



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการต้านโรคซึมเศร้า: กลไกในระดับโมเลกุลผ่านตัวขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนชนิดต่างๆ

Antidepressant effect of medicinal herbal extracts: molecular
mechanism via various monoamine neurotransmitter
transporters

โดย

ผศ. ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ และคณะ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากทุนงบประมาณแผ่นดิน 2557 (ปีที่ 2)

กิตติกรรมประกาศ

ความสำเร็จของโครงการวิจัยนี้ เกิดขึ้นได้ เพราะคณะผู้วิจัยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก ทุนงบประมาณแผ่นดิน ปี 2557 (ปีที่ 2) นอกจากนี้ คณะผู้วิจัย ยังได้รับการสนับสนุนด้านวัสดุ อุปกรณ์ ครุภัณฑ์วิจัย และอาคารสถานที่ทำวิจัย จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย ขอขอบพระคุณหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคนิคการแพทย์ หลักสูตรบัณฑิตศึกษา สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการผลักดันให้การดำเนินโครงการวิจัยนี้ สำเร็จลุล่วงอย่างมีประสิทธิภาพ โครงการพัฒนาศูนย์ความเป็นเลิศด้านโอมิกส์-นาโน เมดิคัล เทคโนโลยี (Center for Excellence in Omics-Nano Medical Technology Project) และโครงการศูนย์นวัตกรรมเพื่อการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยี วิจัย ทางห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ ที่กรุณาเอื้อเพื่อให้ใช้เครื่องมือในการวิจัย สุดท้ายนี้ ขอขอบพระคุณฝ่ายวิจัยคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนให้การดำเนินโครงการประสบความสำเร็จ และเป็นรากฐานสำหรับโครงการต่อไป ในศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยสำหรับงานวิจัยในสาขาประสาทยุติศาสตร์

ชื่อโครงการวิจัย

ฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการต้านโรคซึมเศร้า: กลไกในระดับโมเลกุลผ่านตัวขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนชนิดต่างๆ

Antidepressant effect of medicinal herbal extracts: molecular mechanism via various monoamine neurotransmitter transporters

ชื่อคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ

ภาควิชาเคมีคลินิก คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์ 02-2181081 ต่อ 313 โทรสาร 02-2181082

นิติตช่วยงานวิจัย

1. นิติตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอณู
ทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่

นางสาววาลูกา พลายงาม

นางสาววราพร รักชิตะวัฒนา

นางสาวอัญชลี ประสารสุขลาภ

2. นิติตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอณู
ทางการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้แก่

นางสาวลักขิกา ธเนศผาติสุข

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2557 จำนวนเงิน 1,800,000 บาท

ระยะเวลาการทำวิจัย 1.5 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2556 ถึง 31 มีนาคม 2558

บทคัดย่อ

โรคซึมเศร้าเป็นโรคที่เกิดจากพหุปัจจัย รวมไปถึงความผิดปกติของระบบประสาทโมโนเอมีนเออร์จิก ในปัจจุบัน โรคซึมเศร้าเป็นปัญหาสาธารณสุขทั้งในประเทศไทย และระดับโลก ส่งผลมหาศาลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย และครอบครัว โดยผู้ป่วยต้องกินยาต้านโรคซึมเศร้าเป็นระยะเวลานาน ซึ่งนอกจากมีราคาแพงแล้ว ยังมีผลข้างเคียงของยา และมีประสิทธิภาพไม่ดีนัก ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงศึกษาหาสารต้านโรคซึมเศร้าชนิดใหม่ที่ให้ผลข้างเคียงต่ำ มีประสิทธิภาพสูง และราคาไม่แพง ทั้งนี้ ได้ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรัดเกล้า ใบสะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen) ใบชี้เหล็ก (*Senna siamea* (Lam.)) และบัวบก (*Centella asiatica* (L.)) ที่สกัดด้วยสารละลายเอทานอล และน้ำ ต่อการต้านโรคซึมเศร้าโดยใช้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด LAN-5 เป็นแบบในการทดลอง โดยมุ่งวิเคราะห์ผลของสารสกัดต่อสองกลไก คือ การแสดงออกของยีน hDAT, hSERT และ hNET ในระดับ mRNA โดยใช้เทคนิค RT-PCR และการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน โดพามีน และนอร์อิพิเนฟริน โดยใช้เทคนิค uptake assay ด้วยชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay kit และใช้ยาต้านโรคซึมเศร้า fluoxetine, desipramine และ GBR12935 เป็นยาอ้างอิงในการทดสอบ นอกจากนี้ยังทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรรัดเกล้าต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้เทคนิค MTT assay จากการศึกษาพบว่า สารสกัดสมุนไพรรัดเกล้าทั้ง 3 ชนิด ทั้งที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET ได้ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สารสกัดใบสะระแหน่ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน และซีโรโทนินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสารสกัดสมุนไพรรัดเกล้าที่ศึกษานี้ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 นอกจากนี้ คณะผู้วิจัย ได้พัฒนาเทคนิค HPLC เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ในสมองหนูส่วน hippocampus เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำและจันทน์เทศ

Abstract

Major depressive disorder (MDD) is a multifactorial disease including the abnormalities of monoaminergic neuronal system. At present, MDD is a public health problem nationwide and worldwide, which enormously leads to the quality of life of patients and their families. MDD patients have to be treated for a long period using antidepressants, which are not only expensive, but cause unfavorable side effects and ineffective. Therefore, our research group has attempted to study potential antidepressants with low side effects, high efficiency and reasonable price. In this study, we investigated the mechanisms of action of medicinal extracts, leaves of *Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen and *Senna siamea* (Lam.) and whole plants of *Centella asiatica* (Lam.), using LAN-5 neuroblastoma cell line as a model. Extractions were done using ethanol and water. We focused our study on inhibitory effects of herb extracts on two mechanisms, mRNA expression of human dopamine transporter (hDAT), human serotonin transporter (hSERT) and human norepinephrine transporter (hNET) and activity of all three neurotransmitter transporters by uptake assay using neurotransmitter transporter uptake assay kit with the utilization of fluoxetine, desipramine and GBR12935 as the reference drugs. In addition, MTT assay was employed for toxicity study. We discovered that all of the extracts significantly reduced the expression of hDAT, hSERT and hNET genes in LAN-5 ($P < 0.05$). The extract derived from *M. cordifolia* significantly inhibited the activity of DAT and SERT in LAN-5 ($P < 0.05$) and all of extracts were not toxic to LAN-5. In addition, we developed the HPLC approach to measure the levels of monoamine neurotransmitters in the hippocampus of Sprague Dawley rats orally administered the extracts derived from *Kaempferia parviflora*) and *Myristica fragrans* for 2 weeks daily.

สารบัญเรื่อง

vi

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อภาษาไทย.....	iv
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	v
สารบัญเรื่อง.....	vi
สารบัญตาราง.....	xi
สารบัญภาพ.....	xii
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	2
1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย.....	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 โรคซึมเศร้า.....	4
2.2 ลักษณะอาการของโรคซึมเศร้า.....	4

2.3 สาเหตุของโรคซึมเศร้า.....	5
2.3.1 สาเหตุทางด้านพันธุกรรม.....	5
2.3.2 สาเหตุจากความผิดปกติของสารชีวเคมีภายในร่างกาย.....	6
2.3.3 สาเหตุจากสังคม และสภาวะแวดล้อม.....	6
2.3.4 สาเหตุอื่นๆที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้า.....	7
2.4 การวินิจฉัยโรคซึมเศร้า.....	7
2.5 การรักษาโรคซึมเศร้า.....	9
2.6 สารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน.....	11
2.6.1 ซีโรโทนิน.....	12
2.6.2 โดพามีน.....	14
2.6.3 นอร์อิพิเนพริน.....	17
2.7 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน.....	19
2.7.1 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทซีโรโทนิน.....	22
2.7.2 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน.....	22
2.7.3 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทนอร์อิพิเนพริน.....	22
2.8 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย.....	23
2.8.1 สะระแหน่.....	25
2.8.2 บัวบก.....	26

2.8.3 ซึ่เหล็ก.....	27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	28
3.1 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	28
3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย.....	34
3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง.....	34
3.2.2 ตัวอย่างของสมุนไพร.....	35
3.2.3 ตัวอย่างของยาต้านโรคซึมเศร้า.....	35
3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรและสารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าที่ใช้ในการศึกษาวิจัย.....	36
3.3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีมาเซอร์ชัน.....	36
3.3.2 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายน้ำโดยวิธีต้ม.....	36
3.3.3 การเตรียมยาต้านโรคซึมเศร้า.....	37
3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคซึมเศร้าของสารสกัดจากสมุนไพร.....	37
3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารสกัดจากสมุนไพร และยาต้านโรคซึมเศร้าด้วยวิธี MTT assay.....	37
3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออก ในระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	38
3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้าที่มีผลต่อ	

อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้ชุด น้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay kit.....	44
3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟรินและ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี MTT Assay.....	45
3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.....	48
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	49
4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพร.....	49
4.2 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอลโดยวิธีมาเซอร์ชัน.....	49
4.3 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยน้ำโดยวิธีการต้ม.....	49
4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารสกัดจากสมุนไพร และยาต้านโรคซึมเศร้าด้วยวิธี MTT assay.....	50
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออก ในระดับ mRNA ของ ยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR).....	55
4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้า ที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporters uptake assay kit.....	60

4.7 ผลการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสาร ทดสอบที่ใช้ในการทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาท โดพามีน, นอร์อิพิเนฟรินและ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี MTT Assay.....	70
4.8 ผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>) และลูกจันทน์เทศ (<i>Myristica fragrans</i>) ต่อระดับของ monoamine neurotransmitters ในสมอง หนูส่วน hippocampus.....	75
บทที่ 5 สรุป อภิปราย และวิจารณ์ผลการทดลอง.....	78
5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย.....	78
5.2 สรุป และข้อเสนอแนะ.....	83
รายการอ้างอิง.....	84
ภาคผนวก.....	96
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย.....	100

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ.....	40
ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ.....	41
ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจศึกษา.....	42
ตารางที่ 3.4 Primers จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนและขนาดของ ผลิตภัณฑ์.....	43
ตารางที่ 3.5 ปฏิกริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน hDAT, hNET, hSERT และ GAPDH.....	43
ตารางที่ 3.6 สารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้า ที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	46
ตารางที่ 3.7 การแบ่งกลุ่มทดสอบเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้า ที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5.....	47
ตารางที่ 4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพร.....	49
ตารางที่ 4.2 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ.....	50
ตารางที่ 4.3 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับสาร monoamine neurotransmitters.....	77
ตารางที่ 5.1 โปรตีนไคเนสที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาท monoaminergic.....	82
ตารางที่ 5.2 สารประกอบในสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้า.....	83

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1	โครงสร้างทางเคมีของซีโรโทนิน (Serotonin) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน.....	12
ภาพที่ 2.2	กลไกการสังเคราะห์ และสลายของซีโรโทนินภายในกลุ่มเซลล์ที่สร้างซีโรโทนิน....	14
ภาพที่ 2.3	กลไกการสังเคราะห์โดพามีนภายในระบบประสาทของร่างกาย.....	15
ภาพที่ 2.4	กระบวนการสลายของโดพามีนในเซลล์ประสาทโดยเอนไซม์ MAO และ COMT.....	16
ภาพที่ 2.5	กระบวนการสังเคราะห์นอร์อิพิเนฟรินจากกรดอะมิโนชนิด Tyrosine ภายในร่างกาย.....	18
ภาพที่ 2.6	กระบวนการสลายของนอร์อิพิเนฟรินโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย.....	19
ภาพที่ 2.7	ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ประสาทประกอบด้วยโดเมน 12 โดเมน และปลายทั้ง 2 ด้านของสายโปรตีนอยู่ในเซลล์.....	20
ภาพที่ 2.8	รูปแสดงกลไกการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporter).....	21
ภาพที่ 2.9	กลไกการขนส่ง Monoamine เข้าสู่เซลล์ผ่าน MATs.....	23
ภาพที่ 2.10	ลักษณะโครงสร้างของต้นสระแหน่.....	25
ภาพที่ 2.11	ลักษณะโครงสร้างของต้นบัวบก.....	26
ภาพที่ 2.12	ลักษณะโครงสร้างของต้นขี้เหล็ก.....	27
ภาพที่ 3.1	โครงสร้างโมเลกุลของยา fluoxetine hydrochloride.....	35

ภาพที่ 3.2	โครงสร้างโมเลกุลของยา GBR12935 dihydrochloride.....	35
ภาพที่ 3.3	โครงสร้างโมเลกุลของยา desipramine hydrochloride.....	36
ภาพที่ 3.4	ปฏิกิริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay.....	37
ภาพที่ 3.5	หลักการของชุดน้ำยา Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit.....	44
ภาพที่ 3.6	กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงฟลูออเรสเซนซ์ (RFU) และระยะเวลา (min).....	47
ภาพที่ 4.1	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสะระแหน่ ที่สกัดจากเอทานอล และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL.....	51
ภาพที่ 4.2	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ที่สกัดจากเอทานอล และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL.....	52
ภาพที่ 4.3	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากบัวบก ที่สกัดจากเอทานอล และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL.....	53
ภาพที่ 4.4	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 µM.....	54
ภาพที่ 4.5	ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LAN-5 ด้วยวิธี Gel electrophoresis เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดใบขี้เหล็ก, ใบสะระแหน่ และ บัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	56
ภาพที่ 4.6	ผลการแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับ สารสกัดใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	57

ภาพที่ 4.7	ผลการแสดงออกของยีน hNET ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัด ใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	58
ภาพที่ 4.8	ผลการแสดงออกของยีน hSERT ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับ สารสกัดใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	59
ภาพที่ 4.9	ผลอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 30 นาที.....	61
ภาพที่ 4.10	ผลอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 30 นาที.....	62
ภาพที่ 4.11	ผลอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 30 นาที.....	63
ภาพที่ 4.12	ผลอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 30 นาที.....	64
ภาพที่ 4.13	ผลอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนทั้ง 3 ชนิด ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบขี้เหล็ก ด้วยตัวทำละลาย เอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 µg/mL เป็นเวลา 30 นาที.....	63
ภาพที่ 4.14	ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ Barakol.....	66
ภาพที่ 4.15	Fluorescent spectrum สารสกัดใบสะระแหน่ ใบขี้เหล็ก และบัวบก สกัดจากเอทา นอลที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 480-600 nm	67

ภาพที่ 4.16	Fluorescent spectrum ของสารสกัดใบชะระแห่น, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ที่สกัดจากน้ำ ที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 480-600 nm.....	68
ภาพที่ 4.17	Fluorescent spectrum ของสารสกัดใบชะระแห่น, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ที่สกัดจากเอทานอล และน้ำ ที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 520 nm.....	69
ภาพที่ 4.18	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที.....	71
ภาพที่ 4.19	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที.....	72
ภาพที่ 4.20	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที.....	73
ภาพที่ 4.21	ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที.....	74
ภาพที่ 4.22	แสดงลักษณะและองค์ประกอบสำคัญของเหง้ากระชายดำ (<i>Kaempferia parviflora</i>) และลูกจันทน์เทศ(<i>Myristica fragrans</i>).....	75
ภาพที่ 4.23	แสดงโครมาโตแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณ norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) และ dopamine ด้วยเทคนิค HPLC ในสมองหนูส่วน hippocampus.....	76

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

สังคมทั่วโลกในปัจจุบันตลอดจนสังคมในประเทศไทยมีปัญหาต่าง ๆ เพิ่มมากขึ้นจากเดิม ทำให้สภาพความเป็นอยู่ของประชากรเปลี่ยนแปลงไป จึงส่งผลกระทบต่อสภาพร่างกาย และ สภาพจิตใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาทางด้านสุขภาพจิต ซึ่งจากสภาพสังคมปัจจุบัน ที่มีแต่ความวุ่นวาย และการแก่งแย่งแข่งขันกัน ทำให้อัตราของผู้ป่วยที่มีอาการทางระบบประสาท เพิ่มมากขึ้น โดยโรคทางระบบประสาทที่น่าสนใจและมีแนวโน้มว่าจะมีประชากรป่วยเพิ่มมากขึ้น ในอนาคต คือ โรคซึมเศร้า (Major Depressive disorder) สำหรับผู้ป่วยเป็นโรคซึมเศร้า จะมีความผิดปกติของอารมณ์ โดยที่ผู้ป่วยจะรู้สึกหดหู่ ไม่มีชีวิตชีวา จะคิดถึงแต่เรื่องร้ายๆ อยู่ตลอด คิดว่าตนเองไร้ค่า ไม่สามารถทำประโยชน์ให้แก่ใครได้ และทำงานต่างๆ ได้อย่าง ไม่เต็มประสิทธิภาพ โดยสาเหตุอาจเกิดจากการได้รับผลกระทบจากการสูญเสีย เช่น สูญเสียงาน สูญเสียคนที่รัก หรือเกิดจากความผิดปกติภายในร่างกายของผู้ป่วยเอง ซึ่งโรคนี้เป็นสาเหตุสำคัญ ที่ทำให้เกิดความคิดที่จะฆ่าตัวตายในผู้ป่วยได้ ดังนั้นโรคซึมเศร้าจึงเป็นโรคที่ทำให้มีอัตราการตาย ของประชากรเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยโรคซึมเศร้าจะไม่สามารถ ทำงานใน การทำงานใดๆ ได้อีกด้วย ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อสังคมที่จะนำกำลังคนมาพัฒนาสังคม ทำให้ขาดแคลนบุคลากรที่จะมาพัฒนาสังคมนั้นๆ ได้ โดยจากข้อมูลขององค์การอนามัยโลก ในปี ค.ศ. 2010 ได้ระบุไว้ว่า ประชาชนทั่วโลกประมาณ 121 ล้านคนนั้นป่วยเป็นโรคซึมเศร้า และมีแนวโน้มว่าจะมีผู้ป่วยเป็นโรคซึมเศร้าเพิ่มสูงขึ้นเป็นอันดับสองรองจากโรคหัวใจ ในปี ค.ศ. 2020

(1) สำหรับในประเทศไทยจากการสำรวจข้อมูลของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าในปี พ.ศ. 2553 พบว่ามีผู้ป่วยโรคซึมเศร้าประมาณร้อยละ 2 ของประชากรทั้งหมด ซึ่งคิดเป็นตัวเลขแล้วมีผู้ป่วย ถึง 150,000 ราย (2) ถึงแม้ว่าในปัจจุบันนั้นโรคซึมเศร้าจะสามารถวินิจฉัยโรคได้ง่าย มียาที่สามารถรักษา และ ระวังอาการของโรคได้ แต่ก็ยังมีผู้ป่วยที่เข้ารับการรักษาเพียง 25% ของผู้ป่วย ทั้งหมด เนื่องจากผู้ป่วยโรคซึมเศร้านั้นจะไม่ยอมรับว่าตนเองป่วยเป็นโรคซึมเศร้าจึงไม่ไป พบแพทย์เพื่อรับการรักษา (1) นอกจากนี้ยาที่ใช้รักษาโรคซึมเศร้ามียาราคาแพง มีผลข้างเคียง จากการทานยาก่อนข้างมาก ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้ป่วย และการรักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคนี้จะต้อง ทานยาอยู่ตลอดจนกว่าจะมีอาการดีขึ้น ซึ่งใช้เวลาประมาณ 4-9 เดือน โดยระหว่างนี้ไม่สามารถ

หยุดยาได้ (3) จึงทำให้ผู้ป่วยต้องสูญเสียค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคนี้เป็นจำนวนมาก และมีผลข้างเคียงของยาเกิดขึ้นร่วมด้วย

ดังนั้น คณะผู้วิจัยจึงมีความประสงค์ที่จะนำสารสกัดสมุนไพรมาศึกษาฤทธิ์ในการรักษาหรือป้องกันโรคซึมเศร้า โดยศึกษาผ่านทางกลไกการยับยั้งการทำงาน และการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporters, MATs) ภายในเซลล์ประสาทพหุเล็ง ซึ่งทำให้ปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine) บริเวณช่องว่างไซแนปส์เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้บรรเทาอาการของผู้ป่วยได้ โดยจะทำการศึกษาเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของยารักษาโรคซึมเศร้าที่ใช้ในปัจจุบันว่าฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรให้ผลออกฤทธิ์ได้ใกล้เคียงกับฤทธิ์ของยา นอกจากนี้ยังนำสารสกัดสมุนไพรมาทดสอบด้วยว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทพหุเล็งหรือไม่ โดยผลการวิจัยที่ได้จะมีประโยชน์ในแง่ของ การรักษา และการป้องกันการเกิดโรคซึมเศร้าโดยใช้สารสกัดสมุนไพร เพื่อลดผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการใช้ยา เนื่องจากสารสกัดสมุนไพรอาจไม่มีสารที่เป็นพิษเท่ากับสารเคมีในยา และยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการรักษาโรคซึมเศร้า ทำให้ผู้ป่วยโรคซึมเศร้าไม่ต้องสูญเสียทรัพย์สินในการรักษามากเกินไป นอกจากนี้บุคคลทั่วไปยังสามารถนำสารสกัดสมุนไพรมาใช้ในการป้องกันอาการของโรคซึมเศร้าด้วยตนเองได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

- 1.2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพรต่อเซลล์ประสาทพหุเล็งชนิด LAN-5
- 1.2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้า ผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET ในระดับ mRNA
- 1.2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากสมุนไพรในการต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยที่ทำการศึกษากับเซลล์ประสาทพหุเล็ง คือ LAN-5 โดยเป็นการศึกษาประเภท *In vitro* Study และยารักษาโรคซึมเศร้าที่ใช้ในงานวิจัยเป็นยาที่ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนเท่านั้น

1.4 ข้อจำกัดของการวิจัย

- 1.4.1 การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการทดสอบในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงซึ่งอาจได้ผลการทดสอบที่คลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง เนื่องจากเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงนั้นไม่มีระบบการทำงานที่ซับซ้อนเหมือนกับระบบการทำงานต่างๆภายในร่างกายของมนุษย์ โดยงานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะนำไปศึกษาในสัตว์ทดลองเพื่อนำไปพัฒนาต่อไปในอนาคต
- 1.4.2 ยาต้านโรคซึมเศร้าที่ใช้ในงานวิจัยมีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่ fluoxetine hydrochloride มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน, desipramine hydrochloride มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน และ GBR12935 dihydrochloride มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

- 1.5.1 เข้าใจถึงสาเหตุ อาการ และการรักษาโรคซึมเศร้าที่มีการศึกษาอยู่ในปัจจุบัน
- 1.5.2 องค์ความรู้ใหม่ที่เกิดขึ้นสามารถนำไปต่อยอดการวิจัย เพื่อพัฒนาเป็นยาสมุนไพรสำหรับการรักษา หรือ ป้องกันการเกิดโรคซึมเศร้าที่ไม่มีผลข้างเคียง หรือ ให้ผลข้างเคียงน้อยกว่ายารักษาโรคซึมเศร้าที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน และสามารถลดค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยในการรักษาได้ อีกทั้งยังนำไปสู่การศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาแนวทางการรักษาอาการของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น
- 1.5.3 คาดว่าจะตีพิมพ์ผลงานของโครงการวิจัยนี้ในวารสารวิชาการระดับนานาชาติที่เกี่ยวข้องได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคซึมเศร้า (Major Depressive Disorder)

โรคซึมเศร้า เป็นโรคทางระบบประสาทชนิดหนึ่งที่มีผู้ป่วยมีอาการผิดปกติทางด้านจิตใจ ความรู้สึก และอารมณ์ นอกจากนี้ ผู้ป่วยยังมีอาการนอนไม่หลับ และไม่อยากอาหารรวมอยู่ด้วย ซึ่งจากอาการผิดปกติดังกล่าวนี้จะทำให้ผู้ป่วยได้รับผลกระทบต่อการดำเนินชีวิตประจำวัน ไม่มีจิตใจในการกระทำใด ๆ เนื่องจากผู้ป่วยจะคิดเพียงว่าตนเองนั้นไร้ค่า ไม่มีประโยชน์ต่อบุคคลอื่น มีความรู้สึกหดหู่ และมีความรู้สึกเศร้าอยู่ตลอดเวลา ถ้าผู้ป่วยมีความรู้สึกดังกล่าวอยู่ตลอด และไม่สามารรักษาได้ ก็จะเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยมีความคิดที่จะฆ่าตัวตาย ซึ่งจากการสำรวจผู้ป่วยโรคซึมเศร้าในประเทศอเมริกานั้นพบว่า ผู้ป่วยร้อยละ 3.4 จะฆ่าตัวตาย และร้อยละ 60 ของบุคคลที่ฆ่าตัวตายสำเร็จนั้นป่วยเป็นโรคซึมเศร้า (4)

2.2 ลักษณะอาการของโรคซึมเศร้า

อาการของผู้ป่วยที่เป็นโรคซึมเศร้านั้น จะมีการเปลี่ยนแปลงต่างๆเกิดขึ้น โดยสามารถแบ่งอาการการเปลี่ยนแปลงต่างๆเหล่านั้นได้ดังนี้ (5)

- การเปลี่ยนแปลงทางด้านอารมณ์ โดยผู้ป่วยจะมีความรู้สึกซึมเศร้า กังวลอยู่ตลอดเวลา (Depress) มีอารมณ์หงุดหงิด ฉุนเฉียว โกรธง่าย หรือ มีอาการอยู่ไม่สุข และกระวนกระวายตลอดเวลา (Mania)
- การเปลี่ยนแปลงทางด้านความคิด ผู้ป่วยจะมีความรู้สึกสิ้นหวัง ท้อแท้ มองโลกในแง่ร้าย รู้สึกผิด ไร้ค่า มีความคิดที่จะทำร้ายตัวเอง หรือมีความพยายามที่จะฆ่าตัวตาย
- การเปลี่ยนแปลงทางการเรียนรู้ หรือการทำงาน ผู้ป่วยจะไม่รู้สึกสนุกกับสิ่งต่างๆ รอบตัว ไม่ว่าจะเป็นการทำงาน การทำกิจกรรมที่เพิ่มความสนุกรวมทั้งกิจกรรมทางเพศ ผู้ป่วยจะรู้สึกอ่อนเพลียไม่มีพลังงานทำให้ทำงานได้แย่ง นอกจากนี้ผู้ป่วยยังมีอาการสมาธิสั้น ความจำเสื่อม และการตัดสินใจในเรื่องต่างๆได้แย่ง

- การเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรม ผู้ป่วยจะมีอาการนอนไม่หลับ ตื่นเร็ว หรือในบางรายจะมีอาการนอนหลับมากเกินไป เบื่ออาหาร หรือทานอาหารมากเกินไป ในบางรายทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว มีอาการปวดศีรษะ แน่นท้อง ปวดเรื้อรังโดยจะรักษาด้วยยาไม่หาย และสุดท้ายคือมีความสัมพันธ์กับบุคคลอื่นแย่ง ทำให้ไม่มีสังคม หรือไม่เป็นที่ต้องการของสังคม

และสำหรับผู้ป่วยสูงอายุที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร้านั้นจะมีอาการ หลงลืมในระยะแรก (6) และจะมีอาการเชิงซึมร่วมด้วย (7) นอกจากนี้อาจมีอาการของโรคอื่นๆแทรกซ้อนรวมอยู่ด้วย เช่น โรคเส้นเลือดในสมองแตก (Stroke) โรคหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) (8)

2.3 สาเหตุของโรคซึมเศร้า

สำหรับสาเหตุของโรคซึมเศร้านั้น พบว่าโรคซึมเศร้าเป็นโรคที่เกิดจากปัจจัยหลายๆอย่างร่วมกัน หรือที่เรียกว่า Multifactorial Disease โดยผู้ป่วยโรคซึมเศร้านั้นจะป่วยเป็นโรคซึมเศร้าได้จะต้องมีปัจจัยหลายๆอย่างที่ทำให้เกิดอาการของโรคซึมเศร้าขึ้น โดยปัจจัยเหล่านั้นได้แก่ พันธุกรรม สภาพแวดล้อม สารชีวเคมีภายในร่างกาย และ ปัจจัยทางด้านสุขภาพของผู้ป่วย โดยจะต้องมีปัจจัยเหล่านี้เกิดร่วมกันจึงทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการของโรคซึมเศร้าได้ (9)

2.3.1 สาเหตุทางด้านพันธุกรรม

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ผู้ที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร้าโดยส่วนใหญ่จะมีความผิดปกติในการแสดงออกของยีนเมื่อมีสภาวะแวดล้อมภายนอกเป็นตัวกระตุ้น หรือที่เรียกว่า Gene-environment interaction รวมอยู่ด้วย โดยในผู้ป่วยบางรายจะมีอาการเกิดขึ้นเมื่อมีภาวะเครียดเข้ามากระตุ้น สำหรับยีนที่มีความผิดปกติ คือ ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนขนส่งซีโรโทนิน (Serotonin transporter) ซึ่งจะเกิดขึ้นบริเวณ Promoter (Serotonin-transporter linked promoter region, 5-HTTLPR) ของยีนนี้ (10) นอกจากนี้ยังพบว่าความหลากหลายของยีน Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) นั้นยังมีอิทธิพลต่อการคิดฆ่าตัวตายในผู้ป่วยโรคซึมเศร้า (5) และนักวิทยาศาสตร์ยังเชื่อว่า BDNF นั้นมีกลไกการทำงานร่วมกับ Serotonin transporter โดยที่ BDNF จะไปยับยั้งให้การทำงานของ Serotonin transporter ลดลง (11)

2.3.2 สาเหตุจากความผิดปกติของสารชีวเคมีภายในร่างกาย

ในระยะเริ่มแรกที่มีการใช้ยารักษาโรคซึมเศร้านั้น นักวิทยาศาสตร์พบว่ายารักษาโรคซึมเศร้าจะไปออกฤทธิ์ทำให้สารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Neurotransmitter) เพิ่มสูงขึ้น โดยเฉพาะซีโรโทนิน ดังนั้นจึงได้ตั้งสมมติฐานขึ้น (Monoamine Hypothesis) ว่าสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคซึมเศร้า ซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดนี้ในบริเวณช่องว่างไซแนปส์ (Synaptic cleft) ถ้าหากสารสื่อประสาทมีปริมาณน้อยจะทำให้ผู้ป่วยมีโอกาสสูงในการเกิดโรคซึมเศร้า แต่ถ้ามีปริมาณมากจะทำให้อาการของผู้ป่วยทุเลาลง และจากการศึกษาต่างๆ ที่เกี่ยวกับความผิดปกติของสารชีวเคมีภายในร่างกาย พบว่าผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามักจะมีระดับของสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนบริเวณช่องว่างไซแนปส์ที่อยู่ระหว่างเซลล์ประสาทลดลง (9) โดยเกิดจากการทำงานที่ผิดปกติของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporter) ที่บริเวณเซลล์ก่อนช่องว่างไซแนปส์ (Pre-synaptic cell) ซึ่งอาจเกิดจากความผิดปกติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ส่งผลให้เกิดการดูดสารสื่อประสาทกลับคืนเข้าสู่เซลล์ก่อนช่องว่างไซแนปส์มากขึ้น ทำให้สารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์ลดลง (10) นอกจากนี้ ยังพบว่าผู้ป่วยโรคซึมเศร้ามักมีความผิดปกติของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase, MAO) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการทำลายสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน โดยพบว่าการทำงานของเอนไซม์ที่มากเกินไปทำให้เกิดการทำลายสารสื่อประสาทเพิ่มมากขึ้นเป็นเหตุให้สารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์ลดลงจึงทำให้เกิดอาการซึมเศร้าขึ้นมาได้ (12)

2.3.3 สาเหตุจากสังคมและสภาวะแวดล้อม

จากสภาพสังคมทั่วโลกในปัจจุบันที่มีความวุ่นวายต่างๆ เกิดขึ้นมากมาย มีการแข่งขันกันมากขึ้น สภาพเศรษฐกิจที่ย่ำแย่ ทำให้มีจำนวนคนว่างงานเพิ่มมากขึ้น ผู้คนส่วนใหญ่จึงมีความยากจนเพิ่มมากขึ้น โดยสิ่งที่กล่าวมานี้เป็นสาเหตุที่ทำให้มีผู้ป่วยป่วยเป็นโรคซึมเศร้าเพิ่มมากขึ้น สำหรับในเด็กที่มีปัญหาทางครอบครัว ไม่ว่าจะเป็นการถูกละเลยมาอย่างผิดวิธี ผู้ปกครองไม่ให้ความเอาใจใส่ ผู้ปกครองหย่าร้าง หรือสูญเสียบิดา หรือมารดาไป ก็จะทำให้เด็กมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคซึมเศร้าเพิ่มมากขึ้น (13) ส่วนในผู้ใหญ่แล้วความเครียดจากการ

ทำงาน หรือสภาพสังคมที่มีปัญหาจะเป็นปัจจัยหลักที่กระตุ้นให้เกิดโรคซึมเศร้าได้ (14) ดังนั้น สังคมและสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีจึงเป็นสาเหตุให้อัตราของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าเพิ่มมากขึ้น (15)

2.3.4 สาเหตุอื่นๆที่ทำให้เกิดโรคซึมเศร้า

ในระยะหลังที่ผ่านมา นักวิทยาศาสตร์ได้ทำการศึกษาค้นคว้าหาสาเหตุอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องกับสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน โดยได้ทำการสแกนสมองของผู้ป่วยโรคซึมเศร้าโดยใช้เทคนิค Magnetic Resonance Imaging (MRI) พบว่าสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) ซึ่งเป็นส่วนควบคุมอารมณ์ และ ความทรงจำ ในผู้ป่วยโรคซึมเศร้านั้นมีปริมาตร หรือขนาดที่เล็กกว่าสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในคนปกติ และจากการศึกษานี้เอง นักวิทยาศาสตร์จึงตั้งสมมติฐานขึ้นว่า สมองส่วนฮิปโปแคมปัสนั้นมีความสัมพันธ์กับการทำให้เกิดโรคซึมเศร้า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า การทำงานของ Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis (HPA axis) ที่มากเกินไปจะทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนที่กระตุ้นให้เกิดความเครียด จึงส่งผลให้เกิดอาการของโรคซึมเศร้าได้เช่นกัน

2.4 การวินิจฉัยโรคซึมเศร้า

สำหรับการวินิจฉัยโรคซึมเศร้านั้น แพทย์จะทำการวินิจฉัยโดยซักถามประวัติของผู้ป่วย ว่ามีอาการเป็นอย่างไรบ้างในช่วงที่ผ่านมา มีคนในครอบครัวเคยเป็นโรคนี้หรือไม่ และจำเป็นต้องแยกโรคซึมเศร้าออกจากโรคอื่นๆ โดยการตรวจเลือดเช่นการตรวจหา Thyroid Stimulating Hormone (TSH) และ Thyroxine (T4) เพื่อแยกผู้ป่วยออกจากโรค Hypothyroidism การตรวจอิเล็กโทรไลต์ (Electrolyte) และแคลเซียมในพลาสมาเพื่อแยกโรคทางเมตาบอลิก รวมถึงการตรวจ Erythrocyte sedimentation rate (ESR) และ Complete blood count (CBC) เพื่อแยกการติดเชื้อ และ โรคเรื้อรังออกไป (16) นอกจากนี้ยังมีแบบสอบถามเพื่อใช้ประกอบการวินิจฉัยโรคด้วย โดยแบบสอบถามมีลักษณะดังนี้ (6)

ในช่วง 2 สัปดาห์ที่ผ่านมาคุณมีอาการเกิดขึ้นตลอดเวลาไม่ใช่นาน ๆ ครั้งและเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

1. คุณมีอาการซึมเศร้าหรือท้อแท้ใจ

ใช่

ไม่ใช่

2. คุณขาดความสนใจหรือไม่มีความสุขในสิ่งต่างๆที่คุณเคยชอบหรือทำอยู่ประจำ

ใช่

ไม่ใช่

3. น้ำหนักของคุณเปลี่ยนแปลงไปจากเดิมเกินกว่า 2 กิโลกรัม (ไม่ได้เกี่ยวกับความต้องการลดน้ำหนัก)

ใช่ ไม่ใช่

4. ในช่วงกลางวันคุณนอนไม่หลับหรือหลับมากเกินไป (ไม่ได้เกี่ยวกับการทานยาและการนอนหลับกลางวันมากเกินไป)

ใช่ ไม่ใช่

5. อ่อนเพลีย ไม่มีแรง เชื่องช้า

ใช่ ไม่ใช่

6. คุณรู้สึกกระวนกระวายใจ นั่งไม่ติด

ใช่ ไม่ใช่

7. คุณรู้สึกว่าตนเองไม่มีค่า

ใช่ ไม่ใช่

8. คุณรู้สึกผิดและโทษตัวเอง

ใช่ ไม่ใช่

9. คุณไม่มีสมาธิที่จะทำงาน

ใช่ ไม่ใช่

10. คุณหมกมุ่นกับความคิดตนเองโดยที่หยุดความคิดไม่ได้

ใช่ ไม่ใช่

11. คุณไม่มั่นใจในการตัดสินใจหรือตัดสินใจอะไรไม่ได้

ใช่ ไม่ใช่

12. คุณคิดเกี่ยวกับเรื่องความตายบ่อยๆ คิดอยากตาย มีแผนการที่จะทำหรือเคยฆ่าตัวตาย

ใช่ ไม่ใช่

การให้คะแนนแบบทดสอบภาวะโรคซึมเศร้า

ข้อ 1-6 ตอบว่าใช่ ได้ 1 คะแนน

ข้อ 7,8 ตอบว่าใช่ข้อใดข้อหนึ่งได้ 1 คะแนน

ข้อ 9,10,11 ตอบว่าใช่ข้อใดข้อหนึ่งได้ 1 คะแนน

ข้อ 12 ตอบว่าใช่ได้ 1 คะแนน

โดยถ้าคะแนนรวมมากกว่าหรือเท่ากับ 5 คะแนน แสดงว่ามีภาวะโรคซึมเศร้า

ซึ่งถ้าแพทย์วินิจฉัยพบว่าผู้ป่วยมีอาการของโรคซึมเศร้าแพทย์จะทำการประเมินระดับความรุนแรงของอาการ เพื่อวางแผนการรักษาให้ผู้ป่วยหายจากอาการของโรคซึมเศร้า โดยระดับความรุนแรงของโรคซึมเศร้าสามารถแบ่งเป็น 3 ประเภทได้แก่ Mild ผู้ป่วยจะมีอาการน้อย แต่มีอาการตรงตามเงื่อนไขการวินิจฉัยทุกประการ, Moderate และ Severe ผู้ป่วยจะมีอาการรุนแรงซึ่งส่งผลกระทบต่อสถานะทางสังคม และ หน้าที่การงาน โดยถ้าหากมีอาการทางจิตอย่างอื่นร่วมด้วยจะเรียกว่า Psychotic depression ซึ่งจะจัดอยู่ในกลุ่มอาการ Severe และถ้าหากมีอาการ Mania ร่วมด้วยนั้นจะถูกวินิจฉัยว่าเป็นโรค Bipolar Disorder (17)

2.5 การรักษาโรคซึมเศร้า

สำหรับการรักษาอาการของโรคซึมเศร้านั้น ขั้นแรกแพทย์จะรักษาโดยการให้ยา โดยจะรักษาในผู้ป่วยที่มีอาการไม่รุนแรงมากนัก ซึ่งผู้ป่วยจะต้องทานยาติดต่อกันตลอด และทานตามขนาดที่แพทย์สั่ง ผู้ป่วยจะมีอาการดีขึ้นหลังจากทานยาไปแล้วประมาณ 1-2 สัปดาห์ หลังจากนั้นแพทย์จะลดขนาดยาลงและให้ทานต่อไปอีกประมาณ 4-9 เดือน จนกระทั่งผู้ป่วยหายขาดจากอาการซึมเศร้า แต่สำหรับผู้ป่วยที่มีอาการรุนแรงและไม่ตอบสนองต่อการรักษาด้วยยา แพทย์จะใช้การรักษาโดยการใช้วิธีช็อคไฟฟ้าแทน (Electroconvulsive therapy) (18)

วงการสาธารณสุขทั่วโลกในปัจจุบันได้มีแนวทางในการรักษาอาการของโรคซึมเศร้า ซึ่งส่วนใหญ่ได้ใช้ยาต้านโรคซึมเศร้า (Antidepressant Drug) ในการรักษา โดยยาชนิดนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนหรือยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส ซึ่งจะส่งผลให้ปริมาณของสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนบริเวณช่องว่างไซแนปส์มีเพิ่มมากขึ้น ทำให้ผู้ป่วยมีอาการของโรคลดลง (19) ยาที่ใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้ามียาอยู่หลายชนิดด้วยกัน โดยสามารถแบ่งเป็นกลุ่มตามลักษณะการออกฤทธิ์ของยาดังนี้

1. Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) เป็นยามาตรฐานในปัจจุบันที่ใช้รักษาอาการของโรคซึมเศร้า ซึ่งผลข้างเคียงของยาในกลุ่มนี้จะมีน้อยกว่ายาในกลุ่ม Tricyclic antidepressant และ Monoamine oxidase inhibitor (MAOIs) ซึ่งยากกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน (Serotonin transporter) ยาในกลุ่มนี้ได้แก่

- Citalopram (Celexa, Cipramil)

- Escitalopram (Lexapro, Cipralex, Seroplex, Lexamil)
- Fluoxetine (Prozac, Sarafem, Symbyax)
- Fluvoxamine (Luvox)
- Paroxetine (Paxil, Aropax)
- Sertraline (Zoloft)

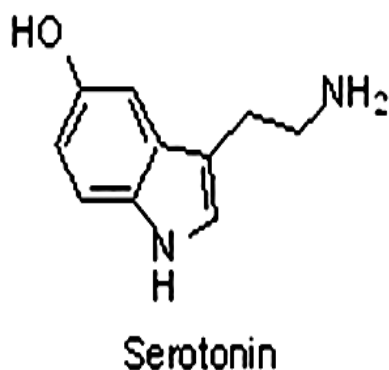
จากการศึกษาต่างๆ ที่ผ่านมามีพบว่า ยาในกลุ่มนี้ถ้าใช้ผิดวิธีจะทำให้เกิดการเสพติดได้ และ อาจทำให้เกิดภาวะโรคอื่นได้เช่นกัน (20)

2. Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors (SNRIs) เป็นยาที่ไปออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาททั้งชนิดซีโรโทนิน และ นอร์อิพิเนพริน ซึ่งจะมีผลข้างเคียงคล้ายกับยาในกลุ่ม SSRIs ยาในกลุ่มนี้ ได้แก่
 - Desvenlafaxine (Pristiq)
 - Duloxetine (Cymbalta)
 - Milnacipran (Ixel)
 - Venlafaxine (Effexor)
3. Noradrenergic and specific serotonergic antidepressants (NaSSAs) ยาในกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ presynaptic alpha-2 adrenergic receptors และ serotonin receptors ส่งผลให้ปริมาณของซีโรโทนินบริเวณช่องว่างไซแนปส์มีเพิ่มมากขึ้น สำหรับผลข้างเคียงของยาในกลุ่มนี้คือ ทำให้เกิดอาการง่วงนอน หิวง่าย และมีน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้น (21) ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่
 - Mianserin (Tolvon)
 - Mirtazapine (Remeron, Avanza, Zispin)
4. Tricyclic antidepressants (TCAs) ยากลุ่มนี้เป็นยากลุ่มแรกๆ ที่ใช้รักษาอาการของโรคซึมเศร้า โดยสาร Tricyclic จะไปยับยั้งการดูดกลับสารสื่อประสาทของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทต่างๆ แต่ยาในกลุ่มนี้จะส่งผลข้างเคียงเมื่อมีการใช้ยามากเกินไป ทำให้ผู้ป่วยมีอาการหัวใจเต้นเร็ว ง่วงนอน ปากแห้ง ท้องผูก มึนงง มีความผิดปกติของไต และ สมรรถภาพทางเพศลดลง ตลอดจนก่อให้เกิดอันตรายถึงแก่ชีวิตได้ จากสาเหตุดังกล่าวในปัจจุบันจึงไม่นิยมนำยากลุ่มนี้มาใช้รักษาอาการของโรคซึมเศร้าแต่จะใช้รักษาผู้ป่วยในกรณีที่มีอาการของโรคซึมเศร้าอย่างรุนแรง (22) ตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่

- Amitriptyline (Elavil, Endep)
 - Clomipramine (Anafranil)
 - Doxepin (Adapin, Sinequan)
 - Imipramine (Tofranil)
 - Trimipramine (Surmontil)
5. Monoamine oxidase inhibitor (MAOIs) กลไกการรักษาอาการโรคซึมเศร้าของยาชนิดนี้คือ ไปยับยั้งการทำลายสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนจากเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส โดยยาจะออกฤทธิ์กีดการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ (1) ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำลายสารสื่อประสาทได้ ส่งผลให้มีปริมาณสารสื่อประสาทเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามเนื่องจากยาชนิดนี้มีผลข้างเคียงที่ค่อนข้างจะรุนแรง ดังนั้น แพทย์จึงไม่ค่อยนำยาชนิดนี้มาใช้รักษาอาการโรคซึมเศร้าให้กับผู้ป่วย แต่จะใช้ยาชนิดนี้ในกรณีที่ผู้ป่วยใช้ยาชนิดอื่นรักษาแล้วไม่ได้ผล (23) สำหรับตัวอย่างยาในกลุ่มนี้ ได้แก่
- Isocarboxazid (Marplan)
 - Moclobemide (Aurorix, Manerix)
 - Phenelzine (Nardil)
 - Selegiline (Eldepryl, Emsam)
 - Tranylcypromine (Parnate)

2.6 สารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Neurotransmitter)

สารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน คือ กลุ่มของสารสื่อประสาทที่มีส่วนประกอบของหมู่อะมิโน (Amino group) 1 หมู่ เชื่อมต่อกับวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring) ด้วยสายของคาร์บอน 2 อะตอม (ภาพที่ 2.1) โดยสารสื่อประสาทชนิดนี้จะถูกสร้างขึ้นจากกรดอะมิโนชนิดที่มีลักษณะเป็นวงแหวนอะโรมาติก (Aromatic ring amino acid) ได้แก่ Tryptophan และ Tyrosine สำหรับสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนที่มีความสำคัญต่อการควบคุมอารมณ์ของร่างกาย ได้แก่ ซีโรโทนิน (Serotonin, 5-Hydroxytryptophan, 5-HT), โดพามีน (Dopamine, DA) และ นอร์อิพิเนฟริน (Norepinephrine, NE) หรือ นอร์อะดรีนาลิน (Noradrenalin, Na) เมื่อร่างกายขาดสารสื่อประสาทเหล่านี้หรือมีการสร้างสารสื่อประสาทออกมาในปริมาณน้อย จะทำให้เกิดอาการเกี่ยวกับโรคทางจิตประสาทขึ้นมาได้ เช่น โรคซึมเศร้า



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างทางเคมีของซีโรโทนิน (Serotonin) ซึ่งเป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน

2.6.1 ซีโรโทนิน (Serotonin, 5-hydroxytryptamine, 5-HT)

ซีโรโทนินเป็นสารสื่อประสาทโมโนเอมีนชนิดหนึ่ง พบอยู่มากบริเวณลำไส้ภายใน Enterochromaffin cells ซึ่งในบริเวณนี้ซีโรโทนินจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเคลื่อนไหวของผนังลำไส้ (24) แต่สำหรับความสำคัญในระบบประสาทส่วนกลาง (Central Nervous System, CNS) ซีโรโทนินจะถูกหลั่งมาจาก Raphe Nuclei ภายในสมอง โดยจะมีหน้าที่ในการควบคุมอารมณ์ความก้าวร้าว, ความอยากอาหาร, ความต้องการทางเพศ และการนอนหลับ นอกจากนี้ยังช่วยควบคุมเกี่ยวกับระบบการรับรู้ (Cognitive) ของร่างกาย โดยเป็นสารสื่อประสาทที่ช่วยในการเรียนรู้ (Learning) และการจดจำ (Memory) (25, 26) ส่วนซีโรโทนินที่ถูกหลั่งออกมาจาก enterochromaffin cells มายังกระแสเลือดจะมีหน้าที่ในการช่วยสมานแผล โดยซีโรโทนินที่ถูกหลั่งออกมาจะไปจับกับเกร็ดเลือด (Platelet) เมื่อมีบาดแผลเกิดขึ้นเกร็ดเลือดที่ถูกพาไปยังบริเวณบาดแผลก็จะปล่อยซีโรโทนินออกมา ซีโรโทนินจะไปกระตุ้นให้เกิดการหดตัวของหลอดเลือด และ กระตุ้นให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่จึงทำให้เกิดการสมานแผลเกิดขึ้น (27)

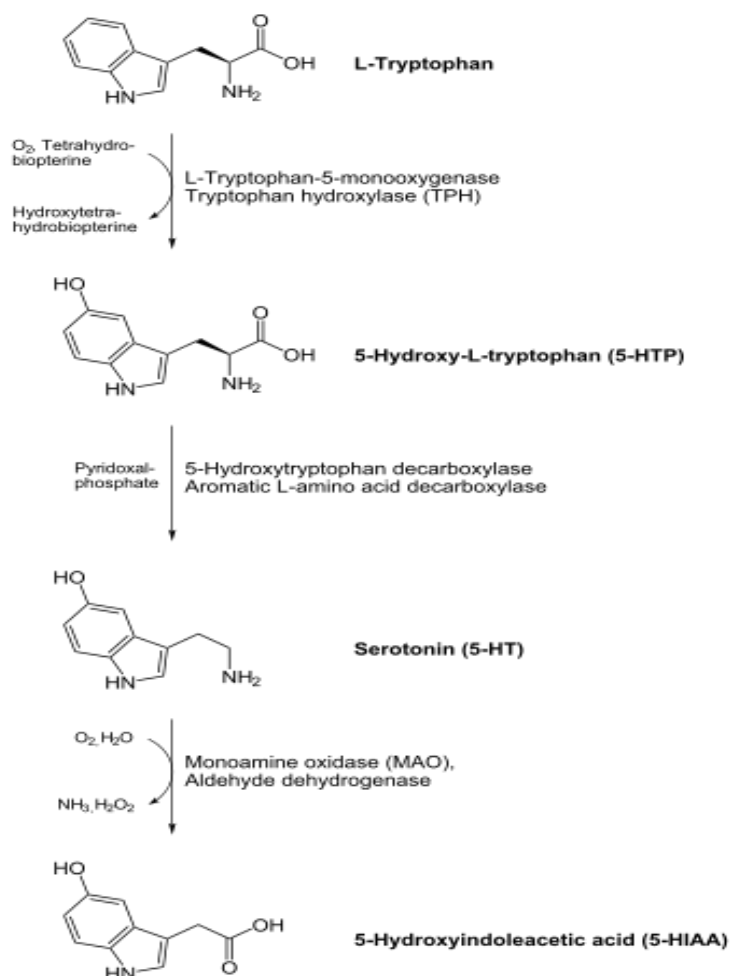
การสังเคราะห์ซีโรโทนินในร่างกายจะสามารถสังเคราะห์ได้เพียงบางกลุ่มเซลล์เท่านั้น เช่น กลุ่มเซลล์สมอง (28) โดยกลไกการสังเคราะห์นั้นสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ขั้นตอน (ภาพที่ 2.2) ดังนี้

ขั้นที่ 1 กรดอะมิโน L-tryptophan จากอาหารจำพวกโปรตีนต่างๆ จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เซลล์สมองโดยวิธี facilitated diffusion โดยอาศัยตัวนำ (Carrier) ชนิดเดียวกับกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ ได้แก่ Phenylalanine, Leucine และ Methionine ดังนั้นปริมาณของซีโรโทนินในสมองนั้น จึงขึ้นอยู่กับปริมาณ Tryptophan ที่ร่างกายได้รับ

ขั้นที่ 2 จัดเป็นขั้นกำหนดอัตราการเกิดปฏิกิริยา (Rate-Limiting Step) โดยกลุ่มเซลล์ที่สร้างซีโรโทนินจะมีองค์ประกอบของเอนไซม์ L-tryptophan-5-monoxygenase หรือ tryptophan hydroxylase (TPH) ซึ่งมีอยู่ 2 ชนิด แต่ที่พบในสมองนั้นจะเป็นชนิด TPH2 โดยจะทำหน้าที่เปลี่ยน Tryptophan ให้เป็น 5-hydroxy-L-tryptophan (5-HTP) โดยเอนไซม์ชนิดนี้จะทำงานได้นั้นจะต้องมีก๊าซออกซิเจน (O_2) และ pteridine cofactor คือ L-erythro-tetrahydrobiopterin (BH4) ในปฏิกิริยา ซึ่งออกซิเจน 1 อะตอมจะถูกใช้ในการสร้าง 5-HTP และอีก 1 อะตอมจะถูกรีดิวซ์ (reduce) ให้เป็นน้ำ สำหรับ pteridine cofactor นั้นจะเป็นตัวให้อิเล็กตรอน (electron) ทำให้ได้สารกึ่งกลางที่ไม่เสถียร คือ quinonoid dihydrobiopterin แล้วเปลี่ยนเป็น quinonoid tetrahydrobiopterin (quinonoid BH4)

ขั้นที่ 3 5-HTP จะถูกเปลี่ยนเป็น serotonin (5-HT) โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) โดยเอนไซม์ชนิดนี้ไม่ได้พบเฉพาะในกลุ่มเซลล์ที่สร้างซีโรโทนินเท่านั้น แต่ยังพบในกลุ่มเซลล์ที่สร้าง catecholamine ด้วย เช่น กลุ่มเซลล์ที่สร้างโดพามีน (Dopamine) เป็นต้น ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะทำหน้าที่เปลี่ยน 5-HTP เป็น 5-HT หรือซีโรโทนิน สำหรับปริมาณของซีโรโทนินในสมองจะขึ้นอยู่กับปริมาณความเข้มข้นของ 5-HTP ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปฏิกิริยา รวมถึงโคแฟกเตอร์ (Cofactor) และระดับ pH นอกจากนี้การที่เอนไซม์ AADC ทำหน้าที่ในกลุ่มเซลล์ที่สร้าง catecholamine มากกว่าปกติ จึงทำให้สร้างซีโรโทนินออกมาได้น้อยเกินไป ทำให้ปริมาณของซีโรโทนินในสมองเกิดความผิดปกติ

การสลายซีโรโทนินนั้นเกิดจากเอนไซม์ Monoamine oxidase (MAO) จะทำการเปลี่ยนซีโรโทนินให้เป็น 5-hydroxy indoleacetaldehyde หลังจากนั้นจะถูก Oxidize ต่อโดยเอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase และ NAD^+ และได้ผลผลิตเป็น 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) ซึ่งเป็นรูป metabolite ของซีโรโทนิน และสามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะ



ที่มา: Own work, copyleft: Multi-license with GFDL and Creative Commons CC-BY-SA-2.5 and older versions (2.0 and 1.0)

ภาพที่ 2.2 กลไกการสังเคราะห์ และสลายของซีโรโทนินภายในกลุ่มเซลล์ที่สร้างซีโรโทนิน

2.6.2 โดพามีน (Dopamine)

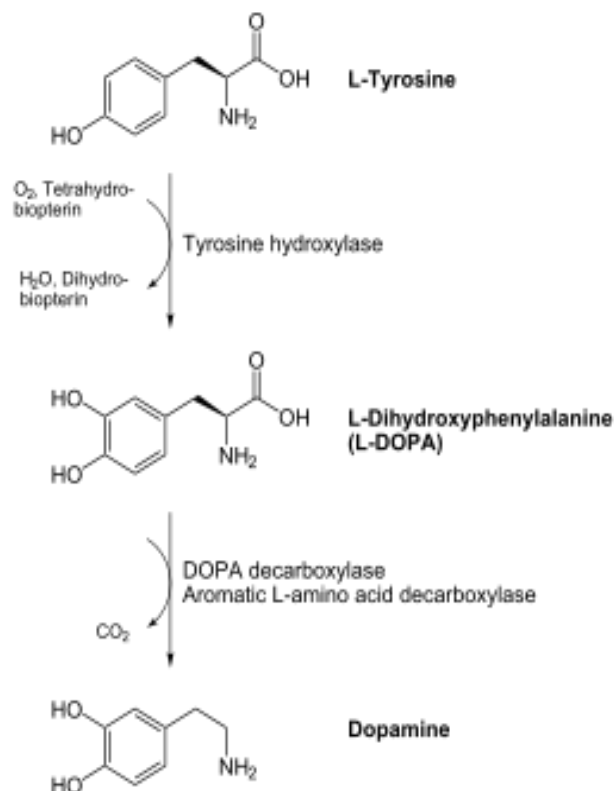
โดพามีนเป็นสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ที่ถูกสังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนชนิด Tyrosine โดยจะมีความสำคัญต่อระบบประสาทส่วนกลางของสัตว์ต่างๆ รวมถึงมนุษย์ โดพามีนที่อยู่ในสมองจะถูกสร้างบริเวณ Substantia nigra และ Ventral tegmental area (29) ซึ่งจะถูกล้างออกมาโดย Hypothalamus เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน Prolactin จากต่อมใต้สมอง (Pituitary gland) (30) นอกจากนี้ ยังมีความสำคัญในการทำงานของสมองที่เกี่ยวข้องกับการเข้าใจ (Cognition) การสร้างแรงจูงใจ (Motivation) การตอบสนอง

ต่อสิ่งเร้า (Reflect) ความพึงพอใจ (Reward) ควบคุมการนอนหลับ อารมณ์ ความสนใจ และการเรียนรู้จดจำสิ่งต่างๆในการทำงาน (31-33) ซึ่งถ้ามีปริมาณของโดพามีนในระบบประสาทน้อยเกินไปจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบประสาท และส่งผลต่อการดำเนินชีวิตประจำวันได้อีกด้วย (34) สำหรับหน้าที่โดพามีนในระบบประสาทซิมพาเทติก (Sympathetic nervous system) จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการเต้นของหัวใจและเพิ่มความดันของเลือด เป็นต้น (35)

กลไกการสังเคราะห์โดพามีนในสมองนั้นสามารถอธิบายเป็นขั้นตอนได้ ดังนี้ (ภาพที่ 2.3) (36)

ขั้นที่ 1 เอนไซม์ Tyrosine 3-monooxygenase (Tyrosine hydroxylase) มาทำการเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ให้กับ L-Tyrosine กลายเป็น L-DOPA

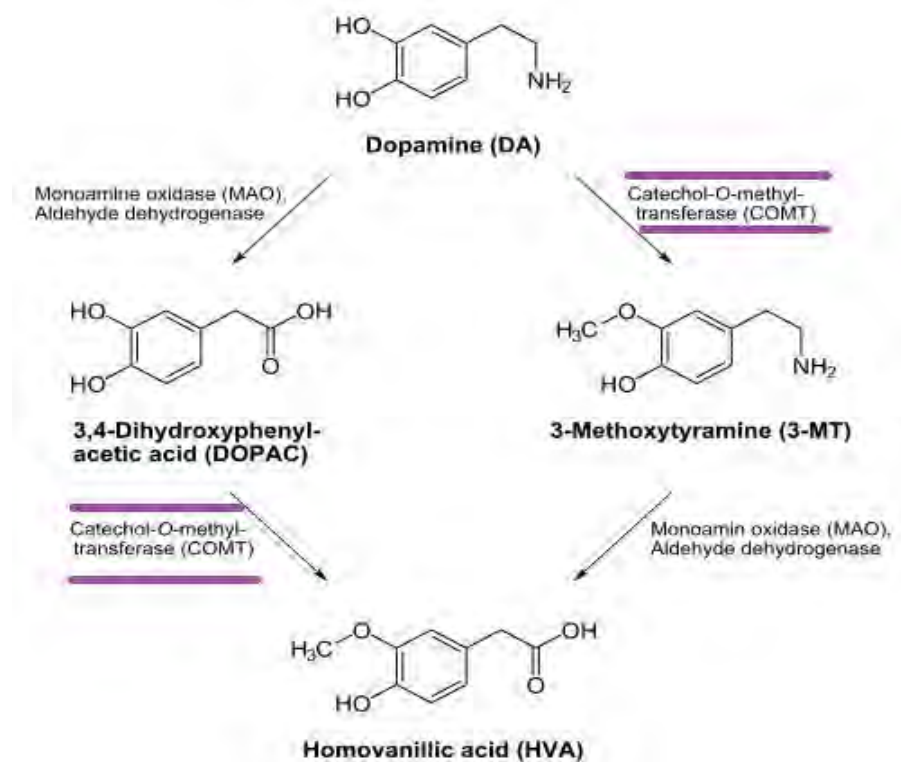
ขั้นที่ 2 เกิดการนำหมู่คาร์บอกซิล (COOH) ออกจาก L-DOPA โดยอาศัยเอนไซม์ Aromatic L-amino acid decarboxylase กลายเป็นโดพามีนในที่สุด



ที่มา: Own work, copyleft: Multi-license with GFDL and Creative Commons CC-BY-SA-2.5 and older versions (2.0 and 1.0)

ภาพที่ 2.3 กลไกการสังเคราะห์โดพามีนภายในระบบประสาทของร่างกาย

สำหรับการสลายโดพามีนภายในเซลล์ประสาทจะอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 ชนิด คือ โมโนเอมีนออกซิเดส (Monoamine oxidase, MAO) และ Catechol-O-methyl transferase (COMT) โดยมีกระบวนการสลายผ่าน 2 กลไก คือ MAO จะทำการสลายโดพามีนที่ถูกนำกลับเข้าสู่เซลล์ผ่านโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน (Dopamine Transporter, DAT) โดยเปลี่ยนโดพามีนให้กลายเป็น 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) หลังจากนั้นเอนไซม์ COMT จะเปลี่ยน DOPAC ให้กลายเป็น Homovanillic acid (HVA) และอีกกลไกคือเอนไซม์ COMT จะทำการสลายโดพามีนที่ถูกพาคกลับเข้าสู่เซลล์ประสาทผ่านทางโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนพริน (Norepinephrine Transporter, NET) โดยเปลี่ยนโดพามีนให้กลายเป็น 3-methoxytyramine (3-MT) หลังจากนั้นเอนไซม์ MAO หรือ Aldehyde dehydrogenase จะทำการเปลี่ยน 3-MT ให้กลายเป็น HVA เช่นกัน (36) (ภาพที่ 2.4)



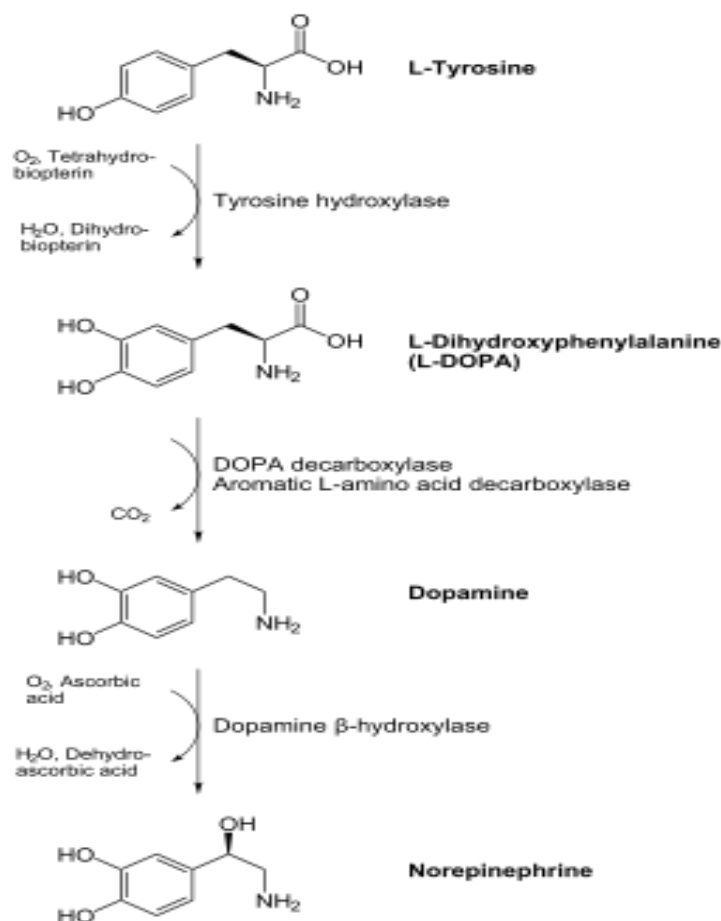
ที่มา: Own work, copyleft: Multi-license with GFDL and Creative Commons CC-BY-SA-2.5 and older versions (2.0 and 1.0)

ภาพที่ 2.4 กระบวนการสลายของโดพามีนในเซลล์ประสาทโดยอาศัยเอนไซม์ MAO และ COMT

2.6.3 นอร์อิพิเนพรีน หรือ นอร์อะดรีนาลิน (Norepinephrine, Noradrenalin)

นอร์อิพิเนพรีน เป็นสารสื่อประสาทอีกชนิดหนึ่งที่สังเคราะห์มาจากกรดอะมิโนชนิด Tyrosine โดยจะถูกสังเคราะห์ภายในสมอง และถูกหลั่งออกมาจากเซลล์ประสาท Noradrenergic ที่อยู่ใน Locus Coeruleus ซึ่งอยู่บริเวณก้านสมอง (Brain stem) (37) เมื่อนอร์อิพิเนพรีนถูกกระตุ้นให้หลั่งออกมาภายในสมองจะทำให้เกิดผลต่อสมองในวงกว้าง โดยจะทำให้เกิดการตื่นตัว (Alertness) เกิดอาการตื่นเต้น (Arousal) และส่งผลกระทบต่อระบบควบคุมความพึงพอใจของร่างกาย (Reward system) (38, 39) นอกจากนี้จะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทแล้ว นอร์อิพิเนพรีนยังทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนได้อีกด้วย (40) โดยนอร์อิพิเนพรีนที่ทำหน้าที่เป็นฮอร์โมนจะถูกสังเคราะห์บริเวณต่อมหมวกไต (Adrenal medulla) การทำงานของฮอร์โมนนี้จะมีผลต่อสมองส่วน Amygdala ทำให้เกิดการควบคุมการตอบสนองต่อสิ่งเร้า ช่วยกระตุ้นอัตราการเต้นของหัวใจ และทำให้ร่างกายนำกลูโคส (Glucose) ที่เก็บเอาไว้ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานเมื่อถูกกระตุ้นจากสภาวะแวดล้อม และยังทำให้เกิดการตอบสนองแบบ Fight-or-Flight ได้อีกด้วย (41)

กระบวนการสังเคราะห์นอร์อิพิเนพรีนนี้นั้นจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ประสาทชนิด Noradrenergic และกลุ่มเซลล์บริเวณ Adrenal Medulla ในต่อมหมวกไต ซึ่งถูกสังเคราะห์ต่อมาจากกระบวนการสังเคราะห์โดพามีน โดยจะมีเอนไซม์ Dopamine-beta-hydroxylase มาเติมหมู่ไฮดรอกซิล (OH) ทำให้เปลี่ยนจากโดพามีนเป็นนอร์อิพิเนพรีน (42) (ภาพที่ 2.5)



ที่มา: Own work, copyleft: Multi-license with GFDL and Creative Commons CC-BY-SA-2.5 and older versions (2.0 and 1.0)

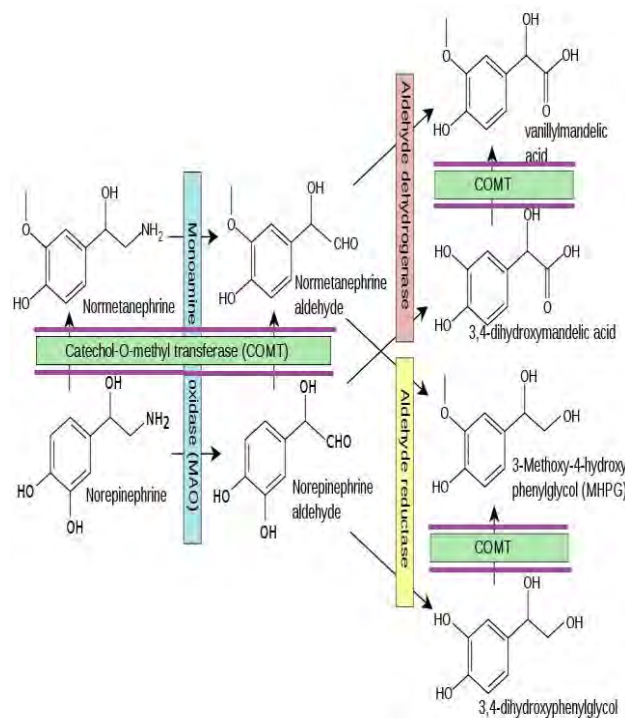
ภาพที่ 2.5 กระบวนการสังเคราะห์นอร์อิพิเนพรีนจากกรดอะมิโนชนิด Tyrosine ภายในร่างกาย

สำหรับกระบวนการสลายนอร์อิพิเนพรีนนั้นจะเกิดขึ้นหลังจากที่นอร์อิพิเนพรีนถูกพากลับเข้าสู่เซลล์ประสาทโดยผ่านโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนพรีน โดยจะถูกเอนไซม์ย่อยเป็นสารเมตาบอไลต์ (Metabolites) ต่างๆ ดังนี้ (38) (ภาพที่ 2.6)

1. Normetanephrine ถูกสร้างจากนอร์อิพิเนพรีนผ่านทางเอนไซม์ COMT
2. 3,4-Dihydroxymandelic acid ถูกสร้างจากนอร์อิพิเนพรีนผ่านทางเอนไซม์ MAO
3. Vanillymandelic acid (VMA) ถูกสร้างจากนอร์อิพิเนพรีนผ่านทางเอนไซม์ MAO
4. 3-Methoxy-4-hydroxyphenylethylene glycol (MHPG/MOPEG) ถูกสร้างจากนอร์อิพิเนพรีนผ่านทางเอนไซม์ MAO

5. Epinephrine ถูกสร้างจากนอร์อิพิเนพรีนผ่านทางเอนไซม์ PNMT

การสลายตัวของนอร์อิพิเนพรีนโดยเอนไซม์ต่าง ๆ ส่วนใหญ่จะได้ผลิตภัณฑ์ คือ VMA ซึ่งจะอยู่ในรูปอิสระไม่จับกับโปรตีนอื่นๆ และสามารถตรวจพบได้ในปัสสาวะ รองลงมา คือ MHPG ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายนอร์อิพิเนพรีนภายในระบบประสาทส่วนกลาง โดยจะมีบางส่วนที่จับกับซัลเฟต (Sulfate) หรือ กลูโคโรไนด์ (Glucuronide) ซึ่งจะถูกรับออกมาในปัสสาวะด้วยเช่นเดียวกัน (38)



ที่มา: Rod Flower; Humphrey P. Rang; Maureen M. Dale; Ritter, James M. (2007). *Rang & Dale's pharmacology*. Edinburgh: Churchill Livingstone.

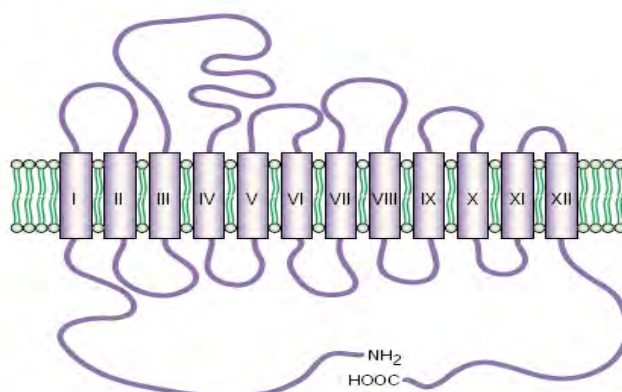
ภาพที่ 2.6 กระบวนการสลายของนอร์อิพิเนพรีนโดยเอนไซม์ชนิดต่างๆที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย

2.7 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporter, MATs)

โดยปกติแล้วในเซลล์ประสาทจะมีโปรตีนชนิดหนึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมปริมาณของสารสื่อประสาทให้มีปริมาณคงที่ โปรตีนชนิดนั้นคือ โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporters, MATs) โดยจะทำหน้าที่นำสารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์

(Synaptic cleft) กลับไปยังเซลล์ประสาทบริเวณก่อนถึงช่องว่างไซแนปส์ (Pre-Synaptic cell) ทำให้สารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์ลดลง (43, 44) ซึ่งยารักษาโรคซึมเศร้าส่วนใหญ่ จะออกฤทธิ์กีดขวางการทำงานของโปรตีนชนิดนี้ทำให้สารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์ไม่ถูกพา กลับเข้าไปปริมาณของสารสื่อประสาทบริเวณช่องว่างไซแนปส์จึงเพิ่มมากขึ้น ทำให้ช่วยลดอาการ แปรปรวนทางอารมณ์ได้ (44-46)

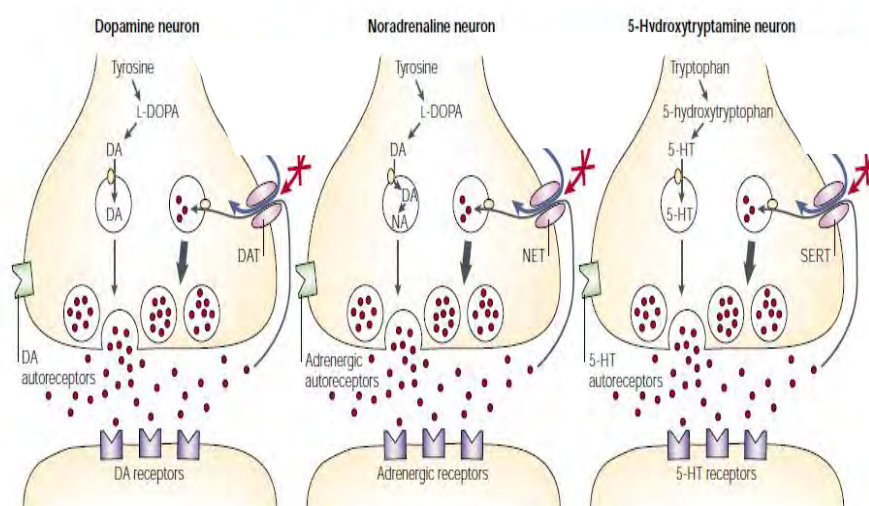
MATs คือ โปรตีนที่อยู่ในกลุ่ม 12 transmembrane (TM) domain neurotransmitter: sodium symporter (NSS) family ซึ่งอยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Plasma Transmembrane protein) ของเซลล์ประสาทบริเวณ Pre-Synaptic cell โดยสายโปรตีนจะแทรกตัวอยู่ระหว่างชั้นของเยื่อหุ้ม เซลล์ ประกอบด้วยโดเมน 12 โดเมน (12 transmembrane domains) มีทั้งส่วนที่อยู่ภายนอก เซลล์ และภายในเซลล์ ส่วนปลายของสายโปรตีนทั้ง 2 ข้าง (NH_2 , COOH) จะอยู่ภายในเซลล์ (47) (ภาพที่ 2.7) โดยโปรตีนทั้งสายทั้งภายนอกเซลล์ และภายในเซลล์จะมีส่วนที่ไว้สำหรับเติม หมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) ด้วยโปรตีนไคเนส (protein kinase) ต่างๆ เช่น cAMP-dependent protein kinase, protein kinase C (PKC) และ Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase (48-51) ซึ่งกลไกการควบคุมการทำงานของ MATs จะควบคุมผ่านกระบวนการ Phosphorylation และ Post-translational modification



ที่มา: SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation Anders S. Kristensen, Jacob Andersen, Trine N. Jørgensen, et al.

ภาพที่ 2.7 ลักษณะโครงสร้างของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ของเซลล์ประสาทประกอบด้วยโดเมน 12 โดเมน และปลายทั้ง 2 ด้านของสายโปรตีนอยู่ใน เซลล์

MATs จะทำหน้าที่ควบคุมปริมาณสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนที่อยู่ในบริเวณช่องว่างไซแนปส์ให้มีปริมาณที่เหมาะสม โดยจะนำพาสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนที่อยู่ในบริเวณช่องว่างไซแนปส์กลับเข้าไปยัง Pre-Synaptic cell โดยอาศัยกลไกการขนส่งโซเดียม และคลอไรด์ (Na^+/Cl^- Transportation) เมื่อถูกพาเข้าสู่เซลล์ สารสื่อประสาทเหล่านั้นจะเก็บอยู่ในรูปของถุง (Vesicle) และจะถูกทำลายโดยเอนไซม์โมโนเอมีนออกซิเดส หรือถูกนำกลับไปใช้ใหม่อีกครั้งหนึ่ง แต่โดยส่วนใหญ่แล้วเซลล์ประสาทจะนำสารสื่อประสาทเหล่านั้นกลับมาใช้ใหม่อีกครั้งหนึ่ง (52) MATs ในร่างกายมนุษย์มีอยู่หลายชนิด แต่ MATs ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยนี้มีอยู่ 3 ชนิด คือ Serotonin Transporter (SERT) ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งสารสื่อประสาทชนิด Serotonin, Dopamine Transporter (DAT) ทำหน้าที่ขนส่งสารสื่อประสาทชนิด Dopamine และ Norepinephrine Transporter (NET) ทำหน้าที่ขนส่งสารสื่อประสาทชนิด Norepinephrine (ภาพที่ 2.8)



ที่มา: PLASMA MEMBRANE MONOAMINE TRANSPORTERS: STRUCTURE, REGULATION AND FUNCTION Gonzalo E. Torres, Raul R. Gainetdinov and Marc G. Caron

ภาพที่ 2.8 รูปแสดงกลไกการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน (Monoamine Transporter)

2.7.1 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (Serotonin Transporter, SERT, 5-HTT)

โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทซีโรโทนิน (Serotonin Transporter, SERT, 5-HTT) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง 5-HT บริเวณ Synaptic cleft กลับเข้าสู่ Pre-synaptic cells ซึ่งมีความจำเพาะต่อ 5-HT สูงมาก (specific transporter protein) โดยในระบบประสาทส่วนกลางจะพบว่า SERT อยู่ในบริเวณ cerebral cortex, hippocampus และ raphe nuclei สำหรับระบบประสาทส่วนนอก (peripheral nervous system, PNS) จะพบ SERT ได้ใน enterochromaffin cells ในระบบทางเดินอาหาร, ต่อมหมวกไต, รก, ปอด และเกร็ดเลือด (53-57) SERT เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์มาจากยีนในกลุ่ม SLC6 โดย SERT จะสังเคราะห์มาจากยีน SLC6A4 (hSERT) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 17 (17 q11.2) โดยจะสังเคราะห์ได้เป็นกรดอะมิโน (Amino acid) ทั้งหมด 630 ตัว (47) กลไกการพา 5-HT เข้าสู่เซลล์ประสาทผ่าน SERT จะอาศัยผ่านกลไกการขนส่งโซเดียม/คลอไรด์ โดยโซเดียม, คลอไรด์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ และโพแทสเซียมที่อยู่ภายในเซลล์อย่างละ 1 โมเลกุลจะเป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการพา 5-HT 1 โมเลกุลเข้าสู่เซลล์ (58) (ภาพที่ 2.9) สำหรับกลไกควบคุมการทำงานของ SERT จะควบคุมผ่านกระบวนการ Phosphorylation โดยอาศัย protein kinase ต่างๆ เช่น CaMKII, Src, p38 MAP kinase และ PKC นอกจากนี้ปริมาณของแคลเซียม และโซเดียมอิออนภายในเซลล์ก็มีส่วนควบคุมการทำงานของ SERT ได้เช่นกัน (59-66)

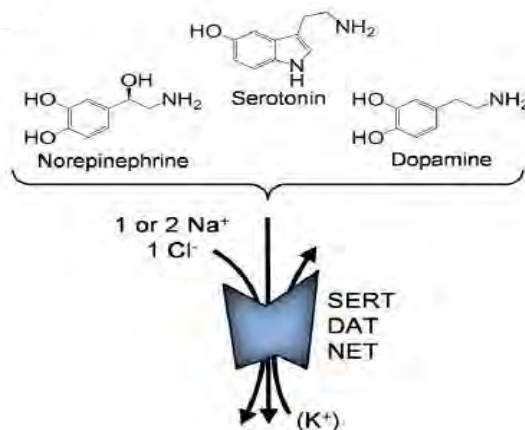
2.7.2 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน (Dopamine Transporter, DAT)

โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน (Dopamine Transporter, DAT) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง DA หรือ NE บริเวณ Synaptic cleft กลับเข้าสู่ Pre-synaptic cells โดยจะพบ DAT ในระบบประสาทส่วนกลางบริเวณ substantia nigra และ ventral tegmental area (VTA) นอกจากนี้ยังพบ DAT ในระบบประสาทส่วนนอกได้ในระบบทางเดินอาหาร, ตับอ่อน และ เซลล์เม็ดเลือดขาว (32, 33) DAT เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์มาจากยีนในกลุ่ม SLC6 เช่นเดียวกับ SERT ซึ่งจะถูกสังเคราะห์มาจากยีน SLC6A3 (hDAT) ที่อยู่บนโครโมโซมที่ 5 (5p15.3) โดยจะสังเคราะห์ได้เป็นกรดอะมิโน (Amino acid) ทั้งหมด 620 ตัว (47) กลไกการพา DA เข้าสู่เซลล์ประสาทผ่าน DAT จะอาศัยผ่านกลไกการขนส่งโซเดียม/คลอไรด์ โดยโซเดียม 2 โมเลกุล และคลอไรด์ 1 โมเลกุลที่อยู่ภายนอกเซลล์ จะเป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการพา DA 1 โมเลกุลเข้าสู่เซลล์ (67) (ภาพที่ 2.9) กระบวนการ phosphorylation ภายในเซลล์จะเป็นกระบวนการที่ควบคุมการทำงานของ DAT โดยอาศัย protein kinase ต่างๆ ได้แก่ PKA, PKC, PI-3K, ERK1, ERK2, Akt, CaMKII, CDK5 และ MAPK (68-71)

2.7.3 โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทนอร์อิพิเนฟริน (Norepinephrine Transporter, NET)

โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทนอร์อิพิเนฟริน (Norepinephrine Transporter, NET) เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่ง NE บริเวณ Synaptic cleft กลับเข้าสู่ Pre-synaptic cells

โดยจะพบ NET ในระบบประสาทส่วนกลางบริเวณ hippocampus และ cortex นอกจากนี้ยังพบ NET ในระบบประสาทส่วนนอกได้ในต่อมหมวกไตชั้นใน, รก และปอด (72-76) NET เป็นโปรตีนที่ถูกสังเคราะห์มาจากยีนในกลุ่ม SLC6 เช่นเดียวกัน ซึ่งจะถูกระงับโดยยีน SLC6A2 (hNET) ที่อยู่ในบริเวณโครโมโซมที่ 16 (16q12.2) โดยจะสังเคราะห์ให้ได้เป็นกรดอะมิโน (Amino acid) ทั้งหมด 617 ตัว (47) กลไกการพา NE เข้าสู่เซลล์ประสาทผ่าน NET จะอาศัยผ่านกลไกการขนส่งโซเดียม/คลอไรด์ โดยโซเดียม 1 โมเลกุล และคลอไรด์ 1 โมเลกุลที่อยู่ภายนอกเซลล์ เป็นสารตั้งต้น (substrate) ในการพา NE 1 โมเลกุลเข้าสู่เซลล์ (77) (ภาพที่ 2.9) กระบวนการ phosphorylation ภายในเซลล์จะเป็นกระบวนการที่ควบคุมการทำงานของ NET เช่นกัน โดยผ่าน protein kinase ชนิด MAPK และ PKC นอกจากนี้ฮอร์โมนอินซูลิน และ angiotensin II ยังมีส่วนควบคุมการทำงานของ NET บริเวณระบบประสาทส่วนนอกได้เช่นกัน (78, 79)



ที่มา: SLC6 Neurotransmitter Transporters: Structure, Function, and Regulation Anders S. Kristensen, Jacob Andersen, Trine N. Jørgensen, et al.

ภาพที่ 2.9 กลไกการขนส่ง Monoamine เข้าสู่เซลล์ผ่าน MATs

2.8 สมุนไพรที่ใช้ในงานวิจัย

เนื่องจากยาที่ใช้รักษาอาการของโรคซึมเศร้าในปัจจุบันมีผลข้างเคียงต่อผู้ใช้มาก กอปรกับปัจจุบันผู้คนส่วนใหญ่ไม่ว่าในประเทศ หรือต่างประเทศ ได้ให้ความสนใจในการบริโภคสมุนไพรที่ได้จากธรรมชาติเพื่อรักษาอาการป่วยต่างๆ หรือป้องกันไม่ให้เกิดโรคต่างๆ ขึ้น

ดังนั้นจึงมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรต่างๆ เพื่อใช้ในการรักษาโรคและป้องกันโรคเกิดขึ้นมากมายรวมไปถึงการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้าอีกด้วย จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ทำการศึกษเกี่ยวกับสมุนไพรต้านโรคซึมเศร้า มีรายงานว่า St. john's wort (*Hypericum perforatum* L.) เป็นพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์สามารถรักษาโรคซึมเศร้าได้ โดยในประเทศเยอรมันได้มีการนำสารสกัดจากสมุนไพรชนิดนี้มาใช้ในการรักษาโรคซึมเศร้ามาเป็นเวลานานแล้ว และจากการนำสารสกัดจาก St. john's wort มาทดสอบกับผู้ป่วยโรคซึมเศร้า โดยมีการใช้ยาชนิด SSRIs เป็นตัวควบคุม พบว่าสมุนไพรชนิดนี้สามารถบรรเทาอาการของโรคซึมเศร้าได้คล้ายกับยาชนิดนี้ (80-83) นอกจากนี้ ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรชนิดอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้า ได้แก่ การศึกษาของ Shahin และคณะ โดยศึกษาฤทธิ์ของหญ้าฝรั่น (*Crocus sativus* L.) เปรียบเทียบกับยา Imipramine ซึ่งเป็นยารักษาโรคซึมเศร้าในผู้ป่วยที่ป่วยเป็นโรคซึมเศร้าปานกลาง พบว่ายา Imipramine ก่อให้เกิดผลข้างเคียงในการใช้ยามากกว่าการรักษาด้วยหญ้าฝรั่น (84) หลังจากนั้นได้มีการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าหญ้าฝรั่นมีฤทธิ์ในการรักษาโรคซึมเศร้าคล้ายกับการออกฤทธิ์ของยาชนิด SSRIs (85) และยังมีการศึกษาฤทธิ์การต้านโรคซึมเศร้าจากสารสกัด ไบกระเพรา (*Ocimum tenuiflorum*.) โดยศึกษากับสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดไบกระเพรานั้นมีฤทธิ์ช่วยในการรักษาอาการซึมเศร้าได้เช่นกัน (86)

สำหรับสมุนไพรที่นำมาใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้ได้แก่ สะระแหน่ (*Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen) (ภาพที่ 2.10) บัวบก (*Centella asiatica* L.) (ภาพที่ 2.11) และ ชี้เหล็ก (*Senna siamea* Lam.) (ภาพที่ 2.12) ซึ่งเป็นสมุนไพรพื้นบ้านในประเทศไทยและมีการศึกษาเกี่ยวกับสรรพคุณที่ช่วยในการบำรุงสมองในวารสารต่างๆ และเป็นสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆในอดีต



ที่มา: <http://jitty12.multiply.com/photos/album/77/77#photo=6>

ภาพที่ 2.10 ลักษณะโครงสร้างของต้นสะระแหน่

2.8.1 สะระแหน่ (Kitchen mint)

สะระแหน่ หรือ สะระแหน่สวน ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Mentha cordifolia* Opiz ex Fresen เป็นพืชล้มลุก ลำต้นมีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมสีเขียวแกมม่วงน้ำตาล ใบเลี้ยงเดี่ยว เรียงตรงข้ามรูปวงรีค่อนข้างกว้าง ผิวใบขน ขอบใบหยักเป็นฟันเลื่อย มีกลิ่นเฉพาะ ดอกช่อออกเป็นกระจุกที่ซอกใบ ผลแห้งไม่แตก (87) สะระแหน่เป็นพืชสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาโรคต่างๆในสมัยโบราณ และนำมาใช้เป็นสมุนไพรพื้นบ้านเพื่อรักษา และบำรุงร่างกายมาจนถึงปัจจุบัน โดยมีการบันทึกในคัมภีร์อายุรเวท (Ayurveda) ว่า สะระแหน่ มีฤทธิ์ในการผ่อนคลายความเครียด และช่วยในการฟื้นฟูการทำงานของสมอง และระบบประสาท นอกจากนี้ สะระแหน่ยังมีฤทธิ์ช่วย ในการขับลม ขับเสมหะ แก้ผื่นแพ้จากแมลง แก้วิงเวียนศีรษะ และแก้ปวดต่างๆ ไม่ว่าจะปวดข้อ ปวดหัว หรือปวดกล้ามเนื้อ (88) จากการศึกษาที่ผ่านมามีพบว่า ในสะระแหน่มีสารประกอบหลายชนิดด้วยกัน เช่น cadinene, cavone, p-cymene, limonene, menthol (89) และจากการศึกษาของ McKemy และคณะในปี ค.ศ. 2002 พบว่า สาร menthol มีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ Transient receptor potential (TRP) Channels ชนิด TRPM8 ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งไอออนชนิดหนึ่งในระบบประสาท โดยการทำงานจะมีความสัมพันธ์กับการรับรู้ความรู้สึกเย็นของร่างกาย โดยโปรตีน TRPM8 จะถูกกระตุ้นให้ทำงานเมื่อสภาพแวดล้อมมีอุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียส (90) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Irene และคณะในปี ค.ศ. 2002 พบว่าสารสกัดจากใบสะระแหน่ด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านการกลายพันธุ์ของสารพันธุกรรม (antimutagenic) ได้อีกด้วย (91)



ที่มา: <http://www.n3k.in.th/สมุนไพร/ใบบัวบก>

ภาพที่ 2.11 ลักษณะโครงสร้างของต้นบัวบก

2.8.2 บัวบก (Gotu kola)

บัวบก หรือ ผักแว่น ผักหนอก ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Centella asiatica* L. (Umb.) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุกอายุหลายปี เลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน ชอบที่ชื้นแฉะ แดงรากฝอยตามข้อไหลที่แผ่ไปจะงอกใบจากข้อชูขึ้น 3-5 ใบ ใบเดี่ยว เรียงสลับ รูปไตเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-5 เซนติเมตร ขอบใบหยัก ก้านใบยาว ดอกช่อออกที่ซอกใบ ขนาดเล็ก 2-3 ดอก กลีบดอกสีม่วง ผล เป็นผลแห้ง แตกได้ (87) เป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่มีการบันทึกไว้ในคัมภีร์อายุรเวทว่ามีสรรพคุณช่วยในการบำรุงสมอง ฟันฟูเซลล์สมองที่มีการเสื่อมสภาพ ซึ่งทำให้มีความจำที่ดีขึ้น และจากงานวิจัยของ Wijeweera และคณะ ศึกษาพบว่าบัวบกนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ GABA transaminase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสลาย สารสื่อประสาท Gamma-aminobutyric acid (GABA) เป็นเหตุให้สารสื่อประสาทชนิดนี้ลดน้อยลง โดยสารสื่อประสาท GABA เป็นสารสื่อประสาทที่ช่วยในการทำให้ระบบประสาทส่วนกลางเกิดการผ่อนคลาย (Relax) และทำให้มีการฟื้นฟูและซ่อมแซมเซลล์ประสาทที่มีความเสียหาย ทำให้ป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาท ดังนั้นถ้าสารสื่อประสาท GABA ถูกทำลายโดยเอนไซม์ GABA transaminase มากเกินไป จะทำให้ระบบประสาทสูญเสียเซลล์ประสาทไปทำให้เกิดความผิดปกติของระบบประสาทขึ้นได้ เช่น ความสามารถในการจดจำลดลงเป็นเหตุให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer disease) (92) โดยสารประกอบที่สามารถพบได้ในบัวบก ได้แก่ สารประกอบจำพวก monoterpenes (bornyl acetate, pinene) เป็นสารที่สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ Acetylcholine esterase (AChE),

สารประกอบ alkaloids, สารประกอบ atropine เป็นสารที่มีฤทธิ์กดประสาท, สารประกอบ Asiatic acid และสารประกอบ brahmoside ที่มีฤทธิ์ช่วยในการจดจำ และแก้อาการปวดหัวข้างเดียว (antiamnestic) เป็นต้น (92-96)



ที่มา: http://www.tratcc.ac.th/wwwstd/14samoopai/page_pa_04.html

ภาพที่ 2.12 ลักษณะโครงสร้างของต้นขี้เหล็ก

2.8.3 ขี้เหล็ก (Cassod tree)

ขี้เหล็ก หรือ ขี้เหล็กใหญ่ (ภาคกลาง) ขี้เหล็กแก่น (ราชบุรี) ขี้เหล็กหลวง (ภาคเหนือ) ขี้เหล็กบ้าน (ลำปาง, สุราษฎร์ธานี) ผักจี้ล (เจ็ว-แม่ฮ่องสอน) มะขี้แผละพะโด (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน) ยะหา (มลายู-ปัตตานี) ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Senna siamea* Lam. มีลักษณะเป็นไม้ยืนต้น สูง 10-15 เมตร แตกกิ่งก้านเป็นพุ่มแคบ เปลือกต้นสีน้ำตาล แตกเป็นร่องตื้นๆ ตามยาว ใบ เป็นใบประกอบแบบขนนกออกเรียงสลับกัน มีใบย่อย 13-19 ใบรูปรีดอกออกเป็นช่อแบบช่อแยกแขนงที่ปลายกิ่ง ดอกสีเหลือง ปลายมน โคนเรียว หลุดร่วงง่าย (87) ขี้เหล็กเป็นสมุนไพรพื้นบ้านที่ชาวบ้านนำมาใช้ในการรักษาอาการนอนไม่หลับ (Insomnia) มาแต่โบราณ และจากการศึกษาส่วนประกอบในสารสกัดจากใบขี้เหล็กพบว่าในสารสกัดมีส่วนประกอบของสารชนิดหนึ่ง โดยนักวิทยาศาสตร์ได้ตั้งชื่อสารชนิดนี้ว่า บาราคอล (Barakol) โดยสารชนิดนี้มีฤทธิ์ช่วยในการระงับประสาท และกดประสาทได้ และยังช่วยในการผ่อนคลายความวิตกกังวล (Anxiety) ได้อีกด้วย แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าสารชนิดนี้มีพิษต่อตับถ้าทานในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอาการตับอักเสบขึ้นได้ (97)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader	BioTek Instruments, Inc.	สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง Nanodrop 1000	Thermo Scientific, Inc	สหรัฐอเมริกา
3. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) รุ่น Olympus CK30	Olympus	ญี่ปุ่น
4. เครื่อง thermal cycler รุ่น DNA Engine PTC-200	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
5. เครื่อง thermal cycler รุ่น Mastercycler EP	Eppendorf AG	เยอรมนี
6. ชุดถ่ายภาพเจล (Transilluminator และ Doc-Print)	VILBER LOURMAT	ฝรั่งเศส
7. เครื่องถ่ายภาพเจล Gel Documentation (Gel Doc) systems	Syngene	อังกฤษ
8. เครื่อง Micro High Speed Refrigerated Centrifuge รุ่น VS-15000CFNII	Vision Scientific Co.,Ltd	เกาหลีใต้
9. เครื่องเขย่าผสม (vortex mixer) รุ่น FINE VORTEX	FINEPCR	เกาหลีใต้

10. เครื่อง vacuum concentrator (DNA speedVacs) รุ่น DNA110-230	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
11. เครื่อง suction รุ่น Pumpe 4010	Boehringer Mannheim	เยอรมนี
12. เครื่อง cryocentrifuge รุ่น Biofuge Stratos	Kendro Laboratory Products	เยอรมนี
13. เครื่อง Evaporation รุ่น miVAC	Genevac	อังกฤษ
14. เครื่อง Lyophilizer รุ่น MODULYOD	Thermo Electron CORP.	สหรัฐอเมริกา
15. เครื่องชั่งแบบละเอียด รุ่น AB204-S CLASSIC	METTLER TOLEDO	สวิสเซอร์แลนด์
16. ตู้อบ (incubator shaker) Minitron	Appropriate Technical Resources, Inc.	สหรัฐอเมริกา
17. ตู้อบเพาะเลี้ยง CO ₂ (CO ₂ incubator)	Sheldon Manufacturing Inc	สหรัฐอเมริกา
18. ตู้อบ (incubator)	Memmert	เยอรมนี

19. ตู้ปลอดเชื้อ (class II biosafety cabinet) รุ่น NapFLOW (Napco)	Thermo Scientific, Inc.	สหรัฐอเมริกา
20. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow cabinet)	E.S.I. FLUFRANCE	ฝรั่งเศส
21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)	Memmert	เยอรมนี
22. ตู้แช่แข็ง -20 °C (Top Open Chest Freezer)	SANYO Electric Co.,Ltd	ญี่ปุ่น
23. ตู้แช่แข็ง -80 °C (ULT Deep Freezer) รุ่น DF8524	ilShin Lab Co.,ltd.	เกาหลีใต้
24. เครื่องทำน้ำ Milli-Q	MERCK Millipore	สหรัฐอเมริกา
25. ถัง liquid nitrogen รุ่น XT20	TAYLOR-WHARTON	สหรัฐอเมริกา
26. SUB CELL รุ่น Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
27. SUB CELL รุ่น Wide Mini-Sub Cell GT	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
28. เครื่อง power supply รุ่น POWER PAC 200	BIO-RAD	สหรัฐอเมริกา
29. เครื่อง power supply รุ่น SX250 MightySlim PSU.	Hoefer, Inc.	สหรัฐอเมริกา
30. เครื่อง Gel electrophoresis tank รุ่น i-MyRun	Cosmo Bio	สหรัฐอเมริกา

3.1.2 อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Auto pipette (ขนาด 20, 200, 1000 μ L)	GILSON	ฝรั่งเศส
2. Auto pipette (ขนาด 10, 20, 200, 1000 μ L)	Eppendorf AG	เยอรมนี
3. Pipette aid รุ่น Portable XP	Drummond Scientific	สหรัฐอเมริกา
4. Pipette tips (ขนาด 10, 200, 1000 μ L)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
5. Barriertips (ขนาด 10, 20, 200, 1000 μ L)	Thermo Fisher Scientific Inc.	สหรัฐอเมริกา
6. Microcentrifuge tube (ขนาด 0.5 mL และ 1.5 mL) และ PCR tube	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
7. Centrifuge tube (ขนาด 15 mL และ 50 mL)	Corning, Inc.	สหรัฐอเมริกา
8. 96-well cell culture cluster, flat bottom with lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
9. 96-well black with clear flat bottom tissue culture treated with lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
10. 6-well cell culture cluster, flat bottom with lid	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
11. Cell culture dish (ขนาด 100mm \times 20mm)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
12. Cell culture flask (ขนาด 25 cm ² และ 75 cm ²)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
13. Disposable serological pipette (ขนาด 5 mL, 10 mL และ 25 mL)	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา

14. Pasteur pipette	COPAN innovation	สหรัฐอเมริกา
15. Cryovial tube (ขนาด 2 mL)	Simport plastics	แคนาดา
16. Filter Paper NO.3	Whatman International Ltd.	อังกฤษ
17. Syringe Filter	Corning Inc.	สหรัฐอเมริกา
3.1.3 สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
1. Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) powder low glucose with 4.00 mM/L Glutamine, 1000 mg/L Glucose and 110 mg/L Sodium Pyruvate	Gibco	สหรัฐอเมริกา
2. Sodium hydrogen carbonate	Merck	เยอรมัน
3. Fetal bovine serum (FBS)	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
4. HyQ trypsin 0.25 % with EDTA with 2.5 g porcine trypsin without calcium, magnesium	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
5. Phosphate buffered saline	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
6. 100x Antibiotic-Antimycotic solution 10,000 units/mL Penicillin, 10,000 µg/mL Streptomycin Amphotericin B 250 µg/mL	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
7. Thiazoyl blue tetrazolium bromide (MTT)	Bio Basic Inc.	แคนาดา

8. Dimethyl sulfoxide (DMSO)	MERCK	เยอรมนี
9. Dimethyl sulfoxide (DMSO), for molecular biology	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
10. TRIzol® RNA Isolation Reagents	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
11. Chloroform	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
12. 2-propanol	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
13. Absolute ethanol	MERCK	เยอรมนี
14. Absolute ethanol	RCI Labscan	ไทย
15. ชุดน้ำยา Taq DNA polymerase	New England biolab (NEB)	อังกฤษ
16. Deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP)	Fermentas	แคนาดา
17. ชุดน้ำยา SuperScript III reverse transcriptase	Invitrogen	สหรัฐอเมริกา
18. RNase AWAY (for RNase decontamination)	Continental Lab Products, Inc.	สหรัฐอเมริกา
19. เอนไซม์ Deoxyribonuclease I, Amplification Grade	Promega	สหรัฐอเมริกา
20. RiboLock™ RNase Inhibitor	Fermentas	แคนาดา
21. Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
22. GenePure LE Agarose	ISC BioExpress	สหรัฐอเมริกา

23. gene ruler 100-3000 bp DNA ladder	Fermentas	แคนาดา
24. Ethidium bromide	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
25. Tris base	Biobasic	แคนาดา
26. Glacial acetic acid	J.T. Baker	ไทย
27. Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt	BDH	อังกฤษ
28. ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay kit	Molecular device	สหรัฐอเมริกา
29. 10X Hanks' Balance Salt Solution	Gibco	สหรัฐอเมริกา
30. HEPES Free acid	Hyclone	สหรัฐอเมริกา
31. Fluoxetine hydrochloride	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
32. GBR 12935 dihydrochloride	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา
33. Desipramine hydrochloride	Sigma-Aldrich	สหรัฐอเมริกา

3.2 กลุ่มตัวอย่างที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย

3.2.1 ตัวอย่างเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด LAN-5 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งประสาทมนุษย์ที่นำมาจากไขกระดูกของเด็กผู้ชายอายุ 5 ปี โดยอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ชนิดนี้คือ Dulbecco's Modified Eagle Medium/Low glucose (DMEM/Low glucose) ที่มี fetal bovine serum อยู่ 10 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และยาปฏิชีวนะคือ 100x Antibiotic-Antimycotic solution 10,000 units/mL Penicillin 10,000 µg/mL Streptomycin Amphotericin B 250 µg/mL ซึ่งจะเลี้ยงอยู่ในสภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.2.2 ตัวอย่างของสมุนไพร

สำหรับสมุนไพรที่นำมาใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้

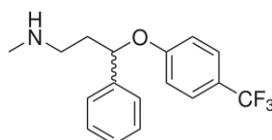
- | | | | | | |
|---|-----------|------------|---------|------------|---------------|
| - | สระระแห่น | ส่วนที่ใช้ | ใบ | แหล่งที่มา | กรุงเทพมหานคร |
| - | บัวบก | ส่วนที่ใช้ | ทั้งต้น | แหล่งที่มา | ชลบุรี |
| - | ขี้เหล็ก | ส่วนที่ใช้ | ใบ | แหล่งที่มา | กรุงเทพมหานคร |

โดยสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด นำมาจากสวนผักภายในกรุงเทพมหานคร และ จังหวัดชลบุรี ประเทศไทย โดยมีการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยโดย ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บตัวอย่างของสมุนไพรไทยในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิณ สุวตะพันธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.3 ตัวอย่างของยาต้านโรคซึมเศร้า (Antidepressant drug)

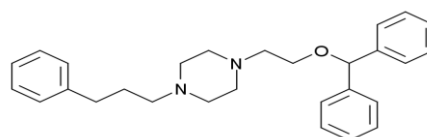
สำหรับยาต้านโรคซึมเศร้าที่นำมาใช้ทดสอบในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 ชนิด ดังนี้

- Fluoxetine hydrochloride ใช้เป็นยาอ้างอิงในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน (ภาพที่ 3.1)



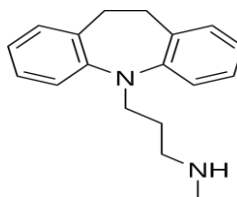
ภาพที่ 3.1 โครงสร้างโมเลกุลของยา fluoxetine hydrochloride

- GBR 12935 dihydrochloride ใช้เป็นยาอ้างอิงในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน (ภาพที่ 3.2)



ภาพที่ 3.2 โครงสร้างโมเลกุลของยา GBR12935 dihydrochloride

- Desipramine hydrochloride ใช้เป็นยาอ้างอิงในการทดสอบการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน (ภาพที่ 3.3)



ภาพที่ 3.3 โครงสร้างโมเลกุลของยา desipramine hydrochloride

โดยงานวิจัยของ Gang Zhao และคณะได้ใช้ยาทั้ง 3 ชนิด เป็นยาอ้างอิงที่ใช้ในการทดสอบการทำงานของตัวขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน โดยใช้ความเข้มข้นที่ 10 ไมโครโมลาร์สำหรับ fluoxetine hydrochloride และ desipramine hydrochloride 0.1 ไมโครโมลาร์สำหรับ GBR 12935 dihydrochloride (98)

3.3 การเตรียมสารสกัดสมุนไพรและสารละลายยาด้านโรคซึมเศร้าที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

3.3.1 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอลโดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) เป็นวิธีการสกัดสารสำคัญจากพืชหรือสมุนไพรโดยการหมักพืชหรือสมุนไพรกับตัวทำละลายจนกระทั่งเนื้อเยื่อของพืชหรือสมุนไพรอ่อนนุ่มและตัวทำละลายสามารถแทรกซึมเข้าไปละลายองค์ประกอบภายในพืชหรือสมุนไพรออกมาได้ เริ่มจากนำสมุนไพรสดมาล้างน้ำให้สะอาดและนำไปตากให้แห้ง บดสมุนไพรให้ละเอียดเป็นผง จากนั้นนำไปหมักกับตัวทำละลายเอทานอล ที่อัตราส่วนระหว่างสมุนไพรบดแห้งบดแห้ง 1 กรัมต่อตัวทำละลาย 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.3 จากนั้นนำไประเหยตัวทำละลายออกด้วยวิธี evaporation ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้สารสกัดหยาบ (crude extract) ออกมาละลายสารสกัดหยาบให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วย dimethyl sulphoxide (DMSO) และนำมากรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดของรูกระดาษกรอง เท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มีด

3.3.2 การสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายน้ำโดยวิธีต้ม (Boil)

นำผงสมุนไพรแห้งที่ได้ในขั้นตอนมาต้มกับน้ำกลั่นที่อัตราส่วนสมุนไพรบดแห้ง 1 กรัมต่อ น้ำ 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งสารสกัดไว้ให้เย็นแล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman NO.3 จากนั้นนำไปทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization จนได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) ออกมาละลายสารสกัดหยาบด้วย DMSO ให้ได้

ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและนำมากรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดของรูกระดาศกรองเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในที่มีด

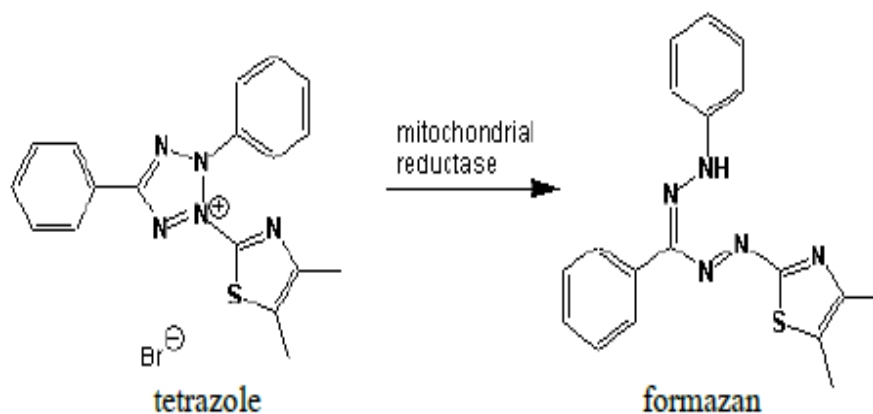
3.3.3 การเตรียมยาต้านโรคซึมเศร้า

นำสาร fluoxetine hydrochloride, desipramine hydrochloride และ GBR12935 dihydrochloride มาละลายด้วยน้ำมิลลิคิว (Milli-Q) ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 มิลลิโมลลาร์ จากนั้นนำไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองด้วย syringe filter ที่มีขนาดของรูกระดาศกรองเท่ากับ 0.2 ไมโครเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มีด

3.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านโรคซึมเศร้าของสารสกัดจากสมุนไพร

3.4.1 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารสกัดจากสมุนไพร และยาต้านโรคซึมเศร้าด้วยวิธี MTT assay

เทคนิค MTT เป็นเทคนิคที่วัดการเปลี่ยนแปลงของสี (Colorimetric assays) โดยสารสีเหลือง MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole) จะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ เปลี่ยนเป็นตะกอนของ formazan สีม่วงสามารถละลายตะกอน formazan ด้วยสารตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นตั้งแต่ 500-600 nm (99)



ภาพที่ 3.4 ปฏิกริยารีดักชัน (Reduction reaction) ของวิธี MTT assay

เลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 25,000 เซลล์ และมีปริมาตรเท่ากับ 150 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบ ดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 1,000, 800, 600, 300, 100, 50, และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเซลล์ 2.) สารละลายยาด้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้น 1000, 100, 10, 1 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 3.) อาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 200 และนำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5) 20 ไมโครลิตร (สารละลาย MTT 10 ไมโครลิตรต่อปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร) แล้วนำกลับเข้าไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งทั้งหมด เติมสารผสมระหว่าง DMSO และ เอทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงจนตะกอนถูกละลายจนหมด แล้วดูดส่วนน้ำด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability)

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{treated cell} - \text{blank}) \times 100}{(\text{untreated cell} - \text{blank})}$$

3.4.2 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออกในระดับ mRNA ของ ยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท LAN-5 ลงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 6 หลุม โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 550,000 เซลล์ และมีปริมาตรเท่ากับ 1.5 มิลลิลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบ ดังนี้ 1.) สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิดที่ความเข้มข้น 100 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 2.) อาหารเลี้ยงเซลล์ โดยให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิลิตร และนำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงนำเซลล์มาสกัดอาร์เอ็นเอ (Total RNA) โดยใช้รีเอเจนต์ TRIzol

3.4.2.1 การสกัด Total RNA โดยใช้รีเอเจนต์ TRIzol

นำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้มาล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง เติมน้ำยา TRIzol 1 มิลลิลิตร ต่อเซลล์จำนวน 5×10^6 เซลล์ ผสมให้เซลล์เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ปิเปต ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายคลอโรฟอร์มเย็น 200 ไมโครลิตร ต่อ น้ำยา TRIzol 1 มิลลิลิตร ผสมสารให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยการเขย่าอย่างรุนแรง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 3 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็วไม่เกิน 12,000 g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้เป็นสารละลายทั้งหมด 3 ชั้น โดยอาร์เอ็นเอจะอยู่ในส่วนใสชั้น บนสุด ดูดส่วนใสชั้นบนสุดประมาณ 400 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายไอโซโพรพานอลเย็น 500 ไมโครลิตร ต่อ น้ำยา TRIzol 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดขึ้นลงประมาณ 10 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะเกิดเป็นตะกอนรูปเข็มสีขาวขุ่นที่ก้นหลอด จากนั้นเทสารส่วนใสด้านบนทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 75 เปอร์เซ็นต์เอทานอลในน้ำ (DEPC-treated water) ที่ปราศจากเอนไซม์ย่อยอาร์เอ็นเอ (RNase) ปั่นที่ความเร็ว 7500 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตากตะกอนอาร์เอ็นเอให้แห้ง ละลายตะกอนอาร์เอ็นเอด้วยน้ำ DEPC ที่ปราศจาก RNase ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บรักษาอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ได้นานหลายเดือน

3.4.2.2 การวัดความเข้มข้นของ total RNA ที่สกัดได้ ด้วยการวัดค่า Optical Density (OD)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ 2 ไมโครลิตร ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง NanoDrop โดยให้ค่า OD_{260} มีค่าเท่ากับ 1.00 เทียบได้กับปริมาณอาร์เอ็นเอ 40 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ต้องเจือจางอาร์เอ็นเอด้วยน้ำกลั่นก่อน เครื่องจะทำการคำนวณค่าความเข้มข้นอาร์เอ็นเอจากสูตร

$$[\text{RNA}] = OD_{260} \times 40 \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^{-3}$$

3.4.2.3 การกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอด้วยเอนไซม์ Deoxyribonuclease I (DNase I)

นำอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 500 ng มาทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ DNase I ดังตารางที่ 3.1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาให้หยุดการทำงานของเอนไซม์ DNaseI ด้วย 25 mM EDTA, pH 8.0 ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ตารางที่ 3.1 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อนออกจากตัวอย่างอาร์เอ็นเอ

Reagent	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (µl)
10x DNase I Reaction buffer	1
DNase I	1
RNA	ขึ้นกับความเข้มข้นของ RNA ตัวอย่าง
DEPC-treated water	เติมให้ปริมาตรของปฏิกริยาครบ 10 µl
รวมปริมาตรทั้งหมดเป็น 10 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที	
25 mM EDTA, pH 8.0	1
นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 10 นาที	

3.4.2.4 การสร้าง complementary DNA (cDNA) จากอาร์เอ็นเอ

นำอาร์เอ็นเอที่ผ่านการกำจัดดีเอ็นเอปนเปื้อน 10 ไมโครลิตร ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ Reverse Transcriptase (RT) ดังตารางที่ 3.2 โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา คือ ตั้งที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ปรับอุณหภูมิขึ้นเป็น 50 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ RT จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยปรับอุณหภูมิขึ้นเป็น 70 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ตารางที่ 3.2 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อสร้าง cDNA จากอาร์เอ็นเอ

Reagent	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (µl)
50 µM Oligo-dT 20 mer	1
Total RNA 10pg-5µg	10
10 mM dNTP Mix	1
DEPC-treated water	เติมให้ครบ 13 µl
ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วแช่แข็งทันที นาน 1 นาที	
SuperScript III 5X First-Strand Buffer	4
SuperScript III 0.1 M DTT	1
40 unit RiboLock	1
SuperScript III Reverse Transcriptase (200 units/ µl)	1
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 20 ไมโครลิตร	

3.4.2.5 การทดสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

ทำ PCR เพื่อตรวจสอบการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้ cDNA จากขั้นตอน 3.2.2.4 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ผสมกับชุดน้ำยาทำ PCR ดังตารางที่ 3.3 และใช้ primers ที่จำเพาะต่อยีนที่ตรวจวัดสำหรับตรวจสอบการแสดงออกยีนที่สนใจ ดังตารางที่ 3.4 โดยปริมาตรสุดท้ายจะเท่ากับ 25 ไมโครลิตร จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เครื่อง Thermal Cycler ในสภาวะที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา ดังตารางที่ 3.5 นำมาตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอ โดยใช้กระแสไฟฟ้า บน agarose gel ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ให้มีความต่างศักย์ 90 โวลต์ (gel electrophoresis) ย้อมเจลด้วยเอทีเดียมโบรมาйд และถ่ายภาพเจลที่ย้อมแล้วด้วยเครื่องถ่ายภาพเจล จากนั้นวัดความเข้มของชั้นผลิตภัณฑ์ในภาพโดยใช้โปรแกรม GeneTool เปรียบเทียบความเข้มของชั้นผลิตภัณฑ์ (product band) เพื่อดูระดับการแสดงออกของ mRNA เทียบกับชั้นผลิตภัณฑ์ของยีนควบคุม (GAPDH) และคำนวณหาร้อยละของการแสดงออกของ mRNA ในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่ไม่มีสารทดสอบ (%cell expression of mRNA)

$$\% \text{cell expression of mRNA} = \frac{\text{100 x treated cell}}{\text{control cell}}$$

untreated cell

ตารางที่ 3.3 ขั้นตอนการเติมน้ำยาเพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนที่สนใจศึกษา

น้ำยา	ปริมาตรต่อ 1 ปฏิกริยา (μ l)
10X NEB Standard Buffer	2.5 สำหรับ DAT, NET และ SERT 3.25 สำหรับ GAPDH
10 mM dNTP Mix	0.5
10 μ M Forward primer	0.5 สำหรับ DAT, NET และ SERT 0.125 สำหรับ GAPDH
10 μ M Reward primer	0.5 สำหรับ DAT, NET และ SERT 0.125 สำหรับ GAPDH
DMSO*	1.25
Taq-DNA polymerase	0.125 สำหรับ DAT, NET และ SERT 0.1875 สำหรับ GAPDH
cDNA	5 สำหรับ DAT, NET และ SERT 1 สำหรับ GAPDH
Milli-Q water	14.625 สำหรับ NET และ SERT 15.875 สำหรับ DAT 18.5625 สำหรับ GAPDH
รวมปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 25 ไมโครลิตร เพิ่มจำนวน DNA ด้วยเทคนิค PCR หมายเหตุ: *DMSO ใส่เฉพาะ NET, SERT และ GAPDH	

ตารางที่ 3.4 Primers จำเพาะสำหรับตรวจสอบการแสดงออกของยีนและขนาดของผลิตภัณฑ์

ยีน	ลำดับเบส	ขนาด ผลิตภัณฑ์
-----	----------	-------------------

hDAT forward primer(100)	5' GTC ACC AAC GGT GGC ATC TA 3'	195 bp
hDAT reverse primer(100)	5'GCT GAC CAG CTT CCA GCA 3'	
hNET forward primer(101)	5' GCT TCT ACT ACA ACG TCA TCA TC 3'	294 bp
hNET reverse primer(101)	5' CGA TGA CGA CGA CCA TCA G 3'	
hSERT forward primer(101)	5' CAT CTG GAA AGG CGT CAA G 3'	319 bp
hSERT reverse primer(101)	5' CGA AAC GAA GCT CGT CAT G 3'	
GAPDH forward primer(102)	5' GAC CAC AGT CCA TGC CAT CAC T 3'	452 bp
GAPDH reverse primer(102)	5' TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG 3'	

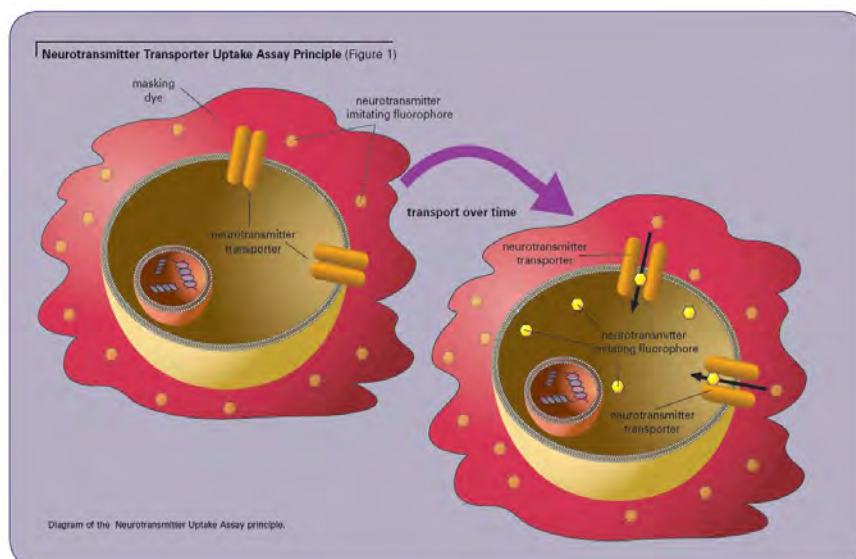
ตารางที่ 3.5 ปฏิกริยาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน hDAT, hNET, hSERT และ GAPDH

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (°C)	เวลา (นาที)	จำนวนรอบ
Pre-denature	94	2	1
Denature	95	45 วินาที	40
Annealing	55 สำหรับ NET, SERT และ GAPDH 57.2 สำหรับ DAT	45 วินาที	
Extension	72	45 วินาที	
Final extension	72	7	1
Hold temp.	4	forever	-

3.4.3 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมองไพเรตต่อการต้านโรคซึมเศร้า ที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay kit

ชุดทดสอบ Neurotransmitter transporter uptake assay kit (Molecular Devices) ภายในน้ำยาของชุดทดสอบจะมีส่วนประกอบของโมเลกุลที่สังเคราะห์เลียนแบบสารสื่อ

ประสาทชนิดโมโนเอมีนทำให้โมเลกุลเหล่านั้นสามารถเคลื่อนที่ผ่านตัวขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนได้ ซึ่งโมเลกุลนั้นติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescent) ที่มีสารกวดการเรืองแสงอยู่เมื่ออยู่ในสภาวะปกติ (Masking Dye) แต่เมื่อนำน้ำยาไปทำการทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่มีการแสดงออกของยีน หรือมีองค์ประกอบของตัวขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน โมเลกุลเลียนแบบนั้นจะสามารถเคลื่อนผ่านเข้าสู่เซลล์โดยอาศัยช่องทางของตัวขนส่งสารสื่อประสาทเหล่านั้นทำให้สารกวดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์หลุดออก ดังนั้นเมื่อนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์โดยใช้เครื่อง Fluorometer จะสามารถวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ได้ภายในเซลล์ โดยค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้จะแปรตามปริมาณโมเลกุลเลียนแบบที่เคลื่อนผ่านตัวขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนที่ทำงานได้ เข้าสู่เซลล์เพาะเลี้ยงทำให้สามารถวัดอัตราการทำงานของตัวขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนได้ (ภาพที่ 3.5)



ที่มา: <http://www.moleculardevices.com/Products/Assay-Kits/Transporters/Neurotransmitter.html>

ภาพที่ 3.5 หลักการของชุดน้ำยา Neurotransmitter Transporter Uptake Assay Kit

เลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม ชนิดก้นใสด้านข้างมีด โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 35,000 เซลล์ และมีปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังตารางที่ 3.6 ซึ่งสามารถแบ่งเป็นกลุ่มทดสอบได้ 4 กลุ่ม ดังตารางที่ 3.7 โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมา

เติมน้ำยา fluorescent dye/masking dye mix ลงไปในแต่ละหลุมการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดอัตราการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เวลาที่ 0, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 นาที ที่ความยาวคลื่น 440, 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader ข้อมูลที่ได้นำมาหักออกจากค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของสารทดสอบและเซลล์ที่ไม่ได้ใส่น้ำยา fluorescent dye/masking dye mix (Blank) จากนั้นนำค่าที่ได้มาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าอัตราการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (RFU) และระยะเวลาที่วัด (min) (ภาพที่ 3.6) และนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (Area below curve) โดยใช้โปรแกรม Sigma Plot เวอร์ชัน 11.0

3.4.4 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี MTT Assay

เลี้ยงเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงขนาด 96 หลุม โดยให้มีจำนวนเซลล์ในแต่ละหลุมเท่ากับ 35,000 เซลล์ และมีปริมาตรเท่ากับ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์, อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาใช้ปิเปตดูดเอาอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด จากนั้นนำมาทดสอบกับสารทดสอบดังตารางที่ 3.6 โดยปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 ไมโครลิตร นำเซลล์ไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาเติมสารละลาย MTT (ความเข้มข้น 5 mg/ml ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์, pH 7.5) 20 ไมโครลิตร (สารละลาย MTT 10 ไมโครลิตรต่อปริมาตรสุดท้าย 100 ไมโครลิตร) แล้วนำกลับเข้าไปบ่มที่สภาวะ 5 เปอร์เซ็นต์ คาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำมาดูดส่วนน้ำใสด้านบนทิ้งทั้งหมด เติมสารผสมระหว่าง DMSO และเอทานอลในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จำนวน 200 ไมโครลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงจนตะกอนถูกละลายจนหมด แล้วดูดส่วนน้ำด้านบน 100 ไมโครลิตร ใส่จานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง Synergy Mx Monochromator-Based Multi-Mode Microplate Reader จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell viability)

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{treated cell} - \text{blank}) \times 100}{(\text{untreated cell} - \text{blank})}$$

ตารางที่ 3.6 สารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้าที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

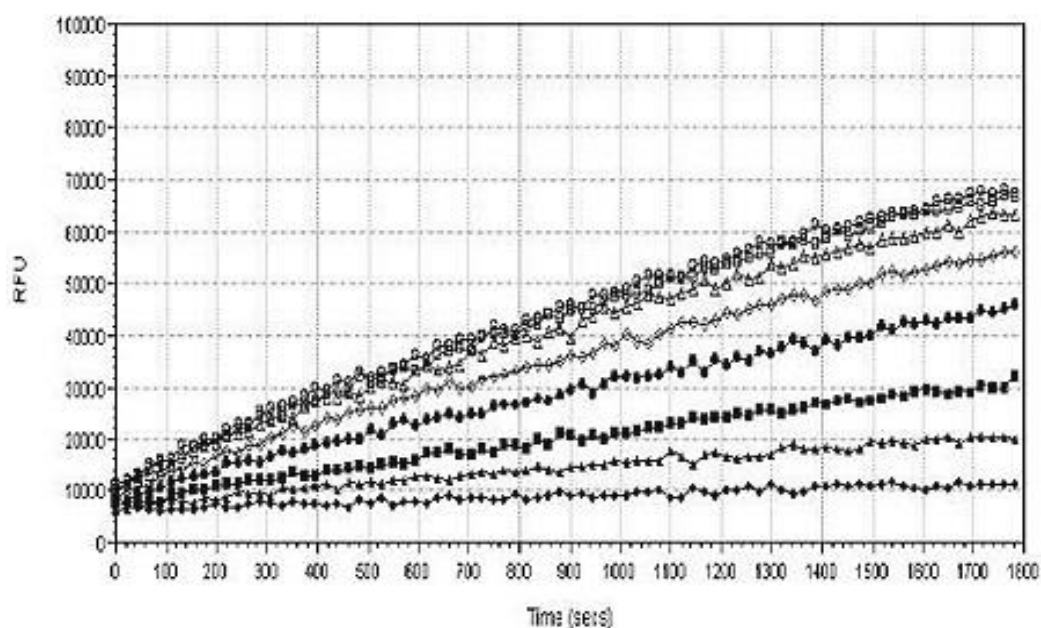
สารทดสอบ	ใช้ทดสอบ
สารสกัดสมุนไพรแต่ละชนิด	โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาททั้ง 3 ชนิด
สารสกัดสมุนไพร+flu+des	โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน
สารสกัดสมุนไพร+flu+GBR12935	โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน
สารสกัดสมุนไพร+des+GBR12935	โปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน
Flu+des+GBR12935	Positive control ของการทดสอบโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาททั้ง 3 ชนิด
Flu+des	Negative control ของการทดสอบโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน
Flu+GBR12935	Negative control ของการทดสอบโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน
Des+GBR12935	Negative control ของการทดสอบโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน
1X HBSS+0.1% BSA Buffer	Negative control ของการทดสอบทั้งหมด
สารทุกชนิดเจือจางใน 1X HBSS+0.1 BSA Buffer ความเข้มข้นสารสกัดสมุนไพรเท่ากับ 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ความเข้มข้นของ flu และ des เท่ากับ 10 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นของ GBR12935 เท่ากับ 0.1 ไมโครโมลาร์	

ตารางที่ 3.7 การแบ่งกลุ่มทดสอบเพื่อทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้าที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5

กลุ่มที่

การทดสอบ

1	ทดสอบผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน
2	ทดสอบผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน
3	ทดสอบผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน
4	ทดสอบผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน



ที่มา: <http://www.moleculardevices.com/products/assay-kits/transporters/neurotransmitter.html>

ภาพที่ 3.6 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (RFU) และระยะเวลา (min)

3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้แต่ละการทดสอบจะทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้ง (triplicate) และนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ

โดยใช้หลักสถิติ Independent Student's *t*-test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ ด้วยโปรแกรม SPSS Statistics เวอร์ชัน 17.0 และการคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟคำนวณโดยใช้โปรแกรม SigmaPlot11.0

4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพร

สมุนไพรที่ใช้ในการศึกษาวิจัยได้รับการพิสูจน์โดย ศ.ดร.ทวีศักดิ์ บุญเกิด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเก็บตัวอย่างของสมุนไพรไทยในพิพิธภัณฑ์พืช (herbarium) ณ พิพิธภัณฑ์พืช ศ.กสิน สุวตะพันธ์ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการพิสูจน์ชนิดของสมุนไพร

Collector Number	Herbarium Number	Scientific Name	Vernacular Name	Common Name	Family
Lukkiga Thanesphatisuk 1	013436 (BCU)	<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	บัวบก	Asiatic pennywort	Umbelliferae (Apiaceae)
Lukkiga Thanesphatisuk 2	013438 (BCU)	<i>Senna aiamea</i> (Lam.) Irwin&Barneby	ขี้เหล็ก, ขี้เหล็กบ้าน	Thai copper pod	Leguminosae- Caesalpinioideae
Visa Thongrakard 21	013445 (BCU)	<i>Mentha cordifolia</i> Opiz <i>ex Fresen</i>	สะระแหน่, สะระแหน่ สวน, หอมคั่ววน	Kitchen mint	Labiatae (Lamiaceae)

4.2 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยเอทานอลโดยวิธีมาเซอเรชัน (Maceration)

จากการสกัดสมุนไพรโดยการนำไปหมักกับเอทานอลที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลผลิตสุดท้ายดังแสดงในตารางที่ 4.2

4.3 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยน้ำโดยวิธีการต้ม (Boil)

จากการสกัดสมุนไพรโดยการนำไปต้มกับน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ได้ผลผลิตสุดท้ายดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ผลการสกัดสมุนไพรด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำ

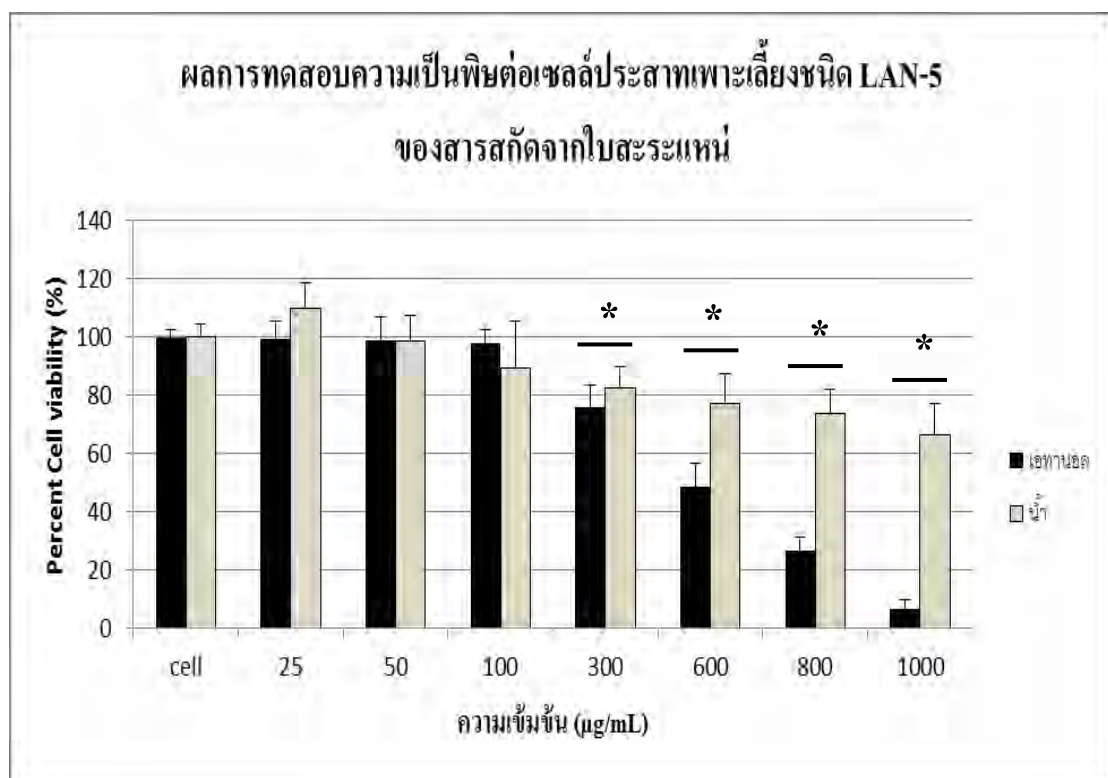
Name of medicinal material	Family	Extract yield (%)	
		Ethanol	Water
<i>Centella asiatica</i> (L.) Urb.	Umbelliferae (Apiaceae)	7.56	9.15
<i>Senna aiamea</i> (Lam.) Irwin&Barneby	Leguminosae- Caesalpinioideae	11.46	9.639
<i>Mentha cordifolia</i> Opiz ex Fresen	Labiatae (Lamiaceae)	4.36	11.2

4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารสกัดจากสมุนไพร และยาด้านโรคซึมเศร้าด้วยวิธี MTT assay

จากการทดสอบวัดความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรที่สกัดจากเอทานอล และน้ำทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1000, 800, 600, 300, 100, 50 และ 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารละลายยาด้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 1000, 100, 10, 1 และ 0.1 ไมโครโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพร และสารละลายยาเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิต (Cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%Cell viability) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ Independent Student's *t*-test โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

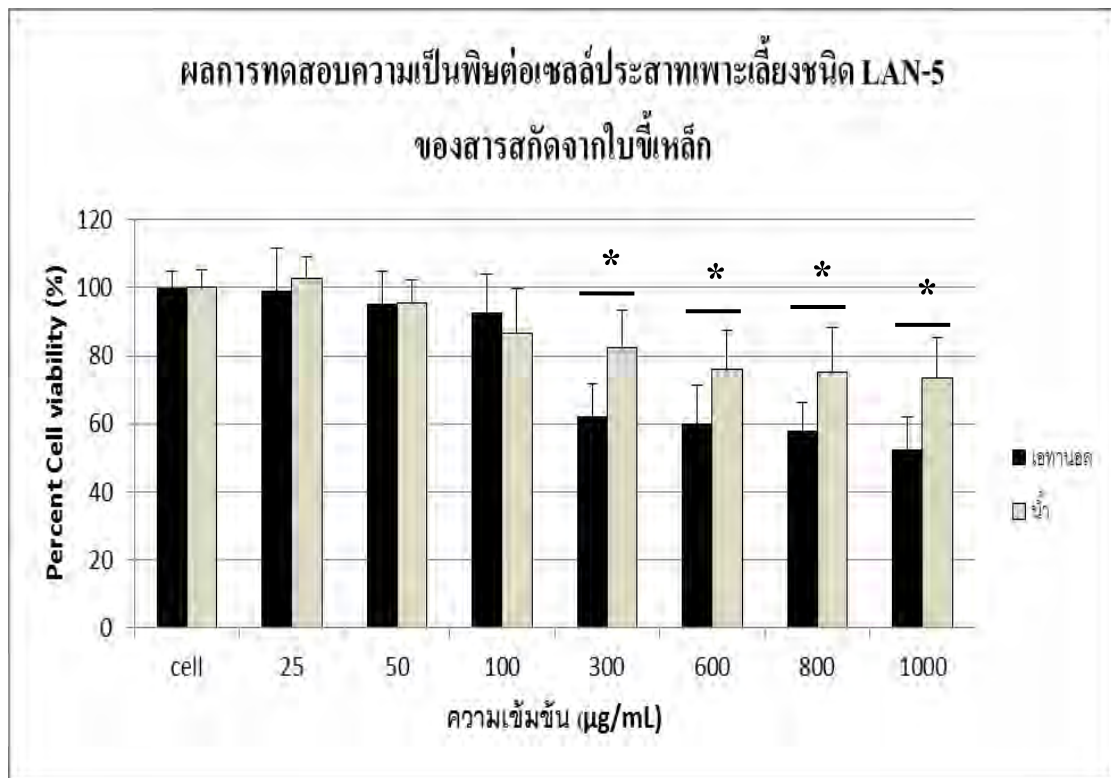
ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดจากใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ที่สกัดจากเอทานอล และ น้ำ ความเข้มข้น 300, 600, 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.1-4.3) สำหรับสารละลายยา fluoxetine hydrochloride และ desipramine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ GBR12935 dihydrochloride ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 ไมโครโมลาร์ นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงโดยเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตมีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.4)

จากผลทดสอบดังกล่าวคณะผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรที่น้อยที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ และมากที่สุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ คือ 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตรไปทำการทดสอบวัดฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออกระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 และทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อระดับการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน, โดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 สำหรับความเข้มข้นของยาต้านโรคซึมเศร้าได้ใช้ความเข้มข้นตามงานวิจัยของ Gang Zhao และคณะ โดย fluoxetine hydrochloride และ desipramine hydrochloride ใช้ความเข้มข้นที่ 10 ไมโครโมลาร์ และ GBR12935 ใช้ความเข้มข้นที่ 0.1 ไมโครโมลาร์ โดยนำไปใช้เป็นสารทดสอบฤทธิ์ต่อระดับการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาททั้ง 3 ชนิด ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ให้เป็นกลุ่มควบคุมบวกในการทดสอบ

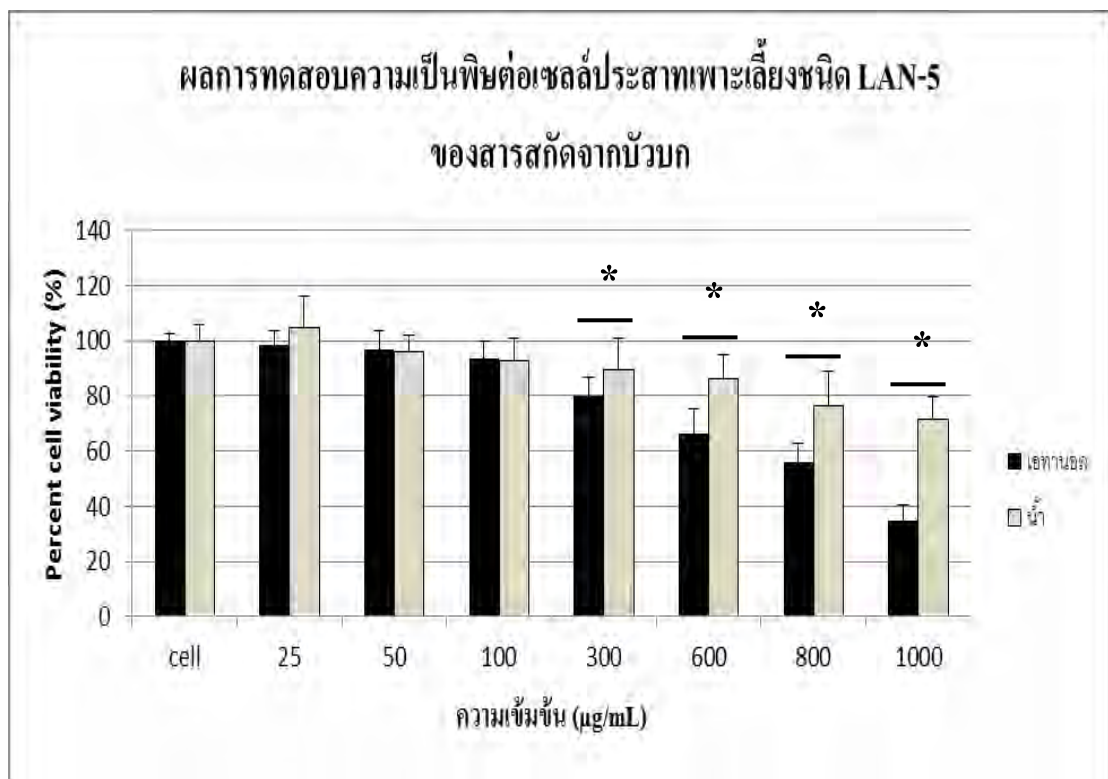


ภาพที่ 4.1 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบสะระแหน่ ที่สกัดจากเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละ

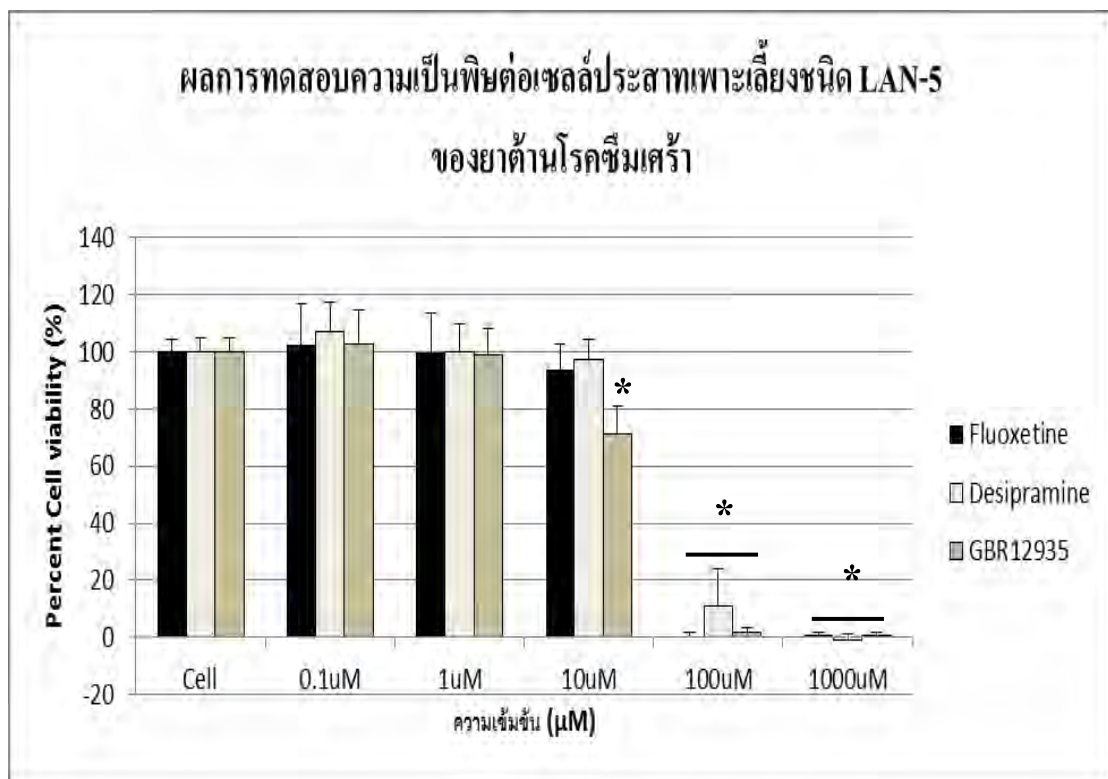
ตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าตัวทำลายทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ขึ้นไป (*) สามารถลด %cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.2 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากใบขี้เหล็ก ที่สกัดจากเอทานอล และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าตัวทำลายทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ขึ้นไป (*) สามารถลด %cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากบัวบก ที่สกัดจากเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 300, 600, 800 และ 1000 µg/mL ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าตัวทำลายทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 300 µg/ml ขึ้นไป (*) สามารถลด %cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

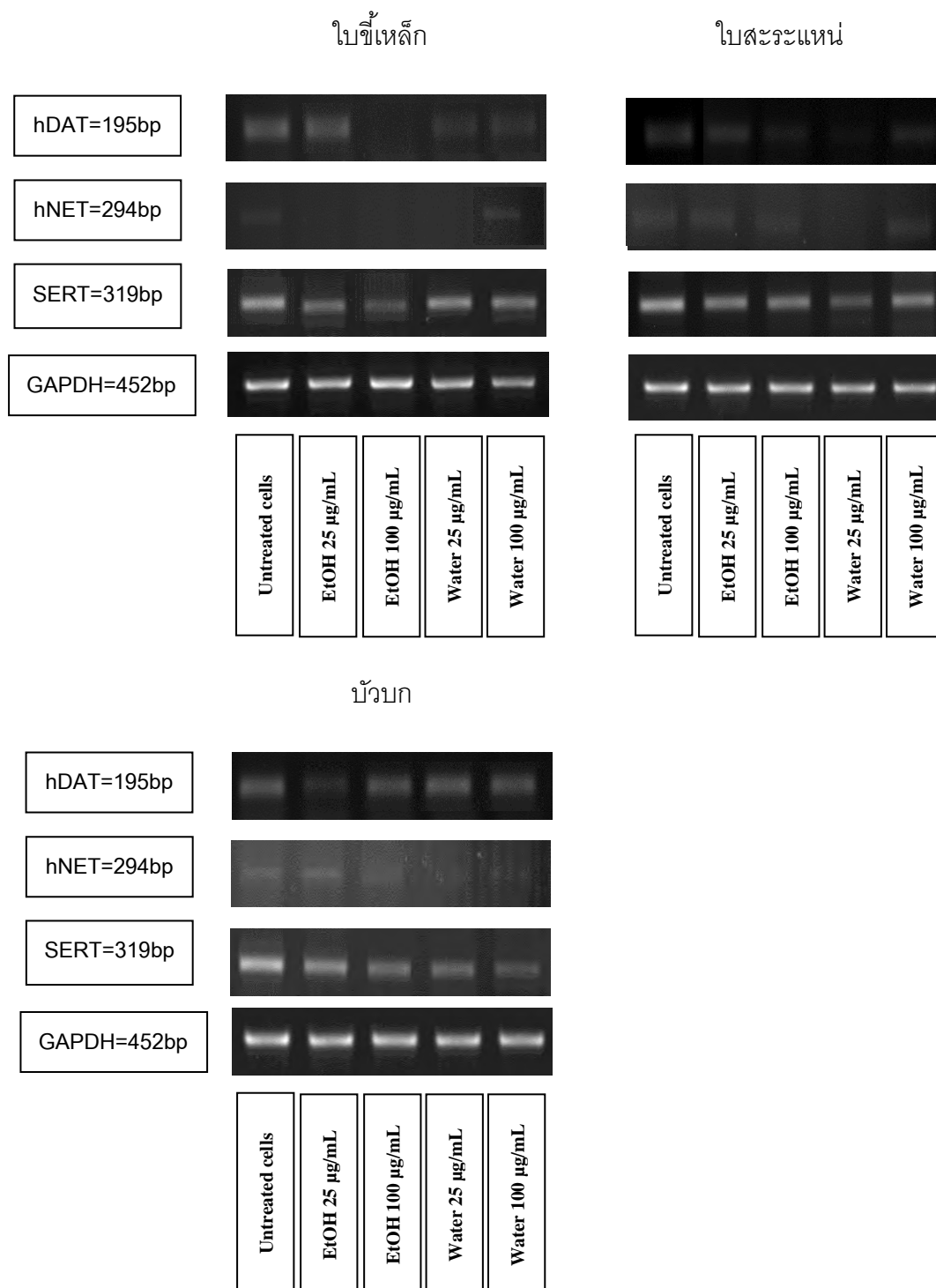


ภาพที่ 4.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 µM ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมี “cell” เป็นกลุ่มควบคุม โดยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่า fluoxetine, desipramine ที่ความเข้มข้น 100 และ 1000 µM และ GBR12935 ที่ความเข้มข้น 10, 100 และ 1000 µM (*) สามารถลด % cell viability ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

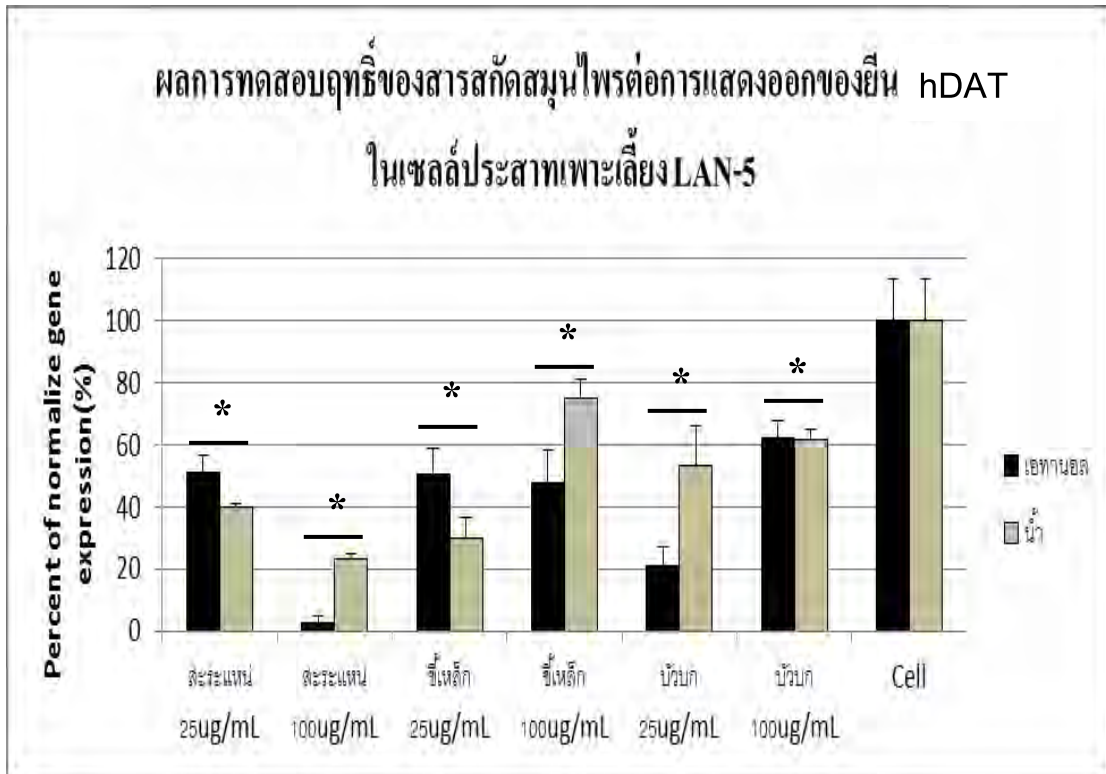
4.5 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออก ในระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR)

จากการวัดการแสดงออกในระดับ mRNA ของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ug/mL โดยนำไปเปรียบเทียบกับอัตราส่วนกับ housekeeping gene ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ใช้ยีน GAPDH จากนั้นนำค่าอัตราส่วนของกลุ่มทดสอบไปเปรียบเทียบกับค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนกับกลุ่มควบคุม โดยให้ค่าอัตราส่วนของกลุ่มควบคุมเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ เมื่อได้ค่าร้อยละแล้วจึงนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้หลักสถิติ Independent Student's *t*-test โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

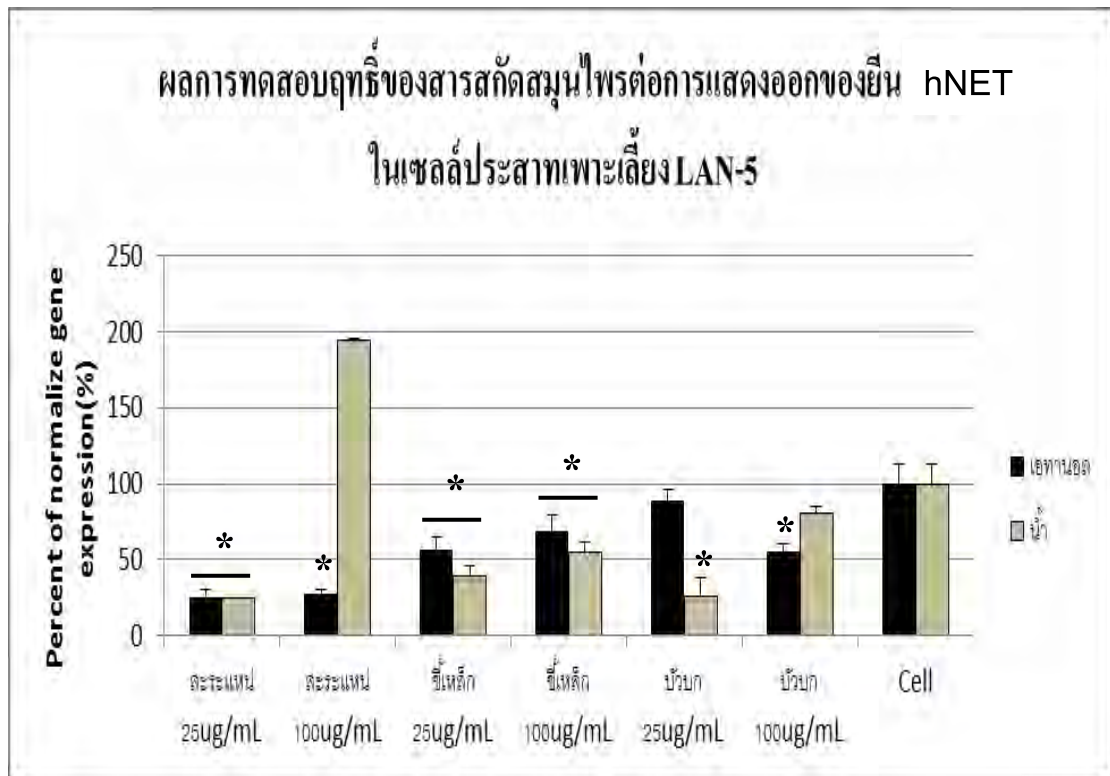
ผลการทดสอบพบว่าสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กดการแสดงออกของยีน hDAT โดยมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ สารสกัดจากใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และ บัวบกด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.6) ส่วนสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กดการแสดงออกของยีน hNET โดยมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ สารสกัดจากใบสะระแหน่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบขี้เหล็กด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากบัวบกด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.7) สำหรับยีน hSERT นั้น สารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์กดการแสดงออกของยีนนี้ โดยมีค่าร้อยละของการแสดงออกของยีนน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ สารสกัดจากใบสะระแหน่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สารสกัดจากใบขี้เหล็กด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดจากบัวบกด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.8)



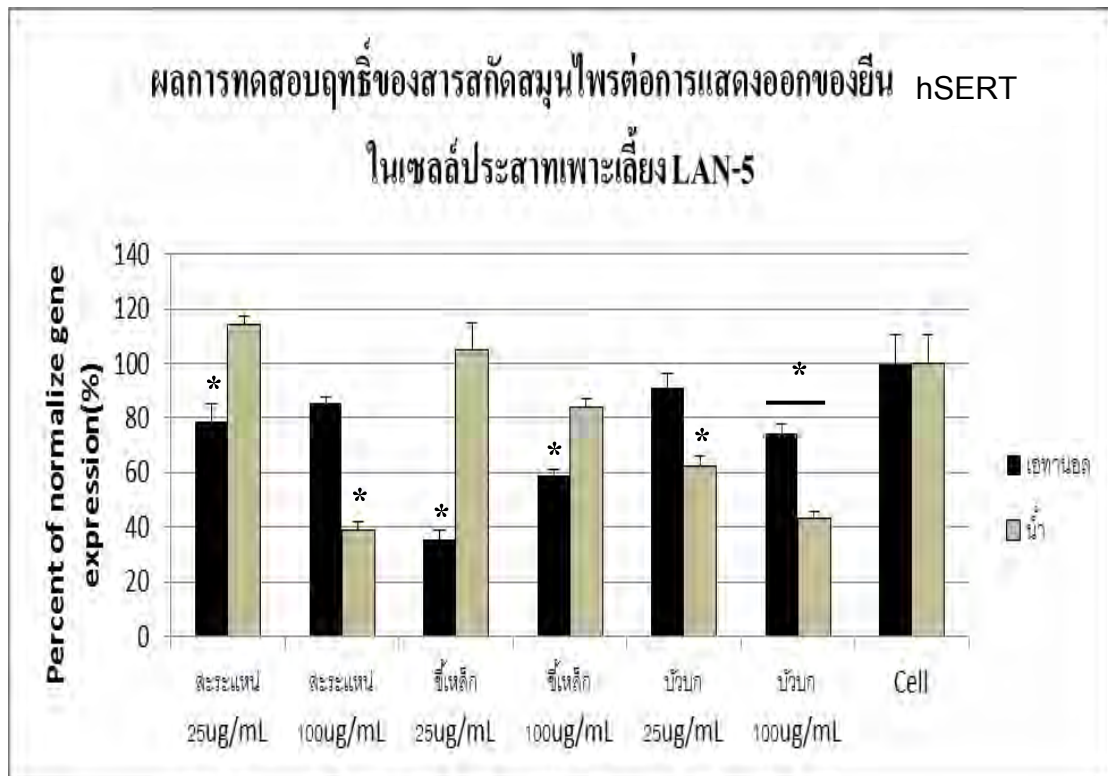
ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนในเซลล์ LAN-5 ด้วยวิธี Gel electrophoresis เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดใบชี้เหล็ก, ใบสะระแห่น และ บัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.6 ผลการแสดงออกของยีน hDAT ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบตะระแห่น, ใบชี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง “Cell” คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยสารสกัด (กลุ่มควบคุม) (ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่าสารสกัดทั้ง 3 ชนิดที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ทั้ง 2 ความเข้มข้น (*) สามารถลดการแสดงออกของยีน hDAT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.7 ผลการแสดงออกของยีน hNET ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง “Cell” คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยสารสกัด (กลุ่มควบคุม) (ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่าสารสกัดใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และที่สกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สารสกัดขี้เหล็กที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำทั้ง 2 ความเข้มข้น และสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และน้ำ ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*) สามารถลดการแสดงออกของยีน hNET ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.8 ผลการแสดงออกของยีน hSERT ในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดโใบสะระแห่น, โใบขี้เหล็ก และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง “Cell” คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยสารสกัด (กลุ่มควบคุม) (ทำการทดสอบจำนวน 3 ครั้งการทดลอง) พบว่าสารสกัดโใบสะระแห่นที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และที่สกัดด้วยน้ำ ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สารสกัดโใบขี้เหล็กที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ทั้ง 2 ความเข้มข้น และสารสกัดบัวบกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และน้ำ ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (*) สามารถลดการแสดงออกของยีน hSERT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.6 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้า ที่มีผลต่ออัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporters uptake assay kit

จากการวัดอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และซีโรโทนิน ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบดังตารางที่ 3.6 แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดสอบดังตารางที่ 3.6 เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporters uptake assay kit นำค่าอัตราการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่ได้ (RFU) ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์กับระยะเวลา (min) จากนั้นนำมาคำนวณหาพื้นที่ใต้กราฟ (Area below curve) โดยใช้โปรแกรม Sigma Plot เวอร์ชัน 11.0 เมื่อได้ค่าพื้นที่ใต้กราฟแล้วจึงนำไปวิเคราะห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมลบ (negative control) ของแต่ละกลุ่มทดสอบโดยใช้หลักสถิติ Independent Student's *t*-test โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

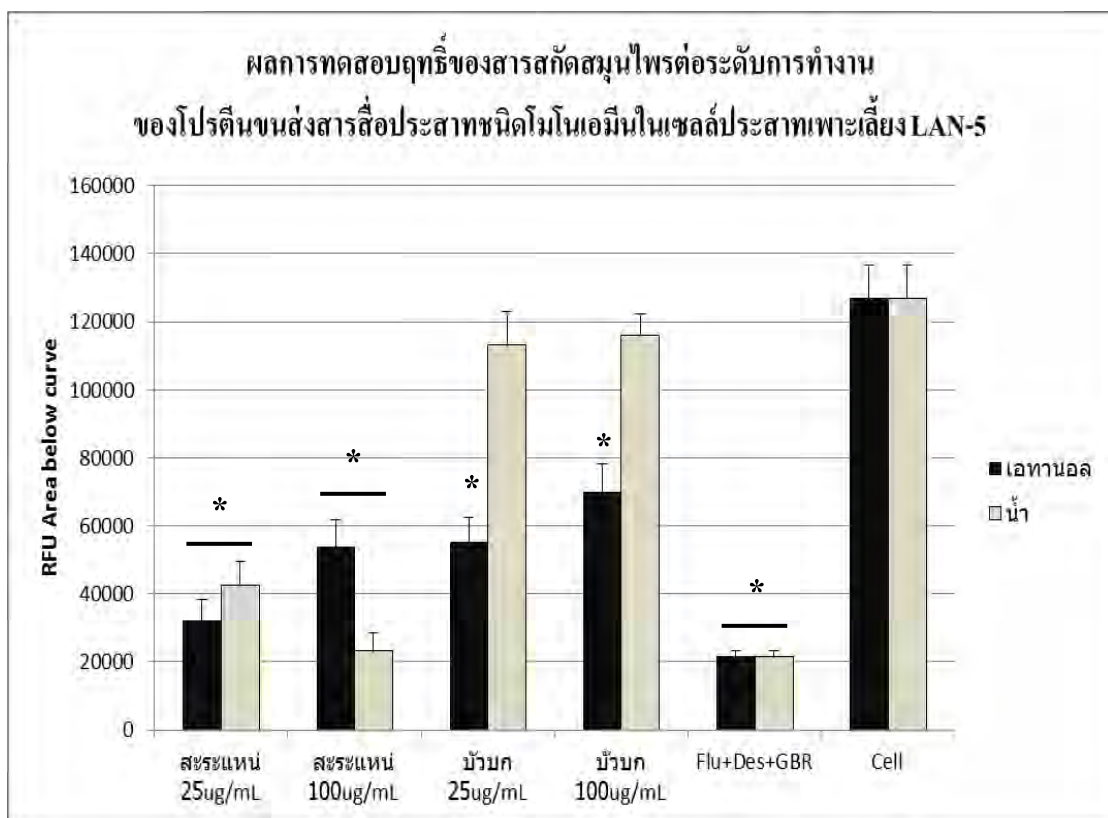
ผลการทดสอบพบว่า สารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้าโดยผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ซึ่งจากการทดสอบได้แบ่งกลุ่มทดสอบเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้าในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนพบว่า สารสกัดใบสะระแหน่ด้วยเอทานอล และ น้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดบัวบกด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.9)

กลุ่มที่สองทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้าในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนพบว่า สารสกัดใบสะระแหน่ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีน โดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่ากลุ่มควบคุมลบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.10)

กลุ่มที่สามทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้าในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินพบว่าสารสกัดสมุนไพรรักษาโรคซึมเศร้าที่ใช้ในการทดสอบทั้ง 3 ชนิดไม่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน (ภาพที่ 4.11)

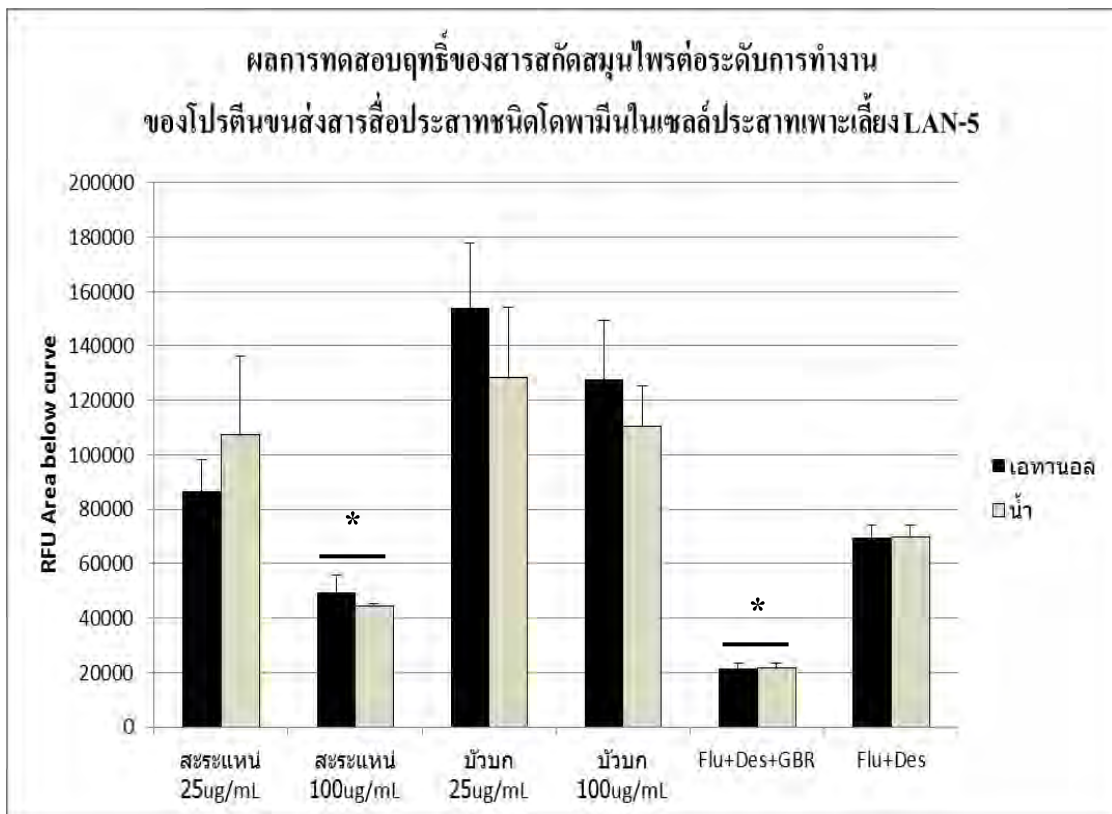
กลุ่มที่สี่ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินพบว่า สารสกัดใบสะระแหน่ด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และน้ำที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินโดยมีค่าพื้นที่ใต้กราฟน้อยกว่ากลุ่มควบคุมลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.12)

สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบขี้เหล็กด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถนำผลการทดสอบมาวิเคราะห์ได้เนื่องจากค่าพื้นที่ใต้กราฟที่คำนวณได้จากการทดสอบมีค่าติดลบทุกการทดสอบ (ภาพที่ 4.13)

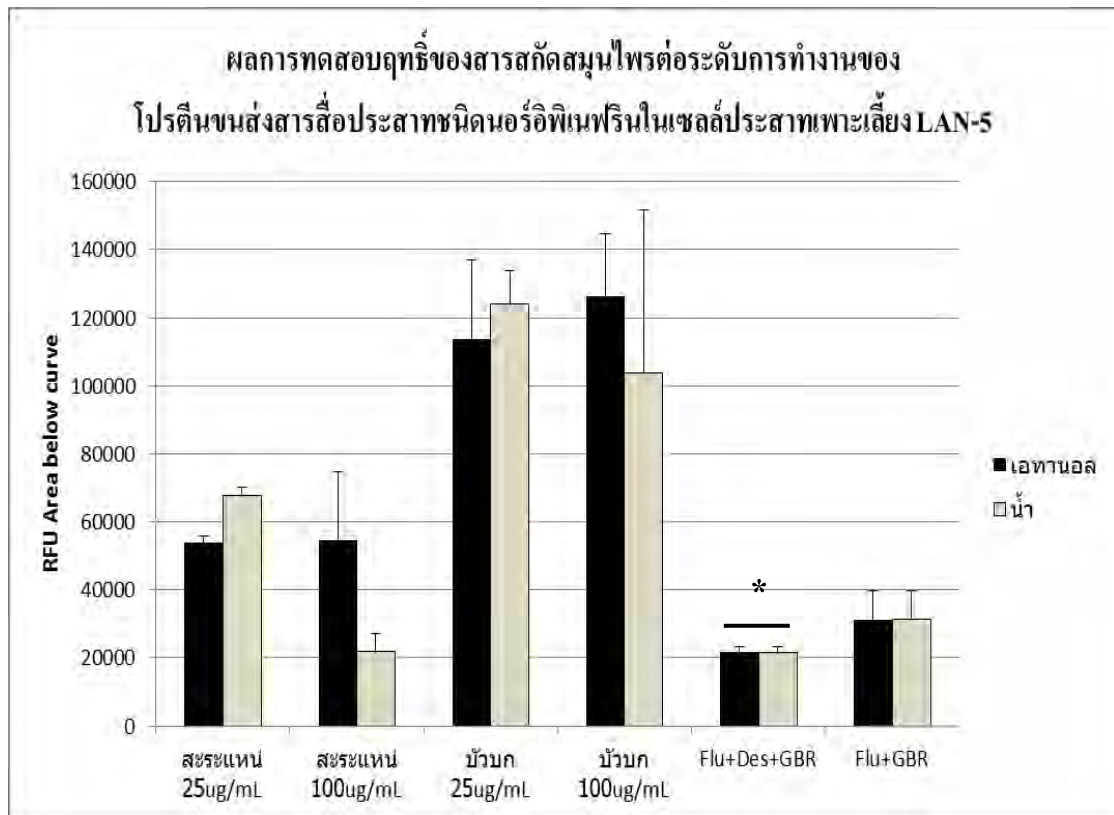


ภาพที่ 4.9 อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 30 นาที “Cell” คือ เซลล์ที่ไม่ได้ถูกทดสอบด้วยสารสกัด (กลุ่มควบคุมลง), “Flu+Des+GBR” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด

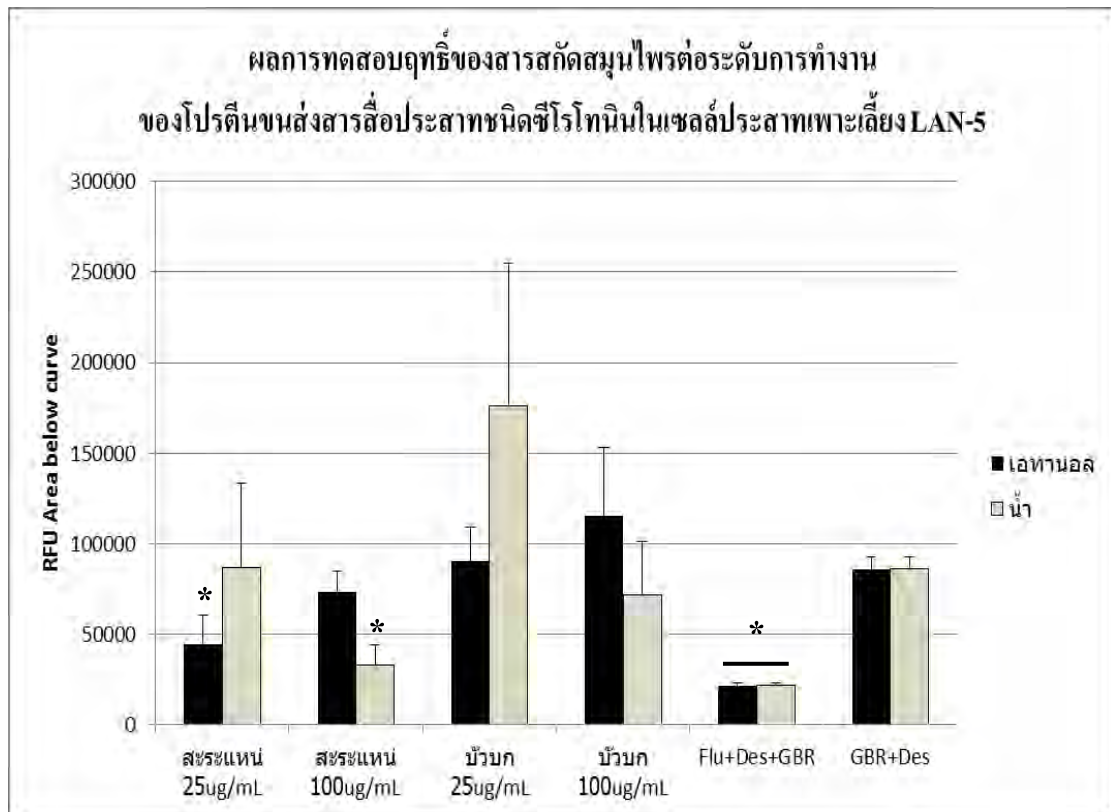
(กลุ่มควบคุมบวก) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารสกัดใบสะระแหน่ และ สารสกัดบัวบกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (*) สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



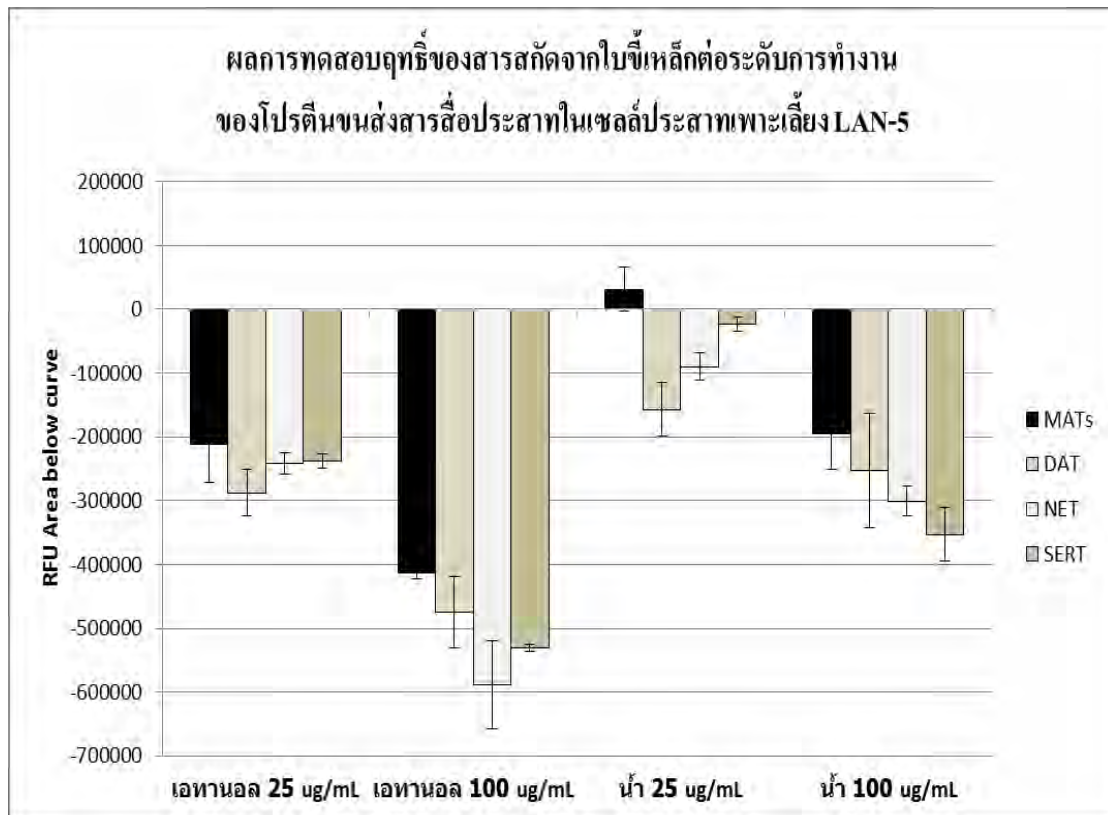
ภาพที่ 4.10 อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 30 นาที “Flu+Des” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้า fluoxetine และ desipramine (กลุ่มควบคุมลบ), “Flu+Des+GBR” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (กลุ่มควบคุมบวก) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารสกัดใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และ สารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (*) สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.11 อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแห่น และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 30 นาที “Flu+GBR” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้า fluoxetine และ GBR12935 (กลุ่มควบคุมลบ), “Flu+Des+GBR” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (กลุ่มควบคุมบวก) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารสกัดใบสะระแห่น และบัวบกที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ น้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟริน ซึ่งแตกต่างจากสารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (*) ที่สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

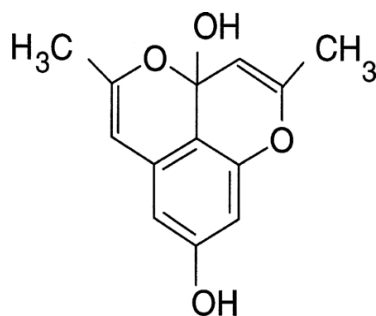


ภาพที่ 4.12 อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบสะระแหน่ และบัวบก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ ที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 30 นาที “GBR+Des” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้า GBR12935 และ desipramine (กลุ่มควบคุมลบ), “Flu+Des+GBR” คือ เซลล์ที่ถูกทดสอบด้วยยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (กลุ่มควบคุมบวก) ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารสกัดใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ และน้ำที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าทั้ง 3 ชนิด (*) สามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนินได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

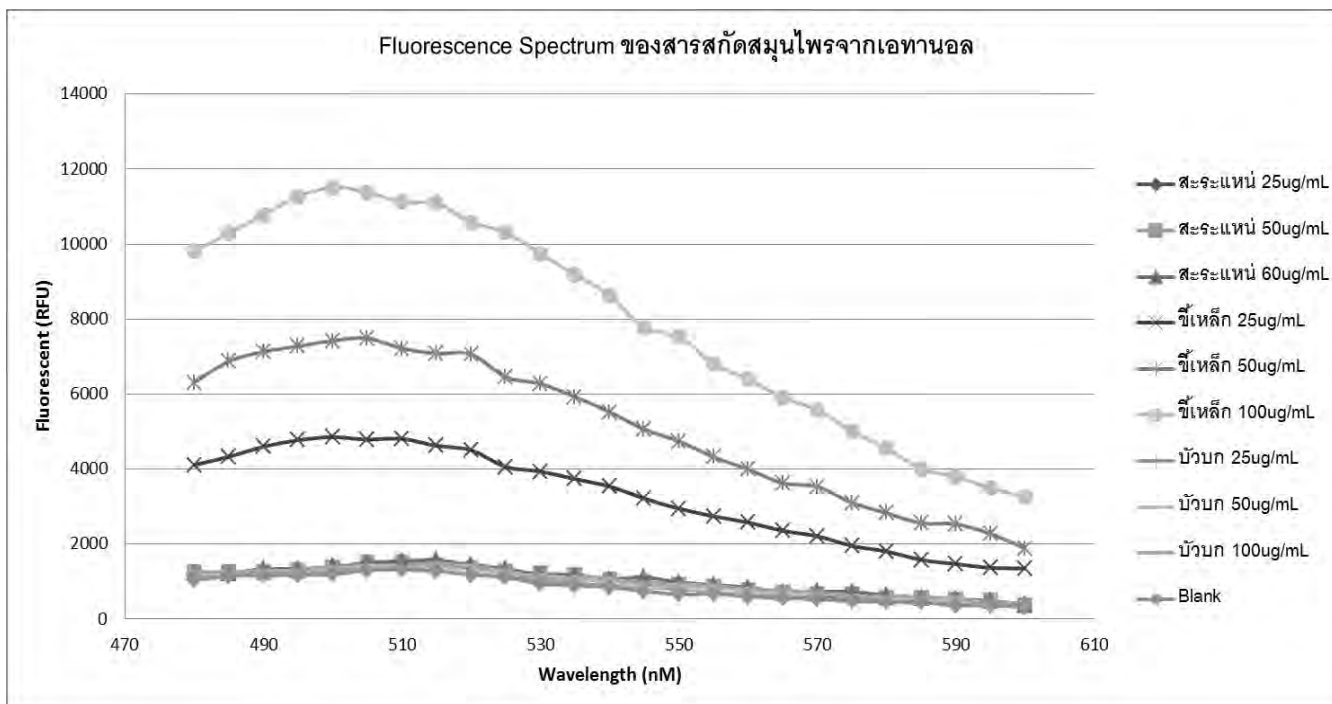


ภาพที่ 4.13 อัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนทั้ง 3 ชนิดในเซลล์ LAN-5 เมื่อทดสอบเซลล์กับสารสกัดใบขี้เหล็ก ด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 $\mu\text{g/mL}$ เป็นเวลา 30 นาที ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้ง การทดลอง จากกราฟไม่สามารถวิเคราะห์ผลการทดสอบได้เนื่องจากค่าพื้นที่ใต้กราฟที่คำนวณได้มีค่าติดลบทำให้การทดสอบนี้ไม่สามารถสรุปผลการทดสอบได้

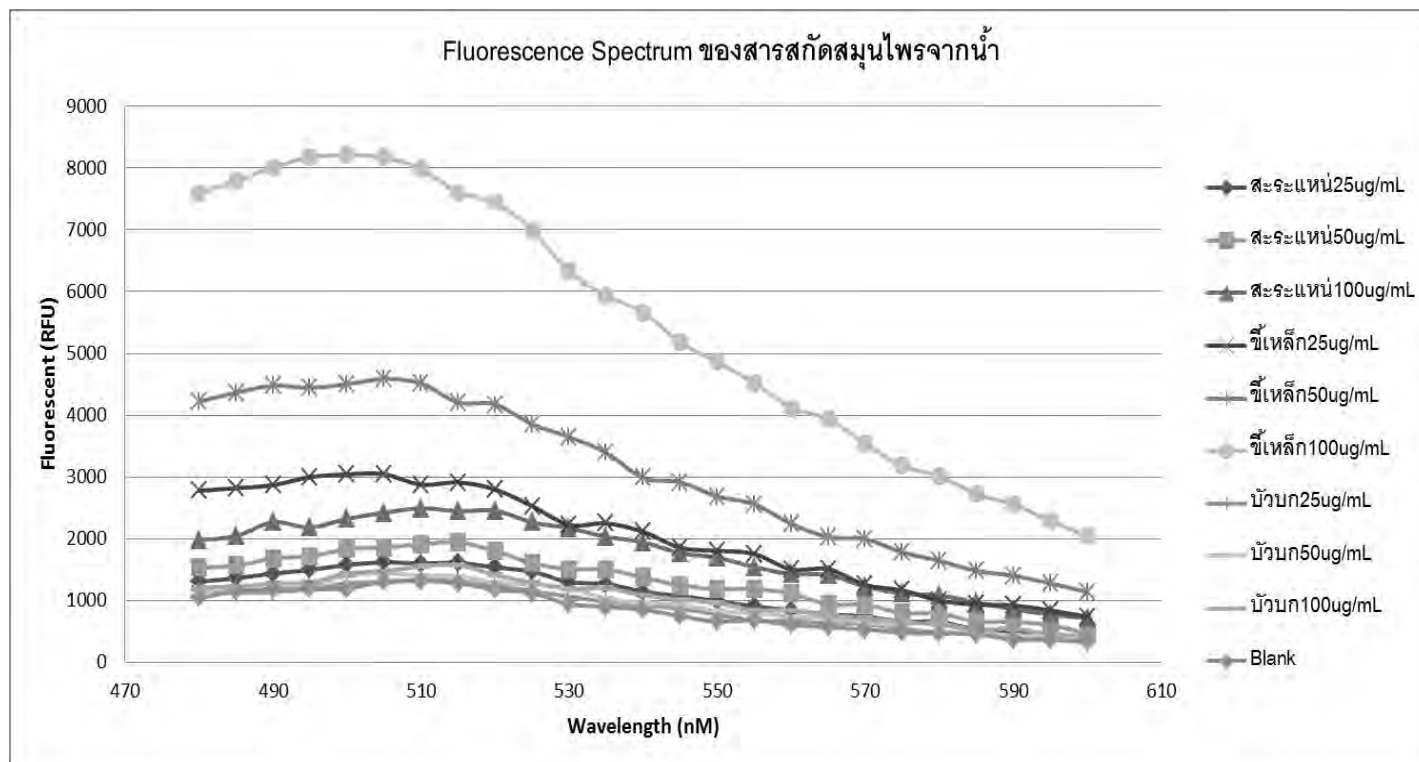
สำหรับผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบชี่เหล็กจากเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการยับยั้งการทำงานของ MATs ด้วยวิธี Uptake assay โดยชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay ไม่สามารถนำค่าที่ได้จากการทดสอบมาวิเคราะห์ผลได้ เนื่องจากการคำนวณค่าพื้นที่ใต้กราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ และระยะเวลาที่ได้มีค่าติดลบ ซึ่งสาเหตุอาจเนื่องมาจากสารประกอบภายในสารสกัดใบชี่เหล็กบางชนิดสามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ หรือที่เรียกว่า Autofluorescence ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทดสอบวัดการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescent spectrum) ของสารสกัดใบชี่เหล็ก ที่ความยาวคลื่น excitation 440 นาโนเมตร และ emission 480-600 นาโนเมตร ได้ผลการทดสอบดังนี้ คือ สารสกัดใบชี่เหล็กจากเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้น 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ ที่ความยาวคลื่น excitation 440 นาโนเมตร และ emission 520 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นเดียวกับการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของชุดน้ำยาที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4.15-4.17) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าสารสกัดใบชี่เหล็กทั้งจากเอทานอล และ น้ำ อาจมีสารประกอบที่สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้ ซึ่งอาจจะเป็นสารประกอบ Baracol ที่มีอยู่ในใบชี่เหล็ก เนื่องจากลักษณะโครงสร้างของ Baracol มีลักษณะเป็นวงแหวนอะโรมาติกหลายวง (Poly-aromatic hydrocarbons) (ภาพที่ 4.14) ซึ่งโครงสร้างโมเลกุลลักษณะนี้สามารถเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ได้เป็นอย่างดี ดังนั้นจึงทำให้ไม่สามารถทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบชี่เหล็กต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนโดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay ได้ และหากมีการศึกษาลักษณะแบบนี้ก็ในอนาคตอาจจะต้องใช้วิธีอื่นในการทดสอบ เช่น การใช้สารกัมมันตรังสีมาทดสอบแทน (^3H Monoamine) แต่อาจเป็นอันตรายต่อผู้ใช้ได้เนื่องจากสารกัมมันตรังสีมีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และสิ่งมีชีวิต



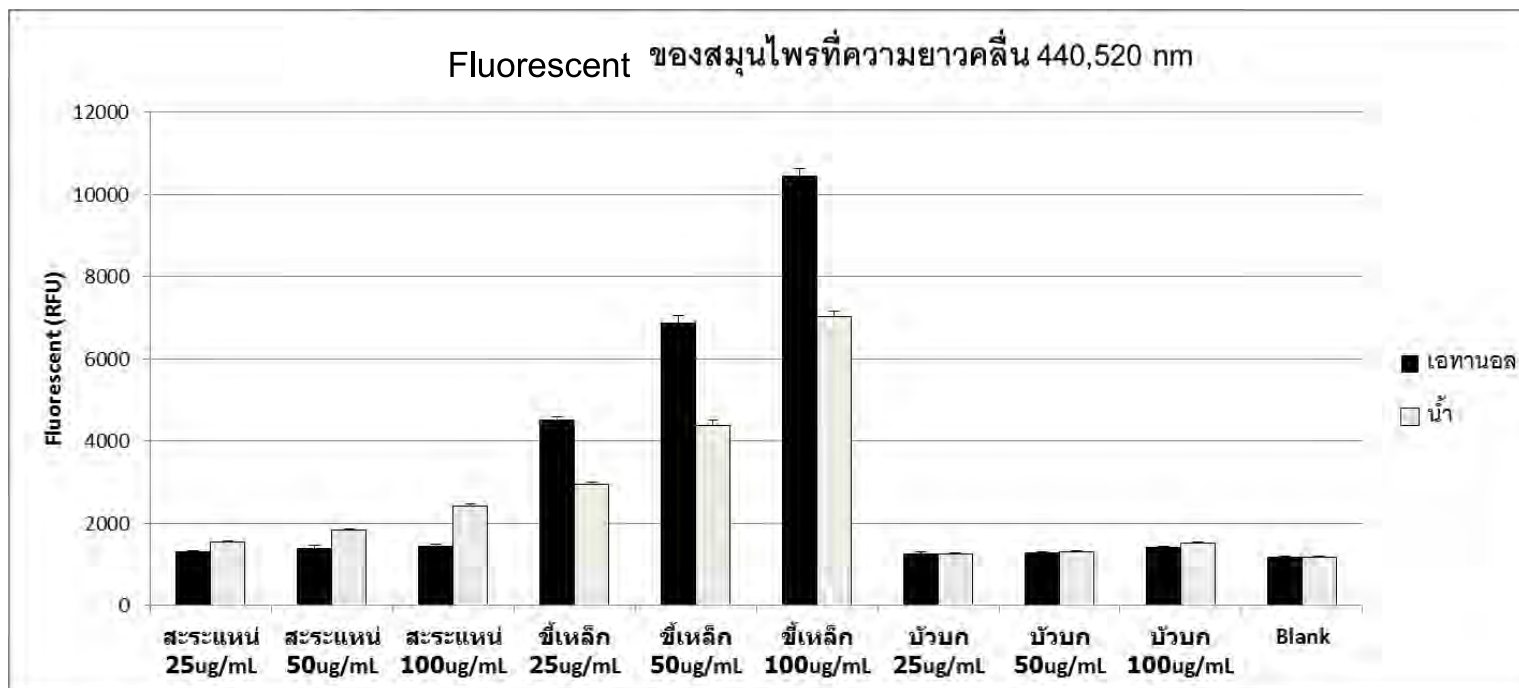
ภาพที่ 4.14 ลักษณะโครงสร้างโมเลกุลของสารประกอบ Baracol



ภาพที่ 4.15 Fluorescent spectrum ของสารสกัดไเบอร์เบอร์รี, ไบซีเห็ด และบัวบก ที่สกัดจากเอทานอลที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 480-600 nm โดย “Blank” = 1XHBSS+0.1%BSA Buffer



ภาพที่ 4.16 Fluorescent spectrum ของสารสกัดใบสาระแทน, ใบขี้เหล็ก และบัวบก ที่สกัดจากน้ำ ที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 480-600 nm โดย “Blank” = 1XHBSS+0.1%BSA Buffer

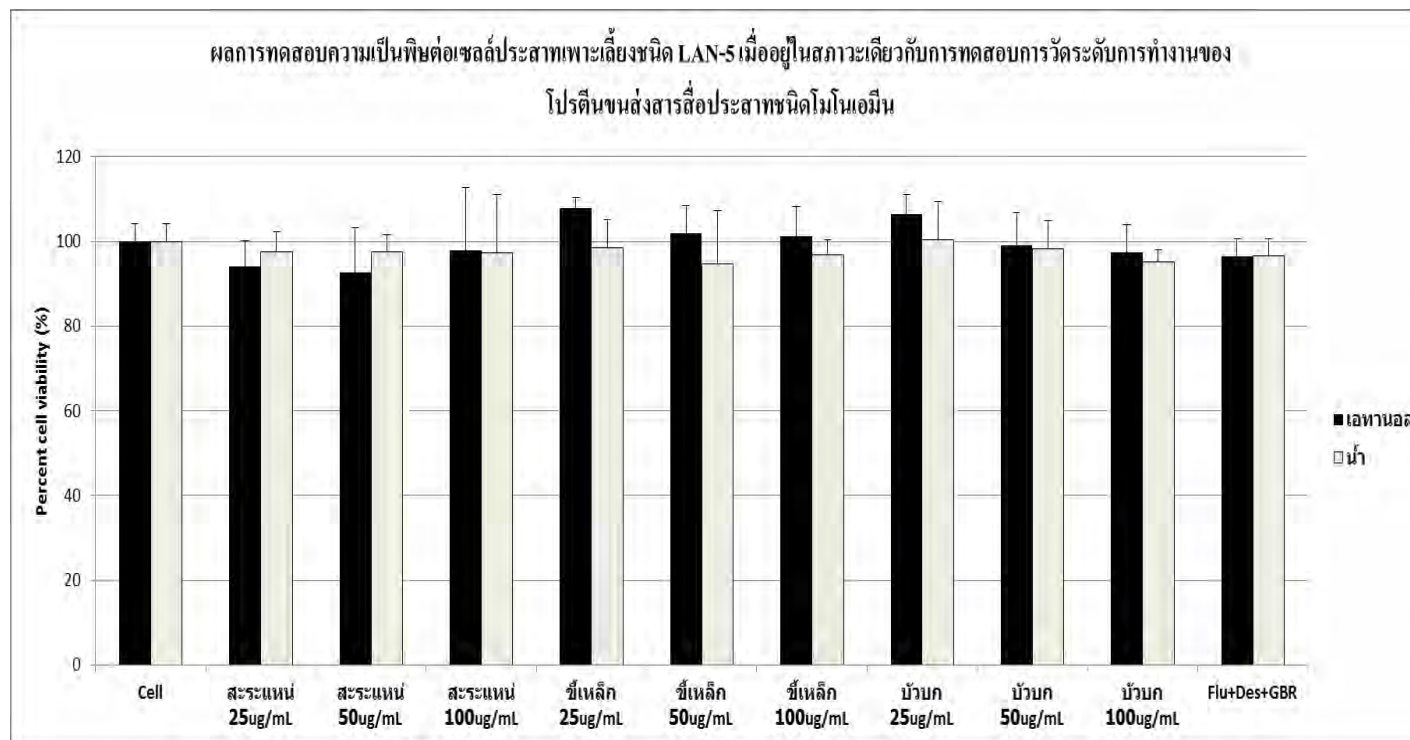


ภาพที่ 4.17 Fluorescent spectrum ของสารสกัดใบสะระแหน่, ใบซีเหล็ก และบัวบก ที่สกัดจากเอทานอล และน้ำ ที่ความยาวคลื่น excitation 450 nm และ emission 520 nm โดย “Blank” = 1XHBSS+0.1%BSA Buffer

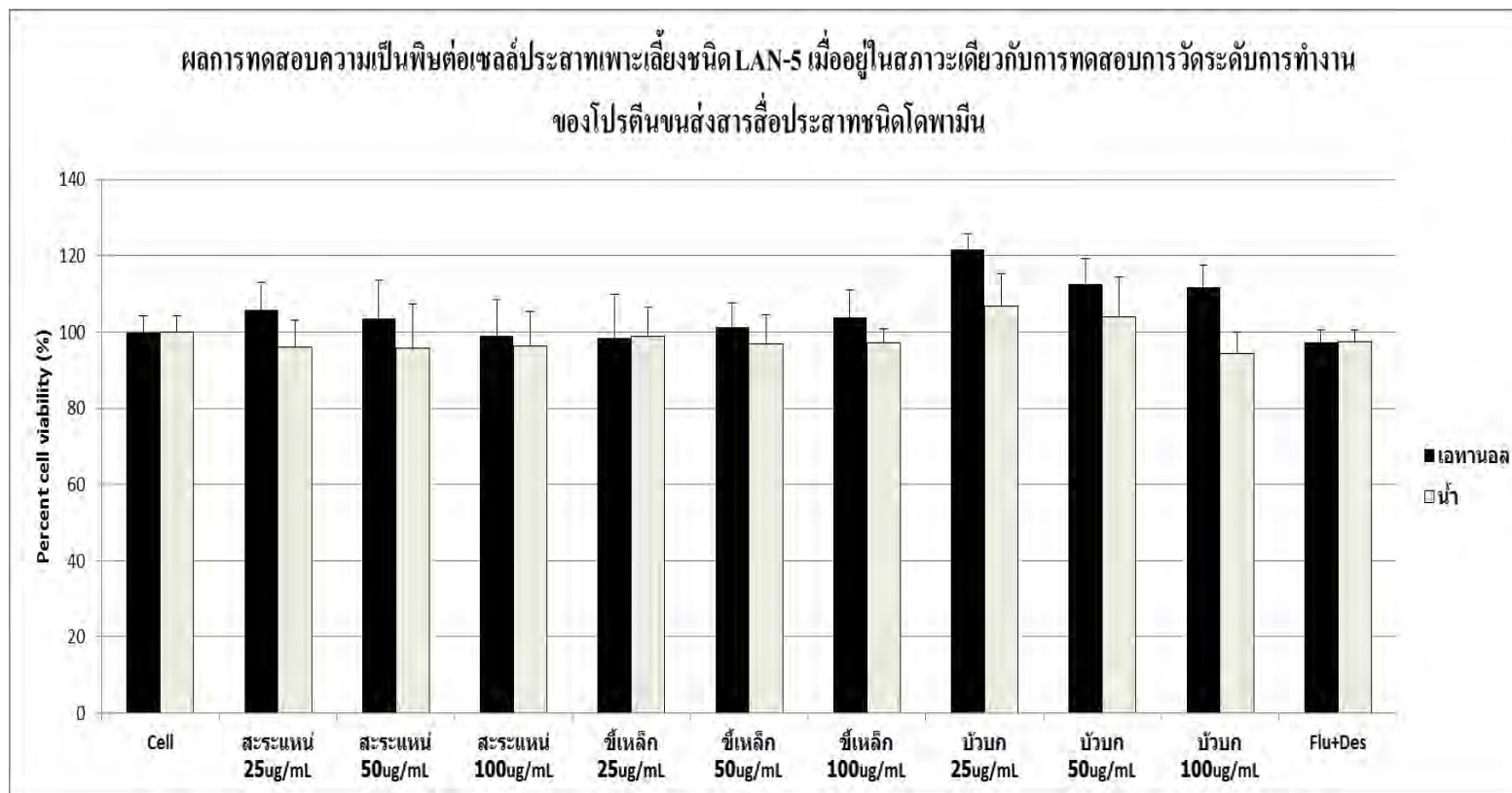
4.7 ผลการทดสอบวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ของสารทดสอบที่ใช้ในการทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโดพามีน, นอร์อิพิเนฟริน และ ซีโรโทนินในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 ด้วยวิธี MTT Assay

จากการทดสอบวัดความเป็นพิษของสารทดสอบ ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 เมื่อทดสอบด้วยสารทดสอบดังตารางที่ 3.5 แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดสอบดังตารางที่ 3.6 เป็นเวลา 30 นาที โดยให้เซลล์กลุ่มที่ไม่ได้ทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพร และสารละลายยาเป็นกลุ่มควบคุมลบ (Negative control) มีค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิต (Cell viability) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ นำกลุ่มทดสอบมาคำนวณเทียบกับกลุ่มควบคุมเพื่อหาร้อยละของอัตราการรอดชีวิต (%Cell viability) และนำมาวิเคราะห์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดสอบ โดยใช้หลักสถิติ Independent Student's *t*-test โดยให้ค่าความเชื่อมั่นอยู่ที่ระดับ 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$)

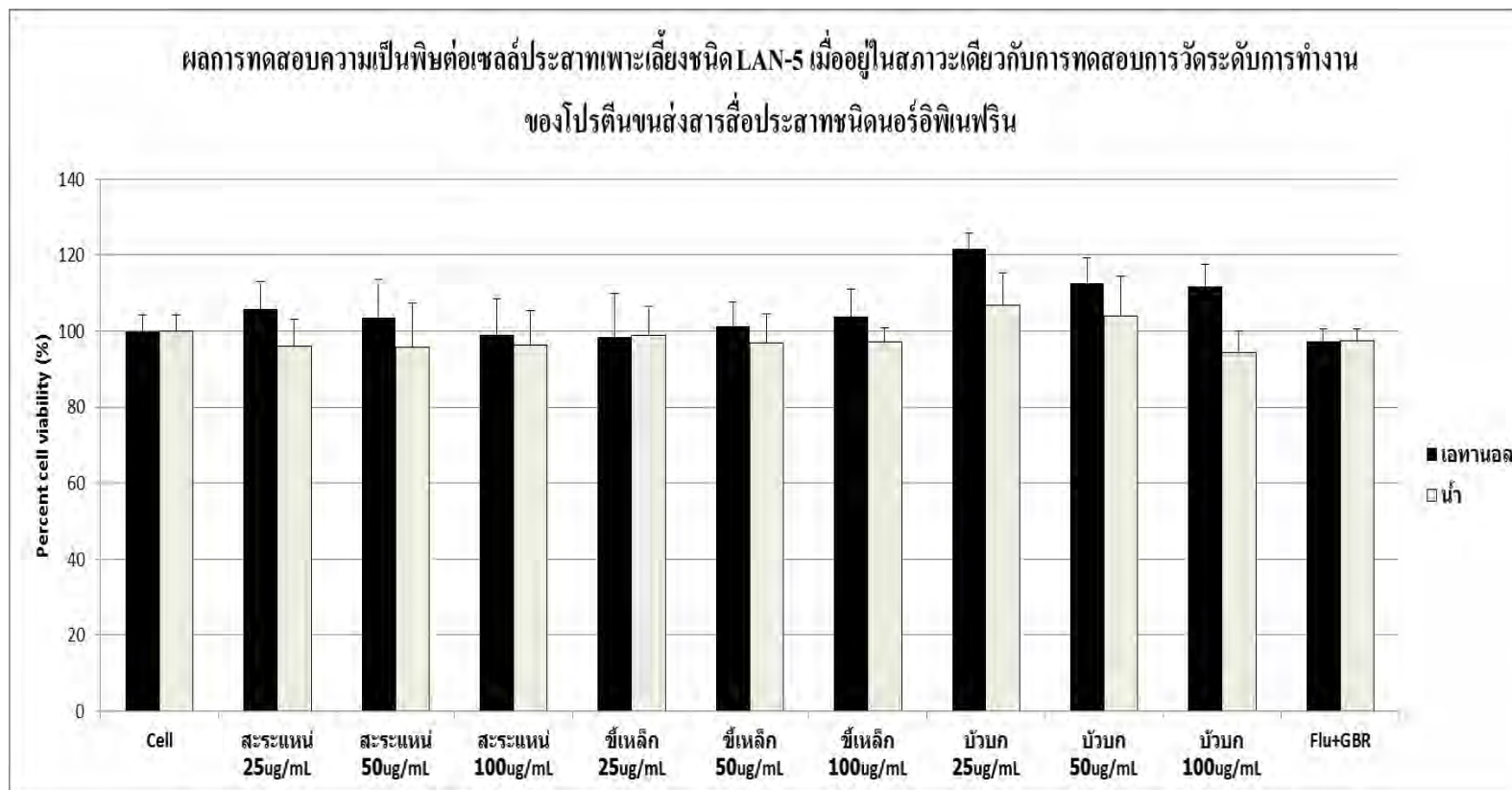
ผลการทดสอบพบว่าสารทั้งหมดที่นำมาใช้ทดสอบวัดอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนนั้นไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยค่าเปอร์เซ็นต์ของอัตราการรอดชีวิตของทุกกลุ่มการทดสอบ และกลุ่มควบคุมลบไม่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) (ภาพที่ 4.18-4.21)



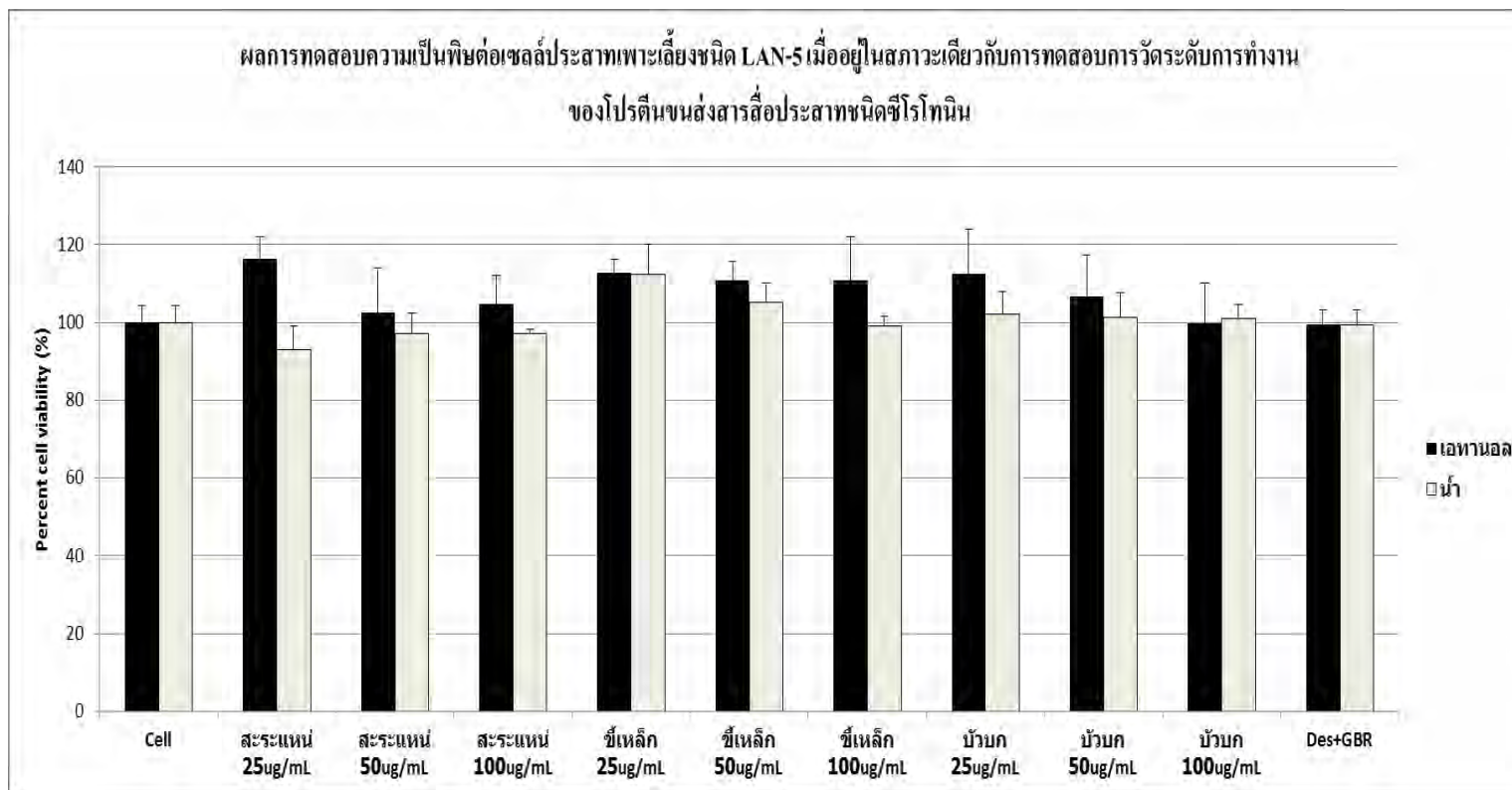
ภาพที่ 4.18 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที โดยมี “Cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารทดสอบทั้งหมดไม่สามารถลด % cell viability ได้ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.19 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโดพามีนต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที โดยมี “Cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารทดสอบทั้งหมดไม่สามารถลด % cell viability ได้ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.20 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดนอร์อิพิเนฟรินต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที โดยมี “Cell” เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารทดสอบทั้งหมดไม่สามารถลด % cell viability ได้ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 4.21 ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบอัตราการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 เป็นเวลา 30 นาที โดยมี Cell เป็นกลุ่มควบคุมลบ ด้วยวิธี MTT assay ทำการทดสอบแต่ละตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง จำนวน 3 ครั้งการทดลอง พบว่าสารทดสอบทั้งหมดไม่สามารถลด % cell viability ได้ ($P < 0.05$)

4.8 ผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) และลูกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ต่อระดับของ monoamine neurotransmitters ในสมองหนูส่วน hippocampus

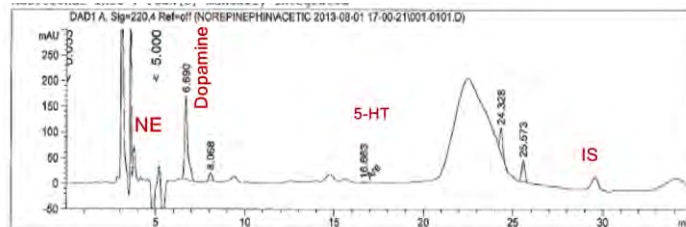
คณะผู้วิจัย ได้วิเคราะห์ ผลของสารสกัดจากเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) และลูกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*) ต่อระดับของ monoamine neurotransmitters ในสมองหนูส่วน hippocampus ภาพที่ 4.22 แสดงลักษณะและองค์ประกอบสำคัญของสมุนไพรทั้งสองชนิด



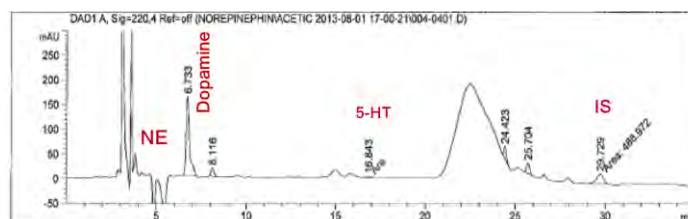
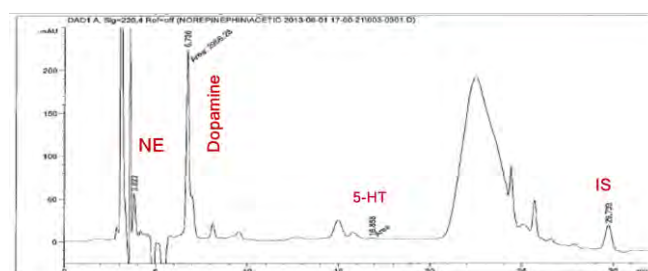
ภาพที่ 4.22 แสดงลักษณะและองค์ประกอบสำคัญของเหง้ากระชายดำ (*Kaempferia parviflora*) และลูกจันทน์เทศ (*Myristica fragrans*)

สำหรับการทดลองนี้ หนูประกอบด้วย 4 กลุ่ม (8 ตัวต่อกลุ่ม) ได้แก่ กลุ่มควบคุม (control group) กลุ่มที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า (fluoxetine) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้ากระชายดำ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกจันทน์เทศ โดยหนูได้รับสารสกัดหรือยา เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อฆ่าหนูแล้ว ได้แยกสมองส่วน hippocampus มาวิเคราะห์หา norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) และ dopamine ทั้งนี้ ได้มีการใช้ internal standard (IS) เป็นตัวควบคุมในการวิเคราะห์ด้วย คณะผู้วิจัยได้พัฒนาเทคนิคการตรวจ monoamine neurotransmitters ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography โดยแสดงโครมาโตแกรมในภาพที่ 4.23 ทั้งนี้ ผลการเปรียบเทียบ ดังแสดงในตารางที่ 4.3 ทั้งนี้ ยังไม่สามารถหาค่าที่แน่นอนน่าเชื่อถือได้ในกรณีของ norepinephrine ดังนั้น จึงอยู่ระหว่างการทำการทดลองซ้ำ ส่วนระดับซีโรโทนินนั้น พบว่า กลุ่มที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า (fluoxetine) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้ากระชายดำ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกจันทน์เทศ มีการเพิ่มสูงขึ้นกว่าในกลุ่มควบคุม ส่วนระดับโดพามีนนั้น พบว่า เฉพาะกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกจันทน์เทศเท่านั้น ที่มีระดับสูงกว่าในกลุ่มควบคุม

Control group



Fluoxetine group

*Kaempferia parviflora* group*Myristica fragrans* group

ภาพที่ 4.23 แสดงโครมาโตแกรมในการวิเคราะห์ปริมาณ norepinephrine (NE), serotonin (5-HT) และ dopamine ด้วยเทคนิค HPLC ในสมองหนูส่วน hippocampus 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (control group) กลุ่มที่ได้รับยาต้านซึมเศร้า (fluoxetine) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้ากระชายดำ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกจันทน์เทศ โดยการใช้ internal standard (IS) เป็นตัวควบคุมในการวิเคราะห์

ตารางที่ 4.3 แสดงผลการเปรียบเทียบระดับสาร monoamine neurotransmitters จากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC ในสมองหนูส่วน hippocampus 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (control group) กลุ่มที่ได้รับยาต้านซีมีเคร่า (fluoxetine) กลุ่มที่ได้รับสารสกัดเหง้ากระชายดำ และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดลูกจันทน์เทศ

Group	Norepinephrine (µg/g)	Serotonin (5-hydroxytryptamine) (µg/g)	Dopamine (µg/g)
Control	NA	0.3657	1.0283
Fluoxetine	NA	0.8534	1.0383
<i>Myristica fragrans</i>	NA	0.6261	1.8631
<i>Kaempferia parviflora</i>	NA	0.6346	1.0543

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และ ข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

แหล่งที่มาของสมุนไพรไทย

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คณะผู้วิจัย ได้ใช้สมุนไพรที่นำมาจากสวนสมุนไพรในกรุงเทพมหานคร และ จังหวัดชลบุรี ภายในเดือน ธันวาคม 2553 ดังนั้น ผลการศึกษาที่ได้ อาจไม่สามารถเป็นตัวแทนของสมุนไพรทั่วประเทศได้ เนื่องจากมีปัจจัยที่ส่งผลถึงสารสำคัญ หรือองค์ประกอบภายในสมุนไพร เช่น ปัจจัยของสภาพแวดล้อม (สภาพดิน น้ำ และอากาศ) นอกจากนี้ผู้วิจัยยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับอายุของสมุนไพร ซึ่งอาจมีผลต่อสารสำคัญ หรือองค์ประกอบภายในสมุนไพร

วิธีการสกัดสารจากสมุนไพร

ผู้วิจัยใช้วิธีมาเซอเรชัน (Maceration) ในการสกัดสารสำคัญจากสมุนไพร โดยใช้ตัวทำละลายเอทานอล และวิธีต้ม (Boil) โดยใช้ตัวทำละลายน้ำ ผู้วิจัยเลือกใช้ตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดนี้ เนื่องจาก ตัวทำละลายทั้ง 2 ชนิดหาได้ทั่วไปในประเทศ มีความปลอดภัยต่อสภาพแวดล้อม สามารถนำไปปรับประทานได้ซึ่งถือเป็นข้อสำคัญ เนื่องจากงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อนำไปพัฒนาใช้ในการรักษามนุษย์ ภายหลังจากการสกัดสารสำคัญออกจากสมุนไพร ตัวทำละลายจะถูกทำให้ระเหยออกด้วยวิธี evaporation สำหรับเอทานอล และ lyophilization สำหรับน้ำเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบ จากนั้นผู้วิจัยเลือก DMSO เป็นตัวทำละลายสารสกัดหยาบ เนื่องจาก DMSO สามารถละลายสารต่างๆ ได้ทั้งส่วนที่มีขั้ว (polar) และ ไม่มีขั้ว (nonpolar) ถึงแม้ว่าจะมีการรายงานถึงความเป็นพิษของ DMSO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตาม ณ ความเข้มข้นที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นที่ยอมรับกันว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ซึ่งการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ร่วมด้วย พบว่า DMSO ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 ทั้งความเข้มข้นที่ 0.1 และ 0.01 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเซลล์ประสาทมนุษย์เพาะเลี้ยง (LAN-5 cells)

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อเซลล์ประสาทมนุษย์เพาะเลี้ยง ผู้วิจัยเลือกเซลล์ LAN-5 ในการศึกษา เนื่องจากลักษณะสำคัญของเซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ประสาทซึ่งน่าจะมีการแสดงออกของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน, โดพามีน และนอร์อิพิเนเฟริน ดังนั้น

จึงนำเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดนี้มาใช้เป็น *in vitro* model สำหรับการศึกษาโรคซึมเศร้า ผู้วิจัยใช้เซลล์ LAN-5 เพื่อศึกษา 1. ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพร และยาต้านโรคซึมเศร้าต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง LAN-5 โดยวัดจากอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสารสกัดสมุนไพร 2. ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET ในระดับ mRNA ซึ่งเป็นโปรตีนที่ใช้ขนส่งสารสื่อประสาทชนิดซีโรโทนิน, โดพามีน และนอร์อิพิเนฟริน บริเวณ synaptics cleft กลับเข้าสู่ pre-synaptic cell โดยปริมาณสารสื่อประสาทบริเวณ synaptic cleft มีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคซึมเศร้า ผู้วิจัยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรไทย เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปกติเซลล์ LAN-5 จะมีเวลาในการแบ่งตัว (doubling time) ประมาณ 5 ชั่วโมง (50,000 เซลล์) (103) ผู้วิจัยจึงคาดว่าน่าจะครอบคลุมเวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวของเซลล์ ดังนั้นผลการทดสอบน่าจะแสดงถึงฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์ LAN-5 ในทุกระยะการแบ่งตัวของเซลล์ที่ประกอบด้วยระยะ G_1 , S, G_2 และ M 3 และ การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนเปรียบเทียบกับฤทธิ์ของยาต้านโรคซึมเศร้าโดยใช้ชุดน้ำยา Neurotransmitter transporter uptake assay เพื่อวัดอัตราการทำงานของโปรตีน โดยการทดสอบนี้ผู้วิจัยใช้เวลาในการทดสอบสารสกัดสมุนไพรเป็นเวลา 30 นาที เนื่องจากเป็นระยะเวลาที่ชุดทดสอบนี้แนะนำให้ใช้ในการทดสอบ

การทดสอบวัดความเป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN5 คณะผู้วิจัยได้ใช้วิธี MTT assay ซึ่งค่าที่ได้จากวิธี MTT assay มักใช้บ่งชี้สภาวะการเสียหายของเอนโดรพลาสติคเมทริกคูลัม และไมโทคอนเดรีย เพราะการเกิดปฏิกิริยาการรีดิวซ์สารประกอบ MTT ด้วยตัวรีดิวซ์คือ NADH และ NAD(P)H ต้องใช้เอนไซม์ภายในเอนโดรพลาสติค เมทริกคูลัม และไมโทคอนเดรีย เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เมื่อทดสอบเซลล์ LAN-5 กับสารสกัดสมุนไพรไทยที่สกัดจากตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ พบว่า เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT assay สารสกัดใบสะระแหน่, ใบขี้เหล็ก และ บัวบก จากตัวทำละลายเอทานอล และน้ำที่ความเข้มข้นสูง ได้แก่ 300, 600, 800 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งจากผลการทดสอบที่ได้ คณะผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นที่น้อยที่สุด และมากที่สุดจากการทดสอบ MTT assay ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง LAN-5 ไปใช้ทดสอบฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้า ได้แก่ 25 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อให้ผลการทดสอบที่ได้มีความใกล้เคียงกับความจริงมากที่สุด สามารถนำไปวิเคราะห์ผลได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของโปรตีน

ขนส่งสารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนของสารสกัดสมุนไพรสามารถยับยั้งได้จริง ไม่ได้เกิดจากความ เป็นพิษของสารสกัดสมุนไพรที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงตาย

สำหรับผลทดสอบวัดความเป็นพิษของสารละลายยาต้านโรคซึมเศร้าด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารละลายของ fluoxetine, desipramine hydrochloride ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และ GBR12935 ที่ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ (ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ) ไม่มีความ เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทดสอบด้วยสถิติ Independent sample *t*-test เทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ลบ ดังนั้นจึงนำความเข้มข้นดังกล่าวไปใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่ง สารสื่อประสาทชนิดโมโนเอมีนได้

จากการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบสะระแหน่ในการต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้ง การแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และผ่าน กลไกการยับยั้งการทำงานของ MATs ด้วยเทคนิค Uptake assay พบว่า สารสกัดใบสะระแหน่ ที่สกัดด้วยเอทานอลความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านทั้ง 2 กลไก โดยที่สามารถยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ได้ และสามารถยับยั้งการทำงานของ MATs และเมื่อทดสอบแยกกันระหว่าง DAT, NET และ SERT พบว่ายังสามารถยับยั้งการทำงานของ SERT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อีกด้วย สำหรับที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่ามีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไก การยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และสามารถยับยั้งการทำงานของ MATs และเมื่อ ทดสอบแยกกันระหว่าง DAT, NET และ SERT พบว่ายังสามารถยับยั้งการทำงานของ DAT ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สำหรับสารสกัดใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยน้ำที่ความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มี ฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT และ hNET ในระดับ mRNA ได้ และยับยั้งการทำงานของการทำงานของ MATs ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สำหรับที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการ ยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT และ hSERT ในระดับ mRNA สามารถยับยั้งการทำงานของ MATs อีกทั้งยังสามารถยับยั้งการทำงานของ DAT และ SERT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อทดสอบแยกกัน

จากการทดสอบข้างต้นสรุปได้ว่าสารสกัดใบสะระแหน่ที่สกัดด้วยเอทานอล และ ที่สกัดด้วยน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ SERT และ DAT ซึ่งอาจเนื่องจากสารประกอบในสาร

สก็ดโบสะระแห่นบางชนิดมีฤทธิ์กระตุ้น หรือยับยั้งโปรตีนไคเนสต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการ phosphorylation ซึ่งเป็นกลไกควบคุมการทำงานของ MATs ในเซลล์ประสาท ทำให้สารสื่อประสาทผ่าน MATs เข้าสู่เซลล์ได้ลดลง โดยจากงานวิจัยที่ผ่านมาได้ศึกษาเกี่ยวกับตัวอย่างของโปรตีนไคเนสที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาท monoaminergic อีกด้วย (ตารางที่ 5.1)

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Haeseler และคณะในปี 2002 ศึกษาพบว่าสารประกอบเมนทอล (Menthol) ซึ่งเป็นสารประกอบที่พบมากในพืชตระกูล Mentha. (*Mentha species*) ซึ่งเป็นตระกูลเดียวกับสะระแห่น มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ voltage-sensitive sodium channels ซึ่งมีกลไกการทำงานคล้ายกับ MATs โดยอาศัยไซโตเลียมในการพาสารสื่อประสาทเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงอาจตั้งสมมติฐานได้ว่าสารประกอบเมนทอลเป็นสารออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ SERT และ DAT (104)

นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสก็ดโบสะระแห่นต่อกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hSERT และ hNET ในระดับ mRNA ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการต้านโรคซึมเศร้า พบว่าสารสก็ดโบสะระแห่น ที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีนทั้ง 3 ชนิดได้ในระดับ mRNA ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสารสก็ดโบสะระแห่นมีฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้าได้ใน *in vitro* model

สำหรับการทดสอบฤทธิ์ของสารสก็ดจากบัวบกในการต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของ MATs ด้วยเทคนิค Uptake assay พบว่า สารสก็ดจากบัวบกที่สกัดด้วยเอทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เพียงกลไกเดียวเท่านั้น ไม่สามารถยับยั้งการทำงานของ MATs ได้ จากผลการทดสอบข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าสารสก็ดบัวบกจากเอทานอล และน้ำ มีฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้าได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ทำให้เซลล์ไม่สามารถสังเคราะห์ MATs มาใช้ในการพาสารสื่อประสาทเข้าสู่เซลล์ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sakina และคณะในปี ค.ศ. 1990 ที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสก็ดบัวบกในการต้านโรคซึมเศร้าในหนู rat พบว่า สารประกอบ atropine ในบัวบกมีฤทธิ์กดประสาท และต้านโรคซึมเศร้าได้เช่นกัน แต่ไม่ทราบกลไกการออกฤทธิ์ของสารที่แน่ชัด (105)

และผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดใบชี่เหล็กในการต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค RT-PCR และผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของ MATs ด้วยเทคนิค Uptake assay พบว่าสารสกัดใบชี่เหล็กที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำมีฤทธิ์ยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งให้ผลคล้ายกับสารสกัดใบสะระแหน่ และ บัวบก จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดใบชี่เหล็กด้วยตัวทำละลายเอทานอล และน้ำมีฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้าได้ใน *in vitro* model โดยผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hDAT, hNET และ hSERT และเนื่องจากในปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของใบชี่เหล็กในการต้านโรคซึมเศร้า ดังนั้นทำให้คณะผู้วิจัยไม่สามารถสรุปได้ว่าสารประกอบชนิดใดในสารสกัดใบชี่เหล็กที่ออกฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าได้ผ่านกลไกดังกล่าว จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมาที่ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการต้านโรคซึมเศร้าทั้งใน *in vitro* model และ *in vivo* model ได้ค้นพบสารประกอบหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการต้านโรคซึมเศร้า (ตารางที่ 5.2) ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ใช้ศึกษาในงานวิจัยนี้มีส่วนประกอบของสารประกอบดังกล่าวอยู่ด้วย

การทดสอบวัดความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนด้วยวิธี MTT Assay พบว่าสารทดสอบทั้งหมดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ($P < 0.05$) ดังนั้นผลทดสอบที่ได้จึงมีความน่าเชื่อถือ โดยที่ฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีนขนส่งสารสื่อประสาทโมโนเอมีนนั้นเกิดขึ้นจริงไม่ได้เกิดจากการตายของเซลล์

ตารางที่ 5.1 โปรตีนไคเนสที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาท monoaminergic

ชนิดของโปรตีนไคเนส	หน้าที่การทำงาน	แหล่งอ้างอิง
PKC	กระตุ้นการทำงานของ MATs ทั้ง 3 ชนิด	(79)
p38 MAPKC	ยับยั้งการทำงานของ SERT และ NET	
CaMK II	ยับยั้งการทำงานของ MATs ทั้ง 3 ชนิด	
ERK1/2	ยับยั้งการทำงานของ DAT	

ตารางที่ 5.2 สารประกอบในสารสกัดสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้า

สารประกอบ	การออกฤทธิ์	แหล่งอ้างอิง
Ginsenoside	ยับยั้งการทำงานของ DAT และ SERT	(106)
Crosin	ยับยั้งการทำงานของ MATs ทั้ง 3 ชนิด	
Safranal	ยับยั้งการทำงานของ MATs ทั้ง 3 ชนิด	
Hyperfolin, Hypericin	ยับยั้งการทำงานของ MATs ทั้ง 3 ชนิด	

5.2 สรุป และข้อเสนอแนะ

จากผลการทดสอบทั้งหมดที่กล่าวมานั้น สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิด มีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET ในระดับ mRNA แต่สำหรับสารสกัดโบทระแห่นยังมีฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าได้โดยผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของ DAT และ SERT ทั้งที่สกัดด้วยตัวทำละลายเอทานอล และ ที่สกัดด้วยตัวทำละลายน้ำ ได้อีกด้วย ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามคณะผู้วิจัยได้ใช้สารสกัดสมุนไพรที่เป็นสารสกัดหยาบในการทดสอบ (crude extract) ดังนั้นจึงไม่สามารถระบุได้ว่าสารประกอบชนิดใดที่สามารถออกฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านทั้ง 2 กลไกดังกล่าวได้ ทำให้เราจะต้องมีการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต เพื่อสามารถระบุได้ว่าสารประกอบชนิดใดในสารสกัดสมุนไพรทั้ง 3 ชนิดที่ออกฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการแสดงออกของยีน hSERT, hDAT และ hNET ในระดับ mRNA และสารประกอบชนิดใดในสารสกัดโบทระแห่น ที่ออกฤทธิ์ต้านโรคซึมเศร้าผ่านกลไกการยับยั้งการทำงานของ DAT และ SERT โดยอาจใช้เทคนิคแยกสารสมุนไพรให้เป็นสารประกอบบริสุทธิ์ เช่น Liquid column chromatography, Silica gel column chromatography, Gas chromatography และ ใช้เทคนิคที่สามารถระบุโครงสร้างโมเลกุลของสารนั้นๆ ได้ร่วมด้วย เช่น Nuclear magnetic resonance (NMR), Mass spectrometry นอกจากนี้เราจะศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรภายในสัตว์ทดลอง (*In vivo study*) เพิ่มเติมเพื่อศึกษากระบวนการดูดซึมสารออกฤทธิ์ภายในร่างกายว่าสามารถออกฤทธิ์ได้เป็นอย่างดี และให้ผลคล้ายกันกับการทดสอบในหลอดทดลอง (*In vitro study*) เพื่อเป็นประโยชน์ในการไปปรับใช้ และพัฒนายาต้านโรคซึมเศร้าที่ให้ผลข้างเคียงต่อผู้ป่วยได้น้อยที่สุด และมีประสิทธิภาพในการรักษาได้มากที่สุดในอนาคต

รายการอ้างอิง

- (1) World Health Organization (WHO). Depression. [Online]. 2011. Available from: <http://www.who.int/en/>. [2011,February 4]
- (2) ศูนย์สารสนเทศ กองแผนงาน กรมสุขภาพจิต กระทรวงสาธารณสุข. จำนวนและอัตราผู้ป่วยสุขภาพจิตต่อประชากร 100,000 คน ปีพ.ศ. 2540 - 2549 หน่วยนับ:คน [Online]. 2011. Available from: <http://www.plan.dmh.go.th/>. [2011,February 4]
- (3) สถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุ กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. โรคซึมเศร้า. [Online]. 2009. Available from: <http://www.agingthai.org/page/709>. [2011,February 4]
- (4) Thomson, W. Barlow Abnormal psychology: An integrative approach. 5, editor. Belmont, CA, USA 2005.
- (5) Dwivedi, Y. Brain-derived neurotrophic factor: role in depression and suicide. Journal of Neuropsychiatric Disease and Treatment. 5 (2009): 433-49.
- (6) Delgado, P., and Schillerstrom , J. Cognitive Difficulties Associated With Depression: What Are the Implications for Treatment? Psychiatric Times. 26 (2009).
- (7) Faculty of Psychiatry of Old Age, N. B., RANZCP. Consensus Guidelines for Assessment and Management of Depression in the Elderly: NSW Health Department 2001, 2001.
- (8) Yohannes, A. M., and Robert, C. Medical Comorbidities in Late-Life Depression. (2008).
- (9) Shah, N., Eisner, T., Farrell, M., and Raeder, C. An Overview of SSRIs for the Treatment of Depression. Journal of the Pharmacy Society of Wisconsin. (1999).
- (10) Caspi, A., Sugden, K., Moffitt, T. E., Taylor, A., Craig, I. W., Harrington, H. L., et al. Influence of Life Stress on Depression: Moderation by a Polymorphism in the 5-HTT Gene. Science. 301 (2003): 386-89.
- (11) Krishnan, V., and Nestler, E. J. The molecular neurobiology of depression. Nature. 455 (2008): 894-902.

- (12) Meyer, J., Ginovart, N., Boovariwala, A., Sagrati, S., Hussey, D., Garcia, A., et al. Elevated Monoamine Oxidase A Levels in the Brain An Explanation for the Monoamine Imbalance of Major Depression. Archives of General Psychiatry. 63 (2006): 1209-16.
- (13) Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Millera, H. A., and Nemeroff, B. C. The link between childhood trauma and depression: Insights from HPA axis studies in humans. Psychoneuroendocrinology. 33 (2008): 693-710.
- (14) Kessler, R. THE EFFECTS OF STRESSFUL LIFE EVENTS ON DEPRESSION. Annual Review of Psychology. 48 (1997): 191-214.
- (15) Kendler, K., Hettema, J., Butera, F., Gardner, C., and Prescott, C. Life Event Dimensions of Loss, Humiliation, Entrapment, and Danger in the Prediction of Onsets of Major Depression and Generalized Anxiety. Archives of General Psychiatry. 60 (2003): 789-96.
- (16) Jenny, D., Eman, S., and Gabrielle, M. Do psychiatrists perform appropriate physical investigations for their patients? A review of current practices in a general psychiatric inpatient and outpatient setting. Journal of Mental Health. 17 (2008): 293-98.
- (17) Diagnostic and statistical manual of mental disorders DSM-IV-TR. Arlington VA American Psychiatric Association, 2010.
- (18) Practice guideline for the treatment of patients with major depressive disorder. American Journal of Psychiatry. 157 (2000): 1-45.
- (19) Turner, E., Matthews, A., Linardatos, E., Tell, R., and Rosenthal, R. Selective publication of antidepressant trials and its influence on apparent efficacy. The New England Journal of Medicine. 358 (2008): 252-60.
- (20) Yufarov V, Butelman E, and Kreek M. Biological clock: biological clocks may modulate drug addiction. European Journal of Human Genetics. 13 (2005): 1101-3.

- (21) Stimmel, Dopheide G.L., and Stahl S.M. Mirtazapine: an antidepressant with noradrenergic and specific serotonergic effects: Pharmacotherapy (American College of Clinical Pharmacy), 1997.
- (22) Broquet K. Status of treatment of depression. Southern Medical Journal. 92 (1999): 846-56.
- (23) Cascade, E., and Kalali, A. EMSAM: The First Year. Psychiatry. (2007).
- (24) King, M. Serotonin. The Medical Biochemistry Page. (2009).
- (25) Frazer, A., and Hensler, J. Understanding the neuroanatomical organization of serotonergic cells in the brain provides insight into the functions of this neurotransmitter1999.
- (26) Coccaro, E. Central serotonin and impulsive aggression. The British Journal of Psychiatry. 155 (1989): 52-62.
- (27) Berger, M., Gray, J. A., and Roth, B. L. The Expanded Biology of Serotonin. The Annual Review of Medicine. 60 (2009): 355-66.
- (28) Walther, J. D., Peter, J. U., Bashammakh, S., Ho¨ rtnagl, H., Voits, M., Fink, H., et al. Synthesis of Serotonin by a Second Tryptophan Hydroxylase Isoform. BREVIA NEUROSCIENCE. 299 (2003): 76.
- (29) Encyclopedia of Drugs, Alcohol, and Addictive Behavior. Ventral Tegmental Area. [Online]. 2001. Available from: <http://www.enotes.com/health/browse/sources/encyclopedia-drugs-alcohol-addictive-behavior>. [25 september 2011]
- (30) Ben-Jonathan, N., and Hnasko, R. Dopamine as a Prolactin (PRL) Inhibitor. Endocrine Reviews. 22 (2001): 724-63.
- (31) Arias-Carrión, O., and Pöppel, E. Dopamine learning and reward-seeking behavior. Acta Neurobiologiae Experimentalis. 67 (2007): 481-88.

- (32) Carlsson, A. Perspectives on the discovery of central monoaminergic neurotransmission. Annual Review of Neuroscience Letters. 10 (1987): 19-40.
- (33) Koob, G. Drug abuse and alcoholism. Overview. . Advances in Pharmacology. 42 (1998): 969–77.
- (34) Redgrave, P., and Gurney, K. The short-latency dopamine signal: a role in discovering novel actions? Nature Reviews Neuroscience. 12 (2006): 967-75.
- (35) Renal Vasodilatory Action of Dopamine in Patients With Heart Failure: Magnitude of Effect and Site of Action. Circulation. 117 (2008): 200-05.
- (36) Morón, J., Brockington, A., Wise, R., Rocha, B., and Hope, B. Dopamine uptake through the norepinephrine transporter in brain regions with low levels of the dopamine transporter: evidence from knock-out mouse lines. The Journal of Neuroscience. 22 (2002): 389-95.
- (37) Henekaa, M. T., Nadrigny, F., Regenc, T., Martinez-Hernandez, A., Dumitrescu-Ozimeka, L., Terwela, D., et al. Locus ceruleus controls Alzheimer's disease pathology by modulating microglial functions through norepinephrine. Proceedings of the National Academy of Sciences. 107 (2010): 6058-63.
- (38) Rang, H. P., Dale, M. M., and Ritter, J. M. Chapter 11 in: Rod Flower. Edinburgh 2007.
- (39) Klimek, V., Stockmeier, C., Overholser, J., Meltzer, H., Kalka, S., Dilley, G., et al. Reduced levels of norepinephrine transporters in the locus coeruleus in major depression. The Journal of Neuroscience. 17 (1997): 8451-58.
- (40) The American Heritage® Stedman's Medical Dictionary(2011). Norepinephrine. (n.d.).

- (41) Tanaka, M., Yoshida, M., Emoto, H., and Ishii, H. Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. European Journal of Pharmacology. 405 (2000): 397-406.
- (42) White, M. Introduction to Autonomic Pharmacology. Pharmacology. 512 (2008).
- (43) ISCID Encyclopedia of Science and Philosophy Monoamine Neurotransmitters [Online]. 2011. Available from: http://www.iscid.org/encyclopedia/Monoamine_Neurotransmitters. [2011,February 4]
- (44) Wikipedia, the free encyclopedia. Monoamine neurotransmitter. [Online]. 2010. Available from: http://en.wikipedia.org/wiki/Monoamine_neurotransmitter. [2010,December 30]
- (45) Barker, E., and Blakely, R. Norepinephrine and serotonin transporters: Molecular targets of antidepressant drugs. Bloom, F., Kupfer, D., editors. New York: Raven Press, 1995.
- (46) Jayanthi, L., and Ramamoorthy, S. Regulation of monoamine transporters: influence of psychostimulants and therapeutic antidepressants. The AAPS Journal. (2005): E728-38.
- (47) Yamashita, A., Singh, S., Kawate, T., Jin, Y., and Gouaux, E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. Nature. 437 (2005): 215–23.
- (48) Vaughan, R. A., Huff, R. A., Uhl, G. R., and Kuhar, M. J. J. Protein kinase C-mediated phosphorylation and functional regulation of dopamine transporters in striatal synaptosomes. . Biological Chemistry. 272 (1997): 15541–46.
- (49) Zhang, L., Coffey, L. L., and Reith, M. E. Regulation of the functional activity of the human dopamine transporter by protein kinase C. Biochem Pharmacol. 53 (1997): 677–88.

- (50) Bonisch, H., Hammermann, R., and Bruss, M. Role of protein kinase C and second messengers in regulation of the norepinephrine transporter. . Advances in Pharmacology. 42 (1998): 183-86.
- (51) Ramamoorthy, S., Giovanetti, E., Qian, Y., and Blakely R. D. Phosphorylation and regulation of antidepressant-sensitive serotonin transporters. The Journal of Biological Chemistry. 273 (1998): 2458–66.
- (52) Biochemistry of Methamphetamine. [Online]. 2011.
- (53) Lesch, K., Wolozin, B., Estler, H., Murphy, D., and Riederer, P. Isolation of a cDNA encoding the human brain serotonin transporter. Journal of Neural Transmission. 91 (1993): 67-72.
- (54) Rudnick, G. Active transport of 5-hydroxytryptamine by plasma membrane vesicles isolated from human blood platelets. The Journal of Biological Chemistry. 252 (1977).
- (55) Gordon, J., and Barnes, N. Lymphocytes transport serotonin and dopamine: agony or ecstasy? Trends in Immunology. 24 (2003): 438-43.
- (56) Balkovetz, D., Tirupathi, C., Leibach, F., Mahesh, V., and Ganapathy, V. Evidence for an imipraminesensitive serotonin transporter in human placental brush-border membranes. The Journal of Biological Chemistry. 264 (1989): 2195-98.
- (57) Paczkowski, N., Vuocolo, H., and Bryan-Lluka, L. Conclusive evidence for distinct transporters for 5-hydroxytryptamine and noradrenaline in pulmonary endothelial cells of the rat. . Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. 353 (1996).
- (58) Talvenheimo, J., Fishkes, H., Nelson, P., and Rudnick, G. The serotonin transporter-imipramine “receptor”. The Journal of Biological Chemistry. 258 (1983): 6115-19.
- (59) Benmansour, S., Deltheil, T., Piotrowski, J., Nicolas, L., Reperant, C., Gardier, A., et al. Influence of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) on serotonin

- neurotransmission in the hippocampus of adult rodents. European Journal of Pharmacology. 587 (2008): 90-98.
- (60) Daws, L., Gerhardt, G., and Frazer, A. 5-HT_{1B} antagonists modulate clearance of extracellular serotonin in rat hippocampus. . Neuroscience Letters. 266 (1999): 165-68.
- (61) Daws, L., Gould, G., Teicher, S., Gerhardt, G., and Frazer, A. 5-HT_{1B} receptor-mediated regulation of serotonin clearance in rat hippocampus in vivo. . Journal of Neurochemistry. 75 (2000): 2113-22.
- (62) Launay, J., Bondoux, D., Oset-Gasque, M., Emami, S., Mutel, V., Haimart, M., et al. Increase of human platelet serotonin uptake by atypical histamine receptors. American Journal of Physiology. 266 (1994): 526-36.
- (63) Matheus, N., Mendoza, C., Iceta, R., Mesonero, J., and Alcalde, A. Regulation of serotonin transporter activity by adenosine in intestinal epithelial cells. . Biochem Pharmacol. 78 (2009): 1198-204.
- (64) Steiner, J., Carneiro, A., Wright, J., Matthies, H., Prasad, H., Nicki, C., et al. cGMP-dependent protein kinase I α associates with the antidepressant-sensitive serotonin transporter and dictates rapid modulation of serotonin uptake. . Molecular Brain Research. 2 (2009): 26.
- (65) Zhu, C., Hewlett, W., Feoktistov, I., Biaggioni, I., and Blakely, R. Adenosine receptor, protein kinase G, and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent up-regulation of serotonin transporters involves both transporter trafficking and activation. Molecular Pharmacology. 65 (2004): 1462-74.
- (66) Zhu, C., Hewlett, W., Francis, S., Corbin, J., and Blakely RD. Stimulation of serotonin transport by the cyclic GMP phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil. European Journal of Pharmacology. 504 (2004): 1-6.

- (67) Gu, H., Wall, S., and Rudnick, G. Stable expression of biogenic amine transporters reveals differences in inhibitor sensitivity, kinetics, and ion dependence. The Journal of Biological Chemistry. 269 (1994): 7124-30.
- (68) Bolan, E., Kivell, B., Jaligam, V., Oz, M., Jayanthi, L., Han, Y., et al. D2 receptors regulate dopamine transporter function via an extracellular signal-regulated kinases 1 and 2-dependent and phosphoinositide 3 kinase-independent mechanism. Molecular Pharmacology. 71 (2007): 1222-32.
- (69) Carvelli, L., Moron, J., Kahlig, K., Ferrer, J., Sen, N., Lechleiter, J., et al. PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. Journal of Neurochemistry. 81 (2002): 859-69.
- (70) Foster, J., Pananusorn, B., Cervinski, M., Holden, H., and Vaughan, R. Dopamine transporters are dephosphorylated in striatal homogenates and in vitro by protein phosphatase 1. Molecular Brain Research. 110 (2003): 100-08.
- (71) Hoover, B., Everett, C., Sorkin, A., and Zahniser, N. Rapid regulation of dopamine transporters by tyrosine kinases in rat neuronal preparations. Journal of Neurochemistry. 101 (2007): 1258-71.
- (72) Foote, S., Bloom, F., and Aston-Jones, G. Nucleus locus ceruleus: New evidence of anatomical and physiological specificity. Physiological Reviews. 63 (1983): 844-914.
- (73) Moore, R., and Bloom, F. Central catecholamine neuron systems: anatomy and physiology of the norepinephrine and epinephrine systems. Annual Review of Neuroscience. 2 (1979): 113-68.
- (74) Jayanthi, L., Vargas, G., and DeFelice, L. Characterization of cocaine and antidepressant-sensitive norepinephrine transporters in rat placental trophoblasts. British Journal of Pharmacology. 135 (2002): 1927-34.
- (75) Schroeter, S., Apparsundaram, S., Wiley, R., Miner, L., Sesack, S., and Blakely, R. Immunolocalization of the cocaine- and antidepressant-sensitive

- I-norepinephrine transporter. The Journal of Comparative Neurology. 420 (2000): 211-32.
- (76) Sung, U., Apparsundaram, S., Galli, A., Kahlig, K., Savchenko, V., Schroeter, S., et al. A regulated interaction of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. The Journal of Neuroscience. 23 (2003): 1697-709.
- (77) Gu, H., Wall, S., and Rudnick, G. Ion coupling stoichiometry for the norepinephrine transporter in membrane vesicles from stably transfected cells. The Journal of Biological Chemistry. 271 (1996): 6911-16.
- (78) Apparsundaram, S., Galli, A., DeFelice, L., Hartzell, H., and Blakely, R. Acute regulation of norepinephrine transport: I. PKC-linked muscarinic receptors influence transport capacity and transporter density in SK-N-SH cells. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 287 (1998): 733-43.
- (79) Ramamoorthy, S., Shippenberg, T., and Jayanthi, L. Regulation of Monoamine Transporters: Role of Transporter Phosphorylation. Pharmacology & Therapeutics. 129 (2011): 220-38.
- (80) Ernst, E. St. John's wort, an anti-depressant? A systematic, criteria-based. Phytomedicine. 2 (1995): 67-71.
- (81) Linde, K., and Mulrow, C. St John's wort for depression. Cochrane Database of Systematic Reviews. (1998).
- (82) Gaster B. St John's wort for depression. A systematic review. Archives of Internal Medicine. 160 (2000): 152-6.
- (83) Williams, J. W. j., Mulrow, C., Chiquette, E., Hitchcock, N. P., Aguilar, C., and Cornell, J. A systematic review of newer pharmacotherapies for depression in adults: evidence report summary. Annals of Internal Medicine. 132 (2000): 743-56.

- (84) Akhondzadeh, S., Fallah-Pour, H., Afkham, K., Jamshidi, A. H., and Khalighi-Cigaroudi, F. Comparison of *Crocus sativus* L. and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: A pilot double-blind randomized trial. BMC Complementary and Alternative Medicine. (2004).
- (85) Akhondzadehbasti A, Moshiri E, Noorbala A, Jamshidi A, Abbasi S, and Akhondzadeh S. Comparison of petal of *Crocus sativus* L. and fluoxetine in the treatment of depressed outpatients: A pilot double-blind randomized trial. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. 31 (2007): 439-42.
- (86) Joshi, H., and Parle, M. Evaluation of nootropic potential of *Ocimum sanctum* Linn. in mice. Indian Journal of Experimental Biology. 44 (Feb. 2006): 133-6.
- (87) สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาเภสัชพฤกษศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2543.
- (88) Quisumbing, E. Medicinal Plants of the Philippines. (1978).
- (89) บุญยะประสงค์ นันทวัน, และ โชคชัยเจริญพร อรรณูช. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. 4, editor. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์ประชาชน, 2539.
- (90) McKemy, D. D., Neuhausser, W. M., and Julius, D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. Nature. 416 (2002): 52-58.
- (91) Villaseñor, I. M., Echegoyen, D. E., and Angelada, J. S. A new antimutagen from *Mentha cordifolia* Opiz. Mutation Research. 515 (2002): 141-46.
- (92) Wijeweeraa, P., Arnasona, J. T., Koszyckib, D., and Meralib, Z. Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola – (*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. Phytomedicine. 13 (2006): 668-76.
- (93) Somchit, M. N., Sulaiman, M. R., Zuraini, A., and et al. Antinociceptive and antiinflammatory effects of *Centella asiatica*. Indian Journal of Pharmacology. 36 (2004): 377-80.

- (94) George, M., Joseph, L., and Ramaswamy. Anti-allergic, antipruritic, and anti-inflammatory activities of *Centella asiatica* extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 6 (2009): 554-59.
- (95) Sudha, S., Kumaresan, S., Amit, A., David, J., and Venkataraman, B. V. Anti-convulsant activity of different extracts of *Centella asiatica* and *Bacopa monnieri* in animals. *Journal of Natural Remedies*. 2 (2002): 33-41.
- (96) Wang, X. S., Dong, Q. J., Zuo, P., and Fang, J. N. Structure and potential immunological activity of a pectin from *Centella asiatica* (L.) Urban. *Carbohydrate Research*. 338 (2003): 2393-402.
- (97) Chantong, B., Wongtongtair, S., Nusuetrong, P., Sotanaphun, U., Chaichantipyuth, C., and Meksuriyen, D. Stability of Barakol under Hydrolytic Stress Conditions and its Major Degradation Product. *Planta Medica*. 75 (2008): 346-50.
- (98) Zhao, G., Gai, Y., Chu, W., Qin, G., and Guo, L. A novel compound N1, N5-(Z)-N10-(E)-tri-p-coumaroylspermidine isolated from *Carthamus tinctorius* L. and acting by serotonin transporter inhibition. *European europsychopharmacology*. 19 (2009): 749-75.
- (99) Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays *Journal of immunological methods*. 65 (1983): 55-63.
- (100) Frankhausera, P., Grimmerb, Y., Bugertc, P., Deuschlea, M., Schmidtb, M., and Schlosd, P. Characterization of the neuronal dopamine transporter DAT in human blood platelets. *Neuroscience Letters*. 399 (2006): 197-201.
- (101) Kubota, N., Kiuchi, Y., Nemoto, M., Oyamada, H., Ohno, M., Funahashi, H., et al. Regulation of serotonin transporter gene expression in human glial cells by growth factors. *European Journal of Pharmacology*. 417 (2001): 69-76.
- (102) Divya, C. S., and Pillai, M. R. Antitumor action of curcumin in human papillomavirus associated cells involves downregulation of viral

oncogenes, prevention of NFkB and AP-1 translocation, and modulation of apoptosis. Molecular Carcinogenesis. 45 (2006): 320-32.

- (103) DSMZ. LAN-5 Cell line index. [Online]. 2004. Available from: http://old.dsmz.de/human_and_animal_cell_lines/info.php?dsmz_nr=673&from=cell_line_index&firstload=1. [2012, July 20]
- (104) Haeseler G., Maue D., Grosskreutz J., Bufler J., Nentwig B., Piepenbrock S., et al. "Voltage-dependent block of neuronal and skeletal muscle sodium channels by thymol and menthol". European Journal of Anaesthesiology. 19 (2002): 571-79.
- (105) Sakina, M. R., and Dandiya, P. C. A psychoneuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. Fitoterapia. 61 (1990): 291-96.
- (106) Sarris, J. Herbal medicine for depression, anxiety and insomnia: A review of psychopharmacology and clinical evidence. European Neuropsychopharmacology. (2011).

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

น้ำยาและสารละลายที่ใช้ในการทดสอบ

1. MTT stock solution reagents 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

MTT dye 5 มิลลิกรัม ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.4) 1 มิลลิลิตร กรองผ่านกระดาษกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 μm เพื่อให้ปราศจากเชื้อ และแยกตะกอนเล็กๆ ที่ยังละลายไม่ได้ออก เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2. การเตรียม DEPC-treated water

ประกอบด้วย 0.01% Diethylpyrocarbonate (DEPC) ผสมกับน้ำในภาชนะที่ปราศจาก RNase ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืนและนำไปอบฆ่าเชื้อ (autoclave)

3. การเตรียม 10% DMEM with glucose (50mL)

DMEM	45	มิลลิลิตร
Fetal Bovine Serum	5	มิลลิลิตร
Antibiotic - Antimycotic	500	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันในหลอดทดลองขนาด 50 mL เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C

4. การเตรียม Tris-acetate Buffer (TAE) (50X)

Tris base	242	กรัม
Glacial acetic acid	57.1	มิลลิลิตร
0.5 M EDTA, pH 8	100	มิลลิลิตร

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

5. การเตรียมอะกาโรสเจล 2% (100 mL)

ชั่งผงอะกาโรส 2 กรัมแล้วเติม 1X TAE buffer จนมีปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นนำเข้าไมโครเวฟจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน เทลงแม่พิมพ์เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยการแช่ไว้ใน 1X TAE buffer

6. การเตรียม 1X HBSS (1 ลิตร)

10X HBSS	100	มิลลิลิตร
1M HEPES	20	มิลลิลิตร

เติมน้ำจนครบ 1 ลิตร

7. การเตรียม 1X HBSS+0.1%BSA Buffer

35%BSA	286	ไมโครลิตร
1X HBSS	100	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

สัญลักษณ์ คำย่อ และคำอธิบาย

คำย่อ	คำอธิบาย
5-HT	serotonin
°C	องศาเซลเซียส
OD	การดูดกลืนแสง (optical density)
%	เปอร์เซ็นต์
/	per
μ	micro (10 ⁻⁶)
μl	microlitre
Abs	Absorbance
bp	Base pairs
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
DA	Dopamine
DAT	Dopamine transporter
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DEPC	Diethyl pyrocarbonate
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Deoxyribonuclease
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Gram
GBR12935	1-(2-(diphenylmethoxy)ethyl)-4-(3-phenylpropyl) piperazine
hDAT	Human dopamine transporter gene
hNET	Human norepinephrine transporter gene
hSERT	Human serotonin transporter gene
M	Molar

MATs	Monoamine transporters
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
mg	Milligram
ml	Millilitre
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, a tetrazole)
mRNA	Messenger Ribonucleic acid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide (reduced)
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced)
NE	Norepinephrine
NET	Norepinephrine transporter
nm	Nanometer
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>P</i>	<i>P</i> -value
PBS	Phosphate Buffered Saline
pH	Negative logarithm of the hydrogen ion concentration
RNA	Ribonucleic acid
RNase	Ribonuclease
RT-PCR	Reverse transcription-polymerase chain reaction
SERT	Serotonin transporter
U	Unit
v / v	Volume by volume

ประวัติประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทวิน เทนคำเนาวิ

คุณวุฒิ

วท. บ. (เทคนิคการแพทย์, เกียรตินิยม), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, พ.ศ. 2537

Ph.D. (Biochemistry and Molecular Biophysics), Virginia Commonwealth University/USA, พ.ศ. 2544

Post-doctoral training, Institute of Molecular Medicine and Genetics (IMMAG),

Medical College of Georgia/USA, พ.ศ. 2544 – 2545

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- ด้านการควบคุมการแสดงออกของยีน (regulation of gene expression) โดยมีประสบการณ์ศึกษากลไกที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไขมันชนิดต่างๆในสมอง ซึ่งในการวิจัยดังกล่าว ใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยา (molecular biology) เช่น molecular cloning, polymerase chain reaction (PCR), real-time PCR, reverse transcription (RT)-PCR, Northern blot analysis, Western blot analysis, electrophoretic mobility shift assay และ reporter gene assay เป็นต้น

- การวิจัยที่ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) เช่น เซลล์สมอง (neuronal cells) และเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) เพื่อทดสอบดูว่า เมื่อถ่ายโอน chimeric genes ที่ผลิตขึ้นจากยีนที่สนใจเข้าสู่เซลล์แล้ว เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างไร รวมทั้งตรวจสอบการเคลื่อนที่ (subcellular localization) หรือการแสดงออกของโปรตีนที่สนใจโดยใช้เทคนิคการย้อมหรือติดฉลาก แล้วตรวจดูเซลล์ ด้วยอุปกรณ์ต่างๆ เช่น confocal microscopy และ fluorescence microscopy เป็นต้น

- การศึกษาในลักษณะ association study เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน (genetic polymorphism) กับการเกิดโรค โดยมุ่งศึกษาอณูชีววิทยาของยีน receptor for advanced glycation endproduct (RAGE), angiotensin-converting enzyme (ACE) และยีนหลักในระบบสารสื่อประสาท serotonergic และ dopaminergic เช่น serotonin transporter gene, serotonin receptor genes, dopamine transporter gene และ dopamine receptor genes เป็นต้น ทั้งนี้ ได้ศึกษาในโรคที่กำลังเป็นปัญหาสาธารณสุข ได้แก่ โรคเบาหวาน โรคสะเก็ดเงิน และโรคซึมเศร้า

- การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากสมุนไพรไทย เช่น ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการลดน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านโรคสะเก็ดเงิน

ผลงานทางวิชาการ

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Original articles in international peer-reviewed journals

1. Effect of *Gloriosa superba* and *Catharanthus roseus* extracts on IFN- γ -induced Keratin 17 expression in HaCaT human keratinocytes. Pattarachotanant N., Rakkhittawattana V. and **Tencomnao T.** Evid Based Complement Alternat Med. 2014 (*In press*)
2. Medicinal herbs and antioxidants: potential of Treatment?, nasutus for disease. Brimson, J.M. and **Tencomnao, T.** Phytochem. Rev. 2014; 13: 643–51.
3. Protection from UVB Toxicity in Human Keratinocytes by Thailand Native Herbs Extracts. Thongrakard V, Ruangrunsi N, Ekkapongpisit M, Isidoro C, **Tencomnao T.** Photochemistry and Photobiology. 2014; 90: 214–24.
4. Turmeric Toxicity in A431 Epidermoid Cancer Cells Associates with Autophagy Degradation of Anti-apoptotic and Anti-autophagic p53 Mutant. Thongrakard V, Titone R, Follo C, Morani F, Suksamrarn A, **Tencomnao T.**, Isidoro C. Phytother Res. 2014 Jul 11. doi: 10.1002/ptr.5196. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 25044209.
5. Effect of *Moringa oleifera* on advanced glycation end-product formation and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. Sangkitikomol W, Rocejanasaroj A, **Tencomnao T.** Genet Mol Res. 2014;13(1):723-735.
6. *Thunbergia laurifolia* extract minimizes the adverse effects of toxicants by regulating P-glycoprotein activity, CYP450, and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. Rocejanasaroj A, **Tencomnao T.**, Sangkitikomol W. Genet Mol Res. 2014; 13(1):205-219.
7. Effects of ethanolic extract of *Annona squamosa* L. leaves on the expression of EGFR. Ronpirin C, Charueksereesakul T, Thongrakard V and **Tencomnao T.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014; 6(4): 791-797.
8. Suppressive effect of ethanolic extract of *Annona squamosa* L. leaves on the expression of Id1 biomarker: Phytochemical investigation and antioxidant activity study. Kawjit N, Charueksereesakul T, Thongrakard V, Sangsuthum S and

- Tencomnao T. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2014; 6(1):499-506.
9. Fluorescence of *Senna simea* Lam. leaf extracts: a possible interference in a fluorescence-based assay. Thanephatisuk L and Tencomnao T. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research. 2013; 5(5):105-110.
 10. Amyloidosis in Alzheimer's Disease: The Toxicity of Amyloid Beta ($A\beta$), Mechanisms of Its Accumulation and Implications of Medicinal Plants for Therapy. Prasansuklab A and Tencomnao T. Evid Based Complement Alternat Med. 2013;2013:413808. doi: 10.1155/2013/413808.
 11. Are religious beliefs and practices of Buddhism associated with disability and salivary cortisol in office workers with chronic low back pain? Sooksawat A, Janwantanakul P, Tencomnao T, Pensri P. BMC Musculoskelet Disord. 2013; 14:29.
 12. Acceleration of gene transfection efficiency in neuroblastoma cells through polyethyleneimine/poly(methyl methacrylate) core-shell magnetic nanoparticles. Tencomnao T, Klangthong K, Pimpha N, Chaleawler-Umpon S, Saesoo S, Woramongkolchai N, Saengkrit N. Int J Nanomedicine. 2012;7:2783-92.
 13. Associations of the +45 T/G and +276 G/T polymorphisms in the adiponectin gene with biliary atresia. Udomsinprasert, W., Tencomnao, T., Honsawek, S., Anomasiri, W., Vejchapipat, P., Chongsrisawat, V., Poovorawan, Y. World Journal of Pediatrics. 2012; 8:328-34.
 14. Dithranol downregulates expression of Id1 mRNA in human keratinocytes *in vitro*. Ronpirin, C., Tencomnao, T. J Genetics and Molecular Research. 2012; 11:3290-7.
 15. Rhinacanthus nasutus Extracts Prevent Glutamate and Amyloid- β Neurotoxicity in HT-22 Mouse Hippocampal Cells: Possible Active Compounds Include Lupeol, Stigmasterol and β -Sitosterol. (2012). Brimson, J.M.; Brimson, S.J.;

- Brimson, C.A.; Rakkhitawatthana, V.; **Tencomnao**, T. *Int J Mol Sci*, 13, pp. 5074-5097.
16. Effects of the antipsoriatic drug dithranol on E2A and caspase-9 gene expression *invitro*. (2012). Ronpirin C, **Tencomnao** T. *Genet Mol Res*, 11(1), pp. 412-420.
 17. Layer-by-layer deposition of cationic polymers on gold nanoparticle for non-viral gene delivery system. (2011). Saengkrit, N., Sajomsang, W., Pimpa, N., Chaleawlerumpon, S., Rakkhithawatthana, V., **Tencomnao**, T. *Technical Proceedings of the 2011 NSTI Nanotechnology Conference and Expo, NSTI-Nanotech 2011*, 3 , pp. 302-305.
 18. Semi-quantitative detection of gene expression using bisbenzimidazole dye. (2011). Kittimongkolsuk, P., **Tencomnao**, T., Santiyanont, R. *Genet Mol Res*, 10(4), pp. 3747-3759.
 19. Modulation of Human Serotonin Transporter Expression by 5-HTTLPR in Colon Cells. (2011). Prasansuklab, A., Poovorawan, Y., **Tencomnao**, T. *Int J Mol Sci*, 12, pp. 6619-6634.
 20. Immunomodulatory effect of hexane extract of *vernonia cinerea* less. trunk on human peripheral blood mononuclear cells. ((2011. Laosim, T., Chuchawankul, S., **Tencomnao**, T. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* (4) 3, pp. 195-188
 21. *In vitro* effect of Thai herbal extracts with anti-psoriatic activity on the expression of caspase .(2011) .9Charueksereesakul, T., Thongrakard, V., **Tencomnao**, T. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* Volume 3, Issue 4, 2011, Pages .203-196
 22. *Rhinacanthus nasutus* Protects Cultured Neuronal Cells against Hypoxia Induced Cell Death. (2011). Brimson, J.M., **Tencomnao**, T. *Molecules*, 16, pp. 6322-6338.

23. Nano-polyplex as a non-viral gene carrier for the expression of bone morphogenetic protein in osteoblastic cells. (2011). Saengkrit, N., Sajomsang, W., Rakkhithawatthana, V., **Tencomnao, T.** Carbohydrate Polymers, 86, pp. 587-593.
24. Effects of Thai Medicinal Herb Extracts with Anti-Psoriatic Activity on the Expression on NF-**KB** Signaling Biomarkers in HaCaT Keratinocytes. (2011). Saelee, C., Thongrakard, V., **Tencomnao, T.** Molecules, 16, pp. 3908-3932.
25. Gold/cationic polymer nano-scaffolds mediated transfection for non-viral gene delivery system Carbohydrate Polymers. (2011). **Tencomnao, T.**, Apijaraskul, A., Rakkhithawatthana, V., Chaleawlert-umpon, S., Pimpa, N., Sajomsang, W., Saengkrit N. Carbohydrate Polymers, 84, pp. 216-222.
26. Antioxidant effects of anthocyanins-rich extract from black sticky rice on human erythrocytes and mononuclear leukocytes. (2010). Sangkitikomol, W., **Tencomnao, T.**, Rocejanasaroj, A. African Journal of Biotechnology, 9 (48), pp. 8222-8229.
27. An investigation of the relationship between serotonin transporter gene promoter polymorphism (5-HTTLPR) and psoriasis susceptibility in a Thai population. (2010). **Tencomnao, T.**, Wongpiyabovorn, J. Genet Mol Res, 9 (4), pp. 2275-2282.
28. Up-regulation of Id1 in peripheral blood of psoriatic patients. (2010). Ronpirin, C., Achariyakul, M., **Tencomnao, T.**, Wongpiyabavorn, J., Chaicumpa, W. Genet Mol Res, 9 (4), pp. 2239-2247.
29. Influence of demographic factors and serotonin transporter-linked polymorphic region (5-HTTLPR) variants on major depression in a northeastern Thai population. (2010). **Tencomnao, T.**, Sritharathikhun, T., Suttirat, S. Asian Biomedicine, 4(6), pp. 893-899.

30. The effects of Thai black sticky rice extract on oxidative stress and lipid metabolism gene expression in HepG2 cells. (2010). Sangkitikomol, W., **Tencomnao, T.**, Rocejanasaroj, A. *Genet Mol Res*, 9 (4), pp. 2086-2095.
31. Psoriasis: A review of the role of serotonergic system. (2010). Ronpirin C., and **Tencomnao T.**, 2010. *African Journal of Biotechnology*, 9 (11), p. 1528-1534.
32. Modulatory effects of Thai medicinal plant extract on proinflammatory cytokines-induced apoptosis in human keratinocyte HaCaT cells. (2010). Thongrakard, V., **Tencomnao, T.** *African Journal of Biotechnology*, 9 (31), pp. 4999-5003.
33. No relationship found between -1438A/G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene (rs6311) and major depression susceptibility in a northeastern Thai population. (2010). **Tencomnao, T.**, Thongrakard, V., Phuchana, W., Sritharathikhun, T., Suttirat, S. *Genet Mol Res*, 9 (2), pp. 1171-1176.
34. Association between Toll-like receptor 2 (TLR2) polymorphisms and asymptomatic bancroftian filariasis. (2010). Junpee, A., **Tencomnao, T.**, Sanprasert, V., Nuchprayoon, S. *Parasitology Research*, pp. 1-10.
35. Association of C/T polymorphism in intron 14 of the dopamine transporter gene (rs40184) with major depression in a northeastern Thai population. (2010). Pattarachotanant, N., Sritharathikhun, T., Suttirat, S., **Tencomnao, T.** *Genet Mol Res*, 9 (1), pp. 565-572.
36. Investigation of gene transferring efficacy through nano-polyplex consisting of methylated N-(4-pyridinylmethyl) chitosan chloride and poly(ethylenimine) in human cell lines. (2010). Rakkhithawatthana, V., Sanitrum, P., Sajomsang, W., Na Ubon, P., **Tencomnao, T.**, Saengkrit, N. *Carbohydrate Polymers*, 80 (1), pp. 276-284.
37. Association between the -1438A/G polymorphism of the serotonin 2A receptor gene and late-onset psoriasis in a Thai population. (2010). Ronpirin, C., **Tencomnao, T.**, Wongpiyabovorn, J. *Genet Mol Res*, 9 (1), pp. 208-214.

38. Interaction of serotonin-related genes affects short-term antidepressant response in major depressive disorder. (2010). **Tencomnao, T.** Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry, 34 (2), p. 432.
39. Effect of *Gymnema inodorum* on postprandial peak plasma glucose levels in healthy human (2010). Chiabchalard, A., **Tencomnao, T.**, Santiyanont, R. Afr. J. Biotechnol., 9 (7), pp. 1079-1085.
40. Association of angiotensin-converting enzyme gene promoter single nucleotide polymorphisms and haplotype with major depression in a northeastern Thai population (2009). Angunsri R., Sritharathikhun T., Suttira S., **Tencomnao T.** Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System, 10, pp. 179-184.
41. Decreased EGF receptor mRNA expression in response to antipsoriatic drug dithranol *in vitro* (2009). **Tencomnao T.**, Ronpirin C., Prasansuklab A., Poovorawan Y. Afr. J. Biotechnol., 8, pp. 3141-3146.
42. Misgenotyping of Dopamine Receptor D1 Gene -48A/G Polymorphism (2009). **Tencomnao T.** and Boonmalert R. Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet., 150B, pp. 447-449.
43. A high-throughput non-immunological method for determination of microalbuminuria based on utilization of Albumin blue 580 (2008). Laiwattanapaisal W., Saythanu P., Nubtueboon P., **Tencomnao T.**, and Santiyanont R. Laboratory Medicine, 39, pp. 727-729.
44. Construction and evaluation of a novel luciferase reporter gene construct: a positive control plasmid for reporter gene assay (2008). **Tencomnao T.**, Rakkhitawatthana V., and Sukhontasing K. Afr. J. Biotechnol., 7, pp. 2124-2127.
45. Analysis of autoantibodies to serotonin and serotonin levels in psoriasis (2007). **Tencomnao T.**, Ketboonlue K., Wongpiyabavorn J., Ronpirin C., Achariyakul M., Laiwattanapaisal W., and Chuchawankul S. Chin Med J., 120 (suppl. 2), p. P07-02.

ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติ

1. Sangkitikomol W., **Tencomnao T.**, and Rocejanasaroj A, 2008. Comparison of total antioxidants of red rice, black rice and black sticky rice. *Journal of Nutrition Association of Thailand* vol. 43, p. 13-21
2. Ronpirin C., and **Tencomnao T.**, 2005. "Food and Disease in the Genomic Era." *J. Food Tech.*, Siam University 2, p. 11-17.
3. **Tencomnao T.**, 2003. "Genetic Polymorphisms: Implications for Neurodegenerative Diseases." *J. Allied Health Sciences*, Chulalongkorn University 3, p. 48-56.

ตำราหรือหนังสือ

Brimson, J. M. & **Tencomnao, T.** Rhinacanthus Nasutus Extract as a Neuroprotectant. In "Bioactive nutraceuticals and food supplements in neurological and brain diseases: prevention and therapy", Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy (Editors, 1st edition), pages 77-83, Elsevier (2014).