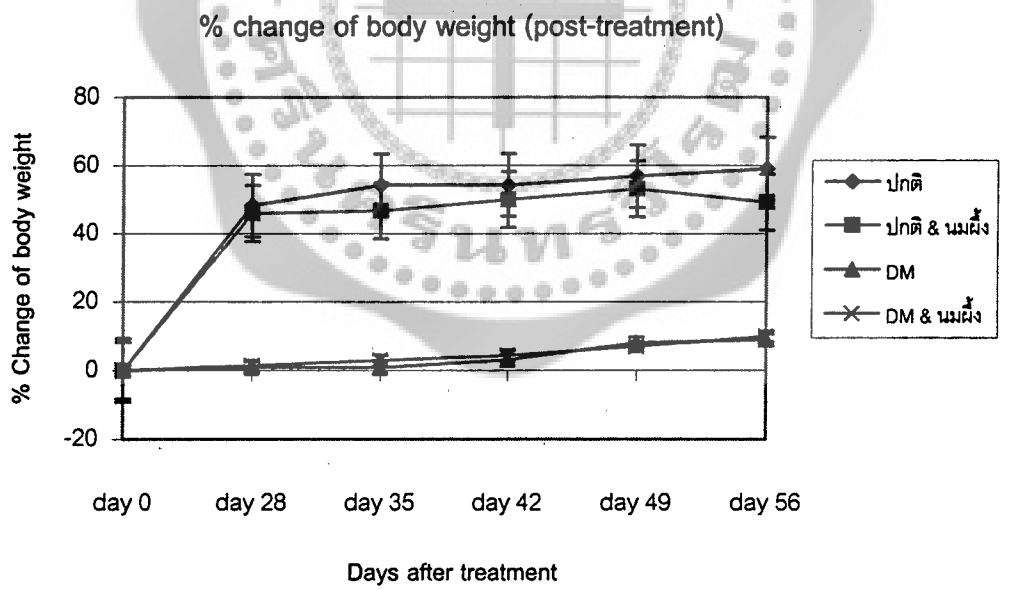
ภาพ 2 กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับน้ำตาลในเลือดของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้ขนาด 2 รับนมผึ้งกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

หนูปกติ	n = 6
หนูปกติเสริมนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน	n = 6
หนูเบาหวาน	n = 6
หนูเบาหวานเสริมนมผึ้ง 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน	n = 6

2. ผลต่อน้ำหนักตัว การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซนต์น้ำหนัก (% change of body weight) ของหนูปกติและหนูปกติที่เสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันไม่มีความแตกต่างกัน น้ำหนักเพิ่มขึ้นเป็นลำดับ เช่นเดียวกับหนูเบาหวานและหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันน้ำหนักตัวลดลงเป็นลำดับอย่างสม่ำเสมอตลอดการทดลอง เหมือนกันทั้งกลุ่ม pre-treatment และ post-treatment หนูที่ฉีด streptozotocin 50 mg/kg แสดงว่านมผึ้งไม่มีผลเพิ่มน้ำหนักตัวทั้งในหนูปกติและในหนูที่ชักนำให้เป็นโรคเบาหวานโดย streptozotocin 50 mg/kg ถึงแม้ว่านมผึ้งสดจะมีผลเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตและจำนวนไข่ของตัวไหม[25] จึงอาจเป็นไปได้ว่ากระบวนการผลิตนมผึ้งโดยวิธี freez dried ได้ทำลายสารออกฤทธิ์บางชนิดทำให้ไม่มีผลเพิ่มน้ำหนักตัว ดังภาพ 3 (pre-treatment) และ ภาพ 4 (post-treatment)



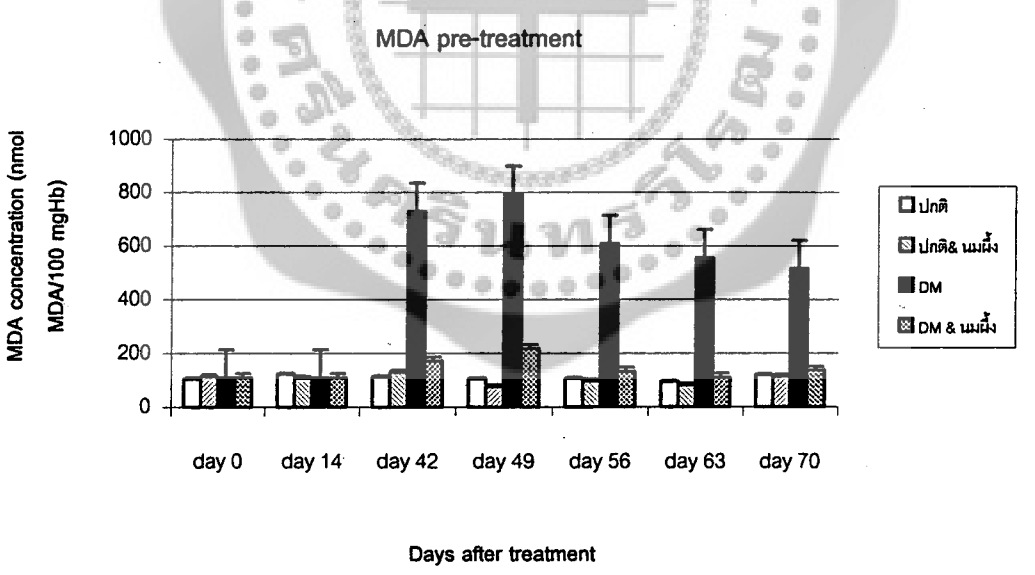
ภาพ 3 กราฟแสดง % change of body weight ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment



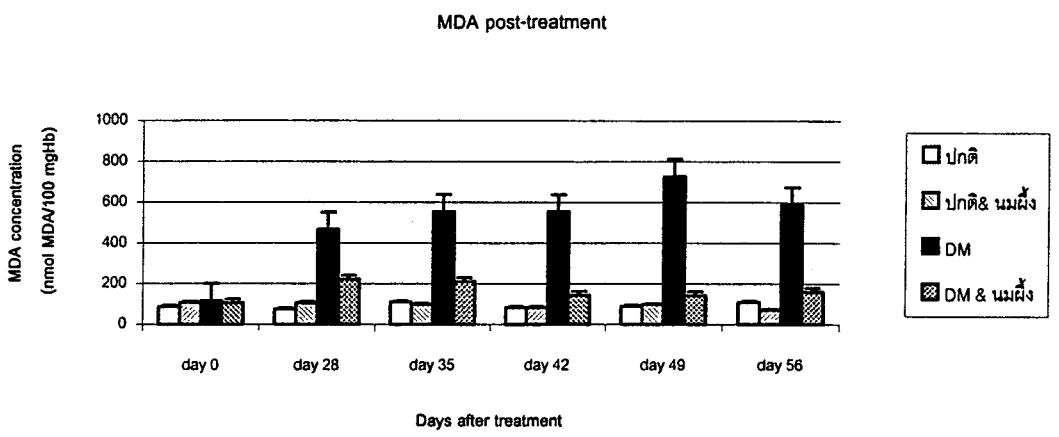
ภาพ 4 กราฟแสดง % change of body weight ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

3. ผลต่อระดับ malondialdehyde (MDA) ระดับ MDA ของหนูปกติมีค่าเท่ากับ 73.88 ± 8.32 ถึง 123.26 ± 15.69 nmol MDA/100 mgHb ภายชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่า ปริมาณ MDA ของหนูเบาหวานอยู่ที่ระดับ 467.92 ± 33.04 ถึง 794.27 ± 44.03 nmol MDA/100 mgHb สูงกว่าหนูปกติอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ถึง $p < 0.05$ ทั้งชุด pre-treatment และ post-treatment กลุ่มหนูปกติ ชุด pre-treatment เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่า ชุด pre-treatment ระดับ MDA activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 49 ส่วนชุด post-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 28 และลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 หนูเบาหวาน เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่าชุด pre-treatment ปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 49 และ $p < 0.001$ ที่ day 42 ถึง day 56 ส่วนชุด post-treatment ปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 35 และ $p < 0.001$ ที่ day 28, day 42 และ day 49 ดังภาพ 5 (pre-treatment) และ ภาพ 6 (post-treatment)

การที่ MDA เพิ่มสูงขึ้นในหนูเบาหวานก็เนื่องมาจากการชักนำให้เป็นเบาหวานไม่ว่าจะเป็นสาร streptozotocin หรือ alloxan ก็ตาม[26-28] และ streptozotocin ขนาดเท่าไรก็ตามจะไม่มีผลต่อระดับ MDA[29] ซึ่งส่วนหนึ่งอาจเป็นผลมาจากนมผึ้งมีผลลดระดับ cholesterol ในเลือดทั้งในคนและสัตว์ทดลอง[30,31] ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดปฏิกิริยาเพอร์ออกซิเดชั่นของไขมัน



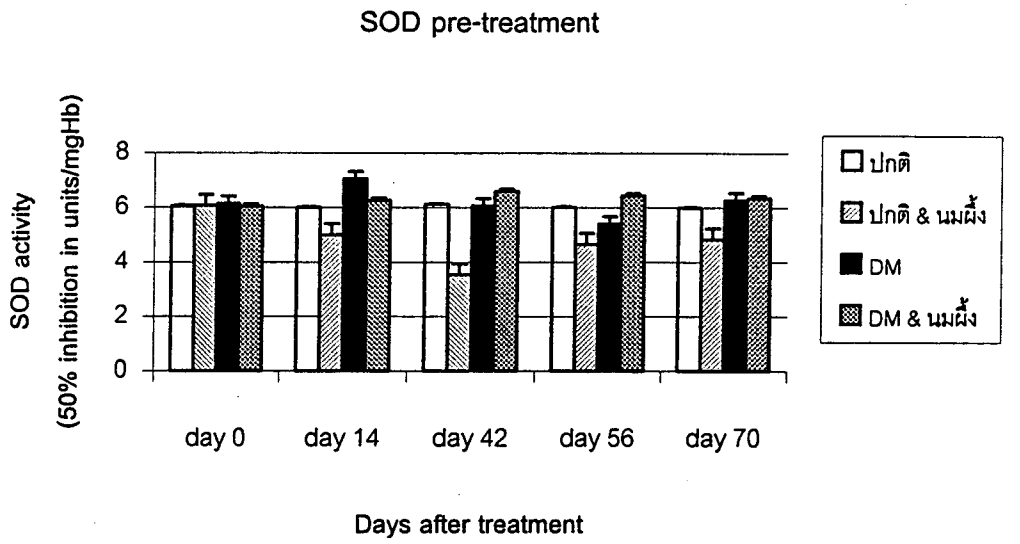
ภาพ 5 กราฟแสดงปริมาณ MDA ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment



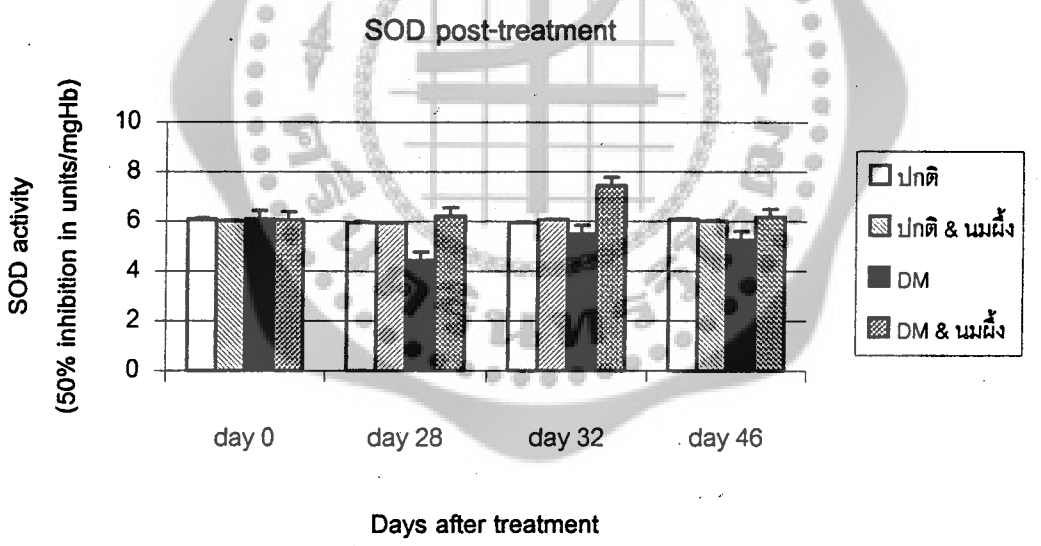
ภาพ 6 กราฟแสดง ปริมาณ MDA ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

4. ผลต่อระดับ superoxide dismutase (SOD) activity ระดับ SOD activity หนูปกติเท่ากับ 5.951 ± 0.21 ถึง 6.12 ± 0.35 ที่ 50% inhibition in units/mgHb ภายหลังชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่าชุด pre-treatment ระดับ SOD activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 และชุด post-treatment ระดับ SOD activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 28 และ $p < 0.05$ ที่ day 46 กลุ่มหนูปกติ เมื่อได้รับการเสริมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่าระดับ SOD activity ชุด pre-treatment ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 42 และ $p < 0.05$ ที่ day 56 และ day 70 กลุ่มหนูเบาหวาน เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่าระดับ SOD activity ชุด pre-treatment ระดับ SOD activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 56 และชุด post-treatment ระดับ SOD activity เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 28 และ $p < 0.01$ ที่ day 46 และ $p < 0.05$ ที่ day 32 ดังภาพ 7 (pre-treatment) และ ภาพ 8 (post-treatment)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อชักนำหนูให้เป็นเบาหวานจะมีผลทำให้ระดับ SOD activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ[26-29, 32,33] เนื่องจากภาวะเบาหวานเป็นภาวะเครียดที่ทำให้เกิดอนุมูลอิสระจำนวนมากร่างกายจึงสูญเสียสารต้านอนุมูลอิสระในที่นี้คือ SOD นมผึ้งจึงน่าจะมีสารกระตุ้นการสร้าง SOD จึงทำให้ระดับ SOD activity ของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามในนมผึ้งมีสารชื่อ neopterin และตรวจพบได้ในเลือดและปัสสาวะของผู้ป่วยที่ติดเชื้อเนื่องจากมีการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน neopterin มีผลร้ายต่อเซลล์คือเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิด apoptosis และยับยั้งการทำงานของ antioxidant[34]



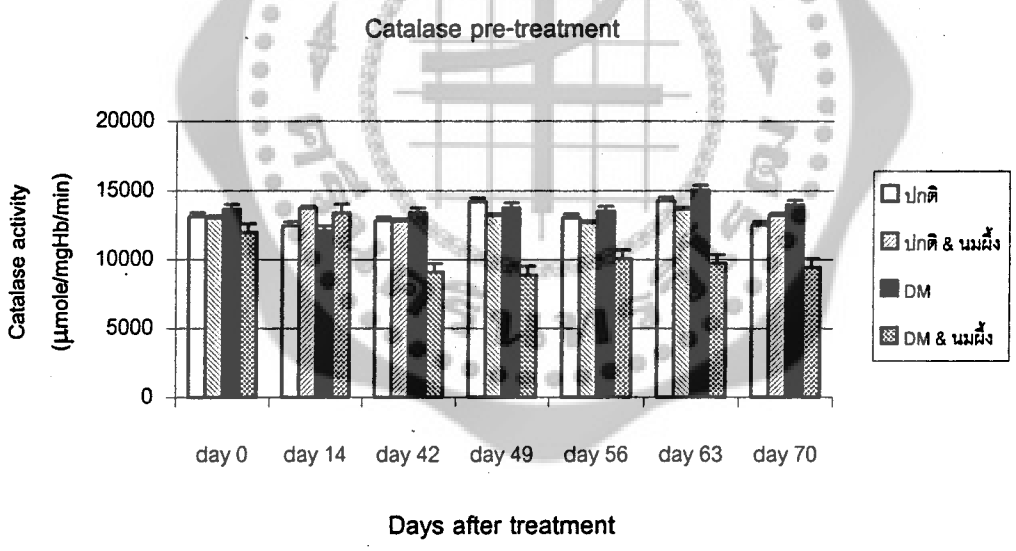
ภาพ 7 กราฟแสดง SOD activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment



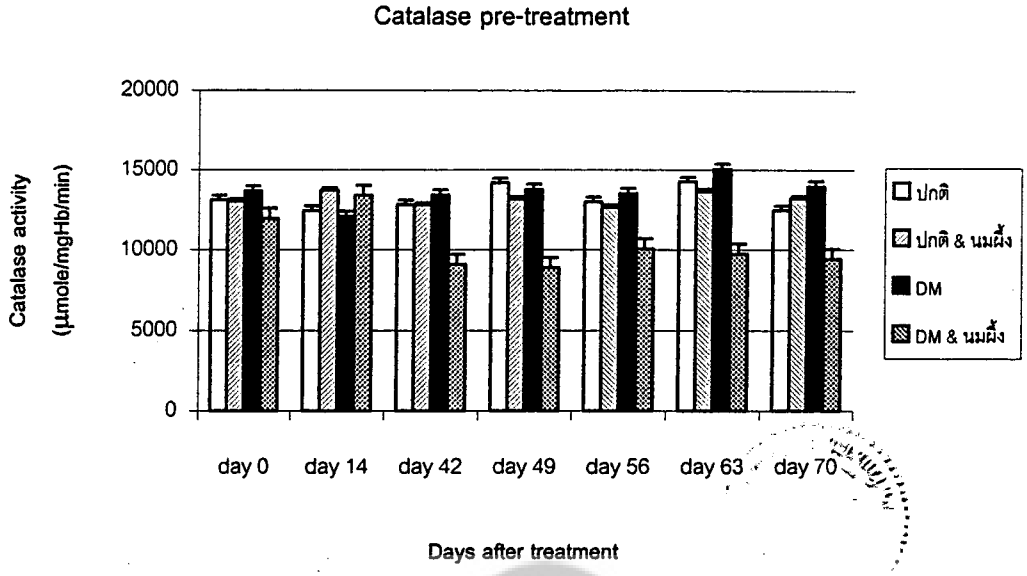
ภาพ 8 กราฟแสดง SOD activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

5. ผลต่อระดับ catalase activity ระดับ catalase activity ของหนูปกติอยู่ระหว่าง 12,447 ± 1,148.3 ถึง 15,328 ± 1,994.8 mmole/mgHb/min ภายหลังชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ระดับ catalase activity เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ระหว่าง 12,097 ± 1,871.8 ถึง 15,057.3 ± 2,179.69 mmole/mgHb/min กลุ่มหนูปกติ ชุด post-treatment พบว่าเมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ระดับ catalase activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 28 กลุ่มหนูเบาหวาน หนูเบาหวานเมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน พบว่าระดับ catalase activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ชุด pre-treatment $p < 0.05$ ที่ day 42 และชุด post-treatment $p < 0.01$ ที่ day 28, day 49 และ day 56 $p < 0.001$ ที่ day 35 และ day 42 ดังภาพ 9 (pre-treatment) และภาพ 10 (post-treatment)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อชักนำหนูให้เป็นเบาหวานจะมีผลทำให้ระดับ catalase activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญภายหลังชักนำให้เป็นเบาหวานเป็นเวลา 6 สัปดาห์[26, 27] ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากเบาหวานทำให้เกิดอนุมูลอิสระเป็นจำนวนมากมีผลให้ระบบควบคุมอนุมูลอิสระทำงานหนัก ดังนั้นระดับ catalase activity จึงลดลง



ภาพ 9 กราฟแสดง catalase activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment

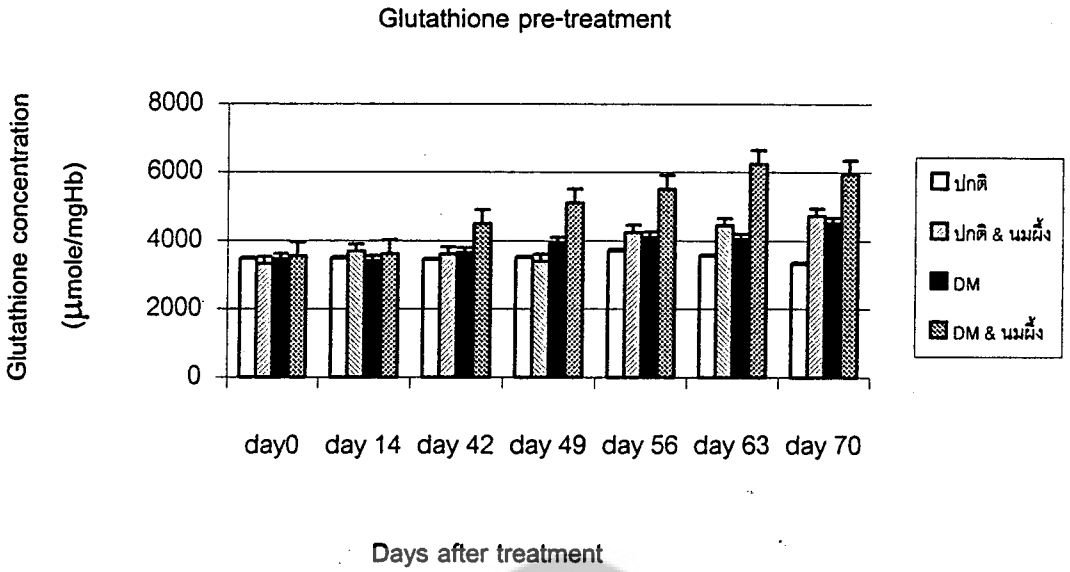


ภาพ 10 กราฟแสดง catalase activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

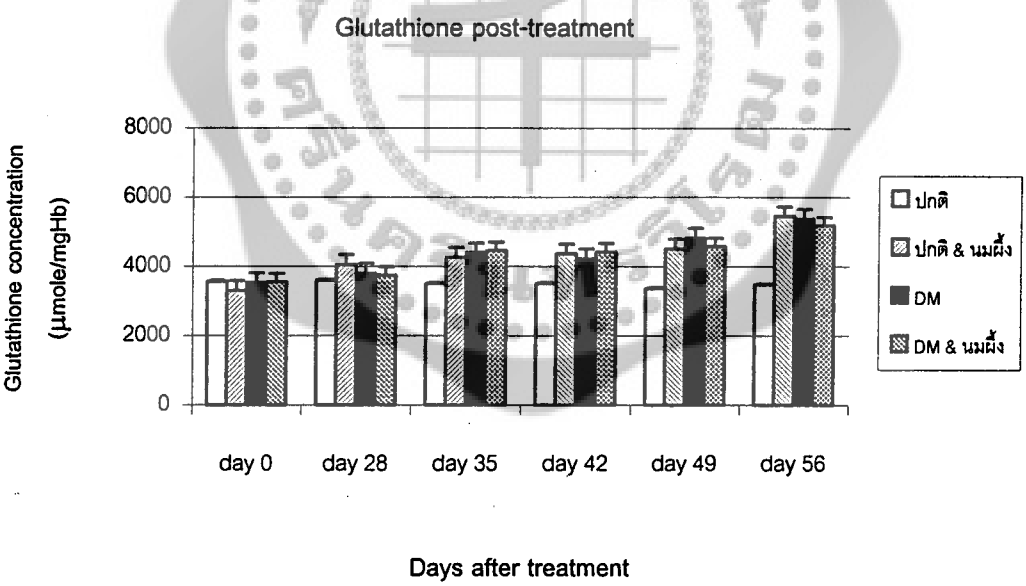
6. ผลต่อระดับ glutathione ระดับ glutathione ของหนูปกติอยู่ระหว่าง 3,323.87 ± 192.49 ถึง 3,592 ± 284.9 µmole/mgHb ภายหลังชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่าระดับ glutathione เพิ่มขึ้นระหว่าง 3,651 ± 69.73 ถึง 5,378 ± 593 µmole/mgHb และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ชุด pre-treatment $p < 0.05$ ที่ day 63 และ day 70 และชุด post-treatment $p < 0.05$ ที่ day 42, $p < 0.01$ ที่ day 35 และ $p < 0.001$ ที่ day 49 และ day 56 กลุ่มหนูปกติ เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าระดับ glutathione เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุด pre-treatment $p < 0.001$ ที่ day 63 และ day 70 กลุ่ม post-treatment $p < 0.05$ ที่ day 28 และ day 49, $p < 0.01$ ที่ day 35 และ day 42 และ $p < 0.001$ ที่ day 56 กลุ่มหนูเบาหวาน เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าระดับ glutathione ของหนูชุด pre-treatment เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ ที่ day 42 และ day 70, $p < 0.01$ ที่ day 49 และ day 56 และ day 70 $p < 0.001$ ที่ day 63 ดังภาพ 11 (pre-treatment) และ ภาพ 12 (post-treatment)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อชักนำหนูให้เป็นเบาหวานจะมีผลทำให้ระดับ glutathione ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ[28] อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้พบว่าระดับ glutathione เพิ่มขึ้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจาก ปริมาณอนุมูลอิสระที่เพิ่มมากขึ้นจากภาวะเบาหวานทำให้มีการสร้าง glutathione เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก นมผึ้งมีผลกระตุ้นการสร้าง glutathione เพื่อลดปริมาณอนุมูลอิสระทั้งในภาวะปกติและภาวะเบาหวานได้เป็นอย่างดี

#159405



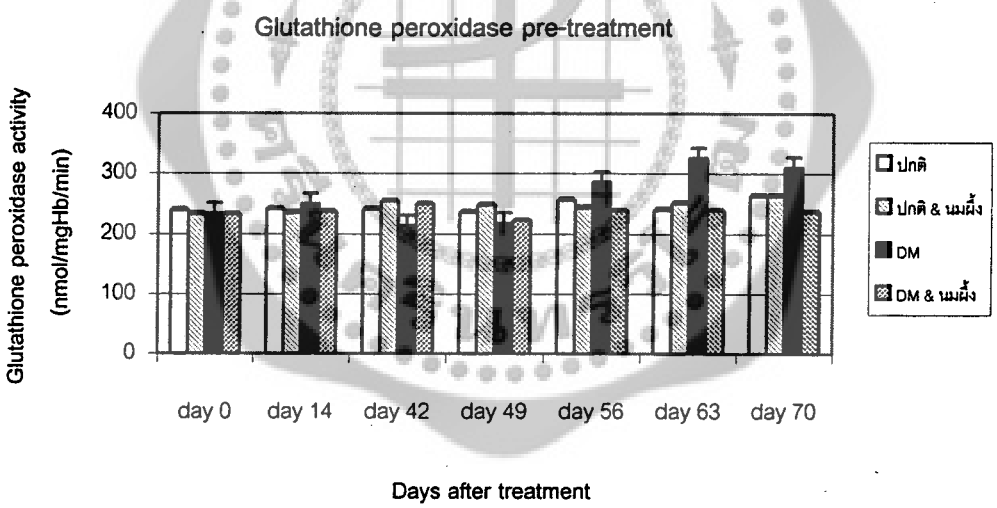
ภาพ 11 กราฟแสดงระดับ glutathione ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment



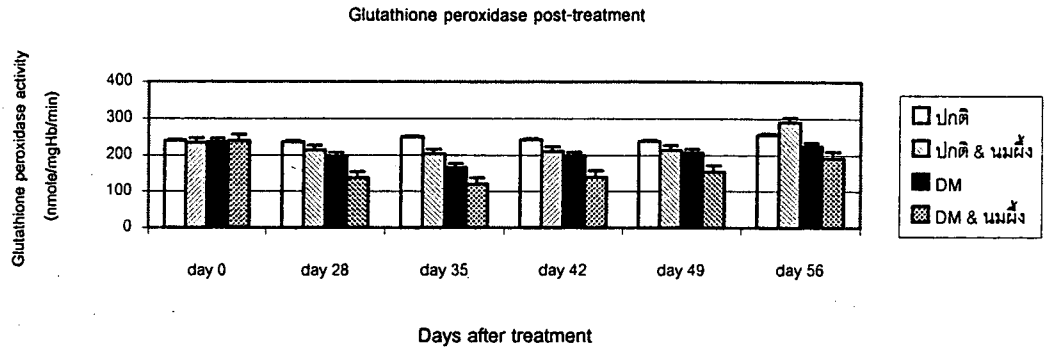
ภาพ 12 กราฟแสดงระดับ glutathione ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

7. ผลต่อระดับ glutathione peroxidase activity (GSH-Px activity) ระดับ GSH-Px activity ของหนูปกติอยู่ระหว่าง 235.53 ± 17.84 ถึง 262.58 ± 16.55 nmole/mgHb/min ภายหลังชักนำหนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin พบว่า ชุด pre-treatment ระดับ GSH-Px activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.01$ ที่ day 63 ชุด post-treatment ระดับ GSH-Px activity ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 28, day 42 และ day 49 และ $p < 0.001$ ที่ day 35 กลุ่มหนูปกติ ระดับ GSH-Px activity เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ กลุ่มหนูเบาหวาน เมื่อได้รับการเสริมนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันพบว่าชุด pre-treatment ระดับ GSH-Px activity ลดลงจากหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.05$ ที่ day 56 และ $p < 0.01$ ที่ day 63 ส่วนชุด post-treatment ระดับ GSH-Px activity ลดลงจากหนูเบาหวานอย่างมีนัยสำคัญ $p < 0.001$ ที่ day 28 ถึง day 49 ดังภาพ 13 (pre-treatment) และ ภาพ 14 (post-treatment)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อชักนำหนูให้เป็นเบาหวานจะมีผลทำให้ระดับ glutathione peroxidase activity เพิ่มขึ้นหลังสัปดาห์ที่ 6 และกลับเข้าสู่ปกติในสัปดาห์ที่ 12[27,33] การชักนำหนูให้เป็นเบาหวานทำให้ระดับ GSH-Px activity ลดลง



ภาพ 13 กราฟแสดง glutathione peroxidase activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม pre-treatment



ภาพ 14 กราฟแสดง glutathione peroxidase activity ของหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน (DM) และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อ น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน ในกลุ่ม post-treatment

8. ผลต่อระดับ ALT ระดับ ALTไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มหนูปกติ หนูปกติที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน หนูเบาหวาน และหนูเบาหวานที่ได้รับนมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวัน

สรุป

ภายหลังชักนำให้หนูให้เป็นเบาหวานด้วย streptozotocin 50 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าหนูเบาหวานมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง และน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญตลอดการทดลอง นมผึ้งขนาด 2 กรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมต่อวันทั้งในชุด pre-treatment และชุด post-treatment มีผลทำให้ระดับ MDA ของหนูเบาหวานและหนูปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ระดับ SOD activity ของหนูเบาหวานเพิ่มขึ้น ระดับ catalase activity ลดลง ระดับ glutathione เพิ่มขึ้น ระดับ glutathione peroxidase activity ลดลง และระดับ ALT ไม่เปลี่ยนแปลง นั่นคือนมผึ้งไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือด มีฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระโดยอาจมีผลลดปริมาณ reactive oxygen species (ROS) และ/หรือลดการเกิดเพอร์ออกซิเดชั่นในร่างกายซึ่งจะทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่นำไปสู่การเกิดอนุมูลอิสระที่เป็นพิษต่อร่างกายอีกมากมาย และ/หรืออาจทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) และ/หรือ มีผลเพิ่มปริมาณและ/หรือประสิทธิภาพของสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายสัตว์ทดลอง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ทำให้เราทราบว่านมผึ้งมีคุณสมบัติในการต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระและเพิ่มปริมาณและ/หรือเพิ่มประสิทธิภาพของ antioxidant ในเม็ดเลือด อย่างไรก็ตามการศึกษาปฏิกิริยา peroxidation ในอวัยวะที่สำคัญของร่างกายเช่น ตับอ่อน สมอง ไต และตับ เป็นต้นก็เป็นสิ่งจำเป็นเช่นเดียวกันเนื่องจากจะทำให้เราสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ตรงเป้าหมายมากยิ่งขึ้น นอกจากนี้การศึกษาในระดับเซลล์จะทำให้เราทราบถึงกลไกการทำงานของนมผึ้งได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

บรรณานุกรม

1. สิริวัฒน์ วงษ์ศรี, เพ็ญศรี ตังคณะสิงห์. ชีววิทยาของผึ้ง 39-43, 128-131, 2529.
2. Nimmannit U. Royal jelly. Drug Information. Th J Pharm Sci 1988 ; 13 : 85-9.
3. Dayan AD. A note on royal jelly : A critical evaluation. J Pharm Pharmacol 1906 ; 12 : 377-83.
4. สุภาภรณ์ พงศกร Royal jelly (นมผึ้ง) นิตยสารใกล้หมอ กรกฎาคม 2531 ; 72-3.
5. Lercker G, Capella P, Conte LS and Ruini F. Commponents of royal jelly : I. Identification of the organic acid. Lipids 1981 ; 16 : 912-9.
6. Townsend GF and Lucas GG. The chemical nature of royal jelly. Biochem J 1940 ; 34 : 1155-62.
7. Nevin W, John HL and Norah CJ. Study on lipid of royal jelly. Biopharm Biophys Acta 1964 ; 84 : 305-15.
8. Barker SA, Foster AB and Lamb DC. Biological origin and configuration of 10-hydroxy-2-decenoic acid. Nature 1959 ; 184 : 634.
9. Brown WH and Freure RJ. Some carboxylic acids present in royal jelly. Can J Chem 1959; 37: 2042-6.
10. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T and Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. J Biol Chem 1990 ; 265 : 11333-7.
11. Abdel-Wahab SM, Selim MA, Shehata MM and Mohamed TR. Detection and estimation of neurohormonal substance in honey and royal jelly. Egypt J Pharm Sci 1982 ; 20 : 353-63.
12. Blum MS, Novak AF and Taber S. 10-hydroxy-2-decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. Science 1959 ; 130 : 452-3.
13. Yatsunami K, Echigo T. Antibacterial action of royal jelly. The XXXth International Apicultural Congress of Apitherapy; 30th. Oct 10-16 ; Nagoya : 1985.
14. Dixit PK, Patel NG. Insulin-like activity in larval foods of the honeybee. Nature 1964 ; 202 : 189-90.
15. O'Conner KJ and Baxter D. The demonstration of insulin-like material in the honeybee, Apis mellifera. Comp Biochem Physiol 1985 ; 81B : 755-60.

16. Kramer KJ, Tager HS, Childs CN and Sperirs RD. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. J Insect Physiol 1977 ; 23 : 293-5.

17. O'Conner KJ and Baxter D. The demonstration of insulin-like material in the honeybee, *Apis mellifera*. Comp Biochem Physiol 1985; 81B: 755-60.

18. Kramer KJ, Tager HS, Childs CN and Sperirs RD. Insulin-like hypoglycemic and immunological activities in honeybee royal jelly. J Insect Physiol 1977; 23 : 293-5.

19. Pongsakorn S, Dachapunya C and Wetchasit P. The role of royal jelly on blood glucose regulation of alloxan-diabetic rat. Thai Army Med 1993; 46 : 77-80.

20. Pongsakorn S, Nusuetrong P and Srijittapong. The longterm treatment of royal jelly on the glucose homeostasis on alloxan-induced diabetic rats. Abstract 27th annual meeting in Thai J Physiol Sci 1998; 11: 68.

21. Nusuetrong P, Pongsakorn S and Srijittapong D. Long term treatment of royal jelly on blood glucose in streptozotocin-diabetic rats. Thai Journal of Phytopharmacy 2000; 7 : 7-13.

22. ธวัชชัย ภาสุรกุล และ ปัทมา ลิ้วณิช การศึกษาผลการออกฤทธิ์ของนมผึ้งในผู้ป่วยโรคเบาหวาน วารสารเภสัชวิทยา 2535-2536ว 14-15ช 27-34.

23. Ji LL. Exercise, oxidative stress, and antioxidant. Am J Sports Med 1996; 24: 520-4.

24. Cotran RS, Kumar V, Robbin SL, editors. Robbins' pathological basis of disease. 4th edition Philadephia: WB Saunder, 1989.

25. Saikatsu S, Ikeno K, Hanada Y and Ikeno T. Physiologically active substances in the oral excreta produced by honey bee – effects of royal jelly on silkworm. Ou Daigaku Shigakushi 1989; 16 (3) : 113-6.

26. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M and Paszkowski J. Lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the diabetic kidney : effect of treatment with angiotensin convertase inhibitors. IUBMB Life 2000; 49(4) : 303-7.

27. Kedziora-Kornatowska KZ, Luciak M, Blaszczyk J and Pawlak W. Effect of aminoguanidine on erythrocyte lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in experimental diabetes. Clin Chem Lab Med 1998; 36(10) : 771-5.

28. Matkovics B, Sasvari M, Kotorman M, Varga IS, Hai DQ and Varga C. Futher prove on oxidative stress in alloxan diabetic rat tissues. Acta Physiol Hung 1997-98; 85(3) : 183-92.

29. Van Dam PS, Van Asbeck BS, Bravenboer B, Van Oirschot JF, Marx JJ and Gispen WH. Nerve conduction and antioxidant levels in experimentally diabetic rats : effects of streptozotocin dose and diabetic duration. Metabolism 1999; 48(4) : 442-7.

30. Vittek J. Effect of royal jelly on serum lipids in experimental animals and humans with artherosclerosis. Experientia 1995; 51(9-10) : 927-35.

31. Shen X, Lu R and He G. Effects of lyophilized royal jelly on experimental hyperlipidemia and thrombosis. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi 1995; 29(1) : 27-9.

32. Cekic O, Bardak Y, Totan Y, Akyol O and Zilelioglu G. Superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and xanthine oxidase in diabetic rats lenses. Ophthalmic Res 1999; 31(5) : 346-50.

33. Matkovics B, Varga SI, Szabo L and Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. Horm Metab Res 1982; 14(2) : 77-9.

34. Hamerlinck FF. Neopterin : a review. Exp Dermatol 1999; 8(3) : 167-76.