

ผลการปกป้องของสารสกัดใบรางจืดจากการเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาท  
HT-22 ผ่านวิถีออโตฟาจี



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก  
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ปีการศึกษา 2562  
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

PROTECTIVE EFFECT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* LEAF EXTRACT AGAINST  
GLUTAMATE-INDUCED TOXICITY IN HT-22 NEURONS VIA AUTOPHAGY PATHWAY



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

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2019

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลการปกป้องของสารสกัดใบรางจืดจากการเหนี่ยวนำ ความเป็นพิษด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาท HT-22 ผ่านวิถี ออโตฟาจี
โดย	นายวุฒิพงษ์ วงศ์ทิพย์
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์

---

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิโรจน์ บุญรัตน์กรกิจ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์)

..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ)

..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ไกร มีมล)

วุฒิพงษ์ วงศ์ทิพย์ : ผลการปกป้องของสารสกัดใบรางจืดจากการเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาท HT-22 ผ่านวิถีออโตฟาจี. ( PROTECTIVE EFFECT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* LEAF EXTRACT AGAINST GLUTAMATE-INDUCED TOXICITY IN HT-22 NEURONS VIA AUTOPHAGY PATHWAY) อ.ที่ปรึกษาหลัก : ผศ. ดร.เทวิน เทนคำเนาว์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ. ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์

หนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทรุนแรงนั้นเกิดได้จากภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ประสาท โดยพบว่าสารสื่อประสาทชนิดกลูตาเมตเมื่อมีระดับสูงผิดปกติสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระและภาวะเครียดออกซิเดชันนำไปสู่การสูญเสียและการตายของเซลล์ประสาทได้ โดยเฉพาะการตายของเซลล์จากการเกิดกระบวนการออโตฟาจีมากเกินไป ซึ่งเป็นกระบวนการที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์ผ่านวิถีอื่นๆ รางจืด (*Thunbergia laurifolia*) เป็นพืชสมุนไพรไทยมีสรรพคุณในการถอนพิษ ด้านการอักเสบ และ ด้านอนุมูลอิสระได้ดี จุดประสงค์ในการวิจัยครั้งนี้ คือ ศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด และการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีออโตฟาจี จากการเหนี่ยวนำภาวะเครียดออกซิเดชันด้วยกลูตาเมตโดยทดสอบในเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ใบรางจืดถูกนำมาสกัดด้วยเอทานอล จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และมีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์และฟีนอลิกสูง โดยจากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS และเปรียบเทียบผลที่ได้กับฐานข้อมูล METLIN-(CA, USA) พบสารออกฤทธิ์สำคัญที่ยังไม่มีรายงานในสารสกัดเอทานอลของใบรางจืด ได้แก่ Apigenin 7-O-glucoside และ 7-Hydroxycoumarin ยิ่งไปกว่านั้นสารสกัดหยาบจากใบรางจืดยังสามารถลดการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วยกลูตาเมต โดยสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และเพิ่มการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระในร่างกาย ได้แก่ superoxide dismutase 1 และ 2 (SOD1 and SOD2) catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) ซึ่งสัมพันธ์กับการลดการเกิดกระบวนการออโตฟาจีภายในเซลล์และเพิ่มปริมาณ ไมโทคอนเดรียโปรตีน โดยพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถลดอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีน LC3B-II/LC3B-I และเพิ่มการแสดงออกของไมโทคอนเดรียโปรตีน TOM20 เมื่อทำการตรวจหาตำแหน่งที่จำเพาะต่อการแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการออโตฟาจี (LC3B) และไมโทคอนเดรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดคอนโฟคอล พบว่า สารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถลดการเกิด LC3-puncta ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของการเกิดกระบวนการออโตฟาจี นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดยังลดการ colocalization ของ LC3B และไมโทคอนเดรีย จากผลการศึกษาวิเคราะห์พบสารออกฤทธิ์สำคัญใหม่ที่ยังไม่มีรายงานมาก่อนของใบรางจืด โดยสารออกฤทธิ์นี้มีความสามารถในการปกป้องเซลล์ประสาทชนิด HT-22 จากภาวะเครียดออกซิเดชันและเป็นปัจจัยสำคัญทำให้สารสกัดจากใบรางจืดมีความสามารถลดการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีออโตฟาจีได้ ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาเป็นสมุนไพรทางเลือกหรือยาเพื่อใช้ในการป้องกันหรือรักษาการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้ในอนาคต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์

ปีการศึกษา 2562

ลายมือชื่อนิสิต .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5976672537 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORD: THUNBERGIA LAUROFOLIA, NEUROPROTECTION, ANTIOXIDANT, GLUTAMATE,  
OXIDATIVESTRESS, NEURODEGENERATIVE DISEASE

Wudtipong Vongthip : PROTECTIVE EFFECT OF *THUNBERGIA LAURIFOLIA* LEAF EXTRACT AGAINST  
GLUTAMATE-INDUCED TOXICITY IN HT-22 NEURONS VIA AUTOPHAGY PATHWAY. Advisor: Asst. Prof.  
TEWIN TENCOMNAO, Ph.D. Co-advisor: Monruedee Sukprasansap, Ph.D.

One of the causes of neurodegenerative disorders is an oxidative stress. Excessive neurotransmitter, namely glutamate, can accumulate and produce free radicals and oxidative stress, resulting in neuronal loss and death. Interestingly, the overactivation of autophagy is main cell death mechanism in neurons. This process plays an important role in controlling the cell death through other pathways. *Thunbergia laurifolia* or Rang-Jued is well known as an herbal tea in Thailand with strong detoxification, anti-inflammation and antioxidant properties. The aim of this study was to evaluate the antioxidant properties and the neuroprotective effects of *T. laurifolia* extract (TLE) against glutamate-induced oxidative stress and neuronal cell death via autophagy pathway in HT-22 cells. The leaves were extracted with ethanol. Our results demonstrated that TLE had the neuroprotective effects against glutamate induced oxidative stress. TLE contained high total phenolic and total flavonoid contents. In addition, we found main bioactive compounds which have not been reported in TLE from ethanol, namely Apigenin 7-O-glucoside and 7-Hydroxycoumarin, from LC-MS analysis and the data were compared with METLIN-(CA, USA) database. Moreover, TLE could attenuate neuronal death from glutamate-induced toxicity. TLE inhibited the intracellular ROS generation caused by glutamate and also up-regulated the gene expression of certain antioxidant enzymes which play a significant role in antioxidant process in the body, including superoxide dismutase 1 and 2 (SOD1 and SOD2), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx). These results are related to the relationship between a decrease in the autophagy process and an increase in the number of mitochondria in cells. We found that TLE decreased the autophagic protein expression ratio (LC3B-II/LC3B-I) and increased mitochondria protein expression (TOM20). Additionally, we detected specific localizations of the autophagy specific protein (LC3B) and mitochondria using a confocal microscope. The result showed that TLE could reduce the occurrence of LC3-puncta, which is a characteristic of the autophagy process. Moreover, TLE also suppressed the colocalization of LC3B and mitochondria. Based on this study, we have discovered the bioactive compounds which have not been reported in TLE. These bioactive compounds could be the key factors of TLE to protect HT-22 neuronal cell death against oxidative stress through the autophagy pathway. Thus, Rang-Jued could be developed and used as alternative herbal medicine for prevention of neurodegenerative disorders.

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular Medicine Student's Signature .....

Academic Year: 2019 Advisor's Signature .....  
Co-advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ จากความช่วยเหลือจากคณาจารย์หลายท่าน ข้าพเจ้าขอขอบคุณความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.เทวิน เทนคำเนาวิ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อ.ดร.มลฤดี สุขประสารทรัพย์ ที่คอยให้คำแนะนำ ให้ความรู้ ให้ความช่วยเหลือ และมอบโอกาสให้ข้าพเจ้ามาโดยตลอดนับตั้งแต่วันที่ข้าพเจ้าเข้ามาศึกษาจนสำเร็จลุล่วง ข้าพเจ้าขอขอบคุณคณะกรรมการ ผศ.ดร.วิโรจน์ บุญรัตนกรกิจ รศ.ดร.รัชนา ศานติยานนท์ ผศ.ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ และรศ.ดร.ไกร มีมล ที่ให้คำแนะนำที่ดีเพื่อให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ข้าพเจ้าขอขอบคุณทุนอุดหนุนการศึกษาจากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ ทุนสนับสนุนนิติตระดับปริญญาโทไปทำวิจัยต่างประเทศ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และ คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนการทำวิจัยให้ข้าพเจ้าได้มีโอกาสไปทำวิจัยในต่างประเทศและได้รับประสบการณ์ที่ไม่อาจประเมินค่าได้

ข้าพเจ้าขอขอบคุณความช่วยเหลือและการดูแลที่ดีจาก Dr. Hyunseung Lee และ Prof.Dr. Kyu-Won Kim Research Institute of Pharmaceutical Science, Seoul National University ประเทศเกาหลีใต้ อีกทั้งยังให้ความรู้และเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัย และขอขอบคุณความช่วยเหลือจากบุคลากรในห้องปฏิบัติการและเพื่อนทุกคน ในคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยให้ช่วยเหลือในการทำวิจัยและแบ่งปันความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบคุณครอบครัวและเพื่อนของข้าพเจ้า ที่คอยรับฟังและสนับสนุนข้าพเจ้าเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วุฒิพงษ์ วงศ์ทิพย์

## สารบัญ

	หน้า
.....	ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ค
.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูปภาพ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ .....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ.....	1
1.2 คำถามในงานวิจัย .....	4
1.3 สมมติฐานในงานวิจัย .....	5
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	5
1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย.....	6
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม.....	7
2.1 โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative diseases).....	7
2.2 กลไกการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress mechanism).....	12
2.3 ไมโทคอนเดรียและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Mitochondria and oxidative stress).....	14
2.4 กลูตาเมตและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Glutamate and oxidative stress).....	16
2.5 กลไกการเกิดอโตฟาจี (Autophagy mechanism).....	19
2.6 การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจี (Cell death and autophagy pathway) .....	21



2.7 กลไกในการป้องกันอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Antioxidant mechanisms in cells).....	25
2.8 รางจืด ( <i>Thunbergia laurifolia</i> ) .....	27
2.9 เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 (HT-22 Mouse hippocampal neuronal cells).....	28
บทที่3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	29
3.1 อุปกรณ์.....	29
3.1.1 สารเคมี.....	29
3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	33
3.2 ตัวอย่างสมุนไพร.....	36
3.3 เซลล์เพาะเลี้ยง.....	36
3.4 วิธีการทดลอง.....	37
3.4.1 การสกัดสารสกัดใบรางจืดด้วยวิธี Soxhlet extraction.....	37
3.4.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก.....	38
3.4.3 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์.....	39
3.4.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบรางจืด.....	39
3.4.4.1 วิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).....	39
3.4.4.2 วิธี 2,2'-Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation (ABTS).....	40
3.4.5 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วย LC-MS.....	41
3.4.6 การทดสอบความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดใบรางจืดจากพิษของ กลูตาเมตโดยวัดจากปริมาณการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT.....	41
3.4.7 การทดสอบความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดใบรางจืดจากพิษของ กลูตาเมตโดยวัดจากปริมาณความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี LDH.....	42

3.4.8 การทดสอบหาปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Intracellular reactive oxygen species production) ด้วยวิธี flow cytometry .....	44
3.4.9 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออกโทฟาจี และปริมาณไมโทคอนเดรีย.....	44
3.4.9.1 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford .....	44
3.4.9.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Western Blot.....	45
3.4.10 การย้อมเซลล์ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining .....	46
3.4.11 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากใบรางจืดต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (SOD, CAT, GPx) โดยวิธี Real time-PCR .....	47
3.4.11.1 การสกัด RNA ด้วยน้ำยา Trizol .....	47
3.4.11.2 การทำ Real time-PCR .....	48
3.4.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ .....	49
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	50
4.1 การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและกลไกที่เกี่ยวข้องของสารสกัดจากใบรางจืด .....	50
4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด .....	50
4.1.2 สารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วยเทคนิค LC-MS .....	52
4.1.3 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบรางจืดต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22.....	53
4.1.4 การปกป้องของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อความเป็นพิษจากกลูตาเมตในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22 .....	55
4.1.5 ผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการกระตุ้นการเกิด ROS ด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 .....	57
4.1.6 ผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ .....	59

4.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการตายของเซลล์ประสาทชนิด HT-22 ผ่านวิธีออตฟาจี.....	61
4.2.1 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของโปรตีนในการบวนการออตฟาจีและไมโทคอนเดรียโปรตีน ในเซลล์ประสาทชนิด HT-22 ด้วยวิธี Western blot.....	61
4.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของโปรตีนในการบวนการออตฟาจีและไมโทคอนเดรียโปรตีน ในเซลล์ประสาทชนิด HT-22 ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry (ICC).....	64
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง.....	70
บทที่ 6 สรุป.....	81
6.1 สรุป.....	81
6.2 ข้อจำกัดของงานวิจัย.....	83
บรรณานุกรม.....	84
ประวัติผู้เขียน.....	104

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรมอร์ที่ใช้ในการทดลอง .....	49
ตารางที่ 2 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด.....	51
ตารางที่ 3 ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด .....	51
ตารางที่ 4 สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ทำนายได้จากเทคนิค LC-MS.....	53



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY

## สารบัญรูปภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 การทำงานของเอ็นไซม์ secretase.....	9
รูปที่ 2 ผลของกระบวนการอักเสบต่อความผิดปกติของเซลล์ประสาท .....	12
รูปที่ 3 ชนิดของ ROS ประเภทต่างๆ .....	13
รูปที่ 4 กลไกการเกิด ROS ภายในเซลล์ .....	14
รูปที่ 5 แผนผังดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย.....	15
รูปที่ 6 รูปแบบต่างๆ ของไมโทคอนเดรีย.....	16
รูปที่ 7 กลไกการเกิด glutamate excitotoxicity ผ่าน glutamate receptor ชนิดต่างๆ.....	17
รูปที่ 8 กลไกการเกิด ROS เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมตโดยไม่ผ่าน glutamate receptor .....	18
รูปที่ 9 กลไกการเกิด degradation ของออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยกระบวนการออโตฟาจี.....	20
รูปที่ 10 การตายของเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีอื่นๆ .....	21
รูปที่ 11 การตายของเซลล์ผ่านวิถีออโตฟาจีในรูปแบบต่างๆ .....	24
รูปที่ 12 กลไกการทำงานของยีน Nrf2-antioxidant response element (ARE) .....	25
รูปที่ 13 ยีนต่างๆ ที่ถูกควบคุมโดย Nrf2.....	26
รูปที่ 14 ไบราริจิตก่อนนำไปตากแห้ง .....	36
รูปที่ 15 เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 .....	37
รูปที่ 16 กลไกการเกิดปฏิกิริยาใน MTT assay .....	42
รูปที่ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาใน LDH assay.....	43
รูปที่ 18 การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot .....	46
รูปที่ 19 โครมาโตแกรมของ LC-MS แสดงพีคของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากไบราริจิต .....	52
รูปที่ 20 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-22 .....	54
รูปที่ 21 ผลการปกป้องของสารสกัดหยาบจากไบราริจิตต่อความเป็นพิษจากกลูตาเมต.....	56

รูปที่ 22 ความสามารถในการลดการกระตุ้นการเกิด ROS ภายในเซลล์ด้วยกลูตาเมต..... 58

รูปที่ 23 สารสกัดจากใบรางจืดเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ..... 60

รูปที่ 24 การแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการออโตฟาจี LC3B และไมโทคอนเดรียโปรตีน ..... 63

รูปที่ 25 การยับยั้งโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการออโตฟาจี ..... 68

รูปที่ 26 แผนภาพสรุปกลไกปกป้องเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22..... 82



## บทที่ 1 บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันประชากรของโลกมีจำนวนผู้สูงอายุที่เพิ่มมากขึ้นทุกปี จากการศึกษาพบว่า มากกว่าร้อยละ 11 ของประชากรโลกมีอายุมากกว่า 60 ปี และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ สำหรับประเทศไทยนั้น กำลังจะเข้าสู่สังคมผู้สูงวัยโดยมีจำนวนผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหากเทียบกับประเทศในกลุ่มทวีปเอเชียและชาติตะวันตก ทั้งยังมีการคาดการณ์ว่าจำนวนผู้สูงอายุ (อายุ 60 ปี ขึ้นไป) จะมีเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 30 ของประชากรในประเทศ และคาดว่าประเทศไทยจะเข้าสู่สังคมผู้สูงอายุในปี ค.ศ. 2021 (Haque 2016 ; Kanasi, Ayilavarapu et al. 2016 ; Christensen, Doblhammer et al. 2009)

การมีอายุที่เพิ่มมากขึ้นประกอบกับวัยที่ชราและความเกี่ยวข้องกับความเสี่ยงต่างๆ ของร่างกายเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้น หนึ่งในโรคที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ โรคความเสื่อมทางระบบประสาท (neurodegenerative diseases) เป็นหนึ่งในโรคสำคัญที่มีอัตราการเกิดเพิ่มสูงขึ้นควบคู่กับปริมาณผู้สูงอายุที่เพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีการสูญเสียหรือการตายของเซลล์ประสาทและนำมาสู่ภาวะสมองเสื่อม (dementia) ได้ ตัวอย่างของโรคที่เกิดจากภาวะนี้ได้แก่ Alzheimer's disease (AD) คิดเป็นร้อยละ 60-70 ของภาวะสมองเสื่อมทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีโรคอื่นๆ ได้แก่ Parkinson's disease (PD) Huntington's disease (HD) Multiple sclerosis (MS) และ Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) (Holtzman, Morris et al. 2011 ; Yacoubian 2017 ; Kumar, Singh et al. 2015) จากการศึกษาในปี 2019 พบว่ามีผู้ป่วยสมองเสื่อมทั่วโลกถึง 46.8 ล้านคน และมีการคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวในปี 2050 (Bhatt, Comas Herrera et al. 2019) สาเหตุการเกิดโรคสมองเสื่อมยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัด โดยมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้หลากหลาย ได้แก่ ปัจจัยด้านพันธุกรรม และปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม โดยปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่ง คือภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งสาเหตุอาจเกิดได้จากภายในและภายนอกร่างกาย สามารถสร้างความเสียหายให้กับส่วนต่างๆ ใน

เซลล์ของร่างกาย สูดหายใจส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด (Niedzielska, Smaga et al. 2016 ; Li, O et al. 2013)

โดยปกติแล้วเซลล์จะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระ Reactive Oxygen Species (ROS) โดยเฉพาะในส่วนของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จะมีกระบวนการสร้างพลังงาน ATP แต่ร่างกายนั้นมีการรักษาสมดุลโดยกระบวนการต้านอนุมูลอิสระด้วยระบบเอนไซม์ ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) และ thioredoxin reductase (TR) เป็นต้น และระบบที่ไม่ใช่เอนไซม์ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และกลูตาไทโอน เป็นต้น (Li, O et al. 2013, Cui et al. 2015) เมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นระบบในการรักษาสมดุลต่างๆ เหล่านี้มักเสื่อมถอยลงไป ทำให้ร่างกายสูญเสียสมดุลในการรักษาระดับของ ROS จึงเกิดการสะสมภายในเซลล์อย่างต่อเนื่องจนทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ดังนั้น ROS ที่เพิ่มสูงขึ้นสามารถเข้าไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลภายในเซลล์ ได้แก่ ไขมัน โปรตีน และหน่วยพันธุกรรม ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ หนึ่งในออร์แกเนลล์ที่สำคัญซึ่งได้รับความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative damage) เป็นบริเวณแรกๆ คือ ไมโทคอนเดรีย รวมไปถึง หน่วยพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า ดีเอ็นเอ (DNA) ซึ่งถูกออกซิไดซ์เกิดเป็น DNA lesion ส่งผลให้สารพันธุกรรมมีความผิดปกติและเป็นสาเหตุของการตายของเซลล์ (Cui et al. 2015 ; Kim, Kim et al. 2015)

กลูตาเมต เป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ excitatory มีบทบาทสำคัญในการทำงานของสมอง ระดับกลูตาเมตที่เหมาะสมนั้น กลูตาเมตจะมีส่วนช่วยในการควบคุมกลไกต่างๆ ภายในสมองเช่น ความจำ การเรียนรู้ อารมณ์ เป็นต้น แต่หากมีระดับกลูตาเมตในสมองมากเกินไปก็เป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ประสาท หรือเซลล์ประสาทเกิดการตายได้เช่นกัน โดยสามารถกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระจนเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ผ่าน 2 กลไก คือ 1) ผ่านกลูตาเมต receptor และ 2) ผ่าน cysteine glutamate antiporter โดยกลไกที่



ไม่ผ่าน receptor สามารถเกิดขึ้นได้มากกว่าเพราะสามารถเกิดได้กับเซลล์ประสาททุกชนิดทั้งที่มี receptor และไม่มี receptor (Liu, Chang et al. 2019) มีการศึกษาพบว่า การมีระดับกลูตาเมตสูงในเซลล์ประสาทมีความเกี่ยวข้องกับโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทเช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน และโรคฮันติงตัน โดยมีการศึกษาพบว่าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่มีกลูตาเมตสูงมีการสะสมของโปรตีน tau และ  $A\beta$  มากขึ้น (Kritis, Stamoula et al. 2015)

กระบวนการออโตฟาจีเป็นกระบวนการที่มีส่วนสำคัญในการเจริญเติบโตของเซลล์โดยมีหน้าที่ในการย่อยสลายส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ที่เกิดความเสียหายโดยสร้างเยื่อหุ้มมาปิดล้อมแล้วขนส่งไปทำลายที่ lysosome และหมუნเวียนสารอาหารต่างๆ แต่การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการออโตฟาจีมากเกินไปเช่น การมีปริมาณ ROS สูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง เป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ เพราะว่าเซลล์นั้นไม่สามารถควบคุมระดับการเกิดกระบวนการออโตฟาจีให้อยู่ในระดับที่สมดุลหรือเหมาะสมได้ เราเรียกกระบวนการนี้ว่า “autophagy-mediated autophagic cell death” ซึ่งหากเกิดในเซลล์ประสาทจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทมากขึ้นนำไปสู่ภาวะโรคสมองเสื่อมได้ในที่สุด โดยมีการศึกษาพบว่า การตายของเซลล์ประสาทผ่านกลไกออโตฟาจีเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทโดยการตายของเซลล์ผ่านกลไกนี้มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์ในลักษณะอื่นเช่น apoptosis และ necrosis เป็นต้น (Button, Luo et al. 2015 ; Bialik, Dasari et al. 2018) ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อหาสารต้านอนุมูลอิสระโดยเฉพาะสารธรรมชาติเช่นสารออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรไทยต่างๆ เป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะช่วยส่งเสริมให้ผู้สูงอายุหันมารับประทานสมุนไพรไทยให้มากขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาทซึ่งสามารถชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ผ่านวิถีออโตฟาจี จนอาจนำไปสู่โรคความเสื่อมทางสมองต่างๆ (Dong, Wang et al. 2009 ; Khadrawy Ya 2014 ; Button, Luo et al. 2015)

รางจืด หรือ ว่านรางจืด (*Thunbergia laurifolia*) จัดอยู่ในวงศ์เหงือกปลาหมอ (*Acanthaceae*) เป็นสมุนไพรไทยมีลักษณะเป็นเถาโดยใบของรางจืดนิยมรับประทานในรูปแบบของชาสมุนไพร ใบสด เปลือก และราก มีสรรพคุณในการถอนพิษ เช่น ยาฆ่าแมลง แอลกอฮอล์ และพิษจากสารเคมี มีการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการต้านการอักเสบ ต้านแบคทีเรีย และ ต้านอนุมูลอิสระ (Junsi and Siripongvutikorn 2016) แต่ยังมีการศึกษาในเซลล์ประสาทที่ค่อนข้างน้อย

ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำสารสกัดจากรางจืดซึ่งเป็นสมุนไพรที่พบมากในประเทศไทย และนิยมรับประทานในรูปแบบของใบชาอบแห้ง มาศึกษาฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตโดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระในการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันที่จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ประสาทซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีอโตฟาจี โดยมีการศึกษาก่อนหน้าพบว่าสารสกัดจากรางจืดมีสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด หากสมุนไพรดังกล่าวสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมตได้ จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำสารจากธรรมชาติดังเช่นใบรางจืด มาใช้ในการป้องกันหรือบรรเทาอาการและ/หรือรักษาผู้ป่วยโรคสมองเสื่อมอย่างมีประสิทธิภาพได้ในอนาคต

## 1.2 คำถามในงานวิจัย

- 1). สารสกัดใบรางจืด สามารถปกป้องภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมต ในการทดสอบด้วยเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ได้หรือไม่
- 2). สารสกัดใบรางจืด สามารถลดการเกิดกระบวนการอโตฟาจี ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ได้หรือไม่

### 1.3 สมมติฐานในงานวิจัย

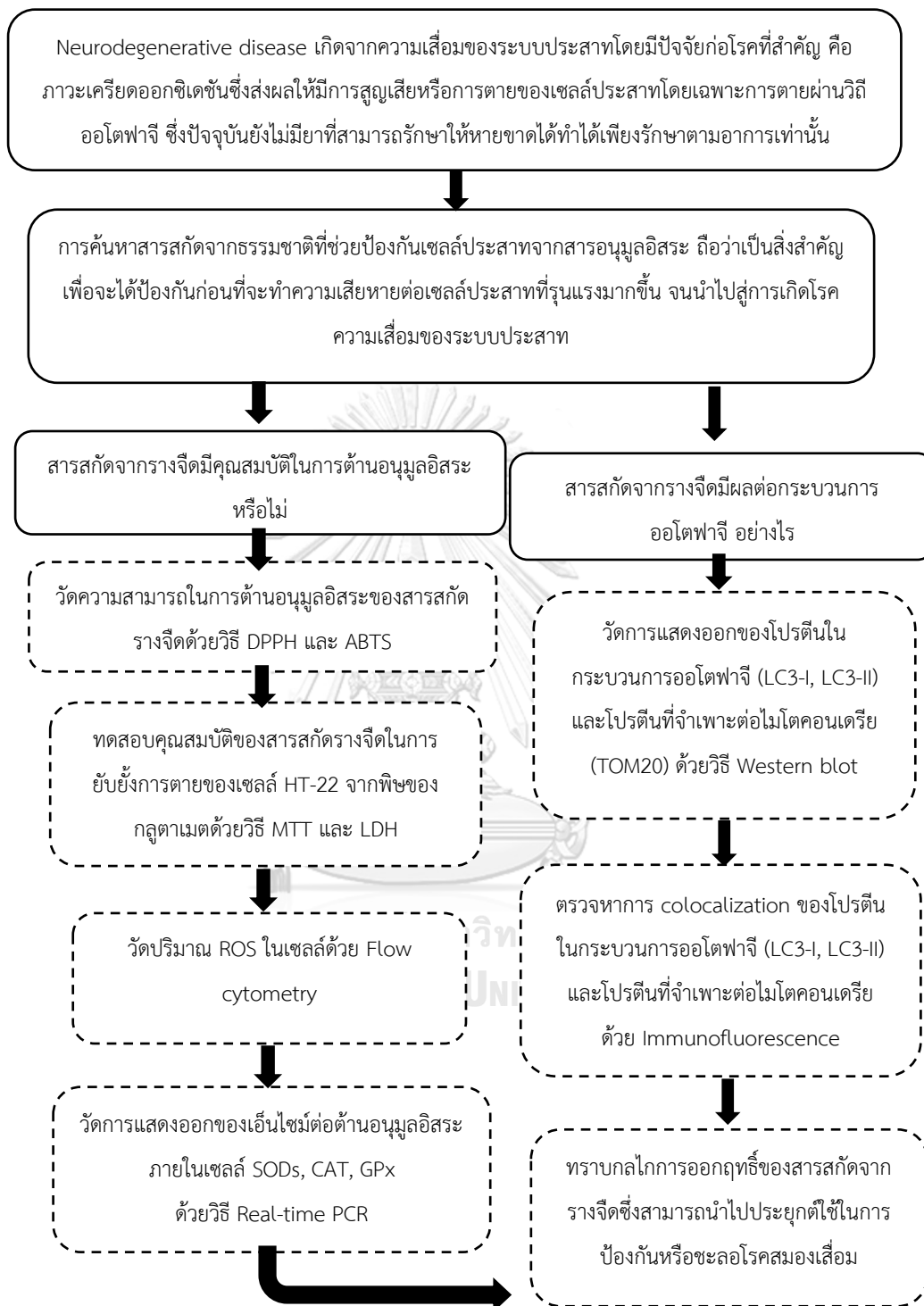
สารสกัดใบรางจืดน่าจะลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน และลดกระบวนการเกิดอโตฟาจี ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ทำให้เซลล์ประสาทดังกล่าวมีชีวิตอยู่รอด

### 1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1). เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืด ต่อการต้านภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22
- 2). เพื่อศึกษาผลของสารสกัดใบรางจืดต่อการลดการเกิดกระบวนการอโตฟาจี ภายในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22



### 1.5 กรอบแนวความคิดงานวิจัย



## บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม

### 2.1 โรคความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative diseases)

โรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาทมีลักษณะสำคัญคือ มีปริมาณเซลล์ประสาทลดลง อันเนื่องมาจากการสูญเสียหรือการตายของเซลล์ประสาททำให้ผู้ป่วยเกิดปัญหาเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวร่างกาย (ataxias) หรือมีภาวะสมองเสื่อม (dementia) ซึ่งภาวะสมองเสื่อมนี้นับเป็นกลุ่มของโรคที่มีความสำคัญที่สุดตัวอย่างของโรคที่เกิดจากภาวะนี้ ได้แก่ Alzheimer's disease (AD) คิดเป็นร้อยละ 60-70 ของภาวะสมองเสื่อมทั้งหมด นอกจากนี้ยังมีโรคอื่นได้แก่ Parkinson's disease (PD) และ Huntington's disease (HD) อาการของโรค AD คือ เกิดความผิดปกติด้านความจำ โดยระยะแรกของโรคผู้ป่วยจะสูญเสียความทรงจำระยะสั้น นอกจากนี้ยังนำมาซึ่งอาการอื่นๆ เช่น อาการสับสน เกิดภาพหลอน เสียความสามารถทางภาษา เสียความทรงจำระยะยาว ชัก กล้ามเนื้อทำงานผิดปกติ และนำไปสู่การเสียชีวิตในที่สุด (Yacoubian 2017 ; Hippus and Neundörfer 2003 ; Kumar, Singh et al. 2015)

สาเหตุการเกิดโรค AD ยังไม่เป็นที่แน่ชัดและมีปัจจัยเกี่ยวข้องหลายปัจจัยทั้งปัจจัยด้านพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งคือภาวะเครียดออกซิเดชัน และการอักเสบของเซลล์ประสาท ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด นอกจากนี้ยังมีโรคอื่นๆ ได้แก่ PD ผู้ป่วยมักมีอาการสั่น และเคลื่อนไหวได้ช้า เกิดจากการสูญเสีย dopaminergic neuron ที่บริเวณของ substantia nigra และการมี protein aggregate มากในสมองทำให้สูญเสียความสามารถในการควบคุมการประสานงานของกล้ามเนื้อ และสูญเสียการควบคุมสมดุลไป สาเหตุหลักอย่างหนึ่งคือ การที่สารอนุมูลอิสระเข้าไปทำลาย dopaminergic neuron อีกโรคที่สำคัญคือ HD เป็นโรคทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความเสื่อมของระบบประสาท ทำให้การควบคุมการประสานงานของกล้ามเนื้อ

ผิดปกติ และทำให้สติปัญญาเสื่อมถอย ผู้ป่วยมักมีการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติเรียกว่าโคเรีย (Holtzman, Morris et al. 2011 ; Yacoubian 2017)

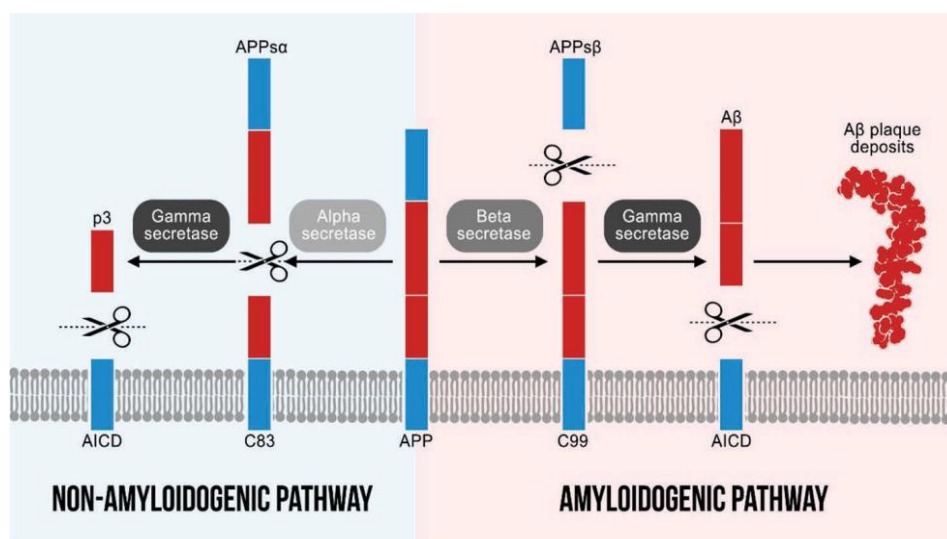
ปัจจุบันจากการศึกษาพบว่าผู้ป่วยสมองเสื่อมทั่วโลกถึง 46.8 ล้านคนและมีการคาดการณ์ว่าจะเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวในปี 2050 และที่สำคัญโรคสมองเสื่อมมักเกิดกับผู้สูงอายุ มีการศึกษาพบว่าผู้ป่วยอัลไซเมอร์ในสหรัฐอเมริกาส่วนใหญ่มีอายุ 75 – 84 ปีคิดเป็นร้อยละ 44 และช่วงอายุ 85 ปีขึ้นไปคิดเป็นร้อยละ 38 โรคสมองเสื่อมในปัจจุบันยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ โดยการรักษาในปัจจุบันจะเป็นการรักษาตามอาการเท่านั้น (Bhatt, Comas Herrera et al. 2019)

สาเหตุสำคัญที่ทำให้เซลล์สมองถูกทำลายมีหลายประการได้แก่ oxidative stress, mitochondrial dysfunction, autophagic/lysosomal dysfunction, protein aggregation และ neuroinflammation (Cui, Kong et al. 2012 ; Kim, Kim et al. 2015)

### 1). Oxidative stress

Oxidative stress หรือ ภาวะเครียดออกซิเดชันนั้น ถือเป็นสาเหตุหลักของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทเมื่อเกิดความไม่สมดุลของสารอนุมูลอิสระ สารอนุมูลอิสระมักสะสมและสร้างความเสียหายให้กับเซลล์ประสาทได้ เนื่องจากสารอนุมูลอิสระมีความสามารถในการผ่านเข้าสู่เซลล์และเยื่อหุ้มนิวเคลียสเข้าไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลภายในเซลล์ จากการศึกษาพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันมีความเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ โดยสารอนุมูลอิสระเป็นสาเหตุของการสะสมของโปรตีนที่ผิดปกติโดยเฉพาะ amyloid beta ( $A\beta$ ) และ tau protein ในส่วนของ  $A\beta$  พบว่าการสะสมของ  $A\beta$  เพิ่มขึ้นในหนูที่มีความบกพร่องของกลไกการป้องกันอนุมูลอิสระ โดยมีการสันนิษฐานว่าสารอนุมูลอิสระไปลดการทำงานของเอ็นไซม์  $\alpha$ -secretase ที่ทำให้ไม่เกิดการสะสมของ  $A\beta$  โดยมีหน้าที่ตัด Amyloid precursor protein (APP) และไปเพิ่มการทำงานของ  $\beta$  และ  $\gamma$ -

secretase ทำให้เกิดการสะสมของ  $A\beta$  (Chen, Liu et al. 2016) และนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทในที่สุดดังแสดงในรูปที่ 1 ส่วน tau protein พบว่า ROS มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ tau protein (hyperphosphorylated tau) (Liu, Li et al. 2015)



รูปที่ 1 การทำงานของเอ็นไซม์ secretase  
(Sasmita 2019)

## 2). Mitochondria dysfunction

ไมโทคอนเดรีย จัดเป็นบริเวณที่มีโอกาสเกิดความเสียหายได้มากที่สุดเพราะมีการสร้าง ROS เกิดขึ้นตลอดเวลาระหว่างกระบวนการสังเคราะห์พลังงาน โดยพบว่า mtDNA ซึ่งมีหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์พลังงานหลายชนิด มีโอกาสเกิดความเสียหายจาก oxidative damage ได้มากกว่า nuclear DNA เมื่อไมโทคอนเดรียเกิดการกลายพันธุ์ทำให้กระบวนการสร้างพลังงานในเซลล์เกิดความผิดปกติ เกิดการสะสมของ ROS และส่งผลให้เกิดความผิดปกติและ/หรือการตายของเซลล์ในที่สุด มีการศึกษาพบว่าความผิดปกติของไมโทคอนเดรียมีความเกี่ยวข้องกับโรคความเสื่อมของระบบประสาท เช่น ไนโรอัลไซเมอร์ความผิดปกติของไมโทคอนเดรียทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมในสมองลดลง และมีส่วนสำคัญในการสะสมของ  $A\beta$  (Mutisya,

Bowling et al. 1995 ; Flynn and Melov 2013 ; Akbar, Essa et al. 2016 ; Weidling and Swerdlow 2019)

### 3). *Autophagic/lysosomal dysfunction*

กระบวนการออโตฟาจี เป็นกระบวนการรักษาสสมดุลของเซลล์โดยการที่เซลล์ย่อยสลายโปรตีนและออร์แกเนลล์ต่างๆ ที่เกิดความเสียหาย การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและการสะสมของ ROS เป็นหนึ่งสาเหตุให้เกิดกระบวนการออโตฟาจีเพิ่มมากขึ้น โดยมีการศึกษาพบว่าในโรคความเสื่อมของระบบประสาท (AD, PD, HD) มีกระบวนการออโตฟาจีเพิ่มมากขึ้นโดยสันนิษฐานว่าการเกิดออโตฟาจีที่มากเกินไปเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ (Rubinsztein, DiFiglia et al. 2005 ; Cherra and Chu 2008)

### 4). *Protein aggregation*

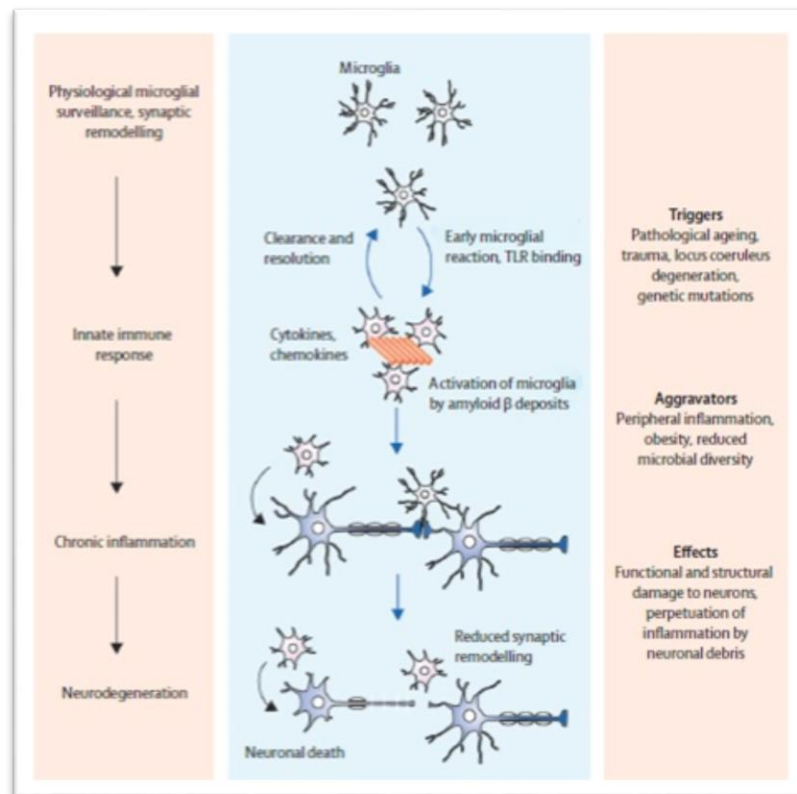
การสะสมของโปรตีนผิดปกติ misfold protein เป็นหนึ่งในลักษณะสำคัญของโรคความเสื่อมของระบบประสาท สำหรับโรคอัลไซเมอร์ ความผิดปกติทางสมองที่สำคัญเกิดจากการสะสมของ A $\beta$  และการสะสมของ tau protein โดย A $\beta$  เกิดจากการที่ amyloid precursor protein (APP) ถูกตัดเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ขนาด 39-43 กรดอะมิโน และเกิดการสะสมเป็น senile plaques (Gabuzda, Busciglio et al. 1994 ; Ghiso and Frangione 2001 ; Apelt, Bigl et al. 2004 ; Priller, Bauer et al. 2006) ส่วน tau protein เป็น microtubule associated protein (MAPs) มีทั้งหมด 6 isoform มักพบมากบริเวณ axon ของเซลล์ประสาทซึ่ง tau protein จะจับอยู่กับ microtubule มีหน้าที่สำคัญในการช่วยรักษาโครงสร้างของ microtubule และมีหน้าที่ช่วยในการรวมตัวของ microtubule โดยทั่วไปแล้วการทำงานของ tau protein จะถูกควบคุมโดยการเติมฟอสเฟตซึ่ง tau protein ปกติจะมีการเติมฟอสเฟต 2-3 ฟอสเฟต/โมล แต่ในผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะพบการเติมฟอสเฟตมากกว่าปกติ 3-4 เท่า การสะสมของ tau protein ที่ถูกเติมฟอสเฟตมากกว่าปกติ



เกิดเป็น neurofibrillary tangles ทำให้ tau protein ไม่สามารถรักษาโครงสร้างของ microtubule ได้อีกดังนั้นเซลล์ประสาทจึงหดสั้นลงและตายในที่สุด (Harada, Oguchi et al. 1994 ; Huang and Jiang 2009 ; Iqbal, Alonso Adel et al. 2005)

#### 5). Neuroinflammation

กระบวนการอักเสบนับเป็นอีกหนึ่งสาเหตุของโรคความเสื่อมของระบบประสาทโดยโปรตีนผิดปกติ misfold protein มักไปจับกับ receptor ของไมโครเกลียและแอสโตรเกลีย (Olabarria, Noristani et al. 2010) กระตุ้น การหลั่งของ inflammatory mediators เช่น cytokines chemokines และ caspase เป็นต้น ดังแสดงในรูปที่ 2 ในโรคอัลไซเมอร์พบว่าการอักเสบของเซลล์ประสาทส่งผลให้เกิดการสะสมของ  $A\beta$  และ tau protein เพิ่มมากขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น  $A\beta$  ที่เพิ่มสูงขึ้นจะถูกไมโครเกลียเข้าไปจับที่ receptors เช่น CD36 TLR4 และ TLR6 ส่งผลให้เกิดการหลั่ง cytokines และ chemokines ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มขึ้นอีกด้วย (Paresce, Ghosh et al. 1996 ; Bamberger, Harris et al. 2003 ; Liu, Walter et al. 2005 ; Stewart, Stuart et al. 2010)



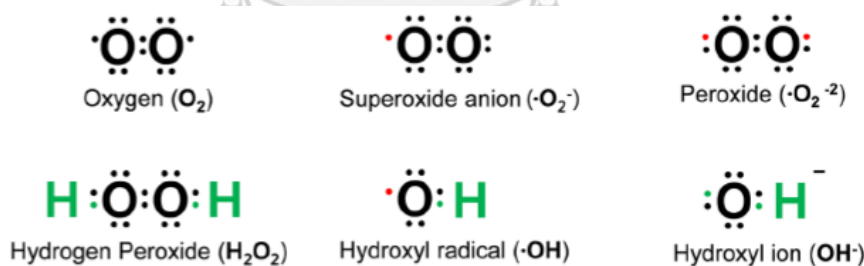
รูปที่ 2 ผลของกระบวนการอักเสบต่อความผิดปกติของเซลล์ประสาท  
(Heneka, Carson et al. 2015)

## 2.2 กลไกการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress mechanism)

ภาวะเครียดออกซิเดชัน คือภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลกันระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเฉพาะการมี Reactive oxygen species (ROS) มากเกินไป โดย ROS ประกอบไปด้วย superoxide anion ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\bullet OH$ ), hydroxyl ion ( $OH^-$ ) และ non-radical hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) จัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมีสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับ DNA ทำให้เกิดความผิดปกติหลายตำแหน่งโดยไป oxidized ตำแหน่ง DNA base, abasic site และเกิด DNA strand break ได้ ส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางพันธุกรรม และเป็นสาเหตุของโรคต่างๆ ได้ ROS สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนและไขมันได้ทำให้โมเลกุลเหล่านี้เกิดการเสียสภาพขึ้น ROS มักเกิดจากกระบวนการ mitochondria respiration โดย ROS ที่

เกิดขึ้นจากไมโทคอนเดรียที่มักเกิดระหว่างการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) โดยอิเล็กตรอนที่หลุดมาจะเข้ามารวมกับออกซิเจนเกิดเป็น superoxide anion ( $O_2^-$ ) จากนั้น  $O_2^-$  สามารถไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆเกิดเป็นสารอนุมูลอิสระอื่นๆ ได้เช่น hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) ไมโทคอนเดรียจึงถือเป็นเป้าหมายแรกๆที่เกิดความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน นอกจากนี้ ROS จะ เกิดระหว่างกระบวนการหายใจระดับเซลล์แล้ว ROS ยังสามารถถูกกระตุ้นให้มีการสร้างเพิ่มขึ้นโดยตอบสนอง ต่อตัวกระตุ้นต่างๆ เช่น growth factor, inflammatory cytokines, ionizing radiation, UV, chemical, toxin เป็นต้น (Cui, Kong et al. 2012 ; Li, O et al. 2013 ; Niedzielska, Smaga et al. 2016)

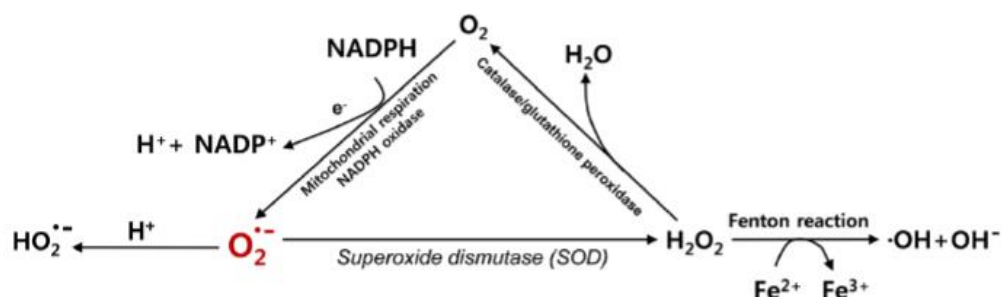
แต่ทั้งนี้ในร่างกายของเรานั้นก็มีกลไกในการป้องกันสารอนุมูลอิสระ เช่น กระบวนการซ่อมแซม DNA หรือการต่อต้านด้วยเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GPx) เพื่อเปลี่ยน ROS ให้เป็นรูปแบบที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์



รูปที่ 3 ชนิดของ ROS ประเภทต่างๆ

(Kim, Kim et al. 2015)

เมื่ออิเล็กตรอนทำปฏิกิริยากับออกซิเจนจึงเกิดเป็น ROS หลายชนิดได้แก่ superoxide ( $O_2^-$ ), hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), hydroxyl ion ( $OH^-$ ) และ hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) โดยจุดสีแดงจะแสดงถึงอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 4 กลไกการเกิด ROS ภายในเซลล์

(Kim, Kim et al. 2015)

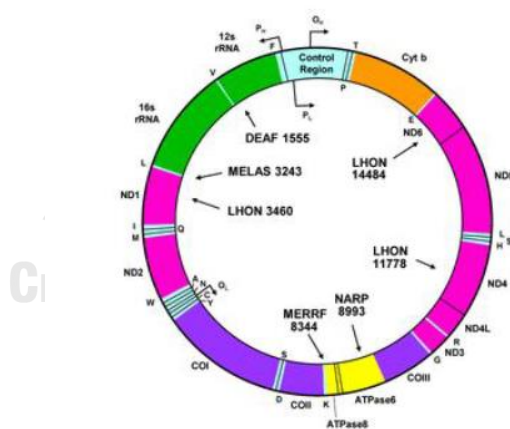
การเกิด ROS ชนิด  $O_2^{\cdot-}$  เกิดจาก  $O_2$  ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จาก respiratory chain complex ในไมโทคอนเดรียหรือเกิดได้จากกระบวนการ NADPH oxidase หลังจากนั้น  $O_2^{\cdot-}$  จะถูกเอนไซม์ SOD เปลี่ยน  $O_2^{\cdot-}$  ไปเป็น  $H_2O_2$  ซึ่งสามารถเปลี่ยนไปเป็น ROS ชนิดอื่นๆ ได้อีก เช่น  $\cdot OH$  และ  $OH^-$  ดังแสดงในรูปที่ 4

### 2.3 ไมโทคอนเดรียและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Mitochondria and oxidative stress)

มีการศึกษาพบว่าความผิดปกติของไมโทคอนเดรียเป็นสาเหตุของการเกิดโรคมามากมาย รวมไปถึงโรคความเสื่อมของระบบประสาท เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญในการเกิด ROS ไมโทคอนเดรียจึงเป็นบริเวณแรกๆ ที่จะเกิดความเสียหาย โดยเฉพาะ mitochondria DNA (mtDNA) ซึ่งมีบทบาทหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์ส่วนประกอบสำคัญในกระบวนการสร้างพลังงานและการเกิด oxidative phosphorylation มีการศึกษาพบว่า mtDNA ถูกทำลายโดยสารอนุมูลอิสระมากกว่าใน nuclear DNA โดยวัดจากลักษณะของความผิดปกติที่พบบ่อย คือ การเกิด oxidation ที่บริเวณ 8-oxo-dG ซึ่งเป็นตำแหน่งของลำดับเบส guanine (Leon, Sakumi et al. 2016) จากที่กล่าวมาข้างต้นการที่ mtDNA ถูกทำลายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ทำให้กระบวนการ respiratory chain ไม่สมบูรณ์เกิดการสะสมของ ROS และยังส่งผลให้ภายในเซลล์มีพลังงานไม่เพียงพอต่อการอยู่รอด เซลล์จึงตายในที่สุด

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้มสองชั้นมีส่วนสำคัญในกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ ได้แก่ การสังเคราะห์พลังงาน ATP ผ่านกระบวนการ oxidative phosphorylation การส่งสัญญาณด้วยแคลเซียม และการสร้าง ROS การขนส่งโปรตีนเข้าและออกจากไมโทคอนเดรียจะขนส่งผ่านกลุ่มโปรตีนที่เรียกว่า TOM-TIM supercomplexes โดยโปรตีน TOM จะอยู่ในส่วนของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นนอก ส่วนโปรตีน TIM จะอยู่บนเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียชั้นใน (Kuhlbrandt 2015)

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มี DNA เป็นของตัวเองเรียกว่า mitochondrial DNA หรือ mtDNA ดังที่ได้กล่าวข้างต้น โดย mtDNA มีความยาว 16,500 คู่เบส และมียีนทั้งหมด 37 ยีน ซึ่งมีความสำคัญกับการทำงานของไมโทคอนเดรีย มียีนถึง 13 ยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างเอ็นไซม์ซึ่งใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation ส่วนที่เหลือจะเกี่ยวข้องกับการสร้าง transfer RNA (tRNA) และ ribosomal RNA (rRNA) (Fox 2012 ; Anne Stetler, Leak et al. 2013)

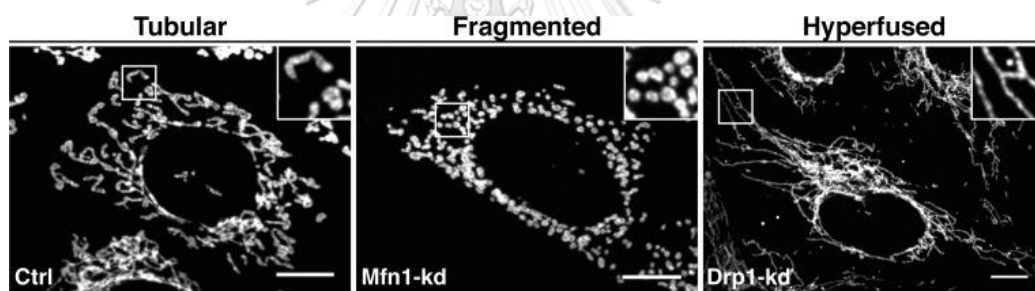


รูปที่ 5 แผนที่จีโนมของไมโทคอนเดรีย

(Chromosome and mtDNA: U.S National Library of Medicine. Available from:

<https://ghr.nlm.nih.gov/mitochondrial-dna>. accessed on Jan 10, 2018 )

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาผ่านกระบวนการ fission และ fusion โดย กระบวนการ fission เป็นการแบ่งตัวไมโทคอนเดรียจากหนึ่งเป็นสอง ส่วน กระบวนการ fusion เป็นการรวมกันของไมโทคอนเดรียจากสองเป็นหนึ่ง ปกติแล้วไมโทคอนเดรียจะมีลักษณะเป็นร่างเชื่อมต่อกัน (tubular network) แต่หากกระบวนการ fission และ fusion เกิด ความผิดปกติไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยนเป็นรูปร่างกลมและแยกออกจากกัน (fragmented network) หรือมีลักษณะเป็นเส้นใย (hyperfused network) แสดงดังรูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ ไมโทคอนเดรียแสดงถึงความผิดปกติต่างๆ ภายในเซลล์ได้ โดยจะตอบสนองต่อสารอาหารและ กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ โปรตีนที่สำคัญในกระบวนการ fission และ fusion ได้แก่ Mitofusin1 Mitofusin2 และ OPA1 (Tilokani, Nagashima et al. 2018)

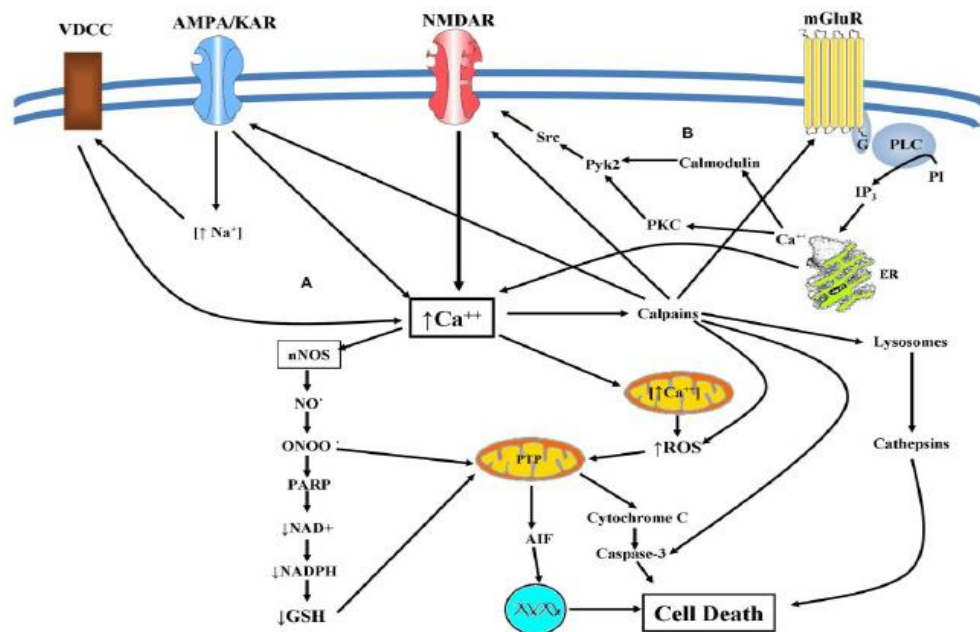


รูปที่ 6 รูปแบบต่างๆ ของไมโทคอนเดรีย  
(Tilokani, Nagashima et al. 2018)

#### 2.4 กลูตาเมตและภาวะเครียดออกซิเดชัน (Glutamate and oxidative stress)

กลูตาเมต เป็นหนึ่งในสารสื่อประสาทที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ excitatory มีบทบาทสำคัญในการทำงานของสมอง ในภาวะปกติกลูตาเมตจะมีส่วนช่วยในการควบคุมกลไกต่างๆ ภายในสมอง เช่น ความจำ การเรียนรู้ อารมณ์ เป็นต้น แต่หากเกิดความผิดปกติส่งผลทำให้ระดับของกลูตาเมตในสมองมีมากเกินไป เป็นสาเหตุทำให้เกิดความเสียหายของเซลล์ประสาทหรือเซลล์ประสาทเกิดการตายได้ กลูตาเมตสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้สองแบบ คือ

กระตุ้นผ่าน receptor ทำให้เกิด excitotoxicity และ กระตุ้นโดยไม่ผ่าน receptor (Fukui, Song et al. 2009 ; Kumari, Mehta et al. 2012 ; Khadrawy Ya 2014 ; Van Laar, Roy et al. 2015)

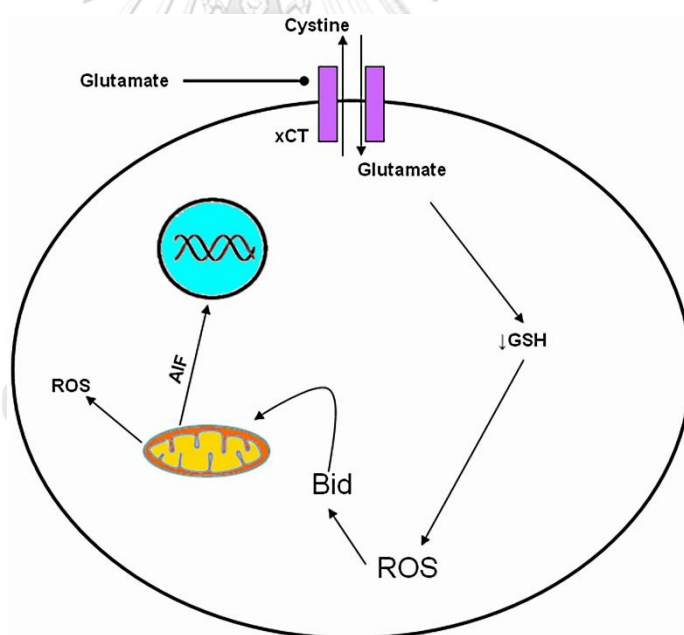


รูปที่ 7 กลไกการเกิด glutamate excitotoxicity ผ่าน glutamate receptor ชนิดต่างๆ

(Kritis, Stamoula et al. 2015)

กลูตาเมตเมื่อจับกับ receptor ทำให้แคลเซียมปริมาณมากไหลเข้าสู่เซลล์ ซึ่งปริมาณแคลเซียมที่มากมีผลต่อการสร้าง nitric oxide ( $\text{NO}^-$ ) ภายในเซลล์จนเกิดเป็นอนุมูลอิสระชนิด peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) เข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ได้ เช่น ไขมัน ทำให้เกิดกระบวนการ lipid peroxidation เข้าทำลาย DNA และทำให้เกิดความผิดปกติของโปรตีน นอกจากนี้แคลเซียมยังทำหน้าที่เป็น co-factor ให้กับเอนไซม์ต่างๆ เช่น calpains, cathepsin เมื่อมีปริมาณแคลเซียมในเซลล์สูงทำให้เอนไซม์เหล่านี้ทำงานมากเกินไป เอนไซม์เหล่านี้จึงเข้าไปทำลายเซลล์ต่างๆ ส่งผลให้เซลล์ประสาทตายได้ในที่สุด (Kritis, Stamoula et al. 2015)

สำหรับกลไกที่ไม่เกี่ยวข้องกับ receptor เรียกว่า oxidative glutamate toxicity เกิดจากการที่มีปริมาณกลูตาเมตภายนอกเซลล์สูงจึงไปยับยั้ง cysteine ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ผ่านช่องทาง cystine/glutamate antiporter system ส่งผลให้ cysteine ภายในเซลล์ลดลง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้าง glutathione ภายในเซลล์ จึงมีผลทำให้ glutathione ภายในเซลล์ลดลงตามมา ดังนั้นการที่ glutathione ซึ่งเป็นสาร primary antioxidant ที่สำคัญในเซลล์ลดลงจึงทำให้มีการสะสมของ ROS ภายในเซลล์มากขึ้น นำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจะเข้าทำปฏิกิริยากับส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ ทำให้เกิดความเสียหาย และนำมาซึ่งการตายของเซลล์ได้ในที่สุด (Khadrawy Ya 2014 ; Kritsis, Stamoula et al. 2015)

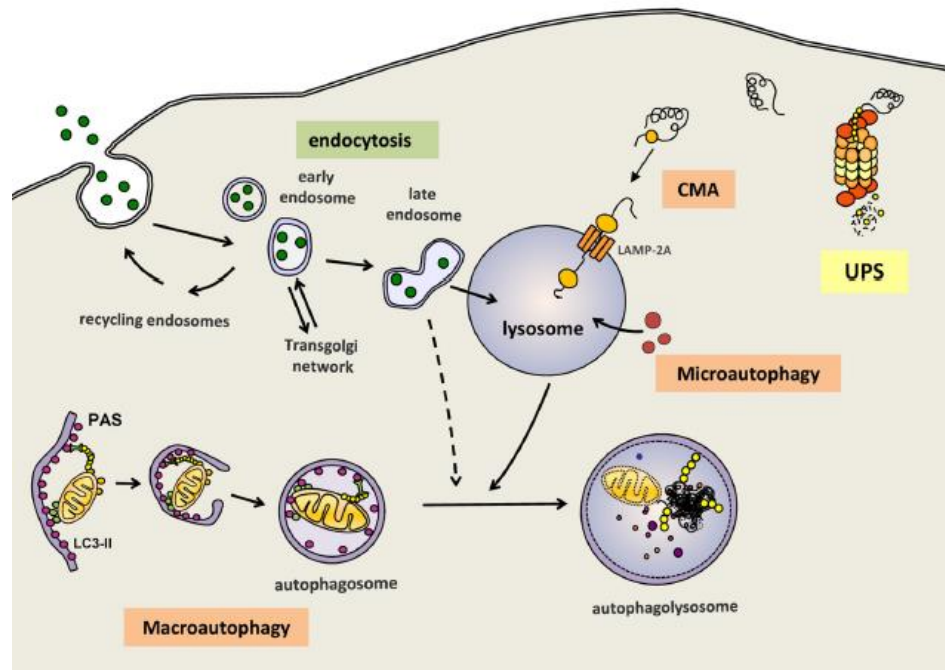


**รูปที่ 8** กลไกการเกิด ROS เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมตโดยไม่ผ่าน glutamate receptor (non-glutamate receptor) (Kritis, Stamoula et al. 2015)



## 2.5 กลไกการเกิดอโตฟาจี (Autophagy mechanism)

อโตฟาจี เป็นกระบวนการที่ใช้อยู่ส่วนต่างๆ ภายในเซลล์ที่เกิดความเสียหายโดยสร้างเยื่อหุ้มมาปิดล้อมแล้วขนส่งไปทำลายที่ lysosome และหมุนเวียนสารอาหารต่างๆ เช่น กรดอะมิโนกลับมาใช้ใหม่ แบ่งออกเป็น 3 ประเภทได้แก่ 1) chaperone mediated autophagy เกิดจาก chaperone hsc70 ไปจับกับโปรตีนอย่างจำเพาะหลังจากนั้นโปรตีนที่ถูกจับด้วย hsc70 จะถูกขนส่งไปทำลายที่ lysosome โดยผ่านการจับกับ lysosomal associated membrane protein (LAMP2A) 2) microautophagy เป็นการขนส่ง material ต่างๆ เช่น โปรตีน และไขมันเข้าไปทำลายผ่านการ invagination ของ lysosome 3) macroautophagy เป็นการขนส่ง material ต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมัน และออร์แกเนลล์เข้าไปทำลายโดยสร้างเยื่อหุ้มสองชั้นมาปิดล้อมเรียกว่า autophagosome แล้วขนส่งไปทำลายที่ lysosome เมื่อรวมกันแล้วเกิดเป็นคอมเพล็กซ์เรียกว่า autophagolysosome ซึ่งในบางครั้ง macroautophagy สามารถเกิดแบบ selective ได้โดยถูกจดจำผ่าน autophagic receptor เช่น selective degradation of mitochondria (mitophagy) (Kubli and Gustafsson 2012 ; Zhang 2013 ; Martinez-Vicente 2017)

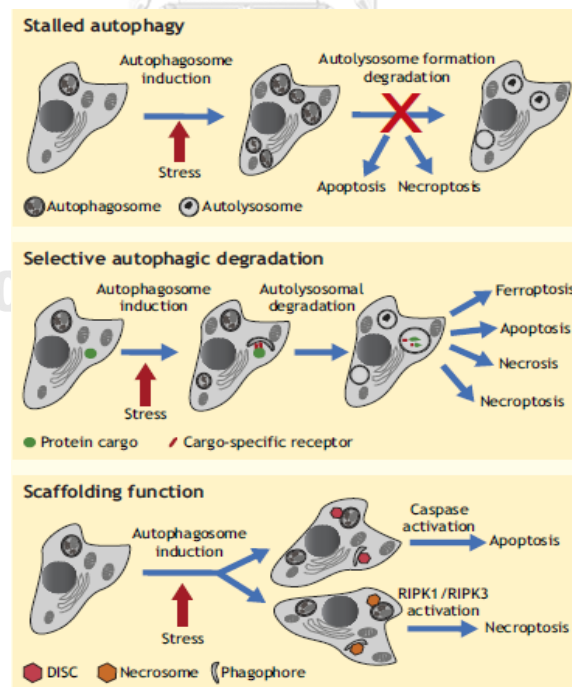


รูปที่ 9 กลไกการเกิด degradation ของออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยกระบวนการอโตฟาจี (Kubli and Gustafsson 2012)

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ากระบวนการอโตฟาจินั้น มีความสำคัญในการทำงานของเซลล์รวมถึงการรักษาสมดุลให้กับเซลล์ เช่น การตอบสนองต่อการบาดเจ็บหรือความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอโตฟาจีมากเกินไปเป็นสาเหตุหนึ่งทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ เพราะว่าเซลล์นั้นไม่สามารถควบคุมระดับการเกิดกระบวนการอโตฟาจีให้อยู่ในระดับที่สมดุลหรือเหมาะสมได้ เราเรียกกระบวนการนี้ว่า “autophagy-mediated autophagic cell death” ซึ่งหากเกิดในเซลล์ประสาทจะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทมากขึ้นนำไปสู่ภาวะโรคสมองเสื่อมได้ในที่สุด (Button, Luo et al. 2015)

## 2.6 การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจี (Cell death and autophagy pathway)

จากที่กล่าวมาข้างต้นเราทราบกันดีว่ากระบวนการอโตฟาจีเป็นกระบวนการที่มีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์โดยจะเข้าไปกำจัดโปรตีนที่ผิดปกติหรือออร์แกเนลล์ที่ได้รับความเสียหายซึ่งในเซลล์ทั่วไปจะมีการเกิดอโตฟาจีในปริมาณต่ำๆ แต่หากมีการกระตุ้นให้เซลล์เกิดความเครียดจากการขาดอาหาร ขาดพลังงาน จะส่งผลให้เกิดอโตฟาจีสูงขึ้นเพื่อที่จะนำส่วนประกอบของเซลล์ต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ และช่วยให้เซลล์มีชีวิตอยู่รอด จะเห็นได้ว่ากระบวนการอโตฟาจีมีส่วนสำคัญอย่างมากในการดำรงชีวิตและการรักษาสมดุลให้กับเซลล์ อย่างไรก็ตาม กระบวนการอโตฟาจี จัดว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้เช่นกัน โดยเรียกการตายแบบนี้ว่า การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจี (autophagy-dependent cell death; ADCD) ซึ่งมีความสัมพันธ์และเกี่ยวข้องกับวิถีอื่นๆ แสดงดังรูปที่ 10 โดยมีรายละเอียดดังนี้ (Bialik, Dasari et al. 2018)



รูปที่ 10 การตายของเซลล์ที่มีความเกี่ยวข้องกับวิถีอื่นๆ

(Bialik, Dasari et al. 2018)

### 1). Stalled autophagy

เป็นการตายแบบผ่านการควบคุม ในบางครั้งกระบวนการออโตฟาจีนั้นไม่ได้กำจัดเซลล์โดยตรง แต่จะไปกระตุ้นลักษณะการตายของเซลล์ชนิดอื่นๆ เช่น การเกิดการตายแบบ necroptosis และ apoptosis เรียกว่า stalled autophagy การตายของเซลล์ลักษณะนี้มักเกิดขึ้นหลังจากที่กระบวนการออโตฟาจีถูกกระตุ้นเป็นปริมาณมากแต่เกิดความผิดปกติในขั้นตอนการรวมกันของออโตฟาโกโซมกับไลโซโซมเป็นออโตไลโซโซม ทำให้เกิดการเปลี่ยนรูปแบบการตายของเซลล์เป็นแบบ necroptosis และ apoptosis (Degtyarev, Mazière et al. 2008 ; Gonzalez, Mader et al. 2012)

### 2). Selective autophagic degradation

เป็นการย่อยสลายโปรตีนอย่างจำเพาะโดยจับกับ cargo specific receptor ทำให้เกิดการกำจัดโปรตีนแบบจำเพาะ เช่น ในกระบวนการ ferroptosis apoptosis necroptosis และ necrosis เป็นต้น (Gao, Monian et al. 2016 ; He et al. 2018)

### 3). Scaffolding function

กระบวนการออโตฟาจีทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้โดยไม่ต้องผ่านการทำงานของไลโซโซม ฟาโกพอร์ หรือ ออโตฟาโกโซม โดยเมมเบรนจะทำหน้าที่เป็นตัวก่อให้เกิดโครงสร้างที่กระตุ้นการตายของเซลล์ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นของ caspase-8 และ intracellular death-inducing signaling complex (DISC) ทำให้เกิดการตายแบบ apoptosis ส่วนการตายของเซลล์อีกรูปแบบหนึ่ง คือ การกระตุ้นให้เกิดการสะสมของ Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1 (RIPK1) และ Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 3 (RIPK3) ซึ่งมีส่วนสำคัญในการสร้าง necrosome ในการตายของเซลล์แบบ necroptosis (Basit, Cristofanon et al. 2013)

การตายของเซลล์โดยผ่านวิถีการออโตฟาจินั้น เกิดได้หลายสาเหตุโดยแบ่งออกเป็น 3 แบบ (รูปที่ 11)

### 1). *Excessive bulk degradation*

เมื่อเซลล์เกิดกระบวนการออโตฟาจิมากกว่าปกติ จากการถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น ความเครียด ทำให้เกิดการสร้างออโตฟาโกโซมมาเรื่อยๆ สลายออร์แกเนลล์ต่างๆ โดยขาดการควบคุมและทำให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด การตายในลักษณะนี้จะสังเกตเห็น perinuclear space มีการพุดขึ้นและมีออโตฟาโกโซมเกิดขึ้นปริมาณมาก มีลักษณะเป็น vacuole ที่บริเวณไซโตพลาสซึม

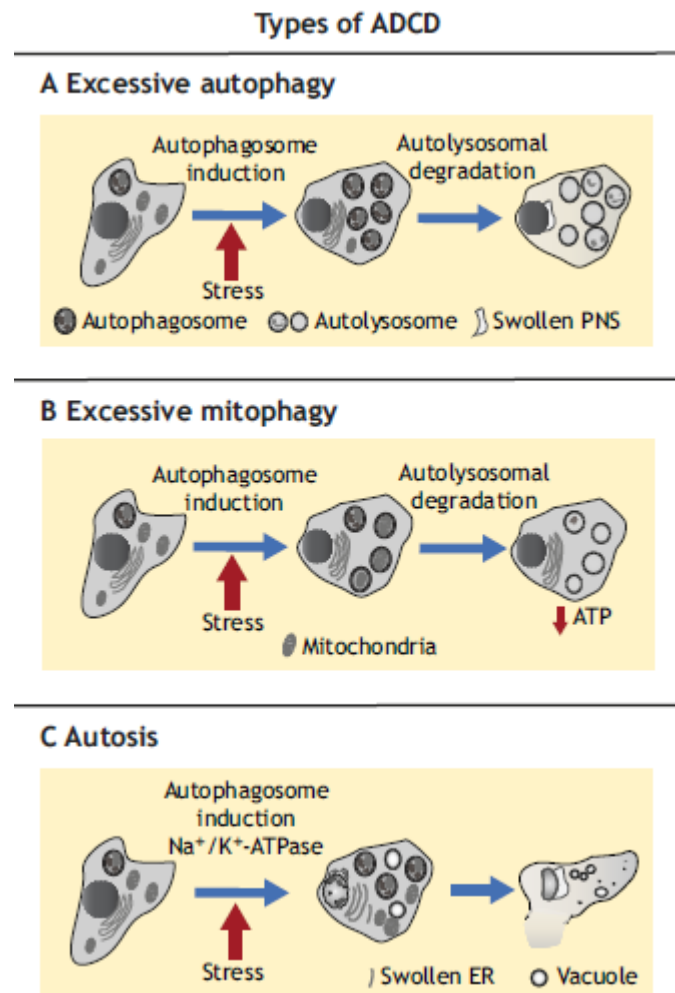
### 2). *Excessive mitophagy*

กระบวนการไมโทฟาจิ จัดเป็นการเกิดออโตฟาจิชนิดหนึ่งที่มีความจำเพาะกับไมโทคอนเดรีย เมื่อไมโทคอนเดรียถูกกำจัดไปเป็นปริมาณมากโดยเฉพาะไมโทคอนเดรียที่เมมเบรนเสียหาย ทำให้เซลล์ขาดแหล่งพลังงานและตายได้ ลักษณะสำคัญของไมโทฟาจิ คือ การแสดงออกของตัวบ่งชี้ออโตฟาจิร่วมกับไมโทคอนเดรีย นอกจากนี้ยังมีโปรตีนอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Small mitochondria Arf (smArf) มีการศึกษาพบว่า การแสดงออกของ smArf ที่เพิ่มขึ้นทำให้ไมโทคอนเดรียสูญเสียความต่างศักย์ของเมมเบรน นำไปสู่การตายของเซลล์ผ่านวิถีออโตฟาจิในที่สุด (Budina, Hontz et al. 2013 ; Reef, Zalckvar et al. 2006)

### 3). *Autosis*

กระบวนการออโตซิสจะแตกต่างกับการตายของเซลล์ผ่านวิถีออโตฟาจิชนิดอื่นๆ มักพบได้ในเซลล์ที่มีการขาดสารอาหาร โดยมีลักษณะคล้ายกันในบางอย่างเท่านั้น ในช่วงเริ่มต้นของออโตซิสเราจะสังเกตเห็นการสะสมของออโตฟาโกโซมและออโตไลโซโซม รวมไปถึงลักษณะผิดปกติต่างๆ เช่น perinuclear space มีการพุดขึ้น ไมโทคอนเดรียเสียหาย เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัมแตกออกเป็นชิ้นๆ การตายของเซลล์แบบนี้จะขึ้นอยู่กับการทำงานของ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase pump ซึ่งมี

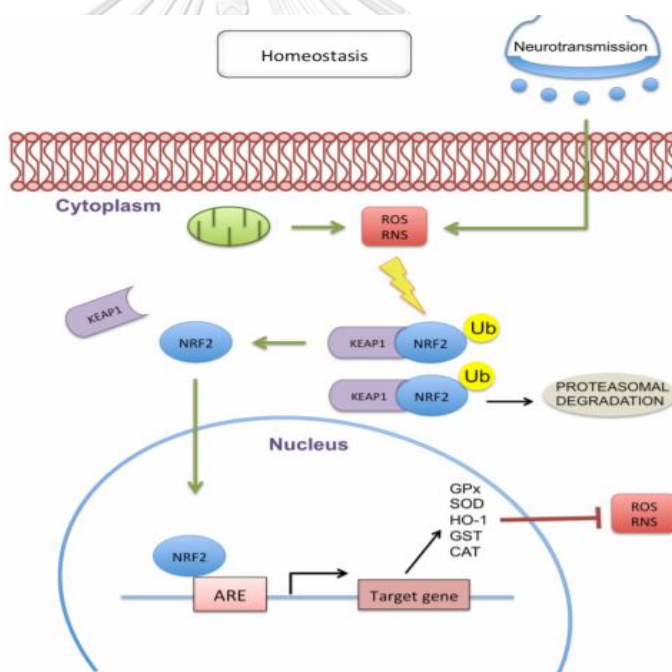
หน้าที่ในการรักษาสมดุลของไอออนให้กับเซลล์ การสื่อสารผ่านวิถีต่างๆ รวมไปถึงการทำงานของไซโตสเกเลตอนในการยึดเกาะและเคลื่อนที่ของเซลล์ (Liu and Levine 2015)



รูปที่ 11 การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจีในรูปแบบต่างๆ (Bialik, Dasari et al. 2018)

## 2.7 กลไกในการป้องกันอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Antioxidant mechanisms in cells)

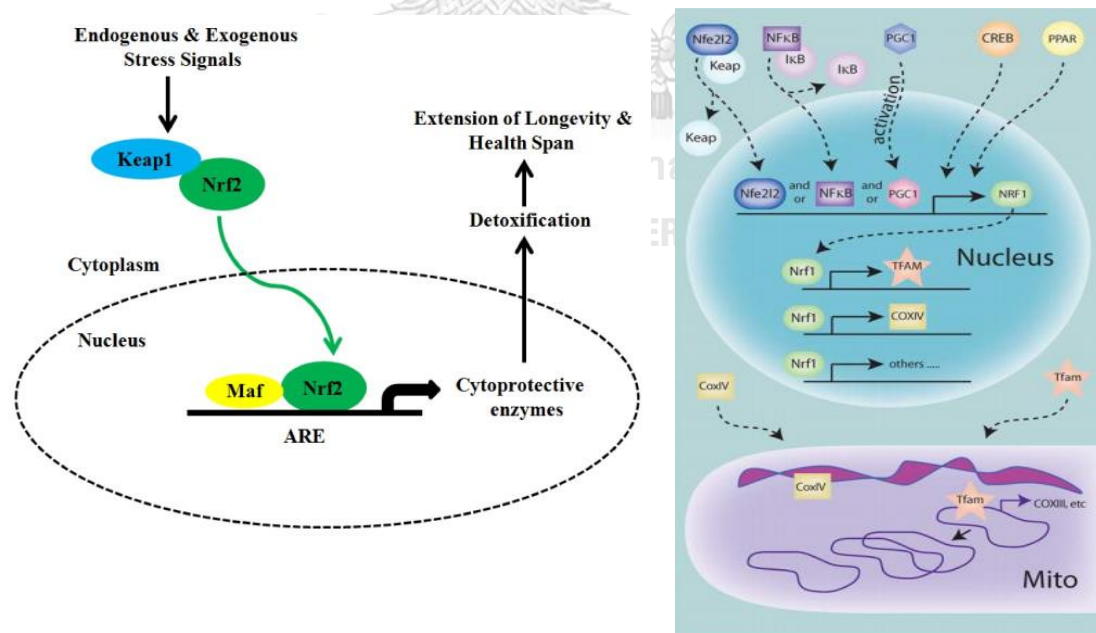
ภาวะเครียดออกซิเดชันมีความสัมพันธ์กับโรคต่างๆ มากมาย กลไกสำคัญในการยับยั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน หรือการต่อต้านอนุมูลอิสระ ทำงานโดยผ่านยีนที่ชื่อว่า Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2 (Nrf2) ซึ่งเป็นตัวควบคุมการแสดงออกของยีนหลายชนิดที่มีความสำคัญในกระบวนการต่อต้านอนุมูลอิสระ เช่น antioxidant genes และ detoxifying or phase II genes ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), hemeoxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1 (NQO1) เป็นต้น ดังรูปที่ 12



รูปที่ 12 กลไกการทำงานของยีน Nrf2-antioxidant response element (ARE)

Nrf2-antioxidant response element (ARE) ถูกกระตุ้นด้วยอนุมูลอิสระจาก excessive cellular respiration หรือ neurotransmission activation ต่อการแสดงออกของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ (Adapted from Vasconcelos et al., 2019)

โดยพบว่า Nrf2 นั้นแสดงออกเพิ่มมากขึ้นในเซลล์มะเร็งเต้านมและเซลล์สมอง เพื่อป้องกันเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Habib, Linher-Melville et al. 2015) นอกจากนั้นแล้ว Nrf2 ยังมีความเกี่ยวข้องกับกลไก selective autophagy โดยมีการศึกษาพบว่าการ over-activation ของ Nrf2 ในหนูที่มีความบกพร่องของกระบวนการออโตฟาจี โดยพบความเชื่อมโยงระหว่าง Nrf2 และออโตฟาจี ผ่าน p62 ซึ่งทำหน้าที่เป็น autophagy substrate และเป็น autophagic cargo receptor (Ma 2013) นอกจากนี้ Nrf2 ยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไมโทคอนเดรียด้วย โดย Nrf2 จะไปทำหน้าที่เป็น enhancer ของยีน Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 1 (NRF-1) ซึ่งเป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการ mitochondrial biogenesis ดังนั้น Nrf2 จึงมีความสำคัญมากต่อการต้านการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อไมโทคอนเดรียโดยอาศัยการทำงานของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ รวมถึงสามารถเพิ่มการสร้างไมโทคอนเดรียมาหมุนเวียนได้ (Anne Stetler, Leak et al. 2013) ดังรูปที่ 13



รูปที่ 13 ยีนต่างๆ ที่ถูกควบคุมโดย Nrf2

(Davinelli, Willcox et al. 2012 ; Anne Stetler, Leak et al. 2013)



## 2.8 รวงจืด (*Thunbergia laurifolia*)

รวงจืด *Thunbergia laurifolia* เป็นพืชในกลุ่ม *Acanthaceae* และเป็นพืชถูกพบมากในประเทศไทยใบรวงจืดมักถูกนำไปบริโภคในลักษณะของใบชาอบแห้ง มีสรรพคุณในการลดการเจ็บปวด การอักเสบและการบวม มีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญคือ Caffeic acid, Apigenin และ Lutein ซึ่งมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้ ได้แก่ การต้านจุลชีพทั้งแบคทีเรียและไวรัสโดยสารสกัดจากรวงจืดด้วยเอทานอลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis* และ *Streptococcus pyogenes* ได้นอกจากนี้สารสกัดจากรวงจืดยังสามารถยับยั้ง neuraminidase จาก influenza ไวรัสทั้ง influenza type A (H1N1,H3N2) และ type B ได้ (Wirotesangthong, Nagai et al. 2009 ; Jungsi and Siripongvutikorn 2016 ; Jungsi, Siripongvutikorn et al. 2017)

การต้านอนุมูลอิสระ สารสกัดจากใบของรวงจืดมีปริมาณ total phenolic content สูงและเมื่อนำไปวัดค่าความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ด้วยวิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging capacity assay (DPPH) และ ferric reducing ability of plasma (FRAP) พบว่ามีค่าสูงด้วยเช่นกัน (Oonsivilai, Cheng et al. 2008, Oonsivilai and Mario 2008)

การต้านมะเร็ง เมื่อนำสารสกัดรวงจืดไปศึกษากับเซลล์มะเร็งเต้านม MCF -7 พบว่าสารสกัดจากรวงจืดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเต้านมได้โดยไปยับยั้งวงจรชีวิตของเซลล์ได้ที่ระยะ G1 (Jetawattana, Boonsirichai et al. 2015)

การต้านการอักเสบ การที่มีสารต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากรวงจืดสูง ทำให้สารสกัดจากรวงจืดสามารถยับยั้งการอักเสบได้โดยสามารถลดการอักเสบในหนูแฮมสเตอร์ที่ถูกติดเชื้อด้วยพยาธิใบไม้ในตับ *Opisthorchis viverrini* โดยความสามารถในการอักเสบนั้นเป็นไปตามความเข้มข้นของสารสกัด (Boonyarikpunchai, Sukrong et al. 2014)

## 2.9 เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 (HT-22 Mouse hippocampal neuronal cells)

เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 เป็นเซลล์ที่กลายมาจากเซลล์แม่ HT-4 ซึ่งมีต้นกำเนิดจากเซลล์ปลูมภูมิในส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู เซลล์ชนิดนี้นิยมใช้ในการศึกษากลไกการปกป้องเซลล์ประสาทจากพิษของกลูตาเมต เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้มีความไวต่อพิษของกลูตาเมตสูง เพราะมีลักษณะพิเศษคือเซลล์ HT-22 ไม่มี receptor ของกลูตาเมตโดยจากการศึกษาการแสดงออกของ NMDA receptor subunit พบว่าเซลล์ HT-22 ไม่มีการแสดงออกของ NMDA receptor subunit 1 ทำให้ subunit อื่นๆไม่สามารถประกอบรวมเป็น receptor ที่สมบูรณ์ได้ (Fukui, Song et al. 2009 ; Liu, Li et al. 2009) ทำให้แน่ใจได้ว่าการกระตุ้นของกลูตาเมตในเซลล์ HT-22 จะเป็นการกระตุ้นผ่านกลไก Oxidative glutamate toxicity (รูปที่ 8) เท่านั้น

### บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 อุปกรณ์

##### 3.1.1 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	ที่ตั้ง	บริษัท
2,2'-Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation (ABTS)		Sigma-Aldrich, USA
30% Acrylamide and bis-acrylamide solution		Bio-Rad, USA
Agarose gel		Merck, Germany
Aluminum chloride		Sigma-Aldrich, USA
Alexa Fluor 488		Cell signaling, USA
Ammonium persulfate (APS)		Merck, Germany
Anti-fade mountant		Invitrogen, USA
Blotting-grade blocker		Bio-Rad, USA
Bovine serum Albumin (BSA)		GE Healthcare, UK
Bradford reagent		Bio-Rad, USA
5-(and-6)-carboxy-2',7'-dihydrofluorescein diacetate (H <sub>2</sub> DFFDA)		Thermo Scientific,
USA		
Chloroform		Sigma-Aldrich, USA
Chloroquine		Sigma-Aldrich, USA

CytoTox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, USA
Carbonylcyanide m - chlorophenylhydrazone (CCCP)	Cell signaling, USA
2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)	Merck, Germany
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)	Biobasic, Canada
4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Sigma-Aldrich, USA
Developer	KODAK, USA
Diethyl pyrocarbonate (DEPC)	Sigma-Aldrich, USA
Dimethyl Sulfoxide (DMSO)	Sigma-Aldrich, USA
DNA Ladder 100 bps	Fermentas, Lithuania
Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)	Sigma-Aldrich, USA
ECL select western blotting detection reagent	GE Healthcare , UK
Ethanol	RCI Labscan, Thailand
Fetal Bovine Serum (FBS)	Sigma-Aldrich, USA
Fixer	KODAK, USA
Folin-Ciocalteu's phenol reagent	Sigma-Aldrich, USA
Gallic acid	Merck, Germany
Glycine	Vivantis Inc., Malaysia
Hydrochloric acid, 37%	Merck, Germany
Hydrogen peroxide, 30%	Merck, Germany
Isopropanol	Sigma-Aldrich, USA

L-ascorbic acid	Calbiochem, USA
L-glutamic acid	Sigma-Aldrich, USA
Methanol	RCI Labscan, Thailand
Mitotracker Red CMXRos	Molecular Probes, USA
Mouse monoclonal anti- $\beta$ -actin antibody	Cell signaling, USA
Mouse monoclonal anti-rabbit IgG, HRP-linked antibody	Cell signaling, USA
Oligo-dT primers	Bioneer, South Korea
Paraformaldehyde	Sigma-Aldrich, USA
Penicillin-Streptomycin solution	Corning Inc., USA
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Sigma-Aldrich, USA
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Hyclone, USA
Potassium persulfate	Sigma-Aldrich, USA
Primers	Bioneer, South Korea
Protease inhibitor cocktails	Roche, Germany
Protein ladder	Thermo Scientific, USA
Quercetin	Sigma-Aldrich, USA
Rabbit polyclonal anti-LC3B antibody	Cell signaling, USA
Rabbit monoclonal anti-TOM20 (D8T4N) antibody	Cell signaling, USA
RT Premix	Bioneer, South Korea
Sodium acetate	Sigma-Aldrich, USA
Sodium carbonate	Merck, Germany

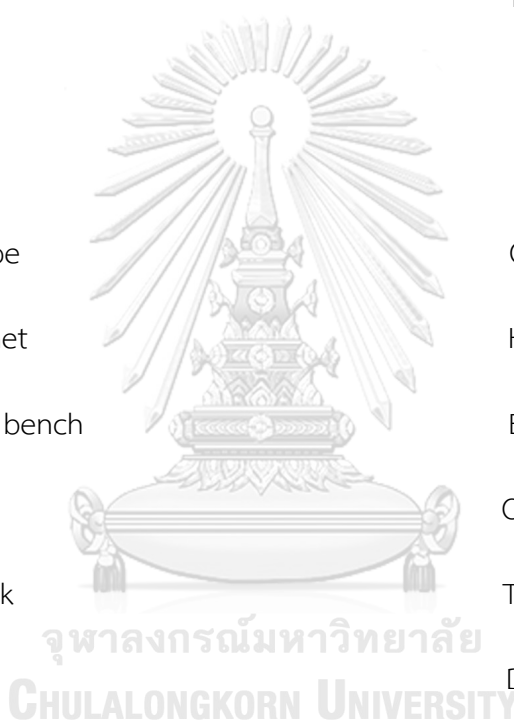
Sodium chloride	Merck, Germany
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Biobasics Inc., Canada
Sodium hydroxide	Merck, Germany
Sodium selenite	Sigma-Aldrich, USA
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Merck, Germany
Tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE)	Cell signaling, USA
Tris-base	Vivantis Inc., Malaysia
Trypsin-EDTA	Hyclone, USA
Trypan Blue Stain	Invitrogen, USA
Tween-20	Vivantis Inc., Malaysia
Triton X-100	Merck, Germany
Trizol Reagent	Invitrogen, USA



### 3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

ชื่ออุปกรณ์ ที่ตั้ง	บริษัท
Adhesive optical sealing film	Bioneer, South Korea
Analytical balances	MettlerToledo, Switzerland
Autoclave	Hirayama, Japan
Auto pipette	Gilson, France
Benchtop centrifuge (Hettich Universal 320R)	Sigma-Aldrich, USA
Block heater	Wealtec, USA
Centrifugal evaporator (miVac Quattro)	Genevac, UK
Centrifuge tube (15, 50 มล.)	Corning Inc., USA
Cell culture flask (25, 75 ซม <sup>2</sup> )	Corning Inc., USA
CO <sub>2</sub> incubator (Forma Series II 3110)	Thermo Scientific, USA
Cryovial tube (2 มล.)	Corning Inc., USA
Confocal laser scanning microscope (LSM 700)	Carl Zeiss, Germany
Disposal serological pipette (5, 10, 25 มล.)	SPL, South Korea
Electrophoresis power supply	Bio-Rad, USA
Extraction Thimble cellulose (Whatman)	GE Healthcare, UK
Exicycler real-time quantitative thermal block	Bioneer, South Korea
Filter tip	Thermo Scientific, USA
Flat bottom culture plate (6, 12, 96 หลุม)	Corning Inc., USA

Flow cytometer (BD FACSCalibur)	BD Biosciences, USA
Freezer (-20 °C)	Sanyo Electric, Japan
Freezer (-80 °C)	Lyofreeze, USA
Gel documentation (Geldoc) system	Syngene, UK
Gel electrophoresis apparatus	Bio-Rad, USA
Glassware	Pyrex, USA
Hemocytometer	Hausser Scientific, USA
Incubator	Memmert, Germany
Inverted microscope	Olympus, Japan
Laminar flow cabinet	Haier, China
Lamina flow clean bench	Esco, Singapore
Light microscope	Olympus, Japan
Liquid nitrogen tank	Taylor Wharton, USA
Magnetic stirrer	Daihan, South Korea
Microcentrifuge refrigerated machine	Vision, South Korea
Microplate reader (Enspire)	Perkin-Elmer, USA
Microplate reader (Synergy Mx)	Biotek, USA
Multichannel pipette	Gilson, France
pH meter	MettlerToledo, Switzerland
Pipette tips 10, 20 (ไมโครลิตร)	Sorenson, USA
Pipette tips 200 (ไมโครลิตร)	Corning Inc., USA





Pipette tips 1000 (ไมโครลิตร)	Corning Inc., USA
PCR tube (0.2 มล.)	Bioneer, South Korea
PVDF membrane	GE Healthcare, UK
Refrigerator (4 °C)	Sharp, Japan
Rotary evaporator	Heidolph, Germany
Soxhlet extraction apparatus	Lenz Laborglas, Germany
UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop ND-1000)	Thermo Scientific, USA
Vortex	Scientific Industries, USA
Water bath	Memmert, Germany



### 3.2 ตัวอย่างสมุนไพร

รางจืดมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Thunbergia Laurifolia* จัดอยู่ในวงศ์เหงือกปลาหมอ (Acanthaceae) เป็นสมุนไพรที่มีลักษณะเป็นไม้เลื้อยหรือเป็นเถา ตัวอย่างใบรางจืดถูกเก็บจาก สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี อ.เมืองระยอง จ.ระยอง บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) และ ถูกระบุชื่อโดย คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเก็บในวันที่ 11 มกราคม พ.ศ.2561



รูปที่ 14 ใบรางจืดก่อนนำไปตากแห้ง

### 3.3 เซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู HT-22 มักถูกใช้เป็นตัวแบบในการศึกษาพิษของกกลูตามेटต่อเซลล์ประสาทโดยเซลล์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. David Schubert (The Salk Institute, San Diego, CA, USA) เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู HT-22 ถูกเลี้ยงในฟลาคซ์ชนิด T-25 ด้วยอาหารชนิด DMEM ร่วมกับ 10% FBS และยาปฏิชีวนะชนิดเพนิซิลลิน (100 ยูนิต/มิลลิลิตร) สเตรปโตไมซิน (100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เซลล์ถูกบ่มภายใต้สภาวะขึ้น 5% CO<sub>2</sub> ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อเซลล์มีความ

หนาแน่นประมาณร้อยละ 70-80 เซลล์ถูกเก็บด้วยเอ็นไซม์ทริปซิน และตรวจนับด้วย Neubauer haemocytometer และนำไปหว่านลงในถาดเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 15 เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การสกัดสารสกัดใบรางจืดด้วยวิธี Soxhlet extraction

นำสมุนไพรมาทำความสะอาด โดยล้างน้ำเปล่าให้สะอาดประมาณ 3 ครั้ง เสร็จแล้วตัดหรือหั่นสมุนไพรให้เป็นชิ้นเล็กๆบางๆ เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการตาก จากนั้นนำไปตากลมทิ้งไว้ 2-3 วัน จนใบรางจืดแห้งสนิทน้ำหนักคงที่แล้วนำไปบดให้ละเอียด ซึ่งผงสมุนไพรที่บดแล้วปริมาณ 40 กรัมใส่ลงใน Cellulose Extraction Thimbles แล้วจึงนำไปใส่ใน Thimble ของเครื่อง Soxhlet Extractor ควรใส่เศษกระดาษ 2-3 ชิ้นลงใน Boiling Flask เพื่อกันไม่ให้ตัวทำละลายเดือดเกินไปจนทำให้ขวดแก้วแตกเสียหาย แล้วจึงใส่ตัวทำละลายเอทานอล ใน Boiling Flask ปริมาณ 400 มิลลิลิตร (สมุนไพร: ตัวทำละลาย = 1:10) เมื่อทำการสกัดเป็นเวลา 36 ชั่วโมง จนตัวทำละลายใน Thimble มีสีใสแล้ว ทำการเก็บสารสกัดทั้งหมดที่ได้ใส่ในขวดที่บดแสงปิดสนิท เพื่อกันให้พ้นจากแสง ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นนำสารสกัดที่ได้ไประเหยเอาตัวทำละลายออกด้วยเครื่อง rotatory evaporator

หลังจากระเหยตัวทำละลายแล้วนำไปปั่นด้วย miVac concentrator เพื่อระเหยแห้งตัวทำละลาย ออกให้หมด จนสารสกัดหยาบมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น จากนั้นนำสารที่ได้ไปชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหา ปริมาณสารที่ได้ (%yield)

$$\% \text{ Yield} = \frac{\text{Crude extract weight(g)}}{\text{Sample powder weight(g)}} \times 100$$

ละลายสารสกัดหยาบของสมุนไพรใน DMSO เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของตัวอย่างเป็น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อละลายเสร็จแล้วนำสารสกัดหยาบสมุนไพรกรองผ่าน filter ขนาด 0.2 ไมครอน ลงใน microcentrifuge tube เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

### 3.4.2 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิก

การทดสอบเพื่อหาสารประกอบฟีนอลิกโดยวิธี Folin-Ciocalteu Colorimetric ทำในสภาพ เเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยใส่ 10% Folin reagent และ 0.1 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) อย่างละ 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมที่ประกอบไปด้วยสารสกัดตัวอย่างที่ละลายด้วย เมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายกรด แกลลิก เป็นสารละลายมาตรฐานในการหาค่ากราฟมาตรฐาน (Standard curve) ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 60 นาที ในที่มีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 760 นาโนเมตร และคำนวณหาค่าสารประกอบ ฟีนอลิกทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของกรดแกลลิกในหน่วยมิลลิกรัมของกรดแกลลิกต่อกรัม สารสกัด (mg of gallic acid equivalent / g extract)

### 3.4.3 การทดสอบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์

การทดสอบเพื่อหาสารประกอบฟลาโวนอยด์โดยวิธี Aluminum chloride colorimetry ทำในสภาพเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุม โดยใส่ 10% อลูมิเนียมคลอไรด์ (AlCl<sub>3</sub>) และ 1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตรต (NaOAc) อย่างละ 10 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมที่ประกอบไปด้วยสารสกัดตัวอย่างที่ละลายด้วยเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายเคอร์ซีติน เป็นสารละลายมาตรฐานในการหาค่ากราฟมาตรฐาน (Standard curve) จากนั้นเติมสารละลายเอทานอลปริมาตร 150 ไมโครลิตร ในทุกหลุม ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 40 นาที ในที่มืดและวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 415 นาโนเมตร และคำนวณหาค่าสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายเคอร์ซีตินในหน่วยมิลลิกรัมของสารละลายเคอร์ซีตินต่อกรัมสาร สกัด (mg of quercetin equivalent / g extract)

### 3.4.4 การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบรางจืด

#### 3.4.4.1 วิธี 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

วิธี DPPH เป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจคัดกรองหาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระในสารสกัด หรือ อาหาร โดยวัดความสามารถในการต้านออกซิเดชันซึ่งใช้สารตัวทำปฏิกิริยา คือ 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl เป็นอนุมูลที่เสถียรในตัวทำละลายเมทานอล ซึ่งสารละลายนี้มีสีม่วง และสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 517 นาโนเมตร โดย DPPH• จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) หรือกับ radical species (R•) ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงความเข้มข้นของสารละลายสีม่วงก็จะลดลง การทดสอบทำในสภาพเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมด้วยวิธี DPPH radical scavenging activity โดยใส่ DPPH working solution 180 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมที่ประกอบไปด้วยสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายวิตามินซีเป็นสารละลายมาตรฐานในการหาค่ากราฟมาตรฐาน (Standard curve) และใช้เอทานอลเป็นตัวควบคุมผลลบ

(Negative control) ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มีด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 517 นาโนเมตรและคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\% \text{ Scavenging activity} = \frac{\text{Abs}(\text{sample}) - \text{Abs}(\text{control})}{\text{Abs}(\text{control})} \times 100$$

#### 3.4.4.2 วิธี 2,2'-Azino-bis (3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) cation (ABTS)

วิธี ABTS เป็นวิธีการวิเคราะห์ความสามารถในการต้านออกซิเดชัน (antioxidant capacity) ซึ่งวิธีนี้ใช้ตัวทำปฏิกิริยาที่สำคัญคือ 2,2'- Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt เป็นอนุโมลที่เสถียรในสารละลาย สารละลายนี้มีสีเขียวและสามารถดูดกลืนแสงได้ที่ 734 นาโนเมตร โดย ABTS• จะเกิดปฏิกิริยากับ antioxidant (AH) ถ้าตัวอย่างมีความสามารถในการต้านออกซิเดชันได้สูงความเข้มข้นของสารละลายสีเขียวก็จะลดลง การทดสอบทำในภาวะเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมด้วยวิธี ABTS radical scavenging activity โดยใช้ ABTS working solution 180 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมที่ประกอบไปด้วยสารสกัดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร โดยใช้สารละลายวิตามินซีเป็นสารละลายมาตรฐานในการหาค่ากราฟมาตรฐาน (Standard curve) และใช้เอทานอลเป็นตัวควบคุมผลลบ(Negative control) ที่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ในที่มีด จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 734 นาโนเมตร และคำนวณหาค่าร้อยละการต้านอนุมูลอิสระดังสมการ

$$\% \text{ Scavenging activity} = \frac{\text{Abs}(\text{sample}) - \text{Abs}(\text{control})}{\text{Abs}(\text{control})} \times 100$$

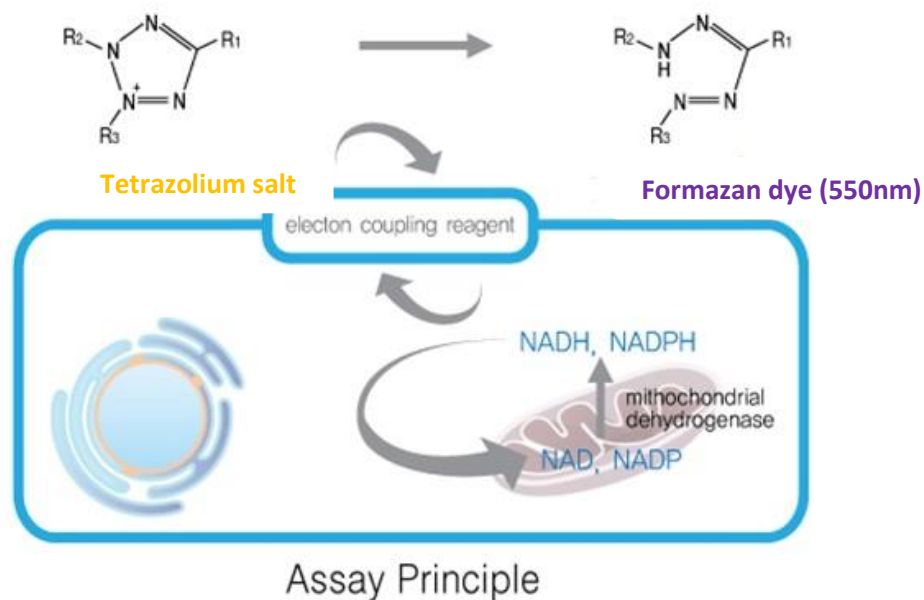
### 3.4.5 การวิเคราะห์หาสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วย LC-MS

ตัวอย่างสารสกัดถูกวิเคราะห์ด้วยเทคนิค LC-MS ด้วยเครื่อง micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) ในโหมดประจุบวก หลังจากนั้นข้อมูลถูกนำไปวิเคราะห์ผ่านเว็บไซต์ METLIN-(CA, USA) ในหมวด Simple search โดยกำหนดให้มีค่าความคลาดเคลื่อนไม่เกิน 30 part per million (PPM) จากนั้นนำสารออกฤทธิ์ที่ทำนายได้ไปสืบค้นข้อมูลผ่าน KNApSACk Keyword Search Web Version 1.000.01 เพื่อหาความเป็นไปได้ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

### 3.4.6 การทดสอบความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดใบรางจืดจากพิษของ กลูตาเมตโดยวัดจากปริมาณการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT

ความเป็นพิษของสารสกัดและความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดใบรางจืดจากพิษของกลูตาเมตถูกทดสอบด้วย วิธี MTT โดยตรวจวัดการเผาผลาญ (metabolic activity) ของเซลล์และวัดปริมาณสีม่วงที่เกิดจากตะกอน formazan การทดสอบทำในถาดเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมโดยหว่านเซลล์ลงไปปริมาณ 3000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มข้ามคืนในสภาวะ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> แล้วบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆพร้อมกับกลูตาเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ เมื่อครบเวลาแล้วทำการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT โดยใช้สารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มให้ครบเวลา 3 ชั่วโมงจากนั้นทำการละลายตะกอนสีด้วย Dimethyl sulfoxide (DMSO) 200 ไมโครลิตร เขย่าให้ละลายตะกอนและนำไปวัดความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร และคำนวณ % cell viability ตามสูตร

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{\text{Abs}(\text{sample}) - \text{Abs}(\text{blank of sample})}{\text{Abs}(\text{control}) - \text{Abs}(\text{blank of sample})} \times 100$$



รูปที่ 16 กลไกการเกิดปฏิกิริยาใน MTT assay

[http://scgbiomax.com/g5/bbs/board.php?bo\\_table=product&wr\\_id=1&page=5](http://scgbiomax.com/g5/bbs/board.php?bo_table=product&wr_id=1&page=5)

(accessed on Jan 5, 2018)

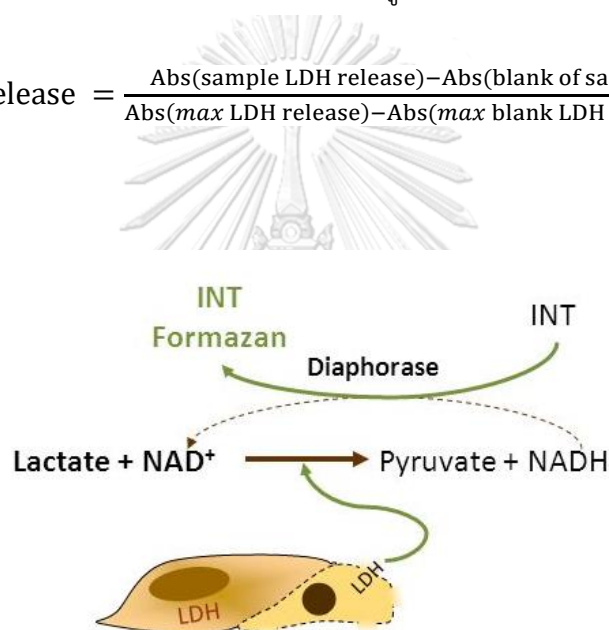
3.4.7 การทดสอบความสามารถในการป้องกันเซลล์ประสาทของสารสกัดใบรางจืดจากพิษของ กลูตาเมตโดยวัดจากปริมาณความเป็นพิษต่อเซลล์ ด้วยวิธี LDH

LDH เป็นเอนไซม์ที่สามารถพบได้ในทุกๆ เซลล์และมีความคงตัวสูงเมื่อพลาสมาเมมเบรนได้รับความเสียหายหรือถูกทำลายเซลล์ก็จะปล่อยเอนไซม์ชนิดนี้ออกมา ความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) ถูกวัดจากปริมาณของเอนไซม์ LDH ซึ่งถูกปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ที่ถูกทำลาย โดย LDH activity ถูกวัดได้จากการทำปฏิกิริยาแบบ coupled enzymatic reaction ในชุดทดสอบ CytoTox 96 ® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) การทดสอบจะทำในสภาพเพาะเลี้ยงชนิด 96 หลุมโดยหว่านเซลล์ลงไปปริมาณ 3000 เซลล์ต่อหลุม จากนั้นบ่มข้ามคืนในสภาวะ 37 °C 5% CO<sub>2</sub> แล้วบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดจากรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆพร้อมกับ กลูตา



เมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำเอาเฉพาะเลี้ยงไปปั่นที่ความเร็ว 1500 g จากนั้นดูดส่วนน้ำ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากหลุมต่างๆรวมทั้งหลุมควบคุมไปใส่ในภาชนะเลี้ยงชนิด 96 อันใหม่ แล้วใส่น้ำยาทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตรในหลุมทดลอง ส่วนคอนโทรลเซลล์ถูกทำให้แตกตัวด้วย lysis buffer เป็นเวลา 30 นาที ก่อนจะใส่น้ำยาทดสอบ แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาทีโดยห้ามโดนแสง หลังจากนั้นใส่น้ำยาหยุดปฏิกิริยาปริมาตร 50 ไมโครลิตร สารละลายถูกวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร จากนั้นคำนวณค่า LDH release จากสูตร

$$\% \text{ LDH release} = \frac{\text{Abs}(\text{sample LDH release}) - \text{Abs}(\text{blank of sample})}{\text{Abs}(\text{max LDH release}) - \text{Abs}(\text{max blank LDH release})} \times 100$$



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 17 กลไกการเกิดปฏิกิริยาใน LDH assay

<https://worldwide.promega.com/resources/protocols/technical-bulletins/0/cytotox-96-non-radioactive-cytotoxicity-assay-protocol/> (accessed on Jan 5, 2018)

### 3.4.8 การทดสอบหาปริมาณอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชัน (Intracellular reactive oxygen species production) ด้วยวิธี flow cytometry

การสะสมหรือการเพิ่มสูงขึ้นของ ROS ภายในเซลล์มักเกิดจากความผิดปกติของระบบต้านอนุมูลอิสระในร่างกายโดยส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่างๆได้โดยเฉพาะโรคความเสื่อมของระบบประสาท ROS ภายในเซลล์จะวัดได้จากการทำปฏิกิริยากับ 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DFFDA) ได้สารเรืองแสง การทดสอบหาปริมาณอนุมูลอิสระจะเริ่มจากการหว่านเซลล์ลงในถาดเพาะเลี้ยงขนาด 12 หลุม จากนั้นบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยกลูตาเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นใส่ DCFH<sub>2</sub>-DA ความเข้มข้น 10  $\mu$ M บ่มที่ 37 °C 45 นาที เมื่อครบเวลาแล้วเก็บเซลล์ด้วยทริปซินแล้ววัดด้วย flow cytometry (FACSCalibur, BD Biosciences, Sanjose, CA, USA) ทันที ที่ความยาวคลื่น excitation และ emission 488 และ 525 นาโนเมตร ตามลำดับ โดยผลการทดลองจะแสดงในรูปแบบของความสัมพันธ์ของระดับ ROS เทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม

### 3.4.9 การศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการออโตฟาจี และ ปริมาณไมโทคอนเดรีย

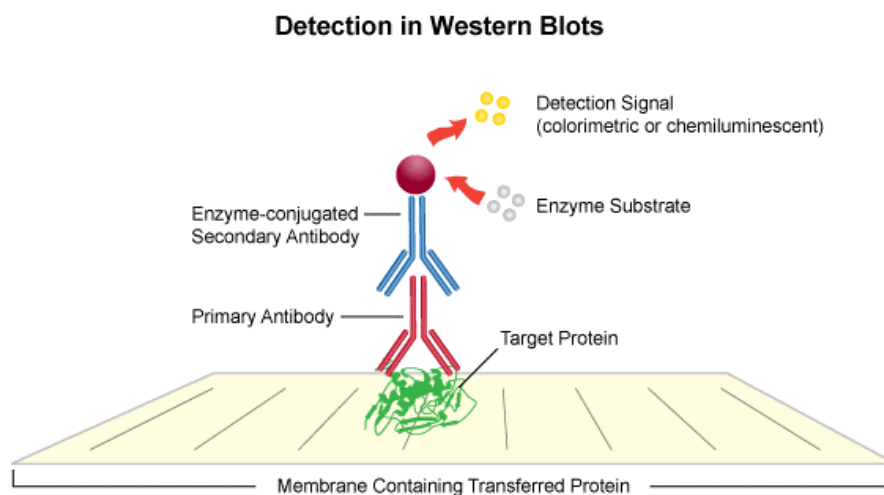
#### 3.4.9.1 การวัดปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford

โปรตีนที่สกัดได้ถูกนำไปวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) โดยโปรตีนจะไปจับกับสี Coomassie Brilliant Blue G-250 เกิดการเปลี่ยนสีจากสีแดงในสภาวะความเป็นกรด เป็นสีน้ำเงิน ทำได้โดยผสมตัวอย่างโปรตีนกับน้ำยา 1X Bradford ในไมโครเพลทจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที และหลีกเลี่ยงการโดนแสง เมื่อครบเวลา

แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง 550 นาโนเมตร ปริมาณโปรตีนในตัวอย่างถูกคำนวณเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (BSA) ความเข้มข้น 0-1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

### 3.4.9.2 การแยกโปรตีนด้วยวิธี Western Blot

เซลล์ถูกบ่มด้วยสารสกัดจากรางจืดและกลูตาเมตที่ความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสม จากนั้นทำการเก็บโปรตีนจากเซลล์ด้วย lysis buffer และวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยวิธี Bradford ตามที่กล่าวมาข้างต้น จากนั้นโปรตีนตัวอย่างถูกทำให้มีความเข้มข้นเท่ากันที่ 20 ไมโครกรัมและแปลงสภาพโปรตีนด้วยการผสมกับ Laemmli บ่มภายใต้อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมเจลอะครีลาไมด์ขนาด 12% สำหรับแยกโปรตีน และทำการหยอดโปรตีนตัวอย่างที่ต้องการ แล้วแยกโปรตีนโดยใช้กระแสไฟฟ้าและทำการย้ายโปรตีนจากเจลอะครีลาไมด์ไปสู่เมมเบรน PVDF (GE Healthcare) จากนั้นบล็อกด้วยนมชนิดไม่มีไขมัน 5% ใน TBST เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และย้อม Primary Antibody ที่จำเพาะต่อกระบวนการออโตฟาจี LC3 (1:8000 Cell Signaling Technology) ไมโตคอนเดรีย TOM20 (1:10000 Cell Signaling Technology) และ  $\beta$ -actin (1:16000 Cell Signaling Technology) บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซ้ำมคืน เมื่อครบเวลาแล้วล้างด้วย 1X TBST 3 ครั้งแล้วบ่มด้วย Anti-rabbit IgG HRP linked Antibody (1:16000 Cell Signaling Technology) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย 1X TBS-T 3 ครั้ง นำไปประกบด้วยฟิล์มและอ่านผลโดยเทียบแถบโปรตีนกับตัวควบคุม  $\beta$ -actin ด้วยโปรแกรม Image J



**รูปที่ 18** การแสดงออกของโปรตีนด้วยวิธี Western blot

<https://www.leinco.com/western-blotting-protocol> (accessed on Jan 5, 2018)

#### 3.4.10 การย้อมเซลล์ด้วยเทคนิค immunofluorescence staining

เทคนิคการย้อมด้วยสี immunofluorescence เป็นการติดตามโปรตีนที่สนใจด้วยแอนติบอดีและติดตามด้วยสีเรืองแสงชนิดต่างๆ การทดลองนี้มีเป้าหมายในการติดตามตำแหน่งของโปรตีน LC3 ร่วมกับไมโทคอนเดรีย เซลล์ HT-22 ถูกหว่านลงในภาชนะเพาะเลี้ยงขนาด 12 หลุม บนแผ่นสไลด์ชนิดกลมที่ผ่านการเคลือบด้วย Poly-D-lysine (Thermo Scientific) และนำไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มด้วยสารสกัดจากรางจืดที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรแล้วบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยกลูตาเมต เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วใส่ Mitotracker (Mitotracker Red CMXRos, Invitrogen) ความเข้มข้น 200 นาโนโมลาร์ ลงในแต่ละหลุมและบ่มเป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำไปรักษาสภาพเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde บ่มที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที จากนั้น permeabilize ด้วย 0.3% Triton X-100 บ่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาแล้วบ่มด้วย 2 % FBS-PBS บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมด้วยแอนติบอดี LC3 (1:200 Cell Signaling Technology) บ่มที่ 4 °Cข้ามคืน จากนั้น

ย้อมด้วย Alexa 488 (1:1000 Cell Signaling Technology) บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้น ย้อมด้วย DAPI 300 นาโนโมลาร์ ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วย 1XPBS 3 ครั้ง จากนั้น mount ด้วย prolong anti fade และเก็บไว้ที่ 4 °C หรือนำไปถ่ายภาพด้วย confocal microscope (LSM-700, Carl Zeiss)

### 3.4.11 การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากรางจืดต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกระดับ

mRNA ของยีนที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (SOD, CAT, GPx) โดยวิธี

Real time-PCR

#### 3.4.11.1 การสกัด RNA ด้วยน้ำยา Trizol

หลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะทดสอบแล้ว ทำการสกัด RNA ด้วยน้ำยา Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) ทิ้งไว้เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดสารทั้งหมดใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วเติมคลอโรฟอร์มที่เย็นลงไป 200 ไมโครลิตร เขย่าประมาณ 20 วินาที เมื่อครบเวลา นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นดูดส่วนใสด้านบน ที่เป็น RNA ใส่ในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร ชุดใหม่ จากนั้นเติมสารละลาย Isopropanol ที่เย็นลงไป ในอัตราส่วน 1:1 กับส่วนใสที่ดูดแยกออกมาได้ ผสมสารเข้าด้วยกัน แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20°C 20 นาที เพื่อตกตะกอน RNA จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาทีที่ อุณหภูมิ 4°C แล้วเทส่วนใสที่จะเห็นตะกอนบริเวณก้นหลอด จากนั้นล้างตะกอน RNA ด้วย 75% เอทานอล ที่ละลายในน้ำ DEPC ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 7,500 g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิ 4°C ทำซ้ำ 3 ครั้ง เมื่อล้างตะกอนครั้งสุดท้ายแล้ว ให้เทส่วนใสทิ้งแล้ว ตากตะกอนไว้ประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ตะกอน RNA แห้งสนิท แล้วละลายตะกอน RNA ด้วยน้ำ DEPC ที่อุณหภูมิ 65°C ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้ตะกอน RNA ละลายในน้ำ DEPC

จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65°C เป็นเวลา 5-10 นาที จากนั้นนำไปวัดปริมาณ RNA ที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Nanodrop หรือเก็บ RNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ - 80°C

### 3.4.11.2 การทำ Real time-PCR

เทคนิค RT-PCR เป็นการติดตามระดับ mRNA ด้วยสีเรืองแสง วิธีนี้นับเป็นเทคนิคที่ได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในปัจจุบันเพราะมีความไวสูงและแม่นยำอีกทั้งยังมีขั้นตอนที่ไม่ซับซ้อน โดยสีที่นิยมใช้คือ SYBR Green ซึ่งจะเข้าจับกับ DNA สายคู่บริเวณตำแหน่ง minor groove ดังนั้นปริมาณแสงที่วัดได้จะแสดงออกมาเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ DNA ที่เพิ่มขึ้น (Deepak, Kottapalli et al. 2007) เพื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองในขั้นแรก mRNA จะต้องถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยสังเคราะห์จาก RNA ปริมาณ 1 ไมโครกรัม ด้วยไพรเมอร์ oligo-dT และชุดน้ำยา Accupower RT Premix (Bioneer, Daejeon, South Korea) จากนั้นนำ cDNA ที่ได้มาทำ real-time PCR โดยใช้ชุดน้ำยาของ AccuPower 2X GreenStar ที่มีสี SYBR - Green เมื่อผสมสารทั้งหมดในปฏิกิริยาแล้ว นำไปเข้าเครื่อง Bioneer Exicycler 96 เพื่อทำปฏิกิริยา PCR โดยใช้อุณหภูมิในขั้นตอน annealing/extension ที่ 55 °C จากนั้นนำค่า Ct ของยีนทั้งหมดมาทำการ normalize กับ  $\beta$ -actin และคำนวณหาปริมาณการแสดงออกของยีนในรูปแบบจำนวนเท่าโดยใช้สูตร  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับเอ็นไซม์ในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระโดยประกอบไปด้วยยีน SOD1 SOD2 GPx และ CAT  $\beta$ -actin โดยใช้ไพรเมอร์ดังตารางที่ 1 (Sukprasansap, Chanvorachote et al. 2017)

### ตารางที่ 1 ลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการทดลอง

Genes	Sequence of primer
SOD1 forward	5'-CAGGACCTCATTTTAATCCTCAC-3'
SOD1 reverse	5'-CCCAGGTCTCCAACATGC-3'
SOD2 forward	5'-CTGGACAAACCTGAGCCCTA-3'
SOD2 reverse	5'-TGATAGCCTCCAGCAACTCTC-3'
CAT forward	5'-CAGCGACCAGATGAAGCA-3'
CAT reverse	5'-CTCCGGTGGTCAGGACAT-3'
GPx forward	5'-ACAGTCCACCGTGTATGCCTTC-3'
GPx reverse	5'-CTCTTCATTCTTGCCATTCTCCTG-3'
$\beta$ -actin forward	5'-GGCTGTATCCCTCCATCG-3'
$\beta$ -actin reverse	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

#### 3.4.12 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ผลการศึกษาทั้งหมดมาจากการทดสอบซ้ำกันทั้งหมดสามครั้งโดยเป็นอิสระต่อกัน และจะนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean  $\pm$  SD) จากนั้นข้อมูลถูกนำวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 22 โดยใช้ตัวสถิติคือ One-way analysis of variance - ANOVA ร่วมกับ Post-hoc ชนิด Dunnett's test และ Bonferroni เพื่อเปรียบเทียบกลุ่มตัวอย่างแต่ละกลุ่ม ที่ระดับนัยสำคัญ  $p$  value  $<$  0.05

## บทที่ 4 ผลการทดลอง

### 4.1 การศึกษาคุณสมบัติการต้านอนุมูลอิสระและกลไกที่เกี่ยวข้องของสารสกัดจากใบรางจืด

#### 4.1.1 ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์และความสามารถในการต้านอนุมูล

##### อิสระในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

สารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ถูกสกัดด้วยวิธีชอกเลตโดยใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบที่ได้มีสีเขียวเข้มและปริมาณผลผลิตเท่ากับร้อยละ 7.96 ของใบรางจืดแห้ง หลังจากนั้นนำไปทดสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ซึ่งถือเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ และมักพบมากในพืชสมุนไพร โดยปริมาณสารประกอบฟีนอลิกสามารถวัดได้โดยวิธี Folin-Ciocalteu colorimetric ผลการทดลองที่ได้เทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของกรดแกลลิก (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และสารประกอบฟลาโวนอยด์ทำการวัดโดยวิธี Aluminum chloride colorimetry ผลการทดลองที่ได้เทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของเคอร์ซีติน (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดพบว่า สารสกัด 1 กรัม มีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกเทียบเท่ากรดแกลลิกมาตรฐานมีค่าเท่ากับ  $160.02 \pm 5.86$  มิลลิกรัม และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์เทียบเท่าเคอร์ซีตินมาตรฐานมีค่าเท่ากับ  $43.55 \pm 0.75$  มิลลิกรัม แสดงดังตารางที่ 2



**ตารางที่ 2** ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

	ปริมาณสารประกอบฟีนอลิก (mg GAE/ g extract)*	ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ (mg QE/ g extract)**
สารสกัดหยาบจากใบรางจืด	160.02±5.86	43.55±0.75

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

\*mg gallic acid equivalent per g extract (mg GAE/g extract)

\*\*mg quercetin equivalent per g extract (mg QE/g extract)

ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดถูกทดสอบด้วยวิธี DPPH และ ABTS โดยเทียบกับค่ากราฟมาตรฐานของวิตามินซี (ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จากการทดสอบพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืด 1 กรัม มีความสามารถต้านอนุมูลอิสระเทียบเท่าวิตามินซี เท่ากับ 41.94±1.72 มิลลิกรัม ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี DPPH และ 46.11±1.37 มิลลิกรัม ในการวิเคราะห์ด้วยวิธี ABTS แสดงดัง**ตารางที่ 3**

**ตารางที่ 3** ความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

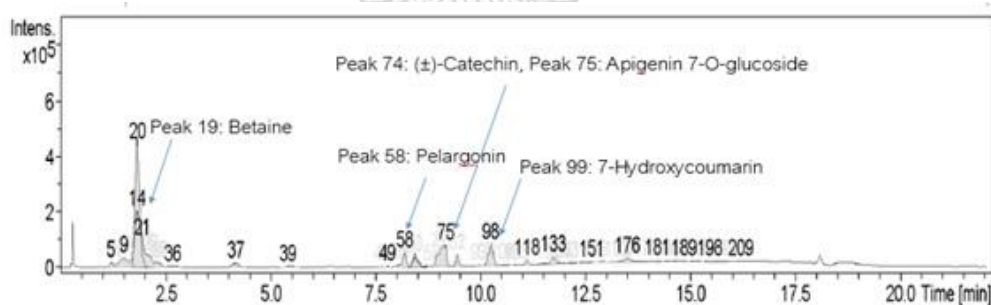
	DPPH (mg AAE/g extract)*	ABTS (mg AAE/g extract)*
สารสกัดหยาบจากใบรางจืด	41.94±1.72	46.11±1.37

ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน

\*mg ascorbic acid equivalent per g extract (mg AAE/g extract)

#### 4.1.2 สารออกฤทธิ์สำคัญในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วยเทคนิค LC-MS

สารสกัดหยาบจากใบรางจืดได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อคัดกรองหาสารออกฤทธิ์โดยเทคนิค LC-MS ด้วยเครื่อง micrOTOF-Q III (Bruker Daltonics) ในโหมดประจุบวกโดยทำนายผ่านเว็บไซต์ METLIN จากการทำนายพบสารออกฤทธิ์สำคัญได้แก่ (±)-catechin epicatechin apigenin 7-O-glucoside pelargonidin 3-O-glucoside และ 7-Hydroxycoumarin โดยพบ สาร (±)-catechin หรือ สาร epicatechin มีปริมาณมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 6.08 สารออกฤทธิ์ที่พบมากเป็นอันดับสอง คือ สาร apigenin สาร 7-O-glucoside หรือ สาร pelargonidin 3-O-glucoside คิดเป็นร้อยละ 5.14 และ สารออกฤทธิ์ที่พบมากเป็นอันดับสาม คือ 7-hydroxycoumarin (umbelliferone) คิดเป็นร้อยละ 4.29 นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ได้จากการทำนายได้แก่ betaine pelargonin apigenin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside และ kaempferol 7,4'-dimethyl ether แสดงข้อมูลดังรูปที่ 19 และตารางที่ 4



รูปที่ 19 โครมาโตแกรมของ LC-MS แสดงพีคของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืด

ตารางที่ 4 สารออกฤทธิ์ในสารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ทำนายได้จากเทคนิค LC-MS

พีคที่	Rt(นาที)	[M+H]	[M+Na]	พื้นที่ (%)	สารประกอบ	มวลตามทฤษฎี	ค่าความคาดเคลื่อนมวล (ppm)
19	1.8	118.088		2.00	Betaine	117.0790	14
58	8.2	595.161		1.81	Pelargonin	594.1585	7
60	8.4	565.153		1.39	Apigenin 6-C-glucoside 8-C-arabinoside	564.148	3
74	9.1		313.0681	6.08	(±)-Catechin	290.0790	0
			313.0681		Epicatechin	290.0790	0
75	9.2	433.1121		5.14	Apigenin 7-O-glucoside	432.1056	1
		433.1121			Pelargonidin 3-O-glucoside	432.1056	1
99	10.3	163.0388		4.29	7-Hydroxycoumarin	162.0317	1
120		315.086		0.29	Kaempferol 7,4'-dimethyl ether	314.079	0

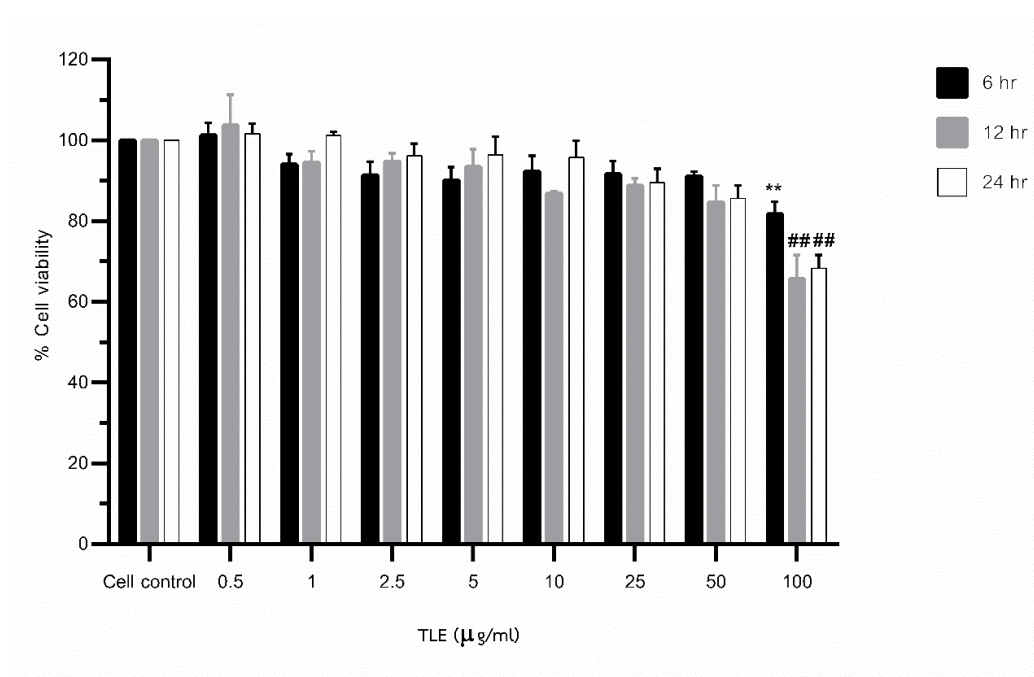
ฐานข้อมูล : METLIN-(CA, USA) และ KNApSACK Keyword Search Web Version 1.000.01

CHULALONGKORN UNIVERSITY

#### 4.1.3 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบรางจืดต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ (0.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และทดสอบระยะเวลาการบ่มต่างๆ (6-24 ชั่วโมง) ศึกษาในเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนู (HT-22) โดยวัดร้อยละการมีชีวิตรอดของเซลล์ พบว่า สารสกัดหยาบใบรางจืดที่ความเข้มข้นสูงสุด 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ส่งผลต่อการลดลงของปริมาณการอยู่รอดของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเซลล์ประสาทมีชีวิตรอดต่ำกว่าร้อยละ 80 ที่เวลา 12

และ 24 ชั่วโมง ในขณะที่เวลา 6 ชั่วโมง แม้ว่าจะมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอดมากกว่าร้อยละ 80 แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุมพบว่า มีปริมาณการมีชีวิตรอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่ความเข้มข้นอื่นๆ (0.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) พบว่า เซลล์มีชีวิตรอดมากกว่าร้อยละ 80 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม แสดงดังรูปที่ 20



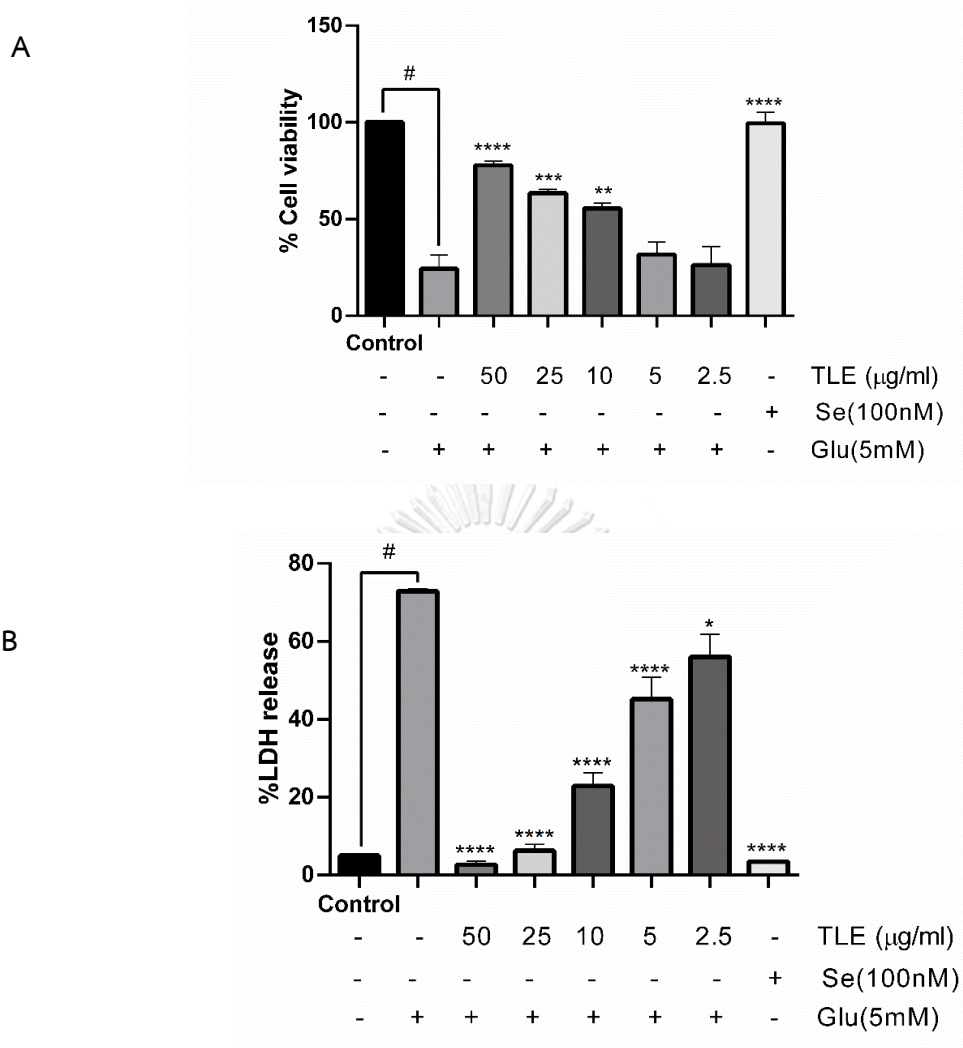
รูปที่ 20 แสดงการมีชีวิตรอดของเซลล์ HT-22

โดยทำการบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ 0.5-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (µg/ml) เวลา 6 12 และ 24 ชั่วโมง (hr) ผลการทดลองแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้ \* $p$  value < 0.05, \*\* $p$  value < 0.01, # $p$  value < 0.005, ### $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับตัวควบคุม(เซลล์ที่ไม่ได้บ่มด้วยสารสกัดหยาบจากใบรางจืด)

#### 4.1.4 การปกป้องของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อความเป็นพิษจากกลูตาเมตในเซลล์

##### ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22

หลังจากทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบผลการปกป้องของสารสกัดต่อความเป็นพิษของกลูตาเมตในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22 ด้วยวิธี MTT โดยเซลล์ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 2.5-50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ( $\mu\text{g/ml}$ ) และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุมเชิงบวกที่ความเข้มข้น 100 นาโนโมลาร์ (nM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ถูกบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (mM) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากผลการทดสอบพบว่าในเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวนี้อัตราการมีชีวิตรอดเพียงร้อยละ 25 เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ขณะที่ในกลุ่มเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-50  $\mu\text{g/ml}$  และสารละลายซีลีเนียมที่ความเข้มข้น 100 nM สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มเซลล์ที่บ่มด้วยกลูตาเมตเพียงอย่างเดียว โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดร้อยละ 56, 63, 78 และ 99 ตามลำดับ และเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดโดยที่สารสกัดความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ได้ดีที่สุด ดังรูปที่ 21.A เพื่อเป็นการเพิ่มความน่าเชื่อถือของผลการทดสอบ ผู้วิจัยได้ทำการวัดความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี LDH จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 2.5-50  $\mu\text{g/ml}$  และสารละลายซีลีเนียม สามารถลดการตายของเซลล์จากความเป็นพิษของ กลูตาเมตได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีอัตราการตายของเซลล์ร้อยละ 56, 45, 22, 6, 3 และ 3 ตามลำดับ โดยที่สารสกัดความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการตายของเซลล์จากความเป็นพิษของกลูตาเมตได้ดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับผลการทดลองข้างต้น ดังแสดงในรูปที่ 21 B

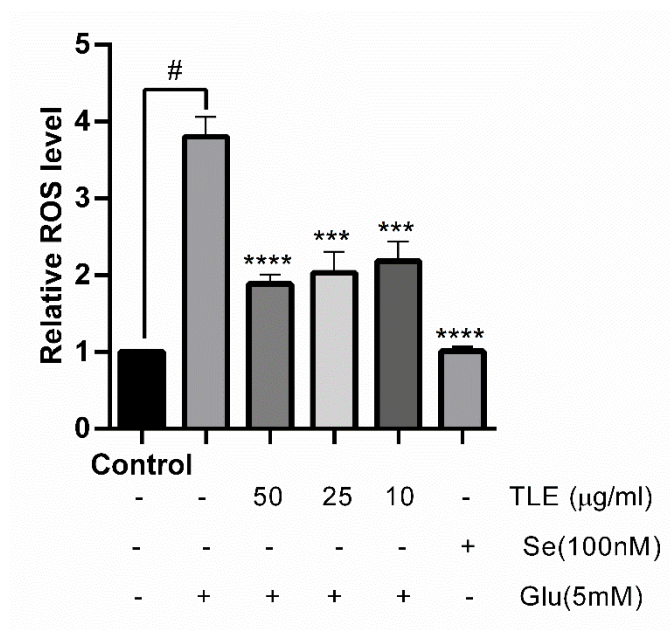


รูปที่ 21 ผลการปกป้องของสารสกัดหยาดจากใบรางจืดต่อความเป็นพิษจากกลูตาเมต

ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22 วัดด้วยวิธี (A) MTT และ (B) LDH เซลล์ HT-22 ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (mM) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้ \* $p$  value < 0.05, \*\* $p$  value < 0.01, \*\*\* $p$  value < 0.005, \*\*\*\* $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วยกลูตาเมตเท่านั้น # $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ (เซลล์กลุ่มควบคุม)

#### 4.1.5 ผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการกระตุ้นการเกิด ROS ด้วยกลูตาเมตในเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22

เพื่อทดสอบความสามารถของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดในการลดการเกิด ROS จากการเหนี่ยวนำด้วยความเป็นพิษของกลูตาเมต ปริมาณ ROS ภายในเซลล์ถูกวัดปริมาณสารเรืองแสงด้วยเทคนิค Flow cytometry จากการทำปฏิกิริยาของ ROS ภายในเซลล์กับสาร 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dihydrofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DFFDA) โดยเซลล์ HT-22 ถูกบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-50 µg/ml ซึ่งสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์จากพิษของกลูตาเมตได้อย่างมีนัยสำคัญ และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวกความเข้มข้น 100 nM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเซลล์ถูกบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากผลการทดสอบพบว่าเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวมีการเพิ่มปริมาณ ROS ภายในเซลล์สูงขึ้นถึง 4 เท่า เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมซึ่งไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ และเมื่อบ่มเซลล์ด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 10-50 µg/ml พบว่าสามารถลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียว และเป็นไปตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มมากขึ้นโดยสารสกัดความเข้มข้น 50 µg/ml สามารถลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์ได้มากที่สุด ดังรูปที่ 22



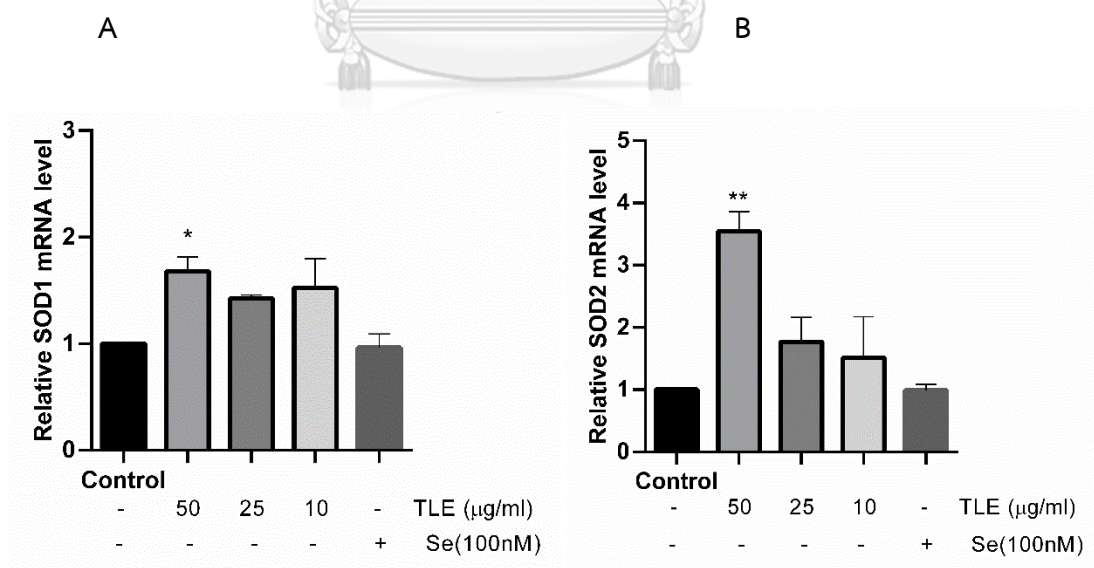
รูปที่ 22 ความสามารถในการลดการกระตุ้นการเกิด ROS ภายในเซลล์ด้วยกลูตาเมต

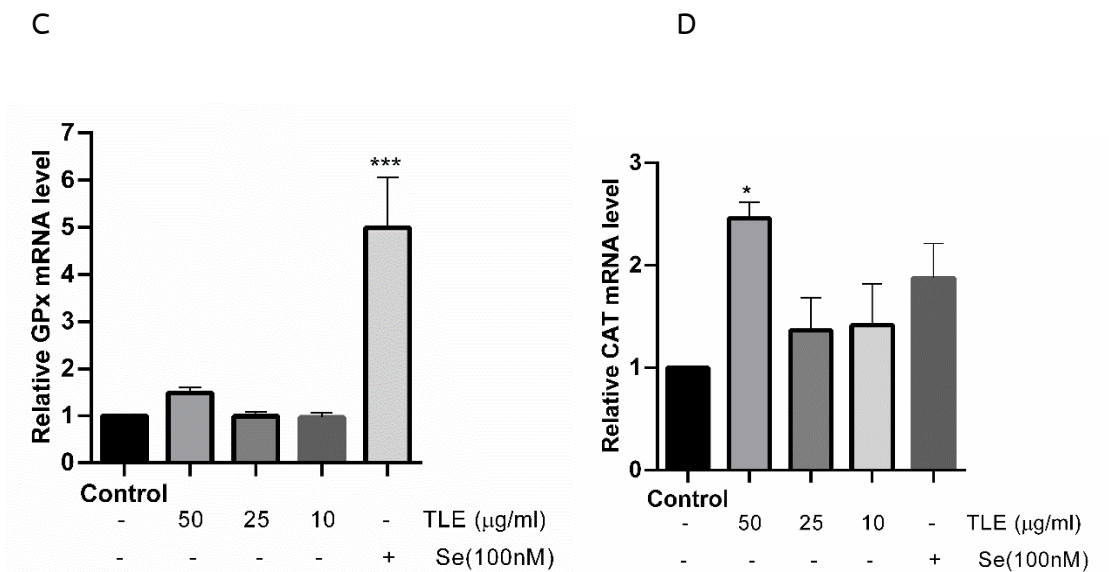
ของสารสกัดหยาบจากใบรางจืด เซลล์ HT-22 ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้นต่างๆ และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธ์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ (mM) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ผลการทดลองจะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้ \* $p$  value < 0.05, \*\* $p$  value < 0.01, \*\*\* $p$  value < 0.005, \*\*\*\* $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์ที่บ่มด้วยกลูตาเมตเท่านั้น # $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ (เซลล์กลุ่มควบคุม)



#### 4.1.6 ผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของยีนต้านอนุมูลอิสระ

เอ็นไซม์มีส่วนสำคัญในกลไกการต้านอนุมูลอิสระ โดยเข้าไปเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของสารอนุมูลอิสระที่ไม่เสถียรให้เป็นโมเลกุลที่มีความเสถียรและไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้โดยเอ็นไซม์ที่สำคัญได้แก่ SOD GPx และ CAT เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ผู้วิจัยได้เลือกศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ SOD1 SOD2 GPx และ CAT โดยใช้เทคนิค Real time-PCR จากผลการทดสอบพบว่า ที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน SOD1, SOD2 และ CAT ในขณะที่สารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์สามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน GPx ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติดังรูปที่ 23 A-D จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบรางจืดสามารถเพิ่มการแสดงออกของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และจากความสามารถนี้อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลให้สารสกัดสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดออกซิเดชันได้





รูปที่ 23 สารสกัดจากใบรางจืดเพิ่มการแสดงออกของยีนในกลุ่มเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

โดยหลังจากเซลล์ HT-22 ถูกบ่มด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เซลล์ถูกนำไปสกัด RNA และทดสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Real time-PCR โดยระดับการแสดงออกของยีน (A) SOD1 (B) SOD2 (C) GPx และ (D) CAT ถูกนำไป normalize ด้วย ยีน  $\beta$ -actin แสดงผลในลักษณะของ fold change พร้อมกับค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้ \* $p$  value < 0.05, \*\* $p$  value < 0.01, \*\*\* $p$  value < 0.005, \*\*\*\* $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ (เซลล์กลุ่มควบคุม)

## 4.2 การศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการตายของเซลล์ประสาทชนิด

### HT-22 ผ่านวิถีอโตฟาจี

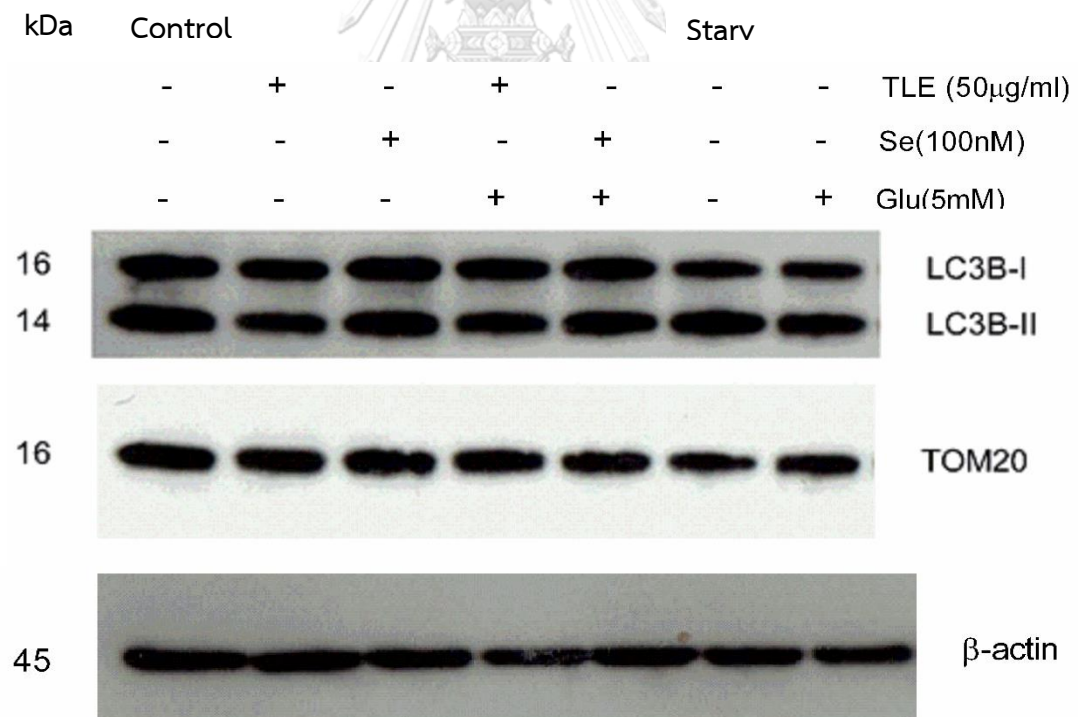
#### 4.2.1 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของโปรตีนในการ บวกรวมการอโตฟาจีและไมโทคอนเดรียโปรตีน ในเซลล์ประสาทชนิด HT-22 ด้วยวิธี

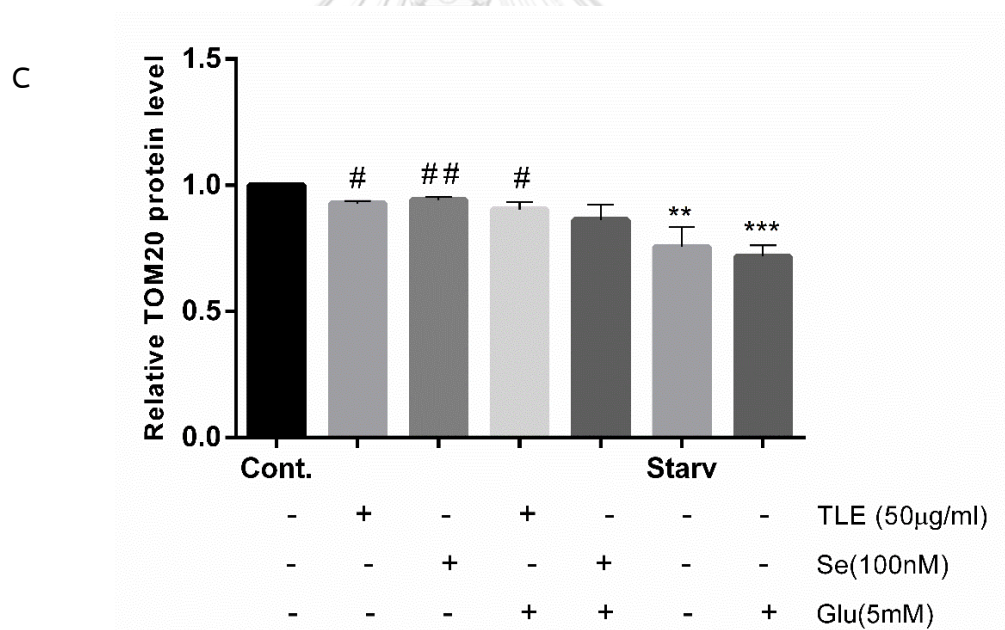
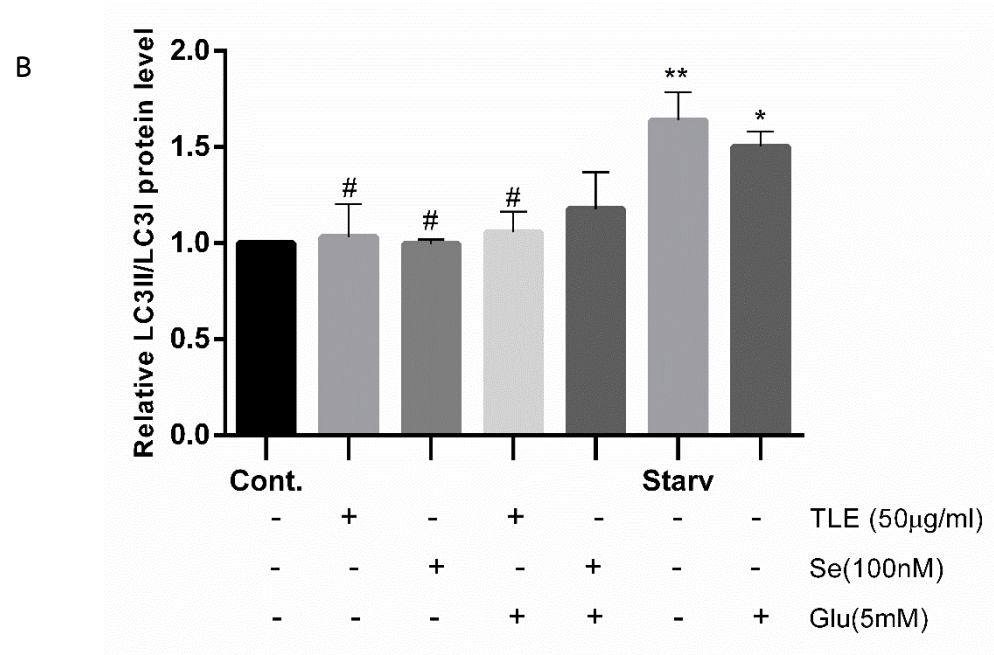
##### Western blot

การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจีมักเกิดจากการกระตุ้นของภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์เป็นระยะเวลานาน LC3 เป็นหนึ่งโปรตีนที่สำคัญที่ช่วยติดตามการเกิดกระบวนการอโตฟาจี โดยเฉพาะ LC3B ซึ่งเป็นไอโซฟอร์มที่มีปริมาณมากและโดดเด่นที่สุด การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน LC3 ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีนที่จำเพาะต่อกระบวนการไมโทคอนเดรีย เป็นการศึกษาที่นิยมใช้บอกการเกิดกระบวนการอโตฟาจีบริเวณไมโทคอนเดรีย (เรียกว่า กระบวนการไมโทฟาจี) ซึ่งพบได้มากที่สุด ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน LC3B ร่วมกับ TOM20 ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียและมีความจำเพาะต่อไมโทคอนเดรียสูง ด้วยวิธี Western blot เซลล์ HT-22 ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ผลการต้านอนุมูลอิสระได้ดีที่สุด และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์ซึ่งเป็นตัวควบคุมเชิงบวก เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตัวควบคุมการเกิดอโตฟาจีในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ที่ถูกอดอาหาร (serum starvation) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน LC3B พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวมีการเพิ่มอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีน LC3B-II ต่อ โปรตีน LC3B-I (LC3B-II/LC3B-I ratio) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่บ่มด้วยสารใดๆ ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดและซีลีเนียมร่วมกับกลูตาเมต สามารถลดอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีน LC3B-II ต่อ LC3B-I ให้กลับมาใกล้เคียงกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่บ่มด้วยสาร

ใดๆ ได้ แสดงดังรูปที่ 24 B ส่วนการทดสอบการแสดงออกของโปรตีน TOM20 พบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวยังมีการลดการแสดงออกของโปรตีน TOM20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่บ่มด้วยสารใดๆ ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดและซีลีเนียมร่วมกับกลูตาเมต สามารถเพิ่มอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีน TOM20 ให้กลับมาใกล้เคียงกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่บ่มด้วยสารใดๆ ได้ แสดงดังรูปที่ 24 C จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบรางจืดที่ความเข้มข้น 50  $\mu\text{g/ml}$  สามารถลดการเกิดกระบวนการไมโทฟาจีที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมตได้ โดยอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบรางจืด

A





รูปที่ 24 การแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการออโตฟาจี LC3B และไมโทคอนเดรียโปรตีน TOM20 ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิด HT-22 เซลล์ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดใบรางจืดที่ความเข้มข้น 50 µg/ml และ/หรือ บ่มด้วยสารละลายซีลีเนียมบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 100 nM จากนั้นถูกบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตที่ความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 18 ชั่วโมง การแสดงออกของโปรตีนถูก

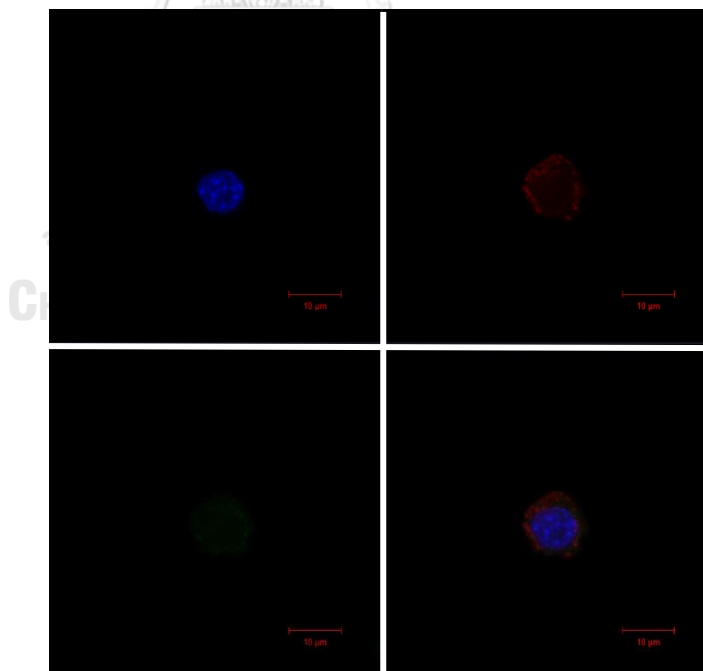
วัดด้วยวิธี Western blot โดยมี (A) แสดงแบนของโปรตีน LC3B-II ต่อ LC3B-I และ TOM20 (B) แสดงกราฟแท่งความสัมพันธ์ของโปรตีน LC3B-II ต่อ LC3B-I (C) แสดงกราฟแท่งความสัมพันธ์ของโปรตีน TOM20 โดยโปรตีนทั้งหมดดังกล่าวถูกนำไป normalize ด้วยโปรตีน  $\beta$ -actin ซึ่งถูกใช้เป็น internal protein control โดยเปรียบเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ แสดงค่าที่ได้ในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้ \* $p$  value < 0.05, \*\* $p$  value < 0.01, \*\*\* $p$  value < 0.005, \*\*\*\* $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ # $p$  value < 0.05, ## $p$  value < 0.01, ### $p$  value < 0.005, #### $p$  value < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียว

#### 4.2.2 การศึกษาผลของสารสกัดเหยาจากใบรางจืดต่อการแสดงออกของโปรตีนในการ บวมการออโตฟาจีและไมโทคอนเดรียโปรตีน ในเซลล์ประสาทชนิด HT-22 ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry (ICC)

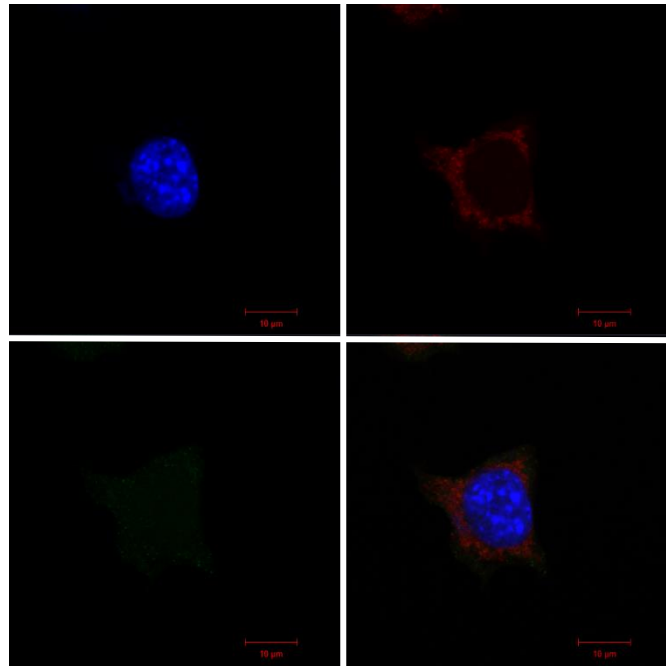
จากผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนแสดงให้เห็นว่ากลูตาเมตสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการออโตฟาจีได้และทำให้ปริมาณของไมโทคอนเดรียโปรตีนลดลง ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันผลที่เกิดขึ้น โดยการตรวจหาตำแหน่งของโปรตีนภายในเซลล์ด้วยเทคนิค ICC ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการตรวจหาการเกิดกระบวนการออโตฟาจี โดยเมื่อเราย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะและติดตามด้วยสัญญาณเรืองแสง หากมีกระบวนการออโตฟาจีเกิดขึ้นจะปรากฏลักษณะจุดใหญ่ๆ ของโปรตีน LC3 เรียกว่า LC3 Puncta เซลล์ HT-22 ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดที่ความเข้มข้น 50  $\mu$ g/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบ่มต่อด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 mM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตัวควบคุมการเกิดออโตฟาจีในการทดลองนี้จะใช้เซลล์ที่ถูกอด

อาหาร (serum starvation) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงร่วมกับ Chloroquine (CQ) ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ ( $\mu\text{M}$ ) ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการรวมกันของอโตฟาโกโซม และไลโซโซมทำให้เราเห็นการสะสมของอโตฟาโกโซมได้ชัดเจนขึ้น เซลล์ HT-22 ถูกย้อมด้วยสีที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย (Mitotracker : สีแดง) โปรตีน LC3 (Alexa 488 : สีเขียว) และ นิวเคลียส (DAPI : สีน้ำเงิน) จากผลการทดสอบพบว่าเซลล์ในกลุ่มที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวมีลักษณะของการเกิด LC3 Puncta ขึ้นอย่างชัดเจน **รูปที่ 25 C** เหมือนกับตัวควบคุมการเกิดอโตฟาจิ ดัง**รูปที่ 25 D** ในขณะที่เซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดร่วมกับกลูตาเมตมีการเกิด LC3 Puncta ลดลงอย่างชัดเจนดัง **รูปที่ 25 E** จากผลการทดสอบในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาดจากใบรางจืดสามารถลดการเกิดกระบวนการอโตฟาจิ ซึ่งนำไปสู่การลดการตายของเซลล์ที่เกิดขึ้น

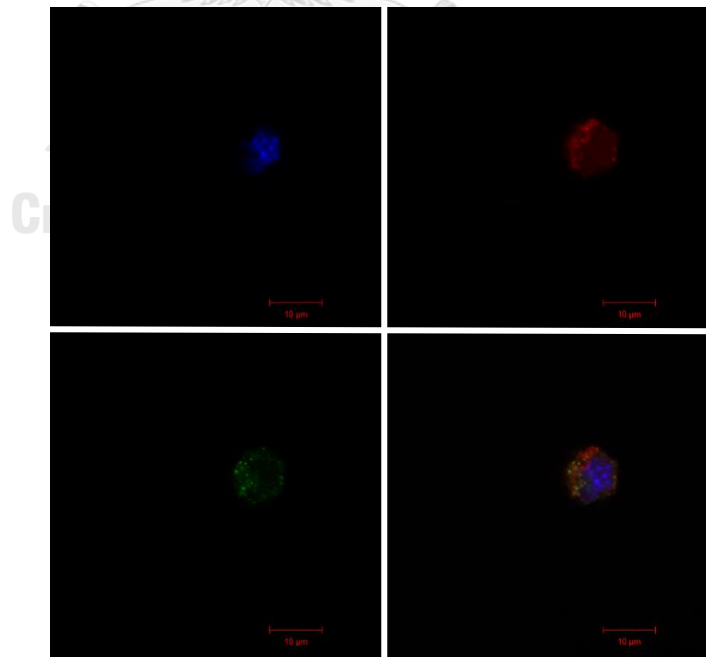
A. Control



B TLE 50  $\mu\text{g/ml}$

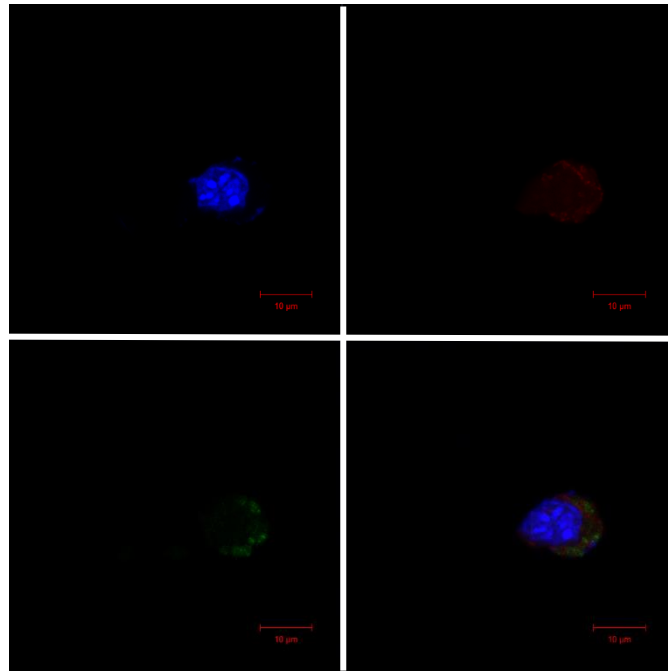
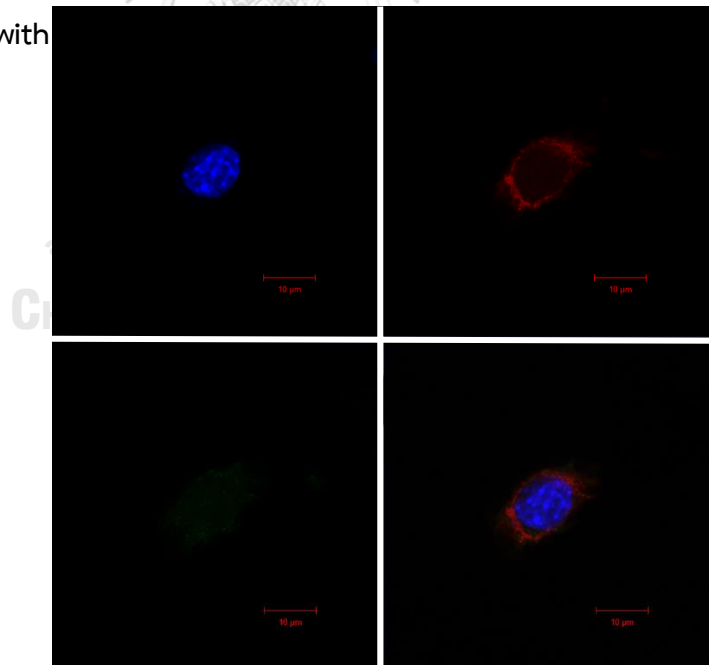


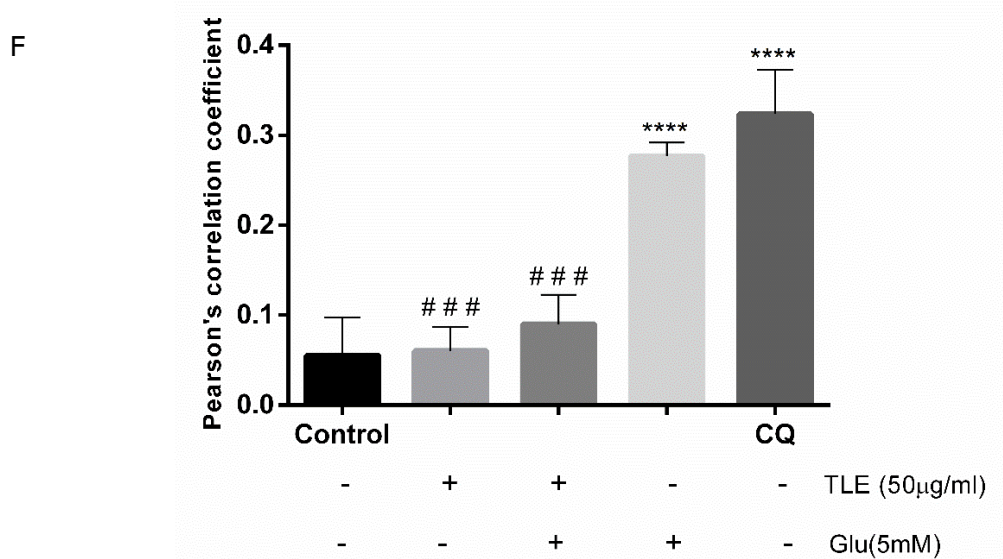
C Glutamate





D CQ

E TLE 50 µg/ml with  
Glutamate



รูปที่ 25 การย้อมสีโปรตีนที่เกี่ยวข้องในกระบวนการออโตฟาจี

(A) เซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ ไม่พบลักษณะของ LC3 Puncta (B) เซลล์ที่ถูกบ่มก่อนด้วยสารสกัดหยาบจากใบรางจืดความเข้มข้น 50 µg/ml ไม่พบลักษณะของ LC3 Puncta (C) เซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 mM เพียงอย่างเดียว พบว่ามีลักษณะของ LC3 Puncta อย่างชัดเจนเช่นเดียวกับ (D) เซลล์กลุ่มตัวควบคุมการเกิดกระบวนการออโตฟาจี และเมื่อ (E) เซลล์ที่ถูกบ่มสารสกัดร่วมกับกลูตาเมต พบว่าลดการเกิด LC3 Puncta อย่างชัดเจน (เซลล์ HT-22 ถูกย้อมด้วยสีที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย (Mitotracker : สีแดง) โปรตีน LC3 (Alexa 488 : สีเขียว) และ นิวเคลียส (DAPI : สีน้ำเงิน) (F) ผลการทดสอบ colocalization โดยพิจารณาจากค่า Pearson's correlation coefficient พบว่าเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสารละลายกลูตาเมตความเข้มข้น 5 mM เพียงอย่างเดียวมีการ colocalization ของ LC3กับไมโทคอนเดรีย เช่นเดียวกับเซลล์กลุ่มตัวควบคุมการเกิดกระบวนการ ออโตฟาจี (Chloroquine 50 µM) และเมื่อเซลล์ที่ถูกบ่มสารสกัดร่วมกับกลูตาเมต พบว่าลดการเกิด colocalization อย่างชัดเจน แสดงค่าที่ได้ในรูปแบบของค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดสอบ 3 ครั้งที่เป็นอิสระต่อกัน และพิจารณาจากค่าดังนี้

\**p value* < 0.05, \*\**p value* < 0.01, \*\*\**p value* < 0.005, \*\*\*\**p value* < 0.0001 โดยเทียบกับ  
กับเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกบ่มด้วยสารใดๆ #*p value* < 0.05, ##*p value* < 0.01, ###*p value* <  
0.005, ####*p value* < 0.0001 โดยเทียบกับเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมต อย่างเดียว



## บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง

โรคความเสื่อมของระบบประสาท เป็นกลุ่มของโรคที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาท มีสาเหตุเกิดจากหลายปัจจัยซึ่งล้วนส่งผลต่อการสูญเสียหรือการตายของเซลล์ประสาทเป็นจำนวนมาก ในผู้สูงอายุมีความเสี่ยงต่อความผิดปกตินี้มากกว่าในวัยอื่นๆ เพราะกลไกป้องกันเซลล์ประสาทต่างๆ มักเสื่อมถอยลง (Cui, Kong et al. 2012) ปัจจุบันยารักษาโรคในกลุ่มนี้มักเป็นการรักษาตามอาการเท่านั้น เช่น ยาในกลุ่ม acetylcholinesterase inhibitor ใช้รักษาภาวะความจำเสื่อมในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ ยาในกลุ่ม dopaminergic เพื่อรักษาการเคลื่อนไหวผิดปกติในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน และยาในกลุ่มต้านการอักเสบต่างๆ เป็นต้น (Chen and Pan 2014) สาเหตุสำคัญของโรคความเสื่อมของระบบประสาทอย่างหนึ่งที่เกิดขึ้นเสมอ คือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Apelt, Bigl et al. 2004 ; Federico, Cardaioli et al. 2012) ซึ่งภาวะดังกล่าวไม่เพียงแต่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคแต่ยังส่งผลถึงการดำเนินไปและความรุนแรงของโรคเพิ่มอีกด้วย (Kim, Kim et al. 2015) ดังนั้นเป้าหมายในการลดการเกิดอนุมูลอิสระที่จะนำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ จึงนับเป็นหนึ่งในกลยุทธ์ที่สำคัญในการช่วยลดโอกาสเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทรวมถึงลดความรุนแรงของโรคได้ สมองเป็นหนึ่งในอวัยวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระหรือ ROS ในปริมาณมากเนื่องจากสมองต้องการพลังงานสูง ทำให้มีการสร้างพลังงานจากปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ในปริมาณมาก (Salim 2017) ในระหว่างการสร้างพลังงานจะมีการเกิด ROS เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยา และจะถูกกำจัดด้วยกลไกป้องกันการสะสมของอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เมื่อไมโทคอนเดรียเกิดการสร้าง ROS สูงผิดปกติหรือกลไกป้องกันดังกล่าวมีความบกพร่อง ส่งผลทำให้เกิดการสะสมของ ROS อย่างต่อเนื่องจนสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์ให้ได้รับความเสียหาย โดยเฉพาะโมเลกุลของสารพันธุกรรม (DNA) โปรตีน รวมถึงไขมัน มีการศึกษาพบว่าในสมองที่มีอายุมากมักมี

การกลายพันธุ์ของ DNA ในไมโทคอนเดรีย จากการทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้นมาก (Angelova and Abramov 2018) และ ROS เป็นสาเหตุให้เกิดการสะสมของ tau protein ส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของ tau protein เป็น neurofibrillary tangles ซึ่งเป็นหนึ่งในความผิดปกติที่มักพบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Liu, Li et al. 2015 ; Chen, Liu et al. 2016) กลไกการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในสมองอีกอย่างหนึ่ง คือ การถูกกระตุ้นจากสาร กลูตาเมต ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทประเภทกระตุ้น (excitatory neurotransmitter) เมื่อในสมองมีปริมาณกลูตาเมตเพิ่มสูงขึ้นผิดปกติ จะส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้โดยผ่านสองวิถี ได้แก่ การกระตุ้นผ่าน receptor ทำให้เกิด excitotoxicity และกระตุ้นโดยไม่ผ่าน receptor สำหรับกระบวนการ excitotoxicity เกิดจากการกระตุ้น receptor ของกลูตาเมต ชนิด N-methyl-D-aspartate receptor (NMDA) ทำให้มีปริมาณแคลเซียมไอออนสะสมภายในเซลล์สูงและส่งผลกระทบต่างๆ มากมาย โดยเฉพาะการกระตุ้นการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ ส่วนการกระตุ้นโดยไม่ผ่าน receptor จะเรียกว่า oxidative glutamate toxicity เกิดจากการที่มีปริมาณกลูตาเมตภายนอกเซลล์สูงซึ่งจะไปยับยั้ง cysteine ไม่ให้เข้าสู่เซลล์ผ่านช่องทางที่เรียกว่า cystine/glutamate antiporter system ส่งผลให้ cysteine เข้าสู่เซลล์ได้น้อยหรือไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้เลยซึ่ง cysteine เป็นสารตั้งต้นของการสร้าง glutathione ภายในเซลล์และเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ ส่งผลให้ระดับของ glutathione ลดลงตามมา จึงเกิดการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหาย และเกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด (Fukui, Song et al. 2009 ; Kumari, Mehta et al. 2012 ; Khadrawy Ya 2014 ; Van Laar, Roy et al. 2015 ; Kritis, Stamoula et al. 2015) อย่างไรก็ตามมียาเพียงไม่กี่ชนิดที่มีเป้าหมายเป็น NMDA receptor antagonist หนึ่งในนั้นคือ memantine ซึ่งให้ผลข้างเคียงเนื่องมาจากความหลากหลายของ receptor subtype ด้วยเหตุนี้เองทำให้การยับยั้งความเป็นพิษของกลูตาเมตผ่านกลไก oxidative glutamate toxicity เป็นอีกหนึ่งกลไกที่สำคัญที่จะ

ช่วยป้องกันการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้ โดยการกระตุ้นของกลูตาเมตแบบไม่ผ่าน receptor สามารถสร้างความเสียหายได้มากกว่าเพราะไม่ต้องคำนึงว่าเซลล์นั้นจะมี receptor ของ กลูตาเมตหรือไม่ (Schubert and Piasecki 2001 ; Liu, Chang et al. 2019) ฉะนั้นเมื่อกลไกการ ต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ทำงานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ การเพิ่มการแสดงออกและการทำงานของสาร ต้านอนุมูลอิสระจึงเป็นสิ่งสำคัญ การบริโภคสารต้านอนุมูลอิสระจากธรรมชาติ นับเป็นอีกหนึ่งวิธีที่จะ ช่วยลดความเสียหายที่เกิดขึ้นได้ สารต้านอนุมูลอิสระที่พบในธรรมชาติมักพบใน ผัก ผลไม้ พืช สมุนไพร และเห็ด โดยสารออกฤทธิ์สำคัญที่พบมักอยู่ในกลุ่ม โพลีฟีนอล แคโรทีนอยด์ วิตามินซี วิตามินอี และ อื่นๆ (Xu, Li et al. 2017) สารต่างๆ เหล่านี้มีบทบาททำให้พืชสมุนไพรมี ความสามารถในการสร้าง ROS ภายในเซลล์และปกป้องการตายของเซลล์ประสาทจากการ กระตุ้นภาวะเครียดออกซิเดชันจากปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นได้

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยใช้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดในตัวทำละลายเอทานอลเพื่อให้ได้ สารสำคัญที่ละลายได้ดีในสารทำละลายอินทรีย์ เช่น สารกลุ่ม apigenin โดยรางจืดเป็นสมุนไพรที่มี คุณสมบัติเชิงสุขภาพต่างๆ มากมาย ทั้งด้านการอักเสบ ด้านแบคทีเรีย และต้านอนุมูลอิสระ (Oonsivilai, Cheng et al. 2008, Oonsivilai and Mario 2008 ; Wirotasangthong, Nagai et al. 2009 ; Jungsi and Siripongvutikorn 2016 ; Jungsi, Siripongvutikorn et al. 2017) ทั้งนี้ การศึกษาในเซลล์ประสาทยังมีไม่มากนัก จากการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดประกอบไปด้วยสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์ปริมาณมาก โดยพบสารประกอบฟีนอลิกมากเนื่องจากสาร ออกฤทธิ์ในพืชสมุนไพรโดยธรรมชาติแล้วจะประกอบไปด้วยสารที่มีขี้และไม่ขี้ในการทดสอบครั้งนี้ สารสกัดหยาบจากใบรางจืดใช้ตัวทำละลายเป็นเอทานอลซึ่งสารประกอบฟีนอลิกนั้นสามารถละลาย ได้ดีในตัวทำละลายที่มีขี้ อันเนื่องมาจากการมีหมู่ไฮดรอกซิลหลายตำแหน่งตามโครงสร้างทางเคมี จึงสามารถวัดค่าปริมาณสารประกอบฟีนอลิกได้มากซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Aryal et al.

2019) เมื่อทำการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่า สารสกัดสามารถกำจัดอนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระเป็นผลมาจากการมีสารประกอบฟีนอลิก และ ฟลาโวนอยด์ รวมถึงสารออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นๆ ที่มีอยู่เป็นจำนวนมากในสารสกัดหยาบใบรางจืด ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงได้ทำการตรวจวิเคราะห์เพื่อทำนายสารออกฤทธิ์ในสารสกัดชนิดนี้ด้วยวิธี LC-MS จากการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล METLIN (CA, USA) พบ สารออกฤทธิ์สำคัญได้แก่ (±)-catechin apigenin-7-O-glucoside pelargonidin-3-O-glucoside 7-hydroxycoumarin โดยพบ (±)-catechin มีปริมาณมากที่สุด สารนี้จัดอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์ที่พบมากเช่นเดียวกับใน ใบชาเขียว (*Camellia sinensis*) และใบชาชนิดอื่นๆ สารชนิดนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยไปจับกับ ROS และเพิ่มการแสดงออกของยีนพวกรีนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้ (Reygaert 2018) นอกจากนี้ (±)-catechin ยังสามารถต้านการอักเสบและต้านมะเร็งได้อีกด้วย (Higdon and Frei 2003 ; Isemura 2019) สารออกฤทธิ์ที่พบมากเป็นอันดับสองคือ apigenin 7-O-glucoside และ pelargonidin 3-O-glucoside apigenin 7-O-glucoside นั้นจัดอยู่ในกลุ่ม ฟลาโวนอยด์เป็นอนุพันธ์ของสาร apigenin ที่มีความสามารถในการละลายได้ดี (Smiljkovic et al. 2017) นอกจากนี้มีการค้นพบสารชนิดนี้ในชาดอกเบญจมาศ (*Chrysanthemum Morifolium*) และชาคาโมมายด์ (*Matricaria recutita* L.) โดยสารนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ต้านมะเร็งและต้านเชื้อราได้ (Wang et al.2018, Mckay and Blumberg 2006) ส่วน pelargonidin 3-O-glucoside หรือ Callistephin นั้นเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจัดอยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ชนิดแอนโทไซยานินที่พบมากใน พืชตระกูลเบอริ์ และถั่ว (Duarte et al. 2018, Fortalezas et al. 2010) สารออกฤทธิ์ชนิดที่พบมากเป็นอันดับที่สามคือ 7 - hydroxycoumarin (umbelliferone) เป็นสารอนุพันธ์ของ Coumarin จัดอยู่ในกลุ่มสารฟีนอลิก สารชนิดนี้มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระโดยพบว่าเพิ่มการแสดงออกของยีนกลุ่มเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ

ได้แก่ SOD และ CAT (Sim et al. 2015) นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ ที่ได้จากการทำนายได้แก่ betaine, pelargonin ฯลฯ สารต่างๆ เหล่านี้น่าจะเป็นสารออกฤทธิ์สำคัญที่ทำให้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและอาจเป็นสารสำคัญที่จะช่วยลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยกลูตาเมตซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทได้

ในการศึกษาความเป็นพิษของกลูตาเมตต่อเซลล์ประสาท เซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ถือเป็นหนึ่งในรูปแบบจำลองชนิดหลอดทดลอง (*in vitro* model) ที่ใช้ในการศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบ oxidative neurotoxicity อย่างแพร่หลาย เนื่องจากเซลล์ชนิดนี้ไม่มีการแสดงออกของ glutamate receptor ชนิด NMDA ทำให้เซลล์ model นี้ถูกใช้ในการศึกษาในรูปแบบการกระตุ้นการเกิด oxidative neurotoxicity แบบไม่ผ่าน receptor (Fukui, Song et al. 2009 ; Liu, Li et al. 2009) ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงได้เลือกใช้เซลล์ HT-22 เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาผลการปกป้องของสารสกัดต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมต จากการศึกษาได้แสดงให้เห็นถึงความเข้มข้นที่ปลอดภัยไม่เป็นพิษของสารสกัดและความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารสกัดต่อเซลล์ HT-22 รวมถึงความสามารถในการปกป้องเซลล์จากพิษของกลูตาเมตโดยสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถเพิ่มการมีชีวิตรอดของเซลล์ และลดการเกิด ROS ภายในเซลล์จากการกระตุ้นด้วยกลูตาเมตได้ โดยที่ ROS ภายในเซลล์สามารถถูกกำจัดได้จากกลไกการต้านอนุมูลอิสระของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ SOD GPx และ CAT โดยเปลี่ยนโมเลกุลที่ไม่เสถียรให้อยู่ในรูปที่เสถียรมากขึ้น ยีนเหล่านี้มีส่วนในการลดการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์หลายชนิด (Li, O et al. 2013) ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาการแสดงออกของยีนเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระต่างๆ ประกอบไปด้วยยีน SOD1 SOD2 GPx และ CAT ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถเพิ่มการแสดงออกของยีน SOD1 SOD2 และ CAT โดยเฉพาะเอ็นไซม์ SOD2 ที่อยู่ในบริเวณเมทริกซ์ของ



ไมโตคอนเดรีย ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ทำหน้าที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระในไมโตคอนเดรีย (Flynn and Melov 2013) ในโรคความเสื่อมของระบบประสาท SOD2 เป็นเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่มีบทบาทสำคัญโดยสามารถลดการสะสมของ  $A\beta$  ในโมเดลของหนูที่เป็นโมเดลของโรคอัลไซเมอร์ได้ (Massaad, Washington et al. 2009 ; Younus 2018) และเมื่อมีการลดระดับเอ็นไซม์ SOD2 ลง ส่งผลให้มีการสะสมของ  $A\beta$  เพิ่มขึ้นอีกด้วย (Feng, He et al. 2014 ; Esposito, Raber et al. 2006) โดยความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระอาจเป็นผลมาจากกลไกการต้านอนุมูลอิสระผ่านวิถี Nrf2/ARE โดยมีงานวิจัยที่พบว่า Nrf2 มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของเอ็นไซม์ในกลุ่มต้านอนุมูลอิสระหลายชนิด และพบการกระตุ้นวิถี Nrf2/ARE ในเซลล์สมองหลายชนิดเพื่อตอบสนองต่อภาวะเครียดออกซิเดชัน (Johnson, Johnson et al. 2008 ; Son, Kawamoto et al. 2013 ; Dinkova-Kostova and Abramov 2015 ; Vasconcelos, Dos Santos et al. 2019) จากผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ดี โดยเป็นผลมาจากสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่หลายชนิด บางชนิดสามารถเข้าทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระได้โดยตรงและบางชนิดมีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ทำให้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถลดการตายของเซลล์ประสาท HT-22 จากภาวะเครียดออกซิเดชันที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมตได้ดี ซึ่งการตายของเซลล์ประสาทที่เกิดจากการกระตุ้นด้วยกลูตาเมตสามารถเกิดขึ้นได้หลายแบบโดยมีปัจจัยสำคัญมาจาก ROS ปริมาณมากที่เกิดขึ้น การตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจีเป็นการตายแบบหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทและสามารถเกิดขึ้นได้จากการกระตุ้นด้วย ROS ปริมาณมาก โดยปกติแล้วกระบวนการอโตฟาจี (Autophagy) เป็นกลไกที่เกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลาและมีส่วนสำคัญในการมีชีวิตรอดของเซลล์ ในภาวะปกติกระบวนการอโตฟาจีทำหน้าที่ในการย่อยสลาย

เซลล์และออร์แกเนลล์ที่เกิดความเสียหายเพื่อนำโมเลกุลต่างๆ มาเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการ เจริญเติบโตของเซลล์ กลไกออโตฟาจีที่พบได้บ่อยคือ กลไกออโตฟาจีแบบ แมคโครออโตฟาจี (macroautophagy) กลไกนี้มีลักษณะเด่นคือเกิดการสร้าง ฟาโกพอร์ (phagophore) ที่มีเยื่อหุ้มสอง ชั้นและมีการสร้าง autophagosome กลไกออโตฟาจีแบบ แมคโครออโตฟาจี สามารถเกิดได้สอง ลักษณะ คือแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ โดยกลไกแมคโครออโตฟาจี แบบจำเพาะมักพบในการ ตอบสนองเบื้องต้นที่ไม่มีเป้าหมายชัดเจนเช่นในภาวะอดอาหาร ส่วนการเกิดกระบวนการ แมคโครออโตฟาจี แบบจำเพาะจะเป็นการตอบสนองต่อออร์แกเนลล์ที่ได้รับความเสียหาย เช่น ไมโทคอนเดรีย เรียกว่า ไมโทฟาจี (mitophagy) ใน peroxisomes เรียกว่า เพกโซฟาจี (pexophagy) เป็นต้น (Feng, He et al. 2014 ; Ding and Yin 2012) สำหรับในเซลล์ประสาทที่อาศัยการทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งพลังงานหลัก กระบวนการไมโทฟาจีจึงมีบทบาทสำคัญในการกำจัดไมโทคอนเดรียที่ได้รับความเสียหายโดยอาศัยการจับกับ receptor ที่จำเพาะเช่น PTEN-induced kinase1 (PINK1) และ Parkin โดยเฉพาะในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันบางรายพบที่มีความผิดปกติของโปรตีน PINK และ Parkin ทำให้มีการสะสมของไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติและเซลล์ประสาทมีภาวะเครียด ออกซิเดชันเกิดขึ้นมาก (Morais, Verstreken et al. 2009 ; Seirafi, Kozlov et al. 2015) อย่างไรก็ตาม กระบวนการออโตฟาจีเมื่อถูกกระตุ้นมากเกินไปก็เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ทั้งทางตรงและการไปกระตุ้นการตายของเซลล์ผ่านวิถีอื่นๆ มีการศึกษาพบว่าในเซลล์ของหนูที่ไม่ได้รับ กลูโคสมีการสะสมของออโตฟาโกโซมและเป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ และในเซลล์ประสาทที่มีความผิดปกติของ Autophagy related 7 (ATG7) สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ทั้งแบบที่อาศัย caspase และ ไม่อาศัย caspase ได้ (Button, Luo et al. 2015)

การตายของเซลล์จากการถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมตสามารถเกิดได้ทั้งการตายแบบ อะพอพโทสิส (apoptosis) ในระยะแรก (12 ชั่วโมง) และเนโครสิส (necrosis) ในระยะหลัง (12-24

ข้าวโม่) (Tan, Sagara et al. 1998 ; Tobaben, Grohm et al. 2011) อย่างไรก็ตามการตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจี (ADCD) เป็นการตายของเซลล์อีกแบบหนึ่งที่สามารถเกิดขึ้นได้ โดยภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นสะสมเป็นเวลานานๆ ทำให้เกิดกระบวนการอโตฟาจีมากกว่าปกติและไม่สามารถควบคุมได้ (Bialik, Dasari et al. 2018) มีการศึกษาพบว่าภาวะเครียดออกซิเดชันสามารถกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์มะเร็งผ่านวิถีอโตฟาจีได้ (McMillan-Ward et al. 2008) และภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้นจากการอดอาหารสามารถกระตุ้นกระบวนการอโตฟาจีได้โดยพบ ROS ภายในเซลล์เป็นปริมาณมาก (Scherz Shouval and Elazar 2009 ; Li, Chen et al. 2013) งานวิจัยในครั้งนี้นพบว่าในเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตเพียงอย่างเดียวมีการเพิ่มขึ้นของกระบวนการอโตฟาจี โดยติดตามผ่านการแสดงออกของโปรตีน LC3B ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่า ในเซลล์ประสาท HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมตมีการตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจีเกิดขึ้น และเมื่อทำการยับยั้งการเกิดกระบวนการอโตฟาจีด้วยสาร 3-Methyladine (3-MA) พบว่าเซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มขึ้น (Kim, Choi et al. 2009) แสดงให้เห็นว่าการตายของเซลล์ HT-22 ที่ถูกกระตุ้นด้วยกลูตาเมตมีความเกี่ยวข้องกับวิถีอโตฟาจี นอกจากนั้นแล้ว ROS ที่เกิดขึ้นยังเข้าไปทำลายไมโทคอนเดรีย ทำให้เราสังเกตเห็นไมโทคอนเดรียมีลักษณะเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ และมีการสูญเสียความต่างศักย์ของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียไป (Kumari, Mehta et al. 2012) ด้วยเหตุนี้เองทำให้ไมโทคอนเดรียมักเป็นเป้าหมายของอโตฟาโกโซมที่จะเข้ามาจับและย่อยสลายไมโทคอนเดรียเหล่านั้น มีการศึกษาพบว่าการที่ระดับกลูตาเมตสูงภายในเซลล์ประสาทส่งผลให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน PINK1 และ Parkin มากขึ้น (Jin, Ni et al. 2018) โดยโปรตีนนี้เป็นมีส่วนสำคัญต่อการเกิดกระบวนการไมโทฟาจี การที่จะติดตามการเกิดไมโทฟาจินั้น สามารถทำได้หลายวิธีหนึ่งในนั้นคือการวัดการแสดงออกของโปรตีนในกระบวนการอโตฟาจี LC3 ร่วมกับโปรตีนที่จำเพาะกับไมโทคอนเดรีย เช่น TOM20 TIM23 เป็นต้น (Yoshii and Mizushima 2017 ; Zhu, Chen et al. 2014)

ผู้วิจัยจึงได้ตรวจการแสดงออกของโปรตีน TOM20 และพบว่าโปรตีนที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย TOM20 มีปริมาณลดลงในเซลล์กลุ่มที่บ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดี่ยว การที่โปรตีนที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย TOM20 มีปริมาณลดลงเป็นผลมาจากการเกิดกระบวนการไมโทฟาจี ซึ่งตอบสนองต่อไมโทคอนเดรียที่เกิดความเสียหายจากภาวะเครียดออกซิเดชัน ในการทดลองนี้กลูตาเมตกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS เป็นปริมาณสูงจนถึงสีเท่าของเซลล์ปกติทำให้ความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียเกิดขึ้นมาก และไมโทคอนเดรียเหล่านั้นจะถูกกำจัดไปด้วยกระบวนการไมโทฟาจีโดยผ่านการทำงานของโปรตีน PINK1 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการไมโทฟาจี เมื่อไมโทคอนเดรียได้รับความเสียหายโปรตีน PINK1 จะส่งสัญญาณให้โปรตีน Parkin เข้ามาบริเวณไมโทคอนเดรียที่ได้รับความเสียหายหลังจากนั้นโปรตีน Parkin จะถูกเติมหมู่ฟอสเฟต เพื่อเริ่มต้นกระบวนการไมโทฟาจี โปรตีนในไมโทคอนเดรีย เช่น mitofusin TOM20 และ voltage-dependent anion channel (VDAC) จะถูกจับด้วยโปรตีน ยูบิวิติน (ubiquitin) ซึ่งเป็นเป้าหมายให้โปรตีน p62 และ LC3II มาจับเพื่อย่อยสลายผ่านการรวมกับ ไลโซโซมต่อไป (Chen, Liu et al. 2016) ด้วยเหตุนี้เองทำให้เซลล์ในกลุ่มที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตอย่างเดียวมักมีการแสดงออกของโปรตีน TOM20 ลดลง ในทางกลับกันเซลล์ในกลุ่มที่บ่มด้วยสารสกัดหยาบจากใบรางจืดก่อนที่จะบ่มด้วยกลูตาเมตสามารถลดการเกิดกระบวนการออโตฟาจีและเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน TOM20 ให้กลับมาอยู่ในปริมาณใกล้เคียงกับเซลล์ปกติได้ เมื่อนำผลการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนทั้งสองชนิดนั้นมาพิจารณาร่วมกันจึงแสดงให้เห็นว่าในกลุ่มเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยสารกลูตาเมตเพียงอย่างเดียวมีการเกิดกระบวนการไมโทฟาจีเพิ่มมากขึ้น และสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถลดการเกิดกระบวนการนี้ลงได้ โดยอาจเป็นผลมาจากไมโทคอนเดรียที่เกิดความเสียหายมีปริมาณลดลงจากการลดปริมาณ ROS ภายในเซลล์โดยความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดใบรางจืดและสารออกฤทธิ์บางชนิดในสารสกัดเช่น apigenin-7-O-glucoside มีส่วนสำคัญในการส่งเสริมให้มีการสร้างไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นโดยผ่านวิถี Nrf2/ARE

เพราะนอกจาก Nrf2 จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระแล้ว Nrf2 ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับในกระบวนการสร้างไมโทคอนเดรียอีกด้วย โดย Nrf2 สามารถกระตุ้น NRF1 ซึ่งเป็นยีนควบคุมโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไมโทคอนเดรีย ได้แก่ mitochondrial transcription factor A (TFAM) mitochondrial transcription factor B1 (TFB1M) และ mitochondrial transcription factor B2 (TFB2M) (Anne Stetler, Leak et al. 2013 ; Holland, Dekker Nitert et al. 2017) การตรวจหากระบวนการไมโทฟาจีนอกจากจะพิจารณาได้จากการแสดงออกของโปรตีนแล้ว ยังสามารถสังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ประเภท confocal microscopy โดยติดตามการเกิด colocalization ของโปรตีนในกระบวนการออโตฟาจีกับโปรตีนที่จำเพาะต่อไมโทคอนเดรีย ยกตัวอย่างเช่น งานวิจัยที่มีการศึกษาในหนูที่มีความผิดปกติของเอ็นไซม์ cytochrome-c-oxidase (COX) ทำให้ไมโทคอนเดรียไม่สามารถสังเคราะห์พลังงานได้ส่งผลให้มีการสะสมของ ROS เมื่อตรวจหากระบวนการไมโทฟาจีก็พบว่ามี การ colocalization ของโปรตีน LC3 และ ไมโทคอนเดรีย (Kogot-Levin, Saada et al. 2016) ดังนั้นเพื่อเป็นการยืนยันการเกิดกระบวนการไมโทฟาจี ผู้วิจัยจึงได้ทำการติดตามตำแหน่งของโปรตีน LC3 กับ ไมโทคอนเดรีย ผลการทดสอบพบว่าในเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยกลูตาเมตเพียงอย่างเดียวมีกระบวนการออโตฟาจีเกิดขึ้นโดยสังเกตได้จากการมี LC3 puncta และพบว่ามี การ colocalization กับไมโทคอนเดรียแสดงให้เห็นว่ากลูตาเมตสามารถกระตุ้นให้เกิดกระบวนการออโตฟาจีและไมตาฟาจีเพิ่มมากขึ้นกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นเพื่อตอบสนองต่อออร์แกนเซลล์ที่เกิดความเสียหายจาก ROS ที่เกิดขึ้นผ่านกลไก glutamate oxidative toxicity แต่ด้วยปริมาณ ROS ที่เพิ่มสูงขึ้นมีปริมาณมากและต่อเนื่อง ทำให้กระบวนการออโตฟาจีเกิดขึ้นมากจนไม่สามารถควบคุมได้ทำให้เซลล์ประสาทชนิด HT-22 ตายเป็นจำนวนมากดังแสดงในการทดลองก่อนหน้าซึ่งเป็นลักษณะสำคัญที่เป็นสาเหตุของโรคความเสื่อมของระบบประสาท ซึ่งสารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถลดการเกิด LC3 puncta และการ colocalization ได้ โดยผลการทดสอบนี้

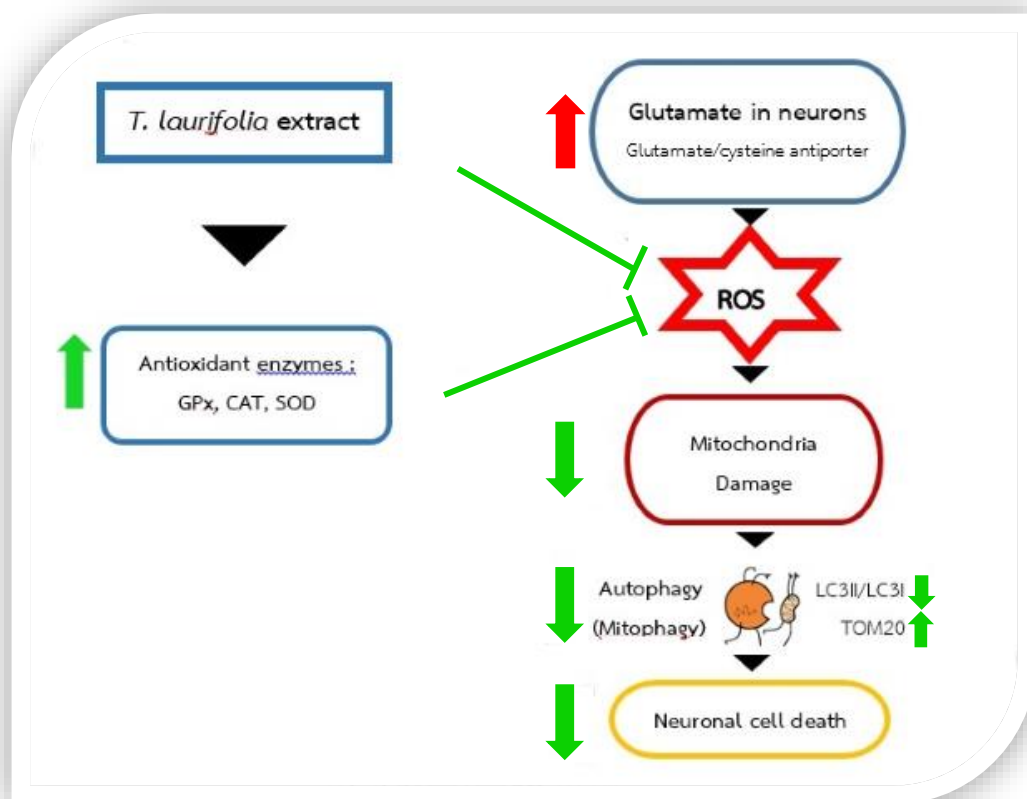
สอดคล้องกับผลการแสดงออกของโปรตีน LC3B และ TOM20 เนื่องมาจากการที่สารสกัดจากใบรางจืดมีสารสำคัญโดยเฉพาะ apigenin-7-O-glucoside และ 7-hydroxycoumarin ซึ่งทำหน้าที่ทั้งจับกับสารอนุมูลอิสระโดยตรงและเพิ่มการแสดงออกของยีนเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระทำให้ ROS และความเสียหายที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยกลูตาเมตลดลง การตอบสนองโดยกลไกออตฟาจีจึงกลับสู่ภาวะที่สมดุลและเซลล์มีชีวิตรอดเพิ่มมากขึ้น

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องการตายของเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสชนิด HT-22 ผ่านวิถีออตฟาจีจากการกระตุ้นด้วยสารกลูตาเมต ซึ่งข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ได้จากการทดลองนี้น่าจะช่วยในการพัฒนายาเพื่อป้องกัน ชะลอ หรือ รักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของระบบประสาทได้ในอนาคตต่อไป

## บทที่ 6 สรุป

### 6.1 สรุป

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากใบรางจืดและ เป็นการสนับสนุนว่าในใบรางจืดมีสารออกฤทธิ์สำคัญหลายชนิดโดยเฉพาะ apigenin -7- O-glucoside และ 7-hydroxycoumarin ซึ่งยังไม่มีรายงานการค้นพบจากสารสกัดใบรางจืดมาก่อน สารเหล่านี้สามารถช่วยในการปกป้องเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 จากเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วยกลูตาเมตได้ โดยสารสกัดหยาบจากใบรางจืดมีความสามารถในการลดอนุมูลอิสระได้โดยตรงและยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ส่งผลให้ลดการเกิด ROS ภายในเซลล์และป้องกันไม่ให้ไมโทคอนเดรียถูกทำลายจากกลไกออกโตฟาจี ทำให้การตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีออโตฟาจีซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคความเสื่อมของระบบประสาทลดลงได้ โดยกลไกทั้งหมดของสารสกัดจากใบรางจืด แสดงในรูปที่ 26 อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาวิจัยอีกมากที่ต้องศึกษาต่อไปในอนาคต เช่น กลไกการต้านอนุมูลอิสระผ่านวิถี ERK/Nrf2 ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในกระบวนการต้านอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้การศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ที่ผ่านการแยกเป็นสารเดี่ยว จัดเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยยืนยันได้ว่าสารเหล่านั้นทำหน้าที่ในการปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชันได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากผลการวิเคราะห์สารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากใบรางจืดมีสารสองชนิดน่าสนใจซึ่งยังไม่มีข้อมูลศึกษาทางวิทยาศาสตร์มาก จึงควรจะนำไปศึกษาต่อไปในอนาคต คือ apigenin -7- O-glucoside และ 7-hydroxycoumarin นอกจากนี้สารสกัดหยาบจากใบรางจืดยังคงต้องการศึกษาในรูปแบบของสัตว์ทดลองและคนต่อไป



รูปที่ 26 แผนภาพสรุปกลไกปกป้องเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22

จากเนื้อมนำภาวะเครียดออกซิเดชันและการตายของเซลล์ผ่านวิถีอโตฟาจีด้วยกลูตาเมต ในภาวะที่กลูตาเมตมีปริมาณสูงในเซลล์ประสาทและสะสมอย่างต่อเนื่องนั้น ส่งผลให้เกิดการสะสมของ ROS ภายในเซลล์ และ ROS เหล่านั้นสามารถเข้าทำลายสร้างความเสียหายให้กับไมโทคอนเดรีย และเกิดการกระตุ้นกระบวนการอโตฟาจีอย่างมากและต่อเนื่อง จนในที่สุดส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท สารสกัดหยาบจากใบรางจืดสามารถเข้าทำปฏิกิริยาเพื่อกำจัด ROS ได้โดยตรง ทั้งยังกระตุ้นการแสดงออกของยีนเอ็นไซม์ต้านอนุมูลอิสระให้เพิ่มมากขึ้น สมองกลไกดังกล่าวนี้จะเข้าไปยับยั้งการเกิดและกำจัด ROS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่งผลทำให้ระดับของ ROS ในเซลล์ลดลงและไมโทคอนเดรียไม่ถูกทำลาย จึงทำให้กระบวนการอโตฟาจีเกิดลดลง เซลล์ประสาทตายลดลง ดังนั้นจึงเป็นการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูชนิด HT-22 ได้



## 6.2 ข้อจำกัดของงานวิจัย

การศึกษานี้วิเคราะห์หาสารสำคัญในสารสกัดรางจืดโดยเทียบกับฐานข้อมูลทำให้ในบางครั้งไม่สามารถแยกสารที่มีค่ามวลต่อประจุที่เท่ากันได้ ทำให้ต้องอาศัยการตรวจยืนยันกับสารมาตรฐานเพิ่มเติม และการศึกษานี้ยังเป็นการศึกษาผ่าน *in vitro* model โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง HT-22 ซึ่งยังขาดลักษณะแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์ เช่นการมีเซลล์ชนิดอื่นล้อมรอบได้แก่ แอสโตรไซต์ และเกลียเซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อปริมาณกลูตาเมตในสมอง



## บรรณานุกรม

- Adjoumani, J. Y., K. Wang, M. Zhou, W. Liu and D. Zhang (2017). Effect of dietary betaine on growth performance, antioxidant capacity and lipid metabolism in blunt snout bream fed a high-fat diet. *Fish Physiol Biochem*, 43(6), 1733-1745.
- Akbar, M., M. M. Essa, G. Daradkeh, M. A. Abdelmegeed, Y. Choi, L. Mahmood and B. J. Song (2016). Mitochondrial dysfunction and cell death in neurodegenerative diseases through nitroxidative stress. *Brain Res*, 1637 34-55.
- Alirezaei, M., G. Jelodar and Z. Ghayemi (2012). Antioxidant Defense of Betaine Against Oxidative Stress Induced by Ethanol in the Rat Testes. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 18(3), 239-247.
- Alirezaei, M., Z. Khoshdel, O. Dezfoulian, M. Rashidipour and V. Taghadosi (2015). Beneficial antioxidant properties of betaine against oxidative stress mediated by levodopa/benserazide in the brain of rats. *J Physiol Sci*, 65(3), 243-252.
- Alzheimer's, A. (2016). 2016 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimers Dement*, 12(4), 459-509.
- Angelova, P. R. and A. Y. Abramov (2018). Role of mitochondrial ROS in the brain: from physiology to neurodegeneration. *FEBS Lett*, 592(5), 692-702.
- Anne Stetler, R., R. K. Leak, Y. Gao and J. Chen (2013). The dynamics of the mitochondrial organelle as a potential therapeutic target. *J Cereb Blood Flow Metab*, 33(1), 22-32.
- Apelt, J., M. Bigl, P. Wunderlich and R. Schliebs (2004). Aging-related increase in oxidative stress correlates with developmental pattern of beta-secretase activity

and beta-amyloid plaque formation in transgenic Tg2576 mice with Alzheimer-like pathology. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, 22 475-484.

Aryal, S., M. K. Baniya, K. Danekhu, P. Kunwar, R. Gurung and N. Koirala (2019). Total Phenolic Content, Flavonoid Content and Antioxidant Potential of Wild Vegetables from Western Nepal. *Plants (Basel)* 8(4).

Bailly, F., C. Maurin, E. Teissier, H. Vezin and P. Cotellet (2004). Antioxidant properties of 3-hydroxycoumarin derivatives. *Bioorg Med Chem*, 12(21), 5611-5618.

Bamberger, M., M. Harris, D. McDonald, J. Husemann and G. Landreth (2003). A Cell Surface Receptor Complex for Fibrillar B-Amyloid Mediates Microglial Activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 23 2665-2674.

Basit, F., S. Cristofanon and S. Fulda (2013). Obatoclox (GX15-070) triggers necroptosis by promoting the assembly of the necrosome on autophagosomal membranes. *Cell death and differentiation*, 20.

Bhatt, J., A. Comas Herrera, F. Amico, N. Farina, J. Wong, J. Orange, S. Gaber, M. Knapp, M. Salcher-Konrad, M. Stevens, D. Australia, W. Grosvenor, D. Ndetei, S. Baker, B. Heuchemer, J. Oetzel, S. Banerjee, J. Hill, D. De Oliveira and P. Wattana (2019). The World Alzheimer Report 2019: Attitudes to dementia.

Bialik, S., S. K. Dasari and A. Kimchi (2018). Autophagy-dependent cell death - where, how and why a cell eats itself to death. *J Cell Sci*, 131(18).

Boonyarikpunchai, W., S. Sukrong and P. Towiwat (2014). Antinociceptive and anti-inflammatory effects of rosmarinic acid isolated from *Thunbergia laurifolia* Lindl. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 124.

- Budina, A., R. Hontz, J. Pimkina and M. Murphy (2013). A conserved domain in exon 2 coding for the human and murine ARF tumor suppressor protein is required for autophagy induction. *Autophagy*, 9.
- Button, R. W., S. Luo and D. C. Rubinsztein (2015). Autophagic activity in neuronal cell death. *Neurosci Bull*, 31(4), 382-394.
- Cesarini, E., L. Cerioni, B. Canonico, G. Di Sario, A. Guidarelli, D. Lattanzi, D. Savelli, M. Guescini, M. G. Nasoni, N. Bigini, R. Cuppini, V. Stocchi, P. Ambrogini, S. Papa and F. Luchetti (2018). Melatonin protects hippocampal HT22 cells from the effects of serum deprivation specifically targeting mitochondria. *PLoS One*, 13(8), e0203001.
- Chan, E., S. Y. Eng, Y. Tan and Z. Wong (2011). Phytochemistry and Pharmacological Properties of *Thunbergia laurifolia*: A Review. *Pharmacognosy Journal*, 3 1–6.
- Cheeptham, N. and G. H. N. Towers (2003). Light-mediated activities of some Thai medicinal plant teas. *Fitoterapia*, 73 651-662.
- Chen, L., R. Na, M. Gu, A. Richardson and Q. Ran (2008). Lipid peroxidation up-regulates BACE1 expression in vivo: a possible early event of amyloidogenesis in Alzheimer's disease. *J Neurochem*, 107(1), 197-207.
- Chen, X. and W. Pan (2014). The Treatment Strategies for Neurodegenerative Diseases by Integrative Medicine. *Integrative Medicine International*, 1(4), 223-225.
- Chen, Y., E. McMillan-Ward, J. Kong, S. J. Israels and S. B. Gibson (2008). Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed and cancer cells. *Cell Death Differ*, 15(1), 171-182.
- Chen, Z., X. Liu and S. Ma (2016). The Roles of Mitochondria in Autophagic Cell Death.

*Cancer Biother Radiopharm*, 31(8), 269-276.

Cherra, S. J., 3rd and C. T. Chu (2008). Autophagy in neuroprotection and neurodegeneration: A question of balance. *Future Neurol*, 3(3), 309-323.

Cho, K. M., T. J. Ha, Y. B. Lee, W. D. Seo, J. Y. Kim, H. W. Ryu, S. H. Jeong, Y. M. Kang and J. H. Lee (2013). Soluble phenolics and antioxidant properties of soybean (*Glycine max* L.) cultivars with varying seed coat colours. *Journal of Functional Foods*, 5(3), 1065-1076.

Christensen, K., G. Doblhammer, R. Rau and J. W. Vaupel (2009). Ageing populations: the challenges ahead. *The Lancet*, 374(9696), 1196-1208.

Codogno, P. and A. J. Meijer (2005). Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2 1509-1518.

Cui, H., Y. Kong and H. Zhang (2012). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct*, 2012 646354.

Davinelli, S., D. Willcox and G. Scapagnini (2012). Extending healthy ageing: Nutrient sensitive pathway and centenarian population. *Immunity & ageing : I & A*, 9 9.

Deepak, S., K. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K. Rangappa, H. Iwahashi, Y. Masuo and G. Agrawal (2007). Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Current genomics*, 8(4), 234-251.

Degtyarev, M., A. Mazière, C. Orr, J. Lin, B. Lee, J. Tien, W. Prior, S. Dijk, H. Wu, D. Gray, D. Davis, H. Stern, L. Murray, K. Hoeflich, J. Klumperman, L. Friedman and K. Lin (2008). Akt inhibition promotes autophagy and sensitizes PTEN-null tumors to lysosomotropic agents. *The Journal of cell biology*, 183 101-116.

- Ding, W. X. and X. M. Yin (2012). Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem*, 393(7), 547-564.
- Dinkova-Kostova, A. T. and A. Y. Abramov (2015). The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function. *Free Radic Biol Med*, 88(Pt B), 179-188.
- Dong, X. X., Y. Wang and Z. H. Qin (2009). Molecular mechanisms of excitotoxicity and their relevance to pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Acta Pharmacol Sin*, 30(4), 379-387.
- Dorn, G. W., 2nd and R. N. Kitsis (2015). The mitochondrial dynamism-mitophagy-cell death interactome: multiple roles performed by members of a mitochondrial molecular ensemble. *Circ Res*, 116(1), 167-182.
- Duarte, L. J., V. C. Chaves, M. Nascimento, E. Calvete, M. Li, E. Ciraolo, A. Ghigo, E. Hirsch, C. M. O. Simoes, F. H. Reginatto and E. M. Dalmarco (2018). Molecular mechanism of action of Pelargonidin-3-O-glucoside, the main anthocyanin responsible for the anti-inflammatory effect of strawberry fruits. *Food Chem*, 247 56-65.
- Erdogan Orhan, I., F. Tosun and B. Sener (2008). Coumarin, Anthroquinone and Stilbene Derivatives with Anticholinesterase Activity. *Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 63 366-370.
- Esposito, L., J. Raber, L. Kekoni, F. Yan, G.-Q. Yu, N. Bien-Ly, J. Puoliväli, K. Scarce-Levie, E. Masliah and L. Mucke (2006). Reduction in Mitochondrial Superoxide Dismutase Modulates Alzheimer's Disease-Like Pathology and Accelerates the Onset of Behavioral Changes in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26 5167-5179.

- Federico, A., E. Cardaioli, P. Da Pozzo, P. Formichi, G. N. Gallus and E. Radi (2012). Mitochondria, oxidative stress and neurodegeneration. *J Neurol Sci*, 322(1-2), 254-262.
- Feng, Y., D. He, Z. Yao and D. J. Klionsky (2014). The machinery of macroautophagy. *Cell Res*, 24(1), 24-41.
- Flynn, J. M. and S. Melov (2013). SOD2 in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration. *Free Radic Biol Med*, 62 4-12.
- Fortalezas, S., L. Tavares, R. Pimpao, M. Tyagi, V. Pontes, P. M. Alves, G. McDougall, D. Stewart, R. B. Ferreira and C. N. Santos (2010). Antioxidant properties and neuroprotective capacity of strawberry tree fruit (*Arbutus unedo*). *Nutrients*, 2(2), 214-229.
- Fox, T. D. (2012). Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly. *Genetics*, 192(4), 1203-1234.
- Fukui, M., J. H. Song, J. Choi, H. Choi and B. Zhu (2009). Mechanism of glutamate-induced neurotoxicity in HT22 mouse hippocampal cells. *European journal of pharmacology*, 617 1-11.
- Gabuzda, D., J. Busciglio, L. B. Chen, P. Matsudaira and B. A. Yankner (1994). INHIBITION OF ENERGY-METABOLISM ALTERS THE PROCESSING OF AMYLOID PRECURSOR PROTEIN AND INDUCES A POTENTIALLY AMYLOIDOGENIC DERIVATIVE. *Journal of Biological Chemistry*, 269 13623-13628.
- Gao, M., P. Monian, Q. Pan, W. Zhang, J. Xiang and X. Jiang (2016). Ferroptosis is an autophagic cell death process. *Cell Research*, 26.
- Ghisso, J. and B. Frangione (2001). Cerebral amyloidosis, amyloid angiopathy, and their

relationship to stroke and dementia. *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, 3 65-73.

Gomes, L. C. and L. Scorrano (2013). Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta*, 1833(1), 205-212.

Gonzalez, P., I. Mader, A. Tchoghandjian, S. Enzenmüller, S. Cristofanon, F. Basit, K. M. Debatin and S. Fulda (2012). Impairment of lysosomal integrity by B10, a glycosylated derivative of Betulinic Acid, leads to lysosomal cell death and converts autophagy into a detrimental process. *Cell death and differentiation*, 19 1337-1346.

Gump, J., L. Staskiewicz, M. Morgan, A. Bamberg, D. Riches and A. Thorburn (2013). Autophagy variation within a cell population determines cell fate via selective degradation of Fap-1. *Nature cell biology*, 16.

Habib, E., K. Linher-Melville, H. X. Lin and G. Singh (2015). Expression of xCT and activity of system xc(-) are regulated by NRF2 in human breast cancer cells in response to oxidative stress. *Redox Biol*, 5 33-42.

Hacıoğlu, C., F. Kar and G. Kanbak (2018). Rat brain synaptosomes: In vitro neuroprotective effects of betaine against fluoride toxicity. *Medical Science and Discovery*, 192-197.

Hajimahmoodi, M., G. Moghaddam, A. M. Ranjbar, H. Khazani, N. Sadeghi, M. R. Oveisi and B. Jannat (2013). Total Phenolic, Flavonoids, Tannin Content and Antioxidant Power of Some Iranian Pomegranate Flower Cultivars (&i&t;Punica granatum&t;/i&t; L.). *American Journal of Plant Sciences*, 04(09), 1815-1820.

Haque, M. N. (2016). Active Ageing Level of Older Persons: Regional Comparison in Thailand. *J Aging Res*, 2016 9093018.



- Harada, A., K. Oguchi, S. Okabe, J. Kuno, S. Terada, T. Ohshima, R. Sato-Yoshitake, Y. Takei, T. Noda and N. Hirokawa (1994). Altered microtubule organization in small-calibre axons of mice lacking tau protein. *Nature*, 369 488-491.
- Heneka, M. T., M. J. Carson, J. E. Khoury, G. E. Landreth, F. Brosseron, D. L. Feinstein, A. H. Jacobs, T. Wyss-Coray, J. Vitorica, R. M. Ransohoff, K. Herrup, S. A. Frautschy, B. Finsen, G. C. Brown, A. Verkhratsky, K. Yamanaka, J. Koistinaho, E. Latz, A. Halle, G. C. Petzold, T. Town, D. Morgan, M. L. Shinohara, V. H. Perry, C. Holmes, N. G. Bazan, D. J. Brooks, S. Hunot, B. Joseph, N. Deigendesch, O. Garaschuk, E. Boddeke, C. A. Dinarello, J. C. Breitner, G. M. Cole, D. T. Golenbock and M. P. Kummer (2015). Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet Neurology*, 14(4), 388-405.
- Hidalgo, M., C. Sánchez-Moreno and S. de Pascual-Teresa (2010). Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *Food Chemistry*, 121(3), 691-696.
- Higdon, J. V. and B. Frei (2003). Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 43(1), 89-143.
- Hippius, H. and G. Neundörfer (2003). The discovery of Alzheimer's disease. *Dialogues in clinical neuroscience*, 5 101-108.
- Holland, O., M. Dekker Nitert, L. A. Gallo, M. Vejzovic, J. J. Fisher and A. V. Perkins (2017). Review: Placental mitochondrial function and structure in gestational disorders. *Placenta*, 54 2-9.
- Holtzman, D. M., J. C. Morris and A. M. Goate (2011). Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med*, 3(77), 77sr71.

- Huang, H. C. and Z. F. Jiang (2009). Accumulated amyloid-beta peptide and hyperphosphorylated tau protein: relationship and links in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 16(1), 15-27.
- Huyut, Z., S. Beydemir and I. Gulcin (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds. *Biochem Res Int*, 2017 7616791.
- Iqbal, K., C. Alonso Adel, S. Chen, M. O. Chohan, E. El-Akkad, C. X. Gong, S. Khatoon, B. Li, F. Liu, A. Rahman, H. Tanimukai and I. Grundke-Iqbal (2005). Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies. *Biochim Biophys Acta*, 1739(2-3), 198-210.
- Isemura, M. (2019). Catechin in Human Health and Disease. *Molecules*, 24(3).
- Jetawattana, S., K. Boonsirichai, S. Charoen and S. Martin (2015). Radical Intermediate Generation and Cell Cycle Arrest by an Aqueous Extract of *Thunbergia Laurifolia* Linn. in Human Breast Cancer Cells. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16 4357-4361.
- Jin, M. F., H. Ni and L. L. Li (2018). Leptin Maintained Zinc Homeostasis Against Glutamate-Induced Excitotoxicity by Preventing Mitophagy-Mediated Mitochondrial Activation in HT22 Hippocampal Neuronal Cells. *Front Neurol*, 9 322.
- Johnson, J. A., D. A. Johnson, A. D. Kraft, M. J. Calkins, R. J. Jakel, M. R. Vargas and P. C. Chen (2008). The Nrf2-ARE pathway: an indicator and modulator of oxidative stress in neurodegeneration. *Ann N Y Acad Sci*, 1147 61-69.
- Junsi, M. and S. Siripongvutikorn (2016). *Thunbergia laurifolia*, a traditional herbal tea of Thailand: Botanical, chemical composition, biological properties and processing influence. *International Food Research Journal*, 23 923-927.

- Junsi, M., S. Siripongvutikorn, C. Yupanqui and W. Usawakesmanee (2017). Phenolic and flavonoid compounds in aqueous extracts of thunbergia laurifolia leaves and their effect on the toxicity of the carbamate insecticide methomyl to murine macrophage cells. *Functional Foods in Health and Disease*, 7 529.
- Kanasi, E., S. Ayilavarapu and J. Jones (2016). The aging population: demographics and the biology of aging. *Periodontology 2000*, 72(1), 13-18.
- Karbowski, M. and R. J. Youle (2003). Karbowski M, Youle RJ.. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 10: 870-880. *Cell death and differentiation*, 10 870-880.
- Kelsey, N., W. Hulick, A. Winter, E. Ross and D. Linseman (2011). Neuroprotective effects of anthocyanins on apoptosis induced by mitochondrial oxidative stress. *Nutr Neurosci*, 14(6), 249-259.
- Khadrawy Ya, E. H. S. A. (2014). Glutamate Excitotoxicity and Neurodegeneration. *Journal of Molecular and Genetic Medicine*, 08(04).
- Kim, G. H., J. E. Kim, S. J. Rhie and S. Yoon (2015). The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Exp Neurobiol*, 24(4), 325-340.
- Kim, H., J. Choi, J. Ryu, S. Park, S. Cho, B. C. Park and D. Lee (2009). Activation of autophagy during glutamate-induced HT22 cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, 388 339-344.
- Knight, L. S., Q. Piibe, I. Lambie, C. Perkins and P. H. Yancey (2017). Betaine in the Brain: Characterization of Betaine Uptake, its Influence on Other Osmolytes and its Potential Role in Neuroprotection from Osmotic Stress. *Neurochem Res*, 42(12), 3490-3503.

- Kogot-Levin, A., A. Saada, G. Leibowitz, D. Soiferman, L. Douiev, I. Raz and S. Weksler-Zangen (2016). Upregulation of Mitochondrial Content in Cytochrome c Oxidase Deficient Fibroblasts. *PLoS One*, 11(10), e0165417.
- Kritis, A. A., E. G. Stamoula, K. A. Paniskaki and T. D. Vavilis (2015). Researching glutamate - induced cytotoxicity in different cell lines: a comparative/collective analysis/study. *Front Cell Neurosci*, 9 91.
- Kubli, D. A. and A. B. Gustafsson (2012). Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res*, 111(9), 1208-1221.
- Kuhlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *BMC Biol*, 13 89.
- Kumar, A., A. Singh and Ekavali (2015). A review on Alzheimer's disease pathophysiology and its management: an update. *Pharmacol Rep*, 67(2), 195-203.
- Kumari, S., S. L. Mehta and P. A. Li (2012). Glutamate induces mitochondrial dynamic imbalance and autophagy activation: preventive effects of selenium. *PLoS One*, 7(6), e39382.
- Lee, S. Y., S. M. Ahn, Z. Wang, Y. W. Choi, H. K. Shin and B. T. Choi (2017). Neuroprotective effects of 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O-beta-D-glucoside from *Polygonum multiflorum* against glutamate-induced oxidative toxicity in HT22 cells. *J Ethnopharmacol*, 195 64-70.
- Leon, J., K. Sakumi, E. Castillo, Z. Sheng, S. Oka and Y. Nakabeppu (2016). 8-Oxoguanine accumulation in mitochondrial DNA causes mitochondrial dysfunction and impairs neuritogenesis in cultured adult mouse cortical neurons under oxidative conditions. *Sci Rep*, 6 22086.

- Leshem, Y., N. Melamed-Book, O. Cagnac, G. Ronen, Y. Nishri, M. Solomon, G. Cohen and A. Levine (2006). Suppression of Arabidopsis vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(47), 18008-18013.
- Li, F., N. Calingasan, F. Yu, W. Mauck, M. Toidze, C. Guimas Almeida, R. Takahashi, G. Carlson, M. Beal, M. Lin and G. Gouras (2004). Increased plaque burden in brains of APP mutant MnSOD heterozygous knockout mice. *Journal of neurochemistry*, 89 1308-1312.
- Li, J., W. O, W. Li, Z. G. Jiang and H. A. Ghanbari (2013). Oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Int J Mol Sci*, 14(12), 24438-24475.
- Li, L., Y. Chen and S. B. Gibson (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cellular Signalling*, 25(1), 50-65.
- Liu, J., L. Chang, Y. Song, H. Li and Y. Wu (2019). The Role of NMDA Receptors in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*, 13 43.
- Liu, J., L. Li and W. Z. Suo (2009). HT22 hippocampal neuronal cell line possesses functional cholinergic properties. *Life Sci*, 84(9-10), 267-271.
- Liu, Y. and B. Levine (2015). Autosis and autophagic cell death: the dark side of autophagy. *Cell Death Differ*, 22(3), 367-376.
- Liu, Y., S. Walter, M. Stagi, D. Cherny, M. Letiembre, W. Schulz-Schaeffer, H. Heine, B. Penke, H. Neumann and K. Fassbender (2005). LPS receptor (CD14): a receptor for phagocytosis of Alzheimer's amyloid peptide. *Brain*, 128(Pt 8), 1778-1789.

- Liu, Z., T. Li, P. Li, N. Wei, Z. Zhao, H. Liang, X. Ji, W. Chen, M. Xue and J. Wei (2015). The Ambiguous Relationship of Oxidative Stress, Tau Hyperphosphorylation, and Autophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2015 352723.
- Ma, Q. (2013). Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 53 401-426.
- Martinez-Vicente, M. (2017). Neuronal Mitophagy in Neurodegenerative Diseases. *Front Mol Neurosci*, 10 64.
- Martinez, A., M. Portero-Otin, R. Pamplona and I. Ferrer (2010). Protein targets of oxidative damage in human neurodegenerative diseases with abnormal protein aggregates. *Brain Pathol*, 20(2), 281-297.
- Massaad, C. A., T. M. Washington, R. G. Pautler and E. Klann (2009). Overexpression of SOD-2 reduces hippocampal superoxide and prevents memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(32), 13576-13581.
- Materska, M. (2014). Flavone C-glycosides from *Capsicum annuum* L.: relationships between antioxidant activity and lipophilicity. *European Food Research and Technology*, 240(3), 549-557.
- Mayo, J., R. Sainz, I. Antoli, F. Herrera, V. Martin and C. Rodriguez (2002). Melatonin regulation of antioxidant enzyme gene expression. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 59 1706-1713.
- McKay, D. L. and J. B. Blumberg (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). *Phytother Res*, 20(7), 519-530.

- Morais, V. A., P. Verstreken, A. Roethig, J. Smet, A. Snellinx, M. Vanbrabant, D. Haddad, C. Frezza, W. Mandemakers, D. Vogt-Weisenhorn, R. Van Coster, W. Wurst, L. Scorrano and B. De Strooper (2009). Parkinson's disease mutations in PINK1 result in decreased Complex I activity and deficient synaptic function. *EMBO Mol Med*, 1(2), 99-111.
- Mutisya, E., A. Bowling and M. Beal (1995). Cortical Cytochrome Oxidase Activity Is Reduced in Alzheimer's Disease. *Journal of neurochemistry*, 63 2179-2184.
- Niedzielska, E., I. Smaga, M. Gawlik, A. Moniczewski, P. Stankowicz, J. Pera and M. Filip (2016). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. *Mol Neurobiol*, 53(6), 4094-4125.
- Olabarria, M., H. N. Noristani, A. Verkhratsky and J. J. Rodriguez (2010). Concomitant astroglial atrophy and astrogliosis in a triple transgenic animal model of Alzheimer's disease. *Glia*, 58(7), 831-838.
- Oonsivilai, R., C. Cheng, J. Bomser, M. Ferruzzi and S. Ningsanond (2008). Phytochemical profiling and phase II enzyme-inducing properties of *Thunbergia laurifolia* Lindl. (RC) extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 114 300-306.
- Oonsivilai, R. and G. Mario (2008). Antioxidant activity and Cytotoxicity of Rang Chuet (*Thunbergia laurifolia* Lindl.) Extracts. *As J Food Ag-Ind*, 1.
- Parsce, D., R. Ghosh and F. Maxfield (1996). Microglial Cells Internalize Aggregates of the Alzheimer's Disease Amyloid Beta-Protein Via a Scavenger Receptor. *Neuron*, 17 553-565.
- Priller, C., T. Bauer, G. Mitteregger, B. Krebs, H. A. Kretschmar and J. Herms (2006). Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 26(27), 7212-7221.

- Reef, S., E. Zalckvar, O. Shifman, S. Bialik, H. Sabanay, M. Oren and A. Kimchi (2006). A Short Mitochondrial Form of p19ARF Induces Autophagy and Caspase-Independent Cell Death. *Molecular cell*, 22 463-475.
- Reuter, S., S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi and B. B. Aggarwal (2010). Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? *Free Radic Biol Med*, 49(11), 1603-1616.
- Reygaert, W. C. (2018). Green Tea Catechins: Their Use in Treating and Preventing Infectious Diseases. *Biomed Res Int*, 2018 9105261.
- Rouaiguia-Bouakkaz, S. and A. Benayahoum (2015). The antioxidant activity of 4-hydroxycoumarin derivatives and some sulfured analogs. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 28(12), 714-722.
- Rubinsztein, D., M. DiFiglia, N. Heintz, R. Nixon, Z.-H. Qin, B. Ravikumar, L. Stefanis and A. Tolkovsky (2005). Autophagy and Its Possible Roles in Nervous System Diseases, Damage and Repair. *Autophagy*, 1 11-22.
- Salim, S. (2017). Oxidative Stress and the Central Nervous System. *J Pharmacol Exp Ther*, 360(1), 201-205.
- Sasmita, A. O. (2019). Current viral-mediated gene transfer research for treatment of Alzheimer's disease. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 35(1), 26-45.
- Savaskan, N., A. Bräuer, M. Kuehbacher, I. Eyupoglu, A. Kyriakopoulos, O. Ninnemann, D. Behne and R. Nitsch (2003). Selenium deficiency increases susceptibility to glutamate-induced excitotoxicity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17 112-114.



- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil and Z. Elazar (2019). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *The EMBO Journal*, 38 e101812.
- Scherz-Shouval, R. and Z. Elazar (2009). Chapter 8 Monitoring Starvation-Induced Reactive Oxygen Species Formation. *Methods in Enzymology*, Academic Press. **452**: 119-130.
- Schubert, D. and D. Piasecki (2001). Oxidative glutamate toxicity can be a component of the excitotoxicity cascade. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(19), 7455-7462.
- Seirafi, M., G. Kozlov and K. Gehring (2015). Parkin structure and function. *FEBS J*, 282(11), 2076-2088.
- Sim, M. O., H. I. Lee, J. R. Ham, K. I. Seo, M. J. Kim and M. K. Lee (2015). Anti-inflammatory and antioxidant effects of umbelliferone in chronic alcohol-fed rats. *Nutr Res Pract*, 9(4), 364-369.
- Smiljkovic, M., D. Stanisavljevic, D. Stojkovic, I. Petrovic, J. Marjanovic Vicentic, J. Popovic, S. Golic Grdadolnik, D. Markovic, S. Sankovic-Babice, J. Glamoclija, M. Stevanovic and M. Sokovic (2017). Apigenin-7-O-glucoside versus apigenin: Insight into the modes of anticandidal and cytotoxic actions. *EXCLI J*, 16 795-807.
- Son, T. G., E. M. Kawamoto, Q. S. Yu, N. H. Greig, M. P. Mattson and S. Camandola (2013). Naphthazarin protects against glutamate-induced neuronal death via activation of the Nrf2/ARE pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 433(4), 602-606.
- Stewart, C. R., L. M. Stuart, K. Wilkinson, J. M. van Gils, J. Deng, A. Halle, K. J. Rayner, L.

- Boyer, R. Zhong, W. A. Frazier, A. Lacy-Hulbert, J. El Khoury, D. T. Golenbock and K. J. Moore (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, 11(2), 155-161.
- Sukprasansap, M., P. Chanvorachote and T. Tencomnao (2017). Cleistocalyx nervosum var. paniala berry fruit protects neurotoxicity against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *Food and Chemical Toxicology*, 103.
- Sun, J., Z. Mei, Y. Tang, L. Ding, G. Jiang, C. Zhang, A. Sun and W. Bai (2016). Stability, Antioxidant Capacity and Degradation Kinetics of Pelargonidin-3-glucoside Exposed to Ultrasound Power at Low Temperature. *Molecules*, 21(9).
- Tan, S., Y. Sagara, Y. Liu, P. Maher and D. Schubert (1998). The Regulation of Reactive Oxygen Species Production during Programmed Cell Death. *The Journal of cell biology*, 141 1423-1432.
- Tilokani, L., S. Nagashima, V. Paupe and J. Prudent (2018). Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem*, 62(3), 341-360.
- Tobaben, S., J. Grohm, A. Seiler, M. Conrad and C. Culmsee (2011). Bid-mediated mitochondrial damage is a key mechanism in glutamate-induced oxidative stress and AIF-dependent cell death in immortalized HT-22 hippocampal neurons. *Cell death and differentiation*, 18 282-292.
- Van Laar, V. S., N. Roy, A. Liu, S. Rajprohat, B. Arnold, A. A. Dukes, C. D. Holbein and S. B. Berman (2015). Glutamate excitotoxicity in neurons triggers mitochondrial and endoplasmic reticulum accumulation of Parkin, and, in the presence of N-acetyl cysteine, mitophagy. *Neurobiol Dis*, 74 180-193.
- Vasconcelos, A. R., N. B. Dos Santos, C. Scavone and C. D. Munhoz (2019). Nrf2/ARE Pathway Modulation by Dietary Energy Regulation in Neurological Disorders. *Front*

*Pharmacol*, 10 33.

Wang, Y., Z. Xu, Y. Huang, X. Wen, Y. Wu, Y. Zhao and Y. Ni (2018). Extraction, Purification, and Hydrolysis Behavior of Apigenin-7-O-Glucoside from *Chrysanthemum Morifolium* Tea. *Molecules*, 23(11).

Weidling, I. and R. H. Swerdlow (2019). Mitochondrial Dysfunction and Stress Responses in Alzheimer's Disease. *Biology (Basel)*, 8(2).

Winter, A. N., E. K. Ross, S. Khatter, K. Miller and D. A. Linseman (2017). Chemical basis for the disparate neuroprotective effects of the anthocyanins, callistephin and kuromanin, against nitrosative stress. *Free Radic Biol Med*, 103 23-34.

Wirotasangthong, M., T. Nagai, H. Yamada, S. Amnuoypol and C. Mungmee (2009). Effects of *Clinacanthus siamensis* leaf extract on influenza virus infection. *Microbiology and immunology*, 53 66-74.

Wonkchalee, O., T. Boonmars, C. Aromdee, P. Laummaunwai, W. Khunkitti, K. Vaeteewoottacharn, P. Sriraj, R. Aukkanimart, W. Loilome, Y. Chamgramol, C. Pairojkul, Z. Wu, A. Juasook and P. Sudsarn (2012). Anti-inflammatory, antioxidant and hepatoprotective effects of *Thunbergia laurifolia* Linn. on experimental opisthorchiasis. *Parasitology research*, 111 353-359.

Xu, D. P., Y. Li, X. Meng, T. Zhou, Y. Zhou, J. Zheng, J. J. Zhang and H. B. Li (2017). Natural Antioxidants in Foods and Medicinal Plants: Extraction, Assessment and Resources. *Int J Mol Sci*, 18(1).

Yacoubian, T. A. (2017). Neurodegenerative Disorders. 1-16.

Yoshii, S. R. and N. Mizushima (2017). Monitoring and Measuring Autophagy. *Int J Mol Sci*, 18(9).

- Younus, H. (2018). Therapeutic potentials of superoxide dismutase. *International journal of health sciences*, 12 88-93.
- Zhang, J. (2013). Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol*, 1(1), 19-23.
- Zhang, M., H. Zhang, H. Li, F. Lai, X. Li, Y. Tang, T. Min and H. Wu (2016). Antioxidant Mechanism of Betaine without Free Radical Scavenging Ability. *J Agric Food Chem*, 64(42), 7921-7930.
- Zhao, G., F. He, C. Wu, P. Li, N. Li, J. Deng, G. Zhu, W. Ren and Y. Peng (2018). Betaine in Inflammation: Mechanistic Aspects and Applications. *Front Immunol*, 9 1070.
- Zhou, Z., G. L. Austin, L. E. A. Young, L. A. Johnson and R. Sun (2018). Mitochondrial Metabolism in Major Neurological Diseases. *Cells*, 7(12).
- Zhu, Y., G. Chen, L. Chen, W. Zhang, D. Feng, L. Liu and Q. Chen (2014). Monitoring mitophagy in mammalian cells. *Methods Enzymol*, 547 39-55.



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
**CHULALONGKORN UNIVERSITY**

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	วุฒิพงษ์ วงศ์ทิพย์
วัน เดือน ปี เกิด	11 มกราคม 2537
สถานที่เกิด	พิษณุโลก
วุฒิการศึกษา	คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ที่อยู่ปัจจุบัน	67/36 ซอยอมร ถนนนางลิ้นจี่ แขวงช่องนนทรี เขตยานนาวา กรุงเทพฯ 10120



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY