

ผลและกลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียต่อการกระตุ้นการเจริญของนิว
ไรท์



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2560
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Effects and underlying mechanisms of Thai and India *Mucuna pruriens* seed extracts on
stimulation of neurite outgrowth



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลและกลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และ
หมามุ่ยอินเดียต่อการกระตุ้นการเจริญของนิวโรท์
โดย นายสุทิน วันสวัสดิ์
สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวั

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโท

.....คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาณีย์ อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. รัชนา ศานติยานนท์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวั)

.....กรรมการ

(ดร. เทวฤทธิ์ สาระชนะ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร. ณิชฎีกา แสงกฤษ)

สุทิน วันสวัสดิ์ : ผลและกลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียต่อการกระตุ้นการเจริญของนิวไรท์ (Effects and underlying mechanisms of Thai and India *Mucuna pruriens* seed extracts on stimulation of neurite outgrowth) อ. ที่ปริกษาวิทยานินพนธ์หลัก: ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนา, 95 หน้า.

กระบวนการสร้างนิวไรท์ เป็นกระบวนการที่สำคัญในการเจริญพัฒนา การซ่อมแซมส่วนที่เสียหาย รวมถึงการสื่อสารระหว่างเซลล์ของเซลล์ประสาท ซึ่งหากกระบวนการการสร้างนิวไรท์เกิดความผิดปกติสามารถก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคฮันติงตัน เป็นต้น ในการศึกษาวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ และการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์จากสารสกัดเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a การศึกษาคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระโดยวิธี DPPH และ ABTS assays นอกจากนั้นทำการศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทโดยวิธี MTT พร้อมกับศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ ประกอบด้วย Ten-4 และ GAP-43 โดยวิธี Real-time PCR ซึ่งจากการทดสอบพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่ยไทย และเมล็ดหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถในการต้านสารอนุมูลอิสระ และพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่ยไทย และเมล็ดหมามุ่ยอินเดียไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท จากนั้นทำการศึกษาฤทธิ์และกลไกของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ โดยพบว่าสารสกัดจากหมามุ่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล สามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 และ GAP-43 ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซนกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 อีกทั้งศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Ten-4 ต่อการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ของสารสกัดสมุนไพร ซึ่งพบว่าการสร้างนิวไรท์ และความยาวของนิวไรท์ลดลง จากการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากสารอนุมูลอิสระได้ และสามารถกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 และ Ten-4 ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาทสำหรับป้องกัน หรือรักษาโรคความผิดปกติของระบบประสาท

ภาควิชา เคมีคลินิก ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

5876663837 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: NEURODEGENERATIVE DISEASES, NEURITE OUTGROWTH, MUCUNA PRURIENS

SUTIN WANSAWAT: Effects and underlying mechanisms of Thai and India *Mucuna pruriens* seed extracts on stimulation of neurite outgrowth.
ADVISOR: ASST. PROF. DR. TEWIN TENCOMNAO, 95 pp.

Neurite outgrowth is a critical process in neuronal development and differentiation, impairment of neurite formation lead to neurodegenerative diseases. In this study we evaluated the effect of *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. pruriens (Thai) and *Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. utilis (Wall. Ex Wight)(India) L. H. Bailey seed crude extracts in hexane, ethyl acetate and ethanol fractions on antioxidant and neurite outgrowth activity as well as underlying mechanisms. From result showed that Thai and India *Mucuna pruriens* seed extract in ethanol fractions have high radical scavenging activity, including DPPH and ABTS. In addition, to evaluate cytotoxicity of herbal extracts in Neuro2a cells which showed non-toxic to the cell line. Thai *Mucuna pruriens* seed extract in ethanol (MTE) and India *Mucuna pruriens* seed extract in hexane (MIH) promoted neurite outgrowth and increased Ten-4 mRNA expression in Neuro2a cells. Moreover, MTE upregulated GAP-43 expression. To evaluate the knockdown Ten-4 mRNA on neurite outgrowth activity of MTE and MIH by using siRNA which the neurite bearing cell and neurite length were decreased. These results indicate that MTE promote neurite outgrowth through upregulation of Ten-4 and GAP-43 while MIH induce neurite outgrowth via increased Ten-4 mRNA expression in Neuro2a cells Thus, this study suggests that MTE and MIH have a potential therapy. They can be developed as a drug for neurodegenerative diseases.

Department: Clinical Chemistry Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Advisor's Signature

Molecular Medicine

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ลุล่วงได้ดี ด้วยความเมตตากรุณาของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผศ.ดร. เทวิน เทนคำเนาว่า ซึ่งเป็นผู้ที่ให้โอกาสได้เข้ามาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท ตลอดจนให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ชี้แนะแนวทางวิธีการแก้ไขปัญหา และข้อผิดพลาดต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. รัชนา ศานติยานนท์ ที่กรุณาเป็นประธานในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ และ อ.ดร. เทวฤทธิ์ สระระชนะ ที่กรุณาเป็นกรรมการร่วมในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ รวมถึงให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ศึกษา ขอขอบพระคุณ อ.ดร. ณัฐธิดา แสงกฤษ ที่กรุณาเป็นกรรมการนอกรมหาวิทยาลัยในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา (เฉพาะค่าเล่าเรียน) และทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 36 ครั้งที่ 3/2560 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่เอื้อเฟื้อเงินทุนเพื่อการศึกษาต่อในระดับปริญญาโท และเพื่อการดำเนินงานวิจัยทั้งหมดนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน จากทั้งมหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ และจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความรู้ คำแนะนำเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการดำเนินงานวิจัย จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ และบุคลากรทุกท่าน สำหรับความช่วยเหลือในด้านสถานที่ในการทำวิจัย ตลอดจนวัสดุอุปกรณ์ พร้อมกับคำแนะนำต่างๆเพื่อการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง เพื่อนสนิททุกคน ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน ในการเป็นกำลังใจ และแรงผลักดันให้ก้าวผ่านปัญหา จนทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงอย่างสมบูรณ์

สารบัญ

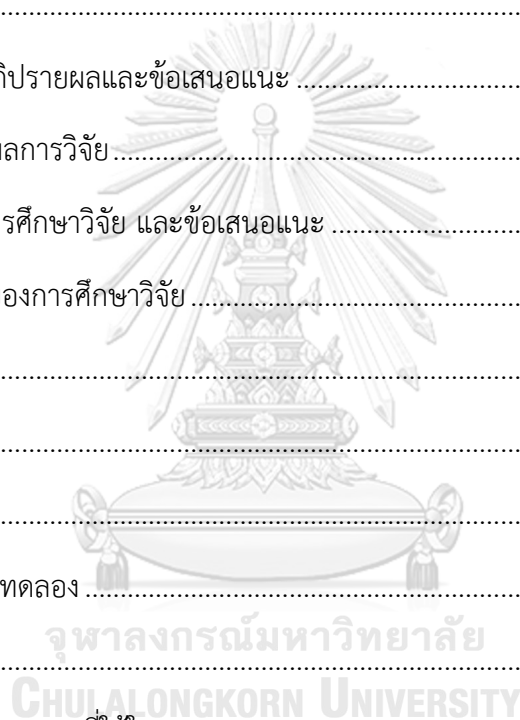
หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 คำถามงานวิจัย	3
1.5 สมมติฐานในงานวิจัย	3
1.6 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย.....	4
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	6
บทที่ 2	7
เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.1 โรคความผิดปกติของระบบประสาท	7
2.2 กระบวนการสร้างของนิวไรท์ (Neurite outgrowth)	9
2.3 สารที่เกี่ยวข้องกับกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ (Neurotrophic factors).....	10
2.4 กลไกที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นการงอกของใยประสาท.....	14
2.5 กลุ่มสารที่สำคัญในการปกป้องเซลล์ประสาท.....	18

2.6 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัย	22
บทที่ 3	26
วิธีดำเนินการวิจัย	26
3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง	26
3.1.1 สารเคมี	26
3.1.2 เครื่องมือ	27
3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย	30
3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง	30
3.2.2 ตัวอย่างพืชสมุนไพร	31
3.3 ระเบียบวิธีวิจัย	32
3.3.1 การสกัดตัวอย่างเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียโดยวิธี Soxhlet extraction	32
3.3.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู่ยไทย และเมล็ดหมามู่ยอินเดีย	34
3.3.3 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจาก เมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดีย	37
3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และ หมามู่ยอินเดียต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT assay	41
3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี Neurite outgrowth assay	42

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 และ GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี Real-Time PCR.....	44
3.3.7 การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีนTen-4 ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี siRNA.....	46
3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	48
บทที่ 4	49
ผลการวิจัย.....	49
4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด	49
4.2 ผลการสกัดหยาบพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล โดยใช้การสกัดแบบ Soxhlet extraction	50
4.3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู๋ไทย และเมล็ดหมามู๋อินเดีย	50
4.3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด.....	50
4.3.2 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด	51
4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดีย	52
4.4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยวิธี DPPH assay	52
4.4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยวิธี ABTS assay	53
4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT	55

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และ เมล็ดของหมามุ่ยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a	57
4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และ เมล็ดของหมามุ่ยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 และ GAP- 43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี Real-Time PCR	62
บทที่ 5	70
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	70
5.1 อภิปรายผลการวิจัย	70
5.2 สรุปผลการศึกษาวินิจฉัย และข้อเสนอแนะ	77
5.3 ข้อจำกัดของการศึกษาวินิจฉัย	77
รายการอ้างอิง	79
ภาคผนวก.....	87
ภาคผนวก ก	88
ข้อมูลจากการทดลอง	88
ภาคผนวก ข	90
น้ำยา และสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ	90
ภาคผนวก ค	93
คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	93
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	95



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (Bioactive compounds) และกลไกที่เกี่ยวข้องจากพืชสมุนไพรในการปกป้องเซลล์ประสาท.....	20
ตารางที่ 2 สารประกอบที่สำคัญ และโครงสร้างของหมามู่ย (<i>Mucuna pruriens</i>).....	24
ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด	35
ตารางที่ 4 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด.....	36
ตารางที่ 5 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay.....	38
ตารางที่ 6 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay	40
ตารางที่ 7 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR.....	45
ตารางที่ 8 ลำดับเบสของไพรเมอร์ (Primer) ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา	46
ตารางที่ 9 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพร.....	49
ตารางที่ 10 ผลการคำนวณปริมาณผลผลิต (%Yield) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพร.....	50
ตารางที่ 11 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียโดยวิธี Folin-Ciocalteu method	51
ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric method	52
ตารางที่ 13 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยวิธี DPPH assay	54
ตารางที่ 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยวิธี ABTS assay	54

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease)....	8
ภาพที่ 2 การเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาทในแต่ละระยะ (ระยะที่1-5).....	10
ภาพที่ 3 กลไกการกระตุ้นการสร้างนิวโรโทรฟินโดย Brain-derived neurotrophic factor (BDNF).....	11
ภาพที่ 4 กลไกการกระตุ้นการสร้างนิวโรโทรฟินโดย Nerve growth factor (NGF).....	12
ภาพที่ 5 แสดงกลไกการกระตุ้นการสร้างนิวโรโทรฟินโดย Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF)	13
ภาพที่ 6 โครงสร้างตัวรับของ BDNF, NGF และ GDNF	14
ภาพที่ 7 กลไกของ NGF และวิถีที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการงอกของนิวโรโทรฟิน	17
ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม Flavonoids และ Non-flavonoids.....	19
ภาพที่ 9 ลำต้น และฝักของหมามู่ย (<i>Mucuna pruriens</i>).....	23
ภาพที่ 10 เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a (Mouse neuroblastoma).....	30
ภาพที่ 11 ส่วนของเมล็ดหมามู่ยไทย (<i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC. Var. <i>pruriens</i>).....	31
ภาพที่ 12 ส่วนของเมล็ดหมามู่ยอินเดีย (<i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC. Var. <i>utilis</i> (Wall. Ex Wight) L. H. Bailey).....	31
ภาพที่ 13 เครื่อง Soxhlet extractor.....	33
ภาพที่ 14 เครื่อง Evaporator	33
ภาพที่ 15 ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay.....	41
ภาพที่ 16 การเพิ่มการงอกของนิวโรโทรฟิน (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a).....	42
ภาพที่ 17 กลไกการทำงานของวิธี siRNA ในการ Knockdown ยีน	47
ภาพที่ 18 ผลการทดสอบความพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT	56

ภาพที่ 19 ผลการทดสอบความพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT.....	57
ภาพที่ 20 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a	59
ภาพที่ 21 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อความยาวของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a.....	60
ภาพที่ 22 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ถ่ายภาพโดยใช้กล้องชนิด Phase contrast.....	61
ภาพที่ 23 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a.....	63
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a.....	64
ภาพที่ 25 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a	65
ภาพที่ 26 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a	66
ภาพที่ 27 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อความยาวของนิวไรท์ (Neurite length) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a.....	67
ภาพที่ 28 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ของสารสกัดหยาบเมล็ดหมามูยไทย และเมล็ดหมามูยอินเดีย ถ่ายภาพโดยใช้กล้องชนิด Phase contrast.....	69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันทั่วโลกกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (Aging society) ซึ่งพบว่าในปีค.ศ. 2045-2050 มีแนวโน้มประชากรที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปเพิ่มมากขึ้น โดยประเทศไทยนั้นมีแนวโน้มประชากรอายุ 60 ปีขึ้นไปเพิ่มสูงขึ้นประมาณ 11.2 % ของประชากร⁽¹⁾ อายุที่เพิ่มสูงขึ้นนั้น ร่างกายก็ย่อมมีการเปลี่ยนแปลงตามไปด้วย เช่น เซลล์ในร่างกายมีการเสื่อมสภาพลง มีภูมิคุ้มกันลดต่ำลง ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวย่อมส่งผลทำให้สภาพร่างกายมีความอ่อนแอ และเกิดโรคร้ายต่างๆตามมา เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน โรคหัวใจ โรคความดันโลหิต และโรคความผิดปกติของระบบประสาท เป็นต้น สำหรับโรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และ โรคฮันติงตัน (Huntington's Disease) เป็นต้น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ซึ่งพบว่าอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เมื่ออายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไปในประเทศสหรัฐอเมริกาคิดเป็น 10% ในประเทศจีนคิดเป็น 4.2% และในประเทศไทยคิดเป็น 3.4% ของประชากร⁽²⁾ โรคความผิดปกติของระบบประสาทนั้นเกิดจากมีการสร้างของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ที่ลดลง โดยใยประสาทนั้นมีความสำคัญในการซ่อมแซมเซลล์ประสาทส่วนที่เสื่อมเสียไป และช่วยในการเชื่อมสัญญาณระหว่างเซลล์ประสาท⁽³⁾ ซึ่งเกิดจากมีสารกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ลดลง รวมทั้งการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากสภาวะเครียดของเซลล์ ในภาวะปกติเมื่อเซลล์ประสาทมีการเสื่อมสลายลงจะมีสารที่ช่วยเพิ่มการงอกของนิวไรท์ เช่น Nerve Growth Factor (NGF) และ Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF)⁽⁴⁾ แต่การใช้สาร Nerve Growth Factor (NGF) ในการรักษาผู้ป่วยโดยตรงนั้นไม่ได้ประสิทธิภาพที่ดีนัก เนื่องจากสารดังกล่าวมีมวลโมเลกุลที่ใหญ่ทำให้ไม่สามารถผ่าน Blood brain barrier ได้⁽⁵⁾ อีกทั้งยาที่ใช้ในการรักษาปัจจุบันนั้นมีผลข้างเคียงที่มากมาย และมีผลในการรักษาเพียงระยะสั้นเท่านั้น

ปัจจุบันสมุนไพรเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาป้องกัน หรือรักษาโรคต่างๆ โดยการนำมาผลิตเป็นยาชนิดแคปซูล หรือยาต้ม แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาฤทธิ์ และกลไกทางชีวภาพของสมุนไพรนั้นควรมีการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่เหมาะสม ในการศึกษาครั้งนี้คณะผู้วิจัยเลือกเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียซึ่งมีการศึกษาพบว่าหมามู่ยนั้นมีผลในการช่วยป้องกัน และรักษาโรคพาร์กินสันเนื่องจากในเมล็ดนั้นมีสาร L-dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารสื่อประสาทชนิดโดปามีน

(Dopamine) แต่หามามูยอินเดีย นั้นไม่ก่อให้เกิดอาการคันของผิวหนัง⁽⁶⁾ ในขณะที่หามามูยไทย นั้นมีผลทำให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนัง ซึ่งมีผลต่อการกระตุ้นระบบประสาทเพื่อตอบสนองต่ออาการคัน แต่หามามูยอินเดีย และหามามูยไทย นั้นยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ และกลไกในการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth)

คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง Neuro2a เป็นโมเดลในการศึกษาครั้งนี้ Neuro2a mouse neuroblastoma อนุพันธ์จาก mouse C1300 tumor ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อบริเวณสมอง สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทได้ ซึ่งเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ศึกษาสารเคมีต่างๆที่มีผลต่อการงอกของนิวไรท์ รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และโรคความผิดปกติของระบบประสาท รวมถึงการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท (Neuronal proliferation and differentiation)⁽⁷⁾ โดยศึกษาการแสดงของยีน Growth associated protein-43 (GAP-43) และ Teneurin-4 (Ten-4) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) พร้อมทั้งศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดย siRNA^(3, 5, 8) โดยงานวิจัยดังกล่าวนี้สามารถนำไปต่อยอดได้ในการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ อีกทั้งยังเพิ่มคุณค่า และพัฒนาสมุนไพรดังกล่าวให้เป็นผลิตภัณฑ์ในการป้องกัน และรักษาโรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) ให้เกิดความปลอดภัย และมีประสิทธิภาพสูงสุดแก่ผู้บริโภคต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหามามูยไทย และหามามูยอินเดียต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Neuro2a
- 1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหามามูยไทย และหามามูยอินเดียในการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth)
- 1.2.3 เพื่อศึกษากลไกของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหามามูยไทย และหามามูยอินเดียต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ GAP-43 และ Teneurin-4

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยนี้ทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ซึ่งเป็นเซลล์ Mouse neuroblastoma เป็นอนุพันธ์จาก Mouse C1300 tumor ซึ่งเป็น *In vitro* model สำหรับศึกษาการพัฒนา และการเพิ่มการงอกของนิวไรต์ ซึ่งจะทำการศึกษาฤทธิ์การเพิ่มการงอกของนิวไรต์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดีย โดยเริ่มจากเลือกความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดีย ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยวิธี MTT assay จากนั้นศึกษาการเพิ่มงอกของนิวไรต์ โดยวิธี Neurite outgrowth assay และศึกษาการแสดงออกของยีน GAP-43 และ Ten-4 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการงอกของนิวไรต์ ด้วยเทคนิค Real-time PCR รวมทั้งศึกษาการยับยั้งการแสดงออกของยีนที่มีผลต่อการกระตุ้นงอกของนิวไรต์ด้วยเทคนิค siRNA

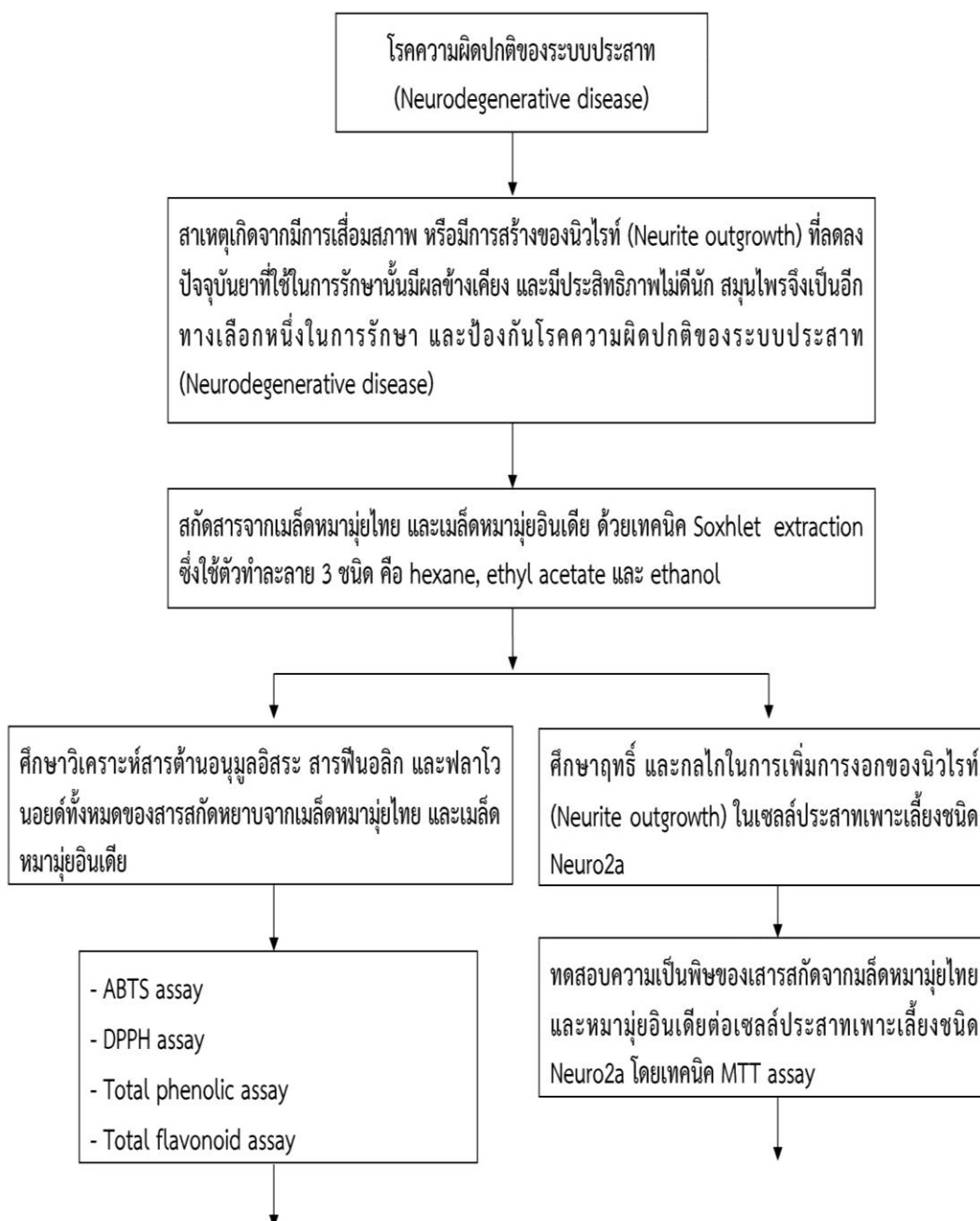
1.4 คำถามงานวิจัย

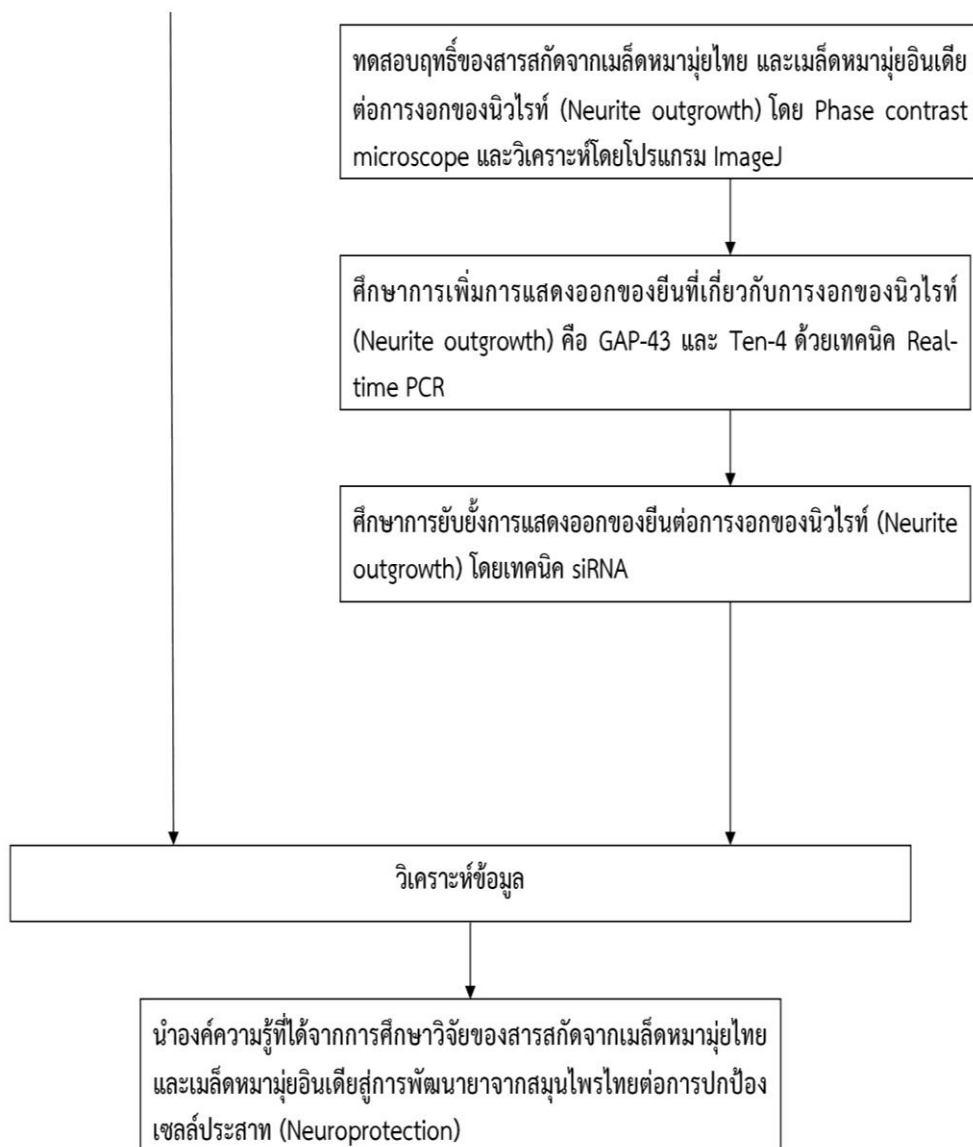
- 1.4.1 สารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรต์ (Neurite outgrowth) ได้หรือไม่
- 1.4.2 สารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการงอกของนิวไรต์ได้หรือไม่

1.5 สมมติฐานในงานวิจัย

สารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรต์ โดยผ่านกลไกที่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการงอกของนิวไรต์ (GAP-43 และ Ten-4) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ได้

1.6 กรอบแนวความคิดในงานวิจัย





1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.7.1 สารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ได้
- 1.7.2 สารสกัดหยาบจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการงอกของนิวไรท์ได้
- 1.7.3 สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปต่อยอดงานวิจัย เพื่อพัฒนาให้เป็นยาสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในการป้องกันโรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) ได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป



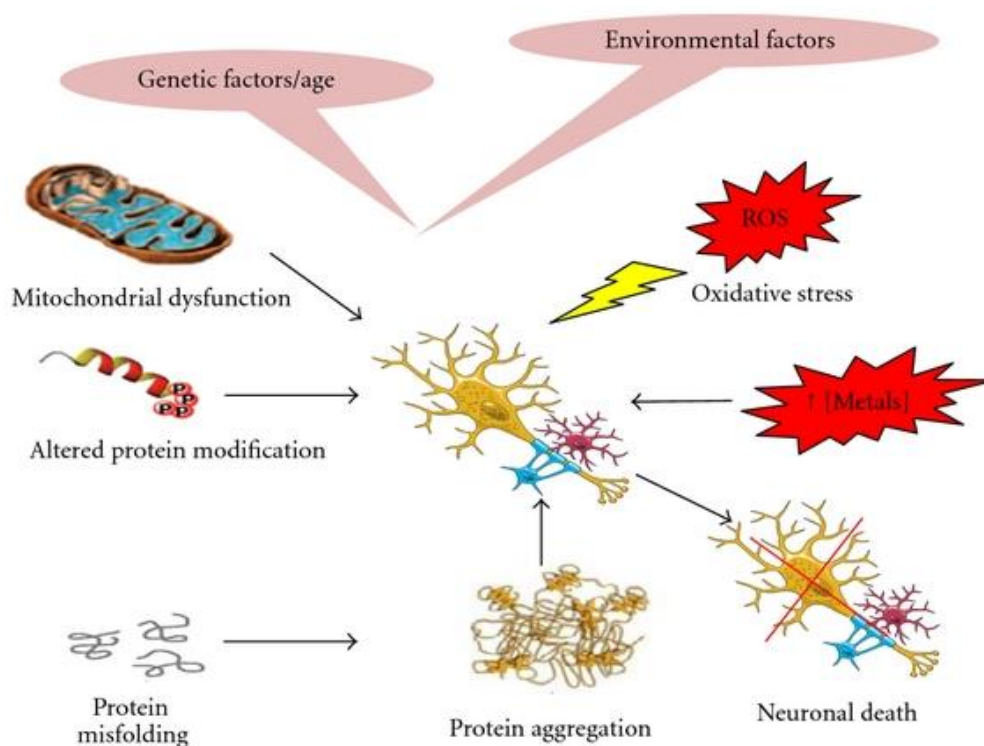
บทที่ 2

เอกสาร และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคความผิดปกติของระบบประสาท

โรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) เกิดจากมีการถูกทำลาย หรือเสื่อมสภาพลงของเซลล์ประสาทในสมอง ส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้าง และหน้าที่ของสมอง สำหรับโรคที่พบได้บ่อย เช่น โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) และโรคฮันติงตัน (Huntington's Disease) เป็นต้น ซึ่งพบว่าแต่ละโรคมีการถูกทำลายในบริเวณสมองที่แตกต่างกันไป โดยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) พบว่ามีการถูกทำลายบริเวณ Cerebral cortex ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อม (Dementia) ส่งผลต่อสติปัญญา ความคิด ความทรงจำบกพร่อง ในขณะที่โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) พบว่าบริเวณ Basal ganglia ถูกทำลายส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติในด้านการเคลื่อนไหว และโรคฮันติงตัน (Huntington's Disease) พบว่ามีความผิดปกติของสมองบริเวณ Frontal lobe ส่งผลทำให้มีความผิดปกติทางด้านการเคลื่อนไหว และการตอบสนองที่ช้าลง⁽⁹⁾ สำหรับการเกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาทรุนแรง เกิดได้จาก 2 ปัจจัยหลัก คือ ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เกิดจากการใช้ชีวิตประจำวันทั่วไป เช่น การรับประทานอาหารปิ้งย่าง อาหารจานด่วน หรือการได้รับสารโลหะหนัก หรือยาปราบวัชพืช เป็นต้น ส่งผลทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ (Free radical) และก่อภาวะเครียดภายในเซลล์ (Oxidative stress) ในขณะที่ปัจจัยทางด้านพันธุกรรม เช่น ความผิดปกติของโครงสร้างโปรตีน ซึ่งอาจเกิดการรวมกลุ่ม หรือการสลายตัวของโปรตีนทำให้โปรตีนไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ และอาจเกิดจากกระบวนการสร้าง หรือสลายสารชีวโมเลกุลภายในเซลล์ ก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นส่งผลทำให้ไมโทคอนเดรียมีการทำงาน และโครงสร้างที่ผิดปกติ⁽¹⁰⁾ ปัจจัยดังกล่าวล้วนก่อให้เกิดการตาย หรือการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทได้ ในปัจจุบันกำลังก้าวเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุ (Aging society) ซึ่งความชราเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาท ซึ่งพบว่าโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่พบบ่อยที่สุดในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยอัตราการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เมื่ออายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไป ในประเทศสหรัฐอเมริกาคิดเป็น 10% ในประเทศจีนคิดเป็น 4.2% และในประเทศไทยคิดเป็น 3.4% ของประชากร⁽²⁾ เนื่องจากในผู้สูงอายุนั้นมีการลดลงของเซลล์ประสาท เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการเหนือสารพันธุกรรม (Epigenetic) หรืออาจเกิดจากการมีสารกระตุ้นการงอกของนิวโรโทรฟินลดลง เช่น Nerve growth factor (NGF) หรือ Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) ซึ่งในสภาวะปกติช่วยในการเจริญพัฒนา และคงอยู่ของเซลล์ประสาท รวมถึงการมี Telomere ที่สั้นลง ส่งผลทำให้เซลล์มี

อายุที่สั้นลงตามไปด้วย⁽¹¹⁾ ปัจจุบันยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) สามารถแยกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มยาที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholinesterase (Acetylcholinesterase inhibitors) เนื่องจากในสมองของผู้ป่วยนั้นมีระดับของ Acetylcholine ที่ต่ำลง เช่น Donepezil, Rivastigmine และ Galantamine เป็นต้น และกลุ่มยาที่สามารถขัดขวางการทำงานของ Glutamate ที่มากเกินไป (NMDA receptor antagonists) เช่น Memantine เป็นต้น⁽¹²⁾ แต่ยาดังกล่าวนี้สามารถก่อให้เกิดผลข้างเคียงแก่ผู้ป่วยได้ เช่น คลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย ท้องเสีย และนอนไม่หลับ เป็นต้น อีกทั้งยังมีราคาที่สูงและให้ประสิทธิภาพในการรักษาเพียงระยะสั้นเท่านั้น

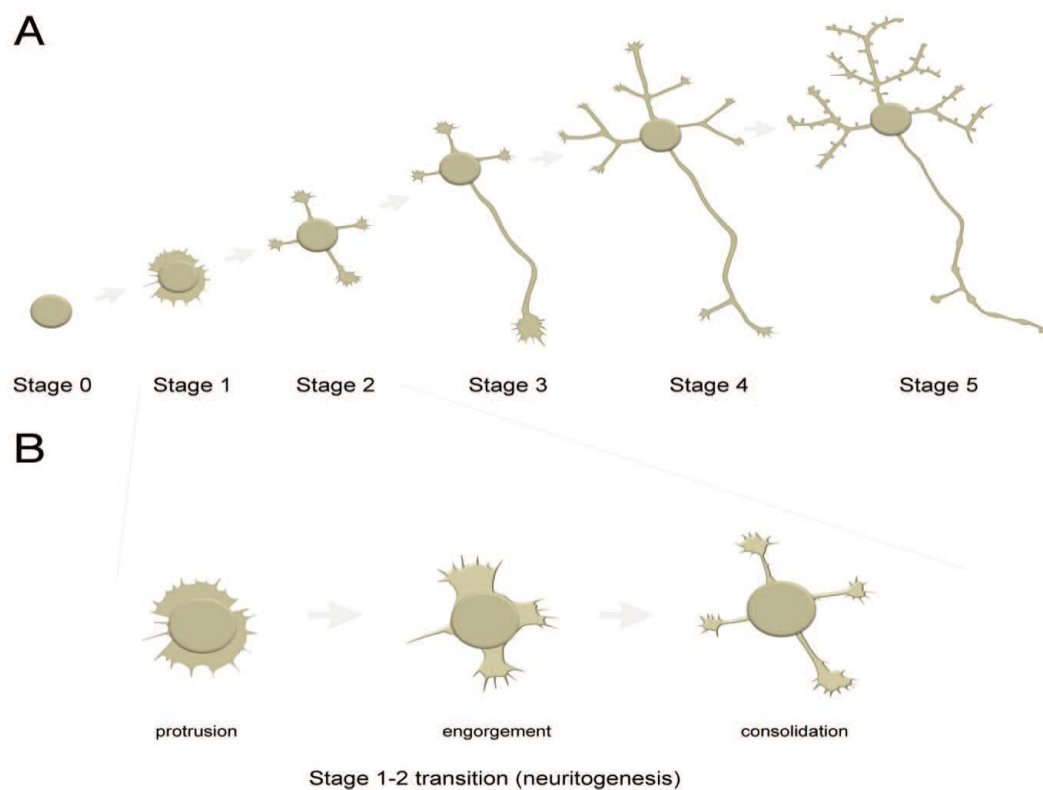


ภาพที่ 1 ปัจจัยที่ก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative disease) ซึ่งประกอบด้วยปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น การได้รับสารอนุมูลอิสระ โลหะหนัก เป็นต้น และปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น การสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย ความผิดปกติของกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน เป็นต้น ซึ่งล้วนก่อให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท

ที่มา: <https://www.hindawi.com/journals/jnd/2013/563481/> (Accessed on October 30, 2016)

2.2 กระบวนการสร้างของนิวไรท์ (Neurite outgrowth)

การงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) เป็นกระบวนการในการเจริญเติบโตและพัฒนาการของเซลล์ประสาทไปเป็นแอกซอน และเดนไดรต์⁽¹³⁾ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการสื่อสาร รับ-ส่งสัญญาณ เชื่อมโยงระหว่างเซลล์ประสาท อีกทั้งยังช่วยในการยึดหยุ่น และคงรูปร่างของเซลล์ประสาท เมื่อเซลล์ประสาทได้รับความเสียหายนิวไรท์สามารถฟื้นฟูให้กลับคืนสู่ภาวะปกติได้⁽⁷⁾ แต่ทั้งนี้ในภาวะปกติสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยสารกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ (Neurotrophic factor) เช่น Nerve growth factor (NGF) หรือ Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) เป็นต้น การเจริญเติบโต และพัฒนาการของเซลล์ประสาทเกิดจากการรวมตัวของโปรตีนที่สำคัญ 2 ชนิด คือ แอกติน และไมโครทิวบูล ประกอบกันเป็นโครงสร้างของเซลล์ประสาท สำหรับกระบวนการสร้าง และเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาทสามารถแบ่งออกเป็น 5 ระยะ โดยเริ่มจากเซลล์ประสาทรูปทรงกลมมีการยึดขยายจากตัวเซลล์ประสาทไปเป็น Lamellipodia และ Filopodia ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 ชั่วโมง (ระยะที่ 1) จากนั้นเวลาประมาณ 6-24 ชั่วโมง เซลล์ประสาทเริ่มมีการสร้างนิวไรท์ขนาดเล็กจำนวนมากรอบๆ ตัวเซลล์ประสาท ซึ่งนิวไรท์ทั้งหมดที่เกิดขึ้นสามารถที่จะพัฒนาไปเป็นแอกซอนได้ (ระยะที่ 2) โดยระยะที่ 1 และ 2 ของการเจริญพัฒนาเซลล์ประสาทสามารถแบ่งย่อยเป็น 3 ระยะ โดยเริ่มจากมีการรวมตัวของ F-actin ส่งผลทำให้เกิดการยื่นของเมมเบรนเป็น Lamellipodia (Protrusion phase) จากนั้นเคลื่อนตัวไปเป็น Lamellipodia และ Filopodia (Engorgement phase) และสุดท้ายเกิดการสร้างฐาน และโครงสร้างพื้นฐานของเซลล์ประสาท (Consolidation phase) หลังจากนั้นประมาณ 24-72 ชั่วโมง เซลล์ประสาทจะเกิดสัญญาณแบบสุ่มซึ่งมีเส้นนิวไรท์จำนวนหนึ่งเส้นมีการยึดยาวอย่างรวดเร็ว และกลายเป็นแอกซอน (ระยะที่ 3) จากนั้นเซลล์ประสาทเกิดการเจริญพัฒนาของแอกซอนอย่างต่อเนื่อง และพัฒนาไปเป็นเดนไดรต์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 3-7 วัน (ระยะที่ 4) สุดท้ายส่งผลทำให้เซลล์ประสาทมีการสร้างไซแนปส์ รับ-ส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ มีการเจริญพัฒนาเป็น Dendrite spine และเกิดเป็นโครงข่ายของเซลล์ประสาท (ระยะที่ 5) (ดังแสดงดังรูปที่ 2)⁽¹⁴⁾



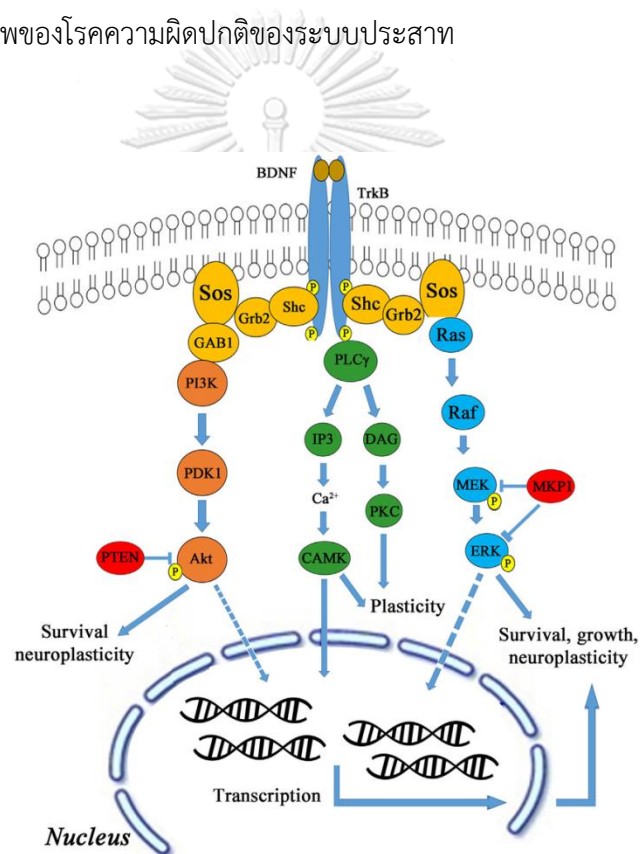
ภาพที่ 2 การเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาทในแต่ละระยะ (ระยะที่1-5) โดยเริ่มจากเซลล์ประสาทรูปทรงกลม จากนั้นเกิดการพัฒนาไปเป็นแอกซอน และเดนไดรต์ตามลำดับ สุดท้ายเกิดเป็นโครงข่ายของเซลล์ประสาท

ที่มา: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24002528> (Accessed on November 14, 2016)

2.3 สารที่เกี่ยวข้องกับกระตุ้นการงอกของนิวไรต์ (Neurotrophic factors)

สารที่ช่วยในการกระตุ้นการงอกของนิวไรต์ (Neurotrophic factors) จัดเป็น Secreted protein ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท การยึดหยุ่นของเซลล์ประสาท การเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท และการสร้างไมอีลินของเซลล์ประสาท เป็นต้น โดยพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระดับสารกระตุ้นการงอกของนิวไรต์มีความสัมพันธ์กับพยาธิสภาพของผู้ป่วยโรคความผิดปกติของระบบประสาท เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน เป็นต้น สำหรับสารที่ช่วยในการกระตุ้นการงอกของนิวไรต์มีหลายชนิด อาทิเช่น NGF, BDNF และ GDNF เป็นต้น ซึ่งสารกระตุ้นแต่ละชนิดนั้นมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกัน

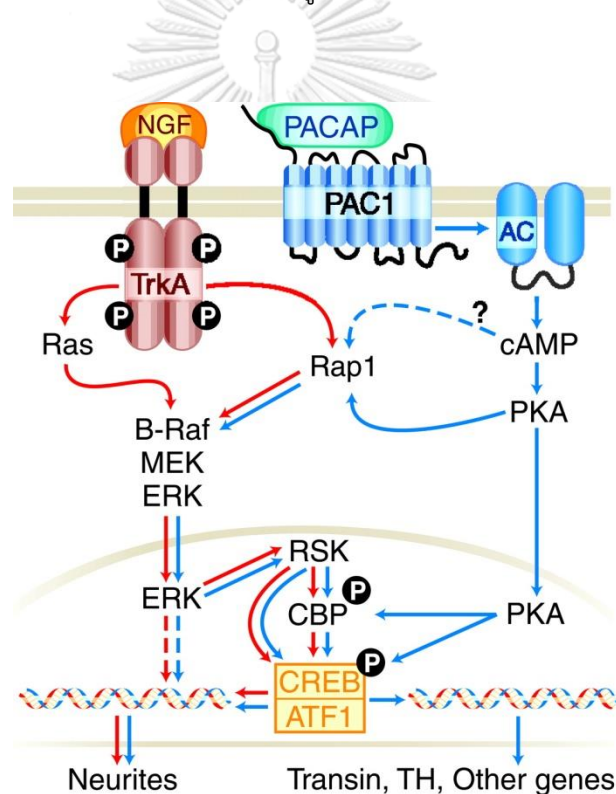
Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ถูกสังเคราะห์มาจาก Pro-isoform BDNF จัดเป็น Small dimeric protein ซึ่งมีโครงสร้างคล้ายกับ NGF ซึ่ง BDNF มีความเกี่ยวข้องกับการเรียนรู้ และความทรงจำ อีกทั้งยังเป็นตัวควบคุม LTD Long-term depression (LTD) และ Long-term potentiation (LTP) รวมถึงการยืดหยุ่น การเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท ซึ่งการทำงานของ BDNF เกิดขึ้นเมื่อจับกับตัวรับ TrkB ส่งผลทำให้เซลล์ประสาทยังคงชีวิตอยู่ได้ ในขณะที่ Pro-BDNF มีการจับกับตัวรับ p75NTR จะส่งผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (Apoptosis pathway) จากการศึกษาที่ผ่านมาทั้ง *In vitro* และ *In vivo* พบว่าระดับการเปลี่ยนแปลงของ BDNF สัมพันธ์กับพยาธิสภาพของโรคความผิดปกติของระบบประสาท



ภาพที่ 3 กลไกการกระตุ้นการสร้างนิวโรโทรฟินโดย Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) โดยจับตัวรับบริเวณผิวเซลล์คือ TrkB จากนั้นส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของวิถีต่างๆเช่น PI3K/Akt, PKC และ MEK/ERK เป็นต้น เกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน และโปรตีนตามลำดับ สุดท้ายเกิดการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท

ที่มา: https://www.researchgate.net/figure/304526050_fig3_FigUre-3-BDnF-and-TrkB-signaling-pathway (Accessed on November 27, 2017)

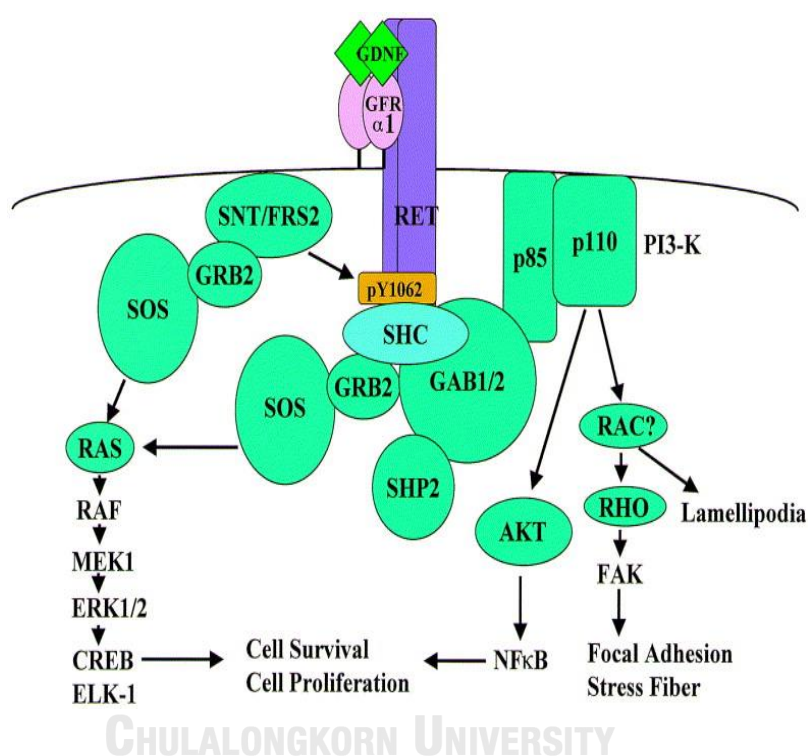
Nerve growth factor (NGF) เป็น Glycoprotein ซึ่งประกอบด้วย 3 หน่วยย่อย คือ α -NGF, β -NGF และ γ -NGF โดย NGF สังเคราะห์มาจาก Pro-NGF และถูกหลั่งออกมาบริเวณนอกเซลล์ การทำงานของ NGF นั้นเกิดขึ้นโดยการจับกับ TrkA ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการยืดหยุ่นและคงชีวิตของเซลล์ประสาท ในขณะที่ Pro-NGF จับกับตัวรับ p75NTR ส่งผลทำให้เกิดกระบวนการตายของเซลล์ประสาท (Apoptosis pathway) จากการศึกษาพบว่าในผู้สูงอายุจะมีระดับของ NGF ลดลง และส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพ และอาการในผู้ป่วยโรคความผิดปกติของระบบประสาทได้



ภาพที่ 4 กลไกการกระตุ้นการสร้างนิวไรต์โดย Nerve growth factor (NGF) โดยสาร NGF จับกับตัวรับบนผิวเซลล์คือ TrkA ส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของวิถี MEK-ERK จากนั้นส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของ CREB ภายในนิวเคลียส แล้วเกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน และโปรตีนตามลำดับ สุดท้ายเกิดการงอกของนิวไรต์

ที่มา: <http://science.sciencemag.org/content/296/5573/1648.full> (Accessed on November 27, 2017)

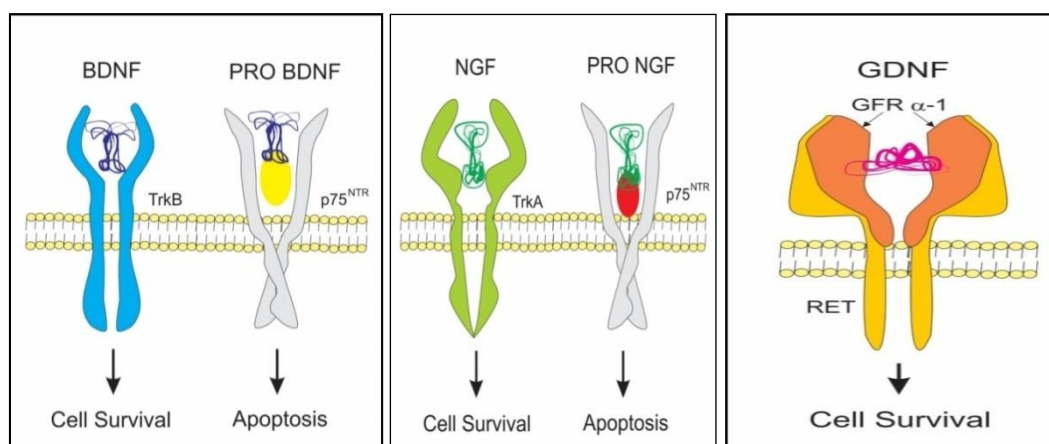
Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) เป็นสารกระตุ้นที่สำคัญซึ่งเกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนา และคงชีวิตอยู่ของ Midbrain dopaminergic neurons GDNF สามารถทำงานได้โดยจับกับตัวรับ GFR $\alpha 1$ และ RET ซึ่งสาร GDNF มีผลยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท และการลดลงของระดับ GDNF ทำให้เกิดการหลั่งของกลูตาเมตจำนวนมาก ส่งผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท รวมถึงมีความเกี่ยวข้องกับอาการ และพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ และโรคพาร์กินสัน⁽¹⁵⁾



ภาพที่ 5 แสดงกลไกการกระตุ้นการสร้างนิวโรโทรฟิโดย Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) โมเลกุลของ GDNF จับกับตัวรับบนผิวเซลล์คือ RET จากนั้นเกิดการส่งสัญญาณกระตุ้นการทำงานของวิถี MEK/ERK หรือ PI3K/Akt เกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน และโปรตีนตามลำดับสุดท้ายเกิดการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท

ที่มา: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359610101000120#FIG2>

(Accessed on November 27, 2017)



ภาพที่ 6 โครงสร้างตัวรับของ BDNF, NGF และ GDNF ตามลำดับ ซึ่งเป็นสารสำคัญในการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์

ที่มา: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4567216/> (Accessed on November 14, 2016)

2.4 กลไกที่เกี่ยวข้องในการกระตุ้นการงอกของใยประสาท

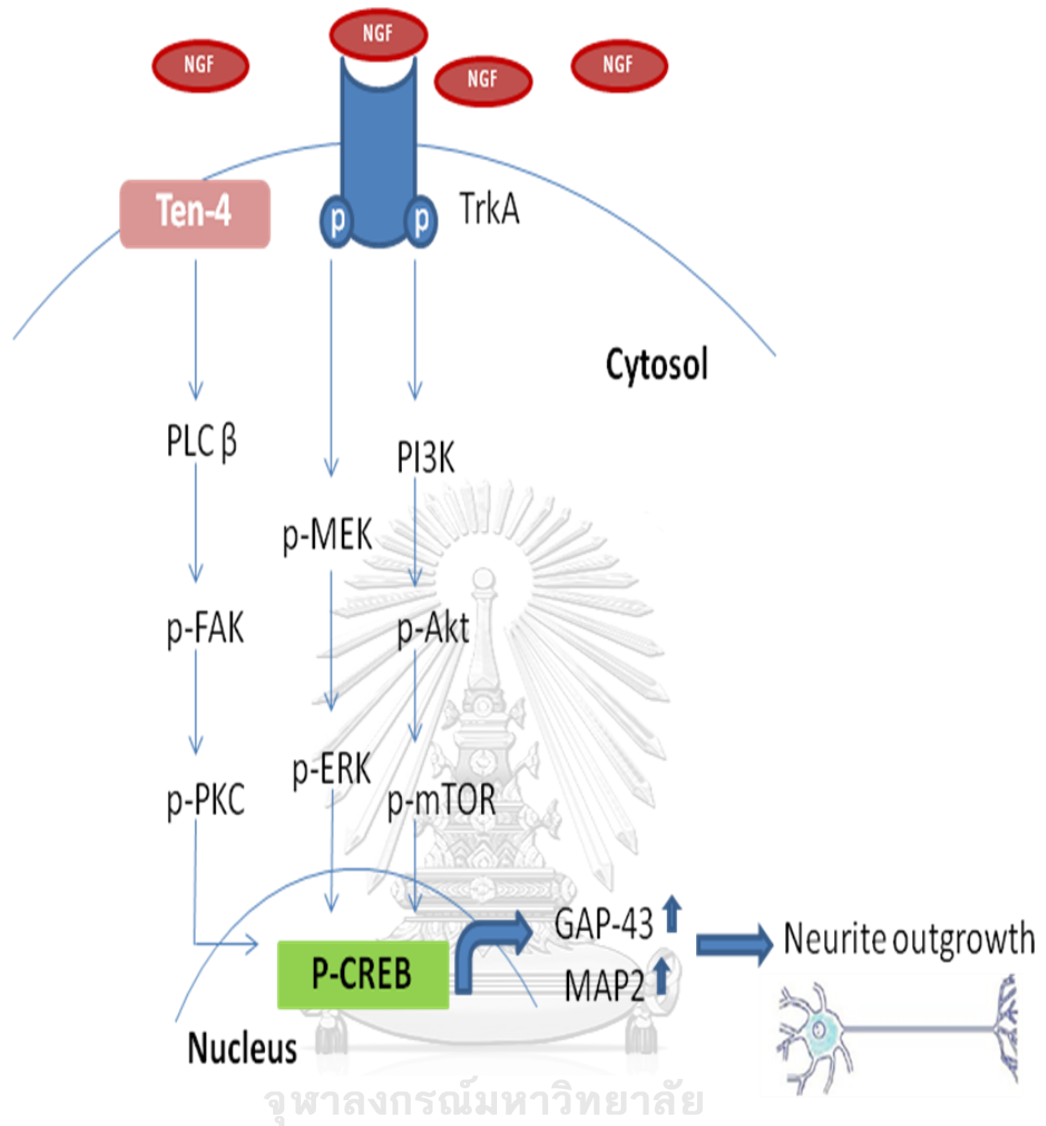
Microtubule associated proteins (MAPs) เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกบริเวณสมอง สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 ประกอบด้วย Map1A กับ Map1B และชนิดที่ 2 ประกอบด้วย Map2 กับ Tau ทั้งสองชนิดมีการแสดงออกสูงในเซลล์ประสาท พร้อมทั้งเป็นตัวบ่งชี้ระยะเริ่มต้นของกระบวนการ Post-mitotic neurons MAP2 เป็นโปรตีนที่สำคัญในกระบวนการสร้างนิวไรท์โดยการส่งเสริมการยึดขยายของ Bundled microtubules⁽¹⁴⁾ ออกจากตัวเซลล์ประสาท อีกทั้งยังพบว่าการแสดงออกที่สูงในส่วนของเดนไดรต์ของเซลล์ประสาท ทั้งยังพบว่าการแสดงออกของ MAP2 ทำให้เกิดการงอกของนิวไรท์ในเซลล์เพาะเลี้ยงต่างๆ เมื่อมีการงอกของนิวไรท์จำนวนมาก การแสดงออกของ MAP2 จะสูงขึ้น ในทางกลับกันเมื่อมีการงอกของนิวไรท์จำนวนน้อยการแสดงออกของ MAP2 จะต่ำลงตามไปด้วย MAP2 แบ่งออกเป็น MAP-2a, MAP-2b, MAP-2c พบว่า MAP-2b, MAP-2c มีบทบาทสำคัญในการงอกของนิวไรท์ และการยึดหยุ่นของเซลล์ประสาท⁽¹⁶⁾ จากการศึกษาของ Mishra R. และคณะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากบอระเพ็ด (*Tinospora cordifolia*) สามารถส่งเสริมการเจริญพัฒนาของเซลล์ IMR-32 human neuroblastoma และเพิ่มการแสดงออกของ MAP2⁽¹⁷⁾ ในขณะที่มีการเจริญพัฒนาของเซลล์เพาะเลี้ยง ในขณะที่ Ryu JS. และคณะ พบว่าสารแกงลิโอไซด์ (Ganglioside) สามารถทำให้เกิดการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาทชนิด Human dental pulp-derived stem cells (hDPSCs) และเพิ่มการแสดงออกของ MAP2 ด้วย⁽¹⁸⁾

Growth Associated Protein 43 (GAP-43) จัดเป็น Presynaptic protein ซึ่งอยู่บริเวณด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ของแอกซอน และมีการแสดงออกที่สูงบริเวณ Growth cone ทั้งนี้มีบทบาทสำคัญในการส่งเสริมเจริญพัฒนาของแอกซอน การเชื่อมโยงระหว่างแอกซอน การเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และการยึดหยุ่นของเซลล์ประสาท และยังพบว่าเมื่อมีการพัฒนาของระบบประสาท และการฟื้นฟูของเซลล์ประสาทหลังจากการได้รับความเสียหายจะมีการแสดงออกของยีน และโปรตีน GAP-43 ที่สูงขึ้นกว่าปกติ จากการศึกษาของ Zheng และคณะ พบว่า Shenghui soup ซึ่งเป็นยาสมุนไพรโบราณของจีน สามารถส่งเสริมการงอกของนิวไรท์ รวมทั้งเพิ่มการแสดงออกของยีน และโปรตีนของ GAP-43 ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12⁽¹⁹⁾ ในขณะที่ Chia wei phan และคณะ พบว่าสาร Uridine และสารสกัดจาก *Pleurotus giganteus* สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 ในเซลล์เพาะเลี้ยง N2a ได้⁽³⁾

Teneurin จัดเป็น Type II transmembrane proteins สามารถแบ่งเป็น 4 รูปแบบ คือ Ten-1 ถึง Ten-4 ซึ่งพบได้ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง พบว่ามีการแสดงออกที่สูงในระบบประสาทส่วนกลาง และสามารถมีการแสดงออกได้ในเนื้อเยื่อทั่วไป เช่น Mesenchymal tissue เป็นต้น แต่พบว่ามีเฉพาะ Ten-4 ที่มีการแสดงออกใน White matter ของ Cerebellum ในหนูทดลอง อีกทั้งมีความเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อ ER stress และโรคโปลิโอในมนุษย์ จากการศึกษาของ Suzuki N. และคณะ ทั้งใน *In vitro* และ *In vivo* พบว่า Ten-4 เป็นตัวควบคุมของการเจริญพัฒนาของ Oligodendrocyte และการสร้างไมอีลินในระบบประสาทส่วนกลาง⁽²⁰⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าการ Knockdown ของ Ten-4 ในเซลล์เพาะเลี้ยง Neuro2a ส่งผลทำให้การสร้าง Filopodia-like protrusion และการงอกของนิวไรท์ลดลง ในทางกลับกันนั้นเมื่อทำการ Overexpression Ten-4 ก็ สามารถเพิ่มการสร้าง Filopodia-like protrusion เพิ่มสูงขึ้นด้วย ดังนั้น Ten-4 จึงเป็นตัวควบคุมในการสร้าง Filopodia-like protrusion และการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาท โดยผ่านวิถี Focal adhesion kinase (FAK)⁽⁸⁾

วิถีของ MAPK-ERK, PI3K/Akt และ PKC เป็นวิถีที่มีความเกี่ยวข้องข้องในการควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท และการงอกของนิวไรท์ ซึ่งประกอบด้วยการยึดตัว, ขนาด และการเกิดเดนไดรท์ และแอกซอนของใยประสาท สำหรับการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์โดยผ่านวิถี MAPK-ERK, PI3K/Akt และ PKC นั้นเริ่มจากเซลล์เพาะเลี้ยงได้รับสารกระตุ้นการงอกของเซลล์ประสาท (Neurotrophic factor) เช่น NGF โดย NGF จับกับตัวรับที่จำเพาะ Tyrosine kinase A (TrkA) ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีส่วนบนโดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) ต่อ MAPK-ERK, PI3K/Akt และ PKC ซึ่งการกระตุ้นวิถี MAPK-ERK และ PI3K/Akt ทำให้เกิดการกระตุ้นวิถีส่วนล่าง คือ mTOR (mammalian-target of rapamycin) เป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการ

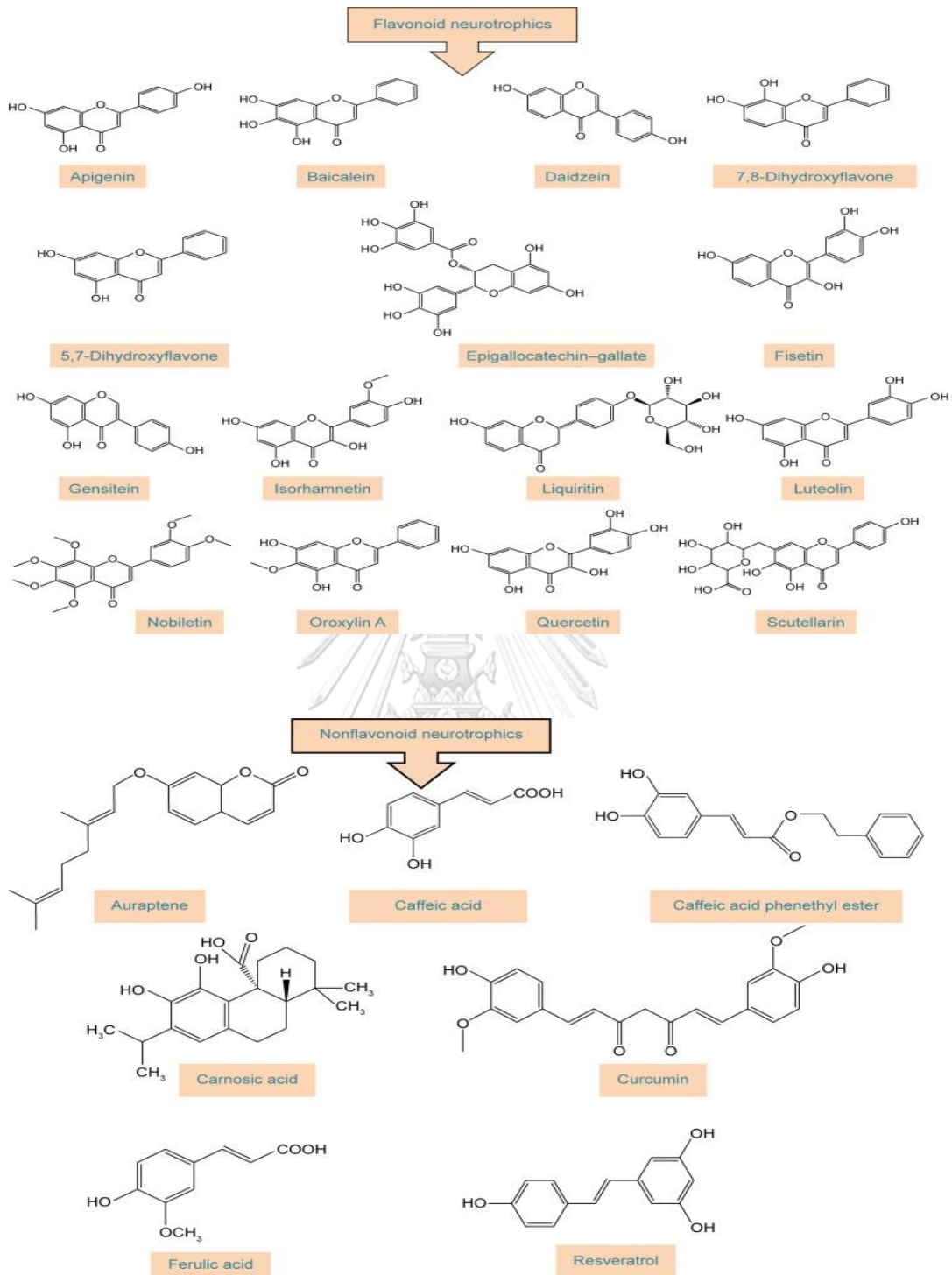
ควบคุมการเจริญเติบโต และความคงอยู่ชีวิตของเซลล์ อีกทั้งยังควบคุมการงอกของนิวโรไท์อีกด้วย ซึ่งพบว่าการยับยั้งการทำงานของโปรตีน mTOR ส่งผลต่อการสูญเสียความทรงจำ และความยืดหยุ่นของเซลล์ประสาท รวมทั้งการงอกของนิวโรไท์ก็ลดลงตามไปด้วย นอกจากนี้การกระตุ้นวิถี MAPK-ERK ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้น CREB ซึ่งเป็น Transcription factor มีบทบาทสำคัญในส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ ในขณะที่การกระตุ้นวิถี PKC โดย NGF ส่งผลทำให้เกิดการกระตุ้น Rac1 และ Cdc42 เกิดการงอกของนิวโรไท์ อีกทั้งยังพบว่าส่งผลทำให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน MAP-2 และ GAP-43 สูงขึ้น ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท และการงอกของนิวโรไท์เพื่อฟื้นฟูเซลล์ประสาทที่ได้รับความเสียหาย จากการศึกษาที่ผ่านมา Konstantin K. และคณะ พบว่าการยับยั้งวิถี PKCzeta และ PI3K/Akt สามารถลดการงอกของนิวโรไท์ได้ใน Postnatally born subventricular zone neuron ในขณะที่ Robert J. และคณะ พบว่าสาร Senegenin จากพืช *Polygala tenuifolia* สามารถเพิ่มการงอกของนิวโรไท์ และปกป้องการตายของเซลล์จากสภาวะความเป็นพิษของเซลล์ประสาทโดยแอมิโลยด์ เบต้า และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน GAP-43 และ MAP2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ในขณะที่ Yin-Zhong MA. และคณะ พบว่าสาร Claulansine F สามารถเพิ่มการงอกของนิวโรไท์ โดยกระตุ้นผ่านวิถี ERK และ Akt ส่งผลทำให้เพิ่มการแสดงออกของ GAP-43 ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 และจากการศึกษาของ Chia-Wei Phan และคณะ พบว่าสาร Uridine สามารถเพิ่มการงอกของนิวโรไท์โดยกระตุ้นผ่านวิถี MEK/ERK และ PI3K/Akt/mTOR อีกทั้งยังเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Neuro2a อีกทั้งยังพบว่าสาร Beta-hydroxy-beta-methylbutyrate สามารถเพิ่มการงอกของนิวโรไท์โดยกระตุ้นผ่านวิถี MAPK/ERK และ PI3K/Akt ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Neuro2a^(3, 5, 21-23)



ภาพที่ 7 กลไกของ NGF และวิธีที่เกี่ยวข้องในการควบคุมการงอกของนิวไรต์

2.5 กลุ่มสารที่สำคัญในการปกป้องเซลล์ประสาท

โพลีฟีนอล (Polyphenol) เป็นกลุ่มสารที่สำคัญ ซึ่งเป็นสารที่มีประโยชน์ในการป้องกัน และรักษาโรคความผิดปกติของระบบประสาท โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารโพลีฟีนอลมีผลต่อกระบวนการเจริญพัฒนา และคงอยู่ของรูปร่างเซลล์ประสาท สารโพลีฟีนอลสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ 1. กลุ่มสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoid) เช่น Baicalein, Daidzein, Luteolin เป็นต้น และ 2. กลุ่มที่ไม่ใช่สารฟลาโวนอยด์ (Non-flavonoid) เช่น Auraptene, Carnosic acid, Curcuminoids เป็นต้น โดยกลุ่มสารดังกล่าวนี้สามารถส่งเสริมการงอกของนิวไรท์ โดยกระตุ้นผ่านตัวรับของสาร NGF และ BDNF คือ Trk receptors รวมถึงกระตุ้นผ่านวิถี ERK และ PI3K/Akt ซึ่งเป็นวิถีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท และการงอกของนิวไรท์ จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า EGCG เป็นสารโพลีฟีนอลที่สามารถพบได้ในสารสกัดชาเขียว และ Curcuminoids จาก *Curcuma longa* Linn. สามารถส่งเสริมการมีชีวิตรอดจากสภาวะเป็นพิษ และส่งเสริมการงอกของนิวไรท์ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC-12 ได้ ในขณะที่สาร Isorhamnetin จาก *Ginkgo biloba* และ Resveratrol ที่พบได้ในองุ่น และไวน์แดงสามารถส่งเสริมกระตุ้นการทำงานของ NGF และ BDNF เกิดการสร้างนิวไรท์ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ได้^(24, 25)



ภาพที่ 8 โครงสร้างทางเคมีของสารกลุ่ม Flavonoids และ Non-flavonoids

ที่มา: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26730179> (Accessed on December 22, 2016)

ตารางที่ 1 สารออกฤทธิ์ที่สำคัญ (Bioactive compounds) และกลไกที่เกี่ยวข้องจากพืชสมุนไพรในการปกป้องเซลล์ประสาท

ชื่อสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ	แหล่งที่พบ	กลไกที่เกี่ยวข้อง	โมเดลที่ใช้ในการศึกษา	เอกสารอ้างอิง
1. Resveratrol	- <i>Veratrum grandiflorum</i> O. LOES - <i>Polygonum cuspidatum</i> - Grapes, berries, grains, tea	- กระตุ้นการสร้างนิวโรไทต์ โดยผ่านวิถี Shh signaling และเพิ่มการแสดงออกของ GAP43, Synaptophysin, Shh, Ptc-1, Smo, Gli-1 และ Sirt1 - กระตุ้นการหลั่งสาร GDNF และ BDNF จาก Rat primary astroglia	- Primary cortical neuron culture - Rat primary astroglia	(26), (27)
2. Curcumin	- <i>Curcuma longa</i>	- กระตุ้นการสร้างนิวโรไทต์ โดยผ่านวิถี MAPK/ERK, PKC, Reggie-1 อีกทั้งเพิ่ม การแสดงออกของ GAP-43 และ Neurofilament-L (NF-L) - เพิ่มการแสดงออกของยีน 5-HT (1A) และโปรตีน BDNF เพื่อปกป้องการตาย ของเซลล์ประสาทจากภาวะ เครียดเรื้อรัง	- PC12 - Rat hippocampal neurons - Primary cortical neuron culture	(28), (29), (30)
3. Baicalein	- <i>Scutellaria baicalensis</i>	- ป้องกันเซลล์ประสาทจาก สาร 6-OHDA เพิ่มการ ทำงานของเอนไซม์ Tyrosine hydroxylase	SH-SY5Y cells	(31)
4. Ginsenoside Rg1	- <i>Panax ginseng</i> - <i>Panax notoginseng</i>	- ป้องกันเซลล์ประสาทจาก สาร H ₂ O ₂ ซึ่งก่อให้เกิดการ เสียหายแก่เซลล์ประสาท โดยการลดการทำงานของ NF-KB signaling	- PC12 cells - Primary Schwann cell cultures - Neuro2a	(32), (33), (34)

		<ul style="list-style-type: none"> - กระตุ้นการแสดงออก และหลั่งสาร NGF and BDNF - กระตุ้นการสร้างนิวโรท์ และป้องกันความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทของ Amyloid beta โดยกระตุ้นผ่านวิถี Akt และ ERK - กระตุ้นการแสดงออกของ ยีน Choline acetyltransferase (ChAT) และ Vesicular acetylcholine transporter (VAcHT) 	cells	
5. Gastrodin	- <i>Gastrodia elata</i>	- เพิ่มการหลั่งของสาร BDNF และช่วยฟื้นฟูเซลล์ประสาทที่ได้รับความเสียหาย	Spinal cord of rat	(35)
6. Acteoside	- <i>Cistanche deserticola</i> - <i>Cistanche tubulosa</i>	- ป้องกันการตายของเซลล์จาก Amyloid beta-peptide โดยการลดการสร้าง ROS และควบคุมวิถีการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยผ่าน Bcl-2, Cytochrome c และ Caspase-3	SH-SY5Y cells	(36)
7. Paeoniflorin	- <i>Radix Paeoniae</i>	- ป้องกันการตายของเซลล์จาก Glutamate โดยการยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bad และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-xL	PC12 cells	(37)
8. Peurarin	- <i>Pueraria montana</i> var. <i>lobata</i>	- กระตุ้นการสร้างนิวโรท์ โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Dynein light chain 2	Rat hippocampal neurons	(38)

		(DLC2) และ Elongation factor 2 (EF2)		
9. Tenuigenin	- <i>Polygala tenuifolia</i>	- ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านการควบคุมโปรตีน Bcl-2 และยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน Caspase-3	Rat hippocampal neurons	(39)

2.6 สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

หมามูย (*Mucuna pruriens*) หรือ Cowhage จัดอยู่ในกลุ่ม Fabaceae ซึ่งพบว่ามีสายพันธุ์มากกว่า 80 สายพันธุ์ สามารถพบได้ในบริเวณเขตร้อน และใกล้เขตร้อน เช่น เอเชีย แอฟริกา และอเมริกา ซึ่งพบว่าหมามูยสายพันธุ์ไทยนั้นสามารถก่อให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนังได้ เนื่องจากฝักของหมามูยนั้นปกคลุมไปด้วยขน (Spicule) ซึ่งภายในมีสารที่ชื่อว่า Mucunain ซึ่งเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดอาการคันอย่างรุนแรง^(40, 41) แต่ในขณะที่หมามูยสายพันธุ์อินเดียนั้นไม่ก่อให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนัง ซึ่งพบว่าในแต่ละส่วนของต้นหมามูยนั้นมีประโยชน์ทางด้านเภสัชวิทยามากมาย เช่น ในส่วนของรากมีคุณสมบัติในการรักษาทางด้านการขับปัสสาวะ ในขณะที่ส่วนของกิ่งก้านใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน โรคเกาต์ โรครูมาติก และโรคมะเร็ง และในส่วนของเมล็ดนั้นมีคุณสมบัติมากมาย เช่น ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสันเนื่องจากภายในเมล็ดมีการสำคัญคือ L-dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นของโดปามีน ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท โรคซึมเศร้า ใช้ในการต้านพิษของงู ด้านสารอนุมูลอิสระ รวมทั้งช่วยในส่วนของระบบสืบพันธุ์ เช่น ช่วยเพิ่มปริมาณและการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม สารประกอบสำคัญที่สามารถพบได้ในหมามูย เช่น L-dopa, Beta -sitosterol, Gallic acid, Glutathione, Bufotenine, 5-Hydroxytryptamine (Serotonin), 6-Methoxyharman, Tryptamine, Linoleic acid, Oleic acid, Palmitic acid (n-Hexanoic acid), Stearic acid (Octadecanoic acid), 3-methoxy-1,1-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline, 3-methoxy-1,1-dimethyl-7,8-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline, indole-3-alkylamines-N, Ndimethyltryptamine, Squalene, Ascorbic acid และ 5-Hydroxytryptophane⁽⁴²⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมา Fung, S.Y. c และคณะ ทำการทดสอบฉีดพิษของงูกะปะเข้าสู่หนู ทดลอง และทำการรักษาด้วยสารสกัดจากเมล็ดหมามูยพบว่าสามารถต้านพิษของงูกะปะโดยผ่านกลไกทางภูมิคุ้มกัน ในขณะที่การศึกษาของ Kamla Kant Shukla และคณะ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามูยสามารถช่วยในระบบสืบพันธุ์โดยสามารถปรับปรุงระดับฮอร์โมน LH, Dopamine, Adrenaline, และ Noradrenaline และลดระดับของฮอร์โมน FSH และ PRL ในผู้ป่วยที่เป็นหมัน จากการศึกษาของ Yamini B. Tripathi และคณะ พบว่า

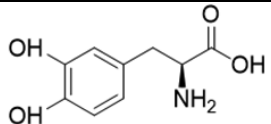
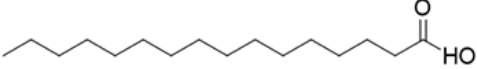
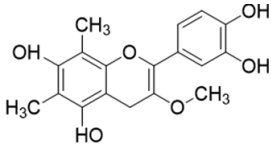
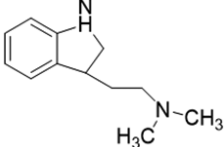
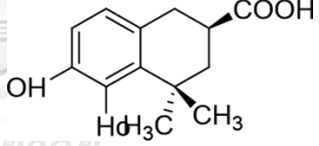
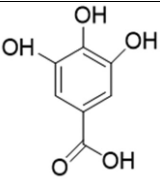
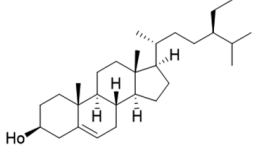
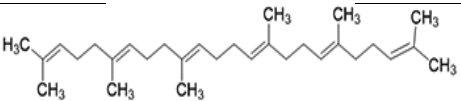
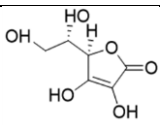
สารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ด้วยแอลกอฮอล์สามารถยับยั้งกระบวนการ Lipid peroxidation โดยกำจัด Superoxides และ Hydroxyl radical ในปฏิกิริยา Lipid peroxidation และการศึกษาของ Satyendra Kumar Yadav และคณะ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋สามารถลดความเป็นพิษของเซลล์ประสาทจากการรับยาปราบวัชพืชโดยลดสารอนุมูลอิสระใน Parkinsonian mouse⁽⁴³⁻⁴⁶⁾ จากการศึกษาของ Babita Singh และคณะ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากเมล็ดของหมามู๋สามารถส่งเสริมการแสดงออกของยีน Neurogenin ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท และเพิ่มการแสดงออกของยีน DCX ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของเซลล์ประสาทในระยะแรกเกิดในหนู Swiss albino เพศผู้⁽⁴⁷⁾

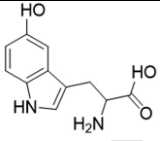
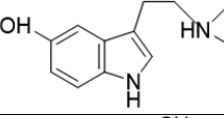
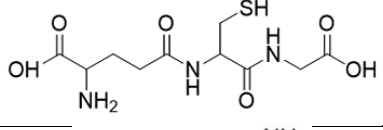
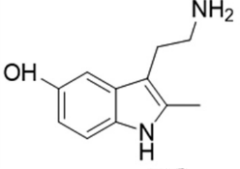
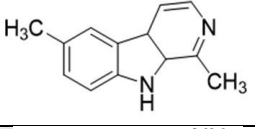
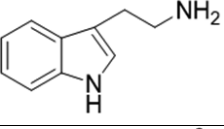
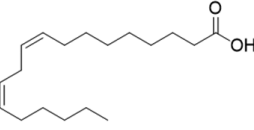


ภาพที่ 9 ลำต้น และฝักของหมามู๋ (*Mucuna pruriens*) ซึ่งบริเวณภายนอกฝักประกอบด้วยขนจำนวนมาก ซึ่งเมื่อสัมผัสก่อให้เกิดอาการคันบริเวณผิวหนัง

ที่มา: http://www.esanlink.com/news_variety_view.php?id_view=558 (Accessed on November 22, 2016)

ตารางที่ 2 สารประกอบที่สำคัญ และโครงสร้างของหมามู่ย (*Mucuna pruriens*)^(48, 49)

ชื่อสารประกอบที่สำคัญ	โครงสร้าง
1. L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)	
2. Palmitic acid (n-hexanoic acid)	
3. Stearic acid (octadecanoic acid)	$\text{H}_3\text{C}(\text{H}_2\text{C})_{15}\text{H}_2\text{C}\text{COOH}$
4. 3-methoxy-1,1-dimethyl-6,7-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline	
5. Indole-3-alkylamines-N,N-dimethyltryptamine	
6. 3-methoxy-1,1-dimethyl-7,8-dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroquinoline	
7. Gallic acid (3,4,5-trihydroxybenzoic acid)	
8. β -sitosterol	
9. Squalene	
10. Ascorbic acid	

11. 5-hydroxytryptophan	
12. Bufotenine	
13. Glutathione	
14. 5-hydroxytryptamine	
15. 6-methoxyharman	
16. Tryptamine	
17. Linoleic acid	

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารเคมี เครื่องมือ และอุปกรณ์ ที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 สารเคมี

1. Hexane	RCI Labscan, ไทย
2. Ethyl acetate	RCI Labscan, ไทย
3. Ethanol	RCI Labscan, ไทย
4. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
5. Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
6. Penicillin-Streptomycin Solution	Corning, สหรัฐอเมริกา
7. Nutrient mixture (F-12 HAM's (1x))	HyClone, สหรัฐอเมริกา
8. EDTA-Trypsin 0.25% (1X)	Gibthai, ไทย
9. Phosphate Buffered Saline	HyClone, สหรัฐอเมริกา
10. Trypan Blue Stain 0.4%	Gibthai, ไทย
11. Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Merk, เยอรมนี
12. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)	Bio basic Inc., แคนาดา
13. Quercetin	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
14. Potassium persulphate	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
15. Ascorbic acid	Calibiochem, สหรัฐอเมริกา
16. DPPH reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
17. ABTS reagent	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
18. Trizol RNA isolation reagent	Invitrogen, สหรัฐอเมริกา
19. 2-isopropanol	Merk, เยอรมันนี

20. Chloroform	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
21. เอนไซม์ DNase	Promega, สหรัฐอเมริกา
22. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas, แคนาดา
23. เอนไซม์ Reverse transcriptase	Fermentas, แคนาดา
24. ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase	Biolab, อังกฤษ
25. AccuPower 2X GreenStar	Bioneer, เกาหลี
26. Diethyl pirocarbonate (DEPC)	Sigma Aldrich, สหรัฐอเมริกา
27. FuGene	Promega, สหรัฐอเมริกา
3.1.2 เครื่องมือ	
1. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus, ญี่ปุ่น
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader Instrument, Inc.	BioTek, สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง NanoDrop 100	ThermoScientific, สหรัฐอเมริกา
4. กล้องจุลทรรศน์แบบ phase contrast	Olympus, ญี่ปุ่น
5. เครื่อง Soxhlet extractor	Merck, เยอรมันนี
6. เครื่อง Rotatory Evaporator รุ่น miVAC	Genevac, อังกฤษ
7. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOREDO, สวิสเซอร์แลนด์
8. เครื่อง Exicycler Real time Quantitative Thermal Block	Bioneer, เกาหลี
9. เครื่อง thermal cycler รุ่น Mastercycler EP	Eppendorf AG, เยอรมนี
10. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น Fine vortex	FINEPCR, เกาหลีใต้

11. เครื่อง Vacuum concentrator (DNA speedVacs)	Thermo Scientific สหรัฐอเมริกา
12. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific. เกาหลีใต้
13. เครื่อง Centrifuge	Beckman Coulter, สหรัฐอเมริกา
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath)	Memmert, เยอรมันนี
15. pH meter	Mettler Toledo, สวิสเซอร์แลนด์
16. ตู้สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด CO ₂	Sheldon, สหรัฐอเมริกา
17. ตู้อบ (Incubator)	Memmert, เยอรมันนี
18. ตู้อบ (Hot air oven)	Memmert, เยอรมันนี
19. Laminar flow cabinet	Labconco, สหรัฐอเมริกา
20. ถัง liquid nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON สหรัฐอเมริกา
21. ตู้เย็น 4°C	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Sharp, ญี่ปุ่น
22. ตู้แช่แข็ง -20°C	SANYO Electric Co., Ltd., เกาหลีใต้
23. ตู้แช่แข็ง -80°C	UShin Lab, เกาหลีใต้
3.1.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำวิจัย	
1. 96 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
2. 6 well cell culture plate	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
3. 60×15 mm Petri Dish	Corning Inc., สหรัฐอเมริกา
4. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 µL)	GILSON, ฝรั่งเศส

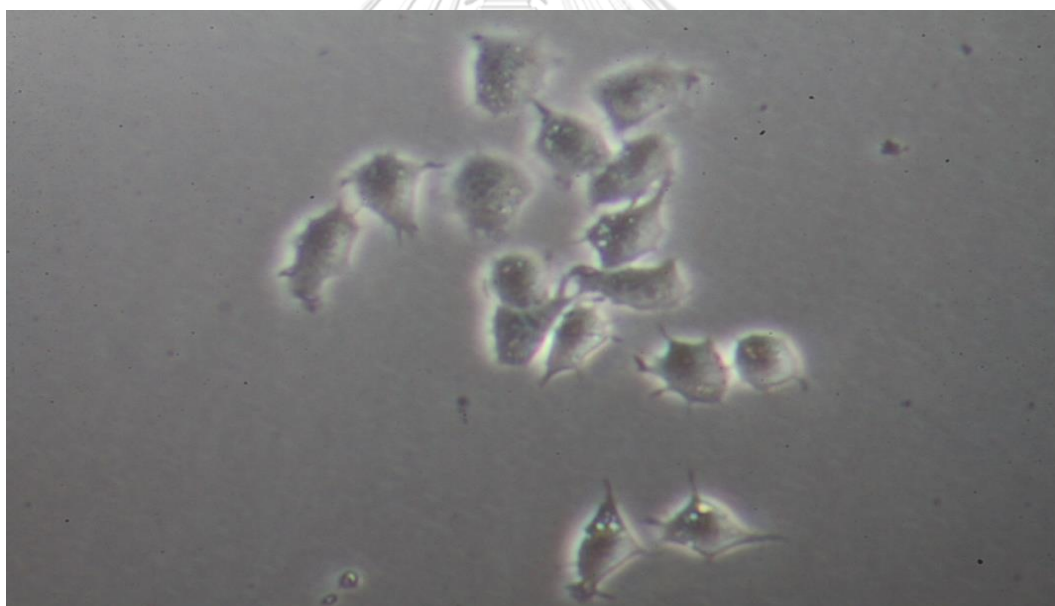
- | | |
|--|---|
| 5. Auto pipette (ขนาด 10, 20, 200, 1000 μ L) | Eppendorf AG, เยอรมนี |
| 6. Cell culture flask (ขนาด 25 cm ²) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| 7. Pipette aid รุ่น Portable XP | Drummond Scientific,
สหรัฐอเมริกา |
| 8. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 μ L) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| 9. Disposable serological pipette (5 และ 10 mL) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| 10. Centrifuge tube (ขนาด 15 และ 50 mL) | Corning Inc., สหรัฐอเมริกา |
| 11. Microcentrifuge tube
(ขนาด 0.5 mL และ 1.5 mL) | Continental Lab Products,
สหรัฐอเมริกา |
| 12. Multichannel pipette | Eppendorf AG, เยอรมนี |
| 13. Pasture pipette | Copan Innovation,
สหรัฐอเมริกา |



3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

สำหรับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ คือ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a เป็นเซลล์ Mouse neuroblastoma อนุพันธ์จาก Mouse C1300 tumor ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อบริเวณสมอง สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทได้ นิยมใช้ในการศึกษาสารเคมีต่างๆที่มีผลต่อการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท (Neuronal proliferation and differentiation) รวมทั้งการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และโรคความผิดปกติของระบบประสาท ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr. Ciro Isidoro from Università del Piemonte Orientale, Italy โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) High glucose ที่มี 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) พร้อมด้วย F-12 HAM's และ Penicillin 100 U และ Streptomycin 100 µg/mL บ่มเพาะเลี้ยงไว้ในตู้ Incubator ที่สภาวะ 37°C และที่มี CO₂ ปริมาณ 5%



ภาพที่ 10 เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a (Mouse neuroblastoma) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบ Phase contrast ด้วยกำลังขยาย 10X

3.2.2 ตัวอย่างพืชสมุนไพร

สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ใช้ตัวอย่างพืชสมุนไพร 2 ชนิด ประกอบด้วย เมล็ดหมามู๋ไทย และเมล็ดหมามู๋อินเดีย ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง และทำการพิสูจน์อัตลักษณ์ของพืชสมุนไพรโดย ศ. กสิน สุวะตะพันธ์ุ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 11 ส่วนของเมล็ดหมามู๋ไทย (*Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. *pruriens*) ซึ่งเมล็ดของหมามู๋ไทยนั้นมีสีดำ ขนาดเล็ก



ภาพที่ 12 ส่วนของเมล็ดหมามู๋อินเดีย (*Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. *utilis* (Wall. Ex Wight) L. H. Bailey) ซึ่งเมล็ดของหมามู๋อินเดียมีลักษณะสีขาว

3.3 ระเบียบวิธีวิจัย

3.3.1 การสกัดตัวอย่างเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียโดยวิธี Soxhlet extraction

Soxhlet extraction เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยให้ความร้อนจนตัวทำละลายระเหยกลายเป็นไอขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุตัวอย่างไว้ เมื่อสารที่สกัดได้สูงถึงระดับกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงมาใน Flask วนเวียนเช่นนี้จนกระบวนการสกัดเสร็จสมบูรณ์ โดยสังเกตจากความใสของสีตัวทำละลายสำหรับตัวทำละลายที่ใช้ศึกษาวิจัย ประกอบด้วย เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล

เริ่มจากนำเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียมาทำความสะอาดด้วยน้ำเปล่าให้สะอาดประมาณ 3 ครั้ง จากนั้นนำไปตากลมทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 2-3 วัน เมื่อแห้งสนิทแล้วนำเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียมาทำการบดละเอียดด้วยเครื่องบด แล้วทำการเก็บไว้ในถุงพลาสติก เมื่อต้องการสกัดสมุนไพรมานำสมุนไพรมานำมาบดละเอียดเรียบร้อยแล้ว นำมาชั่งในปริมาณ 40 กรัมใส่ลงใน Cellulose Extraction Thimbles จากนั้นนำไปใส่ใน Thimble ของเครื่อง Soxhlet extractor พร้อมกับตัวทำละลายใส่ลงใน Boiling Flask ปริมาตร 400 mL โดยอัตราส่วนของสมุนไพรมต่อตัวทำละลายเท่ากับ 1:10 จากนั้นใส่เศษกระเบื้อง 2-3 ชิ้นลงใน Boiling flask เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวทำละลายเดือดเกินไปจนทำให้ Flask แตกเสียหาย โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่มีขั้วที่ต่ำไปยังตัวทำละลายที่มีขั้วที่สูง ตัวทำละลายตัวที่ 1 คือ เฮกเซน เติมน้ำลงใน Boiling flask และให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายที่อยู่ใน Boiling flask จนถึงจุดเดือด เมื่อตัวทำละลายเดือดแล้วจะระเหยขึ้นไปกระทบกับ Condenser ที่หล่อเย็นไว้จนทำให้เกิดการควบแน่นกลับลงมาสัมผัสกับผงสมุนไพรมที่อยู่ใน Cellulose extraction thimbles โดยตัวทำละลายจะชะสารจากสกัดสมุนไพรมผ่านลงมาทาง Siphon ไหลลงสู่ Boiling flask ส่วนตัวทำละลายจะเกิดการระเหยขึ้นไปแล้วควบแน่นกลับลงมายัง Cellulose extraction thimbles อีกครั้ง เกิดขึ้นซ้ำหลายรอบ จนกระทั่งตัวทำละลายที่ผ่านบริเวณ Siphon ใสไม่มีสี ซึ่งใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงต่อ 1 ตัวทำละลาย จากนั้นจึงเปลี่ยนตัวทำละลายเป็นตัวทำละลายตัวที่ 2 คือ เอทิล อะซิเตท และตัวทำละลายตัวที่ 3 คือ เอทานอล ตามลำดับ แล้วทำซ้ำตามกระบวนการข้างต้น เมื่อทำการสกัดเสร็จสิ้นเก็บสารสกัดทั้งหมดที่ได้แยกตามชนิดและตัวทำละลายใส่ในขวดดูแรนซึ่งทำการห่อกระดาษไว้ เพื่อกันให้พ้นจากแสง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง Rotatory evaporator สำหรับการ Evaporation คือ การระเหยสารที่เป็นของเหลว หรือตัวทำละลายออกจากสารสกัดที่ใช้ศึกษาวิจัย ทำให้สารสกัดนั้นมีความเข้มข้นมากขึ้น



ภาพที่ 13 เครื่อง Soxhlet extractor ซึ่งเป็นการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยให้ความร้อนแก่ตัวทำละลาย เมื่อถึงจุดเดือดจะเกิดการระเหย แล้วไปควบแน่นบริเวณ Condenser เป็นหยดน้ำตกลงมาใน Thimbles ซึ่งบรรจุสมุนไพรมันที่บดแล้ว โดยเกิดการสกัดแบบต่อเนื่องจนการสกัดเสร็จสมบูรณ์



ภาพที่ 14 เครื่อง Evaporator เป็นเครื่องที่ใช้ในการระเหยตัวทำละลายออกจากสารสกัด โดยให้ความร้อนกับสารที่สกัดได้จากเครื่อง Soxhlet extractor สุดท้ายได้สารสกัดหยาบที่เข้มข้น

เมื่อสารสกัดทำการระเหยตัวทำละลายจนแห้ง และสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น นำสารสกัดที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณสารที่ได้ (%Yield) สามารถคำนวณได้จากสูตร

$$\%Yield = (\text{ผลที่ได้จริง} / \text{ผลที่ได้ตามทฤษฎี}) \times 100$$

ผลที่ได้จริง = ผลรวมของน้ำหนักสุทธิของสารที่สกัดได้ทั้งหมด

ผลที่ได้ตามทฤษฎี = ปริมาณสมุนไพรที่ใช้ในการสกัด (ในที่นี้เท่ากับ 40 กรัม)

จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ละลายใน 100%DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของ Stock เป็น 100 mg/mL เมื่อละลายเสร็จแล้วนำสารสกัดหยาบที่ได้กรองผ่าน Filter ขนาด 0.2 ไมครอนลงใน Microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C ก่อนนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู๋ไทย และเมล็ดหมามู๋อินเดีย

3.3.2.1 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู๋ไทย และเมล็ดหมามู๋อินเดียโดยวิธี Folin-Ciocalteu method

การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดสมุนไพรซึ่งอ้างอิงจากวิธีของ Chang *et al.* สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดทำปฏิกิริยากับ Folin-Ciocalteu reagent ซึ่งประกอบด้วย Phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents สารดังกล่าวจะถูกรีดิวซ์โดย Phenolic hydroxyl groups ของสารประกอบ Phenolic ทั้งหมดเกิดเป็น Tungsten และ Molybdenum blue ในสถานะที่เป็นต่างให้สารประกอบเชิงซ้อนสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 nm

เตรียมสารละลายกรดแกลลิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 µg/mL เตรียมสารละลายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 10 mg/mL โดยชั่งกรดแกลลิก 100 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร พร้อมกับเตรียมสารละลาย Sodium carbonate (Na₂CO₃) ที่ความเข้มข้น 1 โมลาร์ โดยชั่ง Na₂CO₃ จำนวน 10.59885 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเตรียม 10% ของ Folin-Ciocalteu Phenol reagent เตรียมจาก Folin-Ciocalteu Phenol reagent ที่ความเข้มข้น 100% ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นด้วยปริมาตร 18 มิลลิลิตร ทำการผสมให้เข้ากัน จากนั้นเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยเตรียมจากดูดสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียที่ความเข้มข้น 100 mg/mL

ปริมาตร 10 μL ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 990 μL ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วทำการทดสอบตามวิธีของ Folin-Ciocalteu colorimetric⁽⁵⁰⁾ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (μL)	Standard (μL)	Sample blank (μL)	Sample (μL)
สารสกัดหยาบสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐานกรดแกลลิก	-	50	-	-
น้ำกลั่น	50	-	50	-
สารละลาย 10% Folin-Ciocalteu Phenol reagent	50	50	-	50
สารละลาย 1 โมลาร์ Na_2CO_3	50	50	50	50
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งปราศจากแสงเป็นเวลา 60 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดหยาบสมุนไพรที่เทียบกับ Blank ที่ 750 nm				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ Blank แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกรดแกลลิกซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาบจากสมุนไพรแห้ง 1 กรัม (mg GAE/g dry weight sample)

3.3.2.2 การทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู่ไทย และเมล็ดหมามู่อินเดียโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric method

การหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบสมุนไพร โดยทำปฏิกิริยากับ Aluminium Chloride เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน (Complex flavonoid-aluminum) ที่มีสีเหลือง และดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 nm

เตรียมสารละลายมาตรฐาน Quercitin ที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ โดยเริ่มจากชั่ง Quercitin 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 80% ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเตรียม Aluminium chloride ที่ความเข้มข้น 10% โดยชั่ง Aluminium chloride 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเตรียม Sodium acetate (CH_3COONa) ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยชั่ง Sodium acetate 3.28 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และจากนั้นเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาดที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยเตรียมจากดูดสารสกัดหยาดจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียที่ความเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 10 μL ผสมกับสารละลาย 80% เอทานอลปริมาตร 990 μL ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทดสอบ⁽⁵⁰⁾ ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ขั้นตอนการเตรียมสารเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

Reagent	Reagent blank (μL)	Standard (μL)	Sample blank (μL)	Sample (μL)
สารสกัดหยาดสมุนไพร	-	-	50	50
สารละลายมาตรฐาน Quercitin	-	50	-	-
สารละลาย 10% AlCl_3	10	10	-	10
80% เอทานอล	50		10	
90% เอทานอล	150	150	150	150
สารละลาย 1 โมลาร์ CH_3COONa	10	10	10	10
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งปราศจากแสงเป็นเวลา 40 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายมาตรฐาน และสารสกัดหยาดสมุนไพรที่เทียบกับ blank ที่ 415 nm				

จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวัดไปหักกับค่าของ Blank แล้วนำไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลาย Quercitin ซึ่งแสดงค่าเป็นหน่วยมิลลิกรัมสมมูลของกรดแกลลิกต่อสารสกัดหยาดจากสมุนไพรแห้ง 1 กรัม ($\text{mg QE/g dry weight sample}$)

3.3.3 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดีย

3.3.3.1 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยวิธี DPPH assay

DPPH หรือ 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl เป็นสารอนุมูลอิสระ (free radical) สามารถรับ Electron หรือ Hydrogen radical ได้ ซึ่งเมื่อ DPPH อยู่ในรูปสารละลายใน Absolute ethanol จะมีสีม่วง และเมื่อทำปฏิกิริยากับสารที่มีฤทธิ์ Antioxidant จะทำให้มีสีจางลง โดยใช้ Ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm



RH = สารที่มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ

โดยเริ่มจากเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เตรียมโดยการชั่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเมทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเตรียม DPPH ที่ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยทำการชั่ง DPPH ปริมาณ 4.929 กรัม ละลายในสารละลาย 100% เมทานอล ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.7 ± 0.2 และเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยเตรียมจากคุดสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียที่ความเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 10 μL ผสมกับสารละลายเมทานอลปริมาตร 990 μL ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทดสอบ⁽⁵⁰⁾ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัตถุประสงค์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH assay

Reagent	Control (μ L)	Standard blank (μ L)	Standard (μ L)	Sample blank (μ L)	Sample (μ L)
สารสกัดสมุนไพร	-	-	-	20	20
สารละลาย มาตรฐาน L- ascorbic acid	-	20	20	-	-
สารละลาย DPPH	180	-	180	-	180
สารละลาย 100% เมทานอล	20	180	-	180	-
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งปราศจากแสงเป็นเวลา 30 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 517 nm					

นำค่าที่ได้จากการวัดนั้นคำนวณหาค่า %Radical scavenging activity โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร $\% \text{Radical scavenging activity} = 100 \times [\text{Absorbance control} - (\text{Absorbance sample} - \text{Absorbance blank})] / \text{Absorbance control}$ นำค่า %Radical scavenging activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก ซึ่งแสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพร 1 กรัม (mg VitaminC Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

3.3.3.2 การทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยวิธี ABTS assay

สาร ABTS จะถูกเปลี่ยนเป็น Ion radical ด้วยการเติมโพแทสเซียมเปอร์ซัลเฟต $ABTS^{*+}$ นี้เป็นสีน้ำเงิน และดูดกลืนแสงที่ 734 nm $ABTS^{*+}$ เมื่อทำปฏิกิริยาต่อสารต้านอนุมูลอิสระ $ABTS^{*+}$ ที่มีสีน้ำเงินจะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นรูปที่ไม่มีสี ซึ่งใช้ Ascorbic acid เป็นสารละลายมาตรฐาน เริ่มจากเตรียมสารละลายกรดแอสคอร์บิกที่ความเข้มข้น 6.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ เตรียมโดยการชั่งกรดแอสคอร์บิก 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเมทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเตรียม ABTS ที่ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร โดยทำการชั่ง ABTS 144 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร และเตรียม Potassium persulfate 33.1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการผสมสารละลายระหว่าง ABTS และ Potassium persulfate ในอัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บไว้ในที่มืดเป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4°C จะได้สาร $ABTS^{*+}$ จากนั้นทำการเจือจางด้วยสารละลายเอทานอลด้วยอัตราส่วนของ $ABTS^{*+}$ 5 mL ละลายใน 100% เอทานอล ปริมาตร 100 mL และควรมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.2 และเตรียมสารละลายจากสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 1 mg/mL โดยเตรียมจากดูดสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียที่ความเข้มข้น 100 mg/mL ปริมาตร 10 μL ผสมกับสารละลายเอทานอลปริมาตร 990 μL ทำการผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทดสอบ⁽⁵⁰⁾ ดังตารางที่ 6

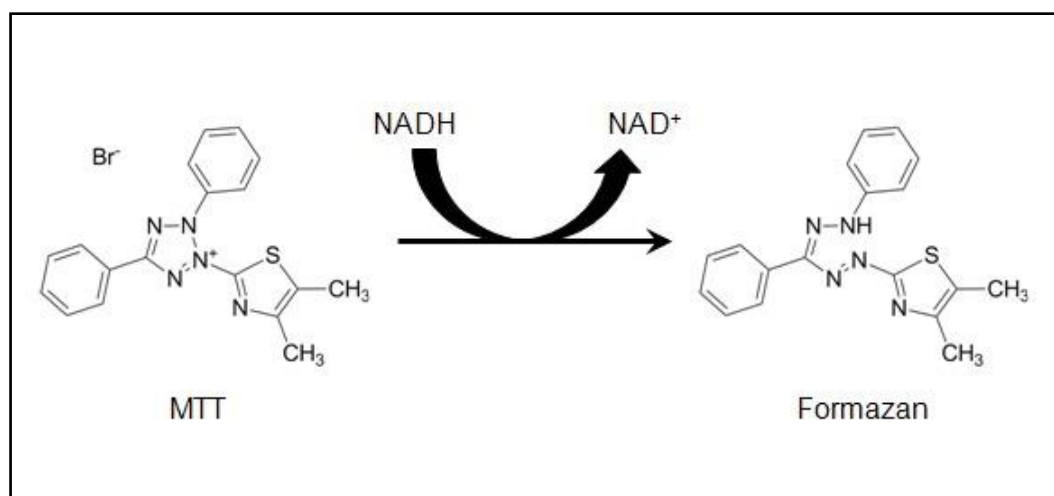
ตารางที่ 6 ขั้นตอนการเติมสารเพื่อวัดฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS assay

Reagent	Control (μ L)	Standard blank (μ L)	Standard (μ L)	Sample blank (μ L)	Sample (μ L)
สารสกัดสมุนไพรร	-	-	-	20	20
สารละลาย มาตรฐาน L- ascorbic acid	-	20	20	-	-
สารละลาย ABTS ^{•+} working reagent	180	-	180	-	180
สารละลาย 100% เมทานอล	20	180	-	180	-
ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องซึ่งปราศจากแสงเป็นเวลา 45 นาที แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 nm					

นำค่าที่ได้จากการวัดนั้นคำนวณหาค่า %Radical scavenging activity โดยสามารถคำนวณได้จากสูตร %Radical scavenging activity = $100 \times [\text{Absorbance control} - (\text{Absorbance sample} - \text{Absorbance blank})] / \text{Absorbance control}$ นำค่า %Radical scavenging activity ของสารสกัดหยาบสมุนไพรรไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแอสคอร์บิก ซึ่งแสดงผลเป็นค่า มิลลิกรัมสมมูลของกรดแอสคอร์บิกต่อสมุนไพรร 1 กรัม (mg Vitamin C Equivalent Antioxidant Capacity (VCEAC)/g dry weight sample)

3.3.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดีย ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT assay

สำหรับหลักการของวิธี MTT เป็นการวัด Metabolic activity ของไมโทคอนเดรียภายในเซลล์ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ Mitochondrial reductase สามารถรีดิวซ์เปลี่ยนสาร MTT ซึ่งมีสีเหลืองให้กลายเป็นตะกอนสีม่วงของ Formazan และสามารถละลายตะกอน Formazan ด้วย DMSO จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm โดยมีขั้นตอนการทดสอบดังนี้



ภาพที่ 15 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีเอนไซม์ Mitochondria reductase เปลี่ยนสาร MTT ซึ่งมีสีเหลือง เป็นสาร Formazan ตะกอนสีม่วง ซึ่งความเข้มของสีตะกอนจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต⁽⁵¹⁾

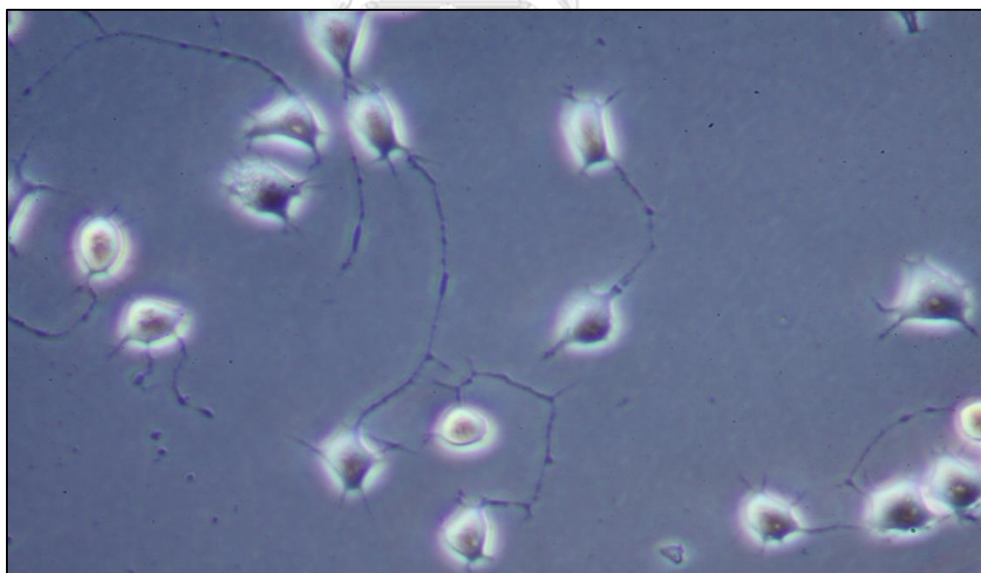
โดยเริ่มจากการหว่านเซลล์ N2a ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 96 หลุม โดยแต่ละหลุมนั้นมีเซลล์จำนวน 5,000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นนำเซลล์ไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเซลล์มาทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625 µg/mL หลุมละ 25 µL แล้วนำไปทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยปริมาตรสุดท้ายต่อหลุมเท่ากับ 200 µL ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น Control cells (Untreated), DMSO 0.1%, Blank และสารสกัดสมุนไพร เมื่อครบเวลานำมาหยอดด้วยน้ำยา MTT ความเข้มข้น 5 mg/mL ที่ละลายใน PBS หลุมละ 20 µL และทำการบ่มในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นทำการละลายตะกอนด้วยสารละลาย 100% Dimethyl sulfoxide (DMSO) หลุมละ 100 µL แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA plate reader ที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร พร้อมกับ

คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (%Cell viability) โดยสามารถคำนวณ %Cell viability ได้จากสูตร

$$\%Cell\ viability = \frac{(Treated\ cell - Blank)}{(Untreated\ cell - Blank)} \times 100$$

3.3.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี Neurite outgrowth assay

Neurite outgrowth assay เป็นการศึกษา Cell differentiation โดยทำการวัดความยาวเซลล์ประสาท (Neurite length) และนับจำนวนเซลล์ซึ่งมีความยาวของนิวไรท์งอกยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (Neurite-bearing cell) โดยใช้โปรแกรม ImageJ ซึ่งการทดสอบนี้ศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียต่อการเพิ่มความยาวของเซลล์ที่มีนิวไรท์ (Neurite length) และเซลล์ที่สามารถสร้างนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) ได้ ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a



ภาพที่ 16 การเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า

โดยเริ่มจากนำเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a หว่านลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm² จำนวน 15,000 เซลล์ต่อจาน จากนั้นทำการบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งทำการเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS เมื่อครบกำหนดเวลานำเซลล์มาทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอลความเข้มข้นมากที่สุดที่สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท เช่น ความเข้มข้น 12.5 µg/mL สามารถเตรียมได้จากดูดผสมุนไพรปริมาตร 1.25 µL ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 1%FBS ปริมาตร 1,000 µL จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 1%FBS ปริมาตร 2,500 µL ใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 mL แล้วดูดทิ้งปริมาตร 250 µL แล้วทำการเติมสารสกัดผสมุนไพรที่ทำการเจือจางไว้ข้างต้นปริมาณ 250 µL นำเซลล์ที่ทำการบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์มาทำการล้างด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 1,000 µL จำนวน 1 ครั้ง แกว่งไปมาเล็กน้อย แล้วทำการดูด PBS ทิ้งให้หมด จากนั้นทำการเติมสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียที่ทำการเจือจางไว้ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL ปริมาตร 2,000 µL ทำการแกว่งไปมาเล็กน้อย จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 10%FBS และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 1%FBS เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ และกลุ่มควบคุมทางบวก ตามลำดับ เมื่อครบกำหนดนำเซลล์มาทำการถ่ายรูปด้วยกล้อง Phase contrast ที่ติดด้วยกล้องถ่ายรูปรุ่น Canon EOS 50D ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า ซึ่งทำการถ่ายรูปประมาณ 100-200 เซลล์ต่อ 1 ตัวอย่าง จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผล แบ่งออกเป็นวัดความยาวเซลล์ประสาท (Neurite length) และนับจำนวนเซลล์ซึ่งมีความยาวของนิวไรท์งอกยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (Neurite-bearing cell) โดยใช้โปรแกรม ImageJ แล้วทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยความยาวเซลล์ประสาท (Mean neurite length) และร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีการงอกของนิวไรท์ยาวกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (%Neurite-bearing cell) ได้จากสูตรดังนี้

$$\% \text{Neurite-bearing cell} = \frac{\text{Neurite count}}{\text{Total neurite}} \times 100$$

โดย Calibration ruler 10 ช่อง มีความยาวเท่ากับ 100 μm สมมติจากการวัดด้วยโปรแกรม ImageJ ความยาวของทั้ง 10 ช่อง มีค่าเท่ากับ 1324 Pixels เพราะนั้น 1 μm มีความยาวเท่ากับ $1324/100 = 13.24 \text{ Pixels}/\mu\text{m}$ ดังนั้น

$$\text{Mean neurite length } (\mu\text{m}) = \frac{\text{Mean length (pixels)}}{13.24 \text{ pixels}/\mu\text{m}}$$

3.3.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียต่อการแสดงออกของระดับ mRNA ของยีน Ten-4 และ GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี Real-Time PCR

3.3.6.1 การสกัด Total RNA จากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยน้ำยา TRIzol

โดยเริ่มจากนำเซลล์ Neuro2a มาเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 6 หลุม หลุมละประมาณ 9×10^5 เซลล์ จากนั้นนำไปบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี $5\% \text{CO}_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำเซลล์มาทำการทดสอบกับสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และความเข้มข้นมากที่สุดที่สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท จากนั้นทำการบ่มไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี $5\% \text{CO}_2$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์มาสกัด RNA (Total RNA) ด้วยน้ำยา TRIzol

เมื่อครบเวลาแล้วนำเซลล์มาทำการกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเลี้ยงเซลล์ แล้วทำการล้างเซลล์ด้วย 1X Phosphate Buffer Saline (PBS) 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำการเติมน้ำยา TRIzol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทั้งไว้ประมาณ 15 นาที เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตต์ดูดผสมขึ้นลงแล้วนำสารทั้งหมดใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอโรฟอร์มที่เย็นลงไป 200 μL เขย่าด้วย Vortex ประมาณ 20 วินาที นำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C สารทั้งหมดจะแยกชั้นออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนใสบนสุดเป็นชั้นของ RNA ชั้นตรงกลางเป็นส่วนของ DNA และชั้นล่างสุดเป็นส่วนของโปรตีนและไขมัน ดูดส่วนใสด้านบนที่เป็น RNA แยกออกมา ปริมาณประมาณ 400 μL ใส่ใน Microcentrifuge tube ขนาด 1.5 mL หลอดใหม่ แล้วเติม 100% Isopropanol ที่เย็นลงไปในอัตราส่วน 1:1 กับส่วนใสที่ดูดแยกออกมาได้ แล้วทำการเขย่าด้วย Vortex แล้วนำไปแช่ไว้ที่ -20°C เป็นเวลา 20 นาที เมื่อครบเวลานำไปปั่นตกตะกอนที่ 12,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อตกตะกอน RNA ตกตะกอน RNA จะอยู่ที่ก้นหลอด ล้างตะกอน RNA ด้วย 75% ethanol ที่ละลายในน้ำ DEPC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้ว Mix ขึ้นลงแบบ Inverse แล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำประมาณ 3 ครั้งเมื่อล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ให้เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนไปตากไว้ไว้ประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง เพื่อให้ตะกอน RNA แห้งสนิท (ระหว่างนี้น้ำ DEPC ไปอุ่นที่อุณหภูมิ

65°C) นำตะกอน RNA ไป Speed vac ที่ความเร็วต่ำ ประมาณ 5 นาที เพื่อกำจัดสารจำพวก แอลกอฮอล์ที่อาจจะปนเปื้อนมาได้จากขั้นตอนการสกัด แล้วจึงละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC (ที่นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 65°C) ปริมาตร 20 μL ตีตกันหลอดเพื่อให้ตะกอน RNA ละลายในน้ำ DEPC จากนั้นนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วย เครื่อง Nanodrop จากนั้นเก็บ RNA ที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ก่อนนำไปใช้ต่อไป

3.3.6.2 การเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วยเอนไซม์ Reverse-transcriptase

โดยเริ่มจากการปรับปริมาตรของ RNA ที่สกัดได้ โดยใช้ Oligo-dT ปริมาตร 1 μL ในขณะที่ปริมาณ RNA นั้นขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง และน้ำ DEPC เติมให้ครบปริมาตร 20 μL ใส่ลงในน้ำยา AccuPower[®] RT Premix จากนั้นนำไป Pre-extension ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 5 นาที 1 รอบ, Extension ที่อุณหภูมิ 60°C นาน 60 นาที 1 รอบ และ Inactivation ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 นาที 1 รอบ จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาเป็นแม่แบบในการทำ Real-time PCR

3.3.6.3 การทำ Real-time PCR

เมื่อได้ cDNA ซึ่งเป็นแม่แบบในการทำ Real-time PCR แล้วนำมาทำ Real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาของ AccuPower 2X GreenStar ซึ่งใช้หลักการของสี Syber green โดยเข้าจับ DNA สายคู่ที่ตำแหน่ง Minor groove โดยสัดส่วนของสารในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR แสดงใน ตารางที่ 7 และ Primer ที่ใช้ทั้งหมดแสดงในตารางที่ 8 ดังต่อไปนี้

ตารางที่ 7 สัดส่วนของสารเคมีในการทำปฏิกิริยา Real-time PCR

สารเคมี	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกิริยา (μL)
2X Greenstar Master mix	6.25
10pmole-F-primer	0.5
10pmole-R-primer	0.5
cDNA template	1
DEPC	4.25
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 12.5 μL	

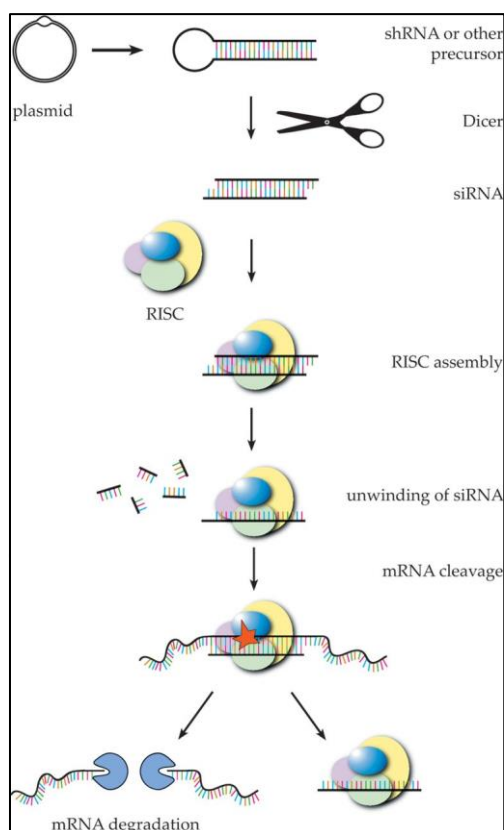
ตารางที่ 8 ลำดับเบสของไพรเมอร์ (Primer) ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง
GAP-43 Forward	5'-GAGGGAGATGGCTCTGCTAC-3'	(52)
GAP-43 Reverse	5'-CACATCGGCTTGTTTAGGC-3'	(52)
Ten-4 Forward	5'-GTGGACAAGTTTGGGCTCATTTAC-3'	(8)
Ten-4 Reverse	5'-GGGTTGATGGCTAAGTCTGTGG-3'	(8)
β -actin Forward	5'-GTTGACATCCGTAAGACC-3'	-
β -actin Reverse	5'-TGAAGGTGGACAGTGAG-3'	-

เมื่อผสมสารทั้งหมดในปฏิกิริยาแล้ว นำไปเข้าเครื่อง Bioneer Exicycler™ 96 ทำปฏิกิริยาในขั้น Pre-Denaturation ที่ 95°C 10 นาที, Denaturation 95°C 15 นาที, Annealing 62°C 15 วินาที, Extension 72°C 30 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 45 รอบ จากนั้นนำค่า Ct ของยีนทั้งหมดมา Normalize กับ β -actin และคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนในรูปแบบจำนวนเท่าโดยใช้สูตร $2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.3.7 การทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี siRNA

siRNA เป็น Double-stranded RNA หรือ Silencing RNA หลักการของเทคนิคนี้เริ่มจาก Long double-stranded RNA ถูกตัดโดยเอนไซม์ที่จำเพาะ Ribonuclease (RNase) III-like enzyme หรือ Dicer ในไซโทพลาซึม ไปเป็น Double-stranded RNA ขนาดเล็ก หรือที่เรียกว่า siRNA โดยมี 21–23 นิวคลีโอไทด์ที่มี 3' two-nucleotide overhangs จากนั้น siRNA ทำการจับและกระตุ้นการทำงานของ RNA-induced silencing complex (RISC) ซึ่งมีส่วนประกอบที่สำคัญในการตัด Sense strand ของ siRNA คือ Endonuclease argonaute 2 (AGO2) ในขณะที่ Antisense strand จะนำพา Active RISC ไปยัง mRNA เป้าหมาย และถูกตัดโดย AGO2 ส่งผลทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนอย่างจำเพาะ โดย siRNA กับ RNA เป้าหมายจะจับกันแบบ Fully complementary หรืออาจเรียกว่าการ Knockdown ยีนในระดับ Post-transcription (53, 54)



ภาพที่ 17 กลไกการทำงานของวิธี siRNA ในการ Knockdown ยีน⁽⁵⁵⁾

สำหรับขั้นตอนการเตรียมน้ำยา RNA oligonucleotides โดยทำการ Annealing siRNA-Ten-4 เริ่มจากทำการละลาย RNA oligonucleotides ในน้ำ RNase free ซึ่งมีความเข้มข้น 100 μM แล้วทำการเจือจาง RNA oligonucleotides โดยใช้ Annealing buffer โดยความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 μM (ประกอบด้วย 30 μL ของ siRNA และ 30 μL ของ annealing buffer) จากนั้นทำการรวมของทั้ง 2 ของ RNA oligonucleotides โดยให้ความเข้มข้นของ siRNA duplex เท่ากับ 20 μM จากนั้นทำการบ่มสารละลายที่อุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 1 นาที และทำการลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลาประมาณ 45 นาที แล้วทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำไปใช้ต่อไป

โดยขั้นตอนการทดสอบเริ่มจากทำการหว่านเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm^2 จำนวน 500,000 เซลล์ต่อจาน แล้วทำการบ่มไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการ Transfect เซลล์ด้วย siRNA-Ten-4 หรือ siRNA-Cont. โดยใช้น้ำยา FuGene (อัตราส่วนของน้ำยา FuGene ต่อ dsRNA เท่ากับ 6:2 ประกอบด้วย Serum-free medium ปริมาตร 86.6 μL , น้ำยา FuGene ปริมาตร 6 μL และ dsRNA 7.4 μL) จากนั้นทำการ Mix แล้ว บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็น

เวลา 20 นาที จากนั้นนำเซลล์ข้างต้นทำการกำจัดอาหารเลี้ยงเซลล์ พร้อมกับล้างเซลล์ด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) ปริมาตร 1,000 μ L จำนวน 1 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำยา siRNA-Ten-4 หรือ siRNA-Cont. ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในเซลล์โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการตรวจสอบการแสดงออกของยีน Ten-4 โดยวิธี Real-time PCR จากนั้นทำการหว่านเซลล์ Neuro2a ที่ถูก Transfect ด้วย siRNA-Ten-4 หรือ siRNA-Cont. ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm² จำนวน 15,000 เซลล์ต่อจาน แล้วทำการบ่มไว้ที่ตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ ที่สภาวะอุณหภูมิ 37°C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และ เอทิล อะซิเตทที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/mL แล้วทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และมี CO₂ ปริมาณ 5% เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดทำการทดสอบตามวิธี Neurite outgrowth assay ต่อไป

3.3.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษาทั้งหมดจะถูกนำเสนอในรูปแบบ ค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean \pm SD) ในแต่ละการทดสอบจะทำการทดลองซ้ำจำนวน 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน จากนั้นข้อมูลจะถูกนำวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS Statistic Ver.22 โดยใช้ตัวสถิติคือ One-way ANOVA ร่วมกับ LSD เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างที่เป็นสารสกัดหยาบสมุนไพรร่วมกับตัวควบคุมทางบวก และตัวควบคุมทางลบ ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ (P-value) น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01, 0.05 จะถือว่าข้อมูลมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด

พืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ หมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดีย ได้รับความอนุเคราะห์จากสวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี จังหวัดระยอง ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2559 พร้อมทั้งทำการเก็บตัวอย่างพืชสมุนไพรในส่วนที่เป็นใบ ดอก และฝัก พร้อมกับทำให้แห้ง และส่งพิสูจน์ทางอัตลักษณ์โดยศาสตราจารย์ กสิน สุวะตะพันธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลจากการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพร ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการพิสูจน์ชนิดของพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อทั่วไป	ส่วนที่นำมาใช้ศึกษา	Herbarium number
<i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC. Var. <i>pruriens</i>	หมามู๋ไทย (Ichy bean)	เมล็ด	015855 (BCU)
<i>Mucuna pruriens</i> (L.) DC. Var. <i>utilis</i> (Wall. Ex Wight) L. H. Bailey	หมามู๋อินเดีย (Velvet bean)	เมล็ด	015786 (BCU)

4.2 ผลการสกัดหยาบพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล โดยใช้การสกัดแบบ Soxhlet extraction

พืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด ทำการสกัดหยาบโดยใช้การสกัดแบบ Soxhlet extraction ด้วยตัวทำละลาย 3 ชนิด ประกอบด้วยเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล จากนั้นทำให้สารสกัดหยาบมีความเข้มข้นมากขึ้นโดยใช้เครื่อง Rotatory evaporation ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบที่ได้ (% Yield) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลการคำนวณปริมาณผลผลิต (%Yield) ของสารสกัดหยาบจากพืชสมุนไพรทั้ง 2 ชนิด

ชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษา	ปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบ(%Yield)		
	เฮกเซน	เอทิล อะซิเตท	เอทานอล
เมล็ดของหมามู่ยไทย	1.77	0.61	0.57
เมล็ดของหมามู่ยอินเดีย	0.24	16.37	0.83

จากตาราง แสดงผลปริมาณผลผลิตของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล มีช่วงอยู่ที่ 0.24% ถึง 16.37% โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซนมีปริมาณน้อยที่สุดคือ 0.24% และสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตทมีปริมาณมากที่สุดคือ 16.37%

4.3 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู่ยไทย และเมล็ดหมามู่ยอินเดีย

4.3.1 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอลโดยวิธี Folin-Ciocalteu method พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดมากที่สุดอยู่ที่ 188.03 ± 7.13 mg GAE/g dry weight โดยใช้กรด Gallic เป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแสดงเป็นค่ามิลลิกรัมสาร Gallic ต่อ น้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด (Mean \pm SD)

4.3.2 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอลโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric method พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุดอยู่ที่ 2.85 ± 2.64 mg QE/g dry weight โดยใช้สาร Quercitin เป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแสดงเป็นค่ามิลลิกรัมสาร Quercitin ต่อน้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด (Mean \pm SD)

จากผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู๋ไทย และเมล็ดหมามู๋อินเดีย พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด และมีปริมาณที่มากกว่าจากสารสกัดหยาบของเมล็ดหมามู๋อินเดีย (ดังแสดงตารางที่ 11-12)

ตารางที่ 11 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียโดยวิธี Folin-Ciocalteu method

Herb extracts	mg GAE/g dry weight
MIH	3.50 \pm 0.51
MIEA	4.86 \pm 0.47
MIE	52.64 \pm 2.69
MTH	3.24 \pm 0.20
MTEA	8.63 \pm 0.36
MTE	188.03 \pm 7.13

ตารางที่ 12 ผลการทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดในสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียโดยวิธี Aluminium chloride colorimetric method

Herb extracts	mg QE/g dry weight
MIH	0.92±1.53
MIEA	0.94±1.35
MIE	ND*
MTH	ND*
MTEA	ND*
MTE	2.85±2.64

*Non detectable

4.4 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดีย

4.4.1 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยวิธี DPPH assay

ผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ด้วยวิธี DPPH assay ซึ่งจะวัดออกมาเป็นค่าของ %Radical scavenging activity และนำไปเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด (VCEAC/g dry plant material) จากการทดสอบคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียพบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีความสามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล DPPH มากที่สุด ซึ่ง %Radical scavenging activity อยู่ที่ 117.81±2.04 VCEAC/g dry plant material รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่ง %Radical scavenging activity อยู่ที่ 107.88±.45 VCEAC/g dry plant material

4.4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยวิธี ABTS assay

ผลการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ด้วยวิธี ABTS assay ซึ่งจะวัดออกมาเป็นค่าของ %Radical scavenging activity และนำไปเปรียบเทียบกับกรดแอสคอร์บิก ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณเป็นค่ามิลลิกรัมกรดแอสคอร์บิกต่อน้ำหนักเป็นกรัมของสารสกัด (VCEAC/g dry plant material) จากการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียพบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีค่าความสามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS มากที่สุด ซึ่ง %Radical scavenging activity อยู่ที่ 108.09 ± 5.39 VCEAC/g dry plant material รองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่ง %Radical scavenging activity อยู่ที่ 106.90 ± 5.94 VCEAC/g dry plant material

จากการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ด้วยวิธี ABTS และ DPPH assay พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีค่าความสามารถต้านออกซิเดชันอนุมูล ABTS และ DPPH มากที่สุด และรองลงมาคือสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งการทดสอบฤทธิ์สารต้านอนุมูลอิสระทั้งวิธี ABTS และ DPPH assay ให้ผลไปในทางเดียวกัน จากผลข้างต้นนั้นสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ดีที่สุดในการต้านสารอนุมูลอิสระ (Radical scavenging activity) (ดังแสดงตารางที่ 13-14)

ตารางที่ 13 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมือคของหมามู๋
ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยวิธี DPPH assay

Herb extracts	VCEAC/g dry plant material
MIH	ND*
MIEA	2.65±3.64
MIE	107.88±8.45
MTH	ND*
MTEA	6.81±1.77
MTE	117.81±2.04

*Non detectable

ตารางที่ 14 ผลการทดสอบคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบเมือคของหมามู๋
ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยวิธี ABTS assay

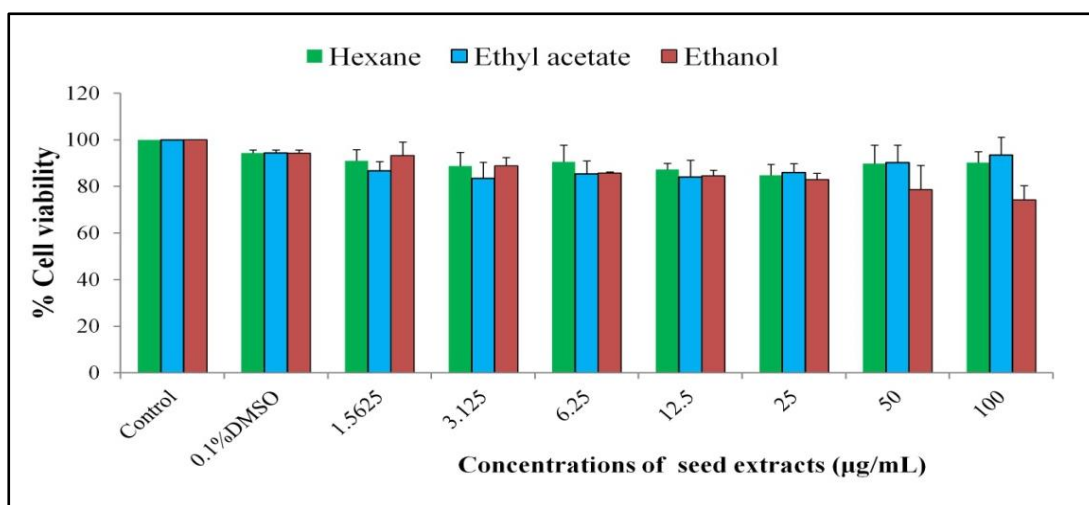
Herb extracts	VCEAC/g dry plant material
MIH	1.68±1.48
MIEA	8.0±1.76
MIE	106.90±5.94
MTH	6.24±1.56
MTEA	19.48±4.39
MTE	108.09±5.39

4.5 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT

เมื่อได้สารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดีย นำมาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยทำการหว่านเซลล์ลงในหลุมจานเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม หลุมละ 5,000 เซลล์ จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อบ่มครบเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์มาทำการ treat ด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดีย ในช่วงความเข้มข้น 0-100 µg/mL และ DMSO 0.1% และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C ออแกเซลล์เซียส 5%CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบกับสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดีย (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตเป็น 100% และ DMSO 0.1% เป็นกลุ่มควบคุมบวก (Positive control) นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%Cell viability)

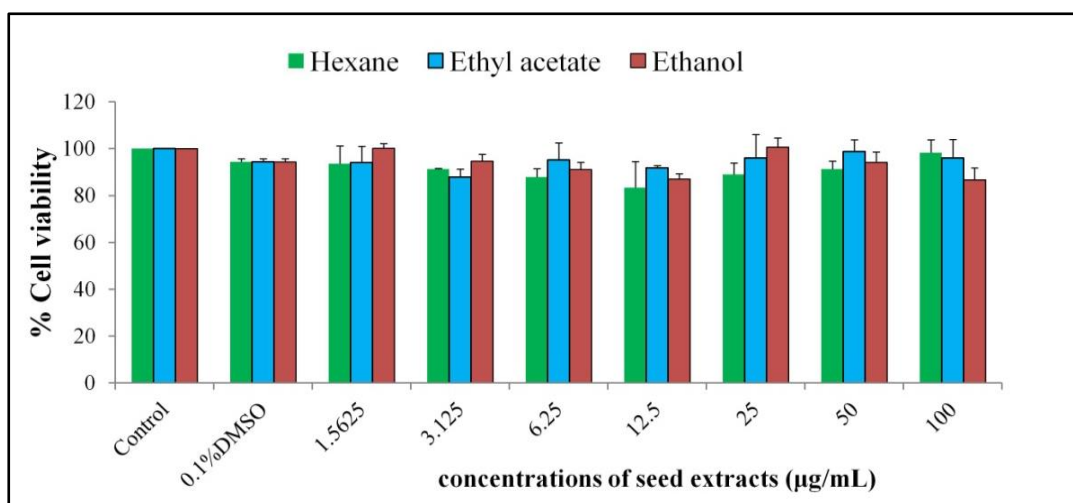
จากการทดสอบพบว่าทั้งสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0-100 µg/mL อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ สารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0-100 µg/mL มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มากกว่า 70% จึงสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 0-100 µg/mL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a (แสดงดังภาพที่18-19)

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย



ภาพที่ 18 ผลการทดสอบความพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย ด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 µg/mL ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี Control เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ (เซลล์ที่ไม่ได้มีการ treat ด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย หรือ DMSO 0.1%) และ DMSO 0.1% เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก ซึ่งแสดงค่าเป็น % อัตราการรอดชีวิต (Mean ± SD) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยวิธี MTT

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดีย



ภาพที่ 19 ผลการทดสอบความพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดีย ด้วยตัวทำละลาย เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น 1.5625-100 µg/mL ต่อเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมี Control เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ (เซลล์ที่ไม่ได้ มีการ treat ด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดีย หรือ DMSO 0.1%) และ DMSO 0.1% เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก ซึ่งแสดงค่าเป็น %การรอดชีวิต (Mean ± SD) โดยทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยวิธี MTT

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของ หมามุ่ยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a

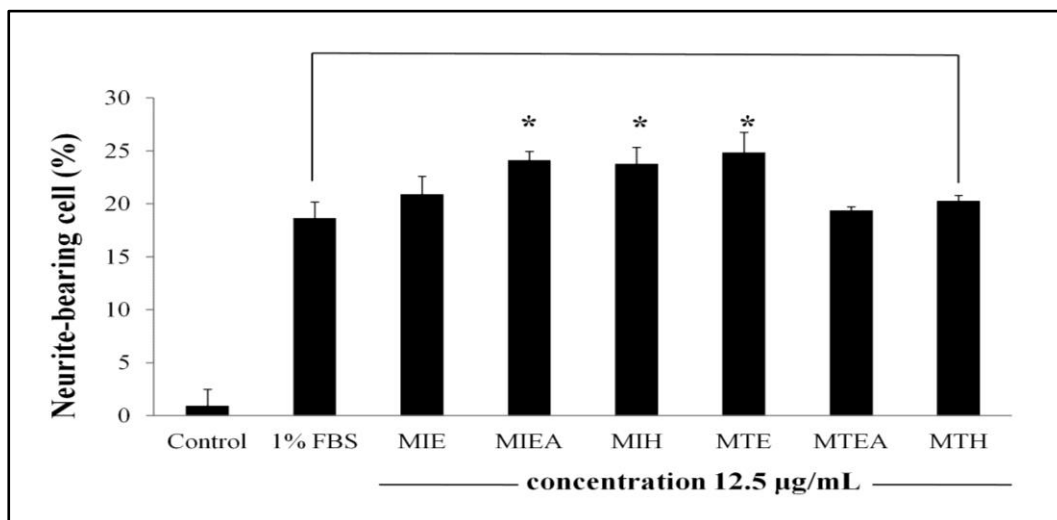
จากผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ย อินเดียต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ทำการทดสอบหาความเข้มข้นที่เหมาะสมซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท เพาะเลี้ยง พร้อมทั้งสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL เป็นความเข้มข้นสูงสุดซึ่งไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ประสาทเพาะเลี้ยง และสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ โดยทำการหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยง เซลล์ จานละ 15,000 เซลล์ และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาทำการ Treat ด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียที่ ความเข้มข้น 12.5 µg/mL จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C และ 5%CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ (Negative control) และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 1%FBS DMEM เป็นกลุ่ม

ควบคุมทางบวก (Positive control) ซึ่งแบ่งการทดสอบออกเป็น 2 ส่วน คือ การวัดการงอกของนิวไรท์ที่ยาวมากกว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของตัวเซลล์ (Neurite-bearing cell) และการวัดความยาวของนิวไรท์ (Neurite length) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ One-way ANOVA โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซนต์ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น $12.5 \mu\text{g/mL}$ ต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MTH) เอทิล อะซิเตท (MTEA) และเอทานอล (MTE) สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) ดังนี้ $20.3 \pm 0.5\%$, $19.37 \pm 0.3\%$ และ $24.84 \pm 1.9\%$ ตามลำดับ ในขณะที่สกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) เอทิล อะซิเตท (MIEA) และเอทานอล (MIE) สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ ดังนี้ $23.77 \pm 1.6\%$, $24.13 \pm 0.8\%$, และ $20.92 \pm 1.6\%$ ตามลำดับ สำหรับค่าเฉลี่ยความยาวของนิวไรท์ สารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MTH) เอทิล อะซิเตท (MTEA) และเอทานอล (MTE) พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความยาวนิวไรท์ (Neurite length) ดังนี้ $13.84 \pm 1.5 \mu\text{m}$, $10.2 \pm 1.6 \mu\text{m}$ และ $17.65 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ตามลำดับ และสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) เอทิล อะซิเตท (MIEA) และเอทานอล (MIE) พบว่ามีค่าเฉลี่ยของความยาวนิวไรท์ (Neurite length) ดังนี้ $17.19 \pm 2.3 \mu\text{m}$, $20.29 \pm 4.5 \mu\text{m}$ และ $12.47 \pm 3.1 \mu\text{m}$ ตามลำดับ

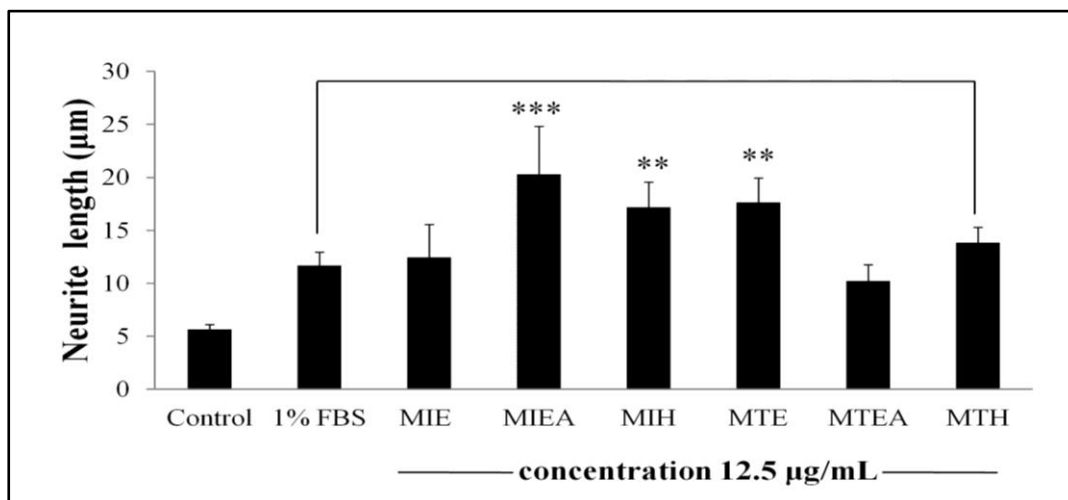
จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ที่ความเข้มข้น $12.5 \mu\text{g/mL}$ ต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) เอทิล อะซิเตท (MTEA) สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และความยาวของนิวไรท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) และ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางบวก ซึ่งสามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ และความยาวของนิวไรท์ ดังนี้ $18.66 \pm 1.5\%$ และ $11.68 \pm 1.3 \mu\text{m}$ ตามลำดับ (แสดงดังภาพที่ 20-21)

ผลการทดสอบของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell)

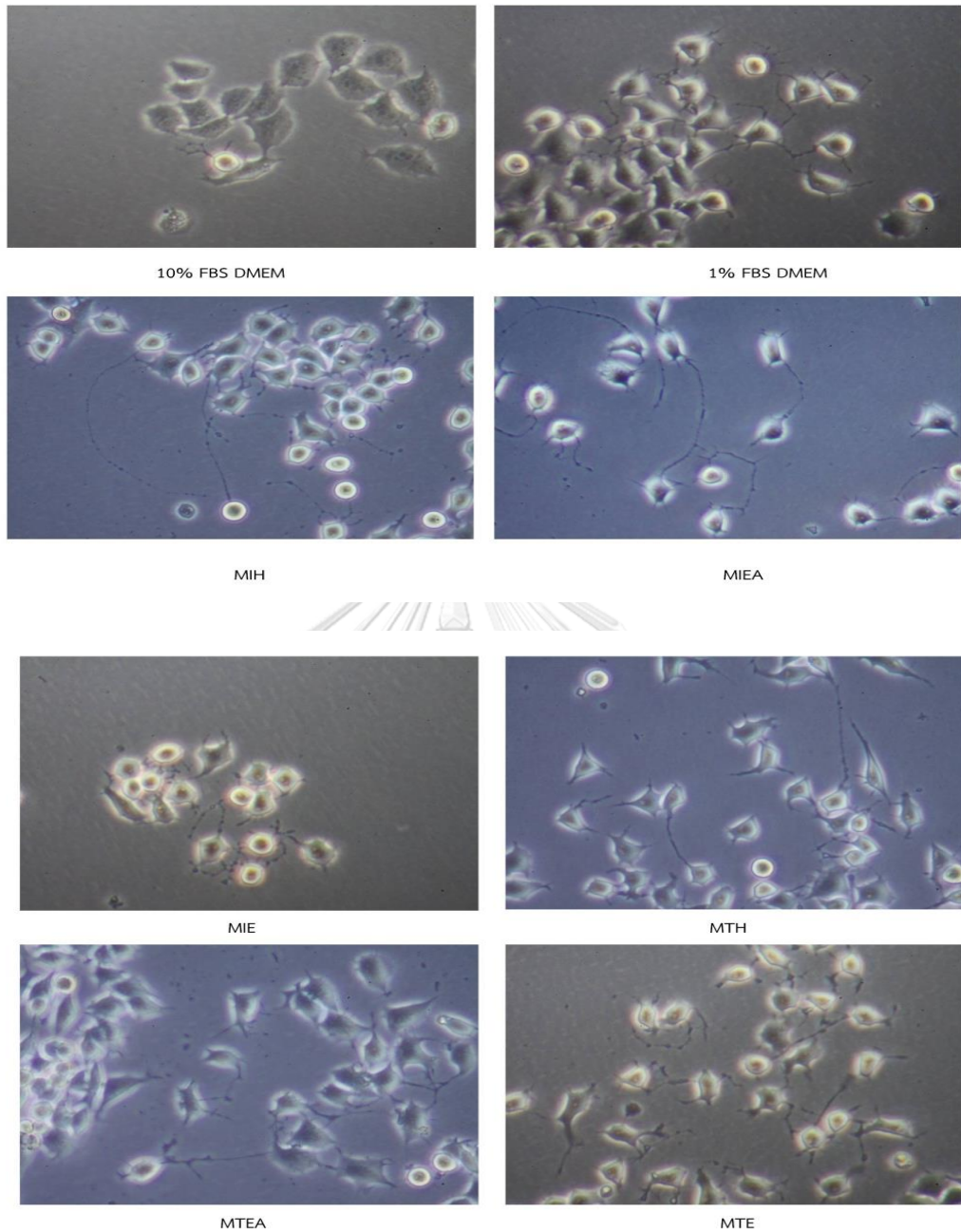


ภาพที่ 20 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 1%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม ImageJ และแสดงค่าเป็น %Neurite-bearing cell (mean ± SD) ซึ่ง * เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$

ผลการทดสอบของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียนีต่อความยาวของนิวไรท์ (Neurite length)



ภาพที่ 21 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียนีต่อความยาวของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 1%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง วิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม ImageJ และแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ยความยาวของนิวไรท์ (Mean ± SD) ซึ่ง * เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$



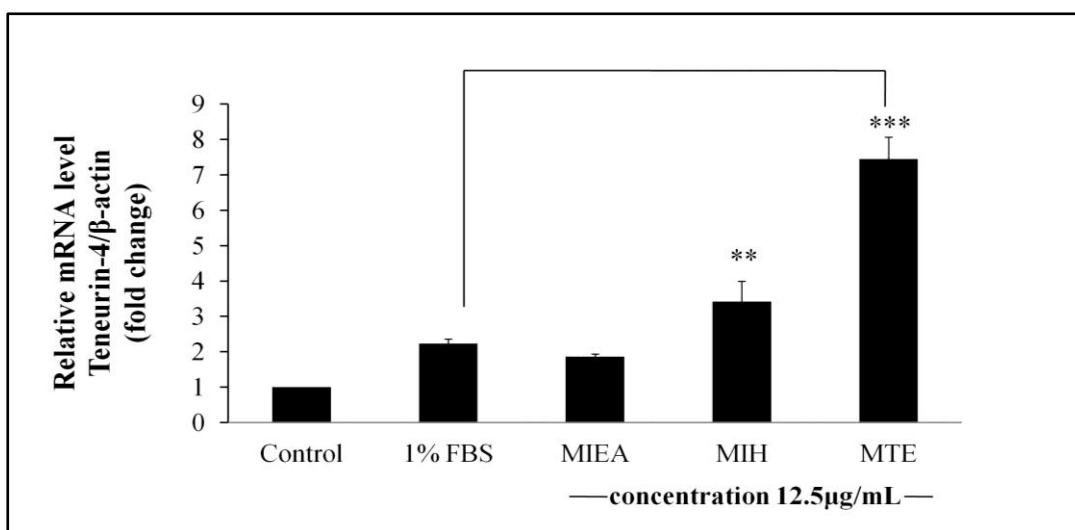
ภาพที่ 22 ผลของฤทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียต่อการงอกของนิวโรไทน์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 1%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งทำการถ่ายภาพโดยใช้กล้องชนิด Phase contrast ที่ติดกับ Canon EOS 50D ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า

4.7 ผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 และ GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี Real-Time PCR

จากผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) เพื่อศึกษากลไกการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 และ GAP-43 ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) และเอทิล อะซิเตท (MTEA) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยทำการหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์จานละ 90,000 เซลล์ และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเซลล์มาทำการ Treat กับสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) และเอทิลอะซิเตท (MTEA) ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL แล้วทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้เซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 10%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางลบ (Negative control) และเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด 1%FBS DMEM เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก (Positive control) โดยการแสดงออกของแต่ละยีนจะถูกนำมาเทียบเป็นอัตราส่วนกับยีน β -actin แล้วนำมาเปรียบเทียบเป็นจำนวนเท่าเทียบกับกลุ่มควบคุมทางลบ และกลุ่มควบคุมทางบวก

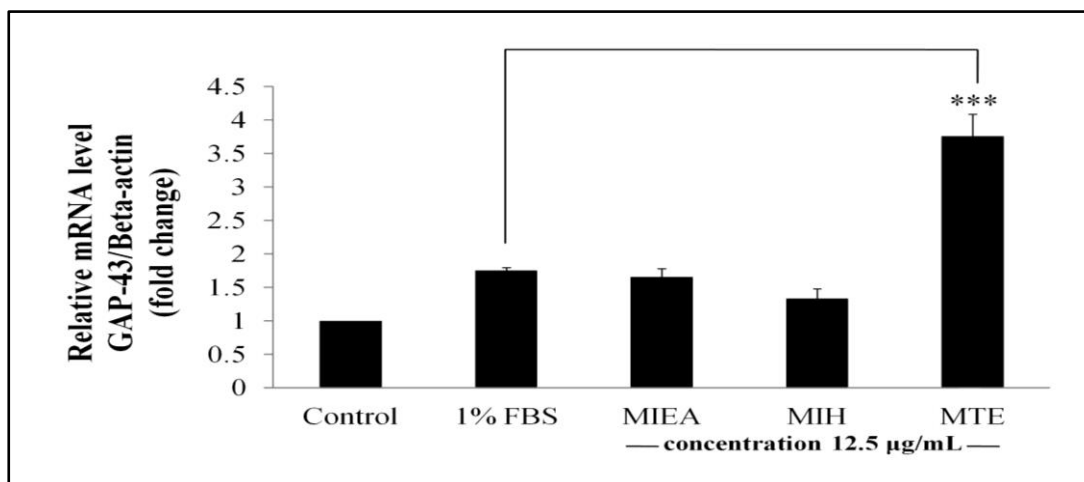
ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL สามารถเพิ่มการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) และ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางบวก ในขณะที่ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน GAP-43 พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) เท่านั้น ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL สามารถเพิ่มการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน GAP-43 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) และ ($P < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทางบวก (แสดงดังภาพที่ 23-24)

ผลการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4



ภาพที่ 23 ผลการทดสอบสารสกัดหยาดจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (Mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก Normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแตกต่างกันมีนัยสำคัญที่ * เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ใน 1%FBS (Positive control)

ผลการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน GAP-43



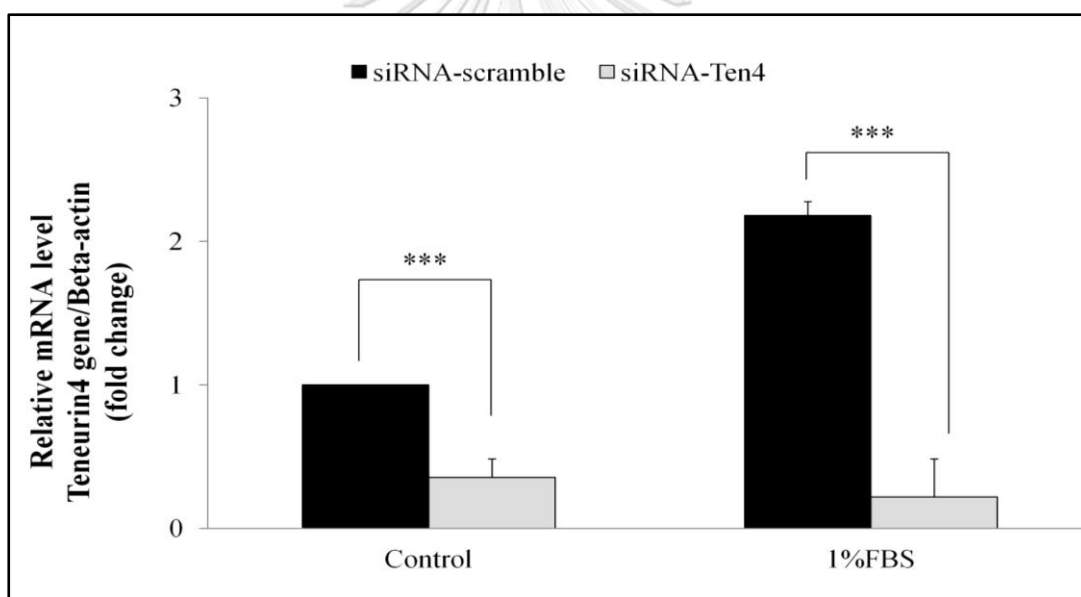
ภาพที่ 24 ผลการทดสอบสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (Mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่* เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ใน 1%FBS (Positive control)

4.8 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียดต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยวิธี siRNA

จากการทดสอบผลของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียดต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋อินเดียดด้วยตัวทำละลายเอทิลเฮกเซน (MIH) ที่ความเข้มข้น $12.5 \mu\text{g/mL}$ สามารถเพิ่มการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ดังนั้นเพื่อยืนยันกลไกการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยเริ่มจากการหว่านเซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์จานละ 700,000 เซลล์ และทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และ $5\%\text{CO}_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ Transfect เซลล์ด้วย siRNA-Ten-4 หรือ siRNA-Cont. แล้วทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C และ $5\%\text{CO}_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการหว่านเซลล์เพื่อทำการทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 โดยวิธี Real-time PCR หรือทำการทดสอบการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth assay) แล้วทำการ Treat เซลล์ด้วยสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู๋อินเดียดด้วยตัวทำละลายเอทิลเฮกเซน (MIH) เอทิล อะซิเตท (MTEA) จากนั้นทำการบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C $5\%\text{CO}_2$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

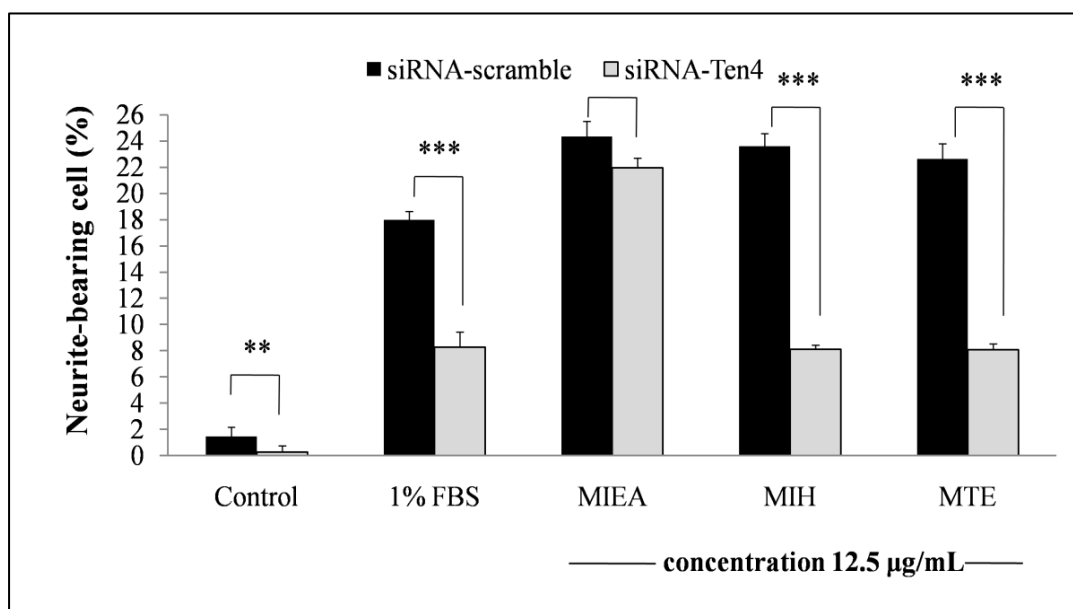
ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ของสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a พบว่าเซลล์ Neuro2a ที่ Treat ด้วย siRNA-Ten-4 พร้อมกับสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) มีการงอกของนิวไรท์ และความยาวของนิวไรท์ลดลงเช่นกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$), ($P < 0.01$) และ ($P < 0.001$) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ทำการ Treat ด้วย siRNA-Cont. ดังนั้นสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล (MTE) และสารสกัดหยาบเมล็ดของหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (MIH) สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 (ดังแสดงภาพที่ 25-27)

ผลการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a



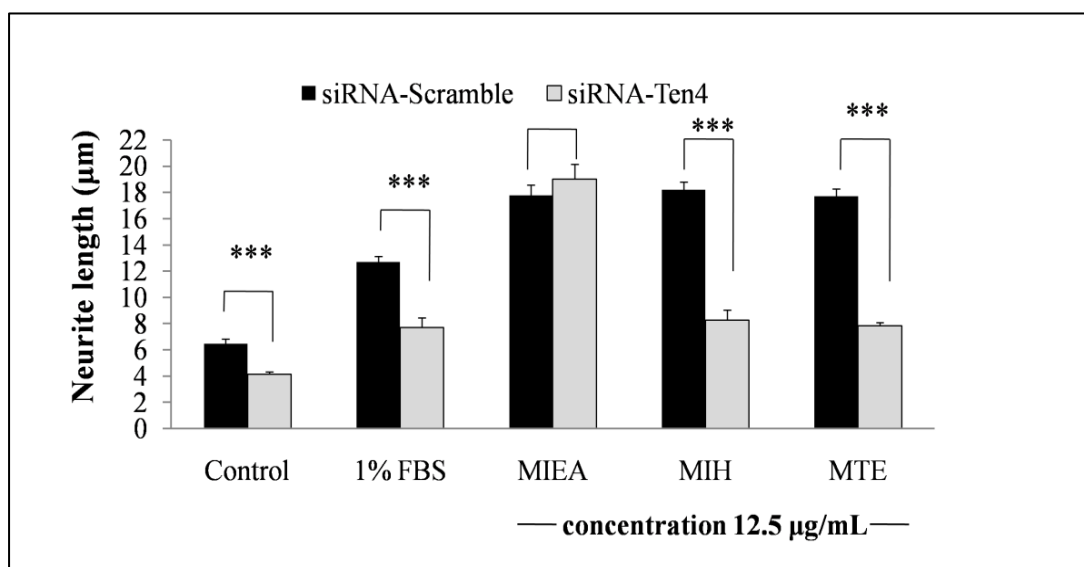
ภาพที่ 25 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a แสดงค่าเป็นจำนวนเท่า (Mean \pm SD) ของการแสดงออกของยีนที่ถูก normalized กับ β -actin แล้ว โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่* เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ Treat ด้วย siRNA-Cont.

ผลการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a

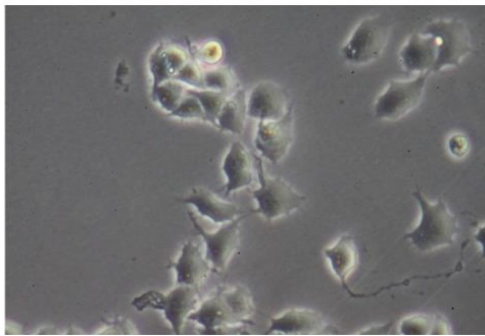


ภาพที่ 26 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และแสดงค่าเป็น %Neurite-bearing cell (Mean \pm SD) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ * เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ Treat ด้วย siRNA-Cont.

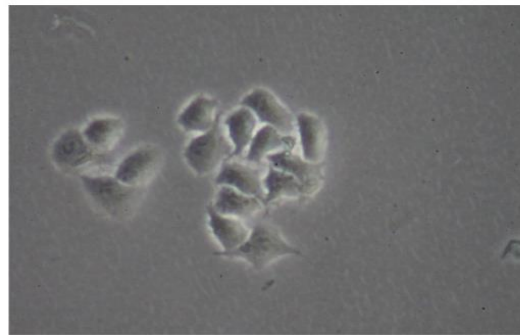
ผลการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อความยาวของนิวไรท์ (Neurite length) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a



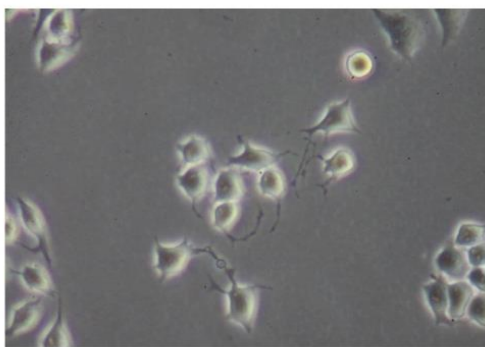
ภาพที่ 27 ผลการทดสอบการยับยั้งการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน Ten-4 ต่อความยาวของนิวไรท์ (Neurite length) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a โดยทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง และแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ยความยาวของนิวไรท์ (Mean \pm SD) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ * เท่ากับ $p < 0.05$, ** เท่ากับ $p < 0.01$ และ *** เท่ากับ $p < 0.001$ เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่ Treat ด้วย siRNA-Cont.



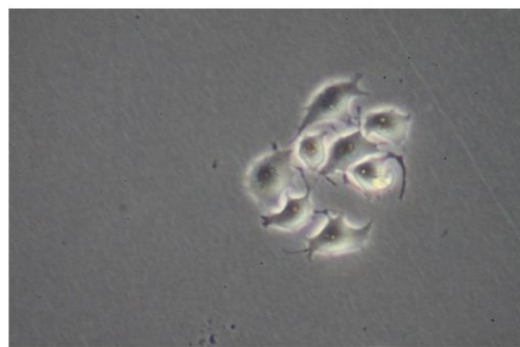
10% FBS siRNA-Cont.



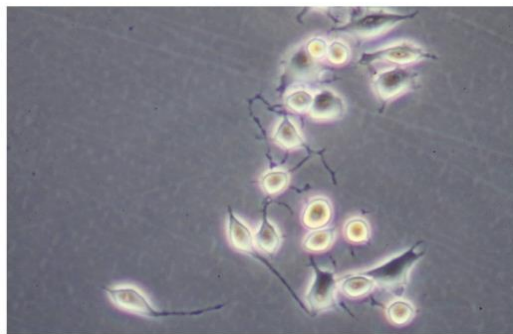
10% FBS siRNA-Ten-4



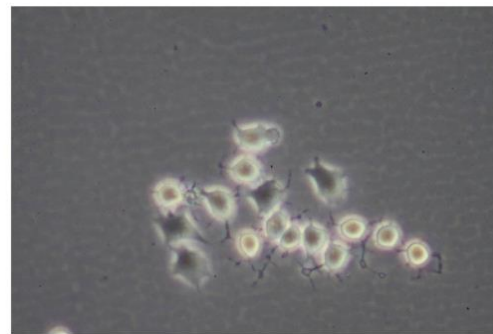
1% FBS siRNA-Cont.



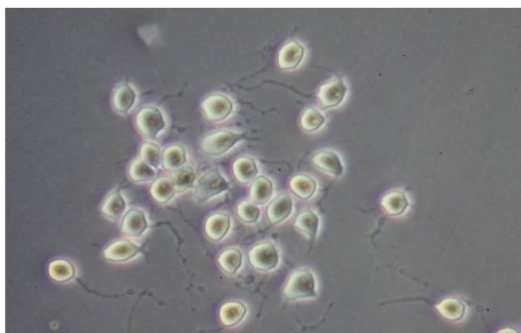
1% FBS siRNA-Ten-4



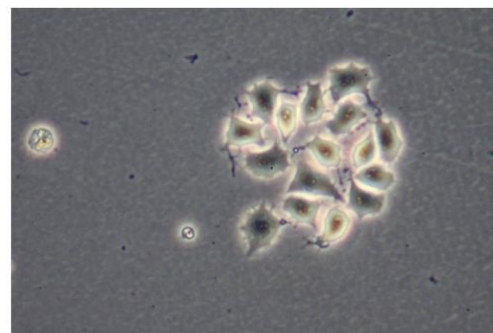
MIEA siRNA-Cont.



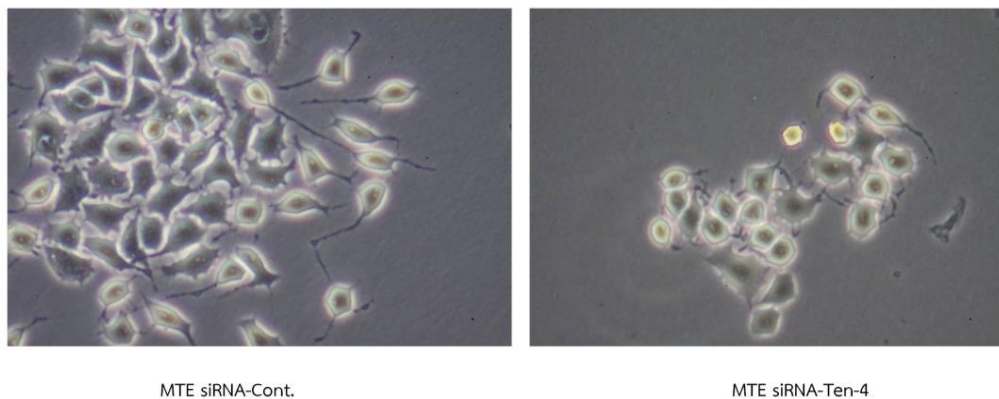
MIEA siRNA-Ten4



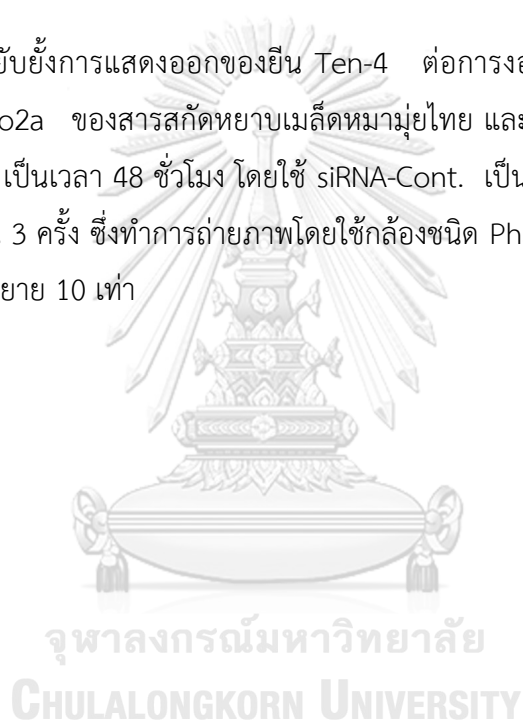
MIH siRNA-Cont.



MIH siRNA-Ten-4



ภาพที่ 28 ผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Ten-4 ต่อการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ของสารสกัดหยาบเม็ล็ดหมามุ่ยไทย และเม็ล็ดหมามุ่ยอินเดีย ที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้ siRNA-Cont. เป็นกลุ่มควบคุมในการทดสอบ ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 ครั้ง ซึ่งทำการถ่ายภาพโดยใช้กล้องชนิด Phase contrast ที่ติดกับ Canon EOS 50D ด้วยกำลังขยาย 10 เท่า



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

โรคความผิดปกติของระบบประสาท (Neurodegenerative diseases) เป็นกลุ่มโรคความผิดปกติที่มีการสูญเสียโครงสร้าง และหน้าที่ของสมองหรือเซลล์ประสาท โดยโรคที่พบได้บ่อย อาทิ เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคฮันติงตัน เป็นต้น ซึ่งสาเหตุของการเกิดโรค หรือกลไกการเกิดโรคสามารถเกิดได้ทั้งปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม และปัจจัยทางพันธุกรรม เช่น ความเครียด การได้รับสารพิษหรือโลหะหนัก ความชราภาพ ความบกพร่องของเมตาบอลิซึม การสร้าง เปลี่ยนแปลงรูปร่าง หรือการสะสมของโปรตีนที่ผิดปกติ การสร้างสารสื่อประสาทที่ผิดปกติ รวมถึงกระบวนการสร้าง หรือการพัฒนาของเซลล์ประสาทที่น้อยลงอย่างผิดปกติ กระบวนการการสร้างนิวไรท์ (Neurite outgrowth) เป็นกระบวนการที่สำคัญในการเจริญ และพัฒนาของเซลล์ประสาท การสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท (Synaptic connections) การรักษารูปร่าง หรือความยืดหยุ่นของเซลล์ประสาท และการสร้างเซลล์ประสาททดแทนหลังจากได้รับความเสียหาย (Neuronal regeneration) โดยกระบวนการสร้างนิวไรท์นั้นมีกลไกที่เกี่ยวข้องหลายกลไก อาทิเช่น การเพิ่มการงอกของนิวไรท์ผ่านกลไกกระตุ้น MEK/ERK pathway หรือการกระตุ้นผ่านกลไก PI3K/Akt pathway รวมทั้งการกระตุ้นผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีนหรือโปรตีน MAP2 GAP-43 และ Ten-4 เป็นต้น⁽⁵⁶⁾ กระบวนการดังกล่าวนี้หากเกิดความผิดปกติสามารถเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาทได้ ในปัจจุบันสารสกัดจากพืชสมุนไพรเป็นทางเลือกหนึ่งในการศึกษาวิจัย และพัฒนาเพื่อป้องกัน หรือรักษาโรคความผิดปกติของระบบประสาท สำหรับการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ทำการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ย จำนวน 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย เมล็ดหมามู่ยไทย (*Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. *pruriens*) และเมล็ดหมามู่ยอินเดีย (*Mucuna pruriens* (L.) DC. Var. *utilis* (Wall. Ex Wight) L. H. Bailey) พืชสมุนไพรชนิดนี้นิยมนำมาใช้ในด้านอายุรเวท โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า มีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ (Antioxidant activity) การยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย การยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง การต้านพิษของงู รวมทั้งพบว่า ภายในเมล็ดของหมามู่ยนั้นประกอบด้วยสารตั้งต้นของสารสื่อประสาทที่สำคัญ คือ L-dopa ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างสารสื่อประสาทชนิดโดปามีน (Dopamine) มีการศึกษามากมายที่เกี่ยวข้องกับสาร L-dopa ภายในเมล็ดของหมามู่ยกับโรคพาร์กินสัน แต่ที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับฤทธิ์ และกลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ โดยผู้วิจัยทำการเก็บตัวอย่างเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียจากสวนสมุนไพรสมเด็จพระ

พระเทพฯ จังหวัดระยอง โดยทำการเก็บเกี่ยวในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2559 โดยทำการเก็บฝักของหมามูยในระยะที่แก่ ซึ่งเถาจะมีสีเหลือง และฝักมีสีน้ำตาลอมแดง ในการสกัดสารแต่ละครั้งนั้นถึงแม้จะเป็นพืชสมุนไพรชนิดเดียวกันอาจได้ปริมาณสารสกัดสมุนไพรในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจเกิดจากช่วงเวลาของการเก็บเกี่ยว วิธีการเก็บเกี่ยว คุณภาพของดินในพื้นที่ทำการปลูก สภาพภูมิอากาศ ภูมิภาคของแหล่งที่ปลูก การบำรุง หรือดูแลรักษาพืชสมุนไพร ดังนั้นปัจจัยเหล่านี้จึงมีความสำคัญต่อสารสำคัญ และปริมาณของสารสกัดพืชสมุนไพร สำหรับขั้นตอนและวิธีการสกัดพืชสมุนไพรเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อสารสกัดสมุนไพร ทั้งในส่วนสารสำคัญ และปริมาณของสารสกัด วิธีที่นิยมในการสกัดพืชสมุนไพรมีหลากหลายวิธี อาทิเช่น วิธี Maceration เป็นวิธีที่ทำการแช่พืชสมุนไพรที่ทำการบดแล้วในตัวทำละลายที่เราต้องการในภาชนะปิด โดยทำการสกัดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน วิธีนี้มีข้อดีคือเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และสะดวก อีกทั้งพืชสมุนไพรที่ทำการสกัดไม่โดนความร้อน และได้สารปริมาณมาก แต่ทั้งนี้ก็มีข้อเสียคือใช้ตัวทำละลายปริมาณมาก พร้อมทั้งต้องมีการกำจัดของเสียที่ดี นอกจากนี้วิธีการสกัดแบบ Soxhlet เป็นวิธีที่มีการสกัดพืชสมุนไพรอย่างต่อเนื่อง และเป็นวิธีที่นิยมในกรณีที่เราไม่ทราบว่าสารสำคัญในพืชสมุนไพรสามารถละลายได้ดีในตัวทำละลายชนิดใด โดยทำให้ความร้อนแก่ตัวทำละลายที่ทำการบรรจุไว้ใน Flask จากนั้นเมื่อตัวทำละลายถึงจุดเดือดจะระเหยขึ้นไปที่ Condenser ซึ่งมีความเย็นแล้วควบแน่นตกลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุพืชสมุนไพรที่ทำการบดไว้ ซึ่งจะทำการสกัดแบบนี้หมุนเวียนไปอย่างต่อเนื่องจนการสกัดสารเสร็จสมบูรณ์ วิธี Soxhlet เป็นวิธีที่ใช้ตัวทำละลายในการสกัดพืชสมุนไพรในปริมาณที่น้อยเมื่อเทียบกับวิธีการสกัดแบบ Maceration แต่อย่างไรก็ตามไม่เหมาะสมกับสารสกัดที่ไวต่อความร้อน⁽⁵⁷⁾ จากการศึกษาที่ผ่านมาการสกัดสารจากเมล็ดของหมามูยพบว่าการสกัดทั้งแบบวิธี Marceration และ Soxhlet^(58, 59) ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยทำการสกัดสารจากเมล็ดของหมามูยไทย และหมามูยอินเดียด้วยวิธีการสกัดแบบ Soxhlet เนื่องจากยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัดในแง่ของตัวทำละลายที่สามารถละลายสารสกัดที่มีผลต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ อีกทั้งเป็นวิธีที่นิยมอย่างแพร่หลาย และสามารถใช้ตัวทำละลายในการสกัดสารสมุนไพรได้อย่างหลากหลาย สำหรับตัวทำละลายเป็นปัจจัยสำคัญหนึ่งในการละลายสารสำคัญออกจากสมุนไพร จากการศึกษาของ Kottai Muthu และคณะ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท และเมทานอลมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิกที่สูง พร้อมทั้งมีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระ⁽⁶⁰⁾ ในขณะที่การศึกษาวิจัยของ Misra และคณะ พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยด้วยตัวทำละลายเอทานอลเป็นตัวทำละลายที่ดีในการสกัดสารสำคัญ L-dopa⁽⁶¹⁾ ซึ่งผู้วิจัยทำการเลือกตัวทำละลายจากสารที่มีขั้วน้อยไปยังสารที่มีขั้วมากจำนวน 3 ตัวทำละลาย ประกอบด้วย เฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ตามลำดับ เมื่อทำการสกัดเสร็จจึงนำสารสกัดหยาบมาทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Evaporator จากนั้นทำการคำนวณปริมาณสารสกัดที่ได้ (%Yield) พบว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลาย

เอทิล อะซิเตท (16.37%) มีปริมาณผลผลิตสารสกัดหยาบมากที่สุด ในขณะที่สารสกัดหยาบจากเมล็ดของหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน (0.24%) มีปริมาณน้อยที่สุด และสุดท้ายการละลายสารสกัดหยาบที่ได้ด้วย DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ดีที่สุดในการละลายสารที่มีขี้ด่ำ หรือไม่มีขี้ด่ำ แต่ทั้งนี้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร DMSO ที่มีความเข้มข้นมากกว่า 10% (v/v) สามารถเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทได้โดยก่อให้เกิดลักษณะเป็นรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma membrane) แต่อย่างไรก็ตามสาร DMSO ที่มีความเข้มข้นน้อยกว่า 10% (v/v) มีความเป็นพิษที่ต่ำ หรือไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท⁽⁶²⁾

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทชนิด Mouse neuroblastoma โดยเป็นอนุพันธุ์จาก Mouse C1300 tumor เป็นเนื้อเยื่อบริเวณสมอง (Neural crest) สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ประสาทได้ ซึ่งเป็นเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิดยึดเกาะ (Adherent cell) เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิดนี้นิยมใช้ศึกษาฤทธิ์ของสารเคมี หรือสารจากธรรมชาติต่อการงอกของนิวไรท์ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท รวมถึงการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท (Neuronal proliferation and differentiation)⁽⁶³⁾ อีกทั้งมีการแสดงออกของ Cholinergic markers และ Adrenergic markers การศึกษาครั้งนี้เลือกเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมาของ Suzuki N. และคณะ ทำการศึกษาการแสดงออกของยีน และโปรตีนของ Ten-4 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a และ PC12 พบว่าในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a มีการแสดงออกของยีนและโปรตีนของ Ten-4 มากกว่าเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด PC12 อาจเกิดจากเซลล์แต่ละชนิดมีการแสดงออกของ Neuronal marker หรือตัวรับที่แตกต่างกัน อีกทั้งเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a มีความไวต่อการพร่องของซีรัม (Serum-deprivation) โดยส่งผลก่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ได้ โดยการกระตุ้นผ่านทางการทำงานของ ERK และ Akt signaling pathway ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้เป็นกลุ่มควบคุมทางบวก⁽⁶⁴⁾ ดังนั้นการเลือกชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาวิจัย แต่เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีข้อจำกัดคือเซลล์ดังกล่าวเป็นเซลล์เพาะเลี้ยงจากสมองหนูซึ่งมีความซับซ้อนที่น้อยกว่าเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากมนุษย์อาจจะทำให้ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน

การศึกษาคุนสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระ และสารประกอบที่สำคัญในเมล็ดของหมามูยไทย และหมามูยอินเดีย โดยการศึกษาคุนสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดสอบด้วย 2 วิธี ประกอบด้วยวิธี DPPH assay และวิธี ABTS assay ซึ่งสารทั้งสองชนิดเป็นสารอนุมูลอิสระ จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทยและหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระที่สูงกว่าตัวทำละลายชนิดเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท ซึ่งทั้งวิธี DPPH assay และวิธี ABTS assay ให้ผลสอดคล้องไปในทางเดียวกัน ในขณะที่กา

ศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระทั้งชนิด DPPH, hydroxyl radical, nitric oxide และ superoxide และจากการศึกษาพบว่าเมล็ดของหมามุ่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากกว่าเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล ซึ่งการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมล็ดของหมามุ่ยที่มีสีดามีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบฟลาโวนอยด์ รวมถึงมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระที่มากกว่าเมล็ดของหมามุ่ยที่มีสีขาว⁽⁶⁵⁻⁶⁷⁾ สารอนุมูลอิสระ (Free radical) สามารถส่งผลทำให้เซลล์ประสาทเกิดความเสียหาย และก่อให้เกิดความเสื่อม หรือตายของเซลล์ประสาทได้ อันเป็นสาเหตุของการเกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาท โดยการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยและหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลนั้นมีสารต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยและหมามุ่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลนั้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการป้องกันการเกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาทโดยผลจากสารอนุมูลอิสระ

การศึกษาอัตราการรอดชีวิต (%cell viability) ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงมีหลากหลายวิธี อาทิเช่น MTT, MTS, XTS และ WST-1 แต่วิธีที่ทำได้ง่าย และนิยมทำอย่างแพร่หลายคือวิธี MTT อีกทั้งเป็นวิธีที่เหมาะสมกับ High throughput screening ซึ่งเป็นการวัดการทำงานของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสาร MTT ซึ่งมีสีเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ Formazan ซึ่งมีสีม่วง^(51, 68) โดยปริมาณของ Formazan เป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต การศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทย และหมามุ่ยอินเดียต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ด้วยวิธี MTT พบว่าที่ความเข้มข้น 1.5625-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ มีอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a มากกว่า 80% ซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ในขณะที่การศึกษาของ Hang Ma และคณะ ทำการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Human neuroblastoma SH-SY5Y cells พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 70%⁽⁶⁹⁾ ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดหมามุ่ยไทยและหมามุ่ยอินเดียมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทได้ กระบวนการสร้างนิวไรท์ (Neurite outgrowth) เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท การสื่อสารระหว่างเซลล์ประสาท รวมถึงการซ่อมแซมเซลล์ประสาทหลังจากได้รับความเสียหาย ในสภาวะปกติสารกระตุ้นการสร้าง หรือเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท เช่น NGF หรือ BDNF ซึ่งมีตัวรับบนผิวเซลล์ที่แตกต่างกัน สำหรับ NGF นั้นจะจับกับตัวรับ TrkA แล้วส่งสัญญาณกระตุ้นผ่าน MEK/ERK pathway หรือ PI3K/Akt แล้วกระตุ้นการทำงานของ P-CREB ในนิวเคลียสของเซลล์แล้วเกิดการเพิ่มการแสดงออกของยีน และโปรตีน เช่น MAP-2, GAP-43, Tubulin เป็นต้น สุดท้ายเซลล์ประสาทเกิด

กระบวนการสร้างนิวไรท์ (Neurite formation) หากกระบวนการดังกล่าวเกิดความผิดปกติ สามารถก่อให้เกิดโรคความผิดปกติของระบบประสาทได้ จากการศึกษาที่ผ่านมาสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย ต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง ป้องกันและรักษาโรคเบาหวาน รวมทั้งภายในเมล็ดเต็มไปด้วยสารที่สำคัญ อาทิเช่น L-dopa ซึ่งมีงานวิจัยมากมายที่ทำการศึกษาสาร L-dopa ต่อการรักษาโรคพาร์กินสัน⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ แต่ทั้งนี้การศึกษาฤทธิ์ และกลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยต่อการกระตุ้นการเจริญของนิวไรท์ยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด โดยเริ่มจากการศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทย และเมล็ดของหมามูยอินเดียซึ่งความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่เป็นพิษ และสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ได้มากที่สุด โดยเริ่มจากความเข้มข้นที่ 100 µg/mL จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และเมล็ดของหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิล อะซิเตทสามารถกระตุ้นการเพิ่มการสร้างนิวไรท์ที่ความเข้มข้น 12.5 µg/mL ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท และสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ได้สูงสุด ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์การสร้างนิวไรท์ และค่าเฉลี่ยของความยาวของนิวไรท์ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยการศึกษาวิจัยนี้มีการใช้กลุ่มควบคุมทางบวกคือ 1%FBS เนื่องจากสภาวะที่เกิดการลดลง หรือการพร่องของซีรัมสามารถทำให้เซลล์ประสาทเกิดการสร้างนิวไรท์ได้⁽⁷³⁾ จากผลการวิจัยพบว่าการวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี MTT สารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทย และหมามูยอินเดียที่ความเข้มข้น 1.5625-100 µg/mL ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท แต่ในขณะที่การทดสอบการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ (Neurite outgrowth assay) ที่ความเข้มข้นมากกว่า 12.5 µg/mL เป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง เนื่องจากการทดสอบวัดอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทด้วยวิธี MTT นั้นใช้ความเข้มข้นของซีรัมคือ 10%FBS แต่ขณะที่การทดสอบการกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ใช้ความเข้มข้นของซีรัม 1%FBS ซึ่งเมื่อได้รับความเข้มข้นของสมุนไพรที่สูงเกินไปอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษ หรือส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างต่อเซลล์ประสาทได้ ต่อมาทำการศึกษากลไกของสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทย และหมามูยอินเดียต่อการกระตุ้นการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ โดยนำสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล และสารสกัดจากเมล็ดของหมามูยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และเอทิล อะซิเตท ซึ่งเป็นสารสกัดที่ส่งผลทำให้มีกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ที่สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมทางบวก (1%FBS) โดยทำการศึกษากลไกในการเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 และ Ten-4 โดยใช้วิธี Real-time PCR เนื่องจากเป็นวิธีที่วัดปฏิกิริยาทุกช่วงของการทดสอบ และติดตามผลการแสดงออกของยีนโดยใช้ค่า Ct ในการแสดงผลการแสดงออกของยีนซึ่งบอกได้ทั้งเชิงปริมาณ และเชิงคุณภาพ ในขณะที่ Conventional PCR เป็นการวัดผลิตภัณฑ์สุดท้ายของปฏิกิริยา และศึกษาผลการแสดงออกของยีนโดยการรันเจล โดยแสดงผลเป็นแถบของยีน ซึ่งเป็นวิธีที่ยุ่งยาก สำหรับ Ten-4 เป็นยีนที่มีการแสดงออกมากบริเวณสมองส่วนกลาง

ซึ่งเป็นตัวควบคุมกระบวนการ Oligodendrocyte และควบคุมการสร้างนิวไรท์ของเซลล์ประสาท โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเมื่อมีการ Knockdown ของยีน Ten-4 ส่งผลทำให้มีการสร้างนิวไรท์ที่ลดลง⁽⁸⁾ จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 จากนั้นทำการศึกษาผลการยับยั้งการแสดงออกของยีน Ten-4 ต่อการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยใช้ siRNA เพื่อยืนยันผลการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 ของสารสกัดทั้งสองชนิดต่อการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ และเนื่องจากยีนดังกล่าวมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นทั้งในสารสกัดจากเมล็ดหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดีย อีกทั้งยังไม่มีการศึกษาวิจัยการแสดงออกของยีน Ten-4 ต่อการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ในสารสกัดจากพืชสมุนไพร ซึ่งเมื่อทำการ Knockdown ของยีน Ten-4 พบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียมีการสร้างนิวไรท์ และความยาวของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ที่ลดลง สำหรับสารสกัดจากเมล็ดหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตท สามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ได้ แต่ไม่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 ได้ ซึ่งสารสกัดที่ได้น่าจะมีสารสำคัญหรือกลไกในการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ที่แตกต่างกัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจาก Bushen-Yizhi formula สามารถปกป้องเซลล์ประสาทของหนูจากสาร Scopolamine ได้โดยเพิ่มการแสดงออกของ BDNF และ NGF⁽⁷⁴⁾ นอกจากนี้สารสกัดจาก *Casearia graveolens* ด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตทสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของสาร NGF ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง PC12 ได้⁽⁷⁵⁾ สำหรับการแสดงออกของยีน GAP-43 นั้นเป็นยีนที่ควบคุมการเจริญพัฒนาของเซลล์ประสาท รวมถึงการเพิ่มการงอกของนิวไรท์ แต่ยีนดังกล่าวนี้ยังไม่มีการศึกษาวิจัยในสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดีย จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 จากการศึกษาวิจัยซึ่งมีเฉพาะสารสกัดจากเมล็ดหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลเท่านั้นที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 โดยสารเอทานอลเป็นสารที่ชะออกของสารที่มีขั้วออกจากสมุนไพร ดังนั้นกลุ่มสารที่มีขั้วน่าจะเป็นสารที่สามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 การศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากเห็ด *Pleurotus giganteus* ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ สามารถกระตุ้นการงอกของนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ได้⁽³⁾ ในขณะที่สาร Ginsenoside-Rd จากสารสกัดของ *Panax ginseng* ซึ่งเป็นสารที่มีขั้วสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของ GAP-43 ในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ได้⁽⁷⁶⁾ แต่ทั้งนี้สารสกัดจากเมล็ดของหมามู่ยไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน GAP-43 และ Ten-4 ได้ ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดหมามู่ยอินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซนสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 โดยการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดพืชสมุนไพรที่มีปริมาณสารในกลุ่ม

Polyphenol สามารถกระตุ้นการสร้างนิวโรทีนในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดต่างๆ โดยมีกลไกในการกระตุ้นการสร้างนิวโรทีนที่แตกต่างกัน โดยในการศึกษาวิจัยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีปริมาณของสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ที่สูงกว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดีย และตัวทำละลายชนิดอื่นๆ อีกทั้งพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลสามารถกระตุ้นการสร้างนิวโรทีน โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 และ GAP-43 ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซนสามารถกระตุ้นการสร้างนิวโรทีน โดยผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 แต่พบว่ามี การแสดงออกของยีน Ten-4 ที่น้อยกว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอล โดยสารสกัดดังกล่าวเป็นเพียงสารสกัดหยาบ ซึ่งน่าจะเกิดจากสารสกัดแต่ละชนิดมีสารสำคัญที่ออกมาจากการสกัดนั้นต่างกัน และสารอาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ใช่สารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ แต่การศึกษาวิจัยครั้งนี้มีการศึกษาสารสำคัญในสารสกัดเพียงสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เท่านั้น ดังนั้นควรมีการศึกษาสารสำคัญที่ออกฤทธิ์โดยการแยกสารที่สำคัญต่อไป จากการศึกษาวิจัยสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอล อดีเตพบว่ามี การกระตุ้นการสร้างนิวโรทีน แต่ไม่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง Ten-4 และ GAP-43 โดยน่าจะเกิดจากมีการกระตุ้นการสร้างนิวโรทีนผ่านกลไกที่แตกต่างกัน ดังนั้นควรมีการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการสร้างนิวโรทีนเพิ่มเติมต่อไป และ การศึกษานี้เป็นการศึกษาใน *In vitro* ซึ่งศึกษาเพียงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยใน *In vivo* อาจผลการศึกษาวิจัยที่แตกต่างกันเนื่องจากมีปัจจัยต่างๆเกี่ยวข้อง อาทิเช่น เมตาบอลิซึมของร่างกาย โปรตีน ฮอร์โมนต่างๆ เป็นต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยผล และกลไกของสารสกัดเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียในสัตว์ทดลองต่อไป

5.2 สรุปผลการศึกษาวิจัย และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาวิจัยสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านสารอนุมูลอิสระ และไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท อีกทั้งสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน และสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่มีความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถเพิ่มการงอกของนิวไรท์ (Neurite-bearing cell) และความยาวของนิวไรท์ (Neurite length) ได้ โดยสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซนกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 ในขณะที่สารสกัดจากเมล็ดหมามู๋ไทยด้วยตัวทำละลายเอทานอลกระตุ้นการงอกของนิวไรท์ผ่านการเพิ่มการแสดงออกของยีน Ten-4 และ GAP-43 ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และหมามู๋อินเดียจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการพัฒนาเป็นยาเพื่อป้องกัน หรือรักษาโรคความผิดปกติของระบบประสาทต่อไป แต่ทั้งนี้ควรมีการศึกษาศาสตร์ที่ออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดหยาบโดยการทำให้สารบริสุทธิ์ พร้อมกับแยกสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ และทำการศึกษาดูยอตกลไกทาง Signaling pathway ที่เกี่ยวข้องกับการงอกของนิวไรท์ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a พร้อมกับควรมีการศึกษาใน *In vivo* model ต่อไป

5.3 ข้อจำกัดของการศึกษาวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาศาสตรหยาบจากเมล็ดของหมามู๋ไทย และเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท และเอทานอล ซึ่งสารสำคัญที่ออกฤทธิ์ที่ออกมาแต่ละตัวทำละลายอาจมีสารแตกต่างกัน จากผลการศึกษาพบว่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ และคุณสมบัติในการต้านสารอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน การศึกษาวิจัยทำการศึกษาศาสตรออกฤทธิ์ที่สำคัญเพียง 2 ชนิด คือ ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์เท่านั้น ดังนั้นควรมีการศึกษาศาสตรสำคัญที่ออกฤทธิ์ในแต่ละตัวทำละลาย โดยทำให้สารบริสุทธิ์ และแยกสารที่สำคัญ พร้อมกับศึกษานี้ทำการเก็บตัวอย่างสมุนไพรที่จังหวัดระยองเพียงที่เดียว ดังนั้นปริมาณสารที่สกัดได้อาจแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ ซึ่งอาจเกิดจากวิธีการเก็บเกี่ยว ภูมิประเทศที่ใช้ในการปลูก รวมทั้งดิน หรือปริมาณน้ำฝนในพื้นที่ที่ใช้ปลูก เป็นต้น อีกทั้งยังพบว่าสารสกัดจากเมล็ดหมามู๋อินเดียด้วยตัวทำละลายเอทิล อะซิเตทสามารถกระตุ้นการสร้างนิวไรท์ แต่ไม่มีการเพิ่มการแสดงออกของยีนทั้ง Ten-4 และ GAP-43 จึงน่ามีการกระตุ้นการสร้างนิวไรท์โดยผ่านกลไกอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการสร้างนิวไรท์ ดังนั้นควรมีการศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับการสร้างนิวไรท์เพิ่มเติมต่อไป นอกจากนี้การศึกษาวิจัยนี้ทำการศึกษาผล และไกลของสารสกัดในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด Neuro2a ซึ่งเมื่อทำการศึกษาในสัตว์ทดลองอาจให้ผลที่แตกต่างกันเนื่องจากการศึกษานี้ทำการศึกษาเฉพาะในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเท่านั้น แต่ในสัตว์ทดลองมีหลากหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อการศึกษาวิจัย อาทิเช่น เมตาบอลิ

ซีมของร่างกาย โพรตีน ฮอร์โมน เป็นต้น ดังนั้นควรมีการศึกษาผล และกลไกของสารสกัดจากเมล็ด
ของหมามู่ยไทย และหมามู่ยอินเดียในสัตว์ทดลองต่อไป



รายการอ้างอิง

1. Affairs UNDoEaS. World population ageing 2015. 2015; Available from: http://www.un.org/en/development/desa/population/publications/pdf/ageing/WPA2015_Report.pdf.
2. Alzheimer's A. 2015 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*. 2015 Mar;11(3):332-84.
3. Phan CW, David P, Wong KH, Naidu M, Sabaratnam V. Uridine from *Pleurotus giganteus* and Its Neurite Outgrowth Stimulatory Effects with Underlying Mechanism. *PLoS One*. 2015;10(11):e0143004.
4. Xu J, Sun Y, Wang M, Ren Q, Li S, Wang H, et al. Bioactive Diterpenoids from the Leaves of *Callicarpa macrophylla*. *J Nat Prod*. 2015 Jul 24;78(7):1563-9.
5. Jesky R, Chen H. The neuritogenic and neuroprotective potential of senegenin against Abeta-induced neurotoxicity in PC 12 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Jan 23;16:26.
6. Manyam BV, Dhanasekaran M, Hare TA. Neuroprotective effects of the antiparkinson drug *Mucuna pruriens*. *Phytother Res*. 2004 Sep;18(9):706-12.
7. Phan CW, David P, Naidu M, Wong KH, Sabaratnam V. Neurite outgrowth stimulatory effects of culinary-medicinal mushrooms and their toxicity assessment using differentiating Neuro-2a and embryonic fibroblast BALB/3T3. *BMC Complement Altern Med*. 2013 Oct 11;13:261.
8. Suzuki N, Numakawa T, Chou J, de Vega S, Mizuniwa C, Sekimoto K, et al. Teneurin-4 promotes cellular protrusion formation and neurite outgrowth through focal adhesion kinase signaling. *FASEB J*. 2014 Mar;28(3):1386-97.
9. Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*. 2003 Jan;111(1):3-10.
10. Sheikh S, Safia, Haque E, Mir SS. Neurodegenerative Diseases: Multifactorial Conformational Diseases and Their Therapeutic Interventions. *J Neurodegener Dis*. 2013;2013:563481.

11. Ramanan VK, Saykin AJ. Pathways to neurodegeneration: mechanistic insights from GWAS in Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and related disorders. *Am J Neurodegener Dis*. 2013 Sep 18;2(3):145-75.
12. National AsS, Helpline D. Drug treatments for Alzheimer's disease. 2014.
13. Sainath R, Gallo G. Cytoskeletal and signaling mechanisms of neurite formation. *Cell Tissue Res*. 2015 Jan;359(1):267-78.
14. Flynn KC. The cytoskeleton and neurite initiation. *Bioarchitecture*. 2013 Jul-Aug;3(4):86-109.
15. Budni J, Bellettini-Santos T, Mina F, Garcez ML, Zugno AI. The involvement of BDNF, NGF and GDNF in aging and Alzheimer's disease. *Aging Dis*. 2015 Sep;6(5):331-41.
16. Johnson GV, Jope RS. The role of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) in neuronal growth, plasticity, and degeneration. *Journal of neuroscience research*. 1992 Dec;33(4):505-12.
17. Mishra R, Kaur G. *Tinospora cordifolia* Induces Differentiation and Senescence Pathways in Neuroblastoma Cells. *Mol Neurobiol*. 2015 Aug;52(1):719-33.
18. Ryu JS, Ko K, Lee JW, Park SB, Byun SJ, Jeong EJ, et al. Gangliosides are involved in neural differentiation of human dental pulp-derived stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):266-71.
19. Zhang Q, Zhang ZJ, Wang XH, Ma J, Song YH, Liang M, et al. The prescriptions from Shenghui soup enhanced neurite growth and GAP-43 expression level in PC12 cells. *BMC Complement Altern Med*. 2016 Sep 20;16:369.
20. Suzuki N, Fukushi M, Kosaki K, Doyle AD, de Vega S, Yoshizaki K, et al. Tenascin-R is a novel regulator of oligodendrocyte differentiation and myelination of small-diameter axons in the CNS. *J Neurosci*. 2012 Aug 22;32(34):11586-99.
21. Salto R, Vilchez JD, Giron MD, Cabrera E, Campos N, Manzano M, et al. beta-Hydroxy-beta-Methylbutyrate (HMB) Promotes Neurite Outgrowth in Neuro2a Cells. *PLoS One*. 2015;10(8):e0135614.
22. Ma YZ, Ning N, He WB, Li JW, Hu JF, Chu SF, et al. Clulansine F promotes neuritogenesis in PC12 cells via the ERK signaling pathway. *Acta Pharmacol Sin*. 2013 Dec;34(12):1499-507.

23. Khodosevich K, Monyer H. Signaling involved in neurite outgrowth of postnatally born subventricular zone neurons in vitro. *BMC Neurosci.* 2010 Feb 10;11:18.
24. Gundimeda U, McNeill TH, Schiffman JE, Hinton DR, Gopalakrishna R. Green tea polyphenols potentiate the action of nerve growth factor to induce neuritogenesis: possible role of reactive oxygen species. *J Neurosci Res.* 2010 Dec;88(16):3644-55.
25. Moosavi F, Hosseini R, Saso L, Firuzi O. Modulation of neurotrophic signaling pathways by polyphenols. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:23-42.
26. Tang F, Guo S, Liao H, Yu P, Wang L, Song X, et al. Resveratrol Enhances Neurite Outgrowth and Synaptogenesis Via Sonic Hedgehog Signaling Following Oxygen-Glucose Deprivation/Reoxygenation Injury. *Cellular Physiology and Biochemistry.* 2017;43(2):852-69.
27. Zhang F, Lu Y-F, Wu Q, Liu J, Shi J-S. Resveratrol promotes neurotrophic factor release from astroglia. *Experimental Biology and Medicine.* 2012;237(8):943-8.
28. Liao K-K, Wu M-J, Chen P-Y, Huang S-W, Chiu S-J, Ho C-T, et al. Curcuminoids promote neurite outgrowth in PC12 cells through MAPK/ERK-and PKC-dependent pathways. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2011;60(1):433-43.
29. Xu Y, Ku B, Cui L, Li X, Barish PA, Foster TC, et al. Curcumin reverses impaired hippocampal neurogenesis and increases serotonin receptor 1A mRNA and brain-derived neurotrophic factor expression in chronically stressed rats. *Brain research.* 2007;1162:9-18.
30. Lu Z, Shen Y, Wang T, Cui M, Wang Z, Zhao H, et al. Curcumin promotes neurite outgrowth via reggie-1/flotillin-2 in cortical neurons. *Neuroscience letters.* 2014;559:7-12.
31. Mu X, He G, Cheng Y, Li X, Xu B, Du G. Baicalein exerts neuroprotective effects in 6-hydroxydopamine-induced experimental parkinsonism in vivo and in vitro. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2009;92(4):642-8.
32. Liu Q, Kou J-P, Yu B-Y. Ginsenoside Rg1 protects against hydrogen peroxide-induced cell death in PC12 cells via inhibiting NF- κ B activation. *Neurochemistry international.* 2011;58(1):119-25.

33. Liang W, Ge S, Yang L, Yang M, Ye Z, Yan M, et al. Ginsenosides Rb1 and Rg1 promote proliferation and expression of neurotrophic factors in primary Schwann cell cultures. *Brain research*. 2010;1357:19-25.
34. Kim MS, Yu JM, Kim HJ, Kim HB, Kim ST, Jang SK, et al. Ginsenoside Re and Rd enhance the expression of cholinergic markers and neuronal differentiation in Neuro-2a cells. *Biol Pharm Bull*. 2014;37(5):826-33.
35. Song C, Fang S, Lv G, Mei X. Gastrodin promotes the secretion of brain-derived neurotrophic factor in the injured spinal cord. *Neural regeneration research*. 2013;8(15):1383.
36. Wang H, Xu Y, Yan J, Zhao X, Sun X, Zhang Y, et al. Acteoside protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against β -amyloid-induced cell injury. *Brain research*. 2009;1283:139-47.
37. Chen A, Wang H, Zhang Y, Wang X, Yu L, Xu W, et al. Paeoniflorin exerts neuroprotective effects against glutamate-induced PC12 cellular cytotoxicity by inhibiting apoptosis. *International Journal of Molecular Medicine*. 2017;40(3):825-33.
38. Bhuiyan MMH, Mohibbullah M, Hannan MA, Hong Y-K, Han C-H, Kim YK, et al. The neuritogenic and synaptogenic effects of the ethanolic extract of radix Puerariae in cultured rat hippocampal neurons. *Journal of ethnopharmacology*. 2015;173:172-82.
39. Chen Y-J, Huang X-B, Li Z-X, Yin L-L, Chen W-Q, Li L. Tenuigenin protects cultured hippocampal neurons against methylglyoxal-induced neurotoxicity. *European journal of pharmacology*. 2010;645(1):1-8.
40. Reddy VB, Iuga AO, Shimada SG, LaMotte RH, Lerner EA. Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. *J Neurosci*. 2008 Apr 23;28(17):4331-5.
41. Lampariello LR, Cortelazzo A, Guerranti R, Sticozzi C, Valacchi G. The Magic Velvet Bean of *Mucuna pruriens*. *J Tradit Complement Med*. 2012 Oct-Dec;2(4):331-9.
42. Saha S, Kumar P. An updated review on Taxonomy, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Macuna Pruriens*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013.

43. Tripathi YB, Upadhyay AK. Effect of the alcohol extract of the seeds of *Mucuna pruriens* on free radicals and oxidative stress in albino rats. *Phytother Res*. 2002 Sep;16(6):534-8.
44. Shukla KK, Mahdi AA, Ahmad MK, Shankhwar SN, Rajender S, Jaiswar SP. *Mucuna pruriens* improves male fertility by its action on the hypothalamus-pituitary-gonadal axis. *Fertil Steril*. 2009 Dec;92(6):1934-40.
45. Yadav SK, Prakash J, Chouhan S, Singh SP, Lampariello LR, Cortelazzo A, et al. *Mucuna pruriens* seed extract reduces oxidative stress in nigrostriatal tissue and improves neurobehavioral activity in paraquat-induced Parkinsonian mouse model *Neurochem Int*. 2013 Jun-Oct-Dec;62(8):1039-47.
46. Fung SY, Tan NH, Sim SM. Protective effects of *Mucuna pruriens* seed extract pretreatment against cardiovascular and respiratory depressant effects of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper) venom in rats. *Trop Biomed*. 2010 Dec;27(3):366-72.
47. al. BSe. Comparative evaluation of extract of *Bacopa monnieri* and *Mucuna pruriens* as neuroprotectant in MPTP model of Parkinson's disease. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2016.
48. Kumar P, Saha S. An updated review on taxonomy, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Macuna pruriens*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2013;2(1).
49. Yadav¹ MK, PU, SP, BLP, , Shah³ H. Phytochemistry and pharmacological activity of *Mucuna pruriens*: A review. *International Journal of Green Pharmacy*. 2017:69-73.
50. Chatatikun M, Chiabchalard A. Phytochemical screening and free radical scavenging activities of orange baby carrot and carrot (*Daucus carota* Linn.) root crude extracts. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. 2013;5(4):97-102.
51. Prabst K, Engelhardt H, Ringgeler S, Hubner H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST, and Resazurin. *Methods Mol Biol*. 2017;1601:1-17.

52. Liu HX, Zhang JJ, Zheng P, Zhang Y. Altered expression of MAP-2, GAP-43, and synaptophysin in the hippocampus of rats with chronic cerebral hypoperfusion correlates with cognitive impairment. *Brain Res Mol Brain Res*. 2005 Sep 13;139(1):169-77.
53. Cejka D, Losert D, Wacheck V. Short interfering RNA (siRNA): tool or therapeutic? *Clin Sci (Lond)*. 2006 Jan;110(1):47-58.
54. Lam JKW, Chow MYT, Zhang Y, Leung SWS. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2015 Sep;4(9):e252-.
55. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):343-9.
56. Gorman AM. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(6a):2263-80.
57. Azwanida N. A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med Aromat Plants*. 2015;4(196):2167-0412.1000196.
58. Mbajiuka Chinedu Stanley OEI, Ochei Kingsley Chinedum, Ifediora Afoma Chinwe, Okezie Emmanuel and Odo Nkechinyelu Nwamaka. Antimicrobial Activities of *Mucuna pruriens* (Agbara) on Some Human Pathogens. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences*. 2014; 9(2):9-13.
59. Ragni Vora ANJ, Nitesh C. Joshi. Comparison of extraction efficiency of various methods to extract L-DOPA from *Mucuna pruriens* (L.) DC. *International Journal of Bioassays*. 2017:5343-6.
60. Kumar D, Muthu AK, Smith AA, Manavalan R. In vitro antioxidant activity of various extracts of whole plant of *Mucuna pruriens* (Linn). *International Journal of PharmTech Research*. 2010;2(3):2063-70.
61. Misra L, Wagner H. Extraction of bioactive principles from *Mucuna pruriens* seeds. 2007.

62. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal*. 2014;28(3):1317-30.
63. LePage KT, Dickey RW, Gerwick WH, Jester EL, Murray TF. On the use of neuro-2a neuroblastoma cells versus intact neurons in primary culture for neurotoxicity studies. *Critical Reviews™ in Neurobiology*. 2005;17(1).
64. Tremblay RG, Sikorska M, Sandhu JK, Lanthier P, Ribocco-Lutkiewicz M, Bani-Yaghoub M. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. *Journal of neuroscience methods*. 2010;186(1):60-7.
65. Lakshmanan GMA. Comparative Study on Antioxidant Activities of Black and White Seed Varieties of Cow Hedge *Mucuna pruriens* L. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*. 2012;3(5).
66. Riaz M, Shahid M, Jamil A, Saqib M. In vitro antioxidant potential of selected aphrodisiac medicinal plants. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2017 Apr-Jun;31(2):419-24.
67. Sonpetkar J, Nipate S, Shenoy P, Chaudhari P. In vitro antioxidant activity of ethanolic extract of *Mucuna pruriens* (L.) DC. Seeds. *J Pharm Res*. 2012;5(5):2769.
68. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Duellman S, Benink HA, Worzella TJ, et al. Cell viability assays. 2016.
69. Ma H, Johnson SL, DaSilva NA, Liu Y, Yuan T, Seeram NP. Protective Effects of *Mucuna* Seed Extract against Oxidative and Inflammatory Stress in Murine Microglia and Human Neuroblastoma Cells. *The FASEB Journal*. 2017;31(1 Supplement):lb412-lb.
70. Cassani E, Cilia R, Laguna J, Barichella M, Contin M, Cereda E, et al. *Mucuna pruriens* for Parkinson's disease: Low-cost preparation method, laboratory measures and pharmacokinetics profile. *Journal of the neurological sciences*. 2016;365:175-80.
71. Gautam B, Vadivel V, Stuetz W, Biesalski HK. Bioactive compounds extracted from Indian wild legume seeds: antioxidant and type II diabetes-related enzyme inhibition properties. *International journal of food sciences and nutrition*. 2012;63(2):242-5.

72. Kumar P, Rawat A, Keshari AK, Singh AK, Maity S, De A, et al. Antiproliferative effect of isolated isoquinoline alkaloid from *Mucuna pruriens* seeds in hepatic carcinoma cells. *Natural product research*. 2016;30(4):460-3.
73. Wang YP, Wang ZF, Zhang YC, Tian Q, Wang JZ. Effect of amyloid peptides on serum withdrawal-induced cell differentiation and cell viability. *Cell Res*. 2004 Dec;14(6):467-72.
74. Zhang S-J, Luo D, Li L, Tan R-R, Xu Q-Q, Qin J, et al. Ethyl Acetate Extract Components of Bushen-Yizhi Formula Provides Neuroprotection against Scopolamine-induced Cognitive Impairment. *Scientific reports*. 2017;7(1):9824.
75. Xu J, Ji F, Sun X, Cao X, Li S, Ohizumi Y, et al. Characterization and biological evaluation of diterpenoids from *Casearia graveolens*. *Journal of natural products*. 2015;78(11):2648-56.
76. Wu S-D, Xia F, Lin X-M, Duan K-L, Wang F, Lu Q-L, et al. Ginsenoside-Rd promotes neurite outgrowth of PC12 cells through MAPK/ERK-and PI3K/AKT-dependent pathways. *International journal of molecular sciences*. 2016;17(2):177.



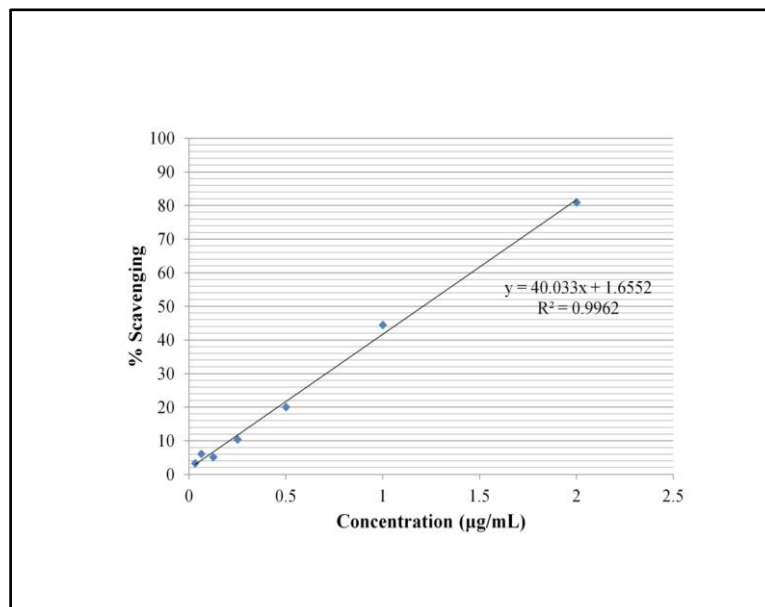
ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

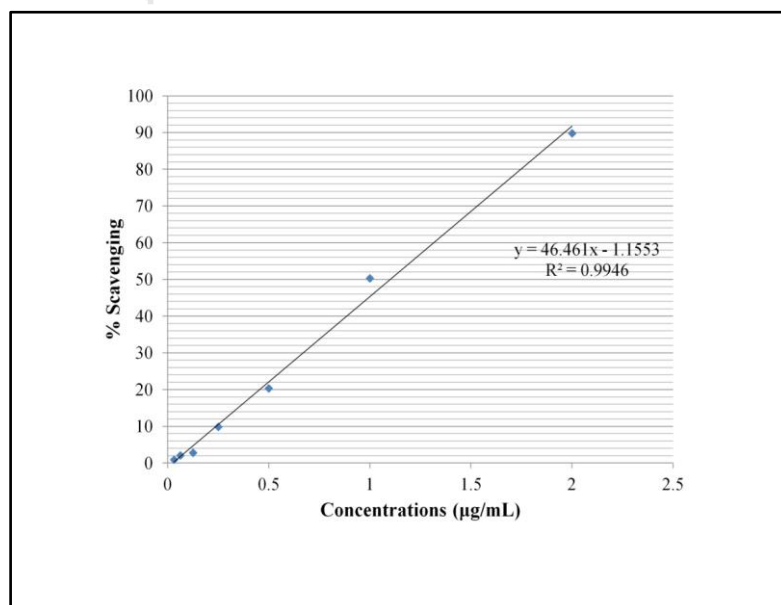
ข้อมูลจากการทดลอง

1. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท เอทานอล ด้วยวิธี DPPH assay

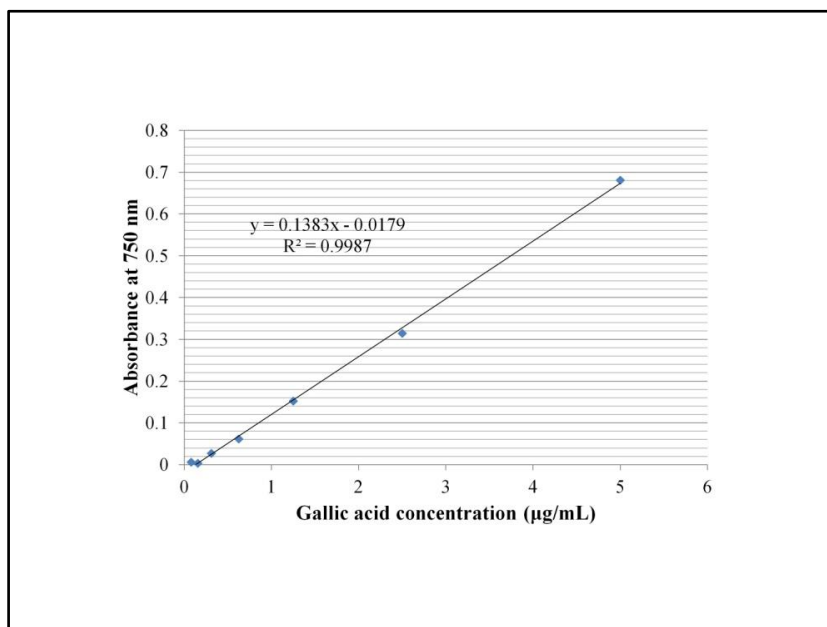


2. กราฟมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดเมล็ดของหมามุ่ยไทย และเมล็ดของหมามุ่ยอินเดียที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท เอทานอล ด้วยวิธี ABTS assay

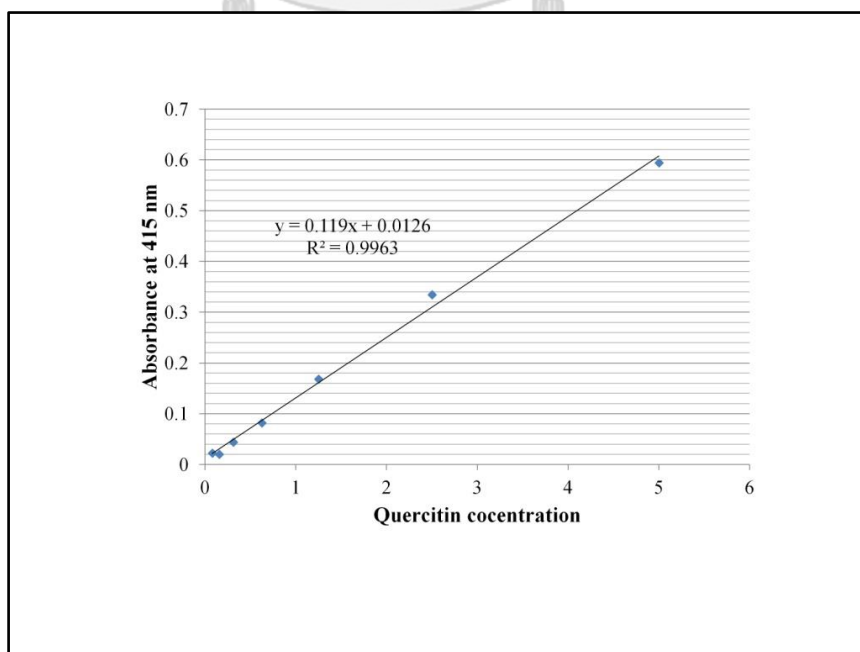
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



3. กราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกสำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกในสารสกัดเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท เอทานอล ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu method



4. กราฟมาตรฐานของแควอซิทินสำหรับใช้ในการคำนวณหาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ในสารสกัดเมล็ดของหมามู่ยไทย และเมล็ดของหมามู่ยอินเดียที่สกัดด้วยตัวทำละลายเฮกเซน เอทิล อะซิเตท เอทานอล ด้วยวิธี Aluminium chloride colorimetric method



ภาคผนวก ข

น้ำยา และสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเซลล์เพาะเลี้ยง

- 10%FBS DMEM เตรียมจาก DMEM ปริมาตร 44 mL รวมกับ น้ำยา HAMF12 ปริมาตร 44 mL จากนั้นทำการเติม FBS ปริมาตร 10 mL พร้อมกับน้ำยา MEMNESS 1 mL และสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin/Streptomycin 1 mL แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

- 1%FBS DMEM เตรียมจาก DMEM ปริมาตร 24.5 mL รวมกับ น้ำยา HAMF12 ปริมาตร 24.5 mL จากนั้นทำการเติม FBS ปริมาตร 500 μ L พร้อมกับน้ำยา MEMNESS 500 μ L และสุดท้ายเติมยาปฏิชีวนะ Penicillin/Streptomycin 500 μ L แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

2. MTT reagent

ความเข้มข้นของน้ำยา MTT ที่ใช้คือ 5 mg/mL สามารถเตรียมได้โดยการชั่งสาร MTT ปริมาณ 250 mg ละลายใน 1X PBS ปริมาตร 50 mL จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วนำมากรองผ่าน filter ขนาด 0.22 ไมครอน ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

3. 1X phosphate buffer saline pH 7.4

โดยทำการเจือจางจาก 10X PBS โดยนำ PBS ความเข้มข้น 10X ปริมาตร 100 mL ผสมกับ น้ำ Milli Q 900 mL แล้วทำการอบด้วยการ autoclave เพื่อฆ่าเชื้อ แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C

4. น้ำยา DPPH ความเข้มข้น 2.5 มิลลิโมลาร์

เตรียมน้ำยา DPPH ปริมาตร 50 mL โดยชั่งสาร DPPH 4.929 กรัม ละลายในสารละลายเมทานอลที่ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 mL จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตร โดยมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ในช่วง 0.7 ± 0.2 จากนั้นทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C โดยปราศจากแสง

5. สารละลายเคออสิทิน

สารเคออสิทินที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมได้จากชั่งสารเคออสิทิน ปริมาณ 20 มิลลิกรัม ละลายในสารละลายเอทานอลความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

6. สารละลาย L-ascorbic acid

สาร L-ascorbic acid ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเตรียมได้จากการชั่งสาร L-ascorbic acid 20 มิลลิกรัมละลายในสารละลายเมทานอลปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

7. น้ำยา ABTS ความเข้มข้น 7 มิลลิโมลาร์

สามารถเตรียมได้จากการชั่งสาร ABTS ปริมาณ 144 มิลลิกรัม แล้วทำการละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

8. สาร Potassium persulfate ความเข้มข้น 2.45 มิลลิโมลาร์

สาร Potassium persulfate 50 มิลลิลิตร เตรียมได้จากการชั่งสาร Potassium persulfate ปริมาณ 33.1 มิลลิกรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

9. ABTS working reagent

เตรียมโดยทำการผสมน้ำยา ABTS กับสาร Potassium persulfate ในอัตราส่วน 8:12 มิลลิลิตร สารที่ได้คือ $\text{ABTS}^{\cdot+}$ จากนั้นทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงโดยปราศจากแสง

10. สารละลาย Sodium carbonate ความเข้มข้น 1 โมลาร์

สามารถเตรียมได้โดยการชั่งสาร Sodium carbonate ปริมาณ 10.59885 กรัม แล้วทำการละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

11. 10% Folin-Ciocalteu Phenol reagent

เตรียมได้จาก 100% Folin-Ciocalteu Phenol reagent ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 18 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

12. 10% Aluminium chloride

เตรียมได้จากการชั่งสาร Aluminium chloride ปริมาณ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

13. Sodium acetate ความเข้มข้น 1 โมลาร์

เตรียมได้จากการชั่งสาร Sodium acetate ปริมาณ 3.28 กรัม แล้วละลายในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตรแล้ว ทำการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C



ภาคผนวก ค

คำอธิบายสัญลักษณ์ และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

คำย่อ	คำอธิบาย
N2a	Murine neuroblastoma (Neuro2a)
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
FBS	Fetal bovine serum
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffer saline
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DPPH	1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical
ABTS	2, 2'-azino-bis (3 ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)
siRNA	Small interfering RNA
GAP-43	Growth associated protein 43
Ten-4	Teneurin 4
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
PCR	Polymerase chain reaction
RT	Reverse transcriptase
cDNA	complementary DNA
RNA	Ribonucleic acid
DNA	Deoxyribonucleic acid
MIH	สารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยเฮกเซน
MIEA	สารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยเอทิลอะซิเตท
MIE	สารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋อินเดียด้วยเอทานอล
MTH	สารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยเฮกเซน
MTEA	สารสกัดจากเมล็ดของหมามู๋ไทยด้วยเอทิลอะซิเตท

MTE	สารสกัดจากเมล็ดของหมามุ่ยไทยด้วยเอทานอล
mL	มิลลิลิตร
%	เปอร์เซ็นต์
μ L	ไมโครลิตร
$^{\circ}$ C	องศาเซลเซียส
μ M	ไมโครโมลาร์



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสุทิน วันสวัสดิ์ เกิดเมื่อวันที่ 23 เมษายน พ.ศ.2535 ที่จังหวัดระยอง จบการศึกษา ระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตร์บัณฑิต เกียรตินิยมอันดับ 2 สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ปีการศึกษา 2557 และเข้ารับการศึกษาระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2558 ในขณะที่เข้ารับการศึกษ ได้รับทุนอุดหนุนการศึกษาฯ 72 พรรษา (เฉพาะค่าเล่าเรียน) และทุนอุดหนุนการวิจัย 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 36 ครั้งที่ 3/2560 จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

